

博士論文

シロイヌナズナの転写因子 HsfA1 の高温ストレス応答と
成長制御における機能解析

東京大学大学院	農学生命科学研究科
応用生命化学専攻	植物分子生理学研究室
平成 20 年度進学	吉田拓実
指導教員	篠崎和子

目次

略語一覧

第一章 序論	1
第二章 高温ストレス下における <i>DREB2A</i> の転写活性化因子の解析...	5
材料と方法.....	11
結果.....	15
考察.....	18
図表一覧.....	21
第三章 <i>HsfA1a</i> 、 <i>HsfA1b</i> 、 <i>HsfA1d</i> による高温ストレス応答の制御	29
材料と方法.....	30
結果.....	34
考察.....	41
図表一覧.....	47
第四章 <i>HsfA1</i> サブファミリー遺伝子による生育制御機構の解析	62
材料と方法.....	62
結果.....	64
考察.....	67
図表一覧.....	70
第五章 総合考察	84
参考文献	89
謝辞	96

図表一覧

図 1、高温ストレス下の <i>DREB2A</i> の遺伝子発現と <i>DREB2A</i> のプロモーター解析	7
図 2、シロイヌナズナの葉肉細胞を用いた一過的遺伝子発現系による Hsf の転写活性化能（中島ら、2008 の図より改変）	9
図 3、GENEVESTIGATOR による <i>Hsf</i> の発現解析	23
図 4、 <i>HsfA1</i> サブファミリー遺伝子の発現	24
図 5、 <i>HsfA1a</i> 、 <i>HsfA1b</i> 、 <i>HsfA1d</i> 過剰発現体の解析	25
図 6、 <i>hsfa1a/b/d</i> 三重変異体の解析	26
図 7、乾燥ストレス下の <i>hsfa1a/b/d</i> 三重変異体における遺伝子発現	28
図 8、 <i>hsfa1a/b/d</i> 三重変異体のマイクロアレイ解析	53
図 9、高温ストレス下の <i>hsfa1a/b/d</i> 三重変異体における遺伝子発現	54
図 10、 <i>HsfA1</i> サブファミリー遺伝子変異体の高温耐性試験	55
図 11、 <i>HsfA1</i> の細胞内局在と、HSP90 阻害剤(GDA)の影響	56
図 12、核排出シグナル (NES) を削った <i>HsfA1</i> の動態と機能	57
図 13、タマネギの表皮細胞への一過的遺伝子発現系による <i>HsfA1</i> 、HSP90 の相互作用解析	59
図 14、ChIP 解析による <i>HsfA1</i> のプロモータ結合解析	61
図 15、Hsf タイプの DNA 結合ドメインを持つ転写因子の分子系統樹 ..	75
図 16、 <i>hsfa1a/b/d/e</i> の表現型	77
図 17、 <i>hsfa1a/b/d/e</i> 四重変異体のマイクロアレイ解析	79
図 18、 <i>hsfa1a/b/d/e</i> 四重変異体における遺伝子発現	81
図 19、 <i>hsfa1a/b/d/e</i> 四重変異体の生育	83
図 20、 <i>HsfA1</i> サブファミリー遺伝子の機能	88
表 1、第二章で使用したプライマーの一覧	21
表 2、第三章で使用したプライマーの一覧	47
表 3、マイクロアレイ解析により 37°C1 時間処理後の <i>hsfa1a/b/d</i> 三重変異体において野生型と比較して発現の減少が大きかった遺伝子	50
表 4、第四章で使用したプライマーの一覧	70
表 5、マイクロアレイ解析により 37°C1 時間処理後の <i>hsfa1a/b/d/e</i> 四重変異体において野生型と比較して発現の減少が大きかった遺伝子	71

略語一覽

ABA	abscisic acid
ABRC	Arabidopsis biological resource center
BiFC	bimolecular fluorescence complementation
CaMV	cauliflower mosaic virus
CDS	coding sequence
CFP	cyan fluorescent protein
ChIP	chromatin immunoprecipitation
Col	columbia
CTP	cytosine triphosphate
DRE	dehydration responsive element
DREB	dehydration responsive element binding protein
DRIP	DREB2A interacting protein
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
GDA	geldana- mycin
GFP	green fluorescent protein
GM	germination medium
GUS	β -glucuronidase
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HSE	heat shock element
Hsf	heat shock transcription factor
HSP	heat shock protein
LEA	late embryogenesis abundant
LUC	luciferase
MS	murashige skoog
NES	nuclear export signal
NLS	nuclear localization signal
PCR	polymerase chain reaction
RT-PCR	reverse transcription-PCR
SDS	sodium dodecyl sulfate
SSC	saline-sodium citrate

T-DNA	transferred DNA
TAIR	the Arabidopsis information resource
VC	vector control
Ws	wassileskijia
YEP	yeast extract-peptone

第一章 序論

人類が生きて行く上で絶対に欠かすことが出来ないものの一つが食糧である。近年その食糧の安定的確保を脅かす大きな問題が生じている。一つは人口の爆発的な増加である。国連の推計によると、2010 年の世界の人口は 69 億人となっている。今後もアジアやアフリカを中心に人口は増加し続け、2050 年には 91 億人に達すると見込まれている。もう一つの問題は地球環境の変化である、その原因に関しては議論があるところだが、実際に温暖化は進行しつつある。砂漠化や土壌の劣化は今も進み、耕作に適した土地は減少しつつある。このような状況の中で、人類は食糧を確保していかなければならない。2009 年に、FAO(国際連合食糧農業機関)は専門家会合を開き、2050 年までに現在より 70%多くの食糧を生産する必要があるという見解を出している。これを実現するためにはありとあらゆる手法を取っていく必要があると考えられる。その方法の一つが、遺伝資源の応用による高機能の作物品種の作出である。ここにこそ、農学部で生命科学を研究する我々が取り組むべき課題がある。

食糧増産を目指すに当たってひとつの方法は、高収量を目指すことが考えられる。緑の革命においては、高収量の穀物品種による生産を世界の多くの地域で実施することで、農業の生産性が大きく向上した。しかし、これには限界もあった。緑の革命の成果を利用するためには、良い土地と水が必要で、これらを得ることが出来ない地域では恩恵を得ることが出来なかった。そこで、もうひとつの方法として不良な土地でも生育できる作物品種の開発が考えられる。世界中で農耕に適している土地は限られている。その上、地球温暖化による平均気温の上昇は、短期的に見ると作物の生育を促す可能性もあるが、長期的に見ると現在は作物生産に適した土地においても至適温度から外れ、生産量に悪影響を及ぼすと考えられる。この傾向は、赤道付近の地域において顕著になると思われ、作物生産の悪化から移民問題にまで発展するという予測もされている(Feng et al., 2010)。このような自体を回避するためにも、高温に対して高い耐性を持った作物作出に向けた研究は重要となっている。

農作物の生産は環境要因によって大きく左右される。高温、低温、乾燥、高塩濃度など様々な要因がある。しかし、行動の自由が無い植物は本来、それらの多くの環境要因にある程度順応できる複雑で精巧なしくみを持っている。悪

環境でも生育できる作物品種を作り出すに当たって、これらの仕組みの研究を進めることは大変重要な事である。植物は変化する周囲の環境に順応するために、様々なストレスに対応して遺伝子発現の制御を行う (Ingram and Bartels, 1996; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006)。ストレスによって発現する遺伝子は多岐にわたり、それらの遺伝子の発現を制御する因子として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が知られている。作物に耐性を付与する方法としてストレス耐性に機能する個々の遺伝子、例えばプロリンやベタインなどの適合溶質の生合成遺伝子を導入した植物や LEA タンパク質の遺伝子を導入した植物が作出されたが、実用的なレベルでの耐性付与には至らなかった (Holmberg et al., 2001)。そのため、ストレス応答に関わる遺伝子を一齐に制御する転写因子の研究が期待されるようになった。

高温ストレス応答に重要な転写因子として HSF (heat shock transcription factor) が知られている。HSF はシス配列である HSE (heat shock element; nGAAnnTTCn 又は nTTCnnGAAn) を介して HSP (heat shock protein) を初めとする多くの熱ストレス誘導性遺伝子を制御する (Nover et al., 2001)。HSF は高度に保存された DNA 結合ドメインとオリゴマー化ドメインを持ち、植物に限らず真核生物全般において広く保存されている (Akerfelt et al., 2010)。植物においてはシロイヌナズナやトマトやイネにおいて研究が進んでいる (Kotak et al., 2007b)。他の生物と異なり、高等植物において、HSF は多種類存在し、それらはオリゴマー化ドメインの違いによって A、B、C の 3 つのグループに分類されている (Nover et al., 2001)。転写活性化ドメインの有無からおおまかには、クラス A は正方向の転写制御、クラス B は負方向の転写制御に関わると考えられている。個別の遺伝子の研究についても進んでおり、*HsfA1a* と *HsfA1b* は初期の熱ストレス応答に働き、熱ストレス誘導性の *HsfA2* は高温耐性獲得において重要な機能を持つことが知られている (Busch et al., 2005; Nishizawa et al., 2006; Charng et al., 2007)。また、*HsfA3* は *DREB2A* (dehydration responsive element binding protein) の制御下にあり、*HsfA2* の発現誘導より遅れて発現が誘導され、高温耐性獲得に機能を持つことも明らかにされた (Schramm et al., 2008; Yoshida et al., 2008)。さらに、*HsfA4* と *HsfA8* は活性酸素種のセンサーとして働くと考えられ (Davletova et al., 2005)、*HsfA5* は *HsfA4* 特異的なリプレッサーとして働くことが示された (Baniwal et al., 2007)。*HsfA9* は種子のみ

で発現し、種子における機能が解析されている(Kotak et al., 2007a)。また、BタイプのHSFに関してもリプレッサーとしての機能が研究されつつある(Ikeda and Ohme-Takagi, 2009)。以上に述べたように、高温ストレス応答に関して、*HSF*を中心とした遺伝子発現制御のネットワークは解析が進んでおり、*HSF*が実際に高温ストレス耐性獲得に重要な機能を持つことも明らかにされつつある。しかし、高温ストレスに対する初期応答に関して未だに不明の点も多い。特に、高温ストレス耐性獲得に重要と考えられている *HsfA2* や、*HsfA3* を制御する *DREB2A* の発現の制御機構は大きな関心の一つだった(Kotak et al., 2007b)。

DREB2A はシロイヌナズナにおいて DRE 配列 (dehydration-responsive element ; A/GCCGAC)に特異的に作用する転写因子として単離された (Liu et al., 1998)。DRE 配列は、乾燥ストレス誘導性の *RD29A* 遺伝子の発現を制御するシス因子として同定されたが、多くの環境ストレス誘導性遺伝子のプロモーター領域に存在することが示されている(Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006)。乾燥等のストレス耐性獲得に機能すると予想された *DREB2A* は、過剰発現させても下流の遺伝子の誘導や耐性の付与は起きなかった。しかし、DNA 結合ドメインの直後にある活性を負に制御する領域を削除した活性型の *DREB2A* (*DREB2A CA*) を用いることで耐性の付与や、下流の誘導を実現することができた(Sakuma et al., 2006b)。 *DREB2A* の負の活性制御には E3 リガーゼである DRIP (*DREB2A* interacting protein) が関わっていることも明らかにされている(Qin et al., 2008)。

発見当初は乾燥や塩ストレスによって働く転写因子であると考えられていた *DREB2A* は、高温ストレスによっても誘導されることが明らかにされた (Sakuma et al., 2006a)。 *DREB2A CA* 過剰発現体や *DREB2A* の変異体を用いた解析からその高温ストレス時における *DREB2A* の下流には *HsfA3* や *HSP* 等が存在し、高温ストレス耐性獲得に重要な機能を持つことが示された。高温ストレスにおける *DREB2A* の発現は、ストレス後徐々に増加していく乾燥や塩ストレスによる応答と異なり、ストレス直後 1 時間以内にピークに達し、その後は発現が減少し、ある程度のレベルを維持するという特徴的な発現パターンを示した。これまでに、*DREB2A* の機能に関する解析は進められていたが、その *DREB2A* の発現自体を制御する因子に関する研究は行われていなかった。植物の中で重要な機能を持ち、応用面でも大きな可能性を秘めている *DREB2A* の発

現制御機構の解明は、植物が環境ストレス耐性を獲得する仕組みをより深く理解するために重要なテーマであった。特に、高温ストレス応答に関しては発現のピークがとても早いことから、*DREB2A* の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もつながることが予想された。

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明すると共に、未だ発現の制御が分かっていない *HsfA2* 等の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解析することを目的とした。

第二章 高温ストレス下における *DREB2A* の転写活性化因子の解析

1994年に、乾燥や低温そして高塩濃度等のストレスによって遺伝子発現が誘導されるシロイヌナズナの *RD29A* 遺伝子の研究から、その発現はプロモーター中の DRE 配列により制御されていることが明らかになった (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994)。この DRE 配列は環境ストレスにより誘導される様々な遺伝子のプロモーター中にあることが示され (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006)、その重要性が次第に明確になっていく。1990年代の後半に、酵母ワンハイブリッド法による研究から DRE 配列に結合する転写因子が単離された (Stockinger et al., 1997; Liu et al., 1998)。単離された二つの転写因子は *DREB1/CBF*、*DREB2* と名付けられ、さらなる研究が進められた。*DREB* タイプの転写因子は植物においては広く保存されている一方で、植物以外には存在しない。シロイヌナズナにおいては *DREB* タイプの転写因子は *DREB1* タイプが 6 種、*DREB2* タイプが 8 種報告されている (Sakuma et al., 2002)。

低温によって強く発現が誘導される *DREB1A* をシロイヌナズナに過剰発現させると、*RD29A* の発現を実際に誘導した上に、植物体の乾燥、低温そして高塩濃度に対する耐性が向上するという結果が得られた (Jaglo-Ottosen et al., 1998; Liu et al., 1998)。植物に耐性を付与できたことから *DREB* タイプの転写因子に対する注目は高まった。一方で、乾燥や高塩濃度によって発現が誘導される *DREB2A* に関しては、シロイヌナズナに過剰発現させても下流の遺伝子発現の誘導や耐性の付与が起きなかった。しかし、シロイヌナズナのプロトプラストを用いた *DREB2A* のドメイン解析から、*DREB2A* には DNA 結合ドメインの直後に長さ 30 アミノ酸程度の活性を負に制御する領域が見出された。この領域を欠損させた *DREB2A CA* をシロイヌナズナに過剰発現させることで、下流の遺伝子発現の誘導と耐性の付与が確認された (Sakuma et al., 2006b)。この結果により、*DREB2A* もシロイヌナズナ中で重要な機能を持つことが明らかになった。さらに研究の過程で、*DREB2A* は高温ストレスによっても発現が強く誘導され、高温耐性獲得に対しても機能を持つことが明らかにされた (Sakuma et al., 2006a)。この研究によって、*DREB2A* は HSF と並んで高温耐性獲得に重要な機能を持つ転写因子であると認知されるようになった (Kotak et al., 2007b)。

これまでの研究から植物のみに存在する *DREB* タイプの転写因子の機能について多くのことが解明され、実際に植物への耐性付与に使えることも明らかにされてきた(Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006)。一方で、活性を持つ *DREB* を植物に過剰発現させると生育の妨げになることも示された(Liu et al., 1998; Sakuma et al., 2006b)。したがってシロイヌナズナの中では、このような活性の強い転写因子は厳密に制御されていると考えられた。当研究室では様々なストレスによって誘導される *DREB2A* に関して、その転写を制御する因子を明らかにすることを目的にプロモーター解析が進められた(中島ら、2008)。特に高温ストレス応答に関しては、プロモーター中にある HSE 配列が重要であること(図 1)や、シロイヌナズナの葉肉細胞を用いた一過的遺伝子発現系で、その配列をシロイヌナズナの数種の HSF が活性化すること(図 2)などが示されたが、植物中で実際に *DREB2A* の発現を制御する因子の同定には至っていなかった。

そこで、本章ではシロイヌナズナ中で *DREB2A* の高温ストレス応答を制御する因子を明らかにすることを目的とした。また、高温ストレス下で *DREB2A* は非常に早く誘導されること(図 1)から、*DREB2A* の発現制御機構を解明することはシロイヌナズナの初期の高温ストレス応答の解明につながることを期待された。

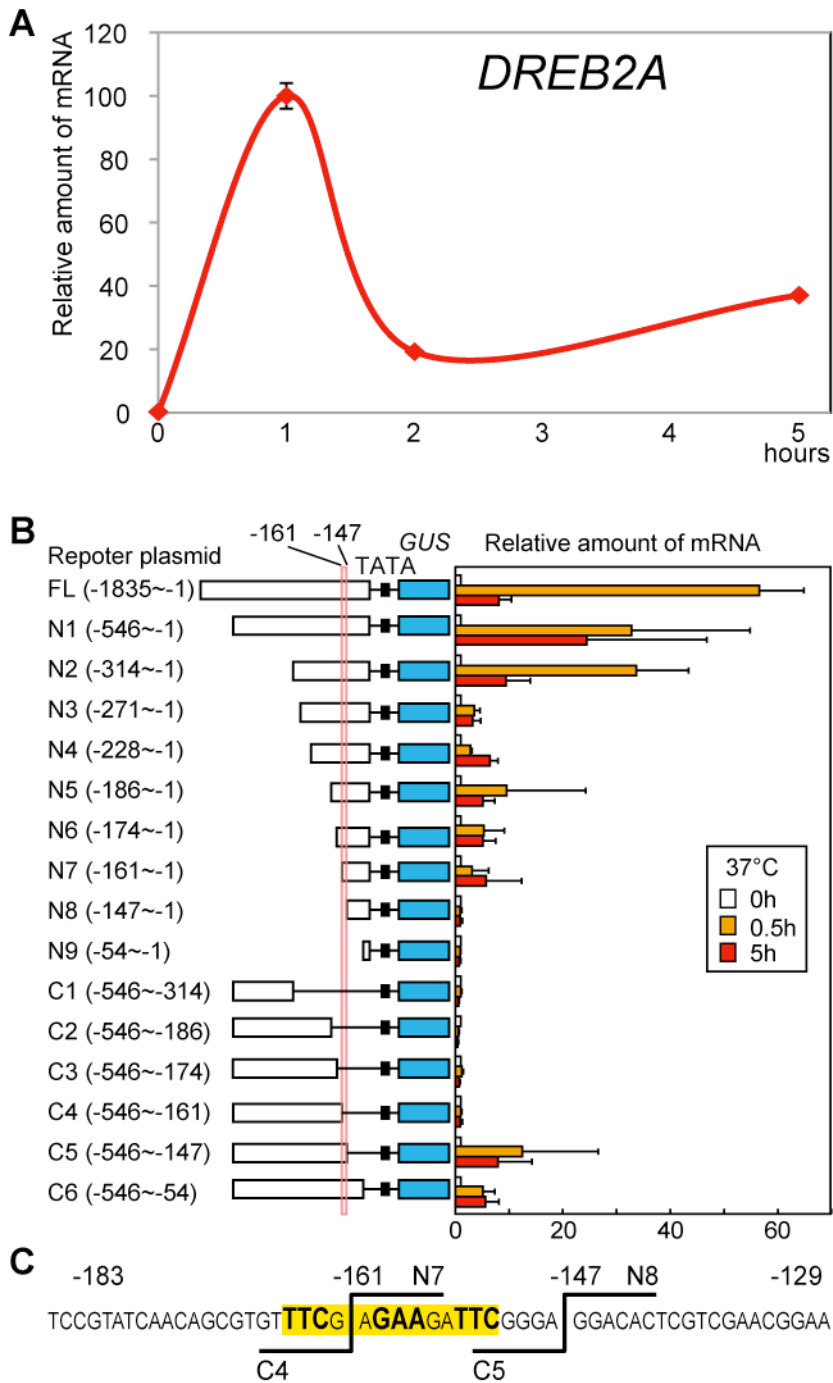


図 1. 高温ストレス下の *DREB2A* の遺伝子発現と *DREB2A* のプロモーター解析

(A) 37°Cの高温ストレス下における野生型(Columbia)での *DREB2A* の遺伝子発現パターン。定量的 RT-PCR により発現解析を行った。全ての値は高温処理 1 時間の値を 100 とした相対値で示した。値は 3 回の PCR の平均値で

エラーバーは標準偏差を示した。

- (B) *DREB2A* プロモーターの高温ストレス応答性(中嶋、2008 の図より引用)。
様々な長さの *DREB2A* プロモーターと *GUS* の融合遺伝子を導入したシロイヌナズナを、37°Cで高温ストレス処理したときの、*GUS* 発現量を定量的 RT-PCR で解析した。全ての値は高温処理前の値を 1 とした相対値で示した。値は 3 回以上の生物学的繰り返しの平均値でエラーバーは標準偏差を示した。
- (C) 高温ストレス応答性シス配列が存在すると考えられる領域の塩基配列。
DREB2A の転写開始点より上流 183 bp から 129 bp の塩基配列を示した。
黄色のラインで HSE 配列を示した。

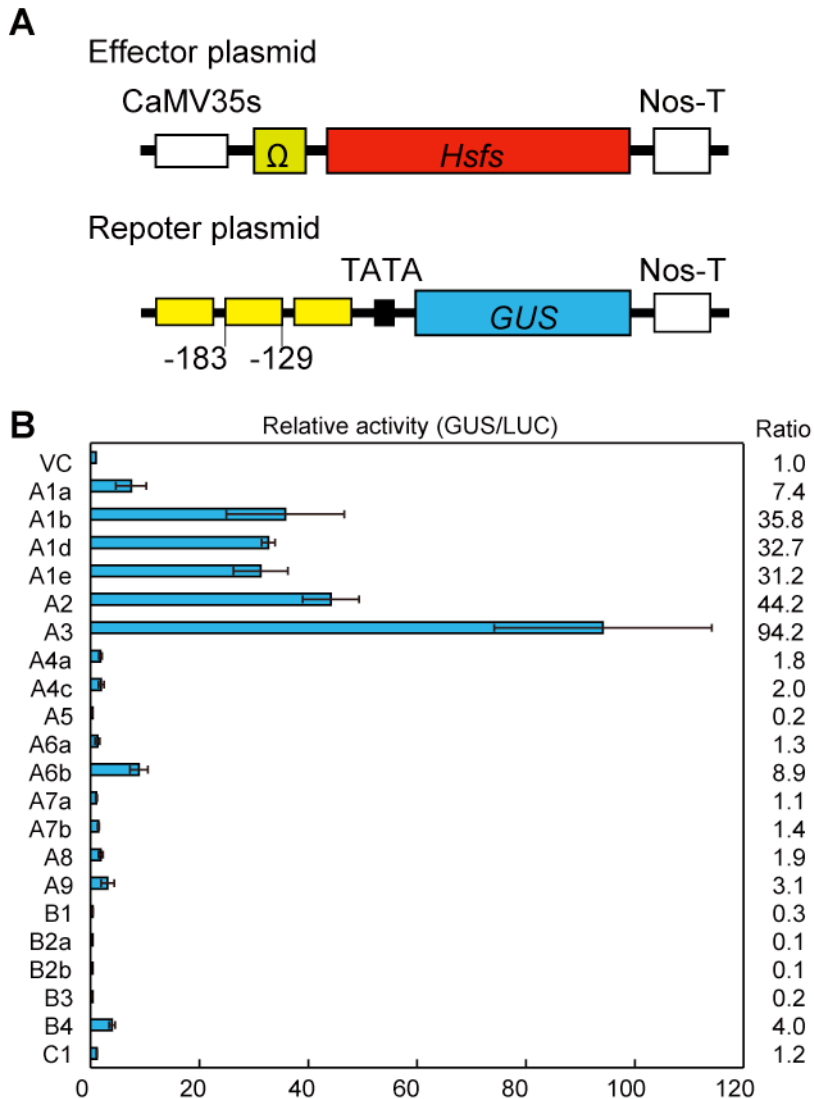


図 2. シロイヌナズナの葉肉細胞を用いた一過的遺伝子発現系による HSF の転写活性化能 (中嶋、2008 の図より改変)

- (A) エフェクターとリポーターの概略図。エフェクターは *CaMV 35S* プロモーターの下流に *HSF* 遺伝子を繋いだものを用いた。リポーターは *DREB2A* プロモーター由来の HSE 配列を含む 54bp を 3 回繰り返した配列を、同じく *DREB2A* プロモーター由来の TATA に繋げ、下流に *GUS* 遺伝子を繋いだものを用いた。
- (B) シロイヌナズナの葉肉細胞を用いた一過的遺伝子発現系による解析。プロトプラストは生育 6 週間のシロイヌナズナの葉肉から得られた細胞を用いた。CaMV 35S プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだプラスミドをエフェクター、リポーターと共に形質転換し、GUS/LUC の値を出

すことで形質転換効率を標準化した。空のベクターの値を 1 として、他のものは相対値で示した。グラフ中のバーは 6 回繰り返して得られた値の標準偏差を示す。中島らの解析で行われなかった HsfA1b、HsfA6a、HsfA7b は、同様の実験を行うことにより追加した。

材料と方法

1. サンプル植物と生育条件

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の野生型として Columbia エコタイプと Wassileskija エコタイプを使用した。シロイヌナズナの寒天培地での培養はシャーレに分注した GM 寒天培地または GMK 寒天培地を使用した。その組成は次の通りである、GM(K)寒天培地: 4.7 g/L ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類 (日本製薬)、112 µg/L B5 ビタミン (GAMBORG'S VITAMIN SOLUTION 1000×)、30 g/L スクロース、8.3 g/L Bacto Agar、pH 5.7 (水酸化カリウムで調整)、(GMK 寒天培地の場合さらに 30 mg /L カナマイシン)。種子は、はじめに乾燥種子を 70% エタノールにより洗浄し、1% 次亜塩素酸ナトリウム、0.02% Triton X-100 溶液に 5 分間浸し滅菌処理を行った後、GM または GMK 寒天培地上に播種した。寒天培地上に播種した後、1~2 日間 4°C で低温処理を行い、その後 22°C、16 時間日長の植物インキュベーターで 1~3 週間生育させたものをストレス処理、高温耐性試験、GUS 染色、GFP 蛍光観察に使用した。

鉢植えでの生育には Jiffy mix (サカタのタネ) を用いた。乾燥種子を暗所、4°C の条件で 1 日間吸水させた後、播種し植物インキュベーター内にて 22°C で生育させた。

2. ストレス処理

特に記す場合を除き、GM(K)寒天培地上で 2~3 週間生育させた植物体をストレス処理実験に供した。高温ストレス処理は、庫内が実験に使用する温度になるように調整したハイブリダイゼーションインキュベーター HP-80 (タイテック) 内にシャーレごと静置することで行った。乾燥ストレス処理は、寒天培地から引き抜いたシロイヌナズナを、パラフィルムを敷きフタを開けたシャーレの上に静置することで行った。また、この時シャーレは 22°C の植物インキュベーター内に置いた。

サンプリングはストレス処理の設定時間に寒天培地またはパラフィルム上からシロイヌナズナを取り出し 2ml 容小型遠心管に入れ、すぐに液体窒素で凍結し -80°C で保存した。後に植物体を破砕するためにチューブ内にはステンレス球 (直径 3~4mm) を 2 つ入れた。

3. RNA の抽出

凍結保存した植物体から RNA iso (TaKaRa) を用いて total RNA の抽出を行った。はじめに shake master (Bio Medical Science) を用いてチューブを振盪し、サンプルを破砕した。1 ml の RNA iso を加えてよく攪拌した後、4°C、15,000 rpm で 10 分間遠心

した。上清を新しいチューブに移し、クロロホルムを 200 μ l 加え、よく攪拌した後室温で 3 分間静置した。4°C、15,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を新しいチューブに移した。250 μ l のイソプロピルアルコールと 250 μ l の High salt 溶液 [0.8 M クエン酸ナトリウム、1.2 M 塩酸] を加え軽く攪拌し室温で 10 分間静置した。4°C、15,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を取り除いた後、1 ml の 75%エタノールを加え攪拌した。その後 4°C、15,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を取り除き 40 μ l の Milli-Q 水を加え 65°Cで 5 分間保温することで total RNA を溶解させた。

4. RT-PCR による解析

4-1.cDNA の合成

cDNA の合成には High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を使用した。10 \times RT Buffer 2 μ l、25 \times dNTP Mix (100 mM) 0.8 μ l、10 \times RT Random Primers 2 μ l、MultiScribe Reverse Transcriptase 1 μ l、Milli-Q 水 4.2 μ l を混合した溶液に、抽出した total RNA を 250 ng 加え、さらに合計で 10 μ l になるように Milli-Q 水を加え攪拌した。混合液を 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) にセットし、次のプログラムで反応させた [25°C 10 分、37°C 120 分、85°C 5 秒、4°C]。反応液に 90 μ l の TE 溶液を加え希釈したものを定量的 RT-PCR の鋳型として使用した。また、18S rRNA 測定用にはこの溶液をさらに 500 倍に希釈したものを使用した。

4-2.RT-PCR による解析

RT-PCR には DNA ポリメラーゼとして PrimeStar HS (TaKaRa) を使用した。5 \times Prime STAR Buffer 2 μ l、dNTP Mixture 0.8 μ l、プライマー2種類 (10 μ M) 0.3 μ l ずつ、鋳型の cDNA を混ぜ、Prime Star HS 0.2 μ l を加えて Milli-Q で 10 μ l にメスアップした。PCR 条件は [98°C 3 分、(98°C 10 秒、55°C 5 秒、72°C 1 分/増幅産物 1 kb あたり) \times 30 サイクル、72°C 7 分] で行った。増幅装置には Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems) を用いた。

4-3.定量的 RT-PCR による解析

定量的 RT-PCR 装置は Applied Biosystems 社の 7300 Real Time PCR System を使用し、反応試薬は Applied Biosystems 社の *POWER* SYBR GREEN PCR MASTER MIX を使用した。2 \times PCR MASTER MIX 5 μ l、forward primer (10 μ M)、reverse primer (10 μ M)をそれぞれ 0.2 μ l、Milli-Q 水 3.6 μ l、さらに 4-1 で合成した cDNA を

鋳型として 1 μ l 加え反応させた。使用したプライマーの配列は表 1 に示す通り。反応条件は[95°C 10 分、(95°C 15 秒、60°C 1 分) \times 40 サイクル]で行った。反応後、95°C まで一度温度を上昇させ、そこから 60°C まで徐々に温度を下げることで、融解温度を測定し単一のものが増幅されていることを確認した。なお、18S rRNA の測定値を内部標準として使用し、鋳型として使用した total RNA 量の違いを標準化した。また、全ての定量的 RT-PCR は 3 連で反応を行い、その平均値と標準偏差を解析結果とした。

5. 形質転換シロイヌナズナの作出

5-1. 植物形質転換用ベクターと組換え DNA

植物形質転換用ベクターとして、GUS 発現用に pGK-GUS を、タンパク質過剰発現用に pGK-NsGFP をそれぞれ用いた (Qin et al., 2008)。どちらのベクターも pGreen0029 を改変したものであり、植物におけるカナマイシン耐性遺伝子を持つ (Hellens et al., 2000)。また、カナマイシン耐性を持つ T-DNA 挿入変異体の相補性試験のために、ハイグロマイシン耐性遺伝子を持つ pGreen0129 を pGKX と同様に改変したベクターも使用した。どちらのベクターも理化学研究所の藤田美紀博士から分与されたものである。

組換え DNA は PrimeSTAR (TaKaRa)を用いた PCR 法により、各遺伝子のプロモーター断片および CDS 断片を増幅することにより準備した。反応液組成は 50 ng/50 μ l 鋳型 DNA、1 \times 緩衝液、0.2 μ M プライマー、20 μ M dNTP 混合液、2 unit/50 μ l、反応条件は [98°C 2 分、(98°C 10 秒、72°C 1 分/1kbp) \times 30 サイクル、72°C で 5 分、4°C]とした。増幅断片は制限酵素で処理し、Rapid Ligation Kit (Roche)を用いて植物形質転換用ベクターに導入した。

5-2. 形質転換シロイヌナズナの作出

シロイヌナズナの形質転換には、アグロバテリウムを介した花序浸し法 (Clough and Bent, 1998)を改良した方法を用いた。また、形質転換用アグロバクテリウムとして *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 を用いた。シロイヌナズナを明期 16 時間、暗期 8 時間の明暗条件で 5 週間生育させた。組換え DNA を含むアグロバクテリウムを、終濃度 50 mg/L カナマイシンおよび 100 mg/L ゲンタマイシン (Sigma)を加えた YEP 液体培地 (10 g/L Bacto peptone (BD)、10 g/L Bacto Yeast Extract (BD)、5 g/L NaCl、NaOH で pH7.0 に調整)にて 28°C で一晩培養した。培養液 2 ml を集菌し、終濃度 10 μ g/L Benzyladenine

(Sigma)、0.5% NUC-SILCONE L-77 (日本ユニカー)を加えた浸潤緩衝液 [2.3 g/L MS 培地用混合塩類、1 ml/L Gamborg's Vitamin Solution、50 g/L スクロース、KOH で pH5.7 に調整] 1 ml に懸濁した。懸濁液を花序に浸透させて高湿度下で一晩静置した後、さらに 4 週間生育させた植物体から T1 種子を回収した。T1 種子を終濃度 30 mg/L カナマイシン(または 50 mg/L ハイグロマイシン)、200 mg/L クラフォラン (サノフィ・アベンティス)を含む GM 寒天培地上に播種して形質転換シロイヌナズナを選抜した。選抜した植物体から回収した T2 種子を播種して解析に用いた。

6. GUS(β -グルクロニダーゼ)染色による組織局在解析

HsfA1a、*HsfA1b*、*HsfA1d*、*HsfA1e* プロモーター配列をそれぞれ pGK-GUS に組み込んだコンストラクトを導入した形質転換シロイヌナズナを GUS 染色した。プロモーター配列には TAIR (The Arabidopsis Information Resource; <http://www.arabidopsis.org/index.jsp>) に登録されている転写開始点から上流 1000 塩基対までの配列を使用した。

GMK 寒天培地上で生育させたシロイヌナズナを引き抜き、氷冷した 90 %アセトンに浸し、氷上で 15 分間静置して固定した。アセトンを除き、100 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)で一度洗浄した後、GUS 染色液 [50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)、0.26 mg/ml X-Gluc (Rose Scientific)、20% メタノール]に浸けた。バルブ付耐圧デシケーターにサンプルを入れ、真空ポンプを使って 15 分間減圧状態に置いた後、室温で適当な時間静置し染色を行った。染色されたサンプルは 70%エタノールでクロロフィルなどの色素を脱色し観察した。サンプルの観察には実体顕微鏡(MZ APO、Leica)を使用し、デジタル撮影装置(AxioCam HRC、Carl Zeiss)を使って撮影した。

7. T-DNA 挿入変異体の選抜と多重変異体の作出

HsfA1 遺伝子の破壊株をシロイヌナズナ生物資源センター (ABRC)から入手した。*hsfa1d-1*、*hsfa1d-2* としてそれぞれ SAIL_410_E01、SALK_022404 を使用した。以上の変異体は全て Columbia バックグラウンドである。入手した種子は GM 寒天培地で 2 週間生育させ、植物の葉の一部からゲノム DNA の抽出を行った。ゲノム DNA の抽出は、破碎した葉を終濃度 200 μ g/ml Proteinase Kを加えた DNA 抽出液(400 mM NaCl、5 mM EDTA、20 mM Tris-HCl (pH8.0)、0.3% SDS) 50 μ l に浸し、55°C で 3 時間静置することで行った。ゲノム DNA

を鋳型として表 1 に示したプライマーで PCR 法を行い、産物を電気泳動により分離し解析することで、それぞれの植物体の遺伝子型を決定した。ホモ接合体であると確認できた植物体から種子を採取し実験に使用した。

HsfA1a と *HsfA1b* の二重変異体である *hsfa1a/b* はドイツの Tübingen 大学の Schöffl 博士らが作出したものを頂き使用した(Busch et al., 2005)。*Hsfa1a/b* は Wassileskija バックグラウンドである。

これ以外の多重変異体は、それぞれの変異体を交配することにより作出した。交配する変異体をそれぞれ同時に鉢植えて生育させ、開花直前に種子を得る側の植物体の蕾を開き、雄ずいを取り除いた。翌日もう一方の変異体の花から雄ずいを取り出し、除雄した花の柱頭に擦りつけることで受粉させた。交配を行った花からできた種子を回収し、この世代で全ての種子がヘテロ接合体になっていることを上記の PCR 法により確認した。このようにして得られた種子より生育させた植物体から、自家受粉によって次の世代の種子を回収し、上記の選抜法でホモ接合体の多重変異体を選抜し、その植物体から得られた種子を実験に使用した。

結果

HSF ファミリー遺伝子の発現解析

高温ストレス下での *DREB2A* の発現誘導を制御する *HSF* 遺伝子を調べるために、遺伝子の発現パターンを解析した。21 種類ある *HSF* 全ての遺伝子発現パターンを調べるために、オンライン上のデータベースである

GENEVESTIGATOR (<https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp>) を使用した。それぞれの *HSF* 遺伝子について、データベース上に登録されている高温ストレス応答のデータ及び各成長段階のデータを用いて発現を調べた (図 3)。高温ストレス応答に関してデータベースに登録されている値はストレス処理開始前、38℃処理 15 分、30 分、1 時間、3 時間の 5 点である。このデータ解析から 21 種の *Hsf* は、恒常的に発現していて高温ストレス下でも発現量が変化しないグループ、高温ストレスにより発現が誘導されるグループ、発現量が非常に小さい、もしくは発現していないグループの 3 つのグループに分かれた。恒常的に発現しているグループには、*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d*、*HsfA4c*、*HsfB3*、*HsfC1* の 6 種類が含まれた。高温ストレスにより発現が誘導されるグループに

は、*HsfA1e*、*HsfA2*、*HsfA3*、*HsfA4a*、*HsfA5*、*HsfA7a*、*HsfA7b*、*HsfA8*、*HsfB1*、*HsfB2a*、*HsfB2b*、*HsfB4* の 12 種類が含まれた。ただし、*HsfA4a*、*HsfA5*、*HsfA8*、*HsfB4* の誘導は弱く、*HsfA3* の発現誘導は 3 時間以降が強いという特徴が見られた。また、*DREB2A* の発現もこのグループと同様の傾向を示した。最後の発現量が少ない、または発現していないグループには、*HsfA6a*、*HsfA6b*、*HsfA9* の 3 種類が含まれた。各成長段階のデータからは、*HsfA1e* と *HsfA9* は種子で発現が強いことが示された。*DREB2A* の高温ストレス誘導性を制御している *HSF* は *DREB2A* の誘導の前に十分量発現していると考えられるため、恒常的に発現しているグループが有力な候補であると考えられた。恒常的な遺伝子発現を示し、*DREB2A* プロモーターの HSE を含む断片を持つレポーター遺伝子の活性化能をもつ、*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の三遺伝子の発現パターンについて定量的 RT-PCR とプロモーターと *GUS* の融合遺伝子を使うことでさらに詳しく解析を行うことにした。これらの三遺伝子は、相同性の高い *HsfA1e* を加えた四遺伝子で *HsfA1* サブファミリーを形成しているとされているため、*HsfA1e* も合わせて解析を行った。

定量的 RT-PCR 解析は GM 寒天培地で 2 週間生育させた野生型 (Columbia) をサンプルとして使用した。サンプリングは高温ストレス開始直前と高温ストレス (37°C、1 時間) 開始直後に地上部と地下部で分けて行なった(図 4A)。*HsfA1* サブファミリーの全てにおいて、地下部と比較して地上部の方が遺伝子の発現レベルが高いことが示された。無処理時では、*HsfA1a*、*HsfA1d*、*HsfA1b*、*HsfA1e* の順に発現量が多く、*HsfA1e* は高温ストレスによって発現誘導が強く起きた。また、同時に *DREB2A* の発現量も測定した。*DREB2A* も地上部における発現の方が高く、高温ストレスによって非常に強く誘導されることが確認できた。

さらに、プロモーターと *GUS* の融合遺伝子を導入したシロイヌナズナの *GUS* 染色による組織局在解析を行った。GMK 寒天培地で生育させ *GUS* 染色法により遺伝子の発現部位を調べた (図 4B)。*HsfA1a* に関しては、この実験法では染色を確認できなかった。*HsfA1b* は主に子葉で発現していることが示された。*HsfA1d* は子葉、本葉ともに発現を確認できた。特に、維管束系やトライコームの基部における染色が顕著であった。*HsfA1e* は子葉の一部で染色を確認できた。*HsfA1a* に関しては発現が確認できなかったが、それ以外はどれも主に地上部で発現していることが組織レベルでも確認された。

データベース、定量的 RT-PCR、プロモーターと *GUS* の融合遺伝子による発現パターンの解析及び以前に行われた HSF の転写活性化能についての解析から、*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* が *DREB2A* の制御因子として働いているという仮説を立てた。*HsfA1* サブファミリーのもう一つの遺伝子 *HsfA1e* はストレスのない状態での発現量が低くまた高温ストレスにより顕著に誘導されることから、高温ストレス後 1 時間に発現誘導のピークに達する *DREB2A* の制御因子ではないと予想した。

***HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* による *DREB2A* の発現への影響**

HsfA1a、*HsfA1b*、*HsfA1d* が *DREB2A* の発現に影響を与えるのかを調べるために、*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* それぞれを過剰発現するシロイヌナズナを作出した。遺伝子の過剰発現にはカリフラワーモザイクウイルス (*CaMV*) 35S プロモーターを用いた。

各遺伝子の過剰発現シロイヌナズナを GMK 寒天培地で 2 週間生育させた後、サンプリングを行い、導入遺伝子と *DREB2A* 遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR により調べた (図 5)。全ての過剰発現シロイヌナズナにおいて導入遺伝子が過剰発現していることが確認できた。しかし、どの植物体においても *DREB2A* 遺伝子の発現量に変化は見られなかった。過剰発現シロイヌナズナを用いた解析から、*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の mRNA 蓄積量が増加するだけでは *DREB2A* の発現を誘導することはできないことが明らかになった。

内在性の *HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* 遺伝子が *DREB2A* の発現誘導に寄与するかどうかを調べるために、T-DNA 挿入変異体を使用して解析を行った。解析には ABRC から取得した *hsfa1d-1*、*hsfa1d-2* およびドイツの Tübingen 大学の Schöffl 博士らが単離した *hsfa1a/b* を使用した (Busch et al., 2005)。これらの変異体からゲノム DNA の抽出を行い T-DNA の挿入を確認した後、RT-PCR により実際に遺伝子の発現がなくなっていることを確認した (図 6A)。さらに、*hsfa1d-1* と *hsfa1a/b* を掛けあわせることで、*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の全ての遺伝子発現がなくなった *hsfa1a/b/d* 三重変異体と、*hsfa1b/d*、*hsfa1a/d* 二重変異体を作成し、解析に使用した。また、*hsfa1d-1*、*hsfa1d-2* が Columbia バックグラウンドで、*hsfa1a/b* は Wassileskija をバックグラウンドであることから、ここからは 2 種類のエコタイプを実験の対照用として使用した。野生型あるいは変異体

を GM 寒天培地上で 2 週間生育させた後、37℃で高温ストレス処理を行いサンプリングした。各変異体における *DREB2A* の発現誘導を定量的 RT-PCR を用いて調べた (図 6B)。Columbia と Wassileskijia の二つの野生型において、熱ストレス下での *DREB2A* 発現誘導に大きな差は見られなかった。また、*hsfa1d-2*、*hsfa1a/b*、*hsfa1b/d* においても、*DREB2A* の発現誘導に大きな変化は見られなかった。ところが、*hsfa1a/d* においては *DREB2A* の発現誘導が野生型の 4 分の 1 から 5 分の 1 程度まで減少していた。さらに、*hsfa1a/b/d* 三重変異体においては、熱ストレス下でも *DREB2A* の発現がまったく誘導されなかった。また、この三重変異体に *HsfA1b* と *HsfA1d* を過剰発現させることで相補性試験を行った (図 6C)。それぞれにおいて、導入遺伝子が過剰発現をしている事を確認した後、37℃で 1 時間処理したときの *DREB2A* の発現を定量的 RT-PCR で調べた。その結果、*HsfA1b* または *HsfA1d* が発現することによって、高温ストレスによる *DREB2A* の発現誘導が復帰することが確認できた。これらの結果から、高温ストレスによる *DREB2A* の発現誘導は *HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の 3 種類の *HsfA1* サブファミリー遺伝子により相補的に制御されていることが明らかになった。

DREB2A は高温ストレスだけでなく、乾燥ストレスでも誘導されることが知られている (Liu et al., 1998; Sakuma et al., 2006b)。*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* による *DREB2A* の発現制御は乾燥ストレス時においても機能しているかを調べるために、これらの変異体を乾燥ストレス処理する実験を行った。この実験では、野生型と変異体をそれぞれ GM 寒天培地上で 2 週間生育させた後、培地から引きぬきパラフィルム上に置くことで乾燥ストレス処理とした。定量的 RT-PCR により各変異体における *DREB2A* の発現誘導を調べたところ、Wassileskijia において乾燥処理 5 時間の誘導が強く起きていたものの、*HsfA1* サブファミリー遺伝子の変異による影響は見られなかった (図 7A)。さらに、乾燥ストレス下で *DREB2A* により制御されることが知られている *RD29A* 遺伝子の誘導も調べたが、*hsfa1a/b/d* において発現誘導の変化は見られなかった (図 7B)。

考察

これまでに我々の研究室において、*DREB2A* は乾燥や塩ストレスだけでなく

高温ストレスでも数多くの遺伝子の発現制御を行っていることが示されていた (Sakuma et al., 2006a)。 *DREB2A* 自体もストレス誘導性の遺伝子で、そのプロモーター中には高温ストレス下における発現誘導に重要な部位があることが明らかとなっていた (図 1B)。その部位には HSF のシス配列である HSE が存在し (図 1C)、シロイヌナズナの葉肉細胞を用いた一過的遺伝子発現系による解析では、*HsfA1* サブファミリー遺伝子、*HsfA2*、*HsfA3*、*HsfA6b*、*HsfB4* によってその HSE が存在する部位を用いたレポーター遺伝子が活性化された (図 2)。

本章では、シロイヌナズナの植物体で実際に *DREB2A* の高温応答を制御している因子を明らかにすることを目的として実験を行い、高温ストレス下における *DREB2A* の発現誘導は *HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の 3 種類の HSF により、相補的に制御されていることを明らかにした。*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の単独の変異体、二重変異体、三重変異体を高温ストレス処理した解析から、これらの遺伝子全てが機能しなくなったときに初めて *DREB2A* の誘導が起きなくなることが示された (図 6B)。これは、この三遺伝子がそれぞれ同等に近い機能を持ち相補できることを示している。実際に、*hsfa1a/b*、*hsfa1a/d*、*hsfa1b/d* の二重変異体、*HsfA1b*、*HsfA1d* を過剰発現させた三重変異体においては高温ストレス下での *DREB2A* の発現が誘導された (図 6B,C)。これまでに *hsfa1a/b* に関する解析が行われており、*HsfA1a* と *HsfA1b* がシロイヌナズナの初期高温ストレス応答に重要な遺伝子であることが報告されていた (Busch et al., 2005)。*hsfa1a/b* においては高温ストレス応答に関する種々の遺伝子の発現誘導が弱くなっていたが、そこに高温ストレス応答のキープファクターの一つと言える *DREB2A* は含まれていなかった。そのため、これまで *DREB2A* の発現は HSF とは別の制御機構によるものである可能性も考えられていたが (Kotak et al., 2007b)、今回の解析により初めて *DREB2A* が *HsfA1* の下流にあることが示された。

二重変異体の中では *hsfa1a/d* でのみ *DREB2A* の高温ストレス応答が低下し、*hsfa1a/b*、*hsfa1b/d* では野生型と殆ど変わらなかった (図 6B)。この結果は *DREB2A* の発現応答において *HsfA1a* と *HsfA1d* の働きが *HsfA1b* の働きより重要な事示していると考えられる。しかしこれは、野生型において遺伝子の発現量が *HsfA1a*、*HsfA1d*、*HsfA1b* の順で大きいことを単純に反映している可能性も考えられる (図 4A)。実際に *hsfa1a/b/d* 三重変異体に *HsfA1b* を野生型

の数十倍発現させることで、*DREB2A* の発現誘導は野生型とほぼ同程度までに回復していた (図 6C)。葉肉細胞を使用した一過的遺伝子発現系によるレポーター遺伝子の活性化能解析では、*HsfA1a* の機能は他の二つと比較して劣っていた (図 2B)。しかし、*HsfA1a* のみが機能する *hsfa1b/d* 二重変異体においても *DREB2A* の発現レベルは野生型と変わらなかったことから、植物中では十分に機能していると考えられ (図 6B)、一過的遺伝子発現系では、実際の転写活性を十分反映していない可能性も考えられる。植物中では、*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* それぞれの発現量がどの程度あるかが *DREB2A* の発現制御において重要であると予想される。

DREB2A の発現量は高温ストレス下において、ストレス開始後 1 時間程度でピークとなり、その後 2 時間あたりまでに急激に低下し、無処理時の 20 倍から 40 倍程度で維持されるという発現パターンを示す。本章の研究から *DREB2A* の高温ストレス下における発現誘導は *HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の 3 種類の遺伝子によって制御されていることが明らかになった。一方で、*DREB2A* の急激な発現低下やその後の発現維持に関しては明らかになっていない。適切なストレス応答において、反応が過剰にならない様に抑える機構も重要であると考えられる。実際に高温ストレスと乾燥ストレス応答に重要な *DREB2A* や高温ストレス応答に重要な *HsfA2* や *HsfA3*、また乾燥ストレスや低温ストレスに重要な *DREB1A* の過剰発現体は各ストレスに対する耐性が向上する一方で、生育に阻害が見られることが報告されている (Liu et al., 1998; Sakuma et al., 2006b; Ogawa et al., 2007; Yoshida et al., 2008)。ストレス応答性のプロモーターを利用して植物に導入することで生育阻害を起こさずに、ストレス耐性を付与することにも成功している (Kasuga et al., 1999)。しかし、植物中における高温ストレス応答の負の制御がどのように行われているのかを明らかにすることで、より自然に近い制御機構を導入して、作物に効果的なストレス耐性付与を行うことが可能になると考えられる。

また、本研究から、*HSF* は *DREB2A* の乾燥ストレス下における発現誘導には関与していないことが明らかになった。*DREB2A* の発現は自然界において、様々なストレスに適切に対応できるように異なる因子によって制御されていると考えられる。それによって、乾燥と高温の複合的なストレスなどにも柔軟に対処しているのではないかと予想される。

図表一覧

表 1. 第二章で使したプライマーの一覧

各々のプライマーセットにおいて上段が遺伝子方向に対して順方向のプライマー、下段が逆方向のプライマーである。

実験内容		
(材料と方法の項目)		
(対応する図番号)	増幅産物	配列 (5' to 3')
定量的 RT-PCR (4-3) (図 4A, 5, 6B, C, 7)	<i>18s rRNA</i>	AAACGGCTACCACATCCAAG CCTCCAATGGATCCTCGTTA
	<i>DREB2A</i>	CAGTGTTGCCAACGGTTCAT AAACGGAGGTATTCCGTAGTTGAG
	<i>HsfA1a</i>	CCGGAGTTTTCTCGTGATCT TCGATCTGGATCCACTTTCC
	<i>HsfA1b</i>	GGTGCTCTTGCCCAAGTATT CCATCGGTCAGGATCAACTT
	<i>HsfA1d</i>	AAACATTGCTTTGGCTTGCT GAGACGGCATTGTCCGTAAT
	<i>HsfA1e</i>	TCGCCAAACAGTTTCTACCAA GCGGTCTGGATCAACTTTTC
	<i>RD29A</i>	TGGATCTGAAGAACGAATCTGATATC GGTCTTCCCTTCGCCAGAA
	<i>HsfA1a</i> プロモータ	GGGTCTAGACCATTGAGAAAAAGCTCAG
	—	GGGTCTAGAACCCTTTTATTTCTCTGTGA
	<i>HsfA1b</i> プロモータ	GGGGAGCTCTCCTGACTGCAGCCCTGTAT
	—	GGGTCTAGAGGCCATTTCCGTTCAATTCA
	<i>HsfA1d</i> プロモータ	GGGGAGCTCTTTTTTAAGAAGGTTTGAC
	—	GGGTCTAGAAGAGATATGGGCGGAGAGAG
GUS による組織局在解析 (6) (図 4B)	<i>HsfA1e</i> プロモータ	GGGGAGCTCCTCGTGTGCTTTGCGACAAC
	—	GGGTCTAGACTCTCTCTCTCTGTCTAC
RT-PCR	<i>HsfA1a</i>	TACGAAAATGGACGGTGTTA

(4-2)		GTTTCTGATGTGAGAAGACCCAA
(図 6A)	<i>HsfA1b</i>	GGGGCGGCCGCATGGAATCGGTTCCCGAAT GGGCTCGAGTTATTTCTCTGTGCTTCTGA
	<i>HsfA1d</i>	CTCCGTTTCTGAGCAAGACC ATGAATATGCTGCTCTCAGG
	<i>HsfA1e</i>	CAGAATGTGGGGCAGAAAGT CTGTCTCGCATCCAACAAGA
	<i>ACT2</i>	GACCTTGCTGGACGTGACCTTAC GTAGTCAACAGCAACAAAGGAGAGC

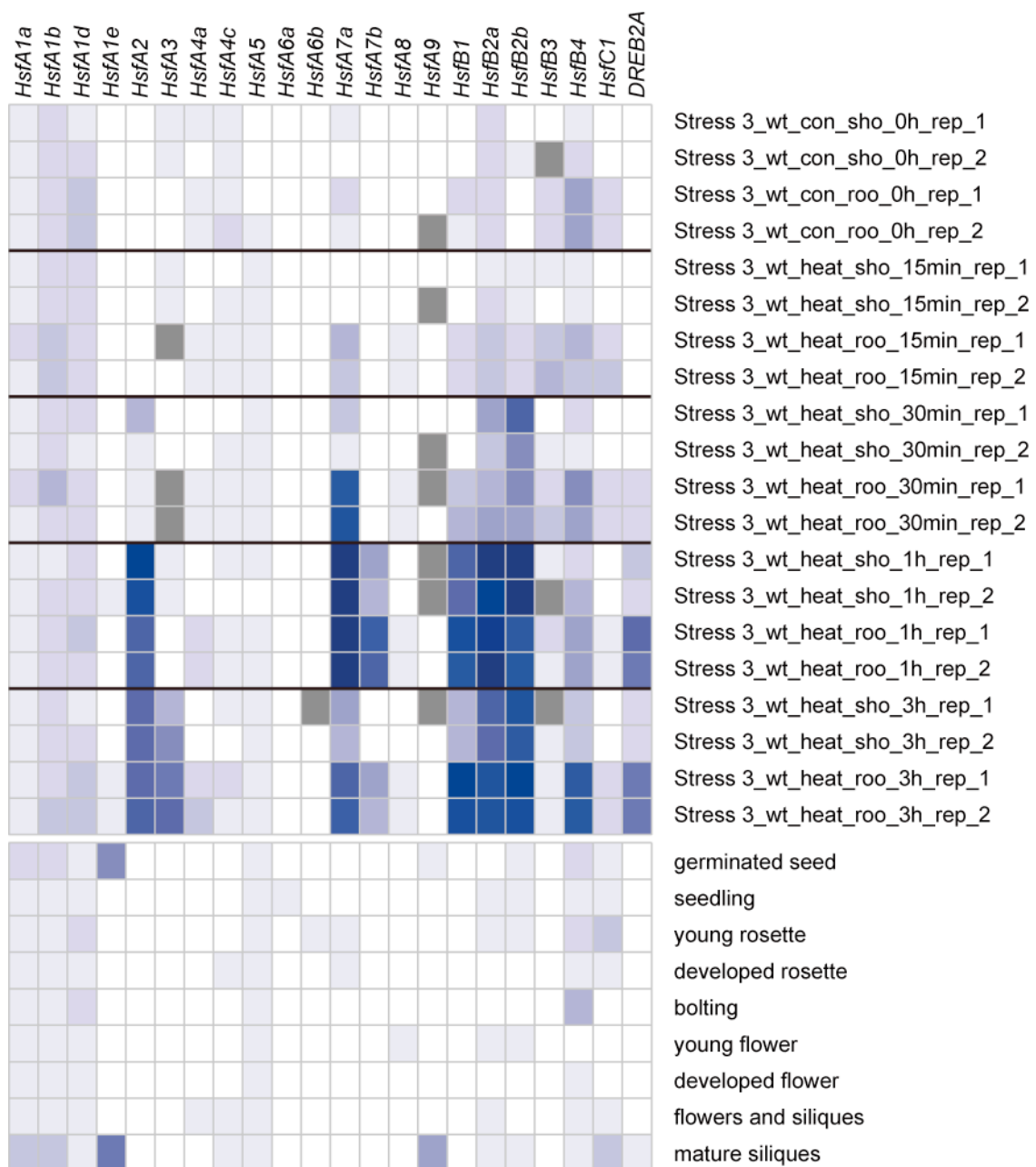


図 3. GENEVESTIGATOR による *HSF* の発現解析

GENEVESTIGATOR (<https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp>) を用いてシロイヌナズナの 21 種の *HSF* の遺伝子発現を解析した。上段はシロイヌナズナの野生型を 38°C で高温処理したときの遺伝子発現、下段は各成長ステージにおける遺伝子発現である。データは GENEVESTIGATOR に登録されているマイクロアレイデータによるもので、青色が濃いほど発現が強いことを示し、sho は地上部、roo は根における発現を示す。

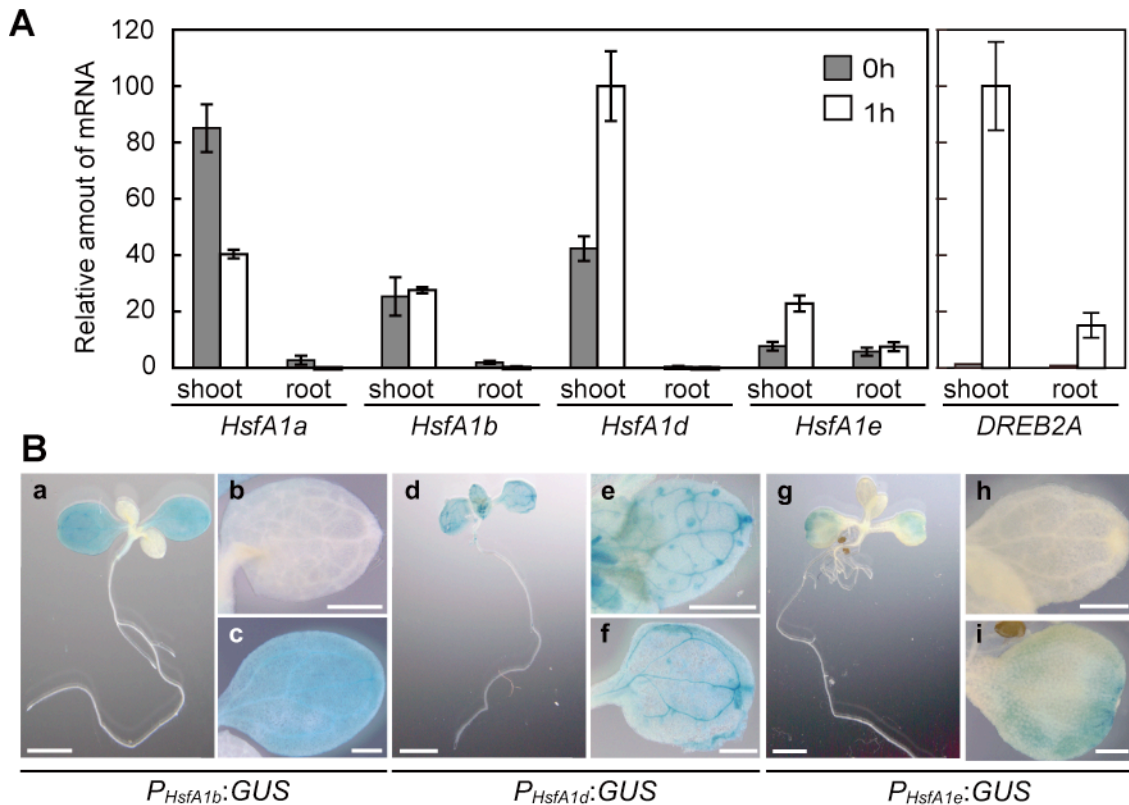


図 4. *HsfA1* サブファミリー遺伝子の発現

- (A) *HsfA1* サブファミリー遺伝子と *DREB2A* の発現。2 週間生育させた野生型 (Columbia) を 37°C 処理した後、地上部と根に分けてサンプリングし、RNA を抽出した。発現量解析は定量的 RT-PCR によって行い、*HsfA1* サブファミリー遺伝子に関しては発現量が最大になった *HsfA1d* の 37°C 処理 1 時間の shoot の値を 100 とした相対値を示した。*DREB2A* に関しては 37°C 処理 1 時間の shoot の値を 100 とした相対値を示した。値は三回の PCR の平均値でエラーバーは標準偏差を示した。
- (B) *HsfA1* サブファミリー遺伝子の組織局在。転写開始点より上流 1 kbp までの *HsfA1* サブファミリーのプロモーター配列と *GUS* の融合遺伝子を導入した植物の幼植物体を一晚 GUS 染色し、実体顕微鏡で観察した。スケールバーは a、d、g が 2 mm、他が 0.5 mm である。

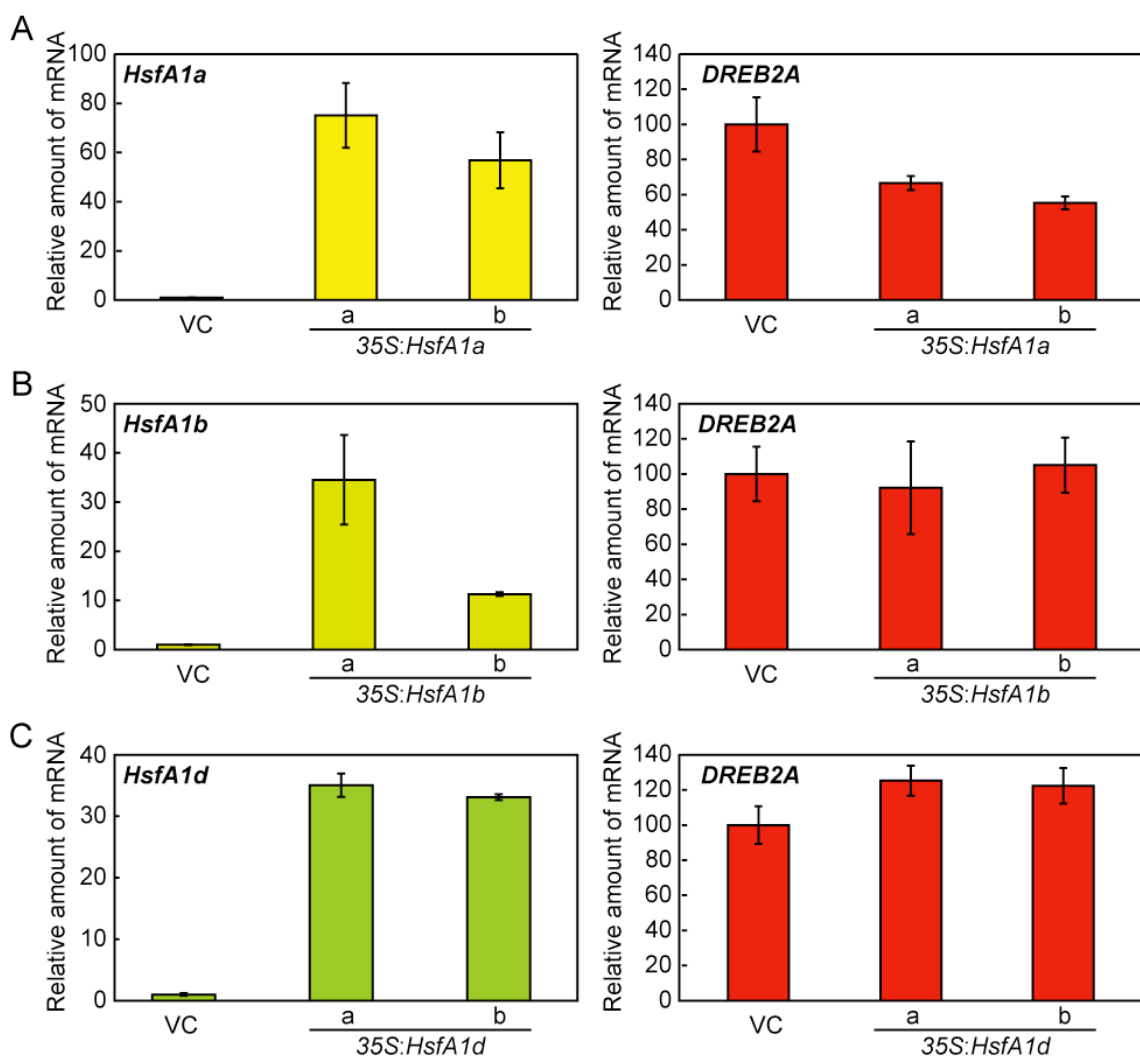


図 5. *HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* 過剰発現体の解析

(A) *HsfA1a* 過剰発現体 (*35S:HsfA1a*) の解析。過剰発現体における *HsfA1a* (左) と *DREB2A* (右) の発現量を定量的 RT-PCR で調べた。

(B) *HsfA1b* 過剰発現体 (*35S:HsfA1b*) の解析。過剰発現体における *HsfA1b* (左) と *DREB2A* (右) の発現量を定量的 RT-PCR で調べた。

(C) *HsfA1d* 過剰発現体 (*35S:HsfA1d*) の解析。過剰発現体における *HsfA1d* (左) と *DREB2A* (右) の発現量を定量的 RT-PCR で調べた。

全てにおいて、過剰発現体は 2 週間生育させたものを用い、ストレスを与えないようにサンプリングし解析に使用した。左のグラフではベクターコントロール (VC) の値を 1 とした相対値を、右のグラフでは VC の値を 100 とした相対値で示した。値は三回の PCR の平均値でエラーバーは標準偏差を示した。

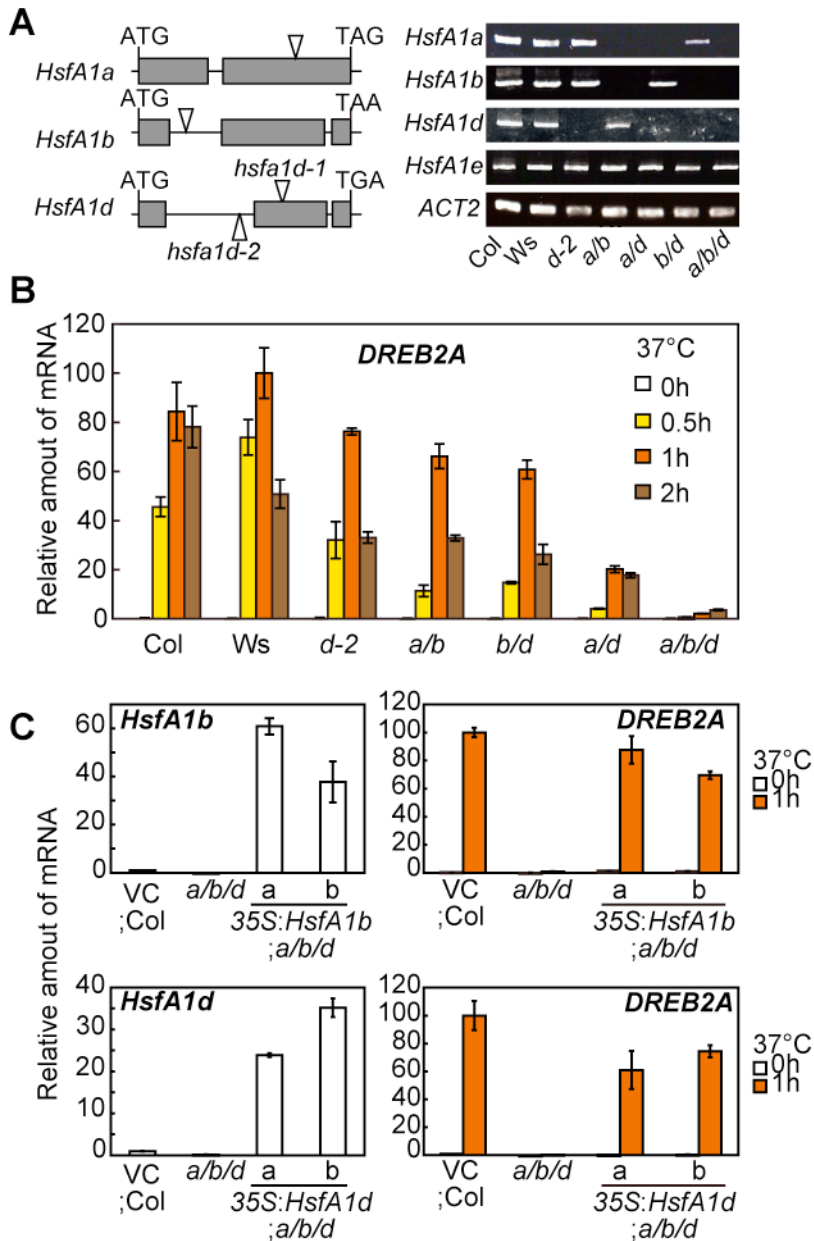


図 6. *hsfa1a/b/d* 三重変異体の解析

- (A) *HsfA1* 遺伝子の構造と変異体の T-DNA 挿入部位 (左)、及び RT-PCR による遺伝子発現解析 (右)。図中の四角は *HsfA1* のコード領域を三角形は変異体の T-DNA 挿入部位を示した。2 週間生育させた植物体における遺伝子発現を RT-PCR で確認した、コントロールとしてアクチン (ACT2) 及び *HsfA1e* の発現も調べた。PCR 反応は 30 サイクルで行った。
- (B) 37°C 処理下の変異体における *DREB2A* の発現量解析。2 週間生育させた植物体に対して 37°C でストレス処理を行い、*DREB2A* の発現誘導を定量的

RT-PCR で測定した。最大値であった野生型 *Wassileskijia* (Ws) の 37°C 1 時間の値を 100 として相対値で示した。値は三回の PCR の平均値でエラーバーは標準偏差を示した。

- (C) *hsfa1a/b/d* 三重変異体を用いた *HsfA1b* 及び *HsfA1d* の過剰発現体の解析。
hsfa1a/b/d 三重変異体に対して、*HsfA1b* (上段、*35S::HsfA1b; a/b/d*) 及び *HsfA1d* (下段、*35S::HsfA1d; a/b/d*) を過剰発現させた植物体を作成した。過剰発現体を 2 週間生育させ、それぞれにおいて *HsfA1b* 及び *HsfA1d* の発現量を定量的 RT-PCR で測定した。野生型 (Columbia) に空のベクターを導入した植物 (VC;Col) における発現量を 1 として相対値で示した(左)。過剰発現体を 37°C で高温ストレス処理し、*DREB2A* の発現誘導を定量的 RT-PCR で測定した (右)。最大値の VC;Col、37°C 1 時間処理の値を 100 として相対値で示した。値は三回の PCR の平均値でエラーバーは標準偏差を示した。

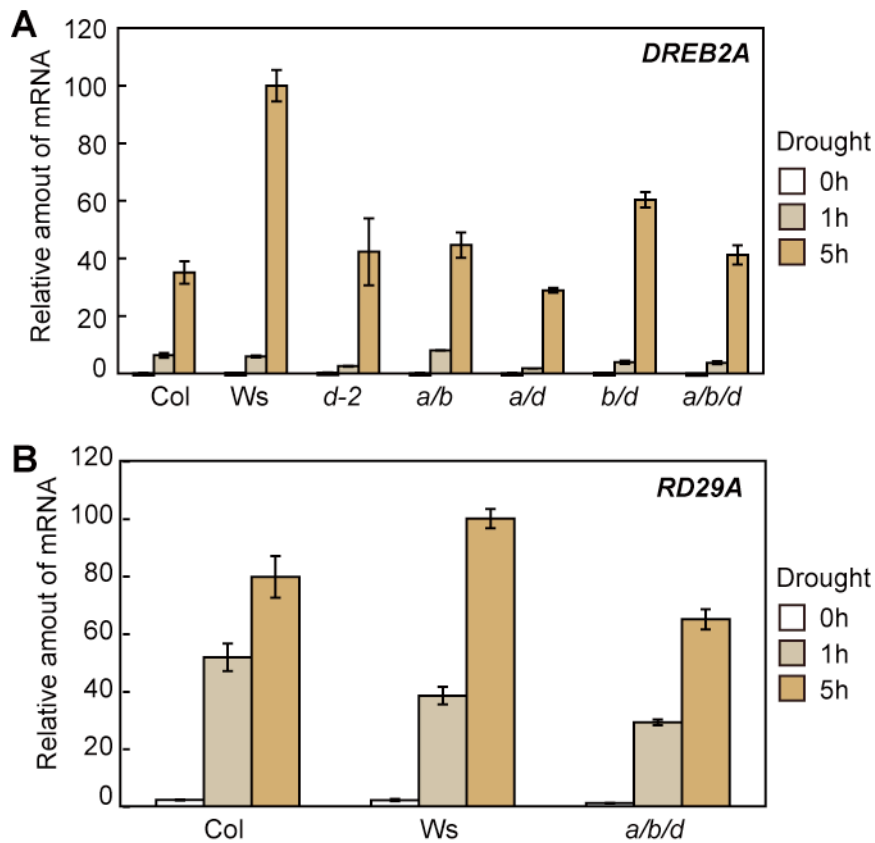


図 7. 乾燥ストレス下の *hsfa1a/b/d* 三重変異体における遺伝子発現
 二週間生育させた *hsfa1a/b/d* 三重変異体を含む変異体を乾燥ストレス処理し、*DREB2A* (A) 及び *DREB2A* の下流遺伝子である *RD29A* (B) の発現を定量的 RT-PCR で測定した。発現量が最大であった野生型 *Wassilewskijia* (Ws) の乾燥ストレス 5 時間における発現量を 100 として相対値で示した。値は三回の PCR の平均値でエラーバーは標準偏差を示した。

第三章 *HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d*による高温ストレス応答制御

*HSP*とそれを制御する *HSF*による高温ストレス応答制御は植物だけでなく、あらゆる生物で保存されている生命を維持する必須な機構である(Kotak et al., 2007b; Akerfelt et al., 2010)。しかし、哺乳類や昆虫などでは数種類しか存在しない *HSF*は、高等植物では数多く存在し、より複雑な高温ストレス応答制御機構を持っていると考えられる。シロイヌナズナにおいては 21 種の *HSF*が存在することが報告され(Nover et al., 2001)、それらの内数種の遺伝子に関して研究が進められてきた。これまでにドイツの Tübingen 大学の Schöffl 博士らのグループによって、*HsfA1a* と *HsfA1b* が高温ストレスに対して初期に働くという報告がされている(Busch et al., 2005)。*hsfa1a/b* 二重変異体を用いたマイクロアレイ解析を行い、8 個の *HSP* と 3 個の *Hsf* (*HsfA7a*, *HsfB1*, *HsfB2A*) を含む 112 個の熱ストレス誘導性遺伝子の発現が減少することが示されている。中でも、5 個の *HSP* については高温ストレス下における発現誘導が見られなくなっていた。その後、高温ストレスにより発現が誘導される *HsfA2* がさらなる下流遺伝子の発現誘導に主要な機能を果たすとされている (Busch et al., 2005; Nishizawa et al., 2006; Charng et al., 2007)。*HsfA2* と同様に高温ストレスによって誘導される *DREB2A* も *HSP* 等の高温ストレス誘導性の遺伝子を制御する主要な転写因子と考えられている (Schramm et al., 2008; Yoshida et al., 2008)。しかし、Schöffl 博士らの研究において *HsfA2* や *DREB2A* の発現変化は見られず、その他の研究においてもこれらの発現誘導を制御する因子に関しては明らかになっていなかった(Kotak et al., 2007b)。

高温ストレス応答に重要な *HSF*の転写活性化能の調整に関しても研究が行われており、動物においては *HSP90* や *HSP70* によって *HSF1* の活性が負に制御されることが知られている(Akerfelt et al., 2010)。その他にも活性の制御にはリン酸化や SUMO 化やアセチル化が関わっていると考えられている。また、シロイヌナズナにおいては *HSP90* と *HsfA1d* が相互作用することがタマネギの一過的遺伝子発現系において調べられている(Yamada et al., 2007)。

第二章における研究で、*DREB2A* の高温ストレス下の発現制御は *HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の 3 つの遺伝子によって行われていることが明らかになった。この三遺伝子はそれぞれが機能相補的に働き、*hsfa1a/b*、*hsfa1a/d*、*hsfa1b/d* のいずれにおいても高温ストレスによる *DREB2A* の発現が誘導されたが、これ

らの遺伝子がすべて変異した *hsfa1a/b/d* においては全く誘導されなくなった (図 6)。この結果から、*HsfA1* サブファミリー遺伝子の高温ストレス応答における役割は *hsfa1a/b* の解析を基に報告された結果と比較して (Busch et al., 2005) はるかに広範にわたると考えられた。

そこで、本章では互いに相補しあう *HsfA1* サブファミリーの三遺伝子が全体として高温ストレスの初期応答に果たす役割を明らかにすることを目的とした。この研究により *DREB2A* だけでなく、広範な高温ストレス応答性遺伝子の初期応答が明らかになることが期待された。同時に、ストレス誘導性ではない *HsfA1* サブファミリーがどのようにして高温ストレス下で *DREB2A* の発現誘導を実現しているかを解析する事を目的とした。

材料と方法

1. サンプル植物と生育条件

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の野生型として Columbia エコタイプと Wassilewskija エコタイプを使用した。生育条件は第二章と同様の条件を用いた。

2. ストレス処理および薬剤処理

特に記す場合を除き、GM(K)寒天培地上で 2~3 週間生育させた植物体をストレス処理実験に供した。高温ストレス処理は、第二章と同様に行なった。GDA 処理には、GDA (ALEXIS biochemical) を 50 μ M になるように Milli-Q 水に溶かした GDA 溶液を使用した。寒天培地から引き抜いたシロイヌナズナをシャーレに分注された GDA 溶液に浸けることで GDA 処理とした。シャーレは 22°C の植物インキュベーター内に静置した。GDA 処理と同様の条件で GDA を加えない Milli-Q 水に浸ける処理も行い対照実験とした。対照実験は 22°C の植物インキュベーター内に静置するものと 37°C に調整したハイブリダイゼーションインキュベーター HP-80 内に静置するものの 2 種類の方法で行った。

サンプリングは第二章と同様に行なった。

3. RNA の抽出

Total RNA の抽出は第二章と同様に行なった

4. 定量的 RT-PCR による解析

定量的 RT-PCR 解析は第二章と同様に行った。

5. 形質転換シロイヌナズナの作出

5-1. 植物形質転換用ベクターと組換え DNA

植物形質転換用ベクターとして、GFP 融合タンパク質発現用に pGK-NsGFP を用いた (Qin et al., 2008)。

組換え DNA の植物形質転換用ベクターへの導入は第二章と同様に行なった。

5-2. 形質転換シロイヌナズナの作出

シロイヌナズナの形質転換と選抜は第二章と同様の方法で行った。

6. T-DNA 挿入変異体と多重変異体

第二章で作出した変異体を本研究でも使用した。

7. GFP 蛍光による細胞内局在解析

HsfA1a、*HsfA1b*、*HsfA1d*、*HsfA1e*、*HSP90.3* のコード配列をそれぞれ pGK-NsGFP の GFP の 3' 側に読み枠をあわせて組み込んだコンストラクトを導入した形質転換シロイヌナズナを GFP 蛍光観察に使用した。

GMK 寒天培地で生育させた形質転換シロイヌナズナをそのまま、または高温ストレス処理及び GDA 処理を行った後にサンプルとした。サンプルは共焦点レーザー顕微鏡 LSM 5 PASCAL (Carl Zeiss) を用いて速やかに観察した。励起光として波長 488 nm のレーザーを用い、波長 505~530 nm の蛍光を検出した。

8. タマネギの表皮細胞を用いた一過的遺伝子発現系による解析

GFP 蛍光観察用には、*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d*、*HsfA1e*、*HSP90.3* の CDS 配列をそれぞれ pGK-NsGFP に組み込んだコンストラクトを実験に使用した。BiFC 解析用には pUC-SPYNE および pUC-SPYCE に *HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d*、*HSP90.1*、*HSP90.3* の CDS 配列を組み込んだコンストラクトを作成し、実験に使用した (Walter et al., 2004)。

タマネギの表皮細胞への組換え遺伝子の導入は (Fujita et al., 2005) の方法を参考にした。タマネギの表皮細胞へのコンストラクトの導入はパーディクルガ

ン(PDS-1000/He; Bio-Rad Laboratory)を使用した、その条件は 28 inch Hg、ヘリウム 1800 p.s.i、ターゲットとの距離 6 cm、1.0 μ m の gold microcarrier とした。タマネギの表皮細胞は導入後 22°Cで一晩静置し、観察に使用した。

9. マイクロアレイによる誘導性遺伝子の解析

hsfa1a/b/d 三重変異体と対照用に Columbia と Wassileskija を解析に使用した。それぞれの植物体を GM 寒天培地で 2 週間生育させた後、無処理のものまたは高温ストレス処理 (37°C 1 時間) 後のものをサンプルとし、3 と同様の方法で RNA 抽出を行いマイクロアレイ解析に使用した。RNA は、Bioanalyzer (Agilent) を使用して質をチェックした。rRNA のバンドが明瞭であり、それぞれの rRNA の量比が理論値と矛盾していないことを確認し、以後の標識に用いた。

解析には Agilent 社の 44 k オリゴマイクロアレイ (Arabidopsis oligomicro array ver 3.0) を用いた。試料のラベリング以降の過程については農業生物資源研究所にあるフローチャートに従って行った。なお、以下のすべての試薬、装置についても特に記す場合を除き Agilent 社のものを使用した。

9-1. プローブの合成

1 試料あたり 800 ng の total RNA を使用し、これを 400 ng ずつ Cy3, Cy5 により標識した。total RNA に T7 promoter primer を加え、65°C で 10 分間熱変性をした後、氷中で 5 分間急冷した。これに cDNA 合成 Master Mix (5×First Strand buffer 2.0 μ l, 0.1 M DTT 1.0 μ l, 10 mM dNTP mix 0.5 μ l, MMLV-RT 0.5 μ l, RNaseOUT 0.25 μ l) を加え、40°C で 2 時間処理した。その後 65°C で 15 分間処理し、反応を停止させた後、氷中で 5 分間急冷した。それぞれの反応液に 10 mM Cyanine3 CTP (cytosine triphosphate)、10 mM Cyanine5 CTP を 1.2 μ l ずつ加え、これに Transcription Mix (Nuclease-free water 7.65 μ l, 4×Transcription buffer 10.0 μ l, 0.1M DTT 3.0 μ l, NTP Mix 4.0 μ l, 50% PEG 3.2 μ l, RNaseOUT 0.25 μ l, Inorganic Pyrophosphatase 0.3 μ l, T7 RNA Polymerase 0.4 μ l) を加え、激しく攪拌して遮光状態で 40°C、120 分間反応させた。これに nuclease free water 60 μ l, RLT-buffer 350 μ l, エタノール 250 μ l を加え、ピペットで混合した。この溶液を 2 ml のコレクションチューブをつけた RNeasy mini カラム (QIAGEN) に移し、13,000 rpm で 30 秒間遠心した。新しいコレクションチューブにカラムを移し、500 μ l の RPR-Buffer を加え、13,000 rpm で 30 秒間遠心した。この作業をもう一度繰り返し、カラムを 1.5 ml のコレクションチューブに移したあと 30 μ l の

RNase-Free water を加え、1 分間静置し、13,000 rpm で 30 秒間遠心し cRNA を回収した。もう一度この作業を繰り返し、260 nm の吸光度を測定し濃度を決定した。

9-2. ハイブリダイゼーション

cRNA ターゲット溶液 (Cy3 ラベル化 cRNA 1 μ g、Cy5 ラベル化 cRNA 1 μ g、10 \times コントロールターゲット 50 μ l を nuclease free water で 250 μ l にメスアップしたもの) を作製し、これに 25 \times fragmentation buffer 10 μ l を加え、激しく攪拌しターゲットの断片化を行った。この溶液を遮光状態で 60 $^{\circ}$ C、30 分間処理した。この溶液に 250 μ l の 2 \times ハイブリダイゼーションバッファーを加え、泡立てないように攪拌し、マイクロアレイスライドへ充填した。そして 60 $^{\circ}$ C で約 17 時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションの終了したスライドを洗浄バッファー 1 (6 \times SSC、0.005 % Triton X-102) で室温、10 分間洗浄した。次に洗浄バッファー 2 (0.1 \times SSC、0.005 % Triton X-102) で 4 $^{\circ}$ C、5 分間洗浄した。それをフィルターエアガンによる窒素ガスで乾燥させた。最後にスライドをアジレントマイクロアレイスキャナスライドのフォルダにセットしてスキャンし、スポット数値化とデータ解析を行った。

10. 高温耐性試験

高温耐性試験は (Sakuma et al., 2006a) の方法を参考に行った。

滅菌した 83 mm 径ろ紙 2 枚を敷いた 9 cm 径のシャーレに、4 ml の GM 液体培地 [GM 寒天培地に Bacto agar を加えずに作製した] を加え、湿らせたものを用意した。そこに、GM 寒天培地上で発芽させた植物体を移植しサージカルテープ (3M Health Care) でシールした。その後、22 $^{\circ}$ C である程度の大きさになるまで生育させた (播種後 9 日)。その間、ろ紙が乾かないように 2、3 日おきに Milli-Q 水を 1ml ずつ与えた。植物を生育させたシャーレを、45 $^{\circ}$ C にしたハイブリダイゼーションインキュベーター HB-80 (タイテック) 内に設置した紙箱の台 (130mm \times 130mm \times 50mm) の上に置き 45 分処理した。シャーレを速やかに 22 $^{\circ}$ C に戻して、さらに 4 日間生育させた後、生存率を計算した。1 回の試験には 14 \sim 25 個体の植物体を使用し、複数回繰り返して実験を行った。また、本研究における高温耐性試験の条件は処理温度、処理時間の異なる試験を何度か行い、それによって最適な条件を検討し、決定したものである。

11. クロマチン免疫沈降 (ChIP) 実験

ChIP 実験は (Kim et al., 2008) を参考にして行った。

実験には 15 日間生育させた HsfA1 と GFP 融合タンパク質を発現する植物体を使用した。通常の生育条件下の植物体と 37°C で 1 時間処理した植物体を正重量で 2 g ずつサンプリングして実験に使用した。サンプルを 400 ml 容ビーカーに入れた 50mM HEPES バッファー (pH7.5) に漬け、EDTA-free complete protease inhibitor (Roche) を加え、終濃度が 1% になるようにホルムアルデヒドを加えた。真空ポンプを使って減圧状態に 5 分間置き、一気に減圧を解除し、その後 37°C で 1 時間静置しタンパク質と DNA をクロスリンクさせた。2.5M グリシンを加え、もう一度減圧状態に 5 分程度置き、一気に減圧を解除した後、さらに 37°C で 1 時間静置した。その後上清を捨て 50mM HEPES バッファー (pH7.5) で 3 回洗った。サンプルを鉄球が 2 つ入った容器に移し、protease inhibitor 入りの 50 mM HEPES バッファー (pH7.5) を 4 ml 加え、シェイクマスターを用いてサンプルを破碎した。破碎後のサンプルをフィルターで濾して、50 ml チューブに移した。2000 rpm で 5 分間遠心し、上清を 15 ml チューブに移した。さらに、2000 rpm で 10 分間遠心し、上清を 50 ml チューブに移した。サンプルに等量の 2×ACE buffer [50mM HEPES/KOH pH 7.5, 1M NaCl, 2mM EDTA, 2% Triton X-100%, 0.2% sodium deoxycholate, 0.2% SDS] を加え、氷冷しながら MISONIX S-3000 (Misonix) を用いて超音波破碎を行い断片化した。15 ml チューブに移して 15000 rpm で 10 分間遠心し、上清を 50ml チューブへ移した。サンプルを 800 μ l 分注し、5 μ l の GFP 抗体 (A11122; invitrogen) を加え、4°C で攪拌しながら一晩放置した。サンプルにダイナビーズ (ベリタス) を加え、4°C で攪拌しながら 4 時間置いた。上清を捨て ACE buffer で数回洗い、さらに 500mM NaCl で洗い、TE で洗った後に溶出バッファー 300 μ l を加え、65°C で一晩放置した。サンプルを RNase 処理した後 Proteinase 処理をし、フェノールクロロホルム法で精製した。エタノール沈殿法でさらに精製した後 TE に溶かし QIAGEN 社製のカラムで精製した後、濃度を測り PCR 実験に使用した。PCR には表 2 に記したプライマーセットを使用した。

結果

HsfA1a、*HsfA1b*、*HsfA1d* が制御する遺伝子の解析

前章で *HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* が *DREB2A* の高温ストレスによる発現誘導を制御していることが明らかになった。以前に *hsfa1a/b* 二重変異体の解析が

行われていた(Busch et al., 2005)が、この三種の *HsfA1* はそれぞれが相補的に働いていることも明らかになったため三重変異体を用いた解析を行うことでより正確な熱ストレス応答機構に関する知見が 深まると予想された。 *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。 *hsfa1a/b/d* 三重変異体は Columbia バックグラウンドの変異体と Wassileskijia バックグラウンドの変異体のかけ合わせにより作出したため、マイクロアレイ解析には対照用として Columbia、Wassileskijia の両方を使用し、それぞれを三重変異体と比較した平均値を発現量変化(Fold change)の値として使用した。マイクロアレイ解析には GM 寒天培地上で 2 週間生育させた植物体を 37°C で 1 時間高温ストレス処理する前後にサンプリングしたものを利用した。

高温ストレス処理をする前の通常の生育条件下では *hsfa1a/b/d* と野生型の間で遺伝子発現の差は殆ど見られなかった (表 3A)。発現量が 2 倍以上変化するものは、減少するものが 21 個、増加するものが 5 個存在した。減少するもので変化の大きい遺伝子は機能が解明されていないものが多かった。したがって、*hsfa1a/b/d* 三重変異体における遺伝子発現の状態は通常の生育条件においては野生型とほとんど変化がないことが明らかになった。 *hsfa1a/b/d* 三重変異体は生育にも目立った変化は見られなかった。

一方、高温ストレス処理 1 時間における遺伝子発現は野生型と変異体の間に大きな変化が見られた (表 3B)。発現量が 2 倍以上変化するものは、減少するものが 713 個、増加するものが 503 個存在した。 *HsfA1* は *DREB2A* の発現を正に制御することや転写活性化能を調べた実験 (図 2) から、それ自体は転写のアクティベーターとして働くと考えられる。そのため、変異体において発現が野生型の発現より増加するものは、 *HsfA1* の変異により発現が減少した遺伝子による影響や *HsfA1* の標的であるリプレッサーによって制御される遺伝子などであると予想される。その内プロモーター (転写開始点から 1kb 上流までを解析に用いた) 中に HSF のシス配列である HSE のコア配列(nGAAnnTTCn または nTTCnnGAAn)が存在するものは、減少するものの中には 467 個、増加するものの中には 248 個存在した。減少するものでは約 65%、増加するものでは約 50%のものがプロモーター中に HSE を持っていた事になる。HSE を持つものは HSF のターゲットである可能性が高い。さらに変異体で発現量が変化した遺伝子の内、プロモーター中に *HsfA1* の下流因子であると判明した *DREB2A* のシス配列である DRE を持つものは、減少するものの中には 184 個(約 26%)、増

加するものの中には 101 個(約 20%)存在した。DREB2A は転写のアクティベーターであることが知られている (Sakuma et al., 2006b; Sakuma et al., 2006a)。184 個のうち 37 個は DREB2A の一部を削った活性型 DREB2A を過剰発現させた植物体において、遺伝子の発現が上昇していたため *DREB2A* の下流で制御されている可能性が高いと考えられた。特に三重変異体で遺伝子発現が減少する遺伝子で、プロモーター中に HSE が無く、DRE が存在するものは 60 個存在し、これらのうち 15 個はさらに活性型 *DREB2A* の過剰発現によっても誘導されていた。これらの遺伝子は HsfA1 に直接制御されるのではなく、HsfA1 の制御下にある DREB2A によって制御されていると予想された。

hsfa1a/b/d において、通常条件下で発現が減少していた 21 個と、高温ストレス下で発現が減少していた 713 個の遺伝子の内の上位 100 個を抜き出して GENEVESTIGATOR を用いてヒートマップを作製した (図 8A)。GENEVESTIGATOR に登録されているマイクロアレイデータの内、ストレスに関係するデータを抽出し、そのデータにおける 21 個と 100 個の遺伝子の動態をヒートマップで表した。赤色は発現の上昇、緑色は発現の減少を示す。通常条件下における 21 個の遺伝子については明確な偏りが見られなかったが、高温ストレス下の 100 個の遺伝子については明らかに熱ストレス応答に対して正の相関があることが示された。この結果から *hsfa1a/b/d* において発現が減少している遺伝子の多くは、高温ストレス誘導性であるといえる。また、熱ストレス以外では強光実験によるアレイ結果においても正の相関が見られた。実際に高温ストレス処理下の野生型をサンプルとしマイクロアレイ解析を行った結果と *hsfa1a/b/d* の結果を比較すると、高温ストレス下での *hsfa1a/b/d* 植物内において遺伝子発現が低下していた 713 個の遺伝子の内、544 個の遺伝子が Columbia において高温ストレス誘導性であり、557 個の遺伝子が Wassileskijia において高温ストレス誘導性であった (表 3)。さらに高温ストレス下の *hsfa1a/b/d* において発現が減少していた遺伝子と高温ストレス下の野生型で発現が上昇していた遺伝子のそれぞれ上位 100 個を比較しベン図を作製した (図 8B)。Columbia 及び Wassileskijia における高温誘導性遺伝子の上位 100 個の内 70 %以上の遺伝子が *hsfa1a/b/d* においては発現誘導が減少している上位 100 個の中に含まれ、90 %近くの遺伝子は *hsfa1a/b/d* において発現の減少がみられた 713 個の遺伝子に含まれていた。

hsfa1a/b/d 三重変異体において発現の低下が顕著だった上位 100 個の遺伝子

に関して、その機能の類推を行うため公共のデータベースを用いた解析を行った。解析の手法は Maruyama らの論文(2009)を参考にして行った。解析には Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) および TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) の GO anotation のデータを使用し、各遺伝子の機能を分類した (図 8C)。上位 100 個の遺伝子には分子シャペロンが 31 個、転写に関わる遺伝子が 12 個存在した。発現が減少した遺伝子には分子シャペロンが多かったことから、*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示唆された。

マイクロアレイ解析で発現が低下していた遺伝子の内、高温ストレス応答に重要な *HSF* と *HSP* について、定量的 RT-PCR でも解析を行った(図 9A)。その結果、*hsfa1a/b/d* 三重変異体において全ての遺伝子の発現誘導が完全に見られなくなることが判明した。また、アレイ解析において、*hsfa1a/b/d* 三重変異体で発現量が 2 倍以上減少した 713 個の遺伝子に含まれていなかったもののうち、野生型では強い高温ストレス応答性が確認できているものに関して、定量的 RT-PCR で解析を行った(図 9B)。四つの遺伝子について確認したところ、全て三重変異体で高温ストレス誘導が見られなかった。以上の結果より、*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* は高温ストレス応答の惹起に関わる主要な部分を制御していることが明らかとなった。

高温耐性獲得における *HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の機能解析

HsfA1a、*HsfA1b*、*HsfA1d* の三遺伝子が実際に植物の高温耐性獲得に機能を持っているかを調べるために、変異体を用いて高温耐性試験を行った(図 10)。9 日間生育させた野生型と *hsfa1a/b/d* 三重変異体に対して 45°C で 45 分間の高温ストレス処理を行い、その後 22°C で 4 日間静置し、植物の状態を観察した(図 10A)。野生型の二種類の植物は、80%近くが生存するのに対して、三重変異体は 4%ほどしか生存できなかった。さらに、*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* を二つずつが変異した二重変異体に対しても同様の実験を行った。*hsfa1b/d* 二重変異体においてのみ生存率が野生型と有意差のある値となった (図 10B)。これらの結果から、*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の三遺伝子は、実際に植物の高温耐性獲得において重要な働きを持つことが明らかとなった。また二重変異体の解析から三遺伝子の内一つでもあれば、今回の実験の条件においては十分生存可能であるが、高温耐性獲得においては *HsfA1a* より *HsfA1b* と *HsfA1d* の働きがより

重要であることが推測された。

HsfA1a、HsfA1b、HsfA1d による高温ストレス応答制御機構の解析

HsfA1a、HsfA1b、HsfA1d の三種類の HsfA サブファミリー遺伝子が、高温ストレス応答における遺伝子の転写制御に重要な役割を果たしていることが示された。しかし、*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* 自体は高温ストレスの前後で mRNA の発現量が大きく変わるわけでない。そのため、高温ストレス時のみにこれらの転写因子を活性化させる機構があると予想された。そこで、HsfA1a、HsfA1b、HsfA1d の応答制御機構に関する解析を行った。

はじめに、HsfA1 サブファミリー遺伝子のタンパク質の動態を調べるために、35S プロモーターの制御下で GFP 融合タンパク質を過剰発現するシロイヌナズナを作出して解析を行った(図 11A)。過剰発現シロイヌナズナの幼植物体の葉を使用して、GFP 蛍光の局在を観察した。通常の生育条件下では HsfA1a、HsfA1b、HsfA1d の GFP 蛍光は、それぞれ細胞の核、核と細胞質、細胞質に局在が観察できた。同じ HsfA1 サブファミリーの HsfA1e は HsfA1b と似た局在を示した。これらの植物を 37°C で 15 分処理すると HsfA1a 以外では局在に変化が現れた。HsfA1b と HsfA1e では細胞質に見えていた蛍光がほとんど観察できなくなり、核に集積した。HsfA1d では核に GFP 蛍光は見られなかったが、高温ストレス処理により核に GFP 蛍光が見られるようになった。したがって HsfA1a 以外の HsfA1b、HsfA1d、HsfA1e 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。これまでに動物の解析で HSF の局在は HSP90 によって制御されていることが報告されている(Akerfelt et al., 2010)。また、シロイヌナズナにおいても HsfA1d と HSP90 の相互作用が報告されている(Yamada et al., 2007)。そこで、これらのタンパク質の局在が HSP90 に依存しているかを調べるために、HSP90 の特異的阻害剤である geldanamycin (GDA)を処理する実験を行った。過剰発現シロイヌナズナを GDA で 30 分処理したところ、HsfA1b、HsfA1d、HsfA1e の局在は、37°C で 15 分処理したときとほぼ同等の変化を示した。このことから、シロイヌナズナの HsfA1 サブファミリー遺伝子のタンパク質の局在は HSP90 により制御されていることが示された。HSP90 の阻害により HsfA1 は核に集積するようになったため、通常の生育条件下では HsfA1a 以外の HsfA1 は HSP90 により核移行を阻害されていると考えられる。また、HSP90 の細胞局内在を調べるために HSP90.3 と GFP の融合タンパク質を過剰発現させたシ

ロイヌナズナも作出し、GFP の蛍光観察を行った。GFP 蛍光は常に細胞質に局在し核においては観察されなかった。このことから HSP90 は細胞質内で HsfA1 と相互作用していると予想された。

HsfA1a、HsfA1b、HsfA1d の高温ストレス下における転写応答制御の開始はタンパク質の核移行によるものかを調べるために、タンパク質の核移行を起こすことが明らかになった GDA 処理下における *DREB2A* の発現量を調べた(図 11B)。野生型における *DREB2A* の発現量は GDA 処理によって、処理前の 6 倍程度まで上昇した。HsfA1 の核移行を引き起こさない水処理では *DREB2A* の誘導は起きないことから、GDA 処理による *DREB2A* の発現誘導は HsfA1 の核移行によるものであると考えられる。この実験によって、HsfA1 が核に集積するだけで下流の遺伝子の誘導は起きることが示された。しかし、*DREB2A* の発現は高温ストレスによって百倍近くまで誘導されるため、高温ストレス下での HsfA1 による *DREB2A* の制御には核移行以外の活性化機構も関与することが示唆された。

HsfA1 は核移行シグナル(NLS)と核排出シグナル(NES)の両方を持っている。HsfA1b と HsfA1d のタンパク質の動きとこれらのシグナルの関係を調べるために、C 末端側に存在する NES を削ったものと GFP の融合遺伝子を過剰発現させたシロイヌナズナを作出した(図 12A)。HsfA1b と HsfA1d の NES を削ったものはそれぞれ HsfA1b Δ 、HsfA1d Δ とした。HsfA1b Δ または HsfA1d Δ の過剰発現体の幼植物体における GFP 蛍光を観察したところ、どちらも通常の生育条件下で、HsfA1b と HsfA1d が高温ストレスを受けたときと同様の局在を示した(図 12B)。この結果から、HsfA1b と HsfA1d が通常の生育条件下では核外に存在するのは、それぞれの NES の影響を受けているためであることが明らかになった。常時核に存在する HsfA1b Δ または HsfA1d Δ が下流の遺伝子発現に影響を与えるか調べるために *DREB2A* の遺伝子発現を調べた(図 12C、D)。HsfA1b Δ 、HsfA1d Δ 共に過剰発現が確認できたが、通常の HsfA1b と HsfA1d の過剰発現体と同様に、下流の遺伝子の発現を誘導することはできなかった。この結果から、HsfA1b Δ 、HsfA1d Δ は核に存在するだけでは十分に機能しないことが示された。

HSF は三量体を形成し、プロモーター中の HSE 配列に結合することで機能することが知られているため(Wu, 1995)、HsfA1a、HsfA1b、HsfA1d が複合体を形成するかどうかタマネギの表皮細胞への一過的遺伝子発現系を用いた Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 法によって解析を行った(図 13)。タマネギの表皮細胞での一過的遺伝子発現系では、HsfA1a、HsfA1b、HsfA1d の局在がシロイヌナズナ中の局在とは異なる可能性があるので、事前にそれぞれの GFP 融合タンパク質を発現させて局在を調べた(図 13A)。HsfA1a は細胞の核に、HsfA1b と HsfA1d は核と細胞質に局在した。これらの表皮細胞に 37°C で 30 分間高温ストレス処理をすると、HsfA1a はそのまま核に存在し、HsfA1b と HsfA1d は核に局在するように変化した。HsfA1a、HsfA1b、HsfA1d が相互作用するかどうかを全ての組み合わせに対して BiFC 法によって実験を行った(図 13B)。この時、遺伝子が導入されている細胞を確認するために、CFP タンパク質を過剰発現させる遺伝子も同時に導入した。YFP シグナルの観察から HsfA1a、HsfA1b、HsfA1d はそれぞれホモおよびヘテロ複合体を形成することが明らかになった。また、複合体の形成による YFP のシグナルは核内でのみ観察することができ、高温処理によってシグナルが観察できる場所が変化することはなかった。HSP90 と HsfA1a、HsfA1b、HsfA1d が相互作用するかどうかについても同様の実験を行った。実験には HSP90.3 だけでなく HSP90.1 も使用した。HSP90 と GFP の融合タンパク質からの蛍光は細胞質と核の両方から観察できた。BiFC による相互作用解析では、HSP90.1、HSP90.3 共に HsfA1a、HsfA1b、HsfA1d の全ての組み合わせで複合体形成による YFP シグナルを確認することができた。HsfA1d との組み合わせにおいては、核外での蛍光も見られたが他は核内で YFP シグナルが見られた。また、高温ストレス処理の前後で YFP シグナルが確認できる位置に目立った変化は見られなかった。この実験により、HsfA1a、HsfA1b、HsfA1d はそれぞれホモおよびヘテロ複合体を形成することができることや、細胞中で HSP90 と相互作用していることが明らかになった。

HsfA1 サブファミリー遺伝子が下流の遺伝子を直接制御しているのかを明らかにするために、理化学研究所植物センターの金博士のご指導により、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法による解析を行った。HsfA1a、HsfA1d、HsfA1e と GFP の融合タンパク質を過剰発現させたシロイヌナズナを解析に利用した。こ

これらの植物体において GFP 抗体を用いて ChIP 解析を行い、それぞれのタンパク質がターゲット遺伝子のプロモーターに結合しているかどうかを調べた。ターゲット遺伝子として高温ストレス応答に重要な転写因子 *HsfA2* と *DREB2A*、高温ストレス応答性が非常に高い *HSP18.2* を解析した。PCR には各遺伝子のプロモーター中の HSE 周辺配列 150bp 程度を増幅するように設計したプライマーを使用した (表 2)。*HsfA1a*、*HsfA1d*、*HsfA1e* は全て *HSP18.2*、*HsfA2*、*DREB2A* のプロモーターに結合していることが明らかになった (図 14)。特に *HSP18.2* に関しては、37°C で 1 時間処理したサンプルにおいて、*HsfA1*-GFP タンパク質と共沈降したプロモーター DNA の量が顕著に増加していることが示された。これは、高温ストレスによって *HSP18.2* のプロモーターに結合した *HsfA1* が増えていることを示している。また、*HsfA1d*-GFP の結果では、*HSP18.2* だけでなく *HsfA2* や *DREB2A* でも同様の結果が得られた。*HsfA1d* はターゲット遺伝子のプロモーターとの結合能が高温ストレスの有無によって大きく変化すると考えられる。これらの結果から、*HsfA1* は細胞中でターゲット遺伝子の HSE に直接結合することが確認された。また、その結合の割合は高温ストレスの有無によって変化する傾向が見られた。

考察

本研究により、*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の三遺伝子は高温ストレス応答において、*DREB2A* だけでなく広範囲の遺伝子の転写制御を担うことが明らかになった。これまでに、*hsfa1a/b* 変異体を用いたマイクロアレイ解析が行われていたが、*HsfA1a*、*HsfA1b* と相補的に働く *HsfA1d* を変異させた三重変異体を解析したことで、*HsfA1* サブファミリー遺伝子が大部分の高温ストレス応答を制御していることが判明した。*hsfa1a/b/d* 三重変異体を用いたマイクロアレイ解析では、高温ストレスによる発現誘導機構が明らかになっていなかった主要な転写因子遺伝子である *HsfA2* も (Kotak et al., 2007b) この三遺伝子の制御下にあることが示された。その他にも、高温ストレス耐性の獲得に重要とされているが、それ自身の発現制御機構が明らかになっていなかった *MBF1c*、*BI1*、*DGD1* も高温ストレス下における三重変異体のアレイ解析によって発現が減少していることが明らかになった (Chen et al., 2006a; Chen et al., 2006b; Watanabe and Lam, 2006; Suzuki et al., 2008)。野生型植物において高温スト

レスにより発現が強く誘導される遺伝子 100 個に注目すると、このうち 70%以上が三重変異体で発現の減少が大きかった上位 100 個の遺伝子に含まれた。これらの結果から、野生型において強く誘導されるこれらの遺伝子は三重変異体ではほとんど誘導されなくなっていると考えられる(図 8A)。実際に高温ストレスで強く誘導される *DREB2A*、*HsfA2*、*HSP18.2*、*HSP70* などは三重変異体においてほとんど誘導が見られなくなることが、定量的 RT-PCR によっても確認できた(図 9A)。さらに、高温ストレス下における野生型植物において発現誘導が上位 100 個の遺伝子は、三重変異体内で 2 倍以上発現が減少した 713 個の中に 90%近くが含まれていた。高温ストレス下で、野生型植物において高レベルで発現誘導が起きるが、三重変異体における発現低下は低レベルである 遺伝子は、*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* によって発現が制御されているが、これら以外にも制御する転写因子が存在する可能性があると考えられる。また、マイクロアレイ解析で野生型において高温ストレスで誘導されるが、*hsfa1a/b/d* で発現の減少が見られなかった数種の遺伝子は、定量的 RT-PCR で解析すると、三重変異体において発現誘導の低下が確認できた (図 9B)。このことから、マイクロアレイの解析結果に上手く反映されなかった遺伝子もいくつか存在することが予想される。その原因としては野生型を 2 種類使用した事による有意な値とならなかったことやシグナル値が低くて検出できなかったなどが予想される。これらの結果と *HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* 自身の遺伝子発現レベルはストレスの前後で大きく変化しないこと(図 4A)から、この三遺伝子が高温ストレス下における、主要な転写応答制御経路の最上流で働いていることが予想された。

高温ストレス下における *hsfa1a/b/d* 三重変異体において発現の減少が顕著だった遺伝子には高温ストレス耐性獲得に重要な分子シャペロンが多く含まれ(図 8C)、この変異体は高温耐性が非常に弱くなっていた(図 10A)。この *hsfa1a/b/d* 変異体を利用することで、高温耐性獲得に重要とされる種々の遺伝子の重要性を上手く比較することが可能になると考えられる。また、基本的な高温耐性獲得機構がほとんど働かなくなっているため、転写応答カスケードの上下関係を詳しく調べることも可能になると思われる。*hsfa1a/b/d* 三重変異体を用いることで高温ストレス応答機構の解析が飛躍的に進むことが予想される。

第二章において、*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の二重変異体と三重変異体を用いた定量的 RT-PCR の解析から *DREB2A* の発現はこれら三遺伝子の発現量に

依存すると考えられた(図 6B)。同様の実験を *HsfA2*、*HSP70*、*HSP101* においても行ったところやはり二重変異体では発現誘導が若干減少するか、もしくは野生型と変わらないレベルを維持し、三重変異体において完全に発現誘導が見られなくなった(図 9A)。高温耐性獲得に関しても、遺伝子発現と同様で二重変異体では耐性が若干低下しているか殆ど変わらないという結果であった(図 10B)。これらのことから、*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* は互いに相補的に働き、基本的にはその総量によって下流の遺伝子の発現誘導が変化すると考えられる。ただし、*HsfA1e* の発現誘導が *hsfa1b/d* の二重変異体ですでに起きなくなっていることや、遺伝子によって最も発現誘導の強さが低下する二重変異体が異なることから、これら三遺伝子にはある程度のターゲット認識の違いがあるのかもしれない。*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の三遺伝子は第二章の相補耐性試験の結果(図 6C)から、一遺伝子を戻すことで高温ストレス下での *DREB2A* の発現を野生型と同程度まで回復することができるが、一遺伝子の発現の総量を過剰にしても下流の遺伝子発現が過剰に誘導されることはない。一方で、下流の遺伝子発現誘導の機能を維持できる最低限必要な *HsfA1* の発現量については明らかにならなかった。これに関しては野生型に対して RNAi で発現量を減少させるか、三重変異体に対して弱いプロモーターを用いて相補耐性試験をする事で明らかになると予想される。また機能を維持する下限のレベルがわからないため、今回は解析に加えなかった発現レベルの低い *HsfA1e* (図 4A) もタンパク質としては他の三遺伝子と同等の機能を持っている可能性が考えられる。通常の生育条件下における *HsfA1e* の発現レベルは高温ストレス応答を開始できる量ではなかったために、*hsfa1a/b/d* 三重変異体で明確な表現型が見られたのかもしれない。*hsfa1a/b/d* 三重変異体に *HsfA1e* を過剰発現させたシロイヌナズナを作出し、その植物における下流遺伝子の発現を調べることでこの仮説を検証することができるであろう。

GFP 融合タンパク質の局在解析によって、*HsfA1b*、*HsfA1d*、*HsfA1e* は高温ストレスによって局在が変化することが明らかになった。この局在変化は高温ストレス処理後すぐに起きる。この素早い局在変化が、下流遺伝子の素早い発現誘導の一因となっていると考えられる。実際に *HsfA1d* 過剰発現体を用いた ChIP 解析において、ターゲット遺伝子のプロモーターに結合している *HsfA1d* タンパク質の割合が、高温ストレスによって多くなることも示された

(図 14)。動物等の研究で HSF の局在変化は HSP90 との結合によって制御されていることが報告されており (Akerfelt et al., 2010)、シロイヌナズナの HsfA1d も HSP90 と相互作用していることがタマネギの表皮細胞を用いた一過的遺伝子発現系による解析によって報告されている (Yamada et al., 2007; Yamada and Nishimura, 2008)。本研究では、HsfA1 と GFP の融合タンパク質を過剰発現させたシロイヌナズナに HSP90 の阻害剤である GDA を処理する実験を行った。GDA 処理によって、各 HsfA1 は高温ストレスを受けた時と同様の局在変化を示した。これにより、シロイヌナズナ中でも HSP90 によって HsfA1 の局在制御が行われていることが明らかになった。

動物等による解析では、HSP90 は HR-C と HR-A/B が結合し NLS をマスクした不活化状態の HSF に結合することで、核移行が起きないように制御しているとされている (Rabindran et al., 1993; Akerfelt et al., 2010)。本研究では HR-C ではなく NES に注目して実験を行った (Nover et al., 2001; la Cour et al., 2004)。NES を削った HsfA1b Δ 、HsfA1d Δ は共に無処理の段階で高温ストレス処理後の HsfA1b と HsfA1d の細胞内局在とほぼ同等の局在を示した (図 12A、B)。HsfA1d Δ は NES との重なりがあることから HR-C の一部が削られているが、HsfA1b Δ の HR-C は完全な状態で残っている。HsfA1b Δ の実験結果は、シロイヌナズナの HsfA1 の細胞内の動態は HR-C 以上に NES が重要な機能を果たしていると思われる。ストレスがない状態では HSP90 と HsfA1 の結合は NLS の機能を阻害するのではなく、NES の機能を活性化することで HsfA1 の核内への流入を抑えているのではないかと予想される。ストレス処理前から核に存在する HsfA1a とほとんど核に存在しない HsfA1d の NES を交換してそれぞれの NES の機能を精査することで有益な知見が得られるであろう。

HsfA1 と GFP の融合タンパク質を過剰発現させたシロイヌナズナを GDA 処理すると、高温ストレスを与えることなく HsfA1 を核に集積させることができた。実際に野生型植物で GDA 処理実験を行うと、HsfA1a、HsfA1b、HsfA1d の下流遺伝子である *DREB2A* は処理前の 6 倍程度発現が誘導されることが確認できた (図 11B)。これは、HsfA1 が HSP90 との結合から外れることで、ある程度の活性を持つことを示している。一方、HsfA1b Δ と HsfA1d Δ の過剰発現体では HsfA1b Δ と HsfA1d Δ が常時核に局在しているが、HsfA1b や HsfA1d の過剰発現体と同様に、無処理の状態では *DREB2A* の発現をほとんど誘導出来な

かった(図 12B)。HsfA1b Δ と HsfA1d Δ が核に存在するのに GDA 処理と同様の活性を得ることが出来ないことに関しては、いくつかの原因が想像できる。一つは、核内でも HSP90 と結合していて三量体を形成していない可能性である。実際にタマネギの表皮細胞を用いた解析では HSP90 と HsfA1 の相互作用が核でも観察できている(図 13B)、しかし、HSP90.3 はシロイヌナズナ中ではほとんど核内に局在していない(図 11B)。この可能性を検討するためには他の HSP90 のシロイヌナズナの細胞中での局在を解析することや、シロイヌナズナの形質転換体を用いて BiFC 法を行うことで HSP90 と HsfA1 の相互作用を明らかにする必要がある。一方、HsfA1b Δ と HsfA1d Δ では C 末端のアミノ酸配列を削ってしまったため、その機能を失ってしまったという可能性である。これに関しては、葉肉細胞でのレポーター遺伝子の活性化実験や NES を削るのではなくアミノ酸配列に変異を加えた HsfA1 をシロイヌナズナに導入して解析を行うことで検討できるであろう。

野生型の GDA 処理での *DREB2A* の発現誘導は 6 倍程でしかなかったが、野生型のシロイヌナズナを高温ストレス処理すると *DREB2A* の発現量は無処理時の 100 倍近くまで上昇する(図 1A、図 11B)。このことから *HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* を完全に活性化するためには HSP90 との結合を解くだけでは不十分で、高温ストレス応答を引き起こすためにはさらなる活性化を受けると考えられる。主に動物や酵母における研究からリン酸化や SUMO 化が HSF の活性を制御する等の報告がある(Holmberg et al., 2001; Akerfelt et al., 2010)。植物においては一酸化窒素やカルシウムとの関連も報告されている (Zhang et al., 2009; Xuan et al., 2010)。しかし、現在のところ HSF を活性化する機構は明らかになっていない。動物における研究では高温ストレス応答性遺伝子のクロマチン構造が高温ストレスによって変化することが知られている (Petesch and Lis, 2008; Kumar and Wigge, 2010)。直接的ではなくても、クロマチン構造が HsfA1 の転写因子としての働きに影響を与えている可能性も考えられる。実際に ChIP 解析では、*DREB2A* の転写が誘導されなかった *HsfA1* 過剰発現体において、無処理の段階でも HsfA1 が *DREB2A* のプロモーターに結合していた。この結果はクロマチン構造の変化が転写の誘導に必要な可能性を示している。

以上のことから総合的に考えると、シロイヌナズナは高温ストレスに 曝され

ると、HsfA1a、HsfA1b、HsfA1d の 3 つの転写因子と結合していた HSP90 が外れ、活性を制御する因子により *HsfA1* の活性化が起こり、同時にターゲットとなる遺伝子のクロマチン構造の変化が起きることで、十分な高温ストレス応答性遺伝子の誘導が引き起こされると予想される。今後は特に HsfA1 の活性化の制御機構の解明研究が重要になると考えられる。

図表一覧

表 2. 第三章で使したプライマーの一覧

各々のプライマーセットにおいて上段が遺伝子方向に対して順方向のプライマー、下段が逆方向のプライマーである。

実験内容		
(材料と方法の項目)		
(対応する図番号)	増幅産物	配列 (5' to 3')
定量的 RT-PCR (4) (図 9, 11B, 12C, D)	<i>18s rRNA</i>	AAACGGCTACCACATCCAAG CCTCCAATGGATCCTCGTTA
	<i>DREB2A</i>	CAGTGTTGCCAACGGTTCAT AAACGGAGGTATTCCGTAGTTGAG
	<i>HsfA2</i>	TGGGATTCTCATAAGTTCTCAACA TGGATCAATCTTTCTGAATCCAT
	<i>HsfA1e</i>	TCGCCAAACAGTTTCTACCAA GCGGTCTGGATCAACTTTTC
	<i>HSP18.2</i>	TGTCAAATAAAAAGCTTGTGTGC AAAAAGCCACAAATTCATAACACA
	<i>HSP70</i>	GGTCGATGGATGCAGCTAAT CTTCAAGCGTTGTAGCACCA
	<i>HSP90.3</i>	ATGTTTTCGTTTGAAC GCAAGATTGTGCATAAGA
	<i>HSP101</i>	TTTTGATTCCGAGGAACACC CTTTGTTTCGTGCCCTCTCTC
	<i>Atlg66510</i>	AAAGGATGTTGTTGAAAAGTTTGAG CCACCTTTTAGAATAGCAGATTCAT
	<i>At3g48520</i>	GGCTTACACGAAGGCTTGTC TCCCACGAAACTGGAGGATA
	<i>At4g27460</i>	GCCTTAAACTCATCCGTCTCTG

GFP 蛍光による組織局在解析 (7, 8) (図 11A, 12B, 13A)		TTTGATTATCAGATCAATGGCTTC
	<i>At5g03210</i>	GACGGTGGTGGTGGATGT CCGGAGAAATGATTTGTGGA
	HsfA1a	GGGGCGGCCGCATGTTTGTAAATTTCAAAT GGGCTCGAGCTAGTGTTCTGTTTCTGATGT
	HsfA1b	GGGGCGGCCGCATGGAATCGGTTCCCGAAT GGGCTCGAGTTATTTCTCTGTGCTTCTGA
	HsfA1d	TTTGCGGCCGCATGGATGTGAGCAAAGTAA GGGCTCGAGTCAAGGATTTTGCCTTGAGAG
	HsfA1e	AAAGCGGCCGCATGGGAACGGTTTGCGAA GGGCTCGAGTCATTTTCTGAGAGCATC
	HSP90.1	TTTGCGGCCGCATGGCGGATGTTTCAGATGG GGGCTCGAGTTAGTCGACTTCCTCCATCTT
	HSP90.3	TTTGCGGCCGCATGGCGGACGCAGAAACCT GGGCTCGAGTTAGTCAACTTCCTCCATCTT
	HsfA1bΔ	GGGGCGGCCGCATGGAATCGGTTCCCGAAT GGGCTCGAGTTAATACTTCATTTGTTGTT
	HsfA1dΔ	TTTGCGGCCGCATGGATGTGAGCAAAGTAA GGGCTCGAGTCAACCCATCTGTTGAGTCA
	HsfA1a YFP N (or C)	GGGTCTAGAATGTTTGTAAATTTCAAAT GGGCTCGAGCTAGTGTTCTGTTTCTGATGT
	HsfA1b YFP N (or C)	GGGTCTAGAATGGAATCGGTTCCCGAAT GGGCTCGAGTTATTTCTCTGTGCTTCTGA
	HsfA1d YFP N	GGGTCTAGAATGGATGTGAGCAAAGTAA GGGCTCGAGTCAAGGATTTTGCCTTGAGAG
	HSP90.1 YFP C	GAATCAAAGTTCTAGACGATGGCGGATGT CCATAAGAGCAATTGGATCCTCTCTTAGTC
	HSP90.3 YFP C	TTCCGATCATCTAGAATGGCGGACG TGATAATTTAGGATCCTTCCTCCATCT
ChIP 解析 (11)	<i>DREB2A</i> プロモータ —	TTCCGTATCAACAGCGTGTTTC TTTTTCTGTTTGAGAGCAAGGTTACG

(図 14)		CTTTTCTGGCGGCCAC
	<i>HsfA2</i> プロモーター	GGGTCTAGAGGCCATTTTCGGTTCAATTCA
	<i>HSP18.2</i> プロモータ	ATTTTCTTGGCATTTCAGG
	—	GCATTTTCGGTCTTGTTTCA

表 3 A. *hsfa1a/b/d* 三重変異体において無処理の状態で野生型と比較して発現が減少していた 21 個の遺伝子。

表中には *hsfa1a/b/d* のマイクロアレイデータと共に高温ストレス下の野生型植物における発現誘導の有無、高温ストレス下の *hsfa1a/b* 二重変異体における遺伝子発現の変化(Busch et al., 2005)、活性型 DREB2A (DREB2A CA) 過剰発現体における遺伝子発現の変化(Sakuma et al., 2006a) を記した。同時に各遺伝子の転写開始点より上流 1kbp までに HSE 及び DRE が含まれている個数も示した。マイクロアレイ結果は発現量の減少が大きかった上位 50 個の遺伝子のデータを示している。

AGI code	Description	Promoter		Microarray data				
		HSE ¹⁾	DRE ²⁾	control condition				
				<i>hsfa1abd</i>				
				Pvalue	Fold change	Regulation	Average log ₂	Standard deviation
At4g21460	expressed protein [At4g21460.1]	1	1	4.5E-02	626.6	down	-9.3	0.6
At4g14905	kelch repeat-containing F-box family protein contains Pfam PF01344: Kelch motif (2 copies) and PF00646: F-box domain; similar to putative SKP1 interacting partner 6 (GP:21689879) (SKIP6) {Arabidopsis thaliana}[19798784]gb AU230074.1 AU230074...	0	0	3.5E-02	113.1	down	-6.8	0.3
At1g10340	ankyrin repeat family protein contains ankyrin repeat domains, Pfam:PF00023 [At1g10340.1]	1	0	3.7E-02	14.7	down	-3.9	0.2
At5g01015	expressed protein [At5g01015.1]	0	0	3.1E-02	14.2	down	-3.8	0.2
At2g46490	expressed protein (APS2) identical to cDNA Aps2, partial cds GI:4519894 [At2g46490.1]	1	0	3.5E-02	13.4	down	-3.7	0.2
At2g46450	cyclic nucleotide-regulated ion channel, putative (CNGC12) similar to cyclic nucleotide and calmodulin-regulated ion channel (cngc3) GI:4581201 from [Arabidopsis thaliana] [At2g46450.1]	1	0	1.5E-02	11.5	down	-3.5	0.1
At1g32330	heat shock transcription factor family protein contains Pfam profile: PF00447 HSF-type DNA-binding domain [At1g32330.1]	0	1	1.5E-02	11.0	down	-3.5	0.1
At1g33960	avirulence-responsive protein / avirulence induced gene (AIG1) identical to AIG1 (exhibits RPS2- and avrRpt2-dependent induction early after infection with Pseudomonas) SP:U40856 [Arabidopsis thaliana] (Plant Cell 8 (2), 241-249 (1996)) [At1g33960.1]	1	0	3.3E-02	7.6	down	-2.9	0.1
At4g17750	heat shock factor protein 1 (HSF1) / heat shock transcription factor 1 (HSTF1) identical to heat shock transcription factor 1 (HSF1) SP:P41151 from [Arabidopsis thaliana] ;contains Pfam profile: PF00447 HSF-type DNA-binding domain [At4g17750.1]	2	1	3.5E-02	5.3	down	-2.4	0.1
At4g15475	F-box family protein (FBL4) 99.7% identical to F-box protein family, AtFBL4 (GP:21536497) [Arabidopsis thaliana]; similar to grr1 GI:2407790 from [Glycine max] [At4g15475.1]	0	1	1.5E-02	4.7	down	-2.2	0.0
At2g39200	seven transmembrane MLO family protein / MLO-like protein 12 (MLO12) identical to SP O80961 MLO-like protein 12 (AtMlo12) {Arabidopsis thaliana}, membrane protein Mlo12 [Arabidopsis thaliana] gi 14091594 gb AAK53805; similar to MLO protein...	1	0	3.5E-02	4.6	down	-2.2	0.1
At2g43620	chitinase, putative similar to basic endochitinase CHB4 precursor SP:Q06209 from [Brassica napus] [At2g43620.1]	1	1	2.6E-02	3.5	down	-1.8	0.1
At4g38550	expressed protein [At4g38550.1]	0	0	4.9E-02	3.1	down	-1.6	0.1
At5g01350	expressed protein [At5g01350.1]	1	0	4.3E-02	3.1	down	-1.6	0.1
At5g51630	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative domain signature TIR-NBS-LRR exists, suggestive of a disease resistance protein. [At5g51630.1]	0	0	2.4E-02	3.0	down	-1.6	0.0
At2g36460	fructose-bisphosphate aldolase, putative similar to PIR S65073 fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13) isoenzyme C-1, cytosolic [Oryza sativa]; contains Pfam profile PF00274 Fructose-bisphosphate aldolase class-1 [At2g36460.1]	2	0	4.3E-02	2.5	down	-1.3	0.1
At3g29810	phytochelatin synthetase family protein / COBRA cell expansion protein COBL2 similar to phytochelatin synthetase [Hordeum vulgare subsp. vulgare] GI:29570314; identified in Roudier, et al. Plant Phys. (2002) 130:538-548 (PMID:12376623); contains Pfam...	0	0	3.5E-02	2.5	down	-1.3	0.1
At4g01010	cyclic nucleotide-regulated ion channel, putative (CNGC13) similar to CaM-regulated potassium ion channel (ACBK1) GI:8515883 from [Arabidopsis thaliana] [At4g01010.1]	3	0	3.5E-02	2.3	down	-1.2	0.1
At4g12040	zinc finger (AN1-like) family protein contains Pfam domains, PF01428: AN1-like Zinc finger and PF01754: A20-like zinc finger [At4g12040.1]	0	3	3.5E-02	2.2	down	-1.1	0.1
At2g47130	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein similar to 3-beta-hydroxysteroiddehydrogenase GI:15983819 from [Digitalis lanata] [At2g47130.1]	1	1	4.9E-02	2.1	down	-1.1	0.1
At4g21480	glucose transporter, putative similar to glucose transporter (Sugar carrier) STP1, Arabidopsis thaliana, SP P23586; contains Pfam profile PF00083: major facilitator superfamily protein [At4g21480.1]	1	0	4.4E-02	2.0	down	-1.0	0.1

表 3B. マイクロアレイ解析により 37°C1 時間処理後の *hsfa1a/b/d* 三重変異体において野生型植物と比較して発現の減少が大きかった遺伝子

AGI code	Description	Promoter		Microarray data									control condition
		HSE ¹⁾	DRE ²⁾	HS 1h					Col	Ws	hsfa1ab	DREB2A CA OX	
				hsfa1abd									
				Pvalue	Fold change	Regulation	Average log2	Standard deviation	Regulation	Regulation	down regulated genes ³⁾	Regulation ⁴⁾	
At1g71000	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein similar to SP O35723 DnaJ homolog subfamily B member 3 Mus musculus, SP Q9QY17 DnaJ homolog subfamily B member 8 Mus musculus; contains Pfam profile PF00226 DnaJ domain [At1g71000.1]	4	0	3.3E-03	1353.5	down	-10.4	0.3	up	up	down		
At4g10250	22.0 kDa ER small heat shock protein (HSP22.0-ER) identical to endomembrane-localized small heat shock protein GI:511795 from [Arabidopsis thaliana] [At4g10250.1]	2	0	3.3E-03	870.2	down	-9.8	0.3	up	up	down	up	
At5g48570	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative / FK506-binding protein, putative similar to rofl [Arabidopsis thaliana] GI:1373396 [At5g48570.1]	0	0	3.9E-03	859.9	down	-9.7	0.4	up	up		up	
At1g03070	expressed protein low similarity to N-methyl-D-aspartate receptor-associated protein [Drosophila melanogaster] GI:567104; contains Pfam profile PF01027: Uncharacterized protein family UPF0005 [At1g03070.1]	2	0	2.8E-03	563.4	down	-9.1	0.2	up	up	down		
At4g21460	expressed protein [At4g21460.1]	1	1	6.2E-03	529.5	down	-9.0	0.5					
At1g48720	hypothetical protein [At1g48720.1]	2	1	2.1E-02	529.3	down	-9.0	1.3	up	up	down	up	
At1g59860	17.6 kDa class I heat shock protein (HSP17.6A-CI) similar to 17.5 kDa class I heat shock protein SP:P04793 from [Glycine max] [At1g59860.1]	1	0	6.0E-03	514.9	down	-9.0	0.5	up	up			
At4g12400	stress-inducible protein, putative similar to sti (stress inducible protein) [Glycine max] GI:872116; contains Pfam profile PF00515 TPR Domain [At4g12400.1]	0	0	5.4E-03	481.5	down	-8.9	0.5	up	up		up	
At4g29770	expressed protein [At4g29770.1]	0	0	1.6E-02	462.5	down	-8.9	1.0	up	up	down		
At5g15250	FtsH protease, putative similar to FtsH-like protein Pf1f precursor GI:4325041 from [Nicotiana tabacum] [At5g15250.1]	1	0	1.6E-02	460.4	down	-8.8	1.0	up	up	down		
At1g54050	17.4 kDa class III heat shock protein (HSP17.4-CIII) contains Pfam profile: PF00011 Hsp20/alpha crystallin family; identified as class CIII in Scharf, K-D., et al,Cell Stress & Chaperones (2001) 6: 225-237. [At1g54050.1]	2	0	3.9E-03	383.4	down	-8.6	0.3	up	up			
At1g52560	26.5 kDa class I small heat shock protein-like (HSP26.5-P) contains Pfam profile: PF00011 Hsp20/alpha crystallin family; identified in Scharf, K-D., et al,Cell Stress & Chaperones (2001) 6: 225-237. [At1g52560.1]	2	0	4.6E-03	362.2	down	-8.5	0.4	up	up	down	up	
At4g27670	25.3 kDa small heat shock protein, chloroplast precursor (HSP25.3-P) identical to small heat shock protein, chloroplast precursor SP:P31170 from [Arabidopsis thaliana]; identified in Scharf, K-D., et al,Cell Stress & Chaperones (2001) 6: 225-237....	2	0	5.1E-03	358.2	down	-8.5	0.4	up	up	down	up	
At5g51440	23.5 kDa mitochondrial small heat shock protein (HSP23.5-M) similar to heat shock 22 kDa protein, mitochondrial precursor SP:Q96331 from [Arabidopsis thaliana]; identified in Scharf, K-D., et al,Cell Stress & Chaperones (2001) 6: 225-237. [At5g51440.1]	4	1	7.4E-03	343.0	down	-8.4	0.5	up	up		up	
At2g26150	heat shock transcription factor family protein contains Pfam profile: PF00447 HSF-type DNA-binding domain [At2g26150.1]	4	0	4.7E-03	270.7	down	-8.1	0.4	up	up			
At3g12580	heat shock protein 70, putative / HSP70, putative strong similarity to heat shock protein GI:425194 [Spinacia oleracea] [At3g12580.1]	2	1	8.6E-03	229.1	down	-7.8	0.6	up	up		up	
At5g12030	17.7 kDa class II heat shock protein 17.6A (HSP17.7-CII) identical to heat shock protein 17.6A GI:3256075 from [Arabidopsis thaliana] [At5g12030.1]	1	0	3.6E-03	226.0	down	-7.8	0.3	up	up		up	
At3g24500	ethylene-responsive transcriptional coactivator, putative similar to ethylene-responsive transcriptional coactivator [Lycopersicon esculentum] gi 5669634 gb AAD46402 [At3g24500.1]	4	0	5.3E-03	221.0	down	-7.8	0.4	up	up		up	
At5g14020	expressed protein [At5g14020.1]	0	0	5.7E-03	181.6	down	-7.5	0.4	up	up			
At2g20560	DNAJ heat shock family protein SP Q9UDY4 DnaJ homolog subfamily B member 4 (Heat shock 40 kDa protein 1 homolog) {Homo sapiens}; contains Pfam profile PF00226: DnaJ domain [At2g20560.1]	1	0	3.3E-03	176.0	down	-7.5	0.2	up	up		up	
At1g56300	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein similar to SP Q9QY17 DnaJ homolog subfamily B member 8 Mus musculus; contains Pfam profile: PF00226: DnaJ domain [At1g56300.1]	0	0	1.6E-02	175.5	down	-7.5	0.8	up	up		up	
At5g12110	elongation factor 1B alpha-subunit 1 (eEF1Balpha1) identical to elongation factor 1B alpha-subunit [Arabidopsis thaliana] GI:6686819 [At5g12110.1]	0	0	4.5E-03	172.5	down	-7.4	0.3	up	up	down	up	
At2g29500	17.6 kDa class I small heat shock protein (HSP17.6B-CI) contains Pfam PF00011: Hsp20/alpha crystallin family; identified in Scharf, K-D., et al, Cell Stress & Chaperones (2001) 6: 225-237. [At2g29500.1]	2	2	9.3E-03	169.0	down	-7.4	0.6	up	up			
At3g15340	expressed protein [At3g15340.1]	0	0	1.0E-02	164.9	down	-7.4	0.6	up	up			
At4g18450	ethylene-responsive factor, putative similar to ethylene response factor 1 GB: AAD03544 GI:4128208 from [Arabidopsis thaliana]; EREBP-1 (Ethylene-inducible DNA binding protein that interact with an ethylene-responsive element) - Nicotiana tabacum,...	0	0	9.5E-03	162.5	down	-7.3	0.6	up	up			
At1g30070	SGS domain-containing protein similar to calyculin binding protein [Mus musculus] GI:3142331; contains Pfam profile PF05002: SGS domain [At1g30070.1]	1	0	1.2E-03	162.4	down	-7.3	0.1	up	up		up	
At1g17870	expressed protein contains 6 transmembrane domains; similar to predicted metalloproteases [At1g17870.1]	1	0	4.0E-03	162.1	down	-7.3	0.3	up	up	down		
At1g72660	developmentally regulated GTP-binding protein, putative very strong similarity to developmentally regulated GTP binding protein (DRG1) [Arabidopsis thaliana] GI:2345150 [At1g72660.1]	0	0	5.7E-03	148.4	down	-7.2	0.4	up	up	down		
At1g02700	expressed protein similar to hypothetical protein GB: CAB80707 GI:7268598 from [Arabidopsis thaliana] [At1g02700.1]	0	0	1.8E-02	142.2	down	-7.2	0.9	up	up	down		

At5g25450	ubiquinol-cytochrome C reductase complex 14 kDa protein, putative similar to SP P48502 Ubiquinol-cytochrome C reductase complex 14 kDa protein (EC 1.10.2.2) (CR14) {Solanum tuberosum}; contains Pfam profile PF02271: Ubiquinol-cytochrome C reductase...	1	0	3.3E-03	140.8	down	-7.1	0.2	up	up		up
At4g14905	kelch repeat-containing F-box family protein contains Pfam PF01344: Kelch motif (2 copies) and PF00646: F-box domain; similar to putative SKP1 interacting partner 6 (GP:21689879) (SKIP6) {Arabidopsis thaliana} 19798784 gb AU230074.1 AU230074...	0	0	3.6E-03	139.7	down	-7.1	0.2				
At4g12990	expressed protein [At4g12990.1]	0	0	7.7E-03	138.0	down	-7.1	0.5				
At5g37670	15.7 kDa class I-related small heat shock protein-like (HSP15.7-CI) contains Pfam profile: PF00011 Hsp20/alpha crystallin family; identified in Scharf, K.-D., et al, Cell Stress & Chaperones (2001) 6: 225-237. [At5g37670.1]	1	0	7.7E-03	135.1	down	-7.1	0.5	up	up	down	up
At5g59720	18.1 kDa class I heat shock protein (HSP18.1-CI) identical to 18.2 kDa class I heat shock protein (HSP 18.2) (SP:P19037)[Arabidopsis thaliana]; contains Pfam profile: PF00011 Hsp20/alpha crystallin family [At5g59720.1]	5	1	6.5E-03	129.3	down	-7.0	0.4	up	up	down	up
At5g52640	heat shock protein 81-1 (HSP81-1) / heat shock protein 83 (HSP83) nearly identical to SP P27323 Heat shock protein 81-1 (HSP81-1) (Heat shock protein 83) {Arabidopsis thaliana}; contains Pfam profiles PF02518: ATPase, histidine kinase-, DNA gyrase B-,....	3	1	1.1E-02	128.9	down	-7.0	0.6	up	up		up
At3g51910	heat shock transcription factor family protein contains Pfam profile: PF00447 HSF-type DNA-binding domain [At3g51910.1]	5	1	3.7E-03	126.5	down	-7.0	0.3	up	up	down	
At3g07150	hypothetical protein [At3g07150.1]	1	1	1.6E-03	126.2	down	-7.0	0.1	up	up	down	
At4g21320	(2R)-phospho-3-sulfolactate synthase-related contains weak similarity to Swiss-Prot:Q57703 (2R)-phospho-3-sulfolactate synthase (PSL synthase) [Methanococcus jannaschii] [At4g21320.1]	1	0	8.4E-03	114.1	down	-6.8	0.5	up	up	down	up
At5g12020	17.6 kDa class II heat shock protein (HSP17.6-CII) identical to 17.6 kDa class II heat shock protein SP:P29830 from [Arabidopsis thaliana] [At5g12020.1]	2	0	4.2E-03	110.8	down	-6.8	0.3	up	up		up
At2g46240	IQ domain-containing protein / BAG domain-containing protein contains Pfam profiles PF00612: IQ calmodulin-binding motif, PF02179: BAG (Apoptosis regulator Bcl-2 protein) domain [At2g46240.1]	1	1	3.7E-03	106.3	down	-6.7	0.2	up	up		
At1g74310	heat shock protein 101 (HSP101) identical to heat shock protein 101 GI:6715468 GB:AAF26423 from [Arabidopsis thaliana] [At1g74310.1]	1	0	7.5E-03	105.1	down	-6.7	0.4	up	up		
At2g32120	heat shock protein 70 family protein / HSP70 family protein similar to SP P22953 Heat shock cognate 70 kDa protein 1 (Hsc70.1) {Arabidopsis thaliana}; contains InterPro accession IPR001023: Heat shock protein Hsp70 [At2g32120.1]	1	1	5.3E-03	103.6	down	-6.7	0.3	up	up		up
At5g07330	expressed protein [At5g07330.1]	0	0	3.3E-03	103.2	down	-6.7	0.2	up	up	down	
At2g25140	heat shock protein 100, putative / HSP100, putative / heat shock protein clpB, putative / HSP100/ClpB, putative similar to HSP100/ClpB GI:9651530 [Phaseolus lunatus] [At2g25140.1]	0	0	2.9E-03	102.8	down	-6.7	0.2	up	up	down	
At3g46230	17.4 kDa class I heat shock protein (HSP17.4-CI) identical to 17.4 kDa class I heat shock protein SP:P19036 from [Arabidopsis thaliana] [At3g46230.1]	4	0	5.3E-03	100.6	down	-6.7	0.3	up	up		
At5g64510	expressed protein [At5g64510.1]	1	0	7.5E-03	99.8	down	-6.6	0.4	up	up		
At4g23493	expressed protein [At4g23493.1]	3	0	3.5E-03	97.9	down	-6.6	0.2	up	up	down	
At4g21323	subtilase family protein contains similarity to subtilase; SP1 GI:9957714 from [Oryza sativa] [At4g21323.1]	1	0	4.0E-03	97.5	down	-6.6	0.3	up	up		
At1g07400	17.8 kDa class I heat shock protein (HSP17.8-CI) similar to 17.5 kDa class I heat shock protein SP:P04793 from [Glycine max]; contains Pfam PF00011: Hsp20/alpha crystallin family [At1g07400.1]	0	0	7.7E-03	94.5	down	-6.6	0.4	up	up		
At1g16030	heat shock protein 70, putative / HSP70, putative similar to heat shock protein hsp70 GI:1771478 from [Pisum sativum] [At1g16030.1]	0	1	8.1E-03	92.9	down	-6.5	0.4	up	up		up
At5g36690	hypothetical protein [At5g36690.1]	0	0	1.1E-03	79.5	down	-6.3	0.1	up	up		

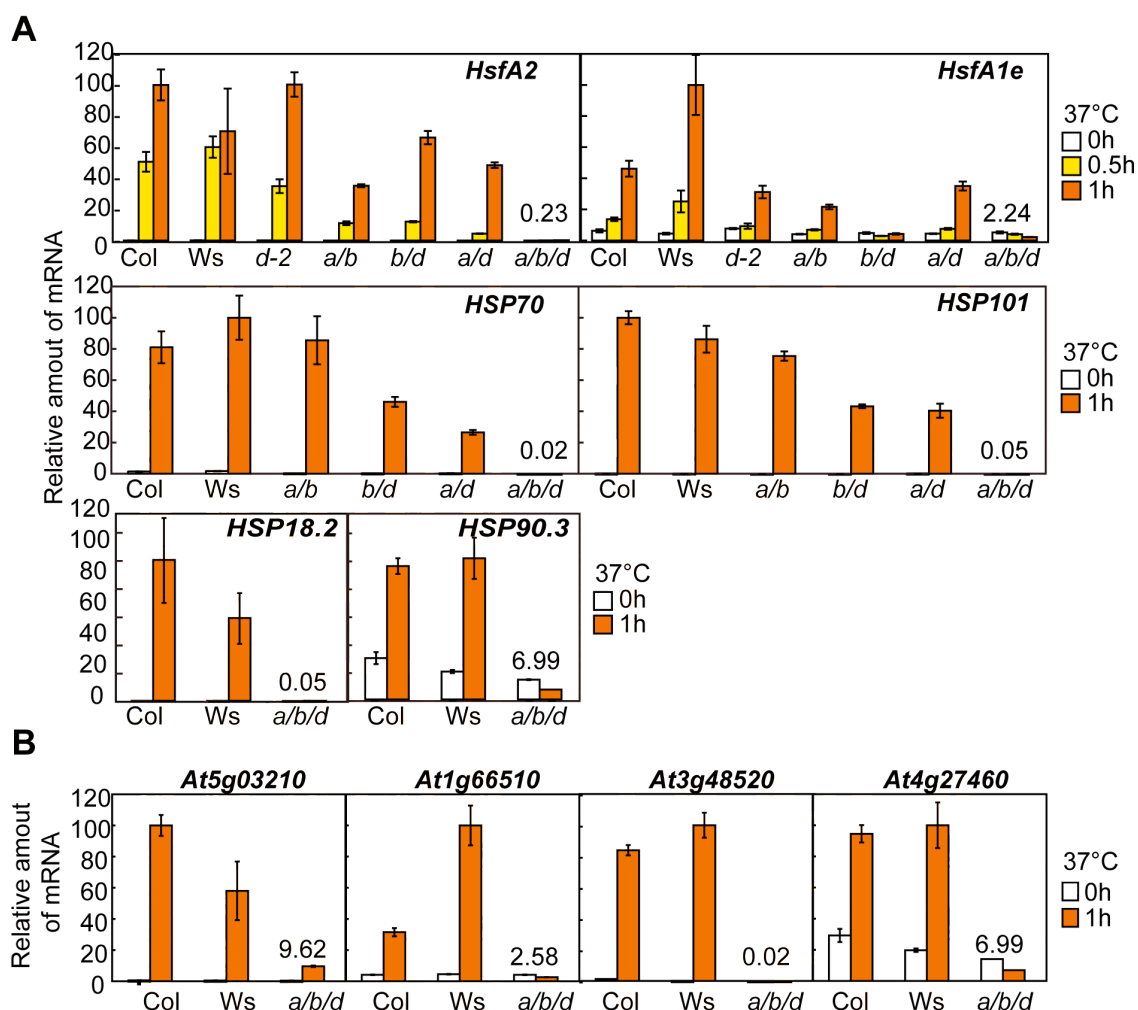


図 9. 高温ストレス下の *hsf1a/b/d* 三重変異体における遺伝子発現

- (A) 高温ストレス応答において主要な遺伝子について、高温ストレス下の変異体における遺伝子発現を定量的 RT-PCR で測定した。
- (B) マイクロアレイ解析において高温ストレス下の *hsf1a/b/d* 三重変異体で野生型植物と比較して発現の減少が確認できなかった遺伝子の中から、野生型植物における高温誘導性が顕著な遺伝子について、定量的 RT-PCR で発現量を測定した。

2 週間生育させた変異体及び野生型を 37°C で高温ストレス処理をした植物をサンプルとして使用した。各遺伝子において発現量が最大となっている値を 100 として相対値で示した。値は三回の PCR の平均値で、エラーバーは標準偏差を示した。また、*hsf1a/b/d* 三重変異体の高温ストレス一時間処理の値をグラフ中に示した。

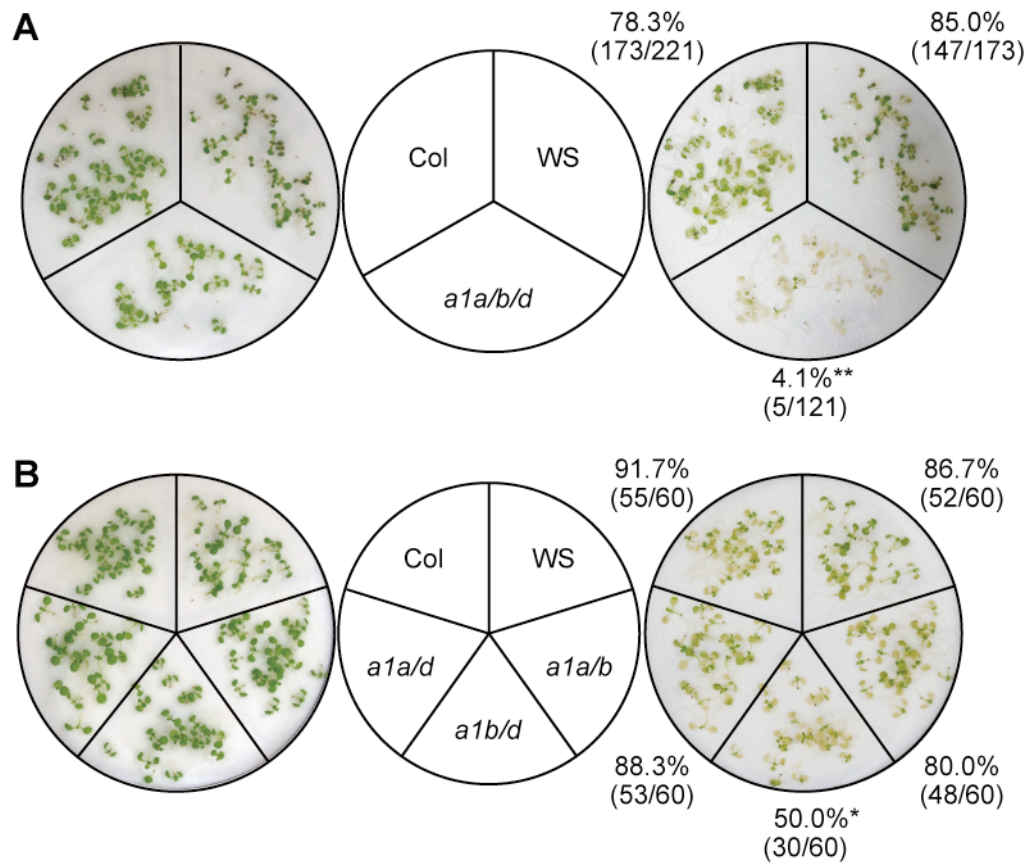


図 10. *HsfA1* サブファミリー遺伝子変異体の高温耐性試験

(A) *hsf1a/b/d* 三重変異体の高温耐性試験

(B) *hsf1a/b*、*hsf1a/d*、*hsf1b/d* 二重変異体の高温耐性試験

それぞれ 9 日間生育させた植物体に対して 45°C で 45 分間の処理を行い高温耐性を調べた。実験は数回繰り返しを行い、写真の回りに実験に使用した植物体の総数、生存数及び生存率を示した。これらの値の内、野生型植物と比較して *t*-検定の結果、有意差があるとみなされたものに対して生存率の横に印をつけた (*: $P < 0.01$, **: $P < 0.001$)。

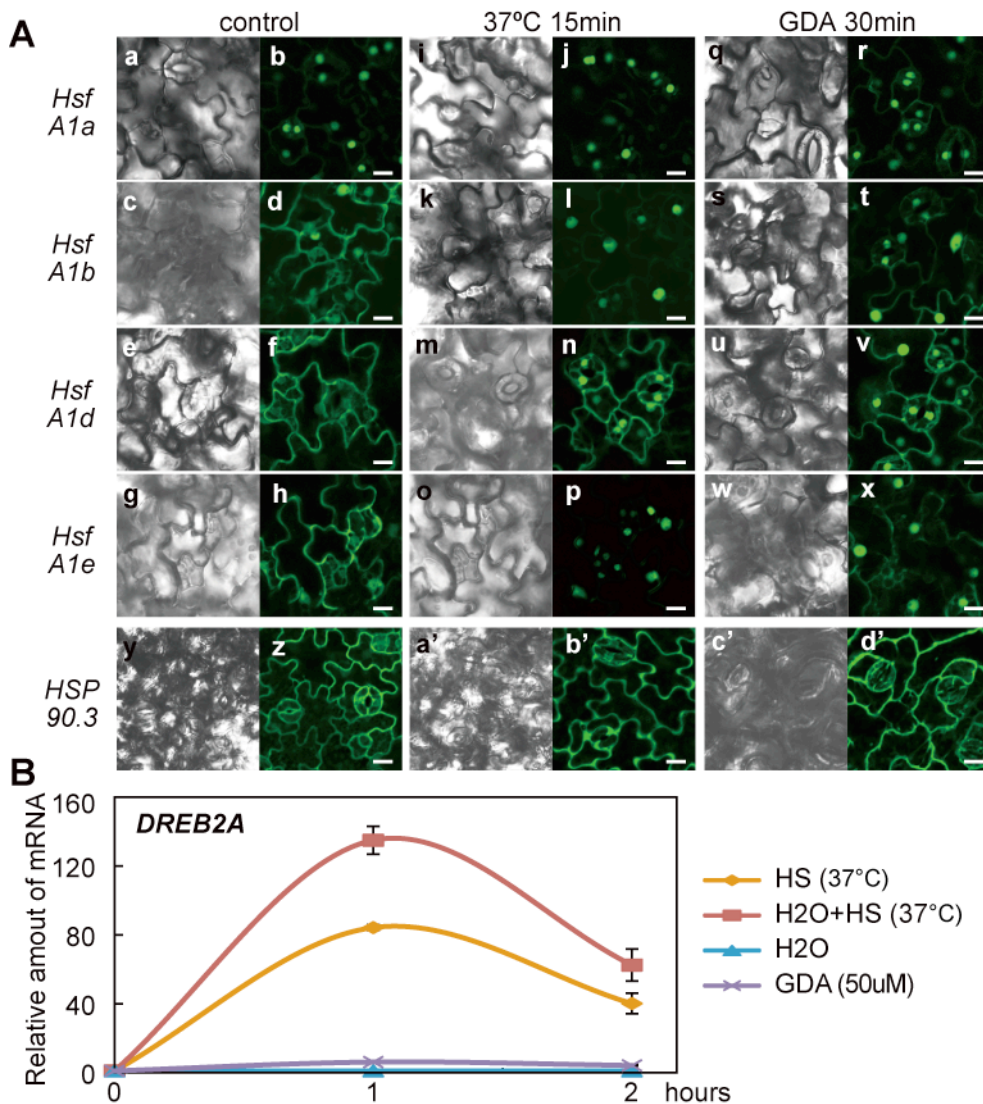


図 11. HsfA1 の細胞内局在と、HSP90 阻害剤(GDA)の影響

(A) HsfA1a、HsfA1b、HsfA1d、HsfA1e 及び HSP90.3 と GFP の融合タンパク質を発現させた幼植物体の葉を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。通常の生育条件の状態、37°Cで 15 分間高温ストレス処理した状態、GDA 溶液 (50 μ M) に 30 分漬けた状態の植物体の葉を観察し示した。スケールバーは 10 μ m である。

(B) 野生型植物 (Columbia) を高温ストレス処理、GDA 処理、対照用として水処理、水と高温による処理をした時の *DREB2A* の発現量を定量的 RT-PCR により解析した。野生型は 2 週間生育させたものを使用した。ストレス処理前 (0 時間) の値を 1 として相対値を示した。値は 3 回の PCR の平均値で、エラーバーは標準偏差を示す。

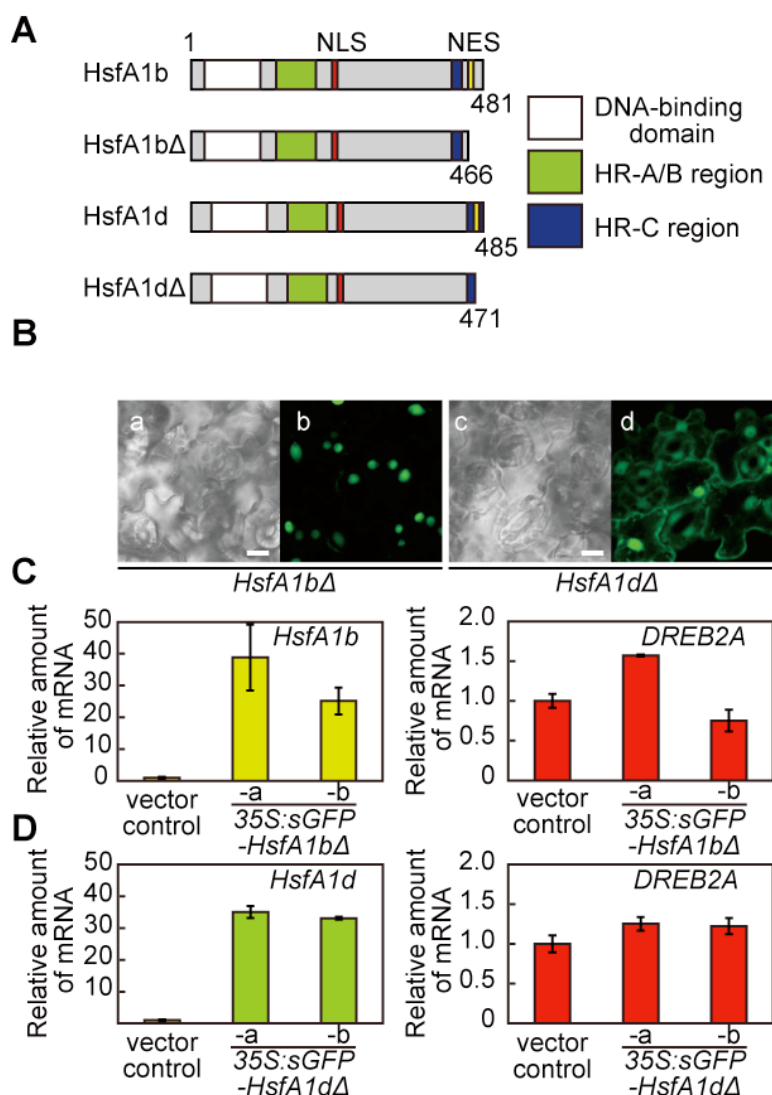


図 12. 核排出シグナル (NES) を削った *HsfA1* の動態と機能

- (A) *HsfA1b*、*HsfA1d* 及び NES を削った *HsfA1b* Δ、*HsfA1d* Δ の構造。図中にはそれぞれの DNA 結合ドメイン、オリゴマー化ドメイン (HR-A/B、HR-C) 及び核移行シグナル (NLS)、NES も示した。図中の数字はアミノ酸の数を示している。
- (B) *HsfA1b* Δ、*HsfA1d* Δ の細胞内局在。それぞれのタンパク質と GFP の融合タンパク質を発現させた植物 (*35S:sGFP-HsfA1b* Δ、*35S:sGFP-HsfA1d* Δ) の幼植物体の葉を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。スケールバーは 10 μm である。
- (C) , (D) *HsfA1b* Δ、*HsfA1d* Δ と GFP の融合タンパク質発現体を二週間生育させ、*HsfA1b*、*HsfA1d* 及び *DREB2A* の遺伝子発現量を定量的 RT-PCR によ

って解析した。ベクターを発現させた植物体 (vector control) における値を 1 として相対値で示した。値は 3 回の PCR の平均値で、エラーバーは標準偏差を示す。

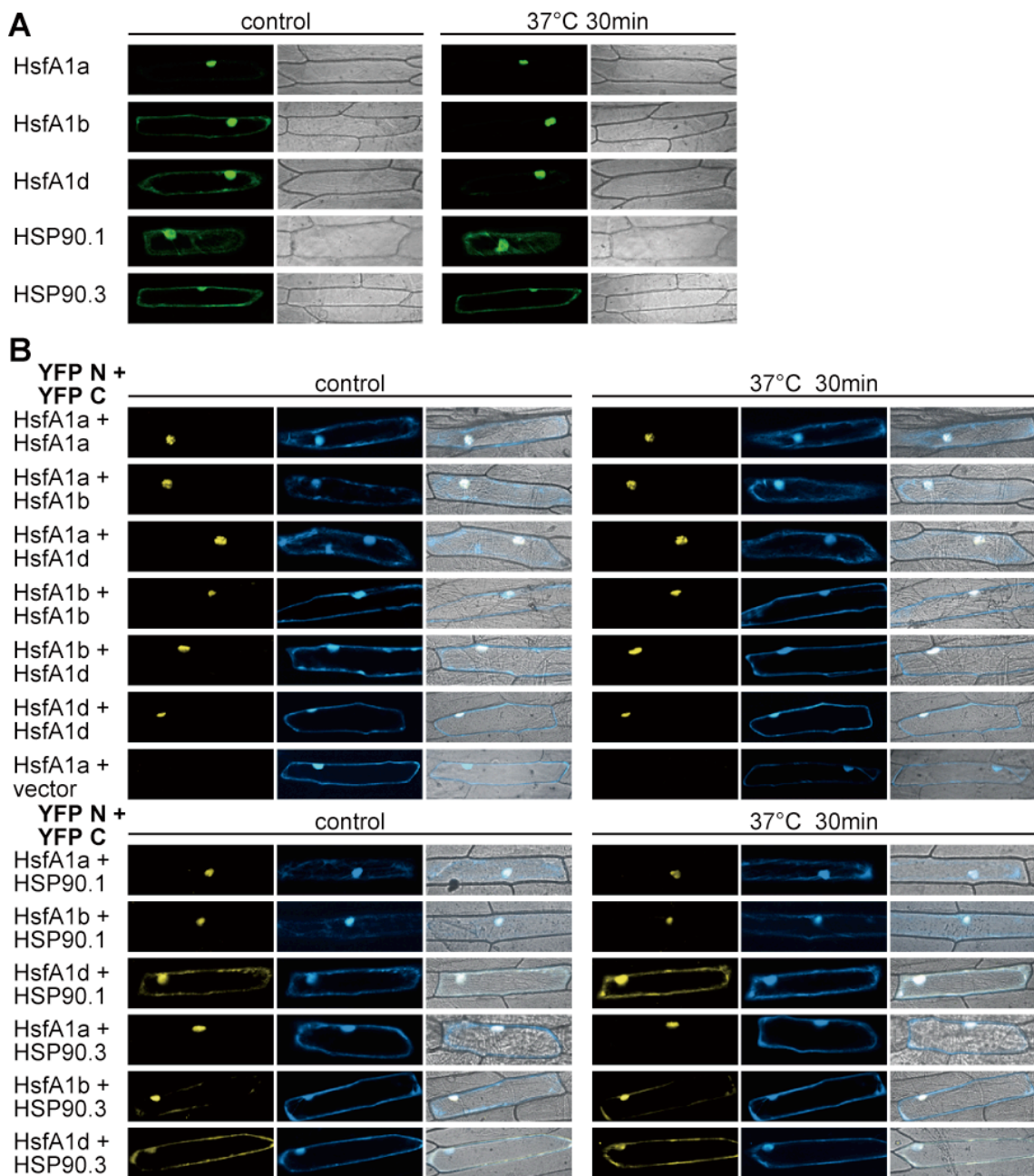


図 13. タマネギの表皮細胞への一過的遺伝子発現系による HsfA1、HSP90 の相互作用解析

- (A) タマネギの表皮細胞への一過的遺伝子発現系における HsfA1 又は HSP90 と GFP の融合タンパク質の細胞内局在。
- (B) タマネギの表皮細胞への一過的遺伝子発現系における BiFC 解析。HsfA1 同士の相互作用（上段）、及び HsfA1 と HSP90 の相互作用（下段）の解析を行った。

BiFC 用コンストラクトと同時に遺伝子導入が成功している細胞を調べるために、CFP を過剰発現させるコンストラクトも導入した。YFP シグナルを左に、CFP シグナルを中央に示した。また、それぞれの細胞において 37℃で 30 分高温ストレス処理した後のシグナルの変化も調べた。

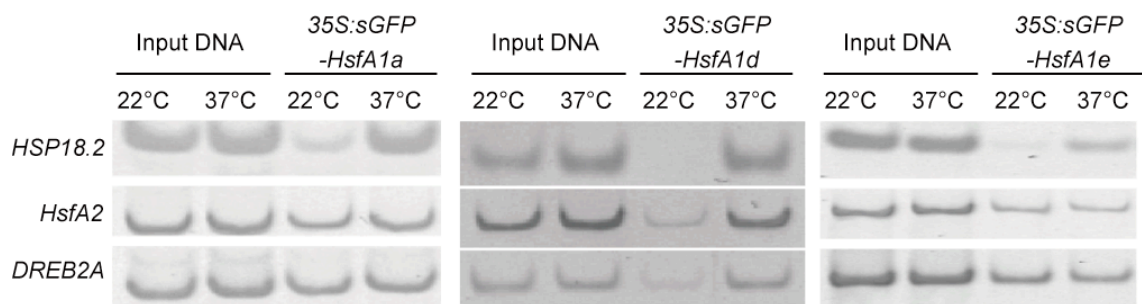


図 14. ChIP 解析による *HsfA1* のプロモーター結合解析

GFP と *HsfA1* の融合タンパク質過剰発現体 (*35S:sGFP-HsfA1a*、*35S:sGFP-HsfA1d*、*35S:sGFP-HsfA1e*) を用いて ChIP 解析を行った。15 日間生育させた植物体からタンパク質を抽出し GFP 抗体により DNA タンパク質複合体を回収し複合体に含まれていた DNA 配列中に *HSP18.2*、*HsfA2*、*DREB2A* のプロモーター中の HSE 周辺配列が存在するかを PCR 法により確認した。22°C はストレス無し、37°C は 37°C で 1 時間高温ストレス処理したサンプルを使用した。

第四章 *HsfA1* サブファミリー遺伝子による生育制御の解析

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 つの遺伝子で形成されている。*DREB2A* や *HsfA2* 等の高温ストレス応答に重要な転写因子や、高温耐性獲得に必要な *HSP* などの分子シャペロンの多くは、*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の三遺伝子の機能によって相補的に制御され *HsfA1e* は機能していないと考えられた。一方、葉肉細胞を用いた一過的遺伝子発現系による転写活性化解析では、*HsfA1e* は他の *HsfA1* と遜色の無い活性化能を持ち高温ストレスに対する誘導性も持つことから、植物中で何らかの機能を果たしていると考えられる。しかし、これまでに *HsfA1e* の機能についての解析はほとんど行われていない。二章での解析においては *HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の三重変異体を用いることで初めてこれらの遺伝子が *DREB2A* の発現制御を行っていることが明らかになった。他にも、分子系統樹上で近縁な遺伝子の多重変異体を利用することでその機能が初めて明確になった例は多く存在する。例えばアブシジン酸シグナル伝達に關与する *SnRK2* なども三重変異体を作製することでそれらが持つ機能に関する研究が飛躍的に進んだ(Fujita et al., 2009; Nakashima et al., 2009)。 *hsfa1e* を含む多重変異体を解析することで機能を明らかにできると考えられた。

そこで本章では *HsfA1e* の機能も合わせて解析することで、*HsfA1* サブファミリー遺伝子全体の機能を明らかにすることを目的とした。はじめに *HsfA1e* も含めたシロイヌナズナの *HsfA1* サブファミリー遺伝子の進化上の位置を把握するために、多種類の生物の *HSF* タイプ転写因子と共に系統樹を作製し解析した。その後、*hsfa1a/b/d/e* 四重変異体も含めた *HsfA1e* が変異した植物体を作出することで、*HsfA1e* の機能、及び *HsfA1* サブファミリー遺伝子全体としての機能の解明を試みた。

材料と方法

1. 分子系統解析

シロイヌナズナのデータベース TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) からシロイヌナズナの *HSF* タイプの転写因子 21 種のアミノ酸配列を抽出した。SALAD DATABASE (<http://salad.dna.affrc.go.jp/salad/>) から *HSF* タイプの DNA 結合ドメインと相同性の高いアミノ酸配列をコードするクラミドモナス

(*Chlamydomonas reinhardtii*; Cr)、ヒメツリガネゴケ(*Physcomitrella patens*; Pp)、イヌカタヒバ(*Selaginella moellendorffii*; Sm)、イネ(*Oryza sativa*; Os)の遺伝子を抽出した。さらに、phytozome (<http://www.phytozome.net/>)から HSF タイプの DNA 結合ドメインと相同性の高いアミノ酸配列を持つ、イネ(*Oryza sativa*; LOC Os)とダイズ(*Glycine max*; Glyma)の遺伝子を抽出した。イネに関しては Os と LOC Os の配列を比較してより完全長に近いと思われるものを採用した。また、トマトの HSF (LpHSF) に関しても先行論文を参考に抽出した(Nover et al., 2001)。このようにして収集した遺伝子がコードする予想アミノ酸配列を、CLUSTALX2 プログラムによって整列し、その後シロイヌナズナの HSF の配列をベースとして整形した。シロイヌナズナの HSF のアライメントは(Nover et al., 2001)を参考にした。アライメント後に、抽出した遺伝子群で保存度の高かった、HSF タイプの DNA 結合ドメインと HR-A/B ドメインを基に、MEGA4 プログラム (<http://www.megasoftware.net/>) を用いて近隣結合法による分子系統樹を作製した。また、1000 回の繰り返しによるブートストラップ値も系統樹中に示した。

2. サンプル植物と生育条件

シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)の野生型として Columbia エコタイプと Wassileskija エコタイプを使用した。生育条件は第二章と同様の条件を用いた。

3. T-DNA 挿入変異体の選抜と多重変異体の作出

第二章で作出した変異体に加えて *HsfA1e* 遺伝子の破壊株 (*hsfa1e*; SALK_094943)をシロイヌナズナ生物資源センター (ABRC)から入手した。*hsfa1e* のホモ接合体の選抜は第二章と同様の方法で行った。*hsfa1a/b/d* と *hsfa1e* の交配も第二章と同様の方法で行った。

4. ストレス処理

特に記す場合を除き、GM 寒天培地上で2~3週間生育させた植物体をストレス処理実験に供した。高温ストレス処理は、第二章と同様に行なった。

5. RNA の抽出

Total RNA の抽出は第二章と同様に行なった。

6. マイクロアレイ解析

hsfa1a/b/d/e 四重変異体と対照用に Columbia と Wassileskija を解析に使用した。それぞれの植物体を GM 寒天培地で2週間生育させた後、無処理のものと高温ストレス処理(37°C1時間)後のものをサンプルとし、4と同様の方法で RNA 抽出を行いマイクロアレイ解析に使用した。マイクロアレイ解析は第三章と同様に行なった。

7. 定量的 RT-PCR 解析

定量的 RT-PCR 解析は第二章と同様に行なった。

結果

HSF タイプの転写因子の分子系統解析

シロイヌナズナの *HsfA1* サブファミリー遺伝子の進化的特徴を調べるために、ヒメツリガネゴケ、イヌカタヒバ、クラミドモナス、イネ、ダイズ、トマトにおいて HSF タイプの DNA 結合ドメインを持つ遺伝子を収集、整列し DNA 結合ドメインと HR-A/B の配列を使って分子系統樹を作製した (図 15)。その結果、HSF は、大きく HsfA タイプと HsfB タイプに分かれた。HsfA タイプの中では、HsfA1 のグループ、HsfA2、HsfA6a、HsfA6b、HsfA7a、HsfA7b、HsfA8、HsfA9 のグループ、HsfA3、HsfC1 のグループ、HsfA4a、HsfA4c、HsfA5 のグループの 4 つのグループに分かれた。イネやダイズでは HSF タイプの DNA 結合ドメインを持つものは非常に多く全てのグループに一つ以上の遺伝子が存在した。シロイヌナズナより早い年代に進化した分類群に属するクラミドモナス、ヒメツリガネゴケ、イヌカタヒバにおいては HSF タイプの転写因子はシロイヌナズナの *HsfA1* サブファミリーと近いものしか存在しなかった。このことから、*HsfA1* タイプの遺伝子は植物の HSF のプロトタイプであり、生物にとって欠かせない機能を備えているものであると考えられる。

hsfa1a/b/d/e 四重変異体の遺伝子発現解析

HSF タイプの転写因子の分子系統解析によって、*HsfA1* サブファミリーに属する遺伝子は植物にとって非常に重要なことが予想された。第二章、第三章の解析により、*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の三遺伝子で高温ストレス応答制御の大部分を担っていることが明らかになった。*HsfA1* のもう一つの遺伝子 *HsfA1e*

を変異させることで、HsfA1 サブファミリーが全体として果たす機能を解析することができると考え、*hsfa1a/b/d* に *hsfa1e* を交配する事で、*hsfa1b/d/e* 三重変異体及び *hsfa1a/b/d/e* 四重変異体を作出した。変異体において、それぞれの遺伝子が発現しなくなっていることを RT-PCR によって確認した (図 16A)。GM 寒天培地上で 2 週間生育させた *hsfa1a/b/d/e* は野生型や他の変異体と比べて成長が遅い傾向があった (図 16B)。それぞれ 14 個体以上のロゼット葉の最大展開葉の長さを計測したところ、野生型は 7mm 程度であったが、*hsfa1a/b/d/e* は 5mm 程度と実際にサイズも小さかった (図 16C)。

hsfa1a/b/d/e 四重変異体内での遺伝子発現がどのように変化しているかを調べるために、第三章で *hsfa1a/b/d* 三重変異体に対して行ったマイクロアレイ解析と同様の解析を行った (表 5A)。37°C 処理 1 時間において、野生型と比較して 992 個の遺伝子の発現が 2 倍以上減少していた。これらの遺伝子の内、601 個の遺伝子が Columbia において高温ストレス誘導性で、614 個の遺伝子が Wassileskijia において高温ストレス誘導性であった。*hsfa1a/b/d/e* 四重変異体で発現が減少していた遺伝子の内、減少幅が上位の 100 個について第三章と同様の方法でヒートマップを作製した (図 17A)。高温ストレス処理におけるヒートマップの傾向は、*hsfa1a/b/d* 三重変異体のヒートマップの場合とほとんど変化がなかった。実際に高温ストレス下での *hsfa1a/b/d* 三重変異体と *hsfa1a/b/d/e* 四重変異体で減少幅が大きかった上位 100 個の遺伝子同士を比較すると、81 個の遺伝子が共通していた。減少していた遺伝子全体を比較すると *hsfa1a/b/d* と *hsfa1a/b/d/e* のどちらでも減少していたのは 516 個の遺伝子であった (図 17B)。減少幅が大きい遺伝子ほどこの重なりは大きく、減少幅が小さくなるに連れて双方の違いが目立った。前章で発現を確認した *DREB2A*、*HsfA2*、*HSP* といった高温ストレス応答に重要な遺伝子について定量的 RT-PCR で発現量を調べると、*hsfa1a/b/d* 三重変異体ですでに高温ストレスに対する応答性が見られなくなっているため、*hsfa1a/b/d* 三重変異体と *hsfa1a/b/d/e* 四重変異体との間での変化は確認できなかった (図 18)。また、*DREB2A*、*HSP70*、*HSP101* に関しては *hsfa1b/d/e* 三重変異体における遺伝子発現を解析した (図 18A)。この三重変異体においては *hsfa1a/b/d* 三重変異体とは異なり、どの遺伝子も発現が誘導されていた。これらの結果から、高温ストレス応答においては *HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の三遺伝子が主要な働きをしていると結論づけられた。

一方、高温ストレスを与えていない通常の生育条件のサンプルを用いたマイクロアレイ解析においては、*hsfa1a/b/d/e* 四重変異体と *hsfa1a/b/d* 三重変異体の間に顕著な差が見られた(表 5B)。*hsfa1a/b/d* 三重変異体においては発現が二倍以上減少した遺伝子は 21 個であったが、*hsfa1a/b/d/e* 四重変異体においては発現が二倍以上減少した遺伝子は 310 個あった。また発現が上昇したものは、*hsfa1a/b/d* 三重変異体では 5 個だったが、*hsfa1a/b/d/e* 四重変異体では 146 個あった。*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d*、*HsfA1e* はアクティベーターとして機能すると考えられるので、変異体中で発現が上昇した遺伝子は直接的な作用でなく、間接的な結果だと思われる。四重変異体において遺伝子発現が減少していた 310 個の内、196 個 (63%)の遺伝子の upstream 1 kb までのプロモーター配列に HSE 配列が存在していた。これらの遺伝子は 4 つの *HsfA1* の直接的なターゲットである可能性が高い。また、310 個の遺伝子のうち 126 個の遺伝子は高温ストレス処理した四重変異体中で遺伝子発現が減少する遺伝子 992 個の中に含まれていた(図 17B)。減少幅の大きかった上位 100 個の遺伝子についてヒートマップを作成すると、高温ストレス下の *hsfa1a/b/d/e* において遺伝子発現が減少していた遺伝子に関するヒートマップほどではないが、高温ストレスで発現が誘導される遺伝子が多く含まれていることが見られた(図 17A)。上位 100 個の遺伝子に関して、第三章の図 8C と同様の方法で機能の類推を行った(図 17C)。その結果、通常の生育条件において *hsfa1a/b/d/e* で発現量が強く減少していた遺伝子には、分子シャペロンが多く含まれていた。また、高温ストレス下の *hsfa1a/b/d* での結果と異なり、リン酸化酵素などの情報伝達に関わると予想される遺伝子 (signal transduction) も多く含まれていた。これらの結果から、*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d*、*HsfA1e* は高温ストレスがない通常の生育状態でも、シロイヌナズナの遺伝子発現の制御に重要な働きを持っていると考えられた。また、通常の生育条件における遺伝子発現制御は *HsfA1* サブファミリー遺伝子の 4 つ全てが相補的に担っており、高温ストレス応答の場合と異なり *HsfA1e* 遺伝子だけでも機能できることが明らかになった。

***hsfa1a/b/d/e* 四重変異体の生育 の観察**

マイクロアレイ解析の結果から、*hsfa1a/b/d/e* 四重変異体では *hsfa1a/b/d* 三重変異体と異なり、通常の生育時にも遺伝子発現が変化することが明らかになった。そのため *HsfA1* サブファミリー遺伝子は、通常の生育条件でも機能して

いることが予想された。GM 寒天培地上で生育する *hsfa1a/b/d/e* 四重変異体は野生型や他の変異体と比較して小さかった(図 16B)。*HsfA1* サブファミリー遺伝子がシロイヌナズナの生育に与える影響をより詳しく調べるために、変異体を鉢植えで生育させ、発芽から種子を付け枯死するまでを観察した(図 19)。土を充填した鉢にシロイヌナズナの種子を直接播種し、22℃に調整した植物インキュベーター内で、ストレスがなるべくかからないように生育させた。播種後 14 日の植物体を比較すると、GM 培地で育てた時以上に明確に *hsfa1a/b/d/e* 四重変異体において生育が遅れることが確認できた。さらに、播種後 46 日の植物を観察すると、野生型と *hsfa1a/b/d* 三重変異体は十分に生育し花序の伸長が終了しているにも関わらず、*hsfa1a/b/d/e* 四重変異体はようやく抽台を始めたばかりであった。*hsfa1a/b/d/e* 四重変異体は伸長が遅いが、その後も成長を続け播種後 61 日には、野生型や三重変異体と同等の背丈まで成長した。この時、野生型や三重変異体は種子を付け枯死し、十分に乾燥した状態であった。これらの結果から *hsfa1a/b/d/e* 四重変異体では、成長が遅れるが、成長が止まるわけでは無いことが示された。*HsfA1* サブファミリー遺伝子はシロイヌナズナの通常の成長にも必要であると考えられた。

考察

hsfa1a/b/d/e 四重変異体の解析から、*HsfA1* サブファミリー遺伝子は植物の高温ストレス応答だけでなく、通常の生育にも必要であることが明らかになった。

通常の生育条件下のマイクロアレイ解析では、*hsfa1a/b/d* 三重変異体において遺伝子発現はほとんど変化がなかったが、*hsfa1a/b/d/e* 四重変異体においては野生型と比べて発現量が 2 倍以上変化する遺伝子が 500 個近く存在した(表 5)。*hsfa1a/b/d/e* はストレスがかからないように調整した上で生育させても明確な生育の遅れを示した(図 19)。*hsfa1a/b/d* や *hsfa1b/d/e* 三重変異体では生育の遅れなどの表現型は確認できなかったことから、*HsfA1* サブファミリー遺伝子が少なくとも一つ働けば、高温ストレスがない状態において必要とされる遺伝子発現制御は維持できると考えられる(図 16C)。これまでに、動物の研究において *HSF* と成長や発生との関係についていくつかの報告がある (Akerfelt et al.,

2010)。ショウジョウバエでは *HSF* が卵形成や幼虫の成長に関わることが報告されている(Jedlicka et al., 1997)。マウスでは、*HSF1* の欠失によって成長の遅れやメスの不妊が起きることが知られている(Xiao et al., 1999)。線虫の実験では、*HSF-1* が老化に伴い低下するタンパク質の恒常性の維持に重要な働きを持つことも報告されている(Ben-Zvi et al., 2009)。植物においては、シロイヌナズナの *HsfA9* が種子の正常な成熟に必要なものであることが知られている(Tejedor-Cano et al., 2010)。しかし、植物の成長と *HSF* の関係は殆ど明らかになっていない。*HSF* の過剰発現により、成長が遅れるという報告はいくつかあるが(Ogawa et al., 2007; Yoshida et al., 2008; Zhu et al., 2009)、これらは異所性の過剰発現による影響である可能性が高い。今回の *hsfa1a/b/d/e* 四重変異体を用いることで、機能獲得による影響ではなく、機能消失によって生育の遅れ見られることが明らかになったことは、植物においては *HsfA1* サブファミリー遺伝子が植物の正常な生育を維持するために必要であることを示している。

高温ストレス下のマイクロアレイ解析では、*hsfa1a/b/d/e* 四重変異体で野生型と比較して発現が 2 倍以上減少している遺伝子が 992 個存在した。*hsfa1a/b/d* 三重変異体における同様のマイクロアレイ解析では、減少していた遺伝子が 713 個で、四重変異体との双方で減少しているものは 516 個であった。この結果から、*HsfA1e* も高温ストレス応答にある程度の機能を持っている可能性は否定できない。しかし、高温ストレス応答性が強く、高温耐性獲得に重要とされる遺伝子は、*hsfa1a/b/d* 三重変異体で既に発現誘導が見られなくなっていること(図 18)、*hsfa1b/d/e* 三重変異体では発現誘導が正常に見られること(図 18A)、さらに *HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の三遺伝子が *HsfA1e* の発現誘導を制御していることから(図 9A)、*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の三遺伝子が高温ストレスの開始において主要な機能を持つ可能性は極めて高いと考えられる。

HSF タイプの転写因子の分子系統解析からヒメツリガネゴケ、イヌカタヒバ、クラミドモナス、イネ、ダイズ、トマトそしてシロイヌナズナの中で唯一全てに存在していたのは *HsfA1* が属するグループであったことから、*HsfA1* は進化的に見ても非常に重要であることが予想できる(図 15)。特に、クラミドモナスやイヌカタヒバ、ヒメツリガネゴケにおいてはこのグループの *HSF* しか存在していない。本研究により、シロイヌナズナの *HsfA1* サブファミリー遺伝子が高

温ストレス応答の開始と、通常条件での生育に関わることが明らかになったことから、*HsfA1* と同じグループに属している他の植物種由来の遺伝子も同様の機能を持っている可能性が高いと考えられる。種々の植物種においても研究が進めば、植物の *HsfA1* グループ遺伝子の機能に関する知見はより強固に確立されるであろう。

図表一覧

表 4. 本章で使したプライマーの一覧

各々のプライマーセットにおいて上段が遺伝子方向に対して順方向のプライマー、下段が逆方向のプライマーである。

実験内容		
(材料と方法の項目)		
(対応する図番号)	増幅産物	配列 (5' to 3')
RT-PCR (6) (図 16A)	<i>HsfA1a</i>	TACGAAAATGGACGGTGTTA GTTTCTGATGTGAGAAGACCCAA
	<i>HsfA1b</i>	GGGGCGGCCGCATGGAATCGGTTCCCGAAT GGGCTCGAGTTATTTCTCTGTGCTTCTGA
	<i>HsfA1d</i>	CTCCGTTTCTGAGCAAGACC ATGAATATGCTGCTCTCAGG
	<i>HsfA1e</i>	CAGAATGTGGGGCAGAAAGT CTGTCTCGCATCCAACAAGA
	<i>ACT2</i>	GACCTTGCTGGACGTGACCTTAC GTAGTCAACAGCAACAAAGGAGAGC
定量的 RT-PCR (6) (図 18)	<i>18s rRNA</i>	AAACGGCTACCACATCCAAG CCTCCAATGGATCCTCGTTA
	<i>DREB2A</i>	CAGTGTTGCCAACGGTTCAT AAACGGAGGTATTCCGTAGTTGAG
	<i>HsfA1a</i>	CCGGAGTTTTCTCGTGATCT TCGATCTGGATCCACTTTCC
	<i>HsfA1b</i>	GGTGCTCTTGCCCAAGTATT CCATCGGTCAGGATCAACTT
	<i>HsfA1d</i>	AAACATTGCTTTGGCTTGCT GAGACGGCATTGTCCGTAAT
	<i>HsfA1e</i>	TCGCCAAACAGTTTCTACCAA GCGGTCTGGATCAACTTTTC
	<i>RD29A</i>	TGGATCTGAAGAACGAATCTGATATC GGTCTTCCCTTCGCCAGAA

表 5A. マイクロアレイ解析により 37℃1 時間処理後の *hsfa1a/b/d/e* 四重変異体において野生型と比較して発現の減少が大きかった遺伝子
 表中には *hsfa1a/b/d/e* のマイクロアレイデータと共に高温ストレス下の野生型における発現誘導の有無、高温ストレス下の *hsfa1a/b* 二重変異体における遺伝子発現の変化(Busch et al., 2005)、活性型 DREB2A (DREB2A CA) 過剰発現体における遺伝子発現の変化(Sakuma et al., 2006a)を記した。同時に各遺伝子の転写開始点より上流 1kbp までに HSE 及び DRE が含まれている個数を示した。マイクロアレイ結果は発現量の減少が大きかった 50 個の遺伝子のデータを示している。

AGI code	Description	Promoter		Microarray data								
		HSE ¹⁾	DRE ²⁾	HS 1h								control condition
				<i>hsfa1abde</i>					<i>Col</i>	<i>Ws</i>	<i>hsfa1ab</i>	<i>DREB2A CA OX</i>
				Pvalue	Fold change	Regulation	Average log2	Standard deviation	Regulation	Regulation	down regulated genes ³⁾	Regulation ⁴⁾
At1g71000	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein similar to SP/O35723 DnaJ homolog subfamily B member 3 Mus musculus, SP/Q9QY17 DnaJ homolog subfamily B member 8 Mus musculus; contains Pfam profile PF00226 DnaJ domain [At1g71000.1]	4	0	1.4E-03	1655.7	down	-10.7	0.4	up	up	down	
At4g10250	22.0 kDa ER small heat shock protein (HSP22.0-ER) identical to endomembrane-localized small heat shock protein GI:511795 from [Arabidopsis thaliana] [At4g10250.1]	2	0	1.6E-03	1229.4	down	-10.3	0.5	up	up	down	up
At3g12580	heat shock protein 70, putative / HSP70, putative strong similarity to heat shock protein GI:425194 [Spinacia oleracea] [At3g12580.1]	2	1	2.4E-03	860.6	down	-9.7	0.8	up	up		up
At4g21460	expressed protein [At4g21460.1]	1	1	1.6E-03	836.7	down	-9.7	0.5				
At4g29770	expressed protein [At4g29770.1]	0	0	2.1E-03	819.2	down	-9.7	0.7	up	up	down	
At1g59860	17.6 kDa class I heat shock protein (HSP17.6A-CI) similar to 17.5 kDa class I heat shock protein SP:P04793 from [Glycine max] [At1g59860.1]	1	0	2.7E-03	804.5	down	-9.7	0.8	up	up		
At4g12400	stress-inducible protein, putative similar to sti (stress inducible protein) [Glycine max] GI:872116; contains Pfam profile PF00515 TPR Domain [At4g12400.1]	0	0	2.0E-03	708.0	down	-9.5	0.6	up	up		up
At5g48570	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative / FK506-binding protein, putative similar to rofl [Arabidopsis thaliana] GI:1373396 [At5g48570.1]	0	0	2.6E-03	706.2	down	-9.5	0.8	up	up		up
At5g14020	expressed protein [At5g14020.1]	0	0	2.8E-03	671.4	down	-9.4	0.9	up	up		
At5g15250	FtsH protease, putative similar to FtsH-like protein Pfif precursor GI:4325041 from [Nicotiana tabacum] [At5g15250.1]	1	0	2.3E-03	582.2	down	-9.2	0.7	up	up	down	
At1g03070	expressed protein low similarity to N-methyl-D-aspartate receptor-associated protein [Drosophila melanogaster] GI:567104; contains Pfam profile PF01027: Uncharacterized protein family UPF0005 [At1g03070.1]	2	0	1.4E-03	580.6	down	-9.2	0.3	up	up	down	
At5g51440	23.5 kDa mitochondrial small heat shock protein (HSP23.5-M) similar to heat shock 22 kDa protein, mitochondrial precursor SP:Q96331 from [Arabidopsis thaliana]; identified in Scharf, K.-D., et al.Cell Stress & Chaperones (2001) 6: 225-237. [At5g51440.1]	4	1	2.1E-03	536.5	down	-9.1	0.7	up	up		up
At1g52560	26.5 kDa class I small heat shock protein-like (HSP26.5-P) contains Pfam profile: PF00011 Hsp20/alpha crystallin family; identified in Scharf, K.-D., et al.Cell Stress & Chaperones (2001) 6: 225-237. [At1g52560.1]	2	0	2.4E-03	519.2	down	-9.0	0.7	up	up	down	up
At2g26150	heat shock transcription factor family protein contains Pfam profile: PF00447 HSF-type DNA-binding domain [At2g26150.1]	4	0	2.8E-03	507.5	down	-9.0	0.8	up	up		
At1g54050	17.4 kDa class III heat shock protein (HSP17.4-CIII) contains Pfam profile: PF00011 Hsp20/alpha crystallin family; identified as class CIII in Scharf, K.-D., et al.Cell Stress & Chaperones (2001) 6: 225-237. [At1g54050.1]	2	0	2.1E-03	452.3	down	-8.8	0.6	up	up		
At5g12020	17.6 kDa class II heat shock protein (HSP17.6-CII) identical to 17.6 kDa class II heat shock protein SP:P29830 from [Arabidopsis thaliana] [At5g12020.1]	2	0	1.6E-03	451.2	down	-8.8	0.4	up	up		up
At1g16030	heat shock protein 70, putative / HSP70, putative similar to heat shock protein hsp70 GI:1771478 from [Pisum sativum] [At1g16030.1]	0	1	2.6E-03	408.3	down	-8.7	0.7	up	up		up
At5g52640	heat shock protein 81-1 (HSP81-1) / heat shock protein 83 (HSP83) nearly identical to SP/P27323 Heat shock protein 81-1 (HSP81-1) (Heat shock protein 83) [Arabidopsis thaliana]; contains Pfam profiles PF02518: ATPase, histidine kinase-, DNA gyrase B-....	3	1	3.2E-03	399.6	down	-8.6	0.9	up	up		up
At4g27670	25.3 kDa small heat shock protein, chloroplast precursor (HSP25.3-P) identical to small heat shock protein, chloroplast precursor SP:P31170 from [Arabidopsis thaliana]; identified in Scharf, K.-D., et al.Cell Stress & Chaperones (2001) 6: 225-237....	2	0	1.9E-03	397.0	down	-8.6	0.6	up	up	down	up
At1g48720	hypothetical protein [At1g48720.1]	2	1	3.7E-03	382.7	down	-8.6	1.0	up	up	down	up
At3g24500	ethylene-responsive transcriptional coactivator, putative similar to ethylene-responsive transcriptional coactivator [Lycopersicon esculentum] gi 5669634 gb AAD46402 [At3g24500.1]	4	0	3.0E-03	366.5	down	-8.5	0.8	up	up		up
At5g12030	17.7 kDa class II heat shock protein 17.6A (HSP17.7-CII) identical to heat shock protein 17.6A GI:3256075 from [Arabidopsis thaliana] [At5g12030.1]	1	0	1.6E-03	270.2	down	-8.1	0.4	up	up		up
At4g18450	ethylene-responsive factor, putative similar to ethylene response factor 1 GB:AAD03544 GI:4128208 from [Arabidopsis thaliana]; EREBP-1 (Ethylene-inducible DNA binding protein that interact with an ethylene-responsive element) - Nicotiana tabacum....	0	0	6.6E-03	255.7	down	-8.0	1.5	up	up		
At5g12110	elongation factor 1B alpha-subunit 1 (eEF1Balpha1) identical to elongation factor 1B alpha-subunit [Arabidopsis thaliana] GI:6686819 [At5g12110.1]	0	0	2.0E-03	252.4	down	-8.0	0.5	up	up	down	up
At1g30070	SGS domain-containing protein similar to calyculin binding protein [Mus musculus] GI:3142331; contains Pfam profile PF05002: SGS domain [At1g30070.1]	1	0	1.5E-03	242.8	down	-7.9	0.3	up	up		up

At1g20070	domain [At1g20070.1]	1	0	1.5E-03	242.6	down	-7.7	0.5	up	up		up
At3g46230	17.4 kDa class I heat shock protein (HSP17.4-CI) identical to 17.4 kDa class I heat shock protein SP:P19036 from [Arabidopsis thaliana] [At3g46230.1]	4	0	2.0E-03	237.2	down	-7.9	0.5	up	up		
At2g29500	17.6 kDa class I small heat shock protein (HSP17.6B-CI) contains Pfam PF00011: Hsp20/alpha crystallin family; identified in Scharf, K-D., et al, Cell Stress & Chaperones (2001) 6: 225-237. [At2g29500.1]	2	2	3.5E-03	220.5	down	-7.8	0.9	up	up		
At1g74310	heat shock protein 101 (HSP101) identical to heat shock protein 101 GI:6715468 GB:AAF26423 from [Arabidopsis thaliana] [At1g74310.1]	1	0	2.5E-03	209.8	down	-7.7	0.6	up	up		
At5g59720	18.1 kDa class I heat shock protein (HSP18.1-CI) identical to 18.2 kDa class I heat shock protein (HSP 18.2) (SP:P19037)[Arabidopsis thaliana]; contains Pfam profile: PF00011 Hsp20/alpha crystallin family [At5g59720.1]	5	1	2.7E-03	203.8	down	-7.7	0.7	up	up	down	up
At4g14905	kelch repeat-containing F-box family protein contains Pfam PF01344: Kelch motif (2 copies) and PF00646: F-box domain; similar to putative SKP1 interacting partner 6 (GP:21689879) (SKIP6) {Arabidopsis thaliana} 19798784 gb AU230074.1 AU230074...	0	0	1.4E-03	194.2	down	-7.6	0.3				
At1g17870	expressed protein contains 6 transmembrane domains; similar to predicted metalloproteases [At1g17870.1]	1	0	1.5E-03	193.7	down	-7.6	0.3	up	up	down	
At1g07400	17.8 kDa class I heat shock protein (HSP17.8-CI) similar to 17.5 kDa class I heat shock protein SP:P04793 from [Glycine max]; contains Pfam PF00011: Hsp20/alpha crystallin family [At1g07400.1]	0	0	3.1E-03	159.0	down	-7.3	0.7	up	up		
At1g14200	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein contains Pfam profile: PF00097 zinc finger, C3HC4 type (RING finger) [At1g14200.1]	2	0	1.6E-03	155.9	down	-7.3	0.4	up	up		
At3g15340	expressed protein [At3g15340.1]	0	0	2.2E-03	152.4	down	-7.3	0.5	up	up		
At3g51910	heat shock transcription factor family protein contains Pfam profile: PF00447 HSF-type DNA-binding domain [At3g51910.1]	5	1	1.6E-03	149.4	down	-7.2	0.4	up	up	down	
At5g37670	15.7 kDa class I-related small heat shock protein-like (HSP15.7-CI) contains Pfam profile: PF00011 Hsp20/alpha crystallin family; identified in Scharf, K-D., et al,Cell Stress & Chaperones (2001) 6: 225-237. [At5g37670.1]	1	0	3.1E-03	146.6	down	-7.2	0.7	up	up	down	up
At1g72660	developmentally regulated GTP-binding protein, putative very strong similarity to developmentally regulated GTP binding protein (DRG1) [Arabidopsis thaliana] GI:2345150 [At1g72660.1]	0	0	1.7E-03	129.4	down	-7.0	0.4	up	up	down	
At2g47180	galactinol synthase, putative similar to galactinol synthase, isoform GolS-1 GI:5608497 from [Ajuga reptans] [At2g47180.1]	2	1	2.8E-03	128.3	down	-7.0	0.6	up	up	down	up
At2g20560	DNAJ heat shock family protein SP Q9UDY4 DnaJ homolog subfamily B member 4 (Heat shock 40 kDa protein 1 homolog) {Homo sapiens}; contains Pfam profile PF00226: DnaJ domain [At2g20560.1]	1	0	2.1E-03	127.8	down	-7.0	0.5	up	up		up
At4g25200	23.6 kDa mitochondrial small heat shock protein (HSP23.6-M) contains Pfam profile PF00011: Hsp20/alpha crystallin family [At4g25200.1]	1	0	3.2E-03	122.9	down	-6.9	0.7	up	up	down	up
At2g32120	heat shock protein 70 family protein / HSP70 family protein similar to SP P22953 Heat shock cognate 70 kDa protein 1 (Hsc70.1) {Arabidopsis thaliana}; contains InterPro accession IPR001023: Heat shock protein Hsp70 [At2g32120.1]	1	1	2.1E-03	119.0	down	-6.9	0.5	up	up		up
At5g01180	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein contains Pfam profile: PF00854 POT family [At5g01180.1]	1	0	1.6E-03	114.4	down	-6.8	0.3	up	up	down	
At5g25450	ubiquinol-cytochrome C reductase complex 14 kDa protein, putative similar to SP P48502 Ubiquinol-cytochrome C reductase complex 14 kDa protein (EC 1.10.2.2) (CR14) {Solanum tuberosum}; contains Pfam profile PF02271: Ubiquinol-cytochrome C reductase...	1	0	1.3E-03	112.5	down	-6.8	0.2	up	up		up
At3g07150	hypothetical protein [At3g07150.1]	1	1	1.7E-03	112.0	down	-6.8	0.4	up	up	down	
At3g07090	expressed protein [At3g07090.1]	3	2	2.4E-03	109.4	down	-6.8	0.5	up	up		up
At4g12990	expressed protein [At4g12990.1]	0	0	3.4E-03	108.4	down	-6.8	0.8				
At1g66080	expressed protein [At1g66080.1]	3	0	1.4E-03	105.1	down	-6.7	0.3	up	up		
At2g46240	IQ domain-containing protein / BAG domain-containing protein contains Pfam profiles PF00612: IQ calmodulin-binding motif, PF02179: BAG (Apoptosis regulator Bcl-2 protein) domain [At2g46240.1]	1	1	1.6E-03	104.2	down	-6.7	0.3	up	up		
At5g36690	hypothetical protein [At5g36690.1]	0	0	1.5E-03	102.5	down	-6.7	0.3	up	up		
At2g25140	heat shock protein 100, putative / HSP100, putative / heat shock protein clpB, putative / HSP100/ClpB, putative similar to HSP100/ClpB GI:9651530 [Phaseolus lunatus] [At2g25140.1]	0	0	1.7E-03	101.2	down	-6.7	0.4	up	up	down	

表 5B. *hsfa1a/b/d/e* 四重変異体において無処理の状態で野生型と比較して発現が強く減少していた 50 個の遺伝子。

AGI code	Description	Promoter		Microarray data				
		HSE ¹⁾	DRE ²⁾	control condition				
				<i>hsfa1abde</i>				
				Pvalue	Fold change	Regulation	Average log2	Standard deviation
At4g21460	expressed protein [At4g21460.1]	1	1	6.5E-03	798.0	down	-9.6	0.9
At3g12580	heat shock protein 70, putative / HSP70, putative strong similarity to heat shock protein GI:425194 [Spinacia oleracea] [At3g12580.1]	2	1	4.6E-03	148.9	down	-7.2	0.4
At2g26150	heat shock transcription factor family protein contains Pfam profile: PF00447 HSF-type DNA-binding domain [At2g26150.1]	4	0	7.7E-03	119.4	down	-6.9	0.9
At4g12990	expressed protein [At4g12990.1]	0	0	6.8E-03	119.1	down	-6.9	0.7
At4g14905	kelch repeat-containing F-box family protein contains Pfam PF01344: Kelch motif (2 copies) and PF00646: F-box domain; similar to putative SKP1 interacting partner 6 (GP:21689879) (SKIP6) {Arabidopsis thaliana} 19798784 gb AU230074.1 AU230074...	0	0	2.0E-02	81.6	down	-6.4	2.3
At4g11900	S-locus lectin protein kinase family protein contains Pfam domains, PF00954: S-locus glycoprotein family, PF00069: Protein kinase domain, and PF01453: Lectin (probable mannose binding) [At4g11900.1]	0	2	8.9E-03	59.1	down	-5.9	0.9
At4g15620	integral membrane family protein contains TIGRFAM TIGR01569 : plant integral membrane protein TIGR01569; contains Pfam PF04535 : Domain of unknown function (DUF588) [At4g15620.1]	1	0	1.0E-02	53.9	down	-5.8	1.0
At4g19500	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative domain signature TIR-NBS-LRR exists, suggestive of a disease resistance protein. A false intron was added between exons 2 and 3 to circumvent a frameshift caused by a sequencing error, as per...	2	0	2.0E-02	39.5	down	-5.3	1.8
At2g46880	calcineurin-like phosphoesterase family protein contains Pfam profile: PF00149 calcineurin-like phosphoesterase [At2g46880.1]	0	0	2.7E-02	31.9	down	-5.0	2.4
At5g52640	heat shock protein 81-1 (HSP81-1) / heat shock protein 83 (HSP83) nearly identical to SP P27323 Heat shock protein 81-1 (HSP81-1) (Heat shock protein 83) {Arabidopsis thaliana}; contains Pfam profiles PF02518: ATPase, histidine kinase-, DNA gyrase B-....	3	1	5.3E-03	31.4	down	-5.0	0.4
At5g23480	expressed protein [At5g23480.1]	1	0	7.0E-03	27.4	down	-4.8	0.5
At4g11000	ankyrin repeat family protein contains ankyrin repeats, Pfam:PF00023 [At4g11000.1]	0	0	2.5E-02	27.0	down	-4.8	2.1
At5g16820	heat shock factor protein 3 (HSF3) / heat shock transcription factor 3 (HSTF3) identical to heat shock transcription factor 3 (HSF3) SP:O81821 from [Arabidopsis thaliana] [At5g16820.1]	1	0	6.6E-03	26.9	down	-4.7	0.5
At4g27670	25.3 kDa small heat shock protein, chloroplast precursor (HSP25.3-P) identical to small heat shock protein, chloroplast precursor SP:P31170 from [Arabidopsis thaliana]; identified in Scharf, K-D., et al,Cell Stress & Chaperones (2001) 6: 225-237....	2	0	1.5E-02	24.2	down	-4.6	1.2
At4g25200	23.6 kDa mitochondrial small heat shock protein (HSP23.6-M) contains Pfam profile PF00011: Hsp20/alpha crystallin family [At4g25200.1]	1	0	7.7E-03	23.9	down	-4.6	0.6
At5g12020	17.6 kDa class II heat shock protein (HSP17.6-CII) identical to 17.6 kDa class II heat shock protein SP:P29830 from [Arabidopsis thaliana] [At5g12020.1]	2	0	1.4E-02	23.6	down	-4.6	1.1
At4g11460	protein kinase family protein contains Pfam PF00069: Protein kinase domain [At4g11460.1]	1	1	1.2E-02	23.3	down	-4.5	1.0
At1g53540	17.6 kDa class I small heat shock protein (HSP17.6C-CI) (AA 1-156) identical to (17.6 kDa class I heat shock protein (HSP 17.6) (AA 1-156)(SP:P13853) (GI:4376161) (Arabidopsis thaliana) (Nucleic Acids Res. 17 (19), 7995 (1989)) [At1g53540.1]	4	1	9.1E-03	22.3	down	-4.5	0.7
At2g20560	DNAJ heat shock family protein SP Q9UDY4 DnaJ homolog subfamily B member 4 (Heat shock 40 kDa protein 1 homolog) {Homo sapiens}; contains Pfam profile PF00226: DnaJ domain [At2g20560.1]	1	0	7.5E-03	21.0	down	-4.4	0.5
At5g18840	sugar transporter, putative similar to ERD6 protein {Arabidopsis thaliana} GI:3123712, sugar-porter family protein 1 [Arabidopsis thaliana] GI:14585699; contains Pfam profile PF00083: major facilitator superfamily protein [At5g18840.1]	2	0	2.2E-03	19.6	down	-4.3	0.1
At5g51440	23.5 kDa mitochondrial small heat shock protein (HSP23.5-M) similar to heat shock 22 kDa protein, mitochondrial precursor SP:Q96331 from [Arabidopsis thaliana]; identified in Scharf, K-D., et al,Cell Stress & Chaperones (2001) 6: 225-237. [At5g51440.1]	4	1	7.0E-03	18.1	down	-4.2	0.4
At5g12110	elongation factor 1B alpha-subunit 1 (eEF1Balpha1) identical to elongation factor 1B alpha-subunit [Arabidopsis thaliana] GI:6686819 [At5g12110.1]	0	0	1.5E-03	15.6	down	-4.0	0.1
At1g59860	17.6 kDa class I heat shock protein (HSP17.6A-CI) similar to 17.5 kDa class I heat shock protein SP:P04793 from [Glycine max] [At1g59860.1]	1	0	1.1E-02	15.3	down	-3.9	0.8
At1g73260	trypsin and protease inhibitor family protein / Kunitz family protein similar to trypsin inhibitor propeptide [Brassica oleracea] GI:841208; contains Pfam profile PF00197: Trypsin and protease inhibitor [At1g73260.1]	2	0	2.7E-02	14.1	down	-3.8	1.8

At4g11830	phospholipase D gamma 2 / PLD gamma 2 (PLDGAMMA2) identical to SP Q9T051 Phospholipase D gamma 2 (EC 3.1.4.4) (AtPLDgamma2) (PLD gamma 2) [Arabidopsis thaliana] [At4g11830.1]	1	0	1.8E-02	13.8	down	-3.8	1.3
At5g44440	FAD-binding domain-containing protein similar to SP P30986 reticuline oxidase precursor (Berberine-bridge-forming enzyme) (BBE) (Tetrahydroprotoberberine synthase) [Eschscholzia californica]; contains PF01565 FAD binding domain [At5g44440.1]	1	0	2.1E-02	13.6	down	-3.8	1.4
At5g12030	17.7 kDa class II heat shock protein 17.6A (HSP17.7-CII) identical to heat shock protein 17.6A GI:3256075 from [Arabidopsis thaliana] [At5g12030.1]	1	0	6.1E-03	13.6	down	-3.8	0.3
At4g15200	formin homology 2 domain-containing protein / FH2 domain-containing protein contains formin homology 2 domain, Pfam:PF02181 [At4g15200.1]	2	0	1.0E-02	13.6	down	-3.8	0.7
At5g09570	expressed protein contains Pfam domain, PF04933: Protein of unknown function (DUF657) [At5g09570.1]	1	0	8.9E-03	13.1	down	-3.7	0.5
At5g48570	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative / FK506-binding protein, putative similar to rofl [Arabidopsis thaliana] GI:1373396 [At5g48570.1]	0	0	7.1E-03	12.9	down	-3.7	0.4
At4g12450	expressed protein [At4g12450.1]	1	0	1.1E-02	12.9	down	-3.7	0.7
At5g44420	plant defensin protein, putative (PDF1.2a) plant defensin protein family member, personal communication, Bart Thomma (Bart.Thomma@agr.kuleuven.ac.be); similar to antifungal protein 1 preprotein [Raphanus sativus] gi 609322 gb AAA69541 [At5g44420.1]	0	1	2.7E-02	12.3	down	-3.6	1.7
At1g07400	17.8 kDa class I heat shock protein (HSP17.8-CI) similar to 17.5 kDa class I heat shock protein SP:P04793 from [Glycine max]; contains Pfam PF00011: Hsp20/alpha crystallin family [At1g07400.1]	0	0	2.2E-03	12.1	down	-3.6	0.1
At4g01740	DC1 domain-containing protein similar to T15B16.6 similar to A. thaliana CHP-rich hypothetical proteins encoded by T10M13, GenBank accession number AF001308 [At4g01740.1]	1	0	9.7E-03	12.0	down	-3.6	0.6
At5g19470	MutT/nudix family protein similar to SP P41888 Thiamine pyrophosphokinase (EC 2.7.6.2) (TPK) (Thiamine kinase) {Schizosaccharomyces pombe}; contains Pfam profile PF00293: NUDIX domain [At5g19470.1]	0	0	1.6E-02	11.6	down	-3.5	1.0
At3g46230	17.4 kDa class I heat shock protein (HSP17.4-CI) identical to 17.4 kDa class I heat shock protein SP:P19036 from [Arabidopsis thaliana] [At3g46230.1]	4	0	1.3E-02	11.4	down	-3.5	0.8
At4g10250	22.0 kDa ER small heat shock protein (HSP22.0-ER) identical to endomembrane-localized small heat shock protein GI:511795 from [Arabidopsis thaliana] [At4g10250.1]	2	0	2.6E-02	10.7	down	-3.4	1.6
At4g11550	DC1 domain-containing protein contains Pfam profile PF03107: DC1 domain [At4g11550.1]	0	0	1.4E-02	9.9	down	-3.3	0.8
At4g13920	disease resistance family protein / LRR family protein contains leucine rich-repeat domains Pfam:PF00560, INTERPRO:IPR001611; similar to Cf-2.2 [Lycopersicon pimpinellifolium] gi 1184077 gb AAC15780 [At4g13920.1]	2	0	2.2E-02	9.8	down	-3.3	1.3
At4g23680	major latex protein-related / MLP-related low similarity to major latex protein {Papaver somniferum} [GI:294060] ; contains Pfam profile PF00407: Pathogenesis-related protein Bet v I family [At4g23680.1]	1	0	8.3E-03	9.6	down	-3.3	0.4
At4g15910	drought-responsive protein / drought-induced protein (Di21) identical to GI:469112; contains PF03242 Late embryogenesis abundant protein domain [At4g15910.1]	1	1	6.1E-03	9.5	down	-3.2	0.3
At4g13270	expressed protein [At4g13270.1]	0	0	6.1E-03	9.4	down	-3.2	0.3
At4g19510	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative domain signature TIR-NBS-LRR exists, suggestive of a disease resistance protein. [At4g19510.2]	0	1	5.8E-03	9.0	down	-3.2	0.2
At5g50790	nodulin MtN3 family protein similar to MtN3 GI:1619602 (root nodule development) from [Medicago truncatula] [At5g50790.1]	4	1	1.6E-02	9.0	down	-3.2	0.9
At2g14560	expressed protein contains Pfam profile PF04525: Protein of unknown function (DUF567) [At2g14560.1]	0	0	1.7E-02	8.6	down	-3.1	0.9
At3g24500	ethylene-responsive transcriptional coactivator, putative similar to ethylene-responsive transcriptional coactivator [Lycopersicon esculentum] gi 5669634 gb AAD46402 [At3g24500.1]	4	0	3.7E-03	8.5	down	-3.1	0.1
At1g74310	heat shock protein 101 (HSP101) identical to heat shock protein 101 GI:6715468 GB:AAF26423 from [Arabidopsis thaliana] [At1g74310.1]	1	0	2.2E-03	8.4	down	-3.1	0.1
At5g02580	expressed protein [At5g02580.1]	0	0	1.3E-02	8.4	down	-3.1	0.7
At5g01300	phosphatidylethanolamine-binding family protein similar to cold-regulated protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare] GI:10799810; contains Pfam profile PF01161: Phosphatidylethanolamine-binding protein [At5g01300.1]	0	0	7.5E-03	8.3	down	-3.0	0.4
At5g64510	expressed protein [At5g64510.1]	1	0	2.0E-02	8.1	down	-3.0	1.0

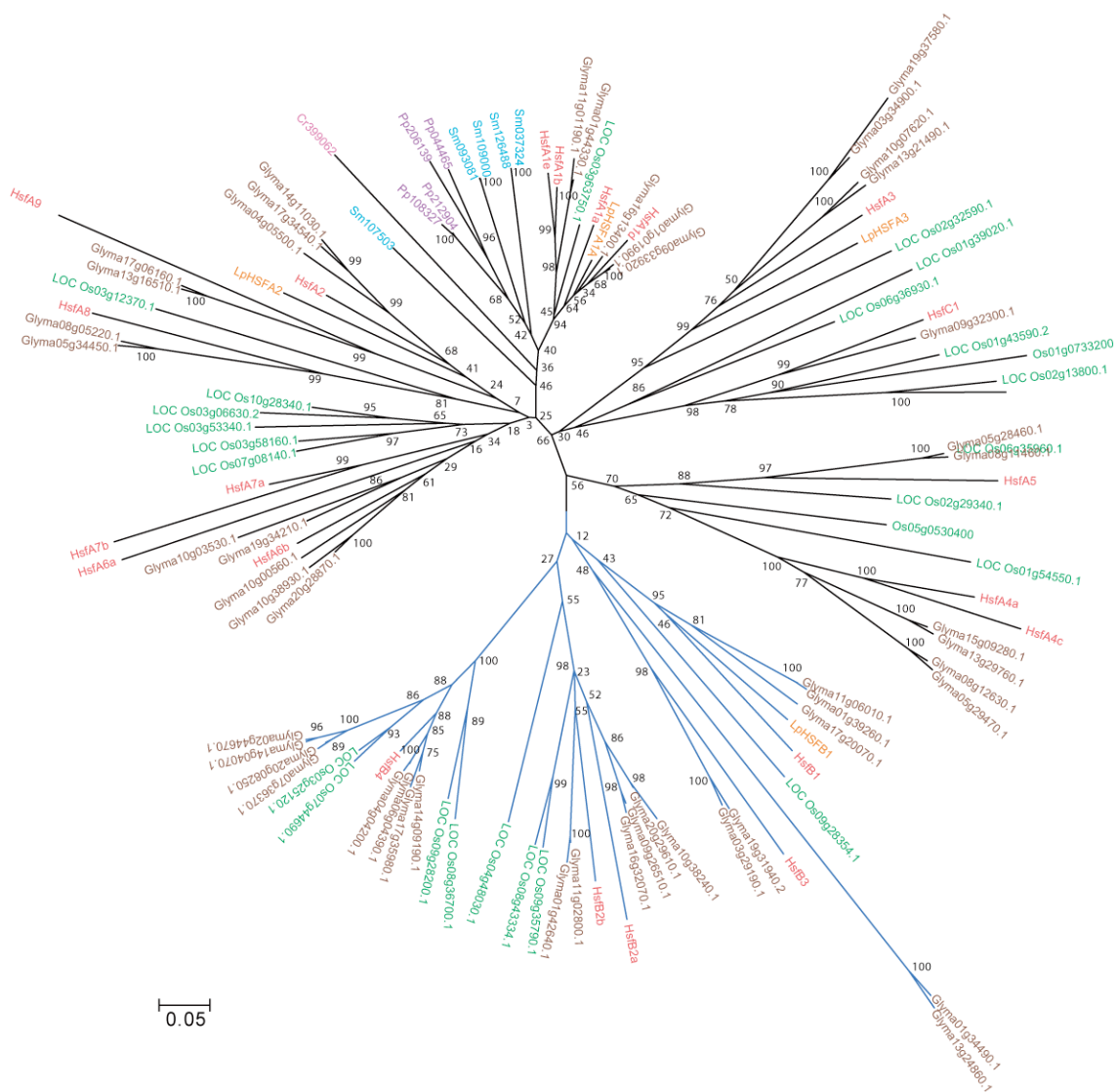


図 15. HSF タイプの DNA 結合ドメインを持つ転写因子の分子系統樹
 系統樹作製に使用した配列は、TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>)、
 phytozome (<http://www.phytozome.net/>)、SALAD database
 (<http://salad.dna.affrc.go.jp/salad/>) から入手した。シロイヌナズナの HSF は
 TAIR に登録されているものを使用し、トマトの HSF の配列は先行論文を参考
 にした(Nover et al., 2001)。シロイヌナズナとトマト以外の HSF に関しては、
 シロイヌナズナの HSF の DNA 結合ドメインと相同性の高いアミノ酸配列を持
 つものを使用した。系統樹にはシロイヌナズナ (Hsf)、トマト (LpHsf)、イネ (Os、
 LOC Os)、ダイズ (Glyma)、イヌカタヒバ (Sm)、ヒメツリガネゴケ (Pp)、ク
 ラミドモナス (Cr)の遺伝子を記した。系統樹はClustal Xで配列を整列した後、
 DNA 結合ドメインと HR-A/B の部分を利用してMEGA4プログラムを利用して

作製した。系統樹には 1000 回繰り返しによって計算したブートストラップ値も示した。

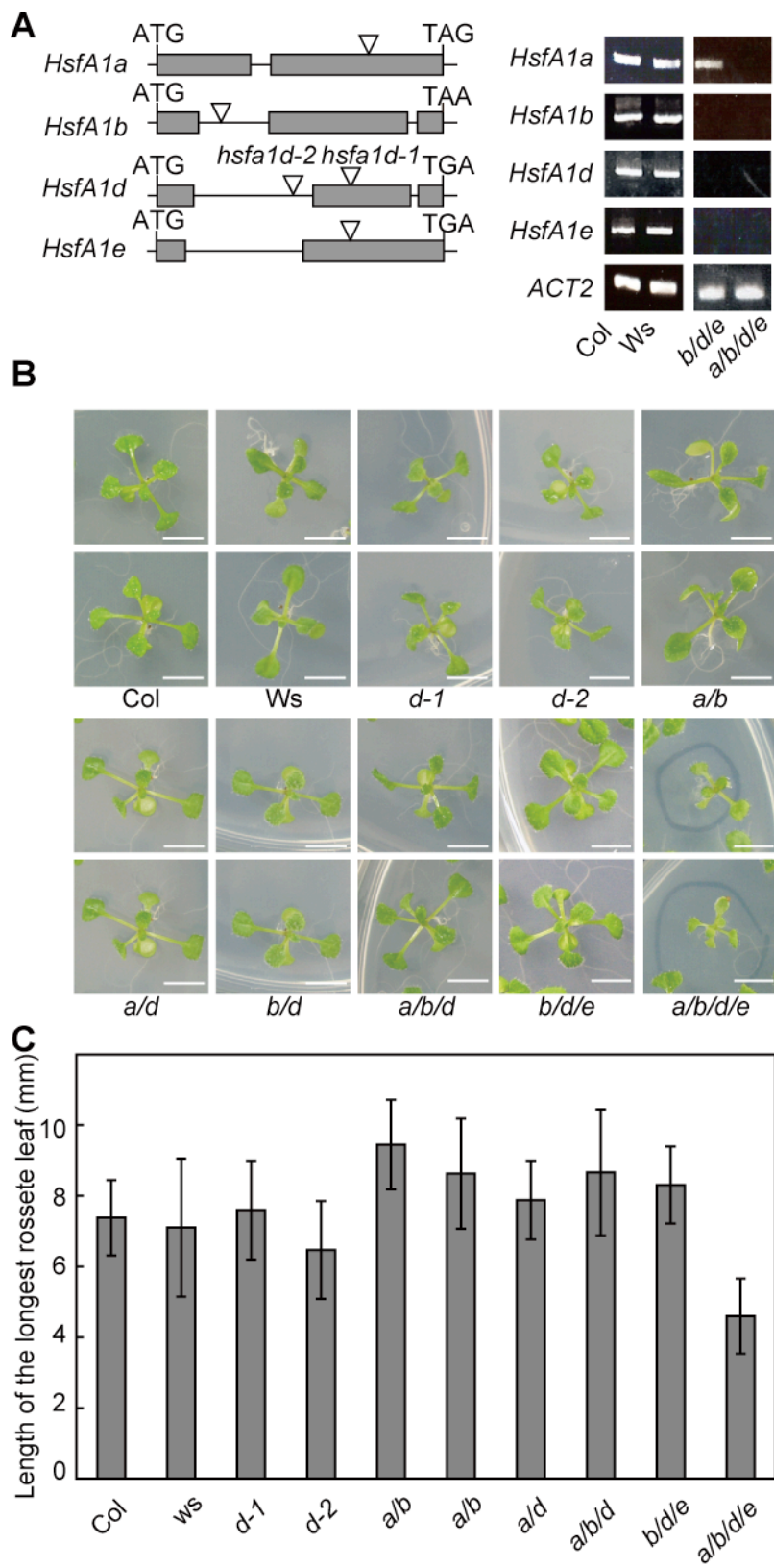


図 16. *hsfa1a/b/d/e* 四重変異体の表現型

- (A) *HsfA1* 遺伝子の構造と変異体の T-DNA 挿入部位 (左)、及び RT-PCR による遺伝子発現解析 (右)。図中の四角は *HsfA1* のコード領域を三角形は変異体の T-DNA 挿入部位を示した。2 週間生育させたそれぞれの変異体における遺伝子発現を RT-PCR で確認した、コントロールとしてアクチン (ACT2) 及び *HsfA1e* の発現も調べた。PCR 反応は 30 サイクルで行った。
- (B) 変異体の形態。それぞれの変異体を 2 週間生育させたときの幼植物体の写真を示した。スケールバーは 5 mm を示す。
- 2 週間生育させた変異体において、最も伸長していた葉の長さを測定した。それぞれの変異体において少なくとも 14 個体以上計測し、その平均及び標準偏差を示した。

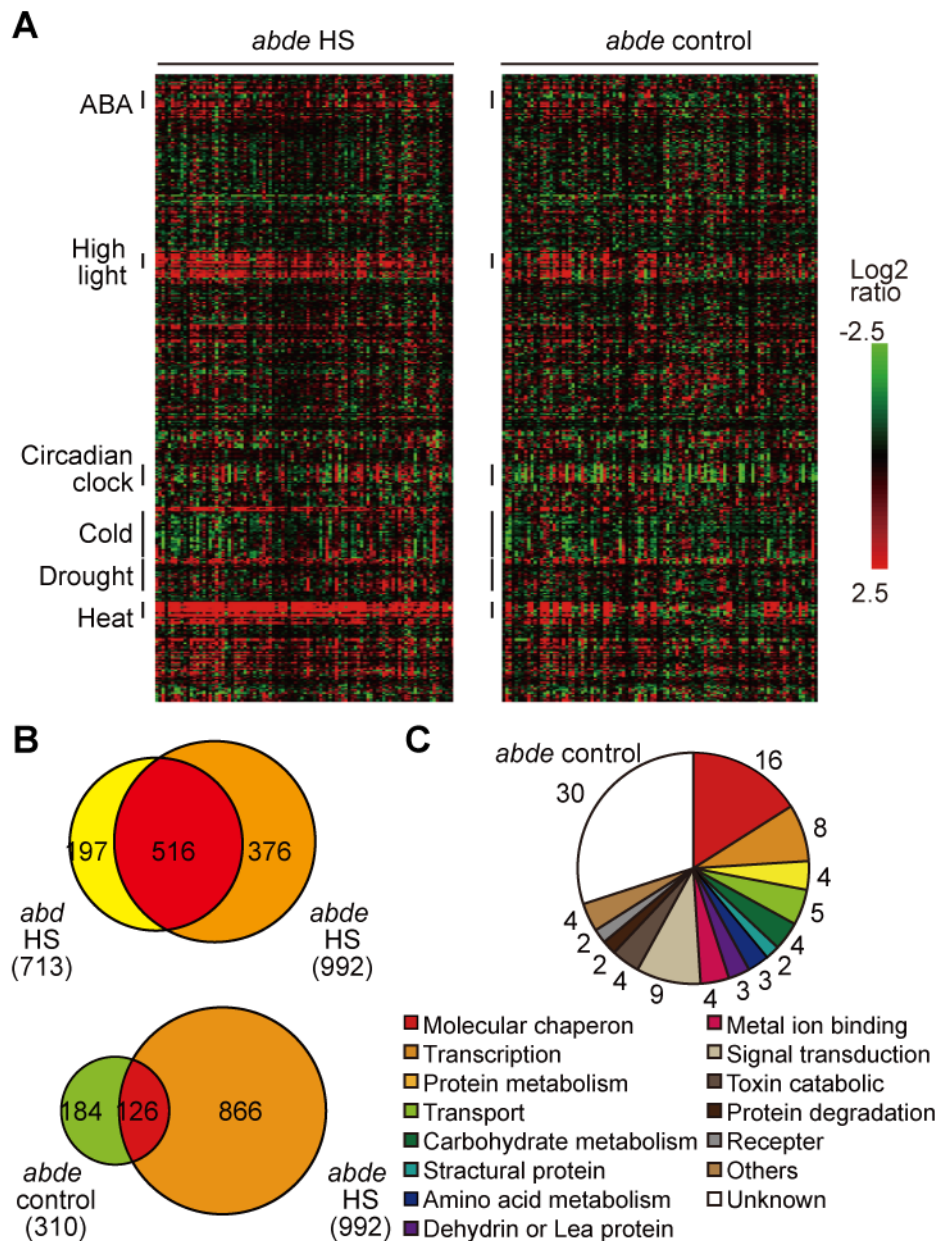


図 17. *hsf1a/b/d/e* 四重変異体のマイクロアレイ解析

(A) *hsf1a/b/d/e* 四重変異体のマイクロアレイ解析において、野生型と比較して発現量の減少幅が大きかった 100 個の遺伝子に対して、GENEVESTIGATOR (<https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp>) のプログラムを利用して、野生型植物を様々なストレス処理することで得られたマイクロアレイデータと比較してヒートマップを作製した。HS のパネルは 37°C 1 時間処理で発現が減少していた遺伝子、control のパネルは通常の生育条件下で発現が減少していた遺伝子を示している。特に ABA 処理、High

light 処理、Circadian clock、低温処理、乾燥処理、高温処理による発現を示す部分は左に明記した。赤く示されている部分はストレスにより発現が増加するもの、緑は減少するものを示している。使用した遺伝子は各マップにおいて、左から発現量の減少が大きい順に並んでいる。

- (B) マイクロアレイ解析に基づくベン図。 *hsfa1a/b/d* 三重変異体及び *hsfa1a/b/d/e* 四重変異体で 37°C1 時間処理後に野生型と比較して発現が 2 倍以上減少していた遺伝子についてベン図を作製した（上段）。 *hsfa1a/b/d/e* 四重変異体において、野生型と比較して無処理の状態で発現が 2 倍以上減少していた遺伝子と、37°C1 時間処理後に発現が 2 倍以上減少していた遺伝子についてベン図を作製した。図中の数字はその領域に含まれる遺伝子の個数を示している。
- (C) 無処理の状態で *hsfa1a/b/d/e* 四重変異体で野生型と比較して発現量の減少が大きい 100 個の遺伝子の機能を Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) 及び TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) のデータを参考に類推し円グラフで示した。円グラフの周囲には各分類に当てはまる遺伝子数を記した。

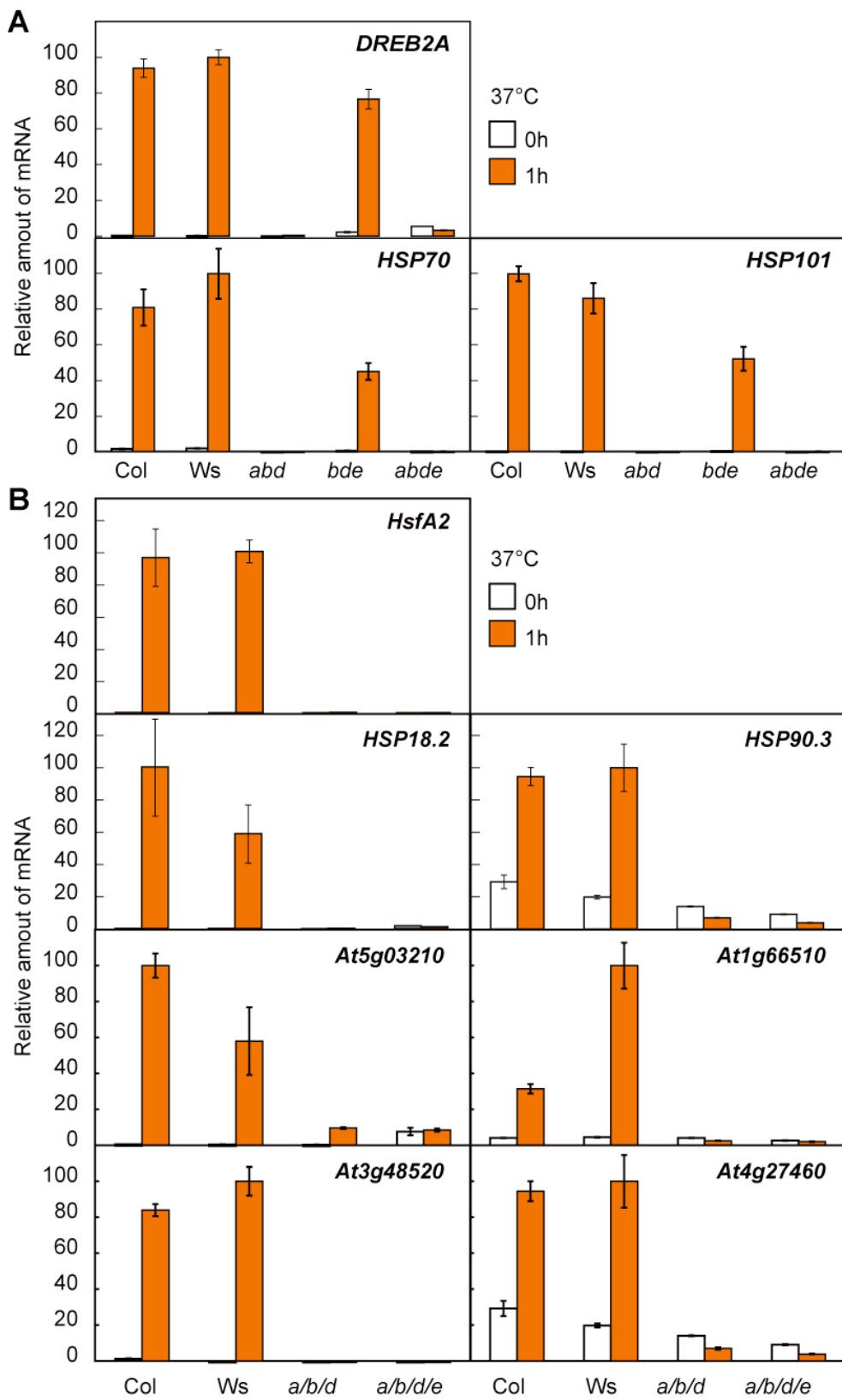


図 18. *hsfa1a/b/d/e* 四重変異体における遺伝子発現

(A) *hsfa1a/b/d/e* 四重変異体 (*a/b/d/e*) と *hsfa1b/d/e* 三重変異体 (*b/d/e*)における遺伝子発現。

(B) *hsfa1a/b/d/e* 四重変異体における遺伝子発現。

2 週間生育させた変異体及び野生型植物を 37°C で高温ストレス処理しサンプルとして使用した。発現量解析は定量的 RT-PCR で行い、各遺伝子において発現量が最大となっている値を 100 として相対値で示した。値は三回の PCR の平均値で、エラーバーは標準偏差を示した。

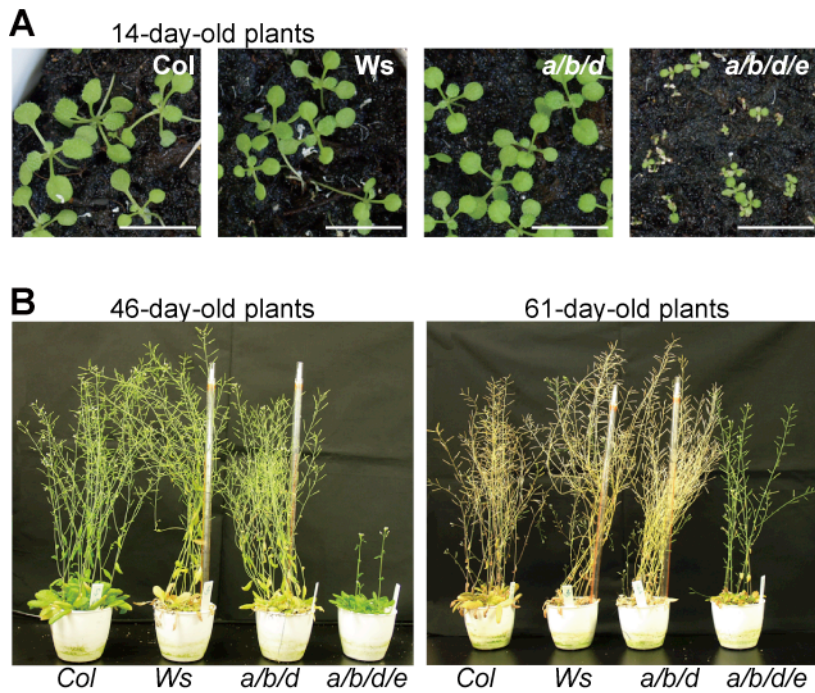


図 19. *hsf1a/b/d/e* 四重変異体の生育

hsf1a/b/d/e 四重変異体、*hsf1a/b/d* 三重変異体及び野生型を鉢植えで 22°C に調整した植物インキュベーター内で生育させ、種子が成熟するまでの過程を観察した。

(A) 播種後 2 週間生育させた変異体の写真を示した。スケールバーは 10mm を示す

(B) 播種後 46 日間生育させた写真 (左) と 61 日間生育させた写真 (右) を示した。

第五章 総合考察

本研究は、高温ストレス応答に重要な転写因子である *DREB2A* の遺伝子発現制御機構の解明を目的に開始し、高温ストレス下において *DREB2A* の発現は *HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の三遺伝子によって機能相補的に制御されていることを明らかにした。さらに、これらの三遺伝子は *DREB2A* だけでなく *HsfA2* 等の主要な因子を含む多くの高温ストレス誘導性遺伝子の発現制御を行っていることも示した。*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の三遺伝子自体は高温ストレスに対する誘導性は弱いか殆ど無く、高温ストレス応答の ON / OFF は転写レベルではなく、翻訳後の制御によってなされていると考えられた。*HsfA1b* と *HsfA1d* が HSP90 の働きによってストレスが無い状態では核への流入が抑えられ、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にした。しかし、高温ストレス応答の ON には HSF の核への流入だけでは十分でないことも示された。また、*HsfA1* サブファミリー遺伝子には、*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の他に *HsfA1e* も存在している。*HsfA1* サブファミリー遺伝子は原始的な分類群に属する種でも保存されていて、シロイヌナズナでは *HsfA1* サブファミリー遺伝子全体で通常の生育条件下における様々な遺伝子の発現調節を行っていることも明らかにした。すなわち、シロイヌナズナの *HsfA1* サブファミリー遺伝子は、四遺伝子全体で通常の生育条件下の遺伝子発現を制御しており、*HsfA1e* を除く三遺伝子で高温ストレスによる遺伝子の発現誘導の制御を行っている結論づけられる(図 20)。

これまでに高温ストレスの応答に関して、*hsfa1a/b* 二重変異体においても何らかの変化が見出されていた(Busch et al., 2005)が、この二重変異体では高温ストレス応答性遺伝子群の大部分の発現は保持されていた。本研究により *HsfA1a* と *HsfA1b* に *HsfA1d* を加えた三遺伝子が機能相補的に高温ストレス応答を制御していることが明らかになった。この三遺伝子の変異体では、*DREB2A* だけでなく高温ストレス応答に重要な機能を持つ転写因子遺伝子である *HsfA2* の誘導も起きなくなった。その他にも高温耐性獲得との関連した様々な遺伝子(Kotak et al., 2007b)が誘導されなくなることが明らかになった。相補的な機能を持つ、三遺伝子の変異体の研究により、今までわからなかった高温ストレス応答の大部分が *HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* によって制御されていることが示さ

れた。また、この三遺伝子の発現は高温ストレスによってほとんど変化しないことから、*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の三遺伝子は高温ストレス応答における転写因子カスケードの最上流に存在している可能性が示唆された。高温ストレス応答の転写カスケードはこの三遺伝子の下流に存在して、様々に分岐していると考えられる。今後の研究の展開としては、高温ストレス応答がほとんど起きなくなった *hsfa1a/b/d* 三重変異体に様々な高温ストレス応答性遺伝子を導入して、高温ストレス応答カスケードの上下関係を明確にしていくことや、耐性付与の機能の比較などが可能であろう。また、本研究により高温ストレスにおける遺伝子発現誘導の最上流に位置すると考えられる転写因子が明らかになったが、その活性化機構を明らかにするには至らなかった。今後はこの転写因子の活性化機構を解析することで、最も興味を惹かれる高温ストレスのセンサーの解明につながる研究が可能になると考えられる。その手法としては、*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* に相互作用するタンパク質の探索や、高温ストレス前後の *HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* タンパク質の修飾状態の比較などが考えられる。動物などでは HSF1 の活性制御にはリン酸化や SUMO 化そしてアセチル化が関わると報告されている (Akerfelt et al., 2010)。HsfA1 におけるこれらの修飾部位を変異させ、*hsfa1a/b/d* 三重変異体に発現させることで、タンパク質の修飾と転写因子としての活性の関連を調べることができると考えられる。植物に限らず幅広い知見を踏まえて研究を進めることで、より早く制御機構の解明につながるかもしれない。

高温ストレス応答がほとんど起きなくなった *hsfa1a/b/d* 三重変異体にもう一つの *HsfA1* サブファミリー遺伝子である *HsfA1e* の変異体を掛けあわせることで *hsfa1a/b/d/e* 四重変異体を作出した。*HsfA1* サブファミリー遺伝子の全てが機能しなくなった *hsfa1a/b/d/e* 四重変異体では、通常の生育条件下の遺伝子発現が大きく変化し、生育も大きく遅れることが明らかになった。動物の研究においては *HSF* が成長や発生に関係するという報告は見られる (Akerfelt et al., 2010)。しかし、植物においては *HSF* の異所的な過剰発現により、生育が遅れるという報告は見られるが (Ogawa et al., 2007; Yoshida et al., 2008)、変異体における生育の変化の報告はなかった。本研究での四重変異体を用いた表現型解析では、異所的な過剰発現による表現型の解析と異なり、その遺伝子の本来の働きが失われた結果を反映していると考えられるため、*HsfA1* サブファミリー

遺伝子の持つ本来の機能を解明するための重要な結果が得られたと考えられる。

hsfa1a/b/d 三重変異体においては、通常の生育条件下での遺伝子発現にはほとんど変化が見られなかったが、*hsfa1a/b/d/e* 四重変異体では多くの遺伝子の発現が変化するようになったのは、通常の生育条件におけるこれらの遺伝子の発現は *HsfA1e* だけでも十分制御できることを示している。また、これら 4 つの遺伝子が相補的に通常条件における遺伝子発現を制御していると考えられる。高温ストレス応答においては、*HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の三遺伝子で主要な機能を果たし、通常の生育条件下では *HsfA1e* も含む四遺伝子で発現制御を行っているというのは興味深い結果である。通常の生育時における *HsfA1e* の発現量は微量であることから、高温ストレス応答の開始に必要な *HsfA1* のタンパク質量と、通常の遺伝子発現維持に必要な *HsfA1* のタンパク質量の違いも、この結果を導いている一因ではないかと考えられる。遺伝子発現誘導と *HsfA1* のタンパク質量の関係に関しては今後明らかにしていきたい。

過剰発現体を使った解析や GDA を使った解析から、高温ストレス応答の開始には *HsfA1* の核への流入だけでなくそれ以外の熱依存的な活性化が必要であることが明らかになった。変異体を使った解析から、*HsfA1* は通常の生育条件下でも機能を果たしていることが明らかになったが、通常の生育条件下では熱依存的な活性化は受けないと考えられる。転写因子として機能するためには、核に存在することは必須であると考えられるため、高温ストレスが無い状態でも HSP90 による抑制から外れることはできる可能性が考えられる。HSP90 から外れた *HsfA1* は GDA 処理下で見られたような転写活性を持つと考えられる。通常の生育条件下の遺伝子発現制御は *HsfA1* が核に流入するだけでも起きる弱い活性化の機能によって支えられているのかもしれない。しかし、通常の生育条件下で *hsfa1a/b/d/e* 四重変異体において発現が変化していた遺伝子は、そのすべてが高温ストレス下で発現が変化した遺伝子の中に含まれているわけではなかった。そのため、通常の生育条件下では、独自の活性制御がある可能性も十分考えられる。これらの解明に関しては今後の研究の発展に期待したい。

本研究を通して、シロイヌナズナの高温ストレス応答を担う転写因子の最上流が *HsfA1a*、*HsfA1b*、*HsfA1d* の三遺伝子であることが示された。これらの転写因子は恒常的に発現する遺伝子であるため、高温ストレス応答の開始にはこれらの活性化が重要であると予想される。今後高温ストレス応答機構の解明に

は、この三遺伝子の活性制御を解析することが重要になってくる。また、高温ストレスによって誘導されるもう一つの *HsfA1* である *HsfA1e* も変異させた四重変異体の解析から、*HsfA1* は高温ストレス応答だけでなく、シロイヌナズナの通常の生育においても重要であることが明らかになった。植物の成長と *HsfA1* の関係は今後非常に面白い研究に発展すると予想される。私は高温ストレス耐性を持つ作物をつくることを目指す上で、最も重要な事は、植物自身はどのように高温に対処しているかを深く理解することだと考え研究を進めてきた。長い進化の過程を経て、今の形に至った植物は、素晴らしい高温ストレス応答機構を備えており、それを解明して利用する事で始めて目的の作物を生み出すことが出来ると考えられる。本研究は、遺伝子発現制御の主役の一つである転写因子の最上流を明らかにした。これは、高温ストレスに耐性をもつ有用な作物作出に向けた大きな一歩だったと私は考える。

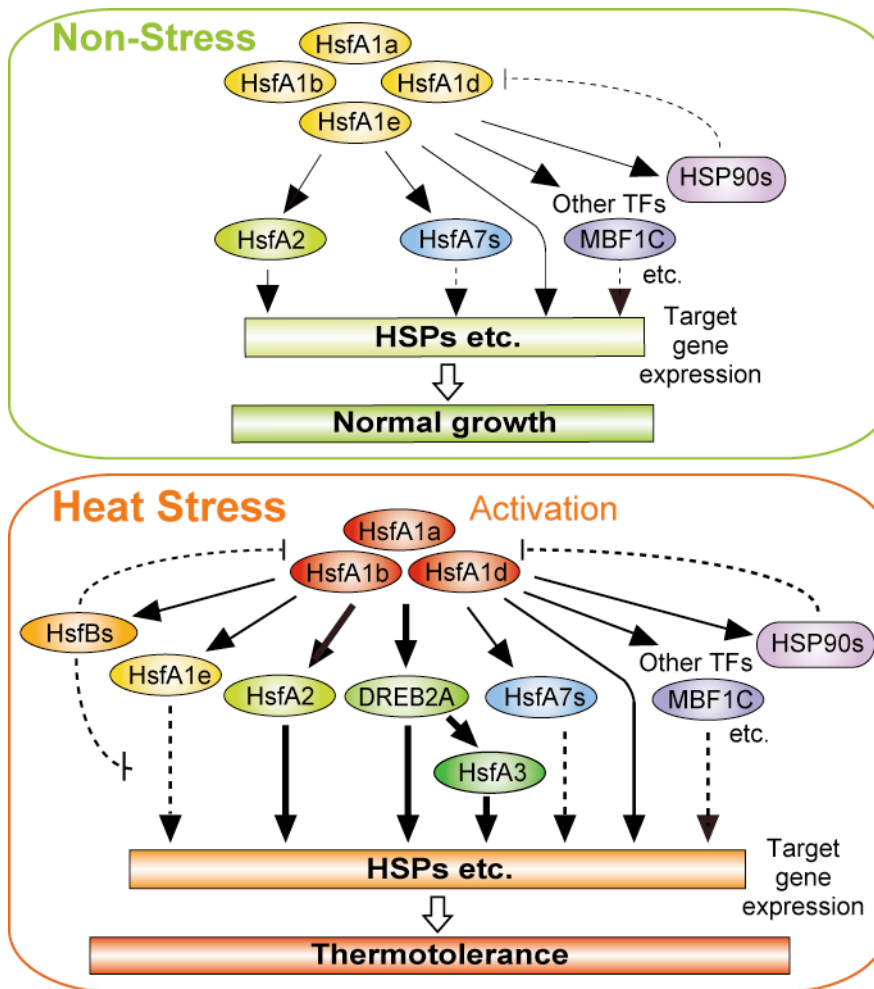


図 20. *HsfA1* サブファミリー遺伝子の機能

HsfA1 サブファミリー遺伝子の機能を示したモデル図を作製した。ストレスがない状態では、*HsfA1* サブファミリー遺伝子は通常状態における *HSP* 等の遺伝子の発現量維持に機能していると考えられる。またその機能の制御には *HSP90* が関わっている。高温ストレスをうけると *HsfA1* は何らかの活性化を受けて、高温ストレス応答性遺伝子の発現誘導を引き起こす。この時 *HsfA1e* を除く 3 つの転写因子が主要な機能を持ち、*HsfA1e* は他の *HsfA1* の働きによって誘導される。

参考文献

- Akerfelt, M., Morimoto, R., and Sistonen, L.** (2010). Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 545-555.
- Baniwal, S., Chan, K., Scharf, K., and Nover, L.** (2007). Role of heat stress transcription factor HsfA5 as specific repressor of HsfA4. *J Biol Chem* **282**, 3605-3613.
- Ben-Zvi, A., Miller, E.A., and Morimoto, R.I.** (2009). Collapse of proteostasis represents an early molecular event in *Caenorhabditis elegans* aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 14914-14919.
- Busch, W., Wunderlich, M., and Schöffl, F.** (2005). Identification of novel heat shock factor-dependent genes and biochemical pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **41**, 1-14.
- Chang, Y., Liu, H., Liu, N., Chi, W., Wang, C., Chang, S., and Wang, T.** (2007). A heat-inducible transcription factor, HsfA2, is required for extension of acquired thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **143**, 251-262.
- Chen, J., Burke, J., Velten, J., and Xin, Z.** (2006a). FtsH11 protease plays a critical role in *Arabidopsis* thermotolerance. *Plant J* **48**, 73-84.
- Chen, J., Burke, J., Xin, Z., Xu, C., and Velten, J.** (2006b). Characterization of the *Arabidopsis* thermosensitive mutant *atts02* reveals an important role for galactolipids in thermotolerance. *Plant Cell Environ* **29**, 1437-1448.
- Clough, S., and Bent, A.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735-743.
- Davletova, S., Rizhsky, L., Liang, H., Shengqiang, Z., Oliver, D., Coutu, J., Shulaev, V., Schlauch, K., and Mittler, R.** (2005). Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**, 268-281.
- Feng, S., Krueger, A.B., and Oppenheimer, M.** (2010). Linkages among climate change, crop yields and Mexico-US cross-border

- migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 14257-14262.
- Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., Maruyama, K., Parvez, M., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2005).** AREB1 Is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* **17**, 3470-3488.
- Fujita, Y., Nakashima, K., Yoshida, T., Katagiri, T., Kidokoro, S., Kanamori, N., Umezawa, T., Fujita, M., Maruyama, K., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Nakasone, S., Yamada, K., Ito, T., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009).** Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **50**, 2123-2132.
- Hellens, R., Edwards, E., Leyland, N., Bean, S., and Mullineaux, P. (2000).** pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* **42**, 819-832.
- Holmberg, C., Hietakangas, V., Mikhailov, A., Rantanen, J., Kallio, M., Meinander, A., Hellman, J., Morrice, N., MacKintosh, C., Morimoto, R., Eriksson, J., and Sistonen, L. (2001).** Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1. *EMBO J* **20**, 3800-3810.
- Ikeda, M., and Ohme-Takagi, M. (2009).** A novel group of transcriptional repressors in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **50**, 970-975.
- Ingram, J., and Bartels, D. (1996).** THE MOLECULAR BASIS OF DEHYDRATION TOLERANCE IN PLANTS. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**, 377-403.
- Jaglo-Ottosen, K.R., Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Schabenberger, O., and Thomashow, M.F. (1998).** Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* **280**, 104-106.
- Jedlicka, P., Mortin, M.A., and Wu, C. (1997).** Multiple functions of Drosophila heat shock transcription factor in vivo. *EMBO J* **16**,

2452-2462.

- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1999).** Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat Biotechnol* **17**, 287-291.
- Kim, J., To, T., Ishida, J., Morosawa, T., Kawashima, M., Matsui, A., Toyoda, T., Kimura, H., Shinozaki, K., and Seki, M. (2008).** Alterations of lysine modifications on the histone H3 N-tail under drought stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **49**, 1580-1588.
- Kotak, S., Vierling, E., Bäumlein, H., and von Koskull-Döring, P. (2007a).** A novel transcriptional cascade regulating expression of heat stress proteins during seed development of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 182-195.
- Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., von Koskull-Döring, P., Vierling, E., and Scharf, K. (2007b).** Complexity of the heat stress response in plants. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 310-316.
- Kumar, S., and Wigge, P. (2010).** H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis*. *Cell* **140**, 136-147.
- la Cour, T., Kierner, L., Mølgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., and Brunak, S. (2004).** Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* **17**, 527-536.
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1998).** Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1391-1406.
- Maruyama, K., Takeda, M., Kidokoro, S., Yamada, K., Sakuma, Y., Urano, K., Fujita, M., Yoshiwara, K., Matsukura, S., Morishita, Y., Sasaki, R., Suzuki, H., Saito, K., Shibata, D., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009).** Metabolic pathways involved in cold acclimation identified by integrated

- analysis of metabolites and transcripts regulated by DREB1A and DREB2A. *Plant Physiol* **150**, 1972-1980.
- Nakashima, K., Fujita, Y., Kanamori, N., Katagiri, T., Umezawa, T., Kidokoro, S., Maruyama, K., Yoshida, T., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2009). Three Arabidopsis SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant Cell Physiol* **50**, 1345-1363.
- Nishizawa, A., Yabuta, Y., Yoshida, E., Maruta, T., Yoshimura, K., and Shigeoka, S.** (2006). Arabidopsis heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress. *Plant J* **48**, 535-547.
- Nover, L., Bharti, K., Döring, P., Mishra, S., Ganguli, A., and Scharf, K.** (2001). Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chaperones* **6**, 177-189.
- Ogawa, D., Yamaguchi, K., and Nishiuchi, T.** (2007). High-level overexpression of the Arabidopsis HsfA2 gene confers not only increased thermotolerance but also salt/osmotic stress tolerance and enhanced callus growth. *J Exp Bot* **58**, 3373-3383.
- Petes, S., and Lis, J.** (2008). Rapid, transcription-independent loss of nucleosomes over a large chromatin domain at Hsp70 loci. *Cell* **134**, 74-84.
- Qin, F., Sakuma, Y., Tran, L., Maruyama, K., Kidokoro, S., Fujita, Y., Fujita, M., Umezawa, T., Sawano, Y., Miyazono, K., Tanokura, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2008). Arabidopsis DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. *Plant Cell* **20**, 1693-1707.
- Rabindran, S., Haroun, R., Clos, J., Wisniewski, J., and Wu, C.** (1993). Regulation of heat shock factor trimer formation: role of a conserved leucine zipper. *Science* **259**, 230-234.

- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J., Abe, H., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002).** DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 998-1009.
- Sakuma, Y., Maruyama, K., Qin, F., Osakabe, Y., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006a).** Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 18822-18827.
- Sakuma, Y., Maruyama, K., Osakabe, Y., Qin, F., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006b).** Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell* **18**, 1292-1309.
- Schramm, F., Larkindale, J., Kiehlmann, E., Ganguli, A., Englich, G., Vierling, E., and von Koskull-Döring, P. (2008).** A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of Arabidopsis. *Plant J* **53**, 264-274.
- Stockinger, E.J., Gilmour, S.J., and Thomashow, M.F. (1997).** Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1035-1040.
- Suzuki, N., Bajad, S., Shuman, J., Shulaev, V., and Mittler, R. (2008).** The transcriptional co-activator MBF1c is a key regulator of thermotolerance in Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem* **283**, 9269-9275.
- Tejedor-Cano, J., Prieto-Dapena, P., Almoguera, C., Carranco, R., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., and Jordano, J. (2010).** Loss of function of the HSFA9 seed longevity program. *Plant Cell Environ.*

- Walter, M., Chaban, C., Schütze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Näke, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K., and Kudla, J. (2004). Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* **40**, 428-438.
- Watanabe, N., and Lam, E. (2006). Arabidopsis Bax inhibitor-1 functions as an attenuator of biotic and abiotic types of cell death. *Plant J* **45**, 884-894.
- Wu, C. (1995). Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**, 441-469.
- Xiao, X., Zuo, X., Davis, A.A., McMillan, D.R., Curry, B.B., Richardson, J.A., and Benjamin, I.J. (1999). HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *EMBO J* **18**, 5943-5952.
- Xuan, Y., Zhou, S., Wang, L., Cheng, Y., and Zhao, L. (2010). Nitric oxide functions as a signal and acts upstream of AtCaM3 in thermotolerance in Arabidopsis seedlings. *Plant Physiol* **153**, 1895-1906.
- Yamada, K., and Nishimura, M. (2008). Cytosolic heat shock protein 90 regulates heat shock transcription factor in Arabidopsis thaliana. *Plant Signal Behav* **3**, 660-662.
- Yamada, K., Fukao, Y., Hayashi, M., Fukazawa, M., Suzuki, I., and Nishimura, M. (2007). Cytosolic HSP90 regulates the heat shock response that is responsible for heat acclimation in Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem* **282**, 37794-37804.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1994). A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* **6**, 251-264.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 781-803.
- Yoshida, T., Sakuma, Y., Todaka, D., Maruyama, K., Qin, F., Mizoi, J., Kidokoro, S., Fujita, Y., Shinozaki, K., and

- Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2008). Functional analysis of an Arabidopsis heat-shock transcription factor HsfA3 in the transcriptional cascade downstream of the DREB2A stress-regulatory system. *Biochem Biophys Res Commun* **368**, 515-521.
- Zhang, W., Zhou, R., Gao, Y., Zheng, S., Xu, P., Zhang, S., and Sun, D.** (2009). Molecular and genetic evidence for the key role of AtCaM3 in heat-shock signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*
- Zhu, Y., Wang, Z., Jing, Y., Wang, L., Liu, X., Liu, Y., and Deng, X.** (2009). Ectopic over-expression of BhHsf1, a heat shock factor from the resurrection plant *Boea hygrometrica*, leads to increased thermotolerance and retarded growth in transgenic *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Mol Biol* **71**, 451-467.

中島潤 (2008) シロイヌナズナの乾燥及び高温ストレス応答性転写因子遺伝子 *DREB2A* のプロモーター解析 修士論文

謝辞

本研究の推進にあたり、多大なるご指導、ご助言、また充実した研究環境を与えてくださいました東京大学大学院植物分子生理学研究室の篠崎和子教授に深く感謝いたします。ならびに、本研究にあたりご支援くださいました植物分子生理学研究室の刑部祐理子講師、溝井順哉博士、城所聡博士及び所属学生の皆様に感謝申し上げます。特に溝井順哉博士には、本論文の作成にあたり多くの丁寧かつ有益なアドバイスを頂きました。心より感謝申し上げます。また、国際農林水産業研究センターの研究員、実験技術補佐員、理化学研究所の研究員の皆様にも本研究の遂行にあたり様々な面でご協力頂きました。感謝申し上げます。

2011 年 3 月