

博士論文（要約）

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

応用生命化学専攻 植物分子生理学研究室

平成 26 年度入学 小泉 慎也

指導教員 篠崎 和子

目次

略語一覧	4
図表一覧	6
研究の背景	8
研究の目的	12
材料と方法	13
1. 植物材料と生育条件	
2. 高温ストレス処理	
3. RNA の抽出	
4. two-step RT-PCR 法による遺伝子発現解析	
5. 植物形質転換用プラスミドの作製	
6. 形質転換シロイヌナズナの作出	
7. GUS 染色による組織局在解析	
8. 共焦点レーザー顕微鏡による GFP 蛍光の検出	
9. 葉肉細胞由来プロトプラストを用いた一過的発現実験	
10. プロモーターの系統解析とデータベースを利用したシス配列の探索	
11. マイクロアレイ解析	
12. 超高速液体クロマトグラフタンデム質量分析装置を用いたジベレリンの定量	
結果	25
1. 温度依存的な HsfA1 の下流遺伝子の発現解析	
2. <i>hsfa1</i> 三重変異体の高温ストレス下での成長解析	
3. ジベレリン合成酵素遺伝子の高温ストレス下での発現解析	

4. *GA3ox1* プロモーターの構造解析
5. 一過的発現系を用いた HsfA1a の *GA3ox1* プロモーターに対する影響の評価
6. ジベレリン合成酵素遺伝子欠損変異体の高温ストレス下での胚軸伸長の解析
7. *ga3ox1-3* 変異体に *GA3ox1* ゲノム DNA 断片を相補した形質転換体の解析
8. 高温ストレス下における内生ジベレリン量の解析
9. GFP-RGA 発現シロイヌナズナを用いた高温ストレス下における RGA タンパク質の蓄積の解析
10. 高温誘導性プロモーター制御下で優勢阻害型 RGA を発現する形質転換体の作出と表現型の解析
11. *ga3ox1-3* 変異体を用いたトランスクリプトーム解析
12. GA 関連変異体を用いた高温耐性試験

考察	40
総合考察	48
図と表	51
参考文献	90
謝辞	99

略語一覽

ARF	AUXIN RESPONSE FACTOR
BZR	BRASSINAZOLE RESISTANT
CaMV	Cauliflower mosaic virus
CBF	C-REPEAT BINDING FACTOR
CDS	Coding sequence
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
Cy3	Cyanine3 cytosine triphosphate
Cy5	Cyanine5 cytosine triphosphate
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DREB	DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN
DRO	DEEPER ROOT
ELUC	Emerald luciferase
ERF	ETHYLENE RESPONSE FACTOR
GA	Gibberellic acid
GA20ox	GA 20-oxidase
GA2ox	GA 2-oxidase
GA3ox	GA 3-oxidase
GAI	GA INSENSITIVE
GAMT	GA METHYLTRANSFERASE
GGDP	Geranylgeranyl diphosphate
GM	Germination medium
GUS	β -glucuronidase
HSE	Heat shock element
HSF	Heat shock transcription factor
HSP	Heat shock protein
LB	Lysogeny broth
MBF	MULTIPROTEIN BRIDGING FACTOR
miRNA	microRNA

Nos	Nopaline synthase
PCR	Polymerase chain reaction
PIF	PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR
RGA	REPRESSOR OF <i>gal</i>
RGL	RGA-LIKE
RT-PCR	Reverse transcription-PCR
SAUR	SMALL AUXIN UPREGULATED RNA
SCL	SCARECROW-LIKE
sGFP	Synthetic green-fluorescent protein
STRE	Stress responsive element

図表一覧

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるために公表できない。
5年以内に出版予定。

研究の背景

人口の爆発的増加が叫ばれて久しい。2011年には世界人口は70億人を越え、今後も増加し続ける見通しである。国連の推計（世界の推計人口：<http://www.un.org/en/development/desa/population/>）によれば世界人口は2050年には90億に達するとされている。こうした莫大な人口を支える食糧の確保は喫緊の課題であり、来るべき食糧問題を解決するためにはテクノロジーを駆使した食糧生産性の向上が不可欠である。

食糧の生産性は、基本的に単位面積あたりの収量と、耕作可能な土地の面積という二つのパラメーターの積で決定される。1940年代から1960年代にかけて起こった緑の革命では、高収量品種の確立によって単位面積当たりの収量が向上したことで、食糧生産性が大きく向上した。しかし、こうした高収量品種の栽培には、適切に管理された土壌に加え、大量の化学肥料と水が必要であり、地球上で栽培可能な地域は限られる。ではもう一つのパラメーター、耕地面積を増やすにはどうしたらよいだろうか。その方法の一つとして、不良な環境でも生育可能な作物品種を開発することが挙げられる。不良土壌や過酷な環境においても生育可能な環境ストレス耐性作物を開発できれば、耕作可能な土地が大きく広がり、食糧の増産につながると期待できる。これまでも植物への環境ストレス耐性の付与は試みられてきたが、中でも植物が元来有する遺伝子資源を活用した分子育種は有望なアプローチであると考えられている (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006; Shi et al., 2016)。

植物は動くことが出来ないため、環境から受ける様々なストレスに柔軟に、そして複雑に対応していることがこれまでの研究で明らかにされている。低温や乾燥、高塩、高温などの非生物的な環境ストレスにさらされると、これらのストレスへの耐性に関与する多数の遺伝子の発現が誘導される (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006; Kotak et al., 2007)。こうしたストレス関連遺伝子の発現制御は、耐性遺伝子のプロモーター上のシス因子と、それに結合する転写因子が担っている。転写因子やその活性制御系の機構を解析することにより、植物の環境ストレス適応機構の詳細が明らかになりつつある。地球規模で進行している温暖化や、それに伴う異常気象に対処するためにも、高温ストレス耐性に関わる転写因子の制御系や、生理機能を明らかにする

ことの重要性は今後ますます高まっていくと考えられる。

生物の生育至適温度から離れた高温は、生体タンパク質の熱変性を引き起こす。このとき植物を含む真核生物では、熱ショックタンパク質(Heat shock protein; HSP)と称される一群のタンパク質の合成が誘導される。HSP は分子シャペロンとして機能し、変性タンパク質を認識して立体構造を修復する。この HSP を介したタンパク質の恒常性の維持は、高温ストレス下での細胞の機能維持に重要である。高温ストレスに応答した HSP の発現誘導に関連する転写因子の中で、特に重要なものとして heat shock transcription factor (HSF) が存在する。HSF は三量体として機能し、シス配列である heat shock element (HSE; (nGAAn)(nTTCn)又は(nTTCn)(nGAAn)) への結合を介して、HSP を初めとする多くの高温誘導性遺伝子を制御している (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、真核生物全般において広く保存されている (Åkerfelt et al., 2010) 。

シロイヌナズナのゲノム中には 21 遺伝子の HSF がコードされており、これは酵母の 1 遺伝子、ヒトの 3 遺伝子に比べてきわめて多い (Fujimoto and Nakai, 2010; Baniwal et al., 2004)。植物の高温ストレス応答では、多数の HSF とその下流の転写因子の遺伝子発現が高温ストレスの強度や期間に応じて調節され、動物や酵母よりも複雑な転写ネットワークが構成されていると示唆されている (Baniwal et al., 2004)。21 の HSF の中でも、特に HsfA1a、HsfA1b、HsfA1d の 3 つ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とが明らかになっており、これら 3 つの HsfA1 が欠損した植物は顕著な高温感受性を示す (Yoshida et al. 2011; Liu et al., 2011)。植物が高温ストレスを感じると 3 つの HsfA1 が活性化され、HSP や下流の転写因子である DREB2A、HsfA2、HsfB、MBF1C などの遺伝子発現が誘導される。これらの高温ストレス誘導性の転写因子は、HSP 等の耐性遺伝子の発現を誘導または抑制し、環境に応じた適切な転写応答を可能にすると考えられている (Ohama et al., 2016)。

HSFを介したHSPの発現誘導は動植物で共通した仕組みである。しかし、このように多数のHSFと転写因子を介して形成される複雑な転写カスケードは、動物には見出されない。この事実から、高温ストレス環境で生き残るために固着性生物である植物は、動物とは異なった転写ネットワークを進化させてきたことが予想される。実際、高温は

細胞内を構成するタンパク質の熱変性を引き起こす一方で、環境からのシグナルとしても機能し、さまざまな生理的および形態的な変化を植物に引き起こすことが知られている (Quint et al., 2016)。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が必要であると考えられる。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て、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ことが予想される。そこで本研究ではモデル植物であるシロイヌナズナを用いて、高温ストレス下に置かれた植物の形態的变化に着目し、その分子遺伝学的解析を行うことにした。

非致命的な高温環境下で生育させたシロイヌナズナでは、胚軸や葉柄の伸長、葉柄の下偏生長、花成の早期化が起こることが報告されている (Quint et al., 2016)。このように、外気温の上昇に応じた伸長を伴う形態的な変化は **Thermomorphogenesis** (以下温度形態形成と訳す) と称される。近年、温度形態形成についての遺伝学的な解析が精力的に進められ、その分子的な実体についての理解が深まってきている。Koiniらは温度形態形成の過程で見られる胚軸や葉柄の伸長という現象が、暗所下に置かれた植物が示す **photomorphogenesis** (光形態形成) と類似していることから、光形態形成で重要な転写因子 **PIF4** (**Phytochrome interacting factor 4**) に着目し、**PIF4** が温度形態形成で重要な機能を担っていることを示した (Koini et al., 2009)。これを端緒として **PIF4** の下流因子の研究が進められた。その結果、植物が 28°C 付近の温度帯にさらされると、**PIF4** の遺伝子発現が誘導され、オーキシシン合成酵素である **YUCCA8** の転写活性化を介してオーキシシン合成を促進し、伸長生長を制御することが示されている (Sun et al., 2012)。

また Kumar と Wigge は温度センサーの同定を目的として、温度形態形成を恒常的に起こす変異体を順遺伝学的に単離した。彼らが単離した変異体の原因遺伝子は、**SWR1** 複合体のサブユニットをコードする **ARP6** (**Actin-related protein 6**) であった。**SWR1** 複合体はヌクレオソームを構成するヒストン八量体を認識し、ヒストン **H2A** をそのバリエーションである **H2A.Z** と交換する機能を持つ。ヌクレオソームに **H2A.Z** が組み込まれると、ヌクレオソームの構造が変化するため、転写因子の **DNA** 結合性に大きく影響

することが知られている (Zhang et al., 2015)。Kumar と Wigge は、*arp6* 変異体ではヌクレオソームにおける H2A.Z の割合が低下していること、さらに非致死的な温度上昇により発現誘導される遺伝子のプロモーターから H2A.Z が除去されることを報告した (Kumar and Wigge, 2010)。また H2A.Z の変異体である *hta9 hta11* 二重変異体は、*arp6* 変異体と同様に胚軸や葉柄が伸長する表現型を示すことから、H2A.Z は温度形態形成を負に制御していることが示された (Kumar and Wigge, 2010)。これらの伸長を伴う形態変化によって葉面温度が低下するというモデルも提唱されており (Bridge et al., 2013)、植物は自身の形態を変化させることで外気温の上昇に適応していると考えられる。

これまで述べてきた HSF を介した高温ストレス応答と、PIF4 や H2A.Z を介する非致死的な高温で起こる伸長応答はそれぞれ独立に研究が進められてきた。そのため高温ストレス耐性に関わる HSF が、ストレス下での伸長生長においてどのような機能を担っているかについてはほとんど知見が無い。そこで本研究では高温ストレス応答のマスター転写因子である 3 つの HsfA1 に注目し、HsfA1 の高温依存的な伸長生長における役割を明らかにすることを目的とした。先行研究で単離された 3 つの HsfA1 を欠損した *hsfalabd* 三重変異体を用いて生理学的、遺伝学的解析を行うことで、温度依存的な伸長生長への HsfA1 の関与を検証し、さらに HsfA1 による制御機構を解析した。

研究の目的

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるために公表できない。5年以内に出版予定。

材料と方法

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるために公表できない。5年以内に出版予定。

結果

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるために公表できない。5年以内に出版予定。

考察

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるために公表できない。5年以内に出版予定。

総合考察

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるために公表できない。5年以内に出版予定。

参考文献

- Achard, P., Gong, F., Cheminant, S., Alioua, M., Hedden, P., and Genschik, P.** (2008). The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. *Plant Cell* **20**: 2117–29.
- Adrian, J., Farrona, S., Reimer, J.J., Albani, M.C., Coupland, G., and Turck, F.** (2010). cis-Regulatory elements and chromatin state coordinately control temporal and spatial expression of FLOWERING LOCUS T in Arabidopsis. *Plant Cell* **22**: 1425–1440.
- Arana, M.V., Marín-de la Rosa, N., Maloof, J.N., Blázquez, M.A., and Alabadí, D.** (2011). Circadian oscillation of gibberellin signaling in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 9292–7.
- Ariizumi, T., Lawrence, P.K., and Steber, C.M.** (2011). The role of two f-box proteins, SLEEPY1 and SNEEZY, in Arabidopsis gibberellin signaling. *Plant Physiol.* **155**: 765–75.
- Balasubramanian, S., Sureshkumar, S., Lempe, J., and Weigel, D.** (2006). Potent induction of Arabidopsis thaliana flowering by elevated growth temperature. *PLoS Genet.* **2**: 0980–0989.
- Baniwal, S.K. et al.** (2004). Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J. Biosci.* **29**: 471–487.
- Boffelli, D., McAuliffe, J., Ovcharenko, D., Lewis, K.D., Ovcharenko, I., Pachter, L., and Rubin, E.M.** (2003). Phylogenetic shadowing of primate sequences to find functional regions of the human genome. *Science* (80-.). **299**: 1391–1394.
- Bridge, L.J. et al.** (2013). Impact of plant shoot architecture on leaf cooling: a coupled heat and mass transfer model. *J. R. Soc. Interface* **10**: 20130326.
- Brunoud, G., Wells, D.M., Oliva, M., Larrieu, A., Mirabet, V., Burrow, A.H., Beekman, T., Kepinski, S., Traas, J., Bennett, M.J., and Vernoux, T.** (2012). A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution. *Nature* **482**: 103–6.
- Cao, D., Cheng, H., Wu, W., Soo, H.M., and Peng, J.** (2006). Gibberellin mobilizes

- distinct DELLA-dependent transcriptomes to regulate seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **142**: 509–525.
- Chang, W.-C., Lee, T.-Y., Huang, H.-D., Huang, H.-Y., and Pan, R.-L.** (2008). PlantPAN: Plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups. *BMC Genomics* **9**: 561.
- Cheng, Y., Dai, X., and Zhao, Y.** (2006). Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **20**: 1790–9.
- Chow, C.N., Zheng, H.Q., Wu, N.Y., Chien, C.H., Huang, H. Da, Lee, T.Y., Chiang-Hsieh, Y.F., Hou, P.F., Yang, T.Y., and Chang, W.C.** (2016). PlantPAN 2.0: An update of Plant Promoter Analysis Navigator for reconstructing transcriptional regulatory networks in plants. *Nucleic Acids Res.* **44**: 1154–1164.
- Claeys, H., Skirycz, A., Maleux, K., and Inzé, D.** (2012). DELLA signaling mediates stress-induced cell differentiation in *Arabidopsis* leaves through modulation of anaphase-promoting complex/cyclosome activity. *Plant Physiol.* **159**: 739–47.
- Clough, S.J. and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**: 735–43.
- Colebrook, E.H., Thomas, S.G., Phillips, A.L., and Hedden, P.** (2014). The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *J. Exp. Biol.* **217**: 67–75.
- Devlin, P.F., Robson, P.R., Patel, S.R., Goosey, L., Sharrock, R.A., and Whitelam, G.C.** (1999). Phytochrome D acts in the shade-avoidance syndrome in *Arabidopsis* by controlling elongation growth and flowering time. *Plant Physiol.* **119**: 909–15.
- Dill, A., Jung, H.S., and Sun, T.P.** (2001). The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 14162–7.
- Duan, L., Dietrich, D., Ng, C.H., Chan, P.M.Y., Bhalerao, R., Bennett, M.J., and Dinneny, J.R.** (2013). Endodermal ABA signaling promotes lateral root quiescence during salt stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell* **25**: 324–41.
- Feng, S. et al.** (2008). Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* **451**: 475–9.
- Feng, Z. et al.** (2014). Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and

- patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: 4632–7.
- Fujimoto, M. and Nakai, A.** (2010). The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress. *FEBS J.* **277**: 4112–4125.
- Fujita, Y. et al.** (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.
- Galvão, V.C., Horrer, D., Küttner, F., and Schmid, M.** (2012). Spatial control of flowering by DELLA proteins in Arabidopsis thaliana. *Development* **139**: 4072–82.
- Geng, Y., Wu, R., Wee, C.W., Xie, F., Wei, X., Chan, P.M.Y., Tham, C., Duan, L., and Dinneny, J.R.** (2013). A spatio-temporal understanding of growth regulation during the salt stress response in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 2132–54.
- Guo, L., Chen, S., Liu, K., Liu, Y., Ni, L., Zhang, K., and Zhang, L.** (2008). Isolation of heat shock factor HsfA1a-binding sites in vivo revealed variations of heat shock elements in Arabidopsis Thaliana. *Plant Cell Physiol.* **49**: 1306–1315.
- Halliday, K.J. and Whitelam, G.C.** (2003). Changes in Photoperiod or Temperature Alter the Functional Relationships between Phytochromes and Reveal Roles for phyD and phyE 1. *Plant Physiol.* **131**: 1913–1920.
- Hauser, F., Chen, W., Deinlein, U., Chang, K., Ossowski, S., Fitz, J., Hannon, G.J., and Schroeder, J.I.** (2013). A genomic-scale artificial microRNA library as a tool to investigate the functionally redundant gene space in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 2848–63.
- Hellens, R.P., Edwards, E. a, Leyland, N.R., Bean, S., and Mullineaux, P.M.** (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* **42**: 819–32.
- Hieno, A. et al.** (2014). Ppdb: Plant promoter database version 3.0. *Nucleic Acids Res.* **42**: 1188–1192.
- Higashi, Y. et al.** (2013). HsfA1d, a protein identified via FOX hunting using *Thellungiella salsuginea* cDNAs improves heat tolerance by regulating heat-stress-responsive gene expression. *Mol. Plant* **6**: 411–22.
- Hisamatsu, T., King, R.W., Helliwell, C.A., and Koshioka, M.** (2005). The involvement of gibberellin 20-oxidase genes in phytochrome-regulated petiole elongation of Arabidopsis. *Plant Physiol.* **138**: 1106–1116.

- Holsters, M., de Waele, D., Depicker, A., Messens, E., van Montagu, M., and Schell, J.** (1978). Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *MGG Mol. Gen. Genet.* **163**: 181–187.
- Iwata, S., Miyazawa, Y., Fujii, N., and Takahashi, H.** (2013). MIZ1-regulated hydrotropism functions in the growth and survival of *Arabidopsis thaliana* under natural conditions. *Ann. Bot.* **112**: 103–114.
- King, K.E., Moritz, T., and Harberd, N.P.** (2001). Gibberellins are not required for normal stem growth in *Arabidopsis thaliana* in the absence of GAI and RGA. *Genetics* **159**: 767–776.
- Kodaira, K.-S., Qin, F., Tran, L.-S.P., Maruyama, K., Kidokoro, S., Fujita, Y., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2011). *Arabidopsis* Cys2/His2 zinc-finger proteins AZF1 and AZF2 negatively regulate abscisic acid-repressive and auxin-inducible genes under abiotic stress conditions. *Plant Physiol.* **157**: 742–56.
- Koini, M.A., Alvey, L., Allen, T., Tilley, C.A., Harberd, N.P., Whitelam, G.C., Franklin, K.A., and Le, L.** (2009). High Temperature-Mediated Adaptations in Plant Architecture Require the bHLH Transcription Factor PIF4. *Curr. Biol.* **19**: 408–413.
- Kumar, S.V., Lucyshyn, D., Jaeger, K.E., Alós, E., Alvey, E., Harberd, N.P., and Wigge, P. a** (2012). Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering. *Nature* **484**: 242–5.
- Kumar, S.V. and Wigge, P. a** (2010). H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis*. *Cell* **140**: 136–47.
- Kumari, A., Jewaria, P.K., Bergmann, D.C., and Kakimoto, T.** (2014). *Arabidopsis* Reduces Growth Under Osmotic Stress by Decreasing SPEECHLESS Protein. *Plant Cell Physiol.* **55**: 2037–2046.
- Larkindale, J., Hall, J.D., Knight, M.R., and Vierling, E.** (2005). Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiol.* **138**: 882–97.
- Larkindale, J. and Knight, M.** (2002). Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiol.* **128**: 682–695.
- Lee, U., Wie, C., Escobar, M., Williams, B., Hong, S., and Vierling, E.** (2005).

Genetic Analysis Reveals Domain Interactions of Arabidopsis Hsp100 / ClpB and Cooperation with the Small Heat Shock Protein Chaperone System. *Plant Cell* **17**: 559–571.

- Li, X., Guo, Y., Chu, J., Fang, S., Yan, C., Noel, J.P., and Liu, H.** (2015). Cryptochrome 1 interacts with PIF4 to regulate high temperature-mediated hypocotyl elongation in response to blue light. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**: 4–9.
- Lim, S., Park, J., Lee, N., Jeong, J., Toh, S., Watanabe, A., Kim, J., Kang, H., Kim, D.H., Kawakami, N., and Choi, G.** (2013). ABA-INSENSITIVE3, ABA-INSENSITIVE5, and DELLAs Interact to Activate the Expression of SOMNUS and Other High-Temperature-Inducible Genes in Imbibed Seeds in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 4863–4878.
- Liu, H.-C., Liao, H.-T., and Charng, Y.-Y.** (2011). The role of class A1 heat shock factors (HSFA1s) in response to heat and other stresses in Arabidopsis. *Plant. Cell Environ.* **34**: 738–51.
- 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.
- Locascio, A., Blázquez, M.A., and Alabadí, D.** (2013). Genomic analysis of della protein activity. *Plant Cell Physiol.* **54**: 1229–1237.
- Mayor, C., Brudno, M., Schwartz, J.R., Poliakov, a, Rubin, E.M., Frazer, K. a, Pachter, L.S., and Dubchak, I.** (2000). VISTA : visualizing global DNA sequence alignments of arbitrary length. *Bioinformatics* **16**: 1046–1047.
- Mi, H., Muruganujan, A., Casagrande, J.T., and Thomas, P.D.** (2013). Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nat. Protoc.* **8**: 1551–66.
- Mi, H., Poudel, S., Muruganujan, A., Casagrande, J.T., and Thomas, P.D.** (2016). PANTHER version 10: Expanded protein families and functions, and analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **44**: 336–342.
- Mitchum, M.G., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kuwahara, A., Yoshioka, Y., Kato, T., Tabata, S., Kamiya, Y., and Sun, T.-P.** (2006). Distinct and overlapping roles of

- two gibberellin 3-oxidases in Arabidopsis development. *Plant J.* **45**: 804–18.
- Mizoi, J., Ohori, T., Moriwaki, T., Kidokoro, S., Todaka, D., Maruyama, K., Kusakabe, K., Osakabe, Y., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2013). GmDREB2A;2, a canonical DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN2-type transcription factor in soybean, is posttranslationally regulated and mediates dehydration-responsive element-dependent gene expression. *Plant Physiol.* **161**: 346–61.
- Nemhauser, J.L., Hong, F., and Chory, J.** (2006). Different Plant Hormones Regulate Similar Processes through Largely Nonoverlapping Transcriptional Responses. *Cell* **126**: 467–475.
- Nishitani, C., Hirai, N., Komori, S., Wada, M., Okada, K., Osakabe, K., Yamamoto, T., and Osakabe, Y.** (2016). Efficient Genome Editing in Apple Using a CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.* **6**: 31481.
- Oh, E., Zhu, J.-Y., Bai, M.-Y., Arenhart, R.A., Sun, Y., and Wang, Z.-Y.** (2014). Cell elongation is regulated through a central circuit of interacting transcription factors in the Arabidopsis hypocotyl. *Elife* **3**: 1–19.
- Ohama, N., Kusakabe, K., Mizoi, J., Zhao, H., Kidokoro, S., Koizumi, S., Takahashi, F., Ishida, T., Yanagisawa, S., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2015). The transcriptional cascade in the heat stress response of Arabidopsis is strictly regulated at the expression levels of transcription factors. *Plant Cell* **28**: 181–201.
- Ohama, N., Sato, H., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2016). Transcriptional Regulatory Network of Plant Heat Stress Response. *Trends Plant Sci.* **22**: 53–65.
- Osakabe, Y. and Osakabe, K.** (2015). Genome editing with engineered nucleases in plants. *Plant Cell Physiol.* **56**: 389–400.
- Plackett, A.R.G. et al.** (2012). Analysis of the Developmental Roles of the Arabidopsis Gibberellin 20-Oxidases Demonstrates that GA20ox1, -2, and -3 are the Dominant Paralogs. *Plant Cell* **24**: 941–60.
- Qin, F. et al.** (2008). Arabidopsis DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. *Plant Cell* **20**: 1693–707.
- Quint, M., Delker, C., Franklin, K.A., Wigge, P.A., Halliday, K.J., and van Zanten,**

- M.** (2016). Molecular and genetic control of plant thermomorphogenesis. *Nat. Plants* **2**: 15190.
- Ren, H. and Gray, W.M.** (2015). SAUR Proteins as Effectors of Hormonal and Environmental Signals in Plant Growth. *Mol. Plant* **8**: 1153–1164.
- Rieu, I., Eriksson, S., Powers, S.J., Gong, F., Griffiths, J., Woolley, L., Benlloch, R., Nilsson, O., Thomas, S.G., Hedden, P., and Phillips, A.L.** (2008a). Genetic analysis reveals that C19-GA 2-oxidation is a major gibberellin inactivation pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 2420–36.
- Rieu, I., Ruiz-Rivero, O., Fernandez-Garcia, N., Griffiths, J., Powers, S.J., Gong, F., Linhartova, T., Eriksson, S., Nilsson, O., Thomas, S.G., Phillips, A.L., and Hedden, P.** (2008b). The gibberellin biosynthetic genes AtGA20ox1 and AtGA20ox2 act, partially redundantly, to promote growth and development throughout the Arabidopsis life cycle. *Plant J.* **53**: 488–504.
- Saito, S., Okamoto, M., Shinoda, S., Kushiro, T., Koshiba, T., Kamiya, Y., Hirai, N., Todoroki, Y., Sakata, K., Nambara, E., and Mizutani, M.** (2006). A plant growth retardant, uniconazole, is a potent inhibitor of ABA catabolism in Arabidopsis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**: 1731–1739.
- Sakamoto, T., Kamiya, N., Ueguchi-Tanaka, M., Iwahori, S., and Matsuoka, M.** (2001). KNOX homeodomain protein directly suppresses the expression of a gibberellin biosynthetic gene in the tobacco shoot apical meristem. *Genes Dev.* **15**: 581–590.
- Sakurai, H. and Enoki, Y.** (2010). Novel aspects of heat shock factors: DNA recognition, chromatin modulation and gene expression. *FEBS J.* **277**: 4140–4149.
- Scharf, K.-D., Berberich, T., Ebersberger, I., and Nover, L.** (2012). The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: structure, function and evolution. *Biochim Biophys Acta* **1819**: 104–119.
- Shi, J., Gao, H., Wang, H., Lafitte, H.R., Archibald, R.L., Yang, M., Hakimi, S.M., Mo, H., and Habben, J.E.** (2016). ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnol. J.*: 1–10.
- Silverstone, a L., Jung, H.S., Dill, a, Kawaide, H., Kamiya, Y., and Sun, T.P.** (2001). Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**: 1555–1566.

- Spartz, A.K., Ren, H., Park, M.Y., Grandt, K.N., Lee, S.H., Murphy, A.S., Sussman, M.R., Overvoorde, P.J., and Gray, W.M.** (2014). SAUR Inhibition of PP2C-D Phosphatases Activates Plasma Membrane H⁺-ATPases to Promote Cell Expansion in Arabidopsis. *Plant Cell* **26**: 2129–2142.
- Stavang, J. a, Gallego-Bartolomé, J., Gómez, M.D., Yoshida, S., Asami, T., Olsen, J.E., García-Martínez, J.L., Alabadí, D., and Blázquez, M. a** (2009). Hormonal regulation of temperature-induced growth in Arabidopsis. *Plant J.* **60**: 589–601.
- Sun, J., Qi, L., Li, Y., Chu, J., and Li, C.** (2012). PIF4-mediated activation of YUCCA8 expression integrates temperature into the auxin pathway in regulating arabidopsis hypocotyl growth. *PLoS Genet.* **8**: e1002594.
- Sun, T.** (2008). Gibberellin Metabolism , Perception and Signaling Pathways in Arabidopsis. *Arab. B.:* e0103.
- Sun, T.-P.** (2011). The molecular mechanism and evolution of the GA-GID1-DELLA signaling module in plants. *Curr. Biol.* **21**: R338-45.
- Tagle, D.A., Koop, B.F., Goodman, M., Slightom, J.L., Hess, D.L., and Jones, R.T.** (1988). Embryonic ϵ and γ globin genes of a prosimian primate (*Galago crassicaudatus*). Nucleotide and amino acid sequences, developmental regulation and phylogenetic footprints. *J. Mol. Biol.* **203**: 439–455.
- Todaka, D. et al.** (2012). Rice phytochrome-interacting factor-like protein OsPIL1 functions as a key regulator of internode elongation and induces a morphological response to drought stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 15947–15952.
- Uga, Y. et al.** (2013). Control of root system architecture by DEEPER ROOTING 1 increases rice yield under drought conditions. *Nat. Genet.* **45**: 1097–102.
- Urbanová, T., Tarkowská, D., Novák, O., Hedden, P., and Strnad, M.** (2013). Analysis of gibberellins as free acids by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* **112**: 85–94.
- Varbanova, M. et al.** (2007). Methylation of gibberellins by Arabidopsis GAMT1 and GAMT2. *Plant Cell* **19**: 32–45.
- 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.
- Yamaguchi, N., Wu, M.-F., Winter, C.M., Berns, M.C., Nole-Wilson, S., Yamaguchi, A., Coupland, G., Krizek, B. a, and Wagner, D.** (2013). A molecular framework

- for auxin-mediated initiation of flower primordia. *Dev. Cell* **24**: 271–82.
- Yamaguchi, S.** (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 225–51.
- Yoshida, K., Kasai, T., Garcia, M.R., Sawada, S., Shoji, T., Shimizu, S., Yamazaki, K., Komeda, Y., and Shinmyo, a** (1995). Heat-inducible expression system for a foreign gene in cultured tobacco cells using the HSP18.2 promoter of *Arabidopsis thaliana*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 466–72.
- Yoshida, T. et al.** (2011). *Arabidopsis* HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression. *Mol. Genet. Genomics* **286**: 321–332.
- Zentella, R., Zhang, Z.-L., Park, M., Thomas, S.G., Endo, A., Murase, K., Fleet, C.M., Jikumaru, Y., Nambara, E., Kamiya, Y., and Sun, T.-P.** (2007). Global analysis of *della* direct targets in early gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 3037–3057.
- Zhang, T., Zhang, W., and Jiang, J.** (2015). Genome-Wide Nucleosome Occupancy and Positioning and Their Impact on Gene Expression and Evolution in Plants. *Plant Physiol.* **168**: 1406–16.
- Zhao, Y.** (2014). Auxin Biosynthesis. *Arab. B.* **12**: e0173.
- Zhou, X., Zhang, Z.-L., Yusuke, J., Qiu, K., Park, J., Nam, E.A., Lumba, S., Desveaux, D., McCourt, P., Kamiya, Y., Tyler, L., and Sun, T.** (2016). ERF11 Promotes Internode Elongation by Activating Gibberellin Biosynthesis and Signaling Pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **171**: pp.00154.

謝辞

本研究を行うにあたって、多大なるご指導、ご助言を賜りました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。また、本研究の推進にあたりご支援いただいた、植物分子生理学研究室の教職員の皆様、実験技術補佐員、秘書の皆様、研究室員の皆様に謹んで感謝申し上げます。特に大濱直彦博士、溝井順哉博士には学部から大学院にかけて、実験技術や論文執筆で多くの助言を賜りました。心より感謝申し上げます。

城所聡博士にはマイクロアレイ実験で、また溝井順哉博士には結果の解析にあたり、多大なるご助力を賜りました。謹んで御礼申し上げます。またジベレリン量の測定は生物制御研究室の中嶋正敏博士にご協力いただきました。サンプルの準備や実験条件の検討など、多くのご助言を賜りました。この場を借りて謹んで感謝申し上げます。

博士2年から2年間にわたり、日本学術振興会より特別研究員に採用していただき、経済的な支援を賜りました。謹んで感謝申し上げます。最後になりますが博士課程進学にあたり、ご理解とご支援を頂いた家族と友人に感謝いたします。

平成 29 年 3 月