

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 吉田 拓実

第1章では、本研究の背景および目的について述べた。植物は周囲の環境ストレスに順応するために遺伝子発現を複雑に制御している。こ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。転写因子 *DREB2A* は高温や乾燥耐性獲得に機能する転写因子として知られている。*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事が予想された。

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、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。

第2章では、高温ストレス下における *DREB2A* の転写活性化因子の解析について述べた。これまでに、*DREB2A* のプロモーター解析の結果から高温誘導には HSE を含む配列が重要であることや、シロイヌナズナの数種の HSF がこの HSE 配列を介して一過的遺伝子発現系において転写を活性化することなどが示されていた。

本研究では、*DREB2A* を制御する候補をさらに絞り込むために、21 種存在する *HSF* の発現パターンを調べ、*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推測した。

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。

第3章では *HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* による高温ストレス応答の制御について述べた。

HsfA1a、*HsfA1b*、*HsfA1d* が制御する遺伝子を広く把握するためにマイクロアレイ解析を行った。高温ストレス処理 1 時間において野生型と変異体の間で、発現量が 2 倍以上減少する遺伝子が 713 個存在していた。発現量が減少していた遺伝子の中には、高温ストレス応答に重要な転写因子 *HsfA2* も含まれていた。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。

HsfA1a、*HsfA1b*、*HsfA1d* の三遺伝子は高温ストレスの前後で発現量がほとんど変化しないため、高温ストレス時にのみに働く活性制御機構の存在が予想された。GFP 融合タンパク質をシロイヌナズナに発現させ、*HsfA1* タンパク質の動態を調べたところ、*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。さらに、HSP90 阻害

剤である GDA 処理による実験から、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 処理した野生型において、*DREB2A* の遺伝子発現はほとんど上昇していなかったことから、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。

第4章では HsfA1 サブファミリー遺伝子による生育制御機構の解析について述べた。*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。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/e 四重変異体を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、通常の生育条件下でも遺伝子発現が大きく変化していた。*HsfA1* サブファミリー遺伝子は、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。このような四重変異体では、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。

第5章では、本研究で得られた結果を総合考察した。本研究によって、高温ストレス下において *HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の三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 を含む四つの 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。

本論文は、高温ストレス下において遺伝子発現誘導される転写因子遺伝子である *DREB2A* の発現解析を行うことで、その高温による発現誘導を制御する転写因子として HsfA1 ファミリーを同定し、HsfA1 ファミリーが多くの高温ストレス誘導性遺伝子を制御する鍵転写因子であることを明らかにしたものである。また、HsfA1 ファミリーの細胞内局在や転写活性化能に関する知見は、高温ストレスの受容から耐性獲得遺伝子群の発現にいたる全容の解明に貢献するものと期待される。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。