審 査 の 結 果 の 要 旨

氏　　名　　趙　慧美

本博士論文は、HsfA1 の転写活性調節における 70kDa の熱ショックタンパク質（HSP70）の機能を明らかにして、高温ストレス応答遺伝子発現機構での役割を解明する事を目的としている。HsfA1 タイプの転写因子は、植物における高温ストレス応答のマスターレギュレーターとして機能していおり、HSP70 が関与する HsfA1 の活性化機構の解明は、植物の高温ストレス応答における重要な課題である。

本論文は５章よりなり、第 1 章の序論に続き第 2 章ではシロイヌナズナの HSP70 の系統解析と機能解析に関して述べている。シロイヌナズナゲノムには 18 個の *HSP70* 遺伝子が存在する。全長アミノ酸配列を用いて系統解析を行うと、6 つの HSP70 が細胞質局在型 DnaK HSP70 サブファミリーに分類された。GFP 融合タンパク質を用いて、これらの HSP70 が細胞質および核に局在すること示した。さらに、*GUS* リポーター遺伝子を用いて、*HSC70-1*、*HSC70-2* および *HSC70-3* 遺伝子の発現は、通常条件および高温条件の両方において植物

体全体で発現していることを明らかにした。*HSP70*、*HSP70B*、および *HSP70T-1* は、通常条件下ではほとんど発現が検出されなかったが、*HSP70* および *HSP70B* は高い高温誘導性を示した。さらに、酵母ツーハイブリッド法による物理的相互作用の確認および一過的発現系での HsdA1 の標的遺伝子の発現抑制の検出から、6 つの HSP70 は HsfA1 の活性化における抑制因子として機能すると結論づけている。

第 3 章では、通常条件においても十分な発現を示す *HSC70-1*、*HSC70-2* および *HSC70-3* の 3 つの遺伝子に注目して、変異体を用いて機能解析を進めている。まず、それぞれ一重、二重および三重変異体（*hsc70-1/2/3*）を作出し、これらを用いて高温耐性試験を行った。二重および三重変異体は、野生型植物と比較して有意な耐性の上昇を示した。そこで、*hsc70-1/2/3* における HsfA1 の下流遺伝子の発現を、定量 RT-PCR 法によって解析した。その結果、通常条件において数種の下流の高温ストレス誘導性遺伝子の発現が、上昇していることを見出した。一方、高温ストレス条件および回復期にはこれらの下流遺伝子の発現レベルの有意な変化は、観察されなかった。これらの結果から、HsfA1 により誘導される転写カスケードが、通常生育条件下では 3 つの HSC70 によって抑制されている可能性を提示している。

次に、上記の仮説を確かめるために、*hsc70-1/2/3* 三重変異体を用いたトラン

スクリプトーム解析を行なっている。この解析によって *hsc70-1/2/3* では、通常の生育条件において多数の高温ストレス応答遺伝子の発現が上昇していることが確かめられた。よって、3 つの HSC70 は、通常生育条件下で高温誘導性遺伝子の発現を抑制している機能が示された。さらに、変異体植物において発現が抑制された遺伝子群の解析を行っている。GO 解析の結果、これらの発現が抑制された遺伝子には病害応答性遺伝子が多く含まれていることを見出している。本結果から HSC70 は植物の病原菌に対する耐性機構で働いている可能性を予測しており、病原菌に対する耐性試験の必要性を述べている。

第 4 章では、HSC70 の塩ストレス応答における機能解析が行われている。HsfA1 は塩ストレス応答においても機能することが報告されていることから、これらの HSC70 もまた植物の耐塩性の調節に関与するのではないかと推測し、*hsc70-1/2/3* 変異体を用いた塩ストレス耐性試験が行われた。高塩ストレス条件下で、発芽に関しては野生型および *hsc70-1/2/3* 変異体間で有意な変化は観察されなかった。しかし、塩ストレスの長期間の処理の後、*hsc70-1/2/3* 変異体植物は野生型植物と比較して顕著な生育阻害を示した。

第 5 章では、総合討論および結論が述べられている。本論文において、6 つの細胞質及び核に局在する HSP70 は、高温ストレス応答におけるマスタースイッチである HsfA1 の抑制因子として機能することが示された。また、*hsc70-1/2/3* 変異体を用いた解析によって、3 つの HSC70 が、通常生育条件に

おいてHsfA1の機能を抑制していることを明らかにした。一方、これらのHSC70は植物の病害に対する応答や塩ストレス耐性の獲得においても、重要な機能を有している可能性を示唆した。本論文によって得られた知見は、乾燥や塩ストレス等の環境ストレス耐性植物の開発に役立つと期待される。

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。