

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 26 年度博士課程 進学
氏名 小泉慎也
指導教員 篠崎和子

論文題目

植物の熱ショック転写因子 HsfA1 を介した 高温ストレス応答性伸長成長の解析

序論

植物は移動の自由を持たないため、環境ストレスに対する適応機構を発達させてきた。環境ストレスの中でも、高温は植物の生育に大きな影響を与えるストレスの一つであり、農業現場においても作物の高温ストレス対策は重要な課題になっている

植物の高温ストレスに対する適応戦略として

(1) 高温ストレス耐性遺伝子を活性化させて高温ストレス耐性を増強する
(2) 植物体の形態や成長を調節することにより高温環境に適した形態に変化する
という 2 種類の戦略が考えられる。これまでに、(1) の戦略の制御機構については盛んに解析が行われてきたのに対し、(2) の戦略についてはほとんど注目されてこなかった。しかし、高温環境に適応し、高い生産性を示す品種を作り出すためには、高温ストレス環境下に置かれても正常に生育する頑強さを付与することが必要である。そのためには、従来研究されてきた高温ストレス耐性に加え、高温ストレス下に置かれた植物の生理的、形態的な応答機構も含めた、植物の高温ストレス応答の総合的な理解が重要であると考えられる。

シロイヌナズナにおいて、HsfA1a、HsfA1b、HsfA1d の 3 つの HSF 型転写因子は高温ストレス応答のマスター転写因子として機能する。これらの HsfA1 を欠損した *hsf1abd* 三重

変異体では高温ストレス耐性遺伝子の発現が起こらず、顕著に高温耐性が低下する。そのため、HsfA1 を介した転写制御機構は（１）の戦略に必須である。しかし、HsfA1 を起点とするシグナル伝達経路が（２）で述べた成長の制御にも関与しているかは明らかにされていない。

本研究は、HsfA1 が高温ストレス下における成長の制御にも関与しているか検証するとともに、HsfA1 シグナル伝達経路の下流で機能する成長制御因子の分子実体の解明を目的とした。*hsfalabd* 三重変異体を用いた生理学的実験および先行研究で行われたトランスクリプトーム解析結果を用いて、高温ストレス時に HsfA1 の下流で機能する成長制御因子の同定を試みた。次に同定した成長制御因子を遺伝学的、細胞生物学的に解析することで、高温によって誘起される植物の形態変化の詳細な分子メカニズムの解明を試みた。

1. HsfA1 は高温ストレス応答性の伸長成長に重要である

高温環境下に置かれた植物では、胚軸や葉柄の伸長成長が起こることが報告されている。高温応答性の伸長成長への HsfA1 の関与を検証するために、高温ストレス下における野生型植物と *hsfalabd* 三重変異体の胚軸長、最大ロゼット半径を測定した。野生型植物では先行研究と同様に、胚軸およびロゼット半径の増大が確認された。一方で、*hsfalabd* 三重変異体ではそのような伸長応答が失われていることが明らかになった。以上のことから、シロイヌナズナの HsfA1 は高温ストレス耐性の獲得に加えて、高温ストレス下における植物の成長制御にも関与していることが示唆された。

2. HsfA1 は非典型的な HSE を介してジベレリン合成酵素遺伝子 *GA3ox1* を制御する

先行研究で同定された HsfA1 下流遺伝子群の中から、植物の成長に関与すると予想される遺伝子を調べ、ジベレリン合成酵素をコードする *GA3ox1* を候補遺伝子として選抜した。*GA3ox1* の高温ストレス応答性の遺伝子発現を解析すると、*GA3ox1* は高温ストレスによって遺伝子発現が誘導され、その発現誘導は HsfA1 依存的であることが明らかになった。

GA3ox1 の転写制御に重要な領域を特定するために、シロイヌナズナと近縁なアブラナ科植物における *GA3ox1* のプロモーター配列を取得し、プロモーターの配列比較を行った。比較解析の結果、*GA3ox1* 遺伝子プロモーター領域には近縁種間で保存度の高い領域が存在することが明らかになった。プロトプラストを用いた転写活性化実験を行った結果、HsfA1a を介した *GA3ox1* の転写活性化にはこの近縁種間で保存された領域が必要であるこ

とが示唆された。HSF 型転写因子は標的遺伝子のプロモーターに存在する HSE 配列 ((nTTCn)(nGAA))を介して遺伝子発現を調節するが、上記の保存領域には典型的な HSE 配列を見出すことはできなかった。データベースに基づいて相同性配列を探索すると、同定された保存領域中には HSE と部分的に類似した配列が含まれることが示された。転写活性化実験により、HsfA1a を介した *GA3ox1* の転写活性化には、同定した HSE 様配列が重要であることが示された。

3. HsfA1 は高温ストレス応答性のジベレリン量の制御とそれに続く DELLA タンパク質の分解に必要である

HsfA1 は *GA3ox1* の転写制御を介し、内生ジベレリンの量を調節することで植物体の成長を制御している可能性が考えられた。そこで、Col および Ws の野生型植物と *hsfalabd* 三重変異体について、高温ストレスが内生ジベレリン量に対して与える影響を超高速液体クロマトグラフタンデム質量分析装置によって解析した。その結果、野生型植物では高温ストレス処理によって内生ジベレリン量が増加することが示された。一方、この高温応答性のジベレリン増加は *hsfalabd* 三重変異体では確認できなかった。

ジベレリンシグナルの主要な抑制因子である DELLA ファミリーに属するタンパク質は、内生ジベレリンの増加に応じて分解されることが知られている。高温ストレスによる内生ジベレリンの蓄積が、実際に伸長が起こる部位で起きているかを明らかにするために、DELLA ファミリーの一員である RGA タンパク質の胚軸における蓄積量を解析した。RGA プロモーター制御下で GFP 融合 RGA タンパク質を発現する形質転換体 (*pRGA:GFP-RGA/Col*) および、*hsfalabd* 三重変異体の遺伝学的背景で GFP-RGA を発現する形質転換体 (*pRGA:GFP-RGA/hsfalabd*) を作出し、胚軸における GFP-RGA の蓄積を GFP 蛍光として観察した。22°C ではどちらの植物の胚軸においても GFP-RGA の蛍光が観察された。高温ストレス処理を行うと、*pRGA:GFP-RGA/Col* では GFP-RGA の蛍光が減衰した。一方で、*pRGA:GFP-RGA/hsfalabd* の胚軸においては高温ストレス処理後も GFP-RGA の蛍光が明瞭に観察できた。以上のことから、HsfA1 は高温ストレスに応答した内生ジベレリン量の増加および、それに続く DELLA タンパク質の分解に重要であることが示唆された。

4. ジベレリン関連変異体の高温ストレス耐性の評価

ジベレリンの高温ストレス耐性に対する影響を評価するために、ジベレリン合成変異体およびジベレリンシグナル伝達変異体を用いて高温耐性試験を行った。ジベレリン合成変

異体として *ga3ox1-3*、ジベレリンシグナル変異体として *della* 五重変異体を用いた。*della* 五重変異体はジベレリンシグナルの抑制因子をコードする *RGA* とその相同遺伝子である *GAI*、*RGL1*、*RGL2*、*RGL3* が欠損した変異体であるため、ジベレリンシグナルが常時亢進している変異体である。実験の結果、ジベレリン合成変異体 *ga3ox1-3* が、野生型植物と比較してわずかに高い高温ストレス感受性を示した。一方で、ジベレリンシグナル変異体である *della* 五重変異体は高い高温ストレス耐性を示した。

この結果は（１）ジベレリンシグナルが高温耐性遺伝子の発現を活性化することで耐性に影響した、（２）ジベレリンシグナルが正常に機能せず、植物の成長制御機構が攪乱された結果見かけの生存率が向上した、という２つの解釈が考えられる。これを検証するために、高温ストレス時特異的にジベレリンシグナルを遮断できる形質転換体 (*pHS:rga-D-sGFP*) を用いて同様の実験を行った。もし、ジベレリンが高温ストレス下における耐性遺伝子の発現を制御しているならば、*pHS:rga-D-sGFP* は高温ストレス感受性を示すはずである。一方で、ジベレリンによって制御される植物体の形態や細胞分裂活性などが高温ストレス耐性の向上の原因ならば、*pHS:rga-D-sGFP* はベクター対照と同様の高温ストレス耐性を示すはずである。実験の結果、形質転換体の高温耐性はベクター対照植物と有意な変化は認められなかった。この結果と変異体の耐性試験の結果と合わせて考えると、ジベレリンは植物の高温ストレス耐性に正に寄与している可能性があるが、その耐性向上のメカニズムは従来知られている耐性遺伝子の活性化とは異なると考えられた。

総括

一連の実験の結果、HsfA1 は高温耐性に関わる遺伝子群の活性化に加えて、高温ストレス下における成長の制御にも関わることを示した。さらに、これは HsfA1 が高温ストレスに応答した活性型ジベレリンの増加、並びにそれに続くジベレリンシグナルの活性化にも必要であるためであることを見出した。また、変異体や形質転換体を用いてジベレリンシグナルの高温ストレス耐性への関与を検証した結果、ジベレリンは高温ストレス耐性を正に制御していることを明らかにした。本研究は、HSF を介した転写ネットワークに新たな知見を加えるとともに、ジベレリンを介した高温ストレス環境への新規な適応機構の存在を示唆するものと考えられる。