

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 19 年度博士課程進学
氏名 城所 聡
指導教員名 篠崎 和子

論文題目

シロイヌナズナの低温誘導性転写因子遺伝子 *DREB1* の発現制御機構の解析

序論

低温、高温、乾燥、高塩濃度といった環境ストレスは、作物の生育や収量に深刻な影響を与える。植物は移動の手段を持たず、これらの環境ストレスに直接さらされるため、環境ストレスに応答したシグナル伝達系を介することにより多数の遺伝子群を発現して耐性を獲得する。シロイヌナズナの転写因子 *DREB1A* は、環境ストレスで誘導される多数の遺伝子のプロモーター領域に存在する DRE 配列に結合して転写を活性化し、環境ストレスに対する耐性を向上させる。*DREB1A* 及びその相同性遺伝子がコードする *DREB1B*、*DREB1C* は転写後調節されることなく活性を有しているため、転写制御機構が、これらの転写因子の機能発現にとってきわめて重要であると考えられる。*DREB1A* 遺伝子の発現レベルは、通常条件下では低く抑えられているが概日リズムによって制御されている。一方、低温条件下では処理後 2 時間から 5 時間を最大として mRNA の蓄積量が一過的に増加する。*DREB1A*、*DREB1B*、*DREB1C* 遺伝子(以下 *DREB1* 遺伝子とする)はプロモーター領域の配列が高度に保存されており、転写開始点から上流-400塩基までの領域中に、Box I から Box VI と名付けられた高い相同性を示す 6 箇所の領

域が存在している。

本研究では、これまでに得られている結果に基づいて、*DREB1C* 遺伝子のプロモーター領域の Box V 及び Box VI を含む領域中に存在する低温条件及び概日条件下で働くシス因子の同定を行った。また、この領域に結合する転写因子として単離された PIF7 の機能解析を行った。さらに、*DREB1C* 遺伝子のプロモーター領域に結合する新規転写因子の単離を試みた。

***DREB1C* 遺伝子のプロモーター中の保存領域 Box V 及び Box VI を含む 65 塩基における転写制御の解析**

DREB1C 遺伝子の転写開始点から上流の-113 から-47 塩基のプロモーター領域中の転写制御に関わる配列を同定するため、この 65 塩基の断片(野生型; 以下 WT 配列とする)及び塩基置換を加えた断片につないだ *GUS* レポーター遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナを作製して、低温条件及び概日条件下における *GUS* mRNA の蓄積量を解析した。その結果、Box V を含む G-box 配列(CACGTG)に変異を加えた配列では低温応答性に変化は見られなかったが、概日条件下でのレポーター遺伝子の mRNA 蓄積量が増加していた。一方、Box VI 及びその 3' 側付近の領域に変異を加えた配列は、概日リズムへの応答性に変化は見られなかったが、低温条件下においてレポーター遺伝子の mRNA 蓄積量の増加が見られなくなった。これらの結果から、Box V 及びその 5' 側の配列が概日リズムに対する応答性を制御し、Box VI 及びその 3' 側の配列が低温に対する応答性を制御していることが示唆された。

Box V 及び Box VI を含む 65 塩基に結合するタンパク質 PIF7 の機能解析

WT 配列を bait とした酵母のワンハイブリッド法によって単離された PIF7 は、光受容体であるフィトクロムとの相互作用を持つ bHLH 型 DNA 結合領域を持つタンパク質である。PIF7 タンパク質が WT 配列に結合することを確認するとともに、結合配列を同定するためにゲルシフト法を行った結果、PIF7 は WT 配列内において G-box に特異的に結合することが示された。G-box 配列は、*DREB1B* 及び *DREB1C* 遺伝子のプロモーター領域には保存されているが、*DREB1A* 遺伝子のプロモーター領域には保存されていない。前

項の結果より、G-box に変異を加えた配列は概日条件下におけるレポーター遺伝子の mRNA 蓄積量の増加を引き起こしたことから、PIF7 は概日条件下において *DREB1C* 遺伝子及び *DREB1B* 遺伝子の転写を抑制する働きを持つことが予想された。

そこで、概日条件下における *DREB1* 及び *PIF7* 遺伝子の mRNA 蓄積量の変化を解析した。その結果、全ての *DREB1* 遺伝子において ZT (Zeitgeber Time; 明期開始からの時間) 7 時間程度をピークとした mRNA 蓄積量の周期的な変動が検出された。ただし、明暗条件下における *DREB1C* 遺伝子のみ暗期において mRNA 蓄積量が増加した。また、*PIF7* 遺伝子については明暗条件下及び恒明条件下ともに ZT4 時間をピークとした mRNA 蓄積量の周期的な変動が検出された。約 1 k 塩基対の *PIF7* 遺伝子のプロモーター領域を用いて制御することで発現させた GUS 及び PIF7-sGFP タンパク質は、形質転換シロイヌナズナの子葉及びロゼッタ葉で検出され、胚軸及び根では検出されなかった。PIF7-sGFP の GFP 蛍光は、特に葉の表側の細胞の核に GFP 蛍光が観察された。GFP 蛍光は、他の PIF で報告された結果と同様に暗条件下では核内で一様であったが、明条件下に短時間置くことにより、顆粒状に強く光っている部位が出現する様子が観察された。しかし、他の PIF とは異なり、明条件下に長時間置いた時にも核全体に蛍光が観察されたことから、PIF7 が長時間の明条件下においても機能できることが示唆された。PIF ファミリーは、シロイヌナズナの光受容体であるフィトクロムや中心振動体の構成因子である TOC1 と相互作用を持つことが報告されている。そこで、PIF7 とタンパク質間相互作用を持つ因子を、プロトプラストを用いたツーハイブリット法及び BiFC 法で探索した結果、PIF7 は PIF ファミリーとホモ及びヘテロの両方の組み合わせで二量体を形成し、フィトクロム B や TOC1 とも相互作用を持つことが示された。

PIF7 の転写因子としての機能を明らかにするために、プロトプラストを用いた一過的な発現系を用いて PIF7 の転写活性化能を解析した結果、PIF7 は N 末側に転写活性化領域を持ち、C 末側にグルタミンを多く含んだ転写抑制領域を持っており、*DREB1C* 遺伝子のプロモーターに対して転写抑制因子として機能しうることが示唆された。PIF7 の植物体での機能を検証するため、*PIF7* 遺伝子の T-DNA 挿入変異植物体 (*pif7*) を単離した。概日条件下における *pif7* 変異植物体での *DREB1* 遺伝子の mRNA 蓄積量を解析した結

果、恒明条件下の主観的暗期において *DREB1B* 及び *DREB1C* 遺伝子の mRNA 蓄積量が野生型と比べて増加した。これらの結果より、PIF7 は *DREB1* 遺伝子のプロモーターにおける保存領域 Box V にある G-box 配列に結合し、*DREB1B* 及び *DREB1C* 遺伝子の概日条件下における転写を抑制する因子であることが示された。

Box V 及び Box VI を含む 65 塩基の配列に結合する新規因子の単離

Box V 及び Box VI を含む 65 塩基の配列に結合する新たな因子を単離するため、G-box に変異を加えた配列を bait として酵母のワンハイブリッドスクリーニング法を行い、結合タンパク質を探索した。その結果、カルモジュリンが結合する部位を有する転写因子 CAMTA2 をコードする cDNA が最も多く単離された。これを含む 6 種類の CAMTA ファミリーについてそれぞれの変異植物体を単離し、低温条件下における *DREB1C* 遺伝子の mRNA 蓄積量を解析したが、顕著な差は検出されなかった。系統解析及び発現解析の結果より、CAMTA ファミリーは互いに相補して機能する可能性が示唆されたことから、現在、多重変異植物体の単離を行っている。

総括

本研究では、*DREB1C* 遺伝子のプロモーター領域中の保存領域 Box V 及び Box VI を含む領域における転写制御に関わる配列の同定とその配列に結合する転写因子の単離及び機能解析を行った。その結果、この領域には、概日リズムにおいて転写を負に制御する配列と低温において正に制御する配列の両方が含まれており、この領域に結合する PIF7 は概日条件下において *DREB1B* 及び *DREB1C* 遺伝子の転写を抑制する因子であった。さらに、転写を正に制御すると考えられる配列に結合する転写因子として CAMTA2 を単離した。今後さらなる上流因子の同定を進めることにより、概日及び低温におけるそれぞれのシグナル経路とその相互作用が明らかになると期待される。

参考文献

Kidokoro S, Maruyama K, Nakashima K, Imura Y, Narusaka Y, Shinwari ZK, Osakabe Y, Fujita Y, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2009) The Phytochrome-Interacting Factor PIF7 Negatively Regulates *DREB1* Expression under Circadian Control in Arabidopsis. *Plant Physiol.* Vol. 151, No. 4, pp2046-2057.