

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 20 年度博士課程 進学

氏名 吉田拓実

指導教員 篠崎和子

### 論文題目

シロイヌナズナの転写因子 HsfA1 の高温ストレス応答と  
成長制御における機能解析

#### 序論

植物は行動の自由が無いために、周囲の環境ストレスに順応するための複雑で精巧なしくみを持っている。中でも様々なストレスに対応して遺伝子発現が制御されることは、中心的な順応システムの一つと考えられる。遺伝子発現の制御には各遺伝子のプロモーター中に存在するシス配列に作用する転写因子の機能が重要である。モデル植物のシロイヌナズナにおいて、乾燥ストレス誘導性遺伝子として単離された *RD29A* の発現を制御するシス因子として *DRE* 配列が同定されている。この *DRE* 配列に特異的に作用する転写因子として *DREB1A* と *DREB2A* が単離され、その機能に関して多くの研究が行われた結果、環境ストレス耐性獲得機構においてこれらの転写因子が重要な機能を果たしていることが明らかにされた。

一方、*DREB2A* の発現自体を制御する因子に関する研究はこれまでに行われていなかった。シロイヌナズナのストレス応答において重要な機能を持ち、応用面でも大きな可能性を秘めている *DREB2A* の発現制御機構の解明は、植物が環境ストレス耐性を獲得する仕組みをより深く理解するために重要なテーマと考えられた。*DREB2A* 遺伝子は乾燥や高温ストレスによって強く誘導

されるが、高温ストレス応答に関しては発現のピークが非常に早い。このため *DREB2A* の高温ストレス応答における制御因子を明らかにすることは、植物の高温ストレスに対する初期応答の解明につながることで予想された。植物の高温ストレス応答では、これまでに *HSF* を中心とした遺伝子発現制御のネットワークに関しては多くの解析が行われているが、*DREB2A* の高温ストレスによる発現を制御する因子に関する報告はない。また、植物の高温ストレスに対する初期応答の制御機構についても未解明な点が多く存在している。

そこで、本研究では高温ストレス下での *DREB2A* の発現制御機構を解析すると共に、未だ発現制御が明らかにされていない *HsfA2* 等の高温ストレスに関与する主要な遺伝子の発現制御機構も含めた植物の高温に対する遺伝子発現の初期応答機構の解明を目的とした。

## 1. 高温ストレス下における *DREB2A* の転写活性化因子の解析

これまでに、当研究室では *DREB2A* の発現制御機構を解明するために、プロモーター解析が進められてきた。特に高温ストレス応答に関しては、プロモーター中にある HSE を含む配列が重要であることや、シロイヌナズナの葉肉細胞を用いた一過的遺伝子発現系で、シロイヌナズナの数種の *HSF* がこの HSE 配列を介して転写を活性化することなどが示されたが、植物中で実際に *DREB2A* の発現を制御する因子の同定には至っていなかった。

*DREB2A* を制御する候補を絞り込むために、21 種存在する *HSF* の発現パターンを調べた。オンライン上の遺伝子発現データベースである GENEVESTIGATOR (<https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp>) により *HSF* 全体の遺伝子発現パターンを比較し、さらに、定量的 RT-PCR やプロモーター-*GUS* 融合遺伝子導入植物の染色による発現解析を行った。発現解析と転写活性化解析の結果から *HsfA1* サブファミリーに属する *HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の三遺伝子が *DREB2A* の発現を制御する有力な候補であると考えられた。

これら三遺伝子のそれぞれの過剰発現体やそれぞれの変異体を解析したが、*DREB2A* の高温誘導性は影響を受けなかった。そこで三遺伝子全てが働かなくなった *hsfa1a/b/d* 三重変異体を作成して解析したところ、*DREB2A* の高温ストレス応答が消失することが確認できた。これにより、*DREB2A* の遺伝子発現は *HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の三遺伝子によって機能相補的に行われていることが明らかになった。また、*hsfa1a/b/d* 三重変異体においても、*DREB2A* の乾燥ストレス応答性は維持されていたことから、*DREB2A* の発現誘導は、高温と乾燥で全く異なる制御機構に基づいていることも明らかになった。

## 2. *HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* による高温ストレス応答の制御

*DREB2A* の高温ストレス下での発現制御は *HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の 3 つの遺伝子が機能相補的に働くことによって行われていることが明らかになった。そこで、これらの三遺伝子を介した高温ストレス応答機構を明らかにすることを目的とし研究を行った。

*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* が制御する遺伝子を広く把握するために *hsfa1a/b/d* 三重変異体を用いたマイクロアレイ解析を行った。通常の生育条件下では *hsfa1a/b/d* と野生型株の間で遺伝子発現の差は殆ど見られなかった。一方、高温ストレス処理 1 時間において野生型株と変異体の間で、発現量が 2 倍以上減少する遺伝子が 713 個存在していた。その内プロモーター中に Hsf のシス配列である HSE のコア配列が存在するものは 467 個あり、これらはこの三つの HsfA1 転写因子により直接制御されている可能性が高いと考えられた。発現量が減少していた遺伝子の中には、これまで高温ストレス下において発現誘導される機構が明らかになっていなかった主要な転写因子 *HsfA2* も含まれていた。*HsfA2* の発現は定量的 RT-PCR でも解析し、*hsfa1a/b/d* 三重変異体において高温ストレスによる発現誘導が消失していることが明らかになった。その他にも、高温ストレス耐性の獲得に重要とされているが、それ自身の発現制御機構が明らかになっていなかった *MBF1c*、*B11*、*DGD1* の発現も減少していた。発現が大きく減少した遺伝子には分子シャペロンが多く、*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* は高温ストレス下におけるタンパク質の保護に関する機能において非常に重要な役割を持っていることが明らかになった。多くの遺伝子が誘導されなくなった *hsfa1a/b/d* 三重変異体は野生型株と比較して、明確に高温ストレス耐性が低下していた。

*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の三遺伝子は高温ストレスの前後で発現量があまり変わらないため、高温ストレス時において、その活性レベルは転写後調節などによって制御されていると予想された。各々の HsfA1 タンパク質の動態を調べるために、GFP 融合タンパク質を過剰発現したシロイヌナズナを作出し解析したところ、*HsfA1b*、*HsfA1d* は高温ストレスにより核に移行することが明らかになった。これまでに、動物などでは HSF の局在を HSP90 が制御していることが知られている。また、シロイヌナズナにおいても *HsfA1d* と HSP90 が相互作用することが報告されていた。GFP 融合タンパク質を過剰発現したシロイヌナズナを HSP90 阻害剤である GDA で処理すると、*HsfA1b*、*HsfA1d* の局在は、高温ストレス下とほぼ同等の変化を示した。このことから

HsfA1b、HsfA1d の高温ストレスによる局在変化は HSP90 によって制御されていると考えられた。一方、GDA 処理した野生型株において、DREB2A の遺伝子発現は高温ストレス時の約 20 分の 1 程度しか上昇していなかったことから、HSP90 による局在変化以外にも HsfA1 の活性化を制御する機構が存在すると考えられた。

### 3. HsfA1 サブファミリー遺伝子による生育制御機構の解析

HsfA1 サブファミリー遺伝子は、HsfA1a、HsfA1b、HsfA1d の 3 つに HsfA1e を加えた 4 つの遺伝子で構成されている。高温ストレス下での遺伝子発現の制御は 3 つの HsfA1 によって行われていると考えられるため、HsfA1e は別の役割を担っている可能性が予想された。そこで、HsfA1e の機能及び HsfA1 サブファミリー全体の機能の解析を試みた。

hsfa1a/b/d に hsfale を交配する事で、hsfa1b/d/e 三重変異体及び hsfale 四重変異体を作成した。hsfa1a/b/d/e 四重変異体の遺伝子発現の変化を調べるためにマイクロアレイ解析を行ったところ、hsfa1a/b/d 三重変異体ではほとんど変化がなかった通常の生育条件下でも遺伝子発現が大きく変化していることが示された。このことから、HsfA1 サブファミリー遺伝子は高温ストレス下だけでなく、通常の生育条件下においても遺伝子発現制御に重要な役割を果たしていることが明らかになった。通常の生育条件下でも遺伝子発現が変化している四重変異体では、発芽から枯死するまで、常に生育が遅れることも観察された。

### 4. 総括

本研究によって、高温ストレス下において HsfA1a、HsfA1b、HsfA1d の 3 つの遺伝子が機能相補的に DREB2A を含む多くの高温ストレス誘導性遺伝子の初期応答を制御していることが明らかになった。HsfA1b と HsfA1d は HSP90 の作用により高温ストレスを受けた直後に核へ集積することも明らかとなったが、下流遺伝子の発現誘導には核移行以外にも何らかの活性化の制御を受けていることも示された。また、通常の生育条件下において、HsfA1e を含む 4 つの HsfA1 サブファミリータンパク質は、種々の遺伝子の発現を制御し、植物の生育を支えていることも明らかにした。