

氏名	小川 大輔
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第939号
学位授与の日付	平成19年3月31日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	シロイヌナズナ熱ショック転写因子 HsfA2 の機能解析
論文審査委員(主査)	山口 和男(学際科学実験センター・教授)
論文審査委員(副査)	岩見 雅史(自然科学研究科・教授), 星名 哲(自然科学研究科・准教授), 西内 巧(学際科学実験センター・准教授), 金森 正明(自然科学研究科・講師)

Heat shock transcription factors (Hsfs) are the central regulators of the heat shock (HS) stress response in all eukaryotic organisms. *HsfA2* is one of the *Arabidopsis* class A *Hsfs*, and the induction of *HsfA2* expression in response to HS stress is highest among those of *Arabidopsis* 21 different *Hsfs*. However, little is known HsfA2 transcriptional target genes and functions in *Arabidopsis*. In this study, we generated *HsfA2* overexpressing transgenic *Arabidopsis* plants (*35S::HsfA2*) and dominant-negative mutants of *HsfA2* (*35S::HsfA2 ΔC264*). The *35S::HsfA2* plants exhibited a dwarf phenotype and remarkable both basal and acquired thermotolerance. By contrast, the *35S::HsfA2 ΔC264* plants displayed reduced both thermotolerance. We carried out microarray analysis of the *35S::HsfA2* plants and identified candidate genes regulated by HsfA2, which exhibited HS stress-induced expression as well as *HsfA2*. Furthermore, we found that the expression of *HsfA2* was also induced by salt and osmotic stress, and the *35S::HsfA2* plants also showed tolerance to these stress. Interestingly, *35S::HsfA2* and *35S::HsfA2 ΔC264* plants exhibited enhanced and decreased callus growth, respectively. These results reveal that HsfA2 regulates a variety of genes related to stress response and plays an important role in plant multiple stress tolerance and suggest that HsfA2 is also involved in developmental process.

自然界において植物は様々な環境ストレスに曝される。動物と違い移動することができない植物は、環境ストレスに対抗しその環境に適応しなければ生き延びることができない。そのため植物はこれらの環境の変化をいち早く感じとり、環境に適応する応答機構を進化の過程で獲得してきたものと考えられる。生物が高温ストレスに曝されるとタンパク質の損傷、変性による機能障害が起こる。そのため、生物はタンパク質の構造を維持し、変性タンパク質の凝集を妨げるために熱ショックタンパク質(Hsp)と呼ばれる分子シャペロンを発現させる。真核生物では *Hsp* 遺伝子などの熱ショック(HS)ストレス応答性遺伝子の転写は、それらのプロモーター領域に存在する HS 応答性シスエレメント(HSE)を認識する熱ショック転写因子(Hsf)によって制御される。

シロイヌナズナゲノムには 21 個の *Hsf* 遺伝子が存在する。その中でも *HsfA2* は最も著しい HS ストレス応答性が示されていることから、シロイヌナズナの HS ストレス応答に重要な役割を果たすのではないかと考えられる。しかし、これまで HsfA2 タンパク質が植物体内でどのような機能を持つかは調べられていなかった。そこで本研究において、私は *HsfA2* の過剰発現植物体、T-DNA 挿入変異植物体、及びドミナントネガティブ変異植物体を作出または入手し、それらの解析を行うことで HsfA2 の機能を明らかにすることを試みた。

まず、*HsfA2* の発現様式を明らかにするために、半定量的 RT-PCR 法により HS ストレス時の *HsfA2* 発現量の変化を検証した。そして、*HsfA2* は HS ストレスに対して急速な応答を示し、それは一過

的なものであることを明らかにした。また、*HsfA2* 遺伝子上流には HSE の存在が認められたため、この領域とレポーター遺伝子 *GUS* との融合遺伝子を作製し、植物内で発現させることにより、HS ストレスに応答した *GUS* の発現が起こること、つまり *HsfA2* プロモーターの転写活性は HS ストレスに依存していることを明らかにした。

次に、植物内での高発現プロモーターであるカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター制御下で *HsfA2* を過剰発現するトランスジェニック植物(35S::*HsfA2*)を作成し、その表現型の観察を行った。作出した 35S::*HsfA2* 植物は通常の生育条件下で著しい矮化を示した。リアルタイム PCR 解析の結果から、この植物体の矮化は *HsfA2* 発現量と相関があることがわかった

(図 1A, B)。35S::*HsfA2* 植物の高温耐性試

験を行い *HsfA2* mRNA の蓄積が高温耐性に与える影響を調べた。その結果、35S::*HsfA2* 植物は野生型植物と比較して、高温耐性が著しく向上していた(図 2)。また、植物体に弱い HS ストレスを与え耐性を獲得させる処理(馴化処理)後の高温耐性(獲得性高温耐性)においても、同様の結果が得られた。これらの結果から、*HsfA2* が植物の高温耐性に重要な役割を果たすことを明らかにすることができた。*HsfA2* は転写活性化因子であることが示唆されていたが、その標的遺伝子は未知であった。そこで *HsfA2* 標的遺伝子を明らかにするため、35S::*HsfA2* 植物のマイクロアレイ解析を行った。その結果、野生型植物に比べ発現量が 2 倍以上に上昇している遺伝子として 243 個の遺伝子を得ることができた。その中には *Hsp* など多数のストレス応答性遺伝子を見出すことができた。これらの遺伝子の多くはその上流配列に HSE の存在が認められ、マイクロアレイデータベースの検索から HS ストレスに応答することが明らかとなった。また、この中の複数の遺伝子について発現解析を行い(図 3)、それらの発現量が *HsfA2* 発現量に依存していること、HS ストレスに対して *HsfA2* とよく似たパターンで応答することを明らかにした。

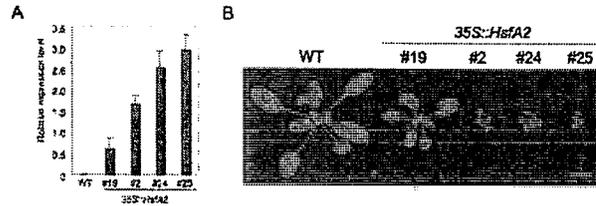


図1 *HsfA2* 過剰発現植物(35S::*HsfA2*)の表現型
(A) 35S::*HsfA2* 植物における *HsfA2* 遺伝子発現量。MS 培地で 10 日間生育させた野生型および 35S::*HsfA2* 植物から RNA を抽出した。cDNA 合成後、リアルタイム PCR 解析により *HsfA2* 発現量を定量化した。数値は *Actin2.6* 発現量に対する相対値を示す。
(B) 播種後 3 週間の野生型および 35S::*HsfA2* 植物。地上部のみを示す。スケールバーは 1 cm。

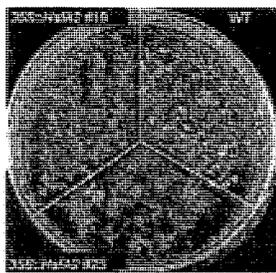


図2 35S::*HsfA2* 植物の高温耐性
播種後 10 日間 22°C で生育させた野生型および 35S::*HsfA2* 植物に対して、HS ストレス処理(45°C、1 時間)を行った。発芽後、5 日間 22°C で生育させた。



図3 *HsfA2* 標的遺伝子の発現解析
播種後 10 日間 22°C で生育させた野生型および 35S::*HsfA2* 植物に対して HS ストレス(37°C、1 時間)処理を行い、RNA 抽出後、半定量的 RT-PCR 法により解析した。PCR のサイクル数は *Actin* 以外は 24 サイクル、*Actin* は 22 サイクル。

次に、*HsfA2* 機能欠損による影響を調べるために *HsfA2* T-DNA 挿入変異体(*hsfA2-1*)を入手し、その表現型の解析を行ったが、種子の高温耐性がわずかに低下していること以外には野生型植物との違いは見いだせなかった。そのため、シロイヌナズナゲノム中に *HsfA2* と機能的に重複した遺伝子が存在している可能性を考え、ドミナントネガティブ型タンパク質を利用して内在性 *HsfA2* 及び *HsfA2* と機能重複した *Hsf* の機能を阻害することを試みた。*HsfA2* のドミナントネガティブ型として、*HsfA2* タンパク質 C 末端に存在する転写活性化領域及び核外移行シグナルを欠失した *HsfA2* ΔC264 を過剰に発現する植物 (35S::*HsfA2* ΔC264) を作出した (図 4A)。解析の結果、35S::*HsfA2* ΔC264 植物は高温耐性、獲得性高温耐性の低下を示すことを明らかにした (図 4B、C)。また、発現解析により 35S::*HsfA2* ΔC264 植物では *HsfA2* 標的遺伝子の HS ストレス応答が低下していることを明らかにした (図 5)。

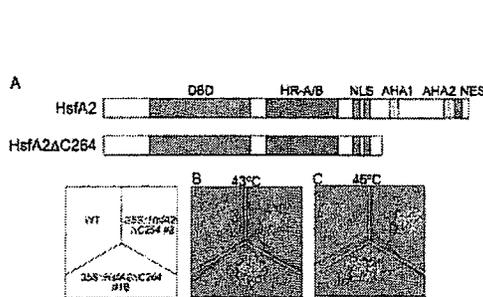


図4 35S::*HsfA2* ΔC264 の表現型
(A) *HsfA2* ΔC264 の構造。DBD: DNA 結合領域。HR-A/B: 多量体形成領域。NLS: 核移行シグナル。AHA: 転写活性化領域。NES: 核外移行シグナル。
(B、C) 播種後 5 日間 22°C で生育させた野生型および 35S::*HsfA2* ΔC264 植物に未処理 (B) もしくは熱化処理 (37°C、1 時間) 後 (C)、各パネルに示した温度で 90 分間 HS ストレス処理を行った。処理後、22°C で 3 日間生育させた。

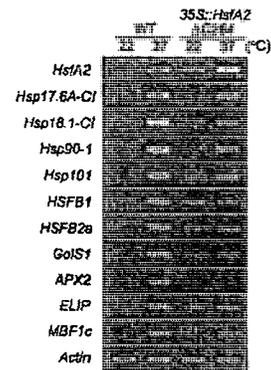


図5 *HsfA2* 標的遺伝子の発現解析
播種後 10 日間 22°C で生育させた野生型および 35S::*HsfA2* ΔC264 植物に対して HS ストレス (37°C、1 時間) 処理を行った。RNA 抽出後、*HsfA2* 標的遺伝子の発現量を半定量的 RT-PCR 法により解析した。PCR サイクル数は *Actin* 以外は 24 サイクル、*Actin* は 22 サイクル。

さらに、*HsfA2* の発現が塩ストレス、浸透圧ストレスにより誘導されること、35S::*HsfA2* 植物ではこれらのストレスによる生育阻害が緩和されることを見出した (図 6)。この結果は *HsfA2* が高温耐性以外に、塩耐性、浸透圧耐性にも関与することを示しており、植物の *Hsf* がそのようなストレス応答に関与することを示したのは本研究が初めてである。また、ストレス応答以外の表現型として、35S::*HsfA2* 植物では根外植片からのカルス形成、増殖が促進されていること、対照的に

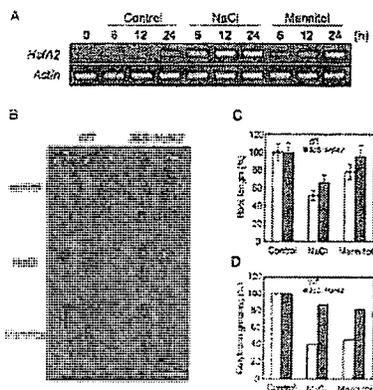


図6 35S::*HsfA2* 植物における塩耐性および浸透圧耐性
(A) 塩ストレス、浸透圧ストレスによる *HsfA2* 発現の誘導。塩ストレス (250 mM NaCl)、浸透圧ストレス (400 mM マンニトール) 処理を行った播種後 10 日目の植物から RNA を抽出し、半定量的 RT-PCR により *HsfA2* 発現パターンを解析した。PCR サイクル数: *HsfA2*: 24 サイクル、*Actin*: 22 サイクル。
(B) WT と 35S::*HsfA2* 植物を 150 mM NaCl または 300 mM マンニトールを含む MS 培地で 7 日間生育させた。
(C) WT と 35S::*HsfA2* 植物を 100 mM NaCl または 200 mM マンニトールを含む MS 培地で生育させた。播種後 7 日目の植物から RNA を抽出した (n = 15)。
(D) WT と 35S::*HsfA2* 植物を 150 mM NaCl または 300 mM マンニトールを含む MS 培地で生育させた。播種後 4 日目に採取した根外植片を 24°C で 10 日間生育させた。

35S::*HsfA2* ΔC264 では遅延するという結果が得られた (図 7)。このことは *HsfA2* がストレス応答以外に細胞の分化、増殖に関与することを示唆しており、非常に興味深い結果である。

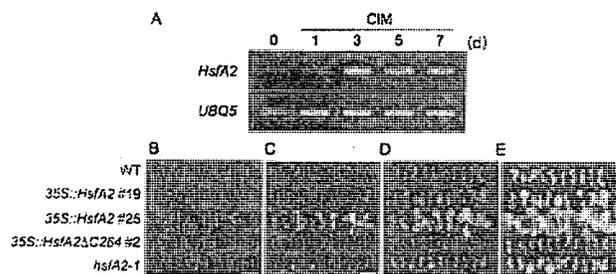


図7 *HsfA2* 発現量の違いによるカルス形成への影響
(A) MS 培地で 7 日間生育させた野生型植物から根外植片を作成し、カルス誘導培地 (CIM) に移植した。1、3、5、7 日間培養後 RNA を抽出し、半定量的 RT-PCR により *HsfA2* 発現パターンを解析した。PCR サイクル数は 24 サイクル。
(B-E) MS 培地で 7 日間生育させた野生型、35S::*HsfA2*、35S::*HsfA2* ΔC264、*hsfA2-1* 植物から根外植片を作成し、カルス誘導培地 (CIM) に移植した。B: 1 週間、C: 2 週間、D: 3 週間、E: 4 週間。

本研究での結果から、*HsfA2* が高温ストレスをはじめとする様々なストレス応答において、特にその耐性獲得に非常に重要な役割を担っていることが明らかになった。また、ストレス応答だけでなく細胞の分化、増殖にも関与することを示唆する結果も得られた。同時に、動物とは対照的に多数の *Hsf* 遺伝子を有する植物ではこれらが複雑なネットワークを構築し、多様な環境ストレスに対応していることが、特にドミナントネガティブ型 *HsfA2* 産生植物の実験から強く示唆された。これらの結果はシロイヌナズナに存在する他の *Hsf* の研究、さらにはシロイヌナズナ以外の植物における *Hsf* 研究にも大いに役立つものと期待される。

学位論文審査結果の要旨

植物は様々な環境ストレスに適応する巧妙な機構を進化の過程で獲得してきた。熱ショック(HS)ストレス応答もその一つで、シロイヌナズナゲノムには 21 個の熱ショック転写因子遺伝子(*Hsf*)が存在する。中でも *HsfA2* はもっとも著しい HS ストレス応答性が示されているが、植物体内での機能についてはほとんど解析されていなかった。本研究はこの *HsfA2* について各種の変異植物体を作成し、その機能の解明を進めたものである。

HsfA2 のプロモーター解析、*HsfA2* の過剰発現植物体、*HsfA2* のノックアウト株、及び *HsfA2* タンパク質の転写活性化領域の欠失によるドミナントネガティブ型 *HsfA2* 産生植物の高温耐性などの解析、更に *HsfA2* 過剰発現植物体の DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析、などを通して、*HsfA2* が植物体の高温耐性及び獲得性高温耐性に重要な役割を果たしていることを初めて明らかにした。また転写調節因子としての *HsfA2* の標的遺伝子を多数同定した。更に *HsfA2* は植物体の高温耐性ばかりでなく、浸透圧ストレスや塩ストレスなど様々なストレス耐性や細胞の分化・増殖にも関与するなど多様な機能を持つことを明らかにした。

以上のように、本研究は *HsfA2* 遺伝子の HS ストレスを初めとする多様な機能に関して多数の新事実を明らかにしており、博士論文として充分評価できるものである。