

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成21年度博士課程 入学

氏 名 金 俊植

指導教員名 篠崎 和子

論文題目

シロイヌナズナの環境ストレス応答性遺伝子 *DREB2A* の 水ストレスに対する転写調節機構の解析

栽培作物を含め、一般的な植物は移動の自由を持たないため、生育環境が悪化しても、その場で耐えて生育をし続けねばならない。そのため植物は水分や温度、光条件などの周辺環境の変化を機敏に感知し、的確に応答する機構を発達させてきた。近年の分子遺伝学的手法の発達により、植物の環境ストレス応答機構に数多くの遺伝子が寄与していることが解明されつつある。シロイヌナズナの Dehydration-Responsive Element-Binding protein 2A (*DREB2A*) は乾燥や高塩などの水ストレスや高温ストレスに応答する遺伝子群の転写調節因子として、植物の環境ストレス耐性獲得に重要な役割を果たしている。

DREB2A はその遺伝子自体の発現もストレス応答性を示す。乾燥や高塩などの水ストレス処理や高温ストレス処理によって、*DREB2A* の転写産物量は素早く上昇を始め、最大で処理前の約 250 倍に達する。さらにこれらのストレス処理に対する転写産物の蓄積パターンの違いから、*DREB2A* の両ストレスに対する応答機構が独立的であることが示唆されており、そのうち高温ストレス誘導性は、*DREB2A* プロモーター領域上の HSE 配列と HsfA1 転写因子群の相互作用によって

制御されることが明らかになっている。しかし、*DREB2A* 遺伝子の水ストレス応答性機構については未だに不確かな点が多い。その機構の解明のため、先行研究において *DREB2A* プロモーター領域のデリーションシリーズの作製およびストレス環境下での活性測定が行われた。

本研究では、先行研究の結果を元に、*DREB2A* プロモーター領域における *DREB2A* の水ストレス応答性を担うシス因子、相互作用する転写因子の探索および解析を行った。さらに、ストレス非存在下で *DREB2A* の転写抑制機構を担うプロモーター領域を同定し、その転写抑制に関与するシス因子と転写因子の探索および解析を行った。

アブシシン酸応答性シス因子 ABRE を介した *DREB2A* の乾燥ストレス応答機構

DREB2A の転写開始点の上流 -147 から -55 塩基対のプロモーター領域 (D 領域) が示す乾燥ストレス応答性機構を解明するため、シス因子の探索を行った。データベース検索により ABA-Responsive Element (ABRE) と Coupling Element 3 (CE3) 類似配列が予測されたため、*DREB2A* プロモーター領域上の該当配列に塩基置換を導入して活性を測定し、この二つのシス因子が *DREB2A* の乾燥ストレス応答性に強く関与していることを証明した。ABRE と相互作用する転写因子としては、既存の報告から ABRE シス因子との相互作用が多数報告されている ABRE-Binding protein 1 (AREB1)、AREB2 そして ABRE-Binding Factor 3 (ABF3) の三つの AREB/ABF 転写因子が予測された。酵母ワンハイブリッド法やクロマチン免疫沈降法、シロイヌナズナのプロトプラストを用いた一過的発現系を用いた実験の結果、三つの AREB/ABF が ABRE 依存的に *DREB2A* プロモーターと相互作用し、その転写活性を上昇させることが明らかになった。この結果は三つの AREB/ABF 転写因子が *DREB2A* プロモーターが持つ乾燥ストレス応答性に関与する可能性を示唆するものである。

AREB/ABF は ABA を介する水ストレスシグナル経路で中心的な役割を果たす転写因子であるため、*DREB2A* のプロモーター活性が ABA シグナル経路の影響を受けていることが推測された。そこで、三つの AREB/ABF の三重変異体を含む、ABA シグナル経路の機能に欠損があるいくつかの変異体を用いて、乾燥ストレス存在下での *DREB2A* 遺伝子の転写産物量の比較を行った。その結果、変異体間の差は存在するものの、用いた全ての変異体で *DREB2A* の乾燥ストレスに対する転写応答性の顕著な低下が観察された。しかし、典型的な ABA 応答性遺伝子とは異なり、*DREB2A* の乾燥応答性はこれらの変異体においても、ある程度保持されていた。従って、*DREB2A* の水ストレス応答性は、AREB/ABF を含む ABA シグナル経路の制御を受けているが、ABA シグナル経路以外の経路も *DREB2A* の転写に関与すると考えられる。

新規転写因子 GRF7 によるストレス非存在下での DREB2A 転写抑制機構

DREB2A プロモーターのデリベーションシリーズにおいて、*DREB2A* の転写開始点の上流 -314 から -272 塩基対のプロモーター領域 (S 領域) が存在するプロモーター断片では、ストレス非存在下でのプロモーター活性が抑制される傾向が示されたため、その機構の解明に挑んだ。S 領域の配列からは既知のシス因子と類似した配列が発見されなかったため、S 領域をベイトとした酵母ワンハイブリッドスクリーニングを行った。その結果、転写因子と考えられていたが機能未知のタンパク質であった Growth-Regulating Factor 7 (GRF7) が S 領域との相互作用因子として単離され、*DREB2A* プロモーターの活性が GRF7 との共発現によって S 領域依存的に有意に抑制されることが示された。また、GFP との融合タンパク質を発現させた植物体の蛍光顕微鏡観察により、GRF7 が核に局在することが確認できた。T-DNA 挿入 (*grf7-1*) あるいは人工マイクロ RNA の発現 (*amiG7*) により GRF7 の機能に欠損が生じた植物体は、野生型に比べサイズが少し小さくなり、ストレス非存在下での *DREB2A* の転写産物量が有意に上昇していた。これらのことは GRF7 が S 領域と相互作用し、ストレス非存在下で *DREB2A* プロモーターの転写活性を抑制する重要な転写因子である事を示唆する。

次に、GRF7 が認識するプロモーター配列を決定するため、GST 融合 GRF7 タンパク質と S 領域由来の様々な DNA 断片との相互作用を Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA) 法により調べた。S 領域の配列に塩基置換を施した実験の結果、TGTCAGG の 7 塩基が GRF7 タンパク質の結合に重要であることが示唆された。さらにこの 7 塩基に塩基置換を導入した *DREB2A* プロモーター領域の転写活性を測定することにより、実際にこの配列が *DREB2A* プロモーターの活性を抑制することを確認し、GRF7-Targeting Element (GTE) と名付けた。

最後にシロイヌナズナのトランスクリプトームにおける GRF7 の役割を調べるため、*amiG7* を用いたマイクロアレイ解析を行った。2 倍以上の有意な発現量の変化を示した遺伝子のうち、約 75% の遺伝子は発現量が上昇しており、さらにその約 68% が *DREB2A* を含む乾燥及び高塩ストレス応答性を示す遺伝子であった。このことから GRF7 が転写抑制能を持つ転写因子であり、特に乾燥や高塩などの水ストレス応答性遺伝子の発現をストレス非存在下で抑制する役割を持っていることが考えられる。GRF7 の機能欠損により植物体のサイズが大きくなることも考慮すると、GRF7 はストレス非存在下で水ストレス応答性遺伝子の発現を抑えることで植物の生育を助けている可能性がある。

総括

本研究では、*DREB2A* プロモーターの二つの異なる領域に着目し、乾燥ストレス存在下での転写促進機構及び、ストレス非存在下での転写抑制機構の解明を行った。*DREB2A* は植物の高温や水ストレスに対する耐性獲得に重要な役割を果たす転写因子であるが、その恒常的な活性は植物の生育に悪影響を与える。そのため、植物は常に *DREB2A* の活性発現を的確に制御する必要がある。今回解明された二つの拮抗する転写調節機構はそのための厳密な制御機構の一翼を担うものであると考えられる。まず、水ストレス環境下では、ABA 依存性と ABA 非依存性の二つの経路からシグナルを受けることで、*DREB2A* の発現を高い精度で調節することが可能になっていると期待される。また *GRF7* による転写抑制機構は *DREB2A* にとどまらず、他の水ストレス応答性転写因子の転写抑制にも関与する可能性があり、限られたエネルギーを環境への順応と生育への投資に分配しなければならない植物が、如何にしてこの二つを両立するのかを解明する端緒となることが期待される。

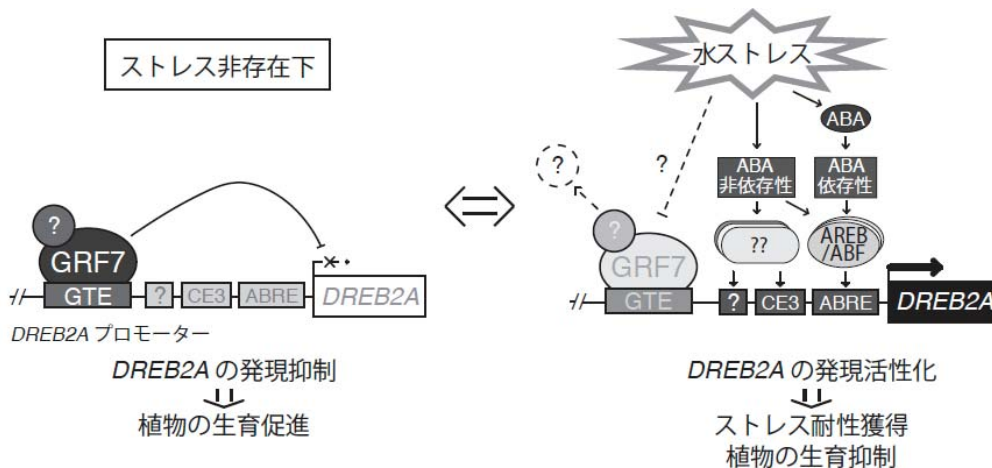


図1 本研究により明らかになった *DREB2A* の転写調節機構の模式図

発表文献

Kim, J.S., Mizoi, J., Yoshida, T., Fujita, Y., Nakajima, J., Ohori, T., Todaka, D., Nakashima, K., Hirayama, T., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011) An ABRE promoter sequence is involved in osmotic stress-responsive expression of the *DREB2A* gene, which encodes a transcription factor regulating drought-inducible genes in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **52**: 2136-46.