

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 吉田拓也
指導教員名 篠崎和子

論文題目

植物ホルモンのアブシシン酸応答性遺伝子発現機構に関する
転写因子 AREB の機能解析

序論

水はすべての生命の源であり、植物においては分布域や生産性を決める最も重要な要素の一つである。植物ホルモンアブシシン酸 (ABA) は植物の水利用に深く関係しており、種子の成熟や発芽、気孔の閉鎖、乾燥ストレス誘導性遺伝子の発現誘導などで重要な役割をはたしている。乾燥や高塩濃度などの水ストレス時には ABA の細胞内濃度が上昇し、ストレス耐性に機能する多くの遺伝子の発現が誘導される。これら ABA 誘導性遺伝子の多くはそのプロモーター領域に ABA 応答配列 (ABRE) をもち、ABRE 配列に結合するタンパク質として AREB/ABF 転写因子が単離された。シロイヌナズナゲノム中には 9 個の AREB/ABF 転写因子が存在するが、そのうち AREB1, AREB2, ABF3 は乾燥、塩、または ABA 処理により栄養生長期の植物体で発現が強く誘導され、ABA を介した乾燥ストレス耐性の獲得に機能する主要な転写因子であることが主に過剰発現体を用いた解析から示唆されていた。しかし、これまでこれら 3 個の AREB/ABF 転写因子についての網羅的な解析はなされておらず、その機能がどの程度重複しているかは明らかにされてこなかった。

本研究では、植物の水ストレス応答機構における ABRE 配列を介した ABA シグナル伝達の分子機構を解明する目的で、シロイヌナズナの AREB/ABF 転写因子の機能解析をおこなった。また、AREB1 をイネに過剰発現させることで乾燥ストレス耐性イネの作出を試みた。

1. シロイヌナズナ AREB/ABF 転写因子の機能解析

1-1. 水ストレス誘導性 AREB1, AREB2, ABF3 の機能解析

水ストレス応答における ABA シグナル伝達の正の制御因子として同様の機能をもつことが示唆されていた水ストレス誘導性転写因子 AREB1, AREB2, ABF3 について、その機能的重複性を明らかにするため、まず AREB/ABF タンパク質についてその細胞内局在性および転写活性化機構を解析した。AREB1, AREB2, ABF3 は既に報告されていた組織特異的遺伝子発現パターンに加え、タンパク質の細胞内核局在性についても類似していることを、GFP 融合タンパク質を用いた解析により示した。また、AREB1 についてのみ遺伝子発現誘導に加えリン酸化による活性化を受けていることが報告されていたが、葉肉細胞由来プロトプラストを用いた一過的発現実験により AREB1, AREB2, ABF3 が最大活性化を示すには共通して ABA が必要であることを明らかにした。この ABA による活性化は、イネ AREB/ABF オルソログにおいても同様であった。SRK2D タンパク質キナーゼは AREB1 のリン酸化を制御する重要な上流活性化因子の一つであるが、AREB1, AREB2, ABF3 は SRK2D と植物細胞内の核で相互作用することが示された。以上の結果は、AREB1, AREB2, ABF3 タンパク質がその機能や細胞内局在性について類似していることを示しており、機能重複が存在することが示唆された。

機能的に重複していることが考えられた AREB/ABF 転写因子について、先行研究で用いられた過剰発現体に付随する異所的発現の問題や、機能重複による問題を回避するため、*areb1 areb2 abf3* 三重変異体を作成し、AREB1, AREB2, ABF3 の植物体における機能を解析した。*areb1 areb2 abf3* 三重変異体は野生型植物やその他の一重および二重変異体と比較して顕著に乾燥ストレス耐性が低下しており、栄養生長期の主根の伸長における ABA 感受性も著しく低下していた。さらに、*areb1 areb2 abf3* 三重変異体を用いた網羅的なトランスクリプトーム解析により、*areb1 areb2 abf3* 三重変異体では水ストレス時に水ストレス応答性遺伝子発現が大きく損なわれていることが示された。このマイクロアレイ解析により同定された新規 AREB/ABF 標的遺伝子には多数の LEA タンパク質遺伝子、グループ A PP2C タンパク質脱リン酸化酵素遺伝

子、種々の転写因子遺伝子が含まれており、その多くはプロモーター領域に ABRE 配列を保持していた。

以上の結果から、AREB1, AREB2, ABF3 が乾燥ストレス応答での ABA シグナル伝達を介した ABRE 配列依存的な遺伝子発現制御において中心的な転写因子として協調的に機能し、その活性化には ABA が必要であることを明らかにした。

1-2. ABA を介した水ストレス応答における ABF1 の機能解析

ここまで、AREB1, AREB2, ABF3 が水ストレス応答での ABA を介した ABRE 配列依存的な遺伝子発現制御において、中心的な役割をはたす転写因子であることを明らかにした。また、最近の報告によりこの AREB/ABF 転写因子による遺伝子発現制御が 3 個の SnRK2 タンパク質キナーゼを介した発現制御系の一部として機能していることが示され、同時に、AREB1, AREB2, ABF3 以外の因子が SnRK2 の下流で機能していることが示唆された。AREB1, AREB2, ABF3 は系統樹上で同一の群に属するが、この群に含まれる ABF1 は水ストレスによる遺伝子発現誘導が顕著でないことから水ストレス応答への関与は解析されてこなかった。そこで、水ストレス応答時の AREB/ABF 転写因子の役割を総合的に理解することを目的に、ABF1 が水ストレス応答における ABA シグナル伝達に関与しているかどうかを明らかにするため、*areb1 areb2 abf3 abf1* 四重変異体を作成し、*areb1 areb2 abf3* 三重変異体と比較解析をおこなった。

areb1 areb2 abf3 abf1 四重変異体は *areb1 areb2 abf3* 三重変異体と比較して栄養生長期の主根の伸長においてわずかな ABA 感受性の低下を示した。また、マイクロアレイ解析により、四重変異体において水ストレス時に顕著に発現が低下している遺伝子のうち SnRK2 の標的遺伝子に含まれる遺伝子の数が三重変異体と比較して増加していることが示された。さらに、ABF1 タンパク質は AREB1, AREB2, ABF3 と同様にその最大活性化に ABA を必要とし、根における細胞内局在は AREB1 と類似していた。以上の結果から、ABF1 が栄養生長期の ABA シグナル伝達において AREB1, AREB2, ABF3 と重複した機能をもっていることが示唆された。

2. シロイヌナズナ AREB1 過剰発現イネの解析

AREB/ABF 転写因子はシロイヌナズナの ABA を介した遺伝子発現制御において中心的な役割をもっているが、シロイヌナズナとイネでは ABRE 配列

や AREB/ABF 転写因子など ABA を介した遺伝子発現制御に関与する因子が共通して保存されていることから、AREB/ABF 転写因子が水ストレス耐性イネの分子育種に有用であることが考えられた。AREB1 はシロイヌナズナの AREB/ABF 転写因子のうち最も解析が進んでおり、活性化型 AREB1 を過剰発現したシロイヌナズナは乾燥ストレス耐性が向上することが報告されている。そこで、AREB1 および活性化型 AREB1 をイネに過剰発現させることで乾燥ストレス耐性イネの作出を試みた。

AREB1 を過剰発現する形質転換イネは幼植物体においてわずかな生育の遅延を示したが、乾燥ストレス耐性の向上を示した。また、出穂期の植物体ではコントロール植物と比較して乾燥ストレスによる葉の老化が遅れ、乾燥ストレスによる収量の低下が緩和された。これらの結果から異所的に発現したシロイヌナズナ AREB1 がイネの乾燥ストレス耐性の獲得に寄与していることが示唆された。

結論

本研究により、水ストレス誘導性転写因子 AREB1, AREB2, ABF3 が水ストレス応答における ABA を介した ABRE 配列依存的な遺伝子発現制御において中心的な役割をはたしていることを明らかにした。また、AREB/ABF の最大転写活性化には ABA が必要であることを示し、その機構が陸上植物で保存されていることを示唆した。さらに、網羅的なトランスクリプトーム解析により AREB/ABF 転写因子の新規標的遺伝子を多数同定し、ABA を介した ABRE 配列依存的な LEA タンパク質遺伝子、PP2C タンパク質脱リン酸化酵素遺伝子、種々の転写因子遺伝子の発現が乾燥ストレス耐性の獲得に重要であることを示した。加えて、シロイヌナズナ AREB1 をイネに過剰発現させることで乾燥ストレス耐性が向上することを示し、AREB/ABF 転写因子が水ストレス耐性イネの分子育種に有用であることを示唆した。

発表論文

Yoshida T, Fujita Y, Sayama H, Kidokoro S, Maruyama K, Mizoi J, Shinozaki K, and Yamaguchi-Shinozaki K. (2010) AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant J* 61: 672-685.