

審査の結果の要旨

氏名 小泉 慎也

シロイヌナズナでは 3 つの熱ショック転写因子 HsfA1a、HsfA1b、HsfA1d が高温ストレス応答のマスター転写因子として機能していることが先行研究で報告されている。これら 3 つの熱ショック転写因子は、シロイヌナズナが高温ストレス環境に適応するのに必須な機能を担っている。

しかし高温環境は植物にとってストレスとして機能する一方で、胚軸や葉柄の伸長を促進する効果があることも知られている。このような温度に応答した形態的な変化は、温度形態形成と呼ばれているが、その分子メカニズムには不明な点が多い。そこで本研究では、高温ストレス耐性獲得の鍵因子である 3 つの HsfA1 の、温度に応答した伸長成長への関与を検証することを目的として研究を行った。

まず生育温度と HsfA1 の下流遺伝子の発現量の関係を解析し、生育温度と HsfA1 の下流遺伝子の発現量に正の相関があることを示した。さらに温度に応答した発現量の増加が 35°C 付近で鈍ることも見出し、35°C 近傍で HsfA1 が十分に活性化することを見出した。次に野生型植物と *hsfa1abd* 三重変異体に 35°C で高温処理を行い、高温に応答した胚軸と葉柄の伸長を観察した。実験の結果、野生型植物では高温処理によって胚軸および葉柄の伸長が観察されたが、*hsfa1abd* 三重変異体では高温に応答した胚軸および葉柄の伸長応答が失われていることが明らかになった。

これらの結果から HsfA1 の下流標的の中に、高温に応答した伸長成長を制御している因子が存在することが予想された。先行研究で行われたマイクロアレイ解析を基に、HsfA1 の下流で機能する成長制御因子を探索した結果、ジベレリンの 3 位の酸化酵素をコードする遺伝子、*GA 3-oxidase 1 (GA3ox1)* が候補として見つかった。遺伝子発現解析および変異体を用いた解析から、(1) *GA3ox1* が HsfA1 依存的に高温処理によって誘導される遺伝子であること、(2) *GA3ox1* の機能欠損変異体である *ga3ox1-3* 変異体では高温処理に応答した胚軸の伸長が抑制されていることが明らかになった。また *GA3ox1* のプロモーター解析の結果より、HsfA1 は非典型的な HSE 配列を介して *GA3ox1* の転写を制御していることが示唆された。

HsfA1 とジベレリンの関係をより詳細に解析するために、高温に応答した内

生ジベレリン量の変動を解析した。野生型植物と *hsfa1abd* 三重変異体に高温ストレス処理を 4 時間行い、植物体における活性型ジベレリン GA₄ の量を超高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計によって測定した。その結果、野生型植物では高温ストレス処理に応答した活性型ジベレリン量の増加が観察された。しかし *hsfa1abd* 三重変異体においては、高温ストレス処理に応答したジベレリン量の増加は確認できなかった。

この結果をさらに検証するために、栄養成長期におけるジベレリンシグナル伝達の重要な因子である RGA と GFP の融合タンパク質を発現する形質転換植物を作出した。RGA は細胞内のジベレリン量の増加に応答して分解される転写調節因子であることが知られている。そのため GFP-RGA は内生ジベレリン量の変化を検出可能な、一種のジベレリンセンサーとして広く用いられている。野生型、*hsfa1abd* 三重変異体の各遺伝学的背景で GFP-RGA を発現する植物を用いて、胚軸における GFP 蛍光の観察を行った。観察の結果、野生型植物の胚軸では、GFP-RGA の蛍光が高温ストレス処理によって減衰する一方で、*hsfa1abd* 三重変異体ではそのような GFP 蛍光の減衰は確認できなかった。以上の結果より、HsfA1 が高温に応答したジベレリン量の調節と、ジベレリンシグナルの活性化に必要であることが示唆された。

GA3ox1 を介したシグナル伝達経路が、どのような遺伝子の発現調節を経て植物体の成長を制御しているのかを明らかにするために、高温ストレス処理後の野生型植物および *ga3ox1-3* 変異体を用いて、マイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイ解析の結果から、*ga3ox1-3* 変異体で発現が低下している遺伝子群にはオーキシン関連の遺伝子群が複数含まれることが明らかになった。マイクロアレイ実験により、発現の低下が認められた複数のオーキシン関連の遺伝子について、野生型植物、*ga3ox1-3* 変異体、*hsfa1abd* 三重変異体における遺伝子発現量を定量的 RT-PCR 法により解析した。その結果、高温ストレス下におけるオーキシン関連の遺伝子の発現量が、*ga3ox1-3* 変異体に加え *hsfa1abd* 三重変異体においても低下していることが明らかになった。

ジベレリンが高温ストレス耐性の獲得に関与しているかを検証するために、ジベレリン変異体の高温耐性を評価した。ジベレリン合成の変異体である *ga3ox1-3*、ジベレリンシグナルの変異体 *della* 五重変異体を用いて、耐性試験を行ったところ、植物体の高温耐性獲得に対して、ジベレリンシグナルが正に機能することを示唆する結果が得られた。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。