

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 城所 聡

本論文において、第 1 章では序論として本研究の背景と目的について述べた。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ため、植物はストレスに応答したシグナル伝達系を介して多数の遺伝子を発現させ耐性を獲得する。シロイヌナズナの転写因子 *DREB1A* は、環境ストレス誘導性遺伝子のプロモーター中の DRE 配列に結合して転写を活性化し、耐性を向上させる。*DREB1A* の遺伝子発現は通常生育条件下では概日リズムによって制御され、低温条件下で mRNA 蓄積量が一過的に増加する。*DREB1A* とその相同遺伝子 *DREB1B*、*DREB1C* (以下 *DREB1* とする) のプロモーターは、Box I から Box VI と名付けられた領域を含み、高度に保存されている。本論文では、これまでに得られている結果に基づいて、*DREB1C* プロモーターの Box V と Box VI を含む領域中からシス因子の同定を行った。また、この領域に結合する因子として単離された PIF7 の機能解析を行った。さらに、この領域に結合する新規転写因子の単離を試みた。

第 3 章では、*DREB1C* プロモーターの Box V と Box VI を含む 65 塩基の断片 (以下 WT 配列とする) 中のシス因子の同定を行った。WT 配列と変異を加えた断片をつないだ *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、低温条件と概日リズムにおける *GUS* mRNA の蓄積量を解析した。その結果、Box V に変異を加えた配列では概日リズムでの mRNA 蓄積量が増加し、Box VI とその 3' 側付近の領域に変異を加えた配列では、低温処理後に mRNA 蓄積量の増加が見られなかった。これらの結果から、Box V が概日リズムでの発現を、Box VI とその 3' 側の配列が低温に対する応答性をそれぞれ制御することが示唆された。

第 4 章では、WT 配列に結合する因子として単離された PIF7 の機能解析を行った。PIF7 は bHLH 型 DNA 結合領域を持つタンパク質であり、ゲルシフト法を行った結果、WT 配列内において G-box に結合した。前項の結果より、G-box に変異を加えた配列では概日リズムでのレポーター遺伝子の発現が増加したことから、PIF7 は概日リズムでの *DREB1* の発現を抑制する働きを持つことが予想された。プロトプラストを用いた一過的な発現系を用いて PIF7 の転写活性を解析した結果、*DREB1C* 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。植物体での PIF7 の機能を検証するため、*PIF7* の変異植物体での概日リズムにおける *DREB1* 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* と *DREB1C* 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 *DREB1B* と *DREB1C* の概日リズムでの転写を抑制する因子であることが示された。

第 5 章では、WT 配列中の G-box に変異を加えた配列を bait とした酵母のワンハイブリッドスクリーニング法を行った。その結果、転写因子 CAMTA2 をコードする cDNA が最も多く単離された。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。

第 6 章では総括として本研究で得られた結果と考察をまとめた。本研究により、*DREB1C* のプロモーターの Box V と Box VI を含む領域には、概日リズムにおいて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ることが示された。また、この領域に結合する PIF7 は概日リズムでの *DREB1B* と *DREB1C* の転写を抑制する因子であった。さらに、この配列に結合する新規転写因子として 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、概日リズムと低温におけるそれぞれのシグナル経路が明らかになると期待される。

以上、本論文は高等植物の低温耐性の獲得機構で重要な機能を持つ転写因子 DREB1 の発現制御機構における概日リズムでの転写抑制の分子機構を示したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。