

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 金 俊植

本論文は第 I 章で、研究の背景および目的について述べた。栽培作物を含む多くの植物は移動の自由を持たないため、周辺環境が悪化しても、その場で耐え生育し続けなければならない。そのため植物は周辺環境の変化を敏感に感知し、的確に応答する機構を発達させてきた。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。また、*DREB2A* 遺伝子自身の発現もこれらのストレス応答性を示す。*DREB2A* の転写調節機構の解明に向け、先行研究では *DREB2A* プロモーター領域のデリーションシリーズの作製及び水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二つのプロモーター領域 (D 領域、S 領域) を選抜し、*DREB2A* の水ストレスに対する転写調節を担うシス因子と転写因子の探索及び機能解析を行った。

第 II 章では、*DREB2A* の乾燥ストレス応答性を担うプロモーター領域とシス因子の解析を示した。D 領域は *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で、乾燥ストレス応答性を示す。シス因子として ABA-Responsive Element (ABRE) と Coupling Element 3 (CE3) 類似配列を同定し、両シス配列が *DREB2A* の乾燥ストレス応答性の発現に強く関与していることを示した。ABRE と相互作用する転写因子として、ABRE-Binding protein 1 (AREB1)、AREB2 と ABRE-Binding Factor 3 (ABF3) を推定し、これらの AREB/ABF が ABRE 依存的に *DREB2A* プロモーターと相互作用し、転写を活性化させることを示した。さらに ABA シグナル経路で働く重要な因子の機能変異体を用いることで、*DREB2A* の乾燥に対する転写活性が ABA シグナル経路の影響を受けることを明らかにした。しかし、典型的な ABA 応答性遺伝子に比べ、*DREB2A* の転写の低下は部分的に留まっており、*DREB2A* の乾燥に対する転写が ABA 非依存的経路の影響も受けていることが示唆された。

第 III 章では、*DREB2A* プロモーター上の S 領域によるストレス非存在下でのプロモーター活性の抑制機構について記した。S 領域は *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で、ストレス非存在下におけるプロモーター活性の抑制に寄与する。S 領域と相互作用する転写因子として、酵母ワンハイブリッドスクリーニングによって Growth-Regulating Factor 7 (GRF7) を単離した。GRF7 は核に局在し、一過的発現系において S 領域依存的に *DREB2A* プロモーター活性を低下させる。人工マイクロ RNA (*amiG7*) や T-DNA 挿入 (*grf7-1*) を用いた GRF7 の機能欠損変異植物は野生型に比べ、植物のサイズが小さくなり、ストレス非存在下での *DREB2A* 転写産物量が上昇した。以上の結果から、GRF7 が S 領域を介してストレス非存在下での *DREB2A* の転写活性に影響を与える転写因子であること

が明らかになった。続いて EMSA 法を用いた S 領域上における GRF7 の結合配列の探索を行い、新規シス因子 GTE (GRF7-Targeting Element) を同定した。続いて植物の転写制御システムにおける 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。その結果、大半の遺伝子の発現量が有意に上昇しており、水ストレスや ABA 応答性を示した。さらに GRF7 の機能欠損植物は野生型に比べ、顕著に強い乾燥及び高塩耐性を示した。以上の結果から、GRF7 が *DREB2A* を含む水ストレス応答性遺伝子の発現を抑制することで、植物の水ストレス耐性を負に制御する因子であることが明らかになった。

第IV章では得られた結果をもとに、*DREB2A* プロモーター領域による *DREB2A* の転写調節機構を考察した。*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。本研究から解明された二つの拮抗する転写調節機構はその厳密な発現制御機構の一翼を担うものであると考えられ、限られたエネルギーを環境への順応と生育と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。

以上、本論文は高温と水ストレスに対する耐性の獲得に重要な役割を果たす転写因子遺伝子の発現制御機構を明らかにする事により、植物の環境への適応と生育とのバランスの制御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。