

第 I 章  
序論

歴史を通し食糧の確保は人類最大の課題であった。人類はおおよそ1万年前、植物の栽培化つまり作物を創り出して以来、何世代にもわたって収量性、病害抵抗性、栄養価や嗜好性などにおいて優良な形質をもつ品種を選抜し、交配し、改良を行ってきた。特に20世紀、緑の革命として知られる半矮性の導入などに代表される品種改良に加え、新たな化学肥料や農薬の開発、灌漑地域の拡大により、農業生産はかつてない規模で増加した。一方、こうした食糧基盤を背景に世界人口も爆発的に増大した。しかし、世界の食糧をめぐる指標（一人当たりの穀物生産量）は1990年を境にマイナス成長に転じ、今後ますます悪化することは決定的である（FAO, 2009; Mahajan and Tuteja, 2005）。水、土地といった自然資源の有限性と、反収を向上させてきた灌漑技術の副作用による土壌の劣化、さらには長期的な異常気象の到来が、農業生産のさらなる成長はおろか現状維持すら危うくしている。よってこの抜き差しならぬ事態を脱するには、従来の分子育種を超える遺伝子組換え技術により、これまで農作物の栽培に適さなかった乾燥地や寒冷地などの劣悪な環境を克服し、突然の気候変化にも素早く適応して安定した生産性を維持できる環境ストレス耐性作物の開発が望まれる。

農作物を含め、植物は移動の自由を持たないので、動物のように自らの意思で移動して生育に適さない環境から逃れることができない。そのため、その生育期間内に水ストレス、温度ストレス、光ストレスといった様々な環境ストレスに曝されることになる。そこで、自らの形態や生理作用を調節することで内部環境の恒常性を維持し、外部環境に適応して生存している。こうした耐性獲得の過程には大がかりな遺伝子発現の変化が伴う。その際、転写因子はそれぞれが特異的に結合する塩基配列を介して、多くのストレス誘導性遺伝子を制御するので、環境応答のマスタースイッチとして働くと考えられる（Yamaguchi-shinozaki and Shinozaki, 2006）。これまでに環境応答においてストレス耐性獲得に機能する遺伝子のプロモーター領域から、こうした転写因子の標的となる環境ストレス応答性のシス配列が多数同定されている。中でも水ストレ

スに応答するシス配列については、植物ホルモンのアブシシン酸 (ABA) を介した応答に関与する ABA-responsive element (ABRE) と、ABA には非依存的な経路で応答する Dehydration-responsive element (DRE) がよく知られている (Agarwal and Jha, 2010)。最近、ABA 依存的な経路については、ABA 受容体が相次いで同定されたことで、植物が水ストレスを感受すると細胞内の ABA 濃度が上昇し、ABA 受容体を介してストレスシグナルが伝達され、転写因子の修飾による活性化を経て遺伝子発現が誘導されるという一連の制御機構が解明されつつある (Nishimura *et al.*, 2010)。一方、ABA 非依存的な経路については、ABA の蓄積を待たずに遺伝子の発現誘導が起こるので、ストレス応答の初期段階において重要であると考えられるが (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994)、水ストレスシグナルの感受からシス因子である DRE とこれに結合する転写因子である DRE-binding protein (DREB) に至るまでの経路およびそのシグナルの実体はほとんど明らかになっていない。

シロイヌナズナの転写因子 DRE-BINDING PROTEIN2A (DREB2A) は、AP2/ERF 型転写因子の DREB2 サブグループに属し、主に低温ストレス応答に機能する DREB1/CBF サブグループとは異なり、乾燥や塩などの水ストレスに加えて高温ストレスにも応答して速やかに発現し、ストレスに応じて特異的な標的遺伝子群の転写を活性化することでストレス耐性の獲得に寄与することが明らかになっている (Liu *et al.*, 1998; Sakuma *et al.*, 2002; Sakuma *et al.*, 2006b)。これまでに、植物の環境ストレス耐性を向上させる遺伝子は、Late embryogenesis abundant (LEA) タンパク質やシャペロンなどの機能遺伝子から転写因子まで多数報告されている。しかし、乾燥と高温の両方のストレスに対する耐性を向上させる転写因子は、転写活性化補助因子である Multiprotein bridging factor 1c (MBF1c, Suzuki *et al.*, 2005) などの少数の例に留まっている。植物が自然界で受ける環境ストレスは、乾燥ストレスと高温ストレスなどが同時に起こる複合的な場合が多く、こうした複合的なストレスは、それぞれのストレスが単独の場

合よりも植物体へのダメージが大きい (Mittler, 2010)。それゆえに、DREB2A が関与するストレス応答機構について研究することは、より俊敏に環境ストレスに応答し、なおかつ複数の環境ストレスへの耐性を同時に獲得できる作物の開発に役立つと期待される。

本研究では、DREB2A が関与するシロイヌナズナの環境ストレス応答において、乾燥および高温ストレスに応答して *DREB2A* 遺伝子が発現し、標的遺伝子の転写が活性化されるまでの制御機構のうち、機能実体である DREB2A タンパク質に着目して解析した。*DREB2A* の発現は、転写段階に加えて翻訳後段階でも制御されており、標的遺伝子の転写活性化には DREB2A の安定性が関与することが示唆されている (Yoshida *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012; Qin *et al.*, 2008)。そこで第 II 章では、シロイヌナズナの植物体における DREB2A タンパク質の蓄積量と DREB2A の標的遺伝子の発現量との関係について解析することで、ストレスに応答した DREB2A タンパク質の安定化と活性化の役割を明らかにすることを目的とした。その結果、DREB2A タンパク質はストレスに応答して安定化し、その蓄積量の増加が標的遺伝子の発現量増加に寄与していることが明らかになった。一方、DREB2A が標的遺伝子の転写を活性化するためには DREB2A タンパク質 が蓄積するだけでは不十分であり、ストレス特異的な活性化の制御を受けることが必要である可能性が示唆された。また、高温ストレス下でも DREB2A の分解制御が続いており、これには DREB2A の負の調節因子として単離されているユビキチン連結酵素 DREB2A-INTERACTING PROTEIN (DRIP) に加えて別のユビキチン連結酵素が機能していることが明らかになった。このような DREB2A のストレスに応答した活性および安定性の制御機構について更なる知見を得るためには、新規相互作用因子の同定と機能解析が有効であると考えられた。そこで、第 III 章では、シロイヌナズナの植物体から共免疫沈降により DREB2A のタンパク質複合体を精製し LC-MS/MS 解析に供することで、DREB2A の既知の相互作用因子に加えて 2 個のユビキチン連



結酵素を新規相互作用因子として単離・同定した。第 IV 章では、これらの解析結果をもとに、DREB2A タンパク質の安定化と活性化が転写活性化能の調節に及ぼす影響について総合考察する。DREB2A が複数の E3 ユビキチン連結酵素に認識され、非ストレス存在下と、ストレス存在下の両方で分解制御を受けていること、それに加えて活性化の制御を受けることでストレス特異的な標的遺伝子の転写を活性化する機構について、これまでの知見と本論文の結果とをもとに、新たに相互作用因子を加えたモデルを提示する。

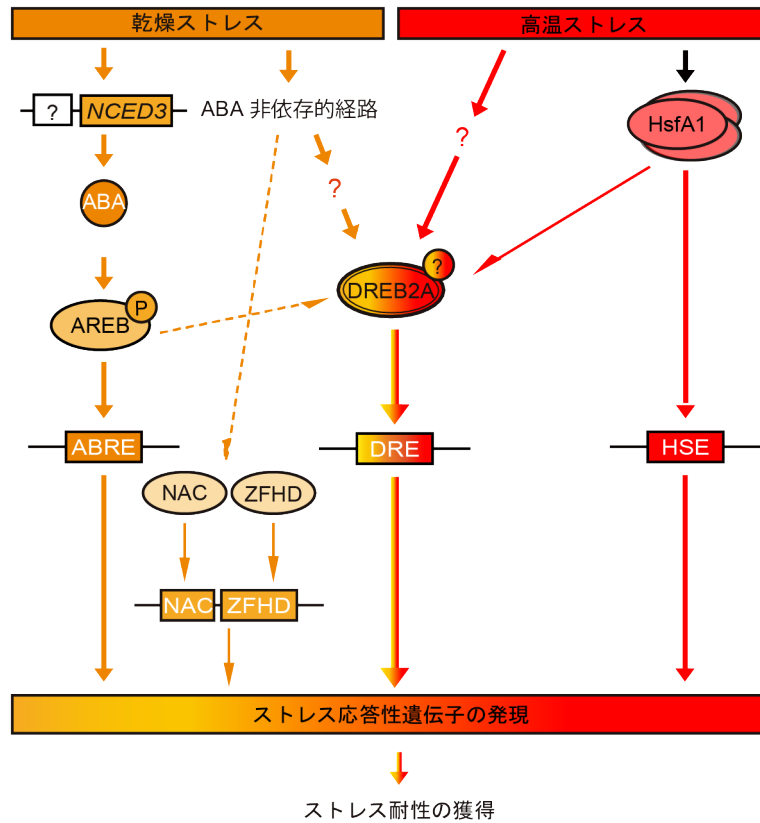


図 I -1. シロイヌナズナにおける乾燥および高温ストレス応答のシグナル伝達経路

乾燥ストレス応答に関与する上流因子、転写因子およびその標的配列を、ABA 依存の経路と非依存的経路について示した。また、高温ストレス応答に関与する上流因子、転写因子およびその標的配列を DREB2A が関与する経路について示した。DREB2A は乾燥および高温ストレスに反応して標的配列である DRE を介して下流のストレス応答性遺伝子の転写を活性化し、ストレス耐性の獲得に寄与している。DREB2A は乾燥ストレス応答において ABA 非依存的な経路で機能する主な転写因子と考えられているが、最近、ABA 依存の経路のシグナルも伝達できること示されたため点線で書き加えた (Kim *et al.* 2011)。高温ストレス応答においては、少なくとも HsfA1 が DREB2A の転写活性化に機能することが示されている。この他にも NAC や ZFHD など、ストレスシグナル伝達経路において機能する多数の転写因子が報告されている。

## 第II章

シロイヌナズナの転写因子 DREB2A の  
環境ストレスに応答した安定化と活性化に関する解析

## 序論

シロイヌナズナの転写因子 DRE-BINDING PROTEIN2A (DREB2A) は、乾燥および高温ストレス応答の初期段階において、ABA に依存しない経路でストレス誘導性遺伝子群の転写活性化に重要な役割を担う。DREB2A は乾燥および低温ストレス誘導性遺伝子 Responsive to dehydration 29A (RD29A) のプロモーター領域の解析から同定されたシス因子 Dehydration-responsive element (DRE) に特異的に結合するタンパク質として、酵母のワンハイブリッドスクリーニングにより DREB1A/CBF3 と共に単離された (Liu *et al.*, 1998)。DRE は、ABA が関与しないシグナル伝達系を介した乾燥および低温ストレスに応答した遺伝子発現を活性化する塩基配列として同定された (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994)。DREB1A/CBF3 の発現が低温ストレスに応答して誘導されるのに対し、DREB2A は乾燥および塩ストレスに応答して誘導されるので、乾燥ストレス時には DREB2A が機能していると考えられた。DREB1A/CBF3 を過剰発現するシロイヌナズナでは、通常条件でも RD29A 等のストレス誘導性遺伝子の転写が誘導され、低温・乾燥耐性の向上、生育遅延などの顕著な表現型が観察された (Liu *et al.*, 1998)。一方、DREB2A を過剰発現するシロイヌナズナにおいては、DREB2A mRNA が蓄積しているのにも関わらず、RD29A の転写は誘導されず、明確な表現型が観察されなかった (Liu *et al.*, 1998)。このことから、DREB2A の機能は転写段階の制御に加えて、転写後段階でも制御されていることが示唆された。プロトプラストを用いた一過的発現系を用いて行われた DREB2A タンパク質のドメイン解析の結果、DREB2A の 136 残基目から 165 残基目までの領域 Negatively regulatory domain (NRD) を欠損させると恒常的な活性型である constitutively active form of DREB2A (DREB2A CA) となることを見出され、DREB2A タンパク質が NRD を介して負の活性制御を受けていることが示唆された (Sakuma *et al.*, 2006a)。また、DREB2A CA の過剰発現体では、乾燥ストレス耐性の向上や生育遅延など顕著な表現型が観察された。さらに DREB2A CA の

過剰発現体を用いたマイクロアレイ解析の結果、通常条件でも乾燥・塩ストレス応答性遺伝子の発現が上昇しており、これらの遺伝子の多くはプロモーター上に DRE が存在していたことから、DREB2A の標的遺伝子が多く含まれていると考えられた。予期されていなかったことに、*DREB2A CA* の過剰発現体では乾燥および塩ストレス応答性遺伝子に加えて高温ストレス応答性遺伝子の発現も上昇しており、これらの遺伝子の中にはプロモーター上に DRE を有するものが多く含まれていた (Sakuma *et al.*, 2006b)。更なる解析により、*DREB2A* 自身の発現も高温ストレスによって誘導されることが示され、*DREB2A CA* の過剰発現体では高温耐性も向上したことから、DREB2A が高温耐性の獲得にも関与していることが明らかになった (Sakuma *et al.*, 2006b)。

DREB2A が受ける負の活性制御に関しては、分解制御の関与が示されている。GFP と全長 DREB2A の融合タンパク質 (GFP-DREB2A) は、構成的プロモーター下でシロイヌナズナ植物体に発現させても、通常条件において微弱な GFP 蛍光しか検出されなかった。一方、GFP と *DREB2A CA* の融合タンパク質の蛍光は強く検出されたことから、DREB2A CA は安定性が向上している可能性が示唆された (Sakuma *et al.*, 2006a)。実際に *GFP-DREB2A* を発現する形質転換体をプロテアソーム阻害剤 MG132 で処理すると GFP 蛍光が強く観察されたことから、DREB2A はユビキチン-プロテアソーム系による選択的分解を受けていると考えられた (Qin *et al.*, 2008)。また、DREB2A の遺伝子断片を用いた酵母のツーハイブリッドスクリーニングからユビキチン連結酵素 DREB2A-interacting protein (DRIP) が単離され、*DRIP* の機能欠損変異体において GFP-DREB2A の蓄積量が高まったことから、DREB2A は通常条件では、DRIP が関与するユビキチン-プロテアソーム系による分解制御により不安定化されていることが示唆された (Qin *et al.*, 2008)。

以上に述べたように、DREB2A を介した転写活性化の制御機構について、通常条件では DREB2A を不安定化し、機能発現を抑制する負の調節が重要である

ことが推察された。一方、ストレス条件下における DREB2A の活性制御機構に関しては、乾燥および高温ストレス条件下における *DREB2A* や標的遺伝子の発現パターンについて、転写産物レベルでの解析は行われているが、DREB2A タンパク質の蓄積量や安定性の変化については解析されていない。また、DREB2A の安定性と転写活性の間の相関が示唆されているが、これらが同一の現象であるのかについては明らかになっていない。そこで本章においては、まず、新たに作製された抗 DREB2A 抗体を用いて、ストレス条件下での野生型シロイヌナズナにおける内在性 DREB2A の蓄積パターンを解析した。次に、ストレス条件下における DREB2A タンパク質の安定性制御機構について、T87 培養細胞を用いた安定性の解析、プロトプラストや植物体を用いた DREB2A の安定性の制御と核移行との関係の解析、ユビキチン連結酵素 DRIP 欠損植物における DREB2A タンパク質の蓄積パターンの解析を行った。さらに、標的遺伝子の転写における DREB2A の安定化と活性化の役割を明らかにするために、構成的プロモーター下で *GFP-DREB2A* を発現させた形質転換シロイヌナズナを用い、ストレス処理やプロテアソーム阻害剤処理を行った時の DREB2A タンパク質の蓄積量と DREB2A 標的遺伝子の mRNA 蓄積量との関係を解析した。

## 材料と方法

### 1. 材料および生育条件

#### 1.1. 使用したシロイヌナズナおよび生育条件

シロイヌナズナの野生型株としては、*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ecotype Columbia -0 (Col) を用いた。シロイヌナズナの *DREB2A* 欠損変異体は、Sakuma *et al.* (2006b) で解析された *dreb2a-1* 変異体 (GABI-KAT line 379F02)、*DRIP* 欠損変異体は、Qin *et al.* (2008) で解析された *drip1* 変異体 (WiscDsLox437G06)、*drip1 drip2* 二重変異体 (*drip2*; SALK\_145041) を用いた。カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S RNA プロモーターおよびタバコモザイクウイルス (TMV)  $\Omega$  配列制御下で sGFP (GFP の S65T 変異型、Chiu *et al.*, 1996) と全長 *DREB2A* の融合タンパク質を発現する形質転換シロイヌナズナは、Sakuma *et al.* (2006a) において解析された、*35S:GFP-DREB2A FL* を用いた。CaMV35S RNA プロモーターおよび TMV  $\Omega$  配列の制御下で全長 *DREB2A* を発現する形質転換シロイヌナズナは、Liu *et al.* (1998) において解析された *35S:DREB2A* (本研究では *35S:DREB2A/WT* と記す) を用いた。

シロイヌナズナの寒天培地上での生育条件は、Fujita *et al.* (2005) の方法に従った。乾燥種子を 70% (v/v) エタノールで洗浄し、次亜塩素酸ナトリウム (有効塩素濃度 1%) と 0.02% (v/v) Polyoxyethylene (10) Octylphenyl Ether (Triton X-100 相当品、Wako、本研究では Triton X-100 と記す) を含む水溶液で滅菌処理した後、滅菌水で 3 度洗浄した。滅菌処理した種子は GM 寒天培地 [4.6 g/L ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類 (Wako)、0.1% (v/v) ガンボーグビタミン溶液 (SIGMA-ALDRICH)、0.5 g/L 2-Morpholinoethanesulfonic acid (MES, DOJINDO)、30 g/L スクロース (Wako)、8.3 g/L Bacto Agar (BD)、pH 5.7 (KOH)] に播種した。4°C、暗条件で 5 日間低温処理した後、22°C、明期 ( $40 \pm 10 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) 16 時間/ 暗期 8 時間の明暗条件のインキュベーター CHL-301 (TOMY) で 2–3 週間生育させた。形質転換植物 (T2) については、30 mg/L 硫酸カナマイシン (明治

製菓)を含むGM寒天培地(GMK寒天培地)で同様に生育させた。

シロイヌナズナの鉢植えでの生育には、プロフェッショナル用培土 No.2 (ダイオ化成) とプランター培土 (ISEKI) を等量ずつ配合した土、あるいはプロフェッショナル用培土 No.2 を用いた。乾燥種子は滅菌水で吸水させ、4°C、暗条件で1日間低温処理した後に播種し、22°C、明期 ( $40 \pm 10 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) 16時間/暗期8時間の明暗条件または、明期12時間/暗期12時間の明暗条件で6週間生育させた。

#### 1.2. 使用したシロイヌナズナ培養細胞および培養条件

シロイヌナズナの培養細胞には、*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., ecotype Col 由来の T87 株 (T87 培養細胞) を用いた。T87 培養細胞の培養条件は Takahashi *et al.* (2001) の方法に従った。T87 培養細胞の培養には、JPL 培地 (組成は表 II-1 に記す) を用い、継代時細胞数 40–60 mg/mL 程度の濃度で、22 °C、明条件 ( $40 \pm 10 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) のインキュベーター内にて、120 rpm で振盪培養した。

#### 1.3. 使用した *Nicotiana benthamiana* および生育条件

*Nicotiana benthamiana* は、乾燥種子に滅菌水を吸水させて、プロフェッショナル用培土 No.2 と土太郎 (スミリン農産工業) を等量ずつ配合した土を入れたプラントポット 3.5 号 ( $\phi 100 \times H78$ 、大和プラスチック) に播種し、22°C、明期 ( $40 \pm 10 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) 16時間/暗期8時間の明暗条件のグロースチャンバーで2週間生育させ、1個体ずつを新しいプラントポットに植え替えて、さらに3–4週間生育させた。

#### 1.4. 使用した大腸菌および培養条件

大腸菌は、*Escherichia coli* strain DH5 $\alpha$  を用いた。大腸菌の純培養には、LB 液体培地 [10 g/L Bacto Tryptone (BD)、5 g/L Bacto Yeast extract (BD)、10 g/L 塩化



ナトリウム、pH 7.0 (NaOH)] を用い、薬剤耐性株の選抜培養には、100 mg/L のアンピシリンナトリウムを含む LB 寒天培地 (LBA 寒天培地) あるいは 50 mg/L の硫酸カナマイシンを含む LB 寒天培地 (LBK 寒天培地) および、50 mg/L のアンピシリンナトリウム (LBA 液体培地) あるいは 25 mg/L の硫酸カナマイシンを含む LB 液体培地 (LBK 液体培地) を用いた。

#### 1.5. 使用したアグロバクテリウムおよび培養条件

アグロバクテリウムは、あらかじめ pSOUP (Hellens *et al.*, 2000) が導入された *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 (pMP90) 株を用いた。アグロバクテリウムの純培養には、YEP 液体培地 [10 g/L Bacto Peptone (BD)、10g/L Bacto Yeast extract、5 g/L 塩化ナトリウム、pH 7.0 (NaOH)] を用い、薬剤耐性株の選抜培養には、LBK 寒天培地および 25 mg/L の硫酸カナマイシン、20 mg/L の硫酸ゲンタマイシンおよび 5 mg/L のテトラサイクリンを含む YEP 液体培地を用いた。

## 2. 組換え遺伝子の構築

CaMV 35S RNA プロモーターおよび TMV  $\Omega$  配列制御下で *GFP-DREB2A* を発現する形質転換シロイヌナズナを作出するための植物形質転換用ベクターの構築には、pBE2113 (Mitsuhara *et al.* 1996) の *Xba*I サイトに *sGFP* の cDNA 断片を導入したベクターDNA (pBE2113 NsGFP) を用いた。DREB2A のコーディング領域は、35S- $\Omega$ -DREB2A (Liu *et al.*, 1998) を鋳型として、PCR により増幅した。増幅した DNA 断片は *Not*I (TaKaRa) で制限酵素処理し、pBE2113 NsGFP の *Not*I 制限酵素部位に挿入した。

CaMV 35S RNA プロモーターおよび TMV  $\Omega$  配列制御下で核移行シグナルを欠失させた変異型 DREB2A の GFP 融合タンパク質を発現する植物形質転換用ベクターの構築には、pGKX-NsGFP (Qin *et al.*, 2008) をベクターDNA として用いた。変異型 DREB2A のコーディング領域 (Morimoto *et al.*, 2013) は、当研究室

の溝井順哉博士から分与されたプラスミドを鋳型として、PCRにより増幅した。増幅した DNA 断片は *NotI* (TaKaRa) で制限酵素処理し、pGKX-NsGFP (Qin *et al.*, 2008) の *NotI* 制限酵素部位に挿入した。

CaMV 35S RNA プロモーターおよび TMV  $\Omega$  配列制御下で *Histone2B-mRFP* を発現するプラスミドベクターは、理化学研究所の刑部祐里子博士から分与された pG0129-35S:mRFP (Morimoto *et al.*, 2013) に *Histone 2B* のコーディング領域をフレームを合わせて挿入することで構築した。pG0129-35S ベクターは、pGreenII 0129 (Hellens *et al.*, 2000) に pGKX (Qin *et al.*, 2008) 由来の CaMV 35S RNA promoter-nos terminator カセットを挿入したものであり、monomeric Red Fluorescent Protein (mRFP) は、カルフォルニア大学の Roger Tsien 博士に由来している。*Histone 2B* のコーディング領域は、*Histone 2B* を pGK-CFP に挿入したプラスミド DNA (Kidokoro *et al.*, 2009) から、*XbaI* と *SmaI* による制限酵素処理により切り出し、*XbaI* と *SmaI* 制限酵素部位に挿入した。塩基配列はサンガー法により決定し (受託解析)、目的の配列を保持していることを確認した。用いたプライマー情報は表 II-2 に記す。

### 3. 植物の形質転換

#### 3.1. 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は、Clough *et al.* (1998) の花序浸し法に若干の改変を加えて以下のように行った。

##### 3.1.1. 形質転換用シロイヌナズナの準備

形質転換の宿主として *dreb2a-1* を用いた。乾燥種子は滅菌水で吸水させ、4°C、暗条件で 1 日間低温処理した後に、プロフェッショナル用培土とプランター培土を等量ずつ配合した土の入ったプラントポット 2.5 号 ( $\phi 80 \times H65$ 、大和プラスチック) に直播し、22°C、明期 ( $45 \pm 10 \mu\text{mol photons m}^2 \text{s}^{-1}$ ) 16 時間/暗期 8 時間条

件のグロースチャンバーで生育させた。播種後 2 週間目に、1 ポット当たり約 10 個体になるように間引きした。さらに 2 週間後、花茎を切り戻し腋芽の伸長を促した。1 週間後に開花した花と角果を切り落として形質転換に供した。

### 3.1.2. アグロバクテリウムの感染

シロイヌナズナの形質転換用に準備したアグロバクテリウム培養液 2 mL を、室温、7,500×g で、5 分間遠心して、菌体を回収した。回収した菌体は 1 mL の Infiltration Medium [2.3 g/L ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類、5 g/L スクロース、10 µg/L ベンジルアデニン、0.05 % (v/v) Silwet L-77 (バイオメディカルサイエンス)、pH 5.7 (KOH)] で洗浄した後、1 mL の Infiltration Medium に再懸濁した。得られたアグロバクテリウム懸濁液を先端の太いピペットチップを装着したマイクロピペッターを用いて、花序の先端に含ませた。高湿度条件を保つために、2 枚の OHP シートを合わせてつくった筒に水道水を噴霧した後、直ちに植物体を囲い、筒の上部をラップで完全に覆った。水道水で 1000 倍希釈した花工場 (住化タケダ園芸、N5:P10:K5) を施し、グロースチャンバーで生育させた。翌日、筒を覆っていたラップをゆっくりと剥がし、その後約 3 週間生育させて、成熟した角果から T1 種子を回収した。

### 3.1.3. 形質転換植物の選抜および種子の収穫

乾燥させた種子を 50 mg/L 硫酸カナマイシンと 200 mg/L クラフォラン (e-pharma) を含む GM 寒天培地 (GMKF 寒天培地) に播種して、22°C、明期条件 ( $45 \pm 10 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) のインキュベーター内にて 14 日間ほど生育させた。緑色の本葉が展開した個体を抗生物質耐性 T1 植物として選抜して、新たに GMKF 寒天培地に移植してさらに 1 週間程度生育させた。その後、プロフェッショナル用培土 No.2 に移植して 22°C、明期 ( $45 \pm 10 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) 16 時間/暗期 8 時間条件のグロースチャンバーで生育させて T2 種子を収穫した。

T2 種子を GMK 寒天培地に播種して 14 日間ほど生育させ、5–6 個体の T2 植物から後述の方法により RNA を抽出して導入遺伝子の発現量を解析し、目的に応じた強度で導入遺伝子を発現する T2 ラインを選抜した。その後、T1 植物体と同様の方法で生育させて T3 種子を収穫した。T3 種子を GM 寒天培地および GMK 寒天培地に播種して 14 日間ほど生育させ、緑色の本葉が抗生物質の有無に関わらず同様に展開するラインをホモ接合体ラインとして選抜して実験に使用した。

### 3.2. 形質転換シロイヌナズナ培養細胞の作出

CaMV 35S RNA プロモーターの下流で GFP を構成的に発現する形質転換シロイヌナズナ培養細胞株は Osakabe *et al.* (2005) に従い、以下のように作出した。

#### 3.2.1. T87 培養細胞の準備

継代 1 週目の T87 培養細胞懸濁液 7.5 mL を 0.5 mm のナイロンメッシュで漉し、300 mL のフラスコに JPL 液体培地で 10 倍希釈した。22°C、明条件 ( $40 \pm 10 \mu\text{mol photons m}^2 \text{s}^{-1}$ ) のインキュベーター内において、120 rpm で培養細胞の生重量が 1 mL の JPL 液体培地あたり 20–40 mg になるまで、3 日間振盪培養した。

#### 3.2.2. 形質転換用のアグロバクテリウムの準備

目的のプラスミド (pBE2113 NsGFP) を保持するアグロバクテリウムを 2 mL の YEP 液体培地に植菌し、28°C で 1 晩振盪培養し、OD が 0.5–1.0 であることを確認し、2 mL 容微量遠心管に移し、常温、 $5,000 \times g$  で 3 分間遠心し、菌体を回収した。沈殿を 1 mL の JPL 液体培地に懸濁し、常温、 $5,000 \times g$  で 3 分間遠心した。回収した菌体を 500  $\mu\text{L}$  の JPL 液体培地に再懸濁し形質転換に用いた。

#### 3.2.3. T87 培養細胞の形質転換

準備したアグロバクテリウム懸濁液 50  $\mu\text{L}$  を T87 培養細胞懸濁液 5 mL に加えて混合した。混合液を 8 穴プラスチック培養プレートに注ぎ、22°C、明条件 ( $40 \pm 10 \mu\text{mol photons m}^2 \text{s}^{-1}$ ) のインキュベーターにて、120 rpm で振盪しながら、2 日間共培養した。共培養した細胞は全量を 50 mL 遠心管に移して、常温、600 $\times$ g で 2 分間遠心した。回収した細胞を 200  $\mu\text{g/mL}$  のクラフォランを含む JPL 液体培地に懸濁し、ローテーターで 10 分間回転しながら洗浄し、常温、600 $\times$ g で 30 秒遠心した。この操作を 3 回繰り返す、200  $\mu\text{g/mL}$  のクラフォランを含む JPL 液体培地 5 mL に再懸濁して、新しい 8 穴プレートに分注し、インキュベーターに戻して 120 rpm で 4 日間振盪培養した。培養した細胞は全量を 50 mL の遠心管に移して、600 $\times$ g、常温で遠心した。回収した細胞を 200  $\mu\text{g/mL}$  クラフォランを含む JPL 液体培地に懸濁し、ローテーターで 10 分間回転しながら洗浄し、600 $\times$ g、常温で 30 秒遠心した。回収した細胞を 200  $\mu\text{g/mL}$  クラフォランを含む JPL 液体培地 2 mL に濃縮した。濃縮した細胞はナイロンメンブレンを敷いた 200  $\mu\text{g/mL}$  のクラフォランを含む CIM 寒天培地 [4.6 g/L ガンボーグ B5 培地用混合塩類 (Wako)、1 mL/L ガンボーグビタミン溶液、0.5 g/L MES、30 g/L スクロース、0.2 mg/L 1-ナフチル酢酸 (Wako)、6 g/L Bacto Agar、pH 5.7 (KOH)] に広げ、22 °C、明条件 ( $40 \pm 10 \mu\text{mol photons m}^2 \text{s}^{-1}$ ) のインキュベーター内に 3 日間、静置した。このメンブレンを、カナマイシン (20  $\mu\text{g/mL}$ ) およびクラフォラン (200  $\mu\text{g/mL}$ ) を含む選抜用 CIM 寒天培地に移し、約 3 週間培養して、形質転換体を選抜した。緑色のカルスが生えてきたものを抗生物質耐性培養細胞として選抜して、新しい選抜用 CIM 寒天培地に移してさらに 2 週間培養した。

#### 4. シロイヌナズナのストレス処理および薬剤処理

##### 4.1. 乾燥ストレス処理

乾燥ストレス処理の方法は Sakuma *et al.* (2006a) に従った。寒天培地において、1. に記述した条件で 3 週間生育させた植物を、寒天培地から抜き取り、Parafilm

を敷いたプラスチックシャーレに 16 個体ずつ均等に並べた。これを、扉を開放したクリーンベンチ内に静置した。植物の水気はキムワイプで軽くふき取った状態で処理の開始とし、一定時間静置することで乾燥ストレス処理とした。室温は 22°C、湿度は 50±15% とした。これらの植物を時間軸に沿って、8 個体サンプリングし、直ちに液体窒素で凍結することで乾燥処理の停止とした。サンプリングは、RNA 抽出に用いる場合は、ステンレス球 (φ2 mm) 4 粒が入った 2 mL 容微量遠心管に行い、タンパク質抽出に用いる場合は、8 個体をアルミ箔に包み、いずれも -80°C で凍結保存した。

#### 4.2. 高温ストレス処理

高温ストレス処理の方法は、Sakuma *et al.* (2006b) に従った。寒天培地において、1 に記述した条件で 16 日間生育させた植物を寒天培地ごと、37°C、明条件 ( $40 \pm 10 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) のインキュベーター内に一定時間静置することで高温処理とした。サンプリングについては 4.1. と同様に行った。

#### 4.3. プロテアーゼ阻害剤あるいはプロテアソーム阻害剤による処理

薬剤処理を行うシロイヌナズナは、寒天培地において、1 に記述した条件で 10 日間生育させた植物を用いた。植物体を 5 mL の 200  $\mu\text{M}$  MG132 (Merck Millipore)、20  $\mu\text{M}$  Epoxomicin (Peptide Institute) 溶液、200  $\mu\text{M}$  MG115 (Peptide Institute) 溶液、200  $\mu\text{M}$  Leupeptin (Peptide Institute) 溶液、あるいは 200  $\mu\text{M}$  phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, New England BioLabs) 溶液を注いだプラスチックシャーレ (φ60 mm×15mm、Costar) に 16 個体ずつ均等に並べ、扉を全開にしたクリーンベンチ内に静置した。疎水性の高い薬剤は溶媒にジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide, DMSO、Wako) を用い、終濃度の 100 倍になるように調整してから Milli-Q 水で希釈した。薬剤処理の対照区には、1% (v/v) DMSO 溶液を用いた。サンプリングについては 4.1. と同様に行った。

#### 4.4. シロイヌナズナ培養細胞を用いたタンパク質の分解速度の測定

DREB2A タンパク質の分解速度の測定には、構成的プロモーター制御下で GFP を発現する形質転換シロイヌナズナ培養細胞を用いた。培養細胞は、前処理として、37°C で 2 時間振盪し、次いで 200 µg/mL シクロヘキシミド (cycloheximide, CHX、SIGMA-ALDRICH) 存在下で 37°C にて 1 時間振盪した。前処理した培養細胞を 2 等分し、CHX に加えて 100 µM MG132 あるいは 1 % (v/v) DMSO を含む培地に移し、37°C にて 1 時間振盪した。これらの培養細胞を、さらにそれぞれ 2 等分し、一方は 22°C に移し、もう一方は 37°C に維持した。これらの植物を時間軸に沿って、ステンレス球 (φ2 mm) 4 粒が入った 2 mL 容微量遠心管にサンプリングし、直ちに液体窒素で凍結し、-80°C で凍結保存した。

### 5. 植物の一過的発現解析

#### 5.1. アグロバクテリアを介した *N. benthamiana* の一過的発現系を用いた解析

*N. benthamiana* の形質転換は、Kobayashi *et al.* (2007) の方法に従って、以下のように行った。

##### 5.1.1. 形質転換用 *N. benthamiana* の準備

*N. benthamiana* の形質転換には、1.3. の方法で 4–5 週間生育させ、本葉が 4–5 枚展開した *N. benthamiana* の第 2–3 本葉を用いた。

##### 5.1.2. 形質転換用のアグロバクテリウムの準備

塩化カルシウム法により形質転換したアグロバクテリウムおよび *p19* 遺伝子 (導入遺伝子由来の RNA がサイレンシングを受けるのを抑制する機能を持つ)

を持つアグロバクテリウムを、2 mL の YEP 液体培地に植菌し、分光光度計で 600 nm の吸光度 (OD600) を測定し、OD600 が 0.5–1.0 に達するまで 28°C で振盪培養した。この培養液 0.5 mL を、15 mL 遠心管に入れた 15  $\mu$ M アセトシリンゴン (SIGMA-ALDRICH) を含む YEP 液体培地 2.5 mL に植え継ぎ、さらに 2–3 時間、OD600 が 1.0 に達するまで 28°C で振盪培養した。室温、3,000 $\times$ g で 15 分間遠心して菌体を回収し、上清を除いた。沈殿を洗浄するため、2 mL の *N. benthamiana* 用インフィルトレーション溶液 [10 mM MES-NaOH (pH 5.6)、10 mM 塩化マグネシウム] に懸濁し、室温、3,000 $\times$ g で 15 分間遠心して菌体を回収し、上清を除いた。沈殿を 1 mL の *N. benthamiana* 用インフィルトレーション溶液で再懸濁し、さらに 5 倍希釈したものをを用いて、分光光度計で OD600 を測定した。これを、150  $\mu$ M アセトシリンゴン入りのインフィルトレーション溶液で OD600 が 10 ( $1.0\times 10^{10}$  cfu/mL に相当) になるように希釈し、室温で 2 時間静置した。目的のプラスミドを持つアグロバクテリウムと *p19* を持つアグロバクテリウムを等量混合して、形質転換用のアグロバクテリウムの混合液とした。

### 5.1.3. *N. benthamiana* の形質転換

準備したアグロバクテリウムの混合液を 1 mL のシリンジ (TERUMO) に取り、シリンジの先を *N. benthamiana* の葉の裏側に押し当てて、気孔から注入した。その後、グロースチャンバーで 4–5 日間生育させた。形質転換された部分の葉の色が薄くなるので、これを目安に解析に用いた。

## 5.2. シロイヌナズナのプロトプラストを用いた一過的発現解析

シロイヌナズナのプロトプラストを用いた一過的発現解析は、Yoo *et al.* (2007) の方法に若干の改変を加えて行った。

### 5.2.1. 葉肉細胞からのプロトプラストの単離



明期 ( $40 \pm 10 \mu\text{mol photons m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) 12 時間/ 暗期 12 時間の明暗条件のインキュベーターCHL-301 (TOMY) で 6 週間生育させたシロイヌナズナのロゼット葉を 0.5–1.0 mm 程度に千切りし、25 mL のプロトプラスト単離用酵素液 [0.4 M マンニトール、20 mM 塩化カリウム、20 mM MES-KOH (pH 5.7)、1.5% (w/v) cellulase R10 (Yakult)、0.4% (w/v) macerozyme R10 (Yakult)、0.1% (w/v) BSA、10 mM 塩化カルシウム] を注いだコニカルビーカーに加えた。アルミ箔で蓋をして、減圧下にて 15 分間静置した後、22°C、暗所にて 3 時間半静置した。反応液に等量の W5 溶液 [154 mM 塩化ナトリウム、125 mM 塩化カルシウム、5 mM 塩化カリウム、2 mM MES-KOH (pH 5.7)] を加えた混合液をナイロンメッシュ (75  $\mu\text{m}$ ) で漉し、小型遠沈管に移して、室温、 $100 \times g$  で 2 分間遠心分離し、上清を除いた。沈殿に 10 mL の W5 溶液を加えて再懸濁した後、室温で 30 分間静置した。上清を除き、5 mL の MMg 溶液 [0.4 M マンニトール、15 mM 塩化マグネシウム、4 mM MES-KOH (pH 5.7)] に懸濁し、血球計算盤を用いて細胞数を測定した。プロトプラスト懸濁液は、さらに MMg 溶液で約  $1.2 \times 10^5$  個/mL になるように調整した。

### 5.2.2. PEG 法を用いたプロトプラストの形質転換

プロトプラストに導入するプラスミドには、QIAprep Plasmid Midi Kit (QIAGEN) を使用して抽出および精製した高純度プラスミドを用いた。濃度は、超微量分光光度計ナノドロップ ND-1000 (NanoDrop) で測定し、1 mg/mL になるよう TE バッファー [10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA (pH 8.0)] で調整した。

蛍光の観察には、5  $\mu\text{g}$  の GFP 融合タンパク質あるいは RFP 融合タンパク質を発現するプラスミド DNA を用いた。また GUS レポーターアッセイには、6  $\mu\text{g}$  のエフェクタープラスミド DNA、5  $\mu\text{g}$  の レポータープラスミド DNA [DRE3-GUS (Liu *et al.*, 1998)、シロイヌナズナの *RD29A* 遺伝子由来の DRE 配列を含む DNA 断片 3 反復の下流に  $\beta$ -グルクロニダーゼ (*GUS*) コード配列を繋いだ組換

え遺伝子]、4  $\mu\text{g}$  の内部標準プラスミド DNA [pBI35S $\Omega$ ELUC (Mizoi *et al.*, 2013)、ヒカリコメツキムシ由来ルシフェラーゼ (*Emerald Luc*, *ELuc*) 遺伝子 (TOYOBO) を 35S RNA プロモーター下で構成的に発現するプラスミド] を用いた。

以上のプラスミドを 2 mL 容微量遠心管に入れ、100  $\mu\text{L}$  のプロトプラスト懸濁液および 110  $\mu\text{L}$  の PEG 溶液 [40% (w/v) PEG4000 (Fluka)、100 mM 硝酸カルシウム、0.2 M マンニトール] を順に加えて穏やかに混合し、室温で 20 分間静置した。反応液に 440  $\mu\text{L}$  の W5 溶液を加えて穏やかに混合し、室温、100 $\times g$  で 2 分間遠心して上清を 600  $\mu\text{L}$  除いた。残ったプロトプラスト液を 500  $\mu\text{L}$  の WI 溶液 [0.5 M マンニトール、4 mM MES-KOH (pH 5.7)、20 mM 塩化カリウム] に混合し、12 穴の培養プレート (Costar) に全量を注いだ。プラスチック容器をペーパータオルで覆い、明条件下 (25  $\mu\text{mol photons m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) で、12–16 時間静置した。

### 5.2.3. GUS および LUC レポーター活性の測定

プロトプラスト液を 2 mL 容微量遠心管に回収し、室温、100 $\times g$  で 2 分間遠心し、上清を除いた後、直ちに液体窒素で凍結した。凍結したプロトプラストに 100  $\mu\text{L}$  の溶解用緩衝液 [2.5 mM Tris-リン酸 (pH 7.8)、1 mM ジチオトレイトール (DTT, Wako)、2 mM trans-1,2-diaminocyclohexane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (SIGMA-ALDRICH)、10% (v/v) グリセロール、1% (v/v) Triton X-100] を加えてボルテックスミキサーで数秒間攪拌し、氷上で 5 分間静置した後、4 $^{\circ}\text{C}$ 、1,000 $\times g$  で 2 分間遠心して粗タンパク質抽出液を得た。GUS および LUC 活性の測定には蛍光・発光マイクロプレートリーダー・マルチラベルカウンター ARVOSx (Wallac) を用いた。20  $\mu\text{L}$  の粗タンパク質抽出液を 50  $\mu\text{L}$  の Bright-Glo Luciferase Assay 基質溶液 (Promega) と混合して 5 分間静置した後、混合液の LUC 活性を測定した。また、10  $\mu\text{L}$  の粗タンパク質抽出液を 100  $\mu\text{L}$  の GUS 基質緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、2 mM 塩化マグネシウム、0.4 mg/mL

4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide hydrate (SIGMA-ALDRICH)] に加えて転倒混和した後、37°C で1時間反応させた。900  $\mu$ L の 0.2 M 炭酸ナトリウム (Wako) を加えて反応を停止させた後、100  $\mu$ L の反応液を用いて GUS 活性を測定した。

得られた GUS 活性の値を LUC 活性の値で除することにより、プラスミド DNA 導入の際のプロトプラストの形質転換効率、およびプロトプラスト数の差を標準化し、GUS 活性値/LUC 活性値をエフェクターDNA の転写活性の値として評価した。

## 6. GFP および mRFP 蛍光の観察

シロイヌナズナの葉肉細胞を用いた一過的発現解析で形質転換したプロトプラスト、あるいは寒天培地上で14–18日間生育させたシロイヌナズナの根端を、共焦点レーザー走査型顕微鏡 LSM 5 PASCAL (Carl Zeiss) を用いて観察した。GFP 蛍光の観察は、波長 488 nm のレーザーにより GFP タンパク質を励起させ、それから発せられる波長 505–530 nm の蛍光を検出した。mRFP 蛍光の観察は、波長 543 nm のレーザーにより mRFP タンパク質を励起させ、それから発せられる波長 560–615 nm の蛍光を検出した。

## 7. RNA 実験

### 7.1. RNA の抽出

全 RNA の抽出は Satoh *et al.* (2004) の方法に若干の改変を加えて、RNAiso (TaKaRa) を利用した酸性フェノール法によって行った。

凍結保存した植物体を、多検体細胞破碎装置 (Shake Master BMS-12、バイオメディカルサイエンス) で破碎(毎分100回×1分30秒)した後に、1 mL の RNAiso を加えて攪拌した。混合液を 4°C、20,400×g で15分間遠心分離した後に、RNA を含む上清を 950  $\mu$ L 回収した。回収した上清に 200  $\mu$ L のクロロホルムを加えて、室温で5分間攪拌した。混合液を 4°C、20,400×g で10分間遠心分離した後

に、上清を 450  $\mu\text{L}$  回収し、200  $\mu\text{L}$  の High Salt Buffer [0.8 M クエン酸ナトリウム、1.2 M 塩化ナトリウム] と 200  $\mu\text{L}$  の 2-プロパノールを加えて、室温で 5 分間攪拌した。混合液を 4°C、20,400 $\times g$  で 10 分間遠心分離して、RNA を沈殿させた後に、1 mL の 75% (v/v) エタノールで 2 回洗浄した。65°C のヒートブロックで乾燥させた後に、25–80  $\mu\text{L}$  の Milli-Q 水に再溶解し、全 RNA 溶液とした。

## 7.2. RNA ゲルブロット解析

### 7.2.1. RNA の電気泳動と転写

6  $\mu\text{L}$  の RNA 溶液 [8–10  $\mu\text{g}$  RNA、Milli-Q 水でメスアップ] と 23.3  $\mu\text{L}$  の RNA 染料溶液 [0.1% (w/v) ブロモフェノールブルー (BPB, SIGMA-ALDRICH)、20% (v/v) ホルムアルデヒド液、60% (v/v) ホルムアミド、33 mg/L エチジウムブロマイド (Wako)、20 mM MOPS (DOJINDO)、8 mM 酢酸ナトリウム、1 mM EDTA (pH 8.0)] を混合し、65°C で 15 分間処理して、RNA を変性させた。その後、氷上で 5 分間静置した後に、1% RNA 用アガロースゲル [1% (w/v) アガロース、5% (v/v) ホルムアルデヒド液、20 mM MOPS、8 mM 酢酸ナトリウム、1 mM EDTA (pH 8.0)] に全量添加し、80 V、定電圧で 2 時間 20 分泳動した。泳動後のゲルは、20 $\times$ SSC [0.3 M クエン酸ナトリウム、3 M 塩化ナトリウム (pH 7.0)] に浸した濾紙を敷いたブロッキング台にうつぶせに置き、その上に 2 $\times$ SSC に浸したナイロン膜 (Biodyne B、Pall) を重ねて、軽く押さえて密着させた。ゲルの上に、濾紙 2 枚を重ね、ペーパータオル、ガラス板、重しを順に載せて 1 晩静置し、RNA をナイロン膜へ転写させた。ナイロン膜を風乾後、減圧下で加熱して 2 時間乾燥させて、RNA を膜上に固定させた。

### 7.2.2. 放射性同位体標識プローブによる標識

標識する遺伝子の cDNA がクローニングされたプラスミドを鋳型とする PCR により、RNA ゲルブロットに用いるプローブの鋳型となる DNA 断片を増幅し

た。用いたプライマー情報は表 II-3 に記した。

得られた DNA 断片の [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP 標識には BcaBEST Labeling Kit (TaKaRa) を用い、添付の説明書に従って行った。50 ng の DNA 断片を鋳型に用い、55°C で 10 分間反応させて [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP 標識 DNA 断片を得た後、セファデックス G50 カラム (GE Healthcare) を用いて精製した。得られた DNA 断片を 95°C で 3 分間加熱した後、直ちに氷上で 5 分間急冷した。得られたプローブの比活性は TRIATHLER (Hidex) を用いて測定した。RNA を転写したナイロン膜を、順に Milli-Q 水および 2×SSC に浸して平衡化した後、ハイブリダイゼーションボトル (TECHNE) に移して 30 mL のハイブリダイゼーション用緩衝液 [0.68 M リン酸水素二ナトリウム、0.28 M リン酸二水素ナトリウム、7% (w/v) SDS、10 mM EDTA] を加えて 65°C に設定した恒温槽で 2 時間以上振盪した。ハイブリダイゼーション用緩衝液を除いた後に、50 mL のハイブリダイゼーション用緩衝液と RI 標識した DNA 断片とを加えて 65°C で 1 晩振盪した。過剰な標識 DNA 断片を含むハイブリダイゼーション用緩衝液を除いた後、30 mL の 1 次洗浄液 [1×SSC、1% (w/v) SDS] を用いて 65°C で 10 分間の洗浄を 2 回行った。さらに、30 mL の 2 次洗浄液 [0.1×SSC、0.1% (w/v) SDS] を用いて 65°C で 20 分間の洗浄を 3 回行った。ナイロン膜をラップで覆った後、ImagePlate (FUJIFILM) に密着させ、1 晩露光させた。目的 RNA とハイブリダイズした標識 DNA 断片のシグナルはフルオロ・イメージアナライザー FLA-7000 (FUJIFILM) を用いて検出した。

### 7.3. 定量的 RT-PCR による解析

#### 7.3.1. 一本鎖 cDNA 合成

SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies) を用いて、全 RNA から一本鎖 cDNA を合成した。7  $\mu$ L の RNA 溶液 [1  $\mu$ g 全 RNA、0.25  $\mu$ L の 10  $\mu$ M oligo dT プライマー、0.5  $\mu$ L の 10 mM dNTP Mixture、Milli-Q 水でメスアップ]

を調製し、これを 65°C で 5 分間熱変性処理した後に氷上で 1 分以上静置した。2  $\mu\text{L}$  の 5×First-Strand Buffer、0.5  $\mu\text{L}$  の 0.1 M DTT、0.5  $\mu\text{L}$  の SuperScript III Reverse Transcriptase を加え、25°C・5 分間、50°C・120 分間、70°C・15 分間反応させて逆転写を行った。

### 7.3.2. 定量的 RT-PCR

定量的 RT-PCR は 7500 RealTime PCR system (Applied Biosystems) を使用し、反応試薬には SYBR *premix Ex Taq* (Takara) を使用した。5  $\mu\text{L}$  の 2×PCR MASTER MIX、0.2  $\mu\text{L}$  の 10  $\mu\text{M}$  順方向プライマー、0.2  $\mu\text{L}$  の 10  $\mu\text{M}$  逆方向プライマー、0.2  $\mu\text{L}$  の 50×Rox Reference Dye II を合計で 8  $\mu\text{L}$  あるいは 9  $\mu\text{L}$  になるように Milli-Q 水で調整し、鋳型として合成した cDNA を Milli-Q 水で 200 倍に希釈したものを 2  $\mu\text{L}$  あるいは 1  $\mu\text{L}$  加え 10  $\mu\text{L}$  の反応系で反応させた。使用したプライマー情報は表 II-4 に記した。反応条件は [95°C・10 分、(95°C・15 秒、60°C・60 秒) × 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、増幅産物が単一であることを確認した。検量線の作成には、合成した cDNA を 5 倍希釈したものを 1 とし、さらに 1-10<sup>5</sup> 倍に希釈した希釈系列を用いた。なお、ACT8 の測定値を内部標準として使用し、鋳型として使用した全 RNA 量の違いを標準化した。

## 8. タンパク質実験

### 8.1. タンパク質抽出

#### 8.1.1 変性条件でのタンパク質抽出

凍結した植物体を、あらかじめ液体窒素で冷やしておいた乳鉢と乳棒を用いて磨砕した。途中で 2-3 回液体窒素を継ぎ足し、粉末状になったところで、乳鉢に 9 M 尿素バッファー [9 M 尿素 (キシダ化学)、75 mM Tris-HCl (pH6.8)、1.5

(w/v) SDS、5% (v/v) 2-メルカプトエタノール (2-ME, SIGMA-ALDRICH)、Milli-Q 水でメスアップ] を、植物体の生重量の 3 倍量加えてさらに磨砕し、室温で静置して試料を溶解させた。なお 9 M 尿素バッファーは 50°C の恒温槽で溶解してから使用した。その後、試料を 1.5 mL 容微量遠心管に移し、ボルテックスミキサーで室温にて 15 分間攪拌した。4°C、20,400×g で 20 分間遠心分離し、上清を回収した。タンパク質濃度は、タンパク質抽出液を Milli-Q 水で 5 倍希釈した 1×プロテインスタンダード I (Bio-Rad) に対して 1/500 量加えて、ブラッドフォード法により 595 nm の吸光度で測定した。検量線は、1% (w/v) BSA (Takara) を、あらかじめ 1/500 量の 9 M 尿素バッファーを加えた 1×プロテインスタンダード I で、2,000、1,000、500、200 および 100 倍に希釈した希釈系列を用いて作製した。抽出液の濃度は、1.5–2 μg/μL になるように 9 M 尿素バッファーで調整し、95°C で 3 分間熱変性処理した後に、氷上で 1 分以上静置した。

#### 8.1.2 非変性条件でのタンパク質抽出

液体窒素中で凍結した植物材料を、あらかじめ海砂と液体窒素を加えて冷やしておいた乳鉢と乳棒を用いて磨砕した。粉末状になるまで磨砕した後、植物材料の生重量の 3 倍量の抽出緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM 塩化ナトリウム、1% (v/v) TritonX-100、1×cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)] の入った 1.5 mL 容微量遠心管に入れてボルテックスミキサーで直ちに攪拌し、氷上で 15 分間静置した。この間、ボルテックスミキサーで 5 分毎に約 10 秒間攪拌した。4°C、3,600×g、10 分間遠心分離し、上清を滅菌済みのミラクロス (CALBIOCHEM) で濾し、新しい遠心管に移した。さらに、4°C、13,000×g、10 分間遠心分離し、上清を回収してタンパク質抽出液とした。

#### 8.2 免疫沈降

免疫沈降は、μMACS エピトープタグアイソレーションキットを使用し、添

付の説明書に記載された方法に若干の改変を加えて行った。8.1.2. で調製したタンパク質抽出液に 50  $\mu$ L の  $\mu$ MACS MicroBeads を加えて転倒混和し、氷上で 30 分間静置した。マグネットスタンドに  $\mu$  Column または M Column (Miltenyi Biotec) を設置し、100  $\mu$ L の 1 $\times$ cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets を含まない抽出緩衝液でカラムを湿潤させた。湿潤させたカラムに試料を全量添加し、カラム中に  $\mu$ MACS MicroBeads を固定した。洗浄液 I [50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM 塩化ナトリウム、1% (v/v) Triton-X100] を 500  $\mu$ L 添加し、自然流下により洗浄した。この洗浄操作を 4 回繰り返す、さらに 100  $\mu$ L の洗浄液 II [20 mM Tris-HCl (pH 7.5)] で洗浄した。あらかじめ 95 $^{\circ}$ C に加熱した溶出液 [0.1 M Tris-HCl (pH 6.8)、50 mM DTT、1% (w/v) SDS、1 mM EDTA (pH8.0)、0.005% BPB、10% (v/v) グリセロール] を 20  $\mu$ L 添加してカラム上で 5 分間放置し、さらに 50  $\mu$ L 添加して溶出し、全量 (約 50  $\mu$ L) を回収した。

### 8.3. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

分離ゲルのアクリルアミド濃度は目的のタンパク質の分子量に合わせて、8.5–10.5% (v/v) に調整した。自作の SDS-PAGE ゲルは、泳動プレート (106 mm (幅) $\times$ 100 mm (高)、スペーサー厚 1 mm、日本エイドー) に、5.5 mL の分離ゲル [相当量の 30% (w/v) アクリルアミド溶液 (Wako)、0.375 M Tris-HCl (pH 8.8)、1% (w/v) SDS (Wako)、0.1% (w/v) 過硫酸アンモニウム (SIGMA-ALDRICH)、0.075% (v/v) tetramethylethylenediamine (TEMED, Kdak)]、3 mL の濃縮ゲル [4% (w/v) 相当量の 30% (w/v) アクリルアミド溶液 (Wako)、0.125 M Tris-HCl (pH 6.8)、1% (w/v) SDS、0.1% (w/v) 過硫酸アンモニウム、0.075% (v/v) TEMED] の順に重層して作製した。電気泳動は、泳動プレートを設置した泳動槽 (ATTO) に、泳動用緩衝液 [3.03 g/L Tris (Wako)、14.4 g/L グリシン (Wako)、1% (w/v) SDS] を注ぎ、濃縮ゲル中ではゲル 1 枚当たり 4–8 mA、分離ゲル中ではゲル 1 枚当たり 8–16 mA で泳動し、分子量マーカー (Precision Plus Protein Dual Color Standards、



Bio-Rad) の泳動度を目安に、目的のタンパク質がゲルの中央にくるまで分離した。

#### 8.4. イムノブロット解析

##### 8.4.1. メンブレンへの転写

メンブレン (Immobilon-P、Merck Millipore) は、メタノール (特級、Wako) に数 10 秒間浸して親水化処理後、ブロッキング溶液 [5% (v/v) メタノール、12.1 g/L Tris、14.4 g/L グリシン] に 15 分以上浸漬して馴染ませた。SDS-PAGE 後のゲルは、ブロッキング溶液に浸して 10 分間振盪した。セミドライ式ブロッキング装置 (ATTO) の陽極電極板をブロッキング溶液で湿らせ、あらかじめブロッキング溶液で膨潤させておいたろ紙 (ブロッキング用、Bio-Rad)、メンブレン、ゲルおよびろ紙の順に重ねて、気泡を除いてから陰極板を載せて固定した。メンブレン 1 cm<sup>2</sup> 当たり 2 mA の定電流で 75 分間かけて、タンパク質をメンブレンに転写した。

##### 8.4.2. ブロッキング

転写後のメンブレンは、50 mL のブロッキング溶液 (1×TBS-T [20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.8% (w/v) 塩化ナトリウム、0.1% (v/v) Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate (Tween20 相当品、Wako)] に 5% (w/v) のスキムミルク (Wako) を溶解したもの) に浸して、室温、45 rpm で 1 時間振盪し、ブロッキングした。

##### 8.4.3. 抗原抗体反応

ブロッキング後のメンブレンは、タグ特異的な一次抗体あるいは抗 DREB2A 抗体を用いて標識した。抗 GFP 抗体 (Roche) (1:2,000) あるいは当研究室の溝井順哉博士から分与された抗 DREB2A 抗体 (1:1,500) を、括弧内に表記した濃度になるように、メンブレン 1 枚当たり 5 mL の 1×TBS-T で希釈して用いた。

二次抗体には、それぞれの一次抗体に対応した、HRP（西洋ワサビペルオキシダーゼ）修飾抗ウサギ IgG 抗体 (SIGMA-ALDRICH) あるいは HRP 修飾抗マウス IgG 抗体 (SIGMA-ALDRICH) を 10 mL の 1×TBS-T で 1/10,000 倍に希釈して用いた。一次抗体反応は、室温、50 rpm で 2 時間、二次抗体反応は、室温、50 rpm で 1 時間行った。

#### 8.4.4. 検出

検出には、ECL Plus (GE Healthcare) を使用した。ECL 溶液は、検出する直前に、A 溶液と B 溶液を 25 : 1 の比率で混合してメンブレン 1 cm<sup>2</sup> あたり 0.25 mL の容量で使用した。卓上に広げたラップにメンブレンを載せ、ECL 溶液をメンブレンの表面になじませ、5 分間反応させた。余分な ECL 溶液をキムワイプで十分に切って、はがき用クリアフィルム（コクヨ）に挟んで、LAS3000 (FUJIFILM) を用いて検出した。

#### 8.4.5. 抗体の剥離

検出した後のメンブレンを、1×TBS-T で 15 分間振盪して洗浄した後に、リブロービング溶液 [62.5 mM Tris-HCl (pH 6.79)、100 mM 2-メルカプトエタノール、2% (w/v) SDS] に浸して、75°C の恒温槽にて 30 分間処理し、抗体を剥離した。その後、1×TBS-T で 15 分間の洗浄を 2 回繰り返した後に、再度ブロッキングを行い、抗原抗体反応に用いた。

#### 8.5. ポンソー S 染色

検出した後のメンブレンを、1×TBS-T で 3 分間洗浄し、ポンソー S 染色液 [0.1 % (w/v) ポンソーS (SIGMA-ALDRICH)、5% (v/v) 酢酸] に浸して 1 分間振盪して発色させ、Milli-Q 水で 2 回洗浄した。水気をキムワイプで十分に切って、はがき用クリアフィルムに挟み、スキャナー (EPSON) で取り込んだ。

## 結果

### 1. 乾燥ストレスおよび高温ストレス条件下でのシロイヌナズナ植物体における DREB2A タンパク質の蓄積

シロイヌナズナ植物体における野生型 DREB2A タンパク質の蓄積量を調べるために、DREB2A に対するウサギポリクローナル抗体の分与を受けた。この抗体は、DREB2A の NRD に続くカルボキシル末端側の保存性の低い領域（166 残基目から 335 残基目までの領域）に対して設計された（図 II-1A）。抗体が DREB2A を特異的に認識することを確認するために、GFP あるいは GFP-DREB2A を構成的に発現する形質転換シロイヌナズナ (*35S::GFP* あるいは *35S::GFP-DREB2A*、Sakuma *et al.*, 2006a) から、GFP あるいは GFP-DREB2A に対して抗 GFP 抗体を用いた免疫沈降を行い、得られた免疫沈降産物に対して抗 DREB2A 抗体を用いたイムノブロット解析を行った（図 II-1B）。その結果、*35S::GFP-DREB2A* から得られた免疫沈降画分において GFP-DREB2A に相当する分子量の位置にシグナルが検出され、これは免疫沈降に用いた抗体とは別の抗 GFP 抗体によっても同じ位置において検出された。*35S::GFP* から得られた免疫沈降画分においては、抗 DREB2A 抗体によるシグナルは検出されず、抗 GFP 抗体によってのみ、GFP に相当する分子量の位置にシグナルが検出された。これに加えて、DREB2A に最も類似したアミノ酸配列を持つ相同タンパク質である DREB2B を用いて (Sakuma *et al.*, 2002)、抗 DREB2A 抗体の特異性を評価した。*Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*) で一過的に発現させた GFP-DREB2A と GFP-DREB2B に対して抗 GFP 抗体を用いた免疫沈降を行い、得られた免疫沈降産物に対してイムノブロット解析を行った（図 II-1C）。その結果、抗 DREB2A 抗体により GFP-DREB2A は検出されたが、GFP-DREB2B (安田 2009、修士論文) は検出されなかった。一方、抗 GFP 抗体を用いた場合は GFP-DREB2A と GFP-DREB2B は同程度に検出された。したがって、抗 DREB2A 抗体は DREB2A を特異的に認識することが確かめられた。

次に、乾燥および高温ストレス下での、シロイヌナズナ植物体における DREB2A タンパク質の蓄積パターンを調べるために、野生型シロイヌナズナに乾燥処理（図 II-2A）あるいは高温処理（図 II-2B）を行い、抗 DREB2A 抗体を用いたイムノブロット解析を行った。陰性対照として、*DREB2A* 欠損変異体 (*dreb2a*, Sakuma *et al.*, 2006a) を用い、同様に解析した。その結果、乾燥処理時と高温処理時では、いずれも内在性の DREB2A が蓄積することが明らかになった。しかし、DREB2A タンパク質の蓄積パターンはそれぞれ異なっており、乾燥処理時は、処理開始後 5 時間で検出され、その後は処理時間の経過に従って蓄積量が増加したのに対し、高温処理時は処理開始後 0.5 時間で検出された後 1 時間から 2 時間にかけて最大量に達し、5 時間以降は蓄積量が減少した（図 II-1B）。こうした DREB2A の蓄積は、*DREB2A* 欠損変異体においてはみられなかった。また、このときの *DREB2A* mRNA の蓄積量についても同時に処理した植物体を用いて解析した（図 II-2）。その結果、先行研究の結果と同様に (Sakuma *et al.*, 2006b)、*DREB2A* mRNA は、乾燥処理時は処理時間の経過に従って次第に増加する蓄積パターンを示した（図 II-2A）。また、高温処理時は処理開始後 0.5 時間程で最大に達し、その後 1 時間以内に素早く減少する一過的な発現パターンを示した（図 II-2B）。このように、乾燥および高温ストレス下では、DREB2A タンパク質の蓄積量の変化は、*DREB2A* mRNA の蓄積量の変化にやや遅れて対応していた。一方、*35S::GFP-DREB2A* 形質転換シロイヌナズナの GFP 蛍光観察から、DREB2A タンパク質は通常条件下では過剰に発現させても蓄積しないと考えられている (Sakuma *et al.*, 2006a)。このため、野生型シロイヌナズナにおける DREB2A タンパク質の蓄積は DREB2A が乾燥ストレスと高温ストレスに応答して安定化したことを示唆する。

## 2. DREB2A の分解は高温ストレス下では抑制される

DREB2A の安定性がストレス下では向上することを確かめるために、通常条

件下 (22°C) と高温ストレス下 (37°C) における DREB2A タンパク質の分解速度を比較した。材料にはシロイヌナズナ培養細胞を用い、形質転換により構成的に発現させた GFP を内部標準として DREB2A の蓄積量を標準化した。培養細胞を用いた利点には、均質な材料が得られやすく、ストレスや薬剤による処理が素早くかつ均一に施せる点が挙げられる (Sokol *et al.*, 2007)。実験系の概略を図 II-3A に示す。内在性の DREB2A を蓄積させるために、培養細胞を前処理として 37°C で 1 時間振盪した。次に、新たな DREB2A の翻訳を阻害するために、タンパク質の合成阻害剤シクロヘキシミド (cycloheximide, CHX) を加えて 37°C で 1 時間振盪した。続いて、CHX 存在下でプロテアソーム阻害剤 MG132、あるいは陰性対照として DMSO のみによる処理を行い、37°C で 1 時間振盪した。これらの細胞を 37°C で維持、あるいは 22°C に移して振盪し、時間軸に沿って DREB2A タンパク質の蓄積量をイムノブロット法により解析した (図 II-3A)。その結果、DREB2A タンパク質の蓄積量は、MG132 非存在下において 22°C では急激に減少したが、37°C では僅かにしか減少しなかった (図 III-3B, C)。しかし、MG132 存在下においては、こうした DREB2A タンパク質の蓄積量減少が、37°C と 22°C いずれの温度条件でもほとんどみられなかった (図 III-3B, C)。以上の結果より、通常条件下では 26S プロテアソームによる選択的分解により負に制御されている DREB2A の安定性が、高温ストレス下では向上することが示された。

### 3. プロテアソームに依存した DREB2A の分解は核内で制御される

先行研究において、通常条件下では、E3 ユビキチン連結酵素である DRIP (DRIP1 および DRIP2) が DREB2A を認識し、26S プロテアソームを介した分解制御を通じて DREB2A を不安定化することが示されている (Qin *et al.*, 2008)。DRIP1 や DRIP2 の GFP 融合タンパク質は、シロイヌナズナ植物体において通常条件下で核に優位に局在し、さらに、タマネギの表皮細胞を用いた Bimolecular

Fluorescence Complementation (BiFC) 解析から、タマネギの表皮細胞の核において DREB2A と相互作用することが示されている (Qin *et al.*, 2008)。しかし、DREB2A の分解制御が、核内の DRIP1 や DRIP2 を介したユビキチン-プロテアソーム系にのみ依存するのかは明らかでない。その他にも、DREB2A を認識する別の E3 ユビキチン連結酵素が存在する可能性や、DREB2A が細胞質で翻訳されてから核に移行するまでの段階で、別の制御を受ける可能性もある。そこで、こうした可能性を確かめるために、まずは DREB2A の分解制御が核移行に依存するのかが解析した。DREB2A はアミノ (N) 末端側にアルギニンとリシンが連続する典型的な核移行シグナル (Nuclear localization signal, NLS) の特徴を持つ領域が 2 か所存在し、Liu *et al.* (1998) によってこれらが DREB2A の NLS、NLS1 および NLS2 であると予測された (図 II-4A)。そこで、これらの NLS が DREB2A の核移行に機能するのかが調べるために、NLS1 および NLS2 のいずれか一方、あるいは両方を欠失させた変異型 DREB2A (DREB2A  $\Delta$ 1、DREB2A  $\Delta$ 2 あるいは DREB2A  $\Delta$ 1/2) を構築し、シロイヌナズナ細胞における細胞内局在を解析した (図 II-4B)。シロイヌナズナの葉肉細胞由来のプロトプラストを用いた一過的発現系において、CaMV 35S RNA プロモーター制御下で GFP とこれらの変異型 DREB2A との融合タンパク質 (GFP-DREB2A  $\Delta$ 1、GFP-DREB2A  $\Delta$ 2 あるいは GFP-DREB2A  $\Delta$ 1/2) を発現させ、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて GFP 蛍光を観察した (図 II-4B)。またこのとき核局在の陽性対照として、mRFP と Histone 2B との融合タンパク質 (Histone 2B-mRFP) を用い、GFP 融合タンパク質と共発現させた (図 II-4B; Kidokoro *et al.*, 2009)。その結果、二つの NLS のいずれか一方を欠失させた GFP-DREB2A  $\Delta$ 1 および GFP-DREB2A  $\Delta$ 2 の GFP 蛍光は mRFP 蛍光と重なって、核で観察された。これらの結果は、GFP-DREB2A の観察結果と類似していた。一方、両方の NLS を欠失させた GFP-DREB2A  $\Delta$ 1/2 の GFP 蛍光は、細胞質において優位に観察された。これらの結果から、予想された二つの NLS はいずれも DREB2A の NLS として機能しており、一方のみ

でも十分に機能し得ることが示された。

次に、DREB2A の核移行と DREB2A タンパク質の安定性の関係について調べるために、これらの変異型 GFP-DREB2A タンパク質の蓄積量を、イムノブロット法により解析した (図 II-4C)。その結果、GFP-DREB2A  $\Delta 1$  と GFP-DREB2A  $\Delta 2$  のタンパク質蓄積量が全長 GFP-DREB2A の蓄積量とあまり変わらなかったのに対し、GFP-DREB2A  $\Delta 1/2$  の蓄積量は全長 GFP-DREB2A と比べて顕著に多かった (図 II-4C)。さらに、これらの変異型 GFP-DREB2A が DREB2A 転写因子としての機能を維持しているのか確かめるために、シロイヌナズナの葉肉細胞由来のプロトプラストを用いた一過的発現系において、転写活性化能の測定を行った (図 II-5)。まず、全長 GFP-DREB2A が、タグを付加していない DREB2A と同様に、レポーター遺伝子 (シロイヌナズナの *RD29A* 遺伝子由来の DRE 配列を含む DNA 断片 3 反復の下流に *GUS* コード配列を繋いだ組換え遺伝子) の転写を活性化するのか解析した (図 II-5)。このとき、GFP を融合した DREB2A がタグを付加していない DREB2A と同様の性質を維持しているのか確認するため、全長 DREB2A と同時に DREB2A CA についても解析した。その結果、GFP-DREB2A と GFP-DREB2A CA はともに転写活性化能を示した (図 II-5)。また、GFP-DREB2A CA の転写活性化能は全長 GFP-DREB2A と比べて顕著に高くなった (図 II-5)。以上のことから GFP-DREB2A はタグを付加していない DREB2A と同様の性質を維持することが確認された。続いて、変異型 GFP-DREB2A についても解析したところ、GFP-DREB2A  $\Delta 1$  と GFP-DREB2A  $\Delta 2$  は、全長 GFP-DREB2A よりもやや高いかほとんど同程度の転写活性化能を示したが、一方、GFP-DREB2A  $\Delta 1/2$  はほとんど転写活性化能を示さず、ベクター対照と同程度であった。この結果は、これらのタンパク質の細胞内局在と対応しており、二つの NLS の欠失による DREB2A の転写活性化能の低下は、核移行が損なわれることに起因していると考えられた。したがって、DREB2A は二つの NLS のいずれか一方を欠失させても、核内に局在して 26S プロテアソ

ームを介した分解制御を受けるが、細胞質にとどまった場合は核内に移行した場合よりもタンパク質の安定性が向上することが示唆された。

次に、シロイヌナズナ植物体においても、二つの NLS が DREB2A の細胞内局在や安定性に影響するのか調べるために、これらの変異型 GFP-DREB2A を DREB2A 欠損変異体の遺伝的背景において構成的に発現する形質転換シロイヌナズナ (*GFP-DREB2As/dreb2a*) を作出した (図 II-6)。それぞれの形質転換シロイヌナズナについて、導入遺伝子の発現量の異なる 2 ライン (発現の強いラインおよび弱いライン) を選抜した (図 II-6A)。通常条件下で、選抜した *GFP-DREB2As/dreb2a* における GFP-DREB2As の GFP 蛍光を観察した (図 II-6B)。その結果、全長の GFP-DREB2A、GFP-DREB2A  $\Delta 1$  および GFP-DREB2A  $\Delta 2$  は核において弱い GFP 蛍光が観察された。一方、GFP-DREB2A  $\Delta 1/2$  の GFP 蛍光は細胞質において強く観察された (図 II-6B)。これらの結果は、シロイヌナズナのプロトプラストにおける観察結果と一致していた (図 II-4B)。次に、高温ストレス下でも GFP 蛍光を観察したところ、全長の GFP-DREB2A、GFP-DREB2A  $\Delta 1$  および GFP-DREB2A  $\Delta 2$  の GFP 蛍光は、通常条件下と細胞内局在は変わらず核において観察されたが、その蛍光シグナルは通常条件下に比べて顕著に強かった。一方、GFP-DREB2A  $\Delta 1/2$  の GFP 蛍光は、通常条件下と細胞内局在も蛍光シグナルの強度も同様であり、依然として細胞質において強く観察された (図 II-6B)。次に、通常条件下および高温ストレス下での *GFP-DREB2As/dreb2a* における GFP-DREB2As の蓄積量をイムノブロット法により解析した (図 II-6C)。その結果、通常条件下での GFP-DREB2As の蓄積量は、シロイヌナズナのプロトプラストでの結果と一致しており (図 II-4C)、GFP-DREB2A  $\Delta 1$  と GFP-DREB2A  $\Delta 2$  の蓄積量は全長の GFP-DREB2A と同程度であったが、GFP-DREB2A  $\Delta 1/2$  の蓄積量は全長の GFP-DREB2A と比べて顕著に強くなっていた (図 II-6C)。一方、高温ストレス下では、全長の GFP-DREB2A、GFP-DREB2A  $\Delta 1$  および GFP-DREB2A  $\Delta 2$  では蓄積量が通常条件下に比べて増



加したのに対し、GFP-DREB2A  $\Delta 1/2$  の蓄積量にはほとんど違いが見られなかった (図 II-6C)。しかし、高温ストレス下で、全長の GFP-DREB2A、GFP-DREB2A  $\Delta 1$  および GFP-DREB2A  $\Delta 2$  の蓄積量が増加しても、その蓄積量は GFP-DREB2A  $\Delta 1/2$  の蓄積量には到底満たない量であった (図 II-6C)。これらの結果から、GFP-DREB2A  $\Delta 1/2$  を除く GFP-DREB2As は、細胞質で翻訳された後、速やかに核に移行し、通常条件下に加えて高温ストレス下でも部分的に分解制御を受けることが示唆された。したがって、DREB2A の安定性の制御は、程度の違いはあっても高温ストレスの有無にかかわらず継続しており、核移行に依存していることが示された。

#### 4. E3 ユビキチン連結酵素 DRIP1 および DRIP2 は、通常条件下に加えて、ストレス下でも DREB2A の分解制御に関与している

DREB2A は通常条件下に加えて、高温ストレス下でも部分的に核移行に依存したユビキチン-プロテアソーム系による分解制御を受けることが示唆された。先行研究において、通常条件下での DREB2A の分解制御には、DRIP1 および DRIP2 が E3 ユビキチン連結酵素として、26S プロテアソームを介した分解制御において機能することが示されている (Qin *et al.*, 2008)。しかし、DRIP1 および DRIP2 が DREB2A のストレス条件下における安定性の制御に関与しているかは明らかになっていない。そこで、通常条件下に加え乾燥および高温ストレス下における DREB2A の蓄積量を、DRIP1 の欠損変異体 *drip1*、および DRIP1 と DRIP2 の二重欠損変異体 *drip1 drip2* において解析した (図 II-7)。その結果、通常条件下では、いずれの植物体においても DREB2A の蓄積が検出されなかったが、乾燥および高温ストレス下では、ピークに達したときの DREB2A の蓄積量が *drip1* および *drip1 drip2* では野生型に比べて増加しており、その傾向は欠損した DRIP 遺伝子の数が多い *drip1drip2* においてより顕著であった (図 II-7)。以上の結果から、DRIP1 および DRIP2 が通常条件下に加えてストレス下でも

DREB2A の分解制御に関わっていることが示唆された。一方、高温処理 2 時間の時点で最大に達した DREB2A の蓄積量は、高温処理 24 時間では *drip1 drip2* においても野生型と同程度までに減少していた。そこで、このような高温ストレス処理の後半に見られる DRB2A の蓄積量の減少が、26S プロテアソームを介した分解制御に依存するのかを調べるために、野生型シロイヌナズナ植物体を MG132 存在下で高温処理し、DREB2A タンパク質の蓄積量を解析した (図 II-8A)。その結果、MG132 存在下では、高温処理 24 時間経過後も、DREB2A の蓄積量の減少が見られなかった (図 II-8A)。さらに、*drip1 drip2* においても、MG132 存在下で高温処理し、DREB2A タンパク質の蓄積量を解析したところ、野生型シロイヌナズナと同様に、高温処理 24 時間経過後も DREB2A の蓄積量の減少が見られなかった (図 II-8B)。以上の結果から、通常条件下および高温ストレス下に加えて乾燥ストレス下でも 26S プロテアソームが介する分解制御による DREB2A の安定性の制御が行われており、これには DRIP1 および DRIP2 が関与しているが、少なくとも、高温ストレスの後半に見られた DREB2A の分解には DRIP1 および DRIP2 とは別の E3 ユビキチン連結酵素が DREB2A の認識に機能している可能性が示唆された。

##### 5. 乾燥および高温ストレス下において、DREB2A タンパク質の蓄積量は、DREB2A 標的遺伝子の mRNA 蓄積量に影響する

高温ストレス下では、シロイヌナズナ植物体において DREB2A タンパク質の安定性が向上することが示されたが、乾燥ストレス下での DREB2A の安定性については明らかになっていない。そこで、高温ストレス下に加えて乾燥ストレス下でも DREB2A の安定性を調べるために、これまで解析を行ってきた *GFP-DREB2A/dreb2a* 形質転換シロイヌナズナのうち導入遺伝子の発現量の強いライン d と、これとは独立したライン m を選抜し、これらの植物体 (*GFP-DREB2A/dreb2a-d* および *GFP-DREB2A/dreb2a-m*) に乾燥処理あるいは高

温処理を行い、DREB2A タンパク質の蓄積量をイムノブロット法により解析した (図 II-9)。この解析において、*GFP-DREB2A/dreb2a* では、GFP-DREB2A を構成的に発現させているので、*DREB2A* の転写段階の制御による影響を除くことができる (図 II-2)。解析の結果、*GFP-DREB2A/dreb2a* における DREB2A の蓄積量は、乾燥処理時間の経過にともなって増加しており、野生型シロイヌナズナと比較するとより早い段階でみられた (図 II-9A)。一方、高温処理によっても、処理時間の経過にともなった DREB2A 蓄積量の顕著な増加がみられたが、野生型において高温処理 5 時間以降にみられた減少がみられず、高温処理 24 時間後も高い蓄積量が維持された (図 II-9B)。以上の結果から、高温ストレス下に加えて乾燥ストレス下においても DREB2A の安定性が向上することが示された。また、野生型シロイヌナズナにおいて観察された DREB2A タンパク質の蓄積パターンは、*DREB2A* 遺伝子の転写段階での制御と翻訳後のタンパク質の安定性の制御の両方の影響を合わせた結果であることが示唆された (図 II-2, 9)。

次に、DREB2A の蓄積量が標的遺伝子の発現量に及ぼす影響を調べるために、*GFP-DREB2A/dreb2a* においてストレス下で、GFP-DREB2A が蓄積した時の、DREB2A 標的遺伝子の mRNA 蓄積量を解析した (図 II-9)。DREB2A の標的遺伝子には、乾燥応答性遺伝子として *RD29B* および *Atlg52690*、高温応答性遺伝子として *HsfA3* および *At4g36010* をそれぞれ選んだ。これらの遺伝子はいずれも、転写開始点の上流 1000 bp 以内に DRE を持ち、尚且つ、通常条件下で *35S:DREB2A CA* において強く誘導され、逆に *dreb2a* においては発現が半分以下にまで発現が低下することが報告されている遺伝子である (Sakuma *et al.*, 2006a, b)。解析の結果、乾燥ストレス下では、*GFP-DREB2A/dreb2a* における *RD29B* と *Atlg52690* の mRNA の蓄積が、野生型と比較して早い段階でみられ、蓄積量も増加していた (図 II-9A)。一方、高温ストレス下では、*GFP-DREB2A/dreb2a* における *HsfA3* と *At4g36010* の mRNA の蓄積が、野生型と比較して早い段階でみられ蓄積量も増加していた (図 II-9B)。これらの結果は、*GFP-DREB2A/dreb2a*

においては、野生型と比較してストレスに応答した DREB2A タンパク質の蓄積がより早く蓄積量も多いことと一致していた (図 II-2, 9)。こうした DREB2A タンパク質の蓄積量と標的遺伝子の mRNA 蓄積量との正の相関は、ストレスを受けて DREB2A が安定化し、その蓄積量が増加することが標的遺伝子の転写誘導にとって重要であることを示唆する。

6. 通常条件下でプロテアソーム 阻害剤処理により DREB2A タンパク質を蓄積させても、DREB2A 標的遺伝子の転写活性化には不十分である

これまでの解析から、シロイヌナズナ植物体において、乾燥および高温ストレス下で DREB2A タンパク質がストレスに応答して安定化し蓄積量が増加すること、およびこの時の DREB2A の蓄積量と DREB2A 標的遺伝子の mRNA 蓄積量の間には、正の相関があることが示された (図 II-9)。しかし、乾燥ストレス下の *GFP-DREB2A/dreb2a* においては、DREB2A の蓄積量と DREB2A 標的遺伝子の mRNA 蓄積量の変化のパターンには一致しない部分もあり、DREB2A 標的遺伝子の発現には、DREB2A の蓄積量に加えて別の要因がある可能性が考えられる。そこで、DREB2A 標的遺伝子の転写を誘導するためには、DREB2A タンパク質が安定化して蓄積するだけで十分なのか、それともストレスによって DREB2A タンパク質が安定化に加えて活性化を受ける必要があるのかを調べるために、*GFP-DREB2A/dreb2a* を通常条件下でプロテアソーム阻害剤処理し、*GFP-DREB2A* を蓄積させて、その蓄積量と標的遺伝子の発現量の関係について解析した (図 II-11, 12)。もし、DREB2A タンパク質が安定化するだけで転写活性を示すのに十分であれば、通常条件下でも DREB2A タンパク質が蓄積すれば標的遺伝子の転写が活性化されると考えられる。

プロテアソーム阻害剤 MG132 は、26S プロテアソームの構成要素である 20S プロテアソームに加えて、いくつかのプロテアーゼにも部分的に作用することが知られている (Kisselev *et al.*, 2001)。そこで、この解析に先立って MG132 処理

による DREB2A の蓄積が 26S プロテアソームを介した分解経路を阻害したことにより、異なるプロテアソーム阻害剤やプロテアーゼ阻害剤を用いて DREB2A タンパク質の安定性を解析した (図 II-10)。プロテアソーム阻害剤には、MG132 に加えて、MG115 および Epoxomicin を用い、プロテアーゼ阻害剤には一般的なセリン/システインプロテアーゼ阻害剤である Leupeptin および PMSF を用いた。その結果、プロテアソーム阻害剤 (MG132、MG115 および Epoxomicin) 存在下では、構成的プロモーター制御下で DREB2A を発現する形質転換シロイヌナズナ *35S:DREB2A/WT* (Liu *et al.*, 1998) において、DREB2A の蓄積量が顕著に増加したのに対し、プロテアーゼ阻害剤 (Leupeptin および PMSF) 存在下では DREB2A の蓄積はみられなかった (図 II-10)。よって、MG132 処理による DREB2A の蓄積が、26S プロテアソームを介した分解制御を阻害したことによる特異的な効果であることが示された。プロテアソーム阻害剤の MG132、MG115 と Epoxomicin の間では同程度の効果が見られたことから (図 II-10)、以降の解析にはプロテアソーム阻害剤として MG115 あるいは MG132 を用いることにした。

最初に、通常条件下で *GFP-DREB2A/dreb2a* に MG115 あるいは MG132 処理を行ったところ、高温ストレス処理を行った場合と同程度に GFP-DREB2A が蓄積した (図 II-11A, 12A)。ところが、DREB2A 標的遺伝子の発現は、高温ストレス処理を行った場合とは異なり、GFP-DREB2A の蓄積量の増加とは相関せず、いずれの処理時間においてもほとんど誘導がみられなかった (図 II-11B, 12B)。しかしこの実験系では、プロテアソーム阻害剤処理が DREB2A の分解制御のみでなく、基本転写因子や RNA ポリメラーゼ II などの機能を阻害したために、標的遺伝子の転写誘導が抑制された可能性も考えられる。そこで、プロテアソーム阻害剤処理と同時に高温処理を行うことで、DREB2A 標的遺伝子の転写が誘導されるのか調べた。その結果、プロテアソーム阻害剤存在下でも高温処理を行うことで、DREB2A 標的遺伝子の mRNA 蓄積量が、高温処理のみの場合

と同程度まで増加することが示された (図 II-11B, 12B)。したがって、通常条件下でプロテアソーム阻害剤処理により DREB2A タンパク質が安定化し蓄積しても、DREB2A 標的遺伝子の転写がほとんど誘導されないことが示された。以上の解析から、ストレス下において DREB2A の蓄積量は標的遺伝子の mRNA 蓄積量に影響するが、標的遺伝子の転写が活性化されるためには DREB2A が蓄積するだけでは不十分であり、ストレス条件特異的な DREB2A タンパク質の活性制御が必要であることが示唆された。

## 考察

これまでの先行研究により、*DREB2A* 遺伝子の機能発現にとって、*DREB2A* タンパク質の分解制御を含めた翻訳後制御が重要であることが示唆されてきたが、実際にシロイヌナズナ植物体において、乾燥や高温ストレス下で *DREB2A* タンパク質の蓄積量がどのように変化するのは明らかになっていなかった (Sakuma *et al.*, 2006a,b; Qin *et al.*, 2008)。本研究では、新たに作製された抗 *DREB2A* 抗体を用い、野生型のシロイヌナズナ植物体において、内在性の *DREB2A* の蓄積パターンを解析した (図 II-2)。この解析により、乾燥および高温ストレス下における *DREB2A* の蓄積パターンは、*DREB2A* mRNA の蓄積パターンと少し時間的な遅れはあるものの、類似していることが明らかになった。したがって、*DREB2A* の蓄積量の変化には、ストレスによって誘導された *DREB2A* mRNA の蓄積量の変化の影響が反映されていると考えられた。しかし、同時に、こうしたストレス下で *DREB2A* タンパク質がストレスによって安定化されることを示す直接的な実験結果も得られた。37°C の高温ストレス下で培養したシロイヌナズナ培養細胞においては、*DREB2A* タンパク質が蓄積するが、CHX 処理により新たなタンパク質合成を阻害した後に 22°C の通常条件に戻すと、急激に *DREB2A* の蓄積量が減少した。一方、37°C に保った状態ではほとんど変化しないことが示された (図 II-3B)。また、形質転換シロイヌナズナ *GFP-DREB2A/dreb2a* においては、構成的に *GFP-DREB2A* を発現しているにも関わらず、通常条件下ではほとんど *GFP-DREB2A* を蓄積せず、乾燥および高温ストレスに曝すことで蓄積量が増加することも示された (図 II-9A)。従って、これらのストレスが刺激となって、*DREB2A* タンパク質が安定化することが、*DREB2A* タンパク質の蓄積量増加に繋がることが示された。

一方、野生型シロイヌナズナ植物体において、高温処理 5 時間以降では、ストレス処理に伴って増加した *DREB2A* の蓄積量が減少していく現象がみられた (図 II-2B)。しかし、そうした *DREB2A* タンパク質の蓄積量減少は、プロテ

アソーム阻害剤存在下で高温処理を行うことで抑制された (図 II-3C, 8)。これまでに通常条件下で DREB2A の分解制御に関わることが報告されていた DRIP1 と DRIP2 の欠損変異体 *drip1* および *drip1 drip2* においては、乾燥および高温ストレス下での DREB2A タンパク質の蓄積量が、野生型シロイヌナズナと異なっていたことから、DRIP1 と DRIP2 がこうしたストレス下でも DREB2A の分解制御に機能する可能性が示唆された (図 II-7)。しかし、高温ストレス下で 24 時間処理した *drip1 drip2* においても、処理に伴って増加した DREB2A の蓄積量は、野生型と同程度まで減少していた (図 II-7)。さらに、こうした減少が野生型の場合と同様に MG132 処理により抑制されたことから (図 II-8)、少なくとも、高温ストレス処理の後半には DREB2A の分解に関わる DRIP とは別の E3 ユビキチン連結酵素が DREB2A の 26S プロテアソームを介した分解制御に機能していることが示唆された。

DREB2A の核移行シグナルを欠損させた変異型 DREB2A の解析により、DREB2A の分解制御について、新たな知見が得られた。DREB2A の二つの NLS の両方を欠失させた変異型 DREB2A (GFP-DREB2A  $\Delta$ 1/2) は、通常条件下でもストレス下でも細胞質に優位に局在し、タンパク質の安定性が向上した (図 II-4, 6)。GFP-DREB2A  $\Delta$ 1/2 の蓄積量は通常条件下でも全長 DREB2A と比べて著しく増加しており、高温ストレスを与えてもほとんど変化しなかった (図 II-6C)。また、GFP-DREB2A  $\Delta$ 1/2 の蓄積量は、高温ストレス下の GFP-DREB2A と比較しても遥かに上回る量であった (図 II-6C)。対照的に、全長 DREB2A や NLS の一方のみを欠損させた変異型 DREB2A はストレスの有無に関係なく核移行し、そのタンパク質蓄積量は高温ストレス下で増加した (図 II-6)。一般的に小胞体移行シグナルを持たない可溶性の核コードタンパク質は細胞質で合成されることから (Alberts *et al.*, 2008)、DREB2A も細胞質で合成された後に核へ移行すると考えられる。よって以上の結果は、DREB2A の安定性がストレスの有無に関係なく核に移行してから制御されることを示唆している。これは DRIP1 が核に



局在していることと矛盾しないが (Qin *et al.*, 2008)、ユビキチン-プロテアソーム系による分解制御において DREB2A を認識する DRIP 以外の E3 ユビキチン連結酵素も核に局在することを示唆する。以上の結果は、DREB2A の遺伝子発現機構において、分解制御が、通常条件下で DREB2A の発現を抑制するための機構として存在するだけでなく、ストレス下における DREB2A 蓄積量を適切に制限することで、標的遺伝子の発現量の調節にも携わっている可能性を示唆している。DREB2A は下流遺伝子の発現誘導を介して成長制御を含めたストレス耐性獲得のための一連の応答を制御しているので、このように DREB2A の蓄積量を厳密に制御することは、ストレス応答の強さを適切に制御することにつながり、ストレス環境下での植物の生存戦略上合理的であると考えられる。

これまで、DREB2A が安定化するだけで、DREB2A 標的遺伝子の発現誘導に十分なのか、それとも別に活性化が必要であるのか明らかになっていなかった。本研究の結果から、DREB2A タンパク質の安定性の制御は、DRIP など既知の因子に加えて、新たに存在が示唆された因子なども関わる複雑な機構であると予想されるが、さらに加えて、活性化の制御を受ける必要があることが示唆された。GFP-DREB2A/*dreb2a* における GFP-DREB2A の蓄積量の増加は、標的遺伝子の mRNA 蓄積量の増加につながったことから、DREB2A の蓄積量が標的遺伝子の発現強度に影響することが示された (図 II-9)。一方、通常条件下でプロテアソーム阻害剤処理を行い、DREB2A タンパク質を蓄積させた場合は DREB2A 標的遺伝子の転写がほとんど誘導されないことが示され(図 II-11, 12)、DREB2A タンパク質の蓄積に加えて、活性化を受ける必要が示された。また、乾燥ストレス下と高温ストレス下の野生型シロイヌナズナにおいて誘導される標的遺伝子が、それぞれのストレスに特異的であることから、ストレスに特異的な活性化機構が存在している可能性が示唆された (Sakuma *et al.*, 2006b)。DREB2A CA が通常条件下でも、乾燥誘導性遺伝子と高温誘導性遺伝子の両方の転写を誘導することからも (Sakuma *et al.* 2006b)、DREB2A がそれぞれのス

トレス下において特異的に活性化される可能性が推測される。実際に、野生型の遺伝的背景において、4×Myc タグと DREB2A の融合タンパク質 (4×Myc-DREB2A) を構成的に発現させた形質転換シロイヌナズナを乾燥あるいは高温処理して標的遺伝子の発現を調べたところ、いずれのストレス下でも同程度に 4×Myc-DREB2A が蓄積しているにもかかわらず、標的遺伝子の発現はストレス特異性が保たれていた (森本 2010、修士論文)。従って、ストレス特異的な標的遺伝子の発現を適切に制御するためには、DREB2A の蓄積に加えてストレスに応答した DREB2A の活性化、つまりは下流遺伝子の転写活性化に関わる翻訳後制御が必要であることが示唆される。

このように転写因子が標的遺伝子の転写を活性化する機構において、転写因子の遺伝子発現が、タンパク質の安定化に加えて、活性化によっても制御されている例は、ABA を介したシグナル伝達経路で機能する ABA-insensitive5 (ABI5) が挙げられる。ABI5 タンパク質は、ユビキチン-プロテアソームシステムによる分解制御を受けており、これには E3 ユビキチン連結酵素 KEEP ON GOING (KEG) および DWD hypersensitive to ABA (DWA) が機能することが報告されている。通常条件下では、主に KEG により ABI5 が分解されているが、ABA の濃度が上昇すると、ABA によって誘導されて ABI5 mRNA の蓄積量が増加することに加えて、KEG の自己ユビキチン化が促進されるために、ABI5 が蓄積する (Antoni *et al.*, 2011)。一方、DWA は通常条件下では ABI5 の分解に機能しないが、ABA 濃度が上昇すると ABI5 の分解に関与することが示唆されている。さらに、ABA シグナルは SnRK2 による ABI5 のリン酸化を促進し、ABI5 を活性化する。また、こうした多段階の制御機構によりタンパク質の安定性と活性が制御される例は、植物に限らずほ乳類などでも報告されている。その一例として、脂肪酸やトリグリセリド合成に関わる多くの遺伝子の発現制御に機能する転写因子 Sterol regulatory element-binding protein (SREBP) が挙げられる。SREBP の安定性は、互いに拮抗する N-アセチル化とユビキチン化によって制御

されており、転写活性は不活性化に導く SUMO 化と活性化に寄与するリン酸化によって調節されている。このような SREBP タンパク質の修飾により、SREBP と核内の他の受容体タンパク質とのタンパク質-タンパク質間相互作用を変化させることで、遺伝子発現が制御されている (Bengoechea-Alonso and Ericsson, 2007; Giandomenico *et al.*, 2003; Hirano *et al.*, 2003)。こうした例から、DREB2A の転写活性が、複数の翻訳後修飾によって制御されている可能性が考えられる。これまでに、シロイヌナズナにおいて DREB2A の翻訳後修飾を示した報告はないが、本研究で行ったイムノブロット解析から、DREB2A のメジャーバンド以外にも *dreb2a* ではみられない複数の特異的なバンドが検出されたことから、こうしたバンドは翻訳後修飾を受けた DREB2A である可能性が考えられる (図 II-2, 9, 11, 12)。実際に、トウジンビエ (*Pennisetum glaucum*) における相同タンパク質である PgDREB2A は、*in vitro* 実験においてリン酸化され、その結果核酸に対する結合活性が低下することが報告されている (Agarwal *et al.*, 2007)。よって、DREB2A の翻訳後修飾を明らかにすることは、DREB2A の安定化と活性化の分子機構を明らかにすることにつながると期待される。また翻訳後修飾に加えて、タンパク質-タンパク質間相互作用も DREB2A の活性調節に関与していると考えられる。これまでに、本研究でも解析した DRIP1 および DRIP2 以外に、Radical-induced Cell Death 1 (RCD1) および Mediator complex subunit 25 (Med25) が DREB2A の相互作用因子として報告されている (Blomberg *et al.*, 2012; Vainonen *et al.*, 2012)。RCD1 は DREB2A の転写活性化ドメインを含む領域に結合することが示されており、Med25 は NRD の直後の領域に結合することやメディエーターの構成要素であり、RNA ポリメラーゼ II のリクルートに関わることが報告されている。現時点ではこれらのタンパク質が DREB2A の活性化に機能しているのかは明らかでないが、DREB2A を取り巻くタンパク質-タンパク質間相互作用ネットワークを明らかにすることで、DREB2A が関与する転写制御機構の全体像が明らかになると期待される。

DREB2A は植物特異的な AP2/ERF 型転写因子の DREB サブファミリーに属している (Sakuma *et al.*, 2002; Mizoi *et al.*, 2012)。DREB2 は DREB1/CBF と並んで主要なサブグループを形成し、いずれもシス因子 DRE を介した環境ストレス応答に関与しているが、これらの転写因子の機能は互いに異なっており、シロイヌナズナにおいて DREB1s/CBFs は主に低温応答に機能する (Liu *et al.*, 1998)。*DREB1s/CBFs* は遺伝子の発現調節機構も DREB2A とは異なっており、低温ストレスに応答して転写が誘導され、次いで標的遺伝子の転写を誘導するが、非ストレス存在下でも、*DREB1s/CBFs* の過剰発現体は標的遺伝子の転写を誘導することから、*DREB1s/CBFs* の遺伝子発現には転写段階での制御が重要であると考えられている。一方、*DREB2A* には非常にアミノ酸配列の相同性が高い相同遺伝子 *DREB2B* と *DREB2C* が存在している (Sakuma *et al.*, 2002)。これらのタンパク質は DNA 結合ドメイン以外にも、NRD 様ドメイン、二つの NLS の周辺に位置する CMIV-1 や CMIV-2、転写活性化ドメインに含まれる CMIV-3 などの保存領域を持つ (Nakano *et al.*, 2006; Vainonen *et al.*, 2012)。さらに、コケ植物から被子植物に至るまで、種間でもシロイヌナズナ *DREB2A* の相同遺伝子を保存している (Mizoi *et al.*, 2012)。最近、ダイズの *DREB2A* 相同タンパク質が NRD 様ドメインを有しており、シロイヌナズナの *DREB2A* と同様に NRD が関与する安定性の制御を受けることが示された (Mizoi *et al.*, 2013)。したがって、シロイヌナズナ *DREB2A* の機能解析によって得られた知見は、その他の種の *DREB2A* 相同遺伝子の転写制御機構の解明にも役立つと期待される。

本章では、ストレスに応答した *DREB2A* タンパク質の安定性と転写活性の制御に関する解析を行い、*DREB2A* は乾燥および高ストレスに応答して安定化し、さらに活性化を受けることで、下流の標的遺伝子の転写を活性化する可能性が示された。この過程では、未知の翻訳後修飾や共役因子との相互作用が関与している可能性がある (図 II-13)。*DREB2A* の活性化の分子機構を明らかにすることは、*DREB2A* が乾燥と高温の異なるストレスシグナルを受容して、それぞ

れのストレスに特異的な標的遺伝子を認識する機構の解明にも役立つと考えられる。植物体がストレス耐性を獲得する過程で DREB2A は必須な機能を担う一方、通常の生育環境では成長抑制など負の影響を及ぼす事を考慮すると (Sakuma *et al.*, 2006a)、素早い DREB2A の代謝回転は、こうした DREB2A の副作用を最小限に押さえつつ、刻々と移り変わる自然環境に迅速に適応していくための植物の生存戦略であると考えられる (Lyzenga and Stone, 2012)。DREB2A の複雑な転写制御機構を解明していくことで、植物の精巧なストレス耐性機構を明らかにする手がかりが得られると期待される。

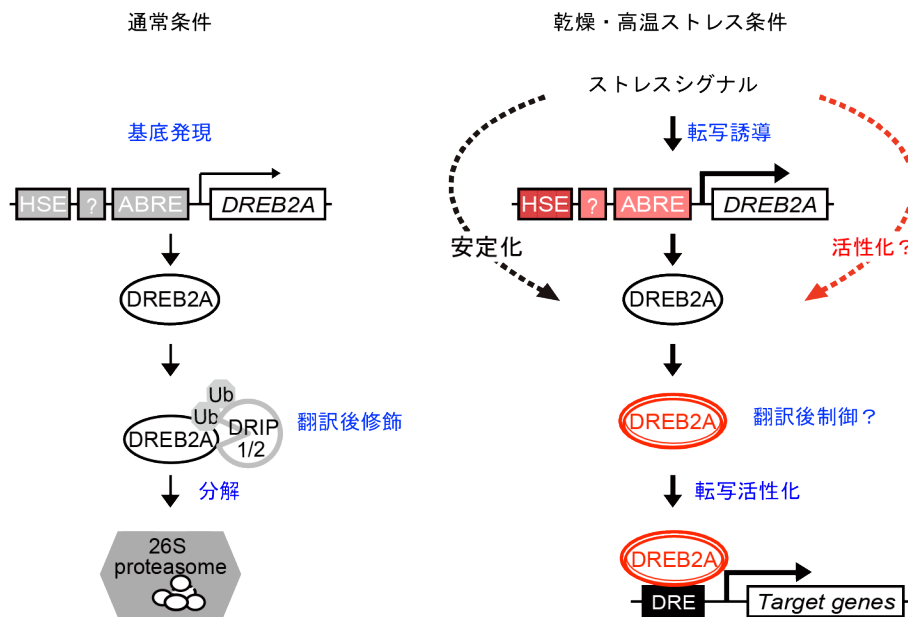


図 II-i 乾燥および高温ストレスに応答した DREB2A の転写制御機構の概念図

DREB2A の機能発現は、通常条件下ではユビキチン-プロテアソーム系を介した分解制御により抑制されている。このとき、DREB2A の認識には E3 ユビキチン連結酵素 DRIP1 および DRIP2 が機能することが示されている (Qin *et al.*, 2008)。一方、乾燥および高温ストレス下では、それぞれのストレス特異的な上流の転写因子により DREB2A の転写が誘導され、DREB2A もまたそれぞれのストレスに特異的に応答する標的遺伝子の転写を活性化する (Yoshida *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011)。このとき DREB2A の安定性が向上することが示唆されているが (Sakuma *et al.*, 2006b)、その詳細は明らかになっていない。本章では、DREB2A による標的遺伝子の転写制御機構について、DREB2A の安定化（黒色の破線）と活性化（赤色の破線）の要素が存在することを想定してその役割について明らかにすることを目指した。

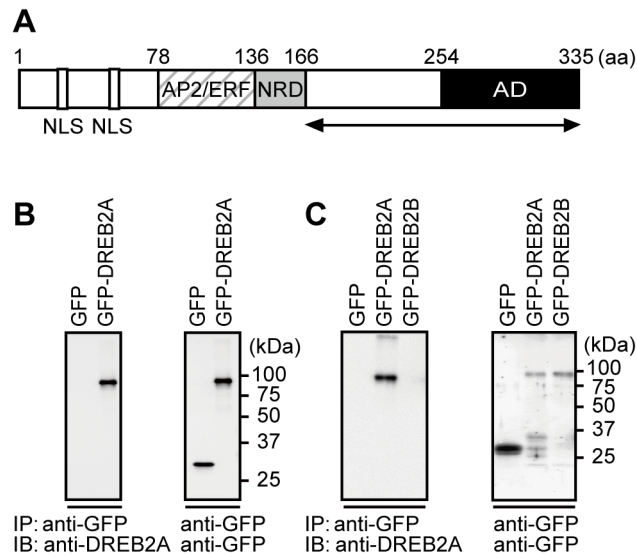


図 II-1 抗 DREB2A 抗体の特異性の検証

(A) DREB2A タンパク質の模式図。抗 DREB2A 抗体を作製するために用いられた DREB2A の 166 残基目から 335 残基目までの領域を黒色の両矢印で指し示した。NLS は核移行シグナルを、AP2/ERF は DNA 結合ドメインを、NRD は負の制御領域を、AD は活性化ドメインをそれぞれ示す。数字はアミノ酸残基数を示す。

(B) 形質転換シロイヌナズナ 35S:GFP および 35S:GFP-DREB2A を用いた抗 DREB2A 抗体の特異性の検証。35S:GFP および 35S:GFP-DREB2A から抗 GFP 抗体を用いた免疫沈降により得られた免疫沈降産物を用いて、イムノブロット解析を行った。各レーンには出発材料の生重量 10 mg (GFP) あるいは 100 mg (GFP-DREB2A) に相当する容量を用いた。左図は、抗 DREB2A 抗体を用いて検出した像を示し、右図は、同じメンブレンを、抗体の剥離後に、抗 GFP 抗体を用いて再検出した像を示す。

(C) *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*) で一過的に発現させた DREB2A の相同遺伝子 DREB2B を用いた抗 DREB2A 抗体の特異性の検証。*N. benthamiana* の一過的発現系において CaMV 35S RNA プロモーター制御下で発現させた GFP、GFP-DREB2A および GFP-DREB2B に対して抗 GFP 抗体を用いた免疫沈降により得られた免疫沈降産物を用いて、イムノブロット解析を行った。各レーンには *N. benthamiana* 葉の生重量 0.2 mg (GFP) あるいは 2 mg (GFP-DREB2A および GFP-DREB2B) に相当する容量を用いた。左図は、抗 DREB2A 抗体を用いて検出した像を示し、右図は、同じメンブレンを、抗体の剥離後に、抗 GFP 抗体を用いて再検出した像を示す。

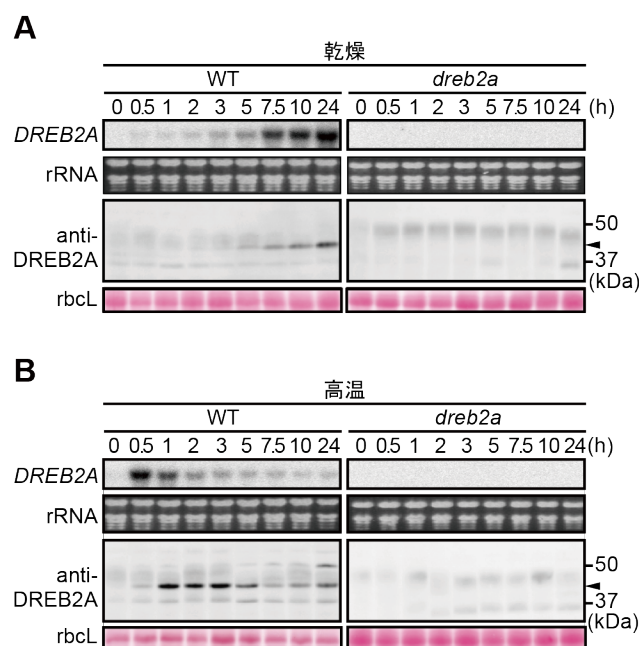


図 II-2 乾燥および高温ストレス条件下での内在性 *DREB2A* 遺伝子の mRNA 蓄積量およびタンパク質蓄積量

GM 寒天培地上で 3 週間生育させた野生型 (WT) および *DREB2A* 欠損変異体 (*dreb2a*) を乾燥処理 (A) あるいは高温処理 (37°C) (B) し、内在性 *DREB2A* 遺伝子の mRNA 蓄積量とタンパク質蓄積量を時間軸に沿って解析した。上段は、RNA ゲルブロット解析による *DREB2A* mRNA の蓄積量を示す。植物体から抽出した全 RNA を各レーン 10  $\mu$ g 用い、rRNA のエチジウムブロマイド染色像を RNA 量の対照として示した。下段は、抗 *DREB2A* 抗体を用いたイムノブロット解析による *DREB2A* タンパク質の蓄積パターンを示す。各レーンに植物体の生重量の 4 mg に相当する容量を用いた。ルビスコの大サブユニット (rbcL) のポンソー-S 染色像をタンパク質量の対照として表した。*DREB2A* タンパク質は黒色の矢尻で指し示した。実験は 3 反復行い、得られた同様の結果から代表的なものを示した。



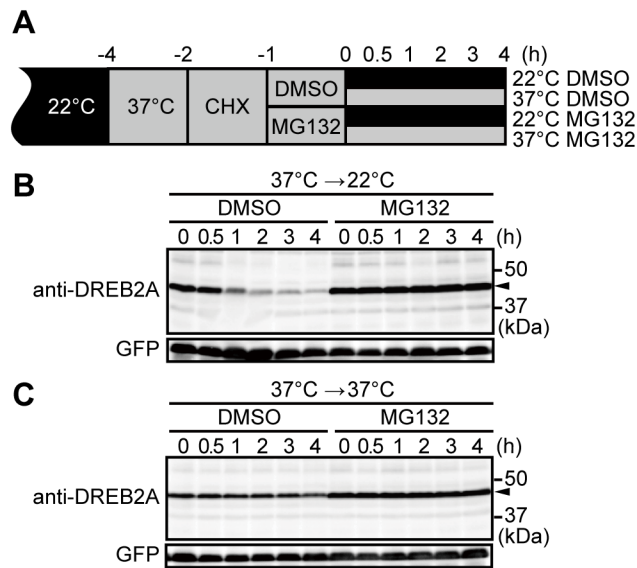


図 II-3 高温ストレスが DREB2A タンパク質の安定性に与える影響

(A) DREB2A の安定性を調べるために、シロイヌナズナ培養細胞に施した処理の模式図。JPL 液体培地で 4 日間培養した形質転換シロイヌナズナ培養細胞 *35S:GFP* を、前処理として 37°C で 2 時間振盪し、次いで 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CHX 存在下で 37°C にて 1 時間振盪した後、終濃度 100  $\mu\text{M}$  MG132、あるいは終濃度 1% の DMSO 存在下で、37°C にて 1 時間振盪した。前処理を終えた時点をも 0 時間として、これらの培養細胞を 22°C あるいは 37°C で一定時間振盪し、内在性 DREB2A の蓄積量を時間軸に沿って解析した。

(B), (C) 高温処理により蓄積させた DREB2A を、通常条件下 (22°C) (B) あるいは高温条件下 (37°C) (C) においた時の蓄積量の変化。通常条件下あるいは高温条件下における DREB2A の蓄積量の変化について、時間軸に沿ったイムノブロット解析を行った。構成的に発現させた GFP をタンパク質量の対照として示した。DREB2A タンパク質は黒色の矢尻で指し示した。実験は 3 反復行い、得られた同様の結果から代表的なものを示した。

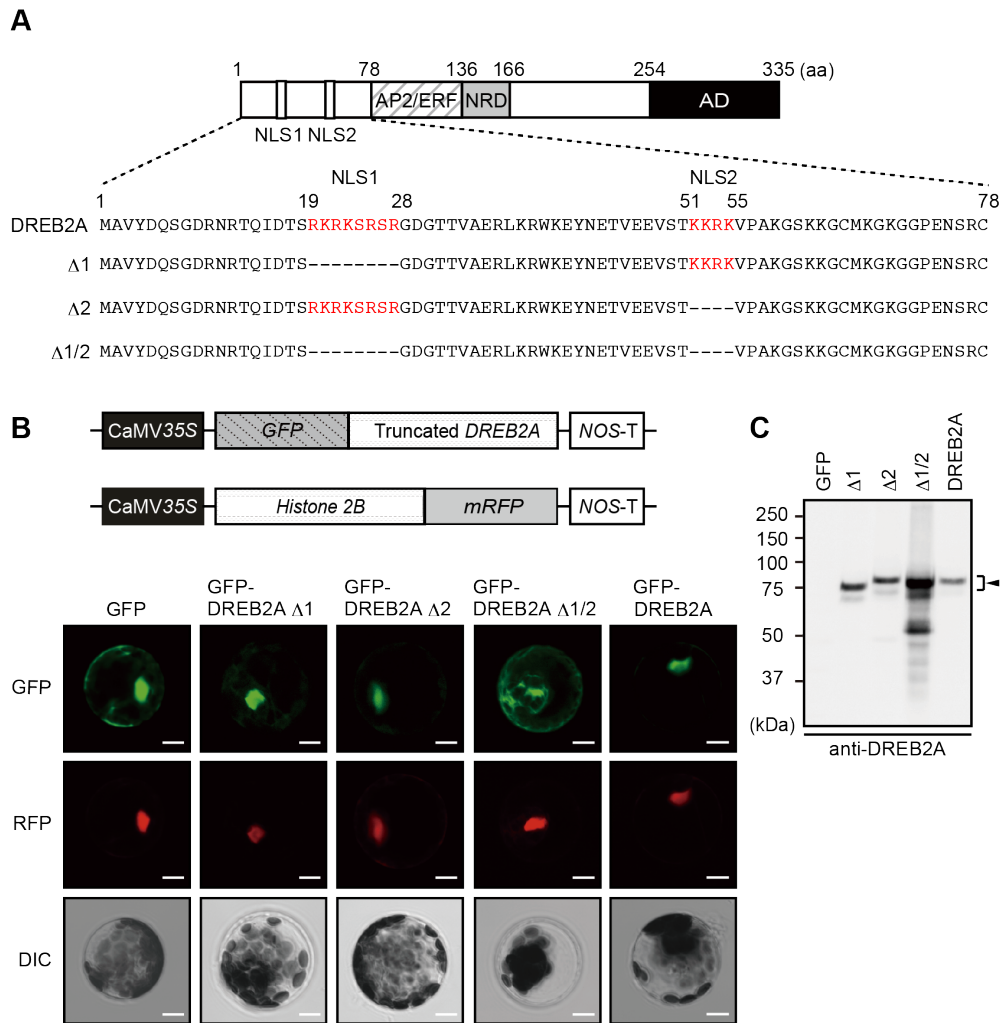


図 II-4 DREB2A の核移行シグナル (NLS) の同定、および NLS の変異導入が DREB2A の局在と安定性に及ぼす影響の解析

(A) DREB2A の二つの核移行シグナル (NLS) を含む 1-78 残基目までのアミノ酸配列の模式図。Liu *et al.* (1998) において予測された二つの NLS、NLS1 および NLS2 を赤字で示した。全長 DREB2A と NLS の一方あるいは両方を欠失させた変異型 DREB2A の配列を示した。

(B) シロイヌナズナの葉肉細胞由来のプロトプラストにおいて一過的に発現させた、GFP と全長あるいは変異型 DREB2A との融合タンパク質の GFP 蛍光の観察。核局在の陽性対照として Histone 2B と mRFP との融合タンパク質を共発現させた。上から順に、共焦点レーザー走査型顕微鏡で取得した GFP 蛍光像 (GFP)、mRFP 蛍光像 (RFP) および微分干渉像 (DIC) を示した。白色のバーは 20  $\mu\text{m}$  を示す。

(C) シロイヌナズナの葉肉細胞由来のプロトプラストにおいて一過的に発現させた、

GFP と全長あるいは変異型 DREB2A との融合タンパク質の蓄積量。プロトプラストから抽出した全タンパク質を抗 DREB2A 抗体を用いたイムノブロット解析に供した。内部標準には CaMV 35S RNA プロモーターと  $\Omega$  配列制御下で *ELuc* 遺伝子を発現させる組換え遺伝子を用い、LUC の活性を指標に泳動するタンパク質の濃度を調整した。DREB2A タンパク質は黒色の矢尻で指し示した。実験は 3 反復行い、得られた同様の結果から代表的なものを示した。

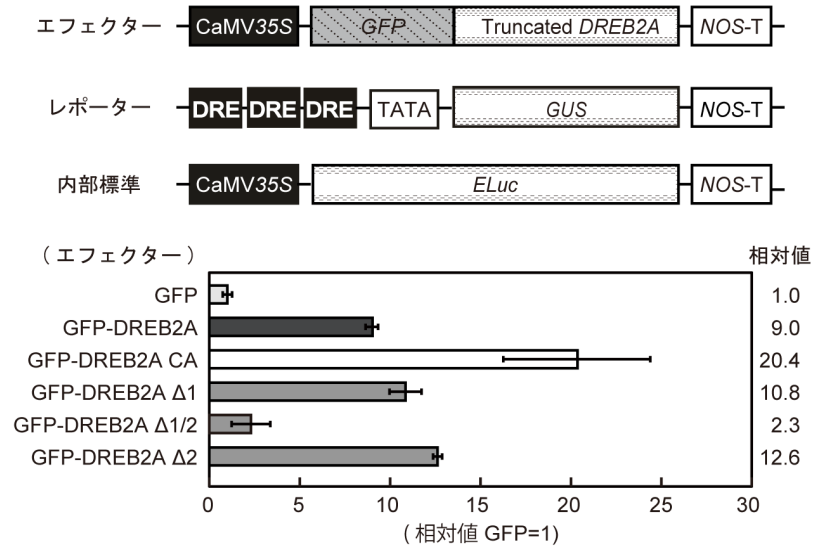


図 II-5 核移行シグナルを欠失させた変異型 DREB2A の転写活性化能の比較解析

シロイヌナズナの葉肉細胞由来のプロトプラストの一過的発現系により GFP と全長あるいは変異型 DREB2A との融合タンパク質の転写活性化能を解析した。上図は、エフェクター、レポーターおよび内部標準の模式図を示す。エフェクターには、CaMV 35S RNA プロモーター制御下で、GFP と全長あるいは変異型 DREB2A との融合タンパク質を発現する組換え遺伝子を用いた。レポーターには、シロイヌナズナの *RD29A* 遺伝子由来の DRE 配列を含む DNA 断片 3 反復の下流に GUS コード配列を繋いだ組換え遺伝子を用い、内部標準には CaMV 35S RNA プロモーター制御下で *ELuc* 遺伝子を発現させる組換え遺伝子を用いた。転写活性化能は、LUC 活性に対する GUS 活性の相対活性を指標とし、GFP ベクター対照における値を 1 として、各組換え遺伝子の相対値を示した。値は 3 つの測定区の平均値を、エラーバーは標準偏差を示す。実験は 2 反復行い、得られた同様の結果から代表的なものを示した。

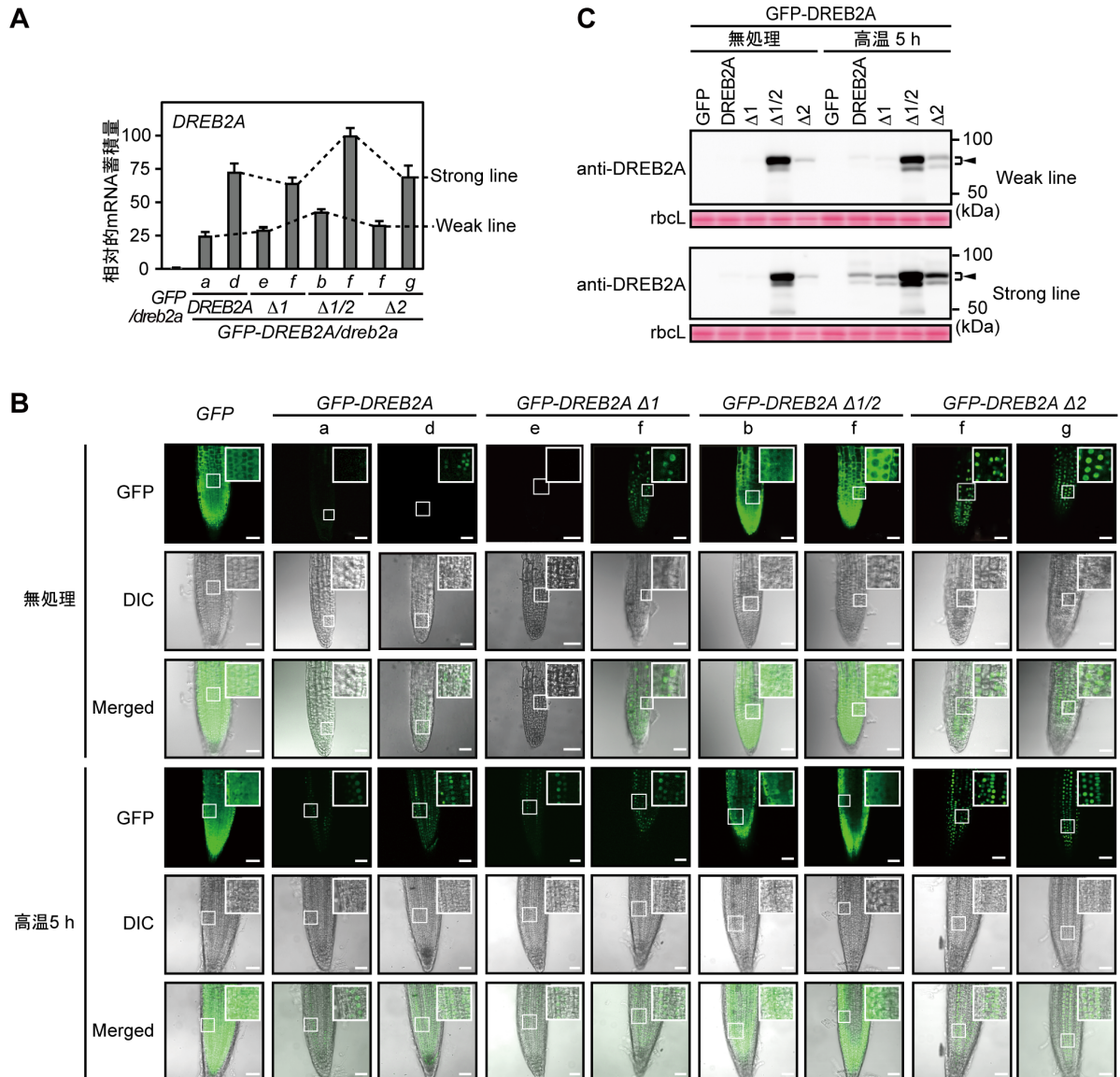


図 II-6 シロイヌナズナ植物体において DREB2A の NLS への変異が及ぼす DREB2A の局在と安定性への影響

*DREB2A* 欠損変異体の遺伝的背景において、CaMV 35S RNA プロモーター制御下で全長あるいは NLS を欠失させた変異型 DREB2A と GFP との融合タンパク質 (図 II-4A) を構成的に発現させた形質転換シロイヌナズナを作成し、これらの融合タンパク質の細胞内局在性 および、タンパク質の安定性を解析した。

(A) 定量的 RT-PCR による導入遺伝子の mRNA 蓄積量の解析。GM 寒天培地で 14 日間生育させた植物体における導入遺伝子の mRNA 蓄積量を測定した。内部標準として *ACT8* 遺伝子を用い、最も高い値を 100 として、相対値で示した。値は 3 つの測定区の

平均値を、エラーバーは標準偏差を示す。実験は2反復行い、得られた同様の結果から代表的なものを示した。アルファベットの小文字は、それぞれの形質転換シロイヌナズナにおいて導入遺伝子の発現量が強いライン (Strong line) および弱いライン (Weak line) の、独立した2ラインを示す。

(B) 作出した形質転換シロイヌナズナにおける無処理あるいは高温処理時の GFP 蛍光の観察。上から順に、共焦点レーザー走査型顕微鏡で取得した GFP 蛍光像 (GFP)、微分干渉像 (DIC) および重ね合わせ像 (Merged) を示した。白色のバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。

(C) 作出した形質転換シロイヌナズナにおける、無処理あるいは高温処理時の変異型 GFP-DREB2A 融合タンパク質の蓄積量。GM 寒天培地上で 10 日間生育させた植物体を無処理のまま、あるいは高温処理し、時間軸に沿ってサンプリングした。植物体から全タンパク質を抽出し、抗 DREB2A 抗体を用いたイムノブロット解析に供した。各レーンに植物体の生重量の 4 mg に相当する容量を用い、rbcL のボンソーS 染色像をタンパク質量の対照として示した。DREB2A タンパク質は黒色の矢尻で指し示した。実験は2反復行い、得られた同様の結果から代表的なものを示した。

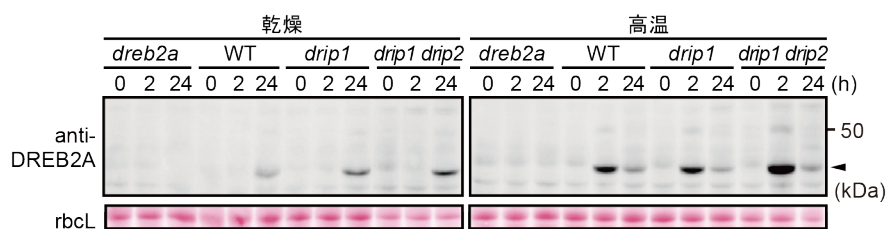


図 II-7 *DRIP* の欠損変異体における、乾燥および高温ストレス条件下での内在性 *DREB2A* 遺伝子のタンパク質蓄積量

GM 寒天培地上で 3 週間生育させた野生型 (WT)、*DREB2A* 欠損変異体 (*dreb2a*)、*DRIP1* 欠損変異体 (*drip1*) および *DRIP1 DRIP2* 二重欠損変異体 (*drip1 drip2*) を乾燥処理あるいは高温処理 (37°C) し、内在性 *DREB2A* 遺伝子由来のタンパク質蓄積量を時間軸に沿って、抗 *DREB2A* 抗体を用いたイムノブロット解析を行った。各レーンに植物体の生重量の 4 mg に相当する容量を用い、*rbcL* のボンソーS 染色像をタンパク質量の対照として表した。実験は 3 反復行い、得られた同様の結果から代表的なものを示した。

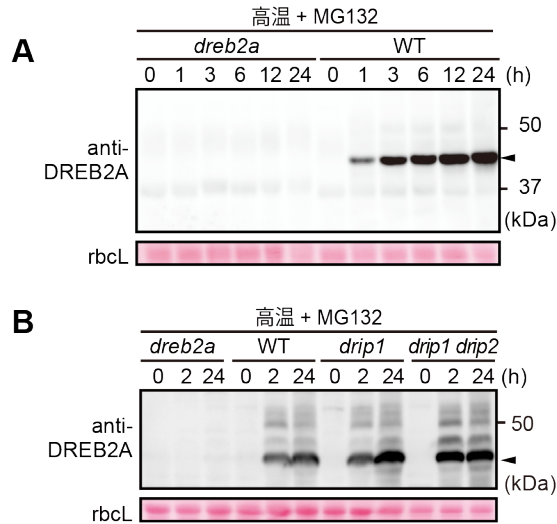


図 II-8 プロテアソーム阻害剤 MG132 存在下で高温処理を行った野生型シロイヌナズナ、*DRIP1* 欠損変異体および *DRIP1 DRIP2* 二重欠損変異体における DREB2A タンパク質の蓄積量

野生型 (WT)、*DREB2A* 欠損変異体 (*dreb2a*)、*DRIP1* 欠損変異体 (*drip1*) および *DRIP1 DRIP2* 二重欠損変異体 (*drip1 drip2*) を無処理のまま、あるいは MG132 存在下で高温処理し、植物体から全タンパク質を抽出し、抗 DREB2A 抗体を用いたイムノブロット解析に供した。各レーンに植物体の生重量の 4 mg に相当する容量を用い、*rbcl* のポンソーS 染色像をタンパク質量の対照として示した。DREB2A タンパク質は黒色の矢尻で指し示した。

(A) MG132 存在下で高温処理した WT および *dreb2a* における DREB2A タンパク質の蓄積パターン。

(B) MG132 存在下で高温処理した WT、*dreb2a*、*drip1* および *drip1 drip2* における DREB2A タンパク質の蓄積量の変化。



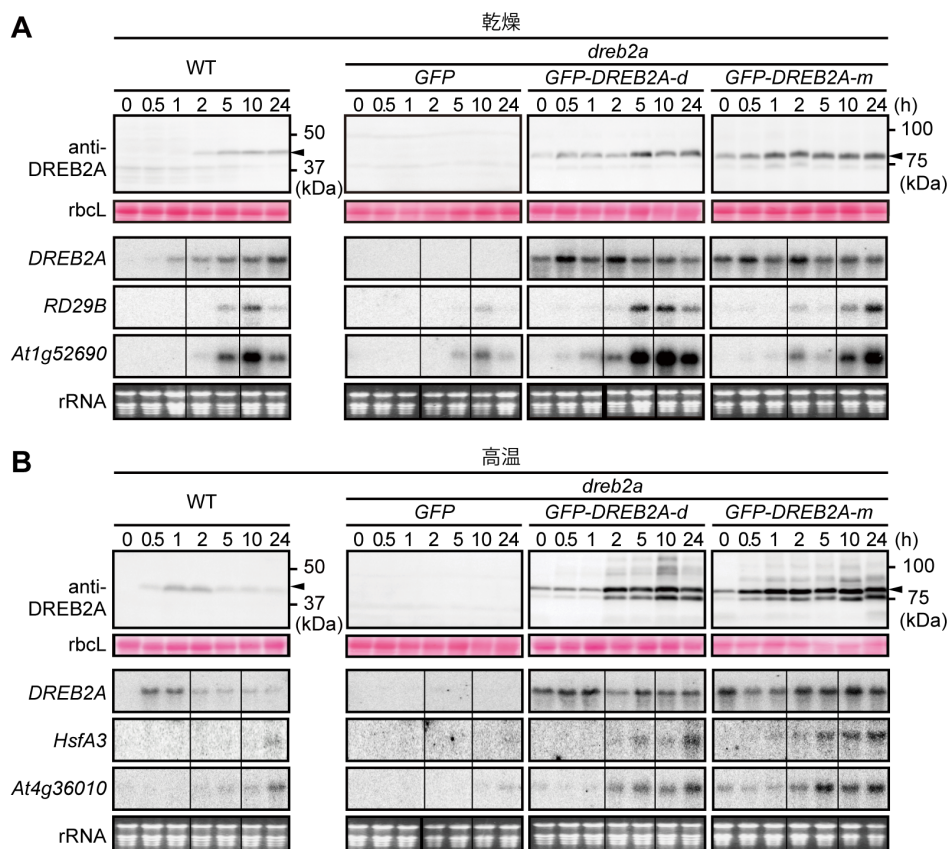


図 II-9 乾燥および高温ストレス条件下での *GFP-DREB2A/dreb2a* における DREB2A タンパク質の安定性と転写活性化能の解析

GM 寒天培地上で3週間生育させた野生型 (WT) および *GFP-DREB2A/dreb2a* を乾燥処理 (A) あるいは高温処理 (37°C) (B) し、DREB2A タンパク質の蓄積量および *DREB2A* と DREB2A の標的遺伝子の mRNA 蓄積量を時間軸に沿って解析した。上段は、抗 DREB2A 抗体を用いたイムノブロット解析による DREB2A タンパク質の蓄積パターンを示す。各レーンに植物体の生重量の 4 mg に相当する容量を用い、*rbcL* のポンソーS 染色像をタンパク質量の対照として表した。DREB2A タンパク質は黒色の矢尻で指し示した。下段は、RNA ゲルブロット解析による *DREB2A* mRNA と DREB2A の標的遺伝子の mRNA 蓄積量を示す。DREB2A の標的遺伝子として、乾燥ストレスに誘導される *RD29B*、*At1g52690* (A)と、高温ストレスに誘導される *HsfA3* と *At4g36010* (B) を示した。植物体から抽出した全 RNA を各レーン 10  $\mu$ g 用い、*rRNA* のエチジウムブロマイド染色像を RNA 量の対照として示した。実験は2反復行い、得られた同様の結果から代表的なものを示した。

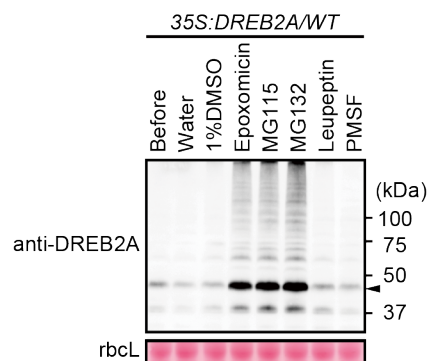


図 II-10 プロテアーゼ阻害剤およびプロテアソーム阻害剤処理を行った *35S:DREB2A/WT* における DREB2A タンパク質蓄積量の解析

GM 寒天培地上で 10 日間生育させた植物体に、通常条件下で、水、1% (v/v) の DMSO、プロテアソーム阻害剤 (20  $\mu$ M Epoxomicin、200  $\mu$ M MG115 または 200  $\mu$ M MG132) あるいはプロテアーゼ阻害剤 (200  $\mu$ M Leupeptin または 200  $\mu$ M PMSF) で 10 時間処理し、DREB2A タンパク質の蓄積量を抗 DREB2A 抗体を用いたイムノブロット法により解析した。各レーンに植物体の生重量の 4 mg に相当する容量を用い、*rbcL* のポンソーS 染色像をタンパク質量の対照として表した。DREB2A タンパク質は黒色の矢尻で指し示した。

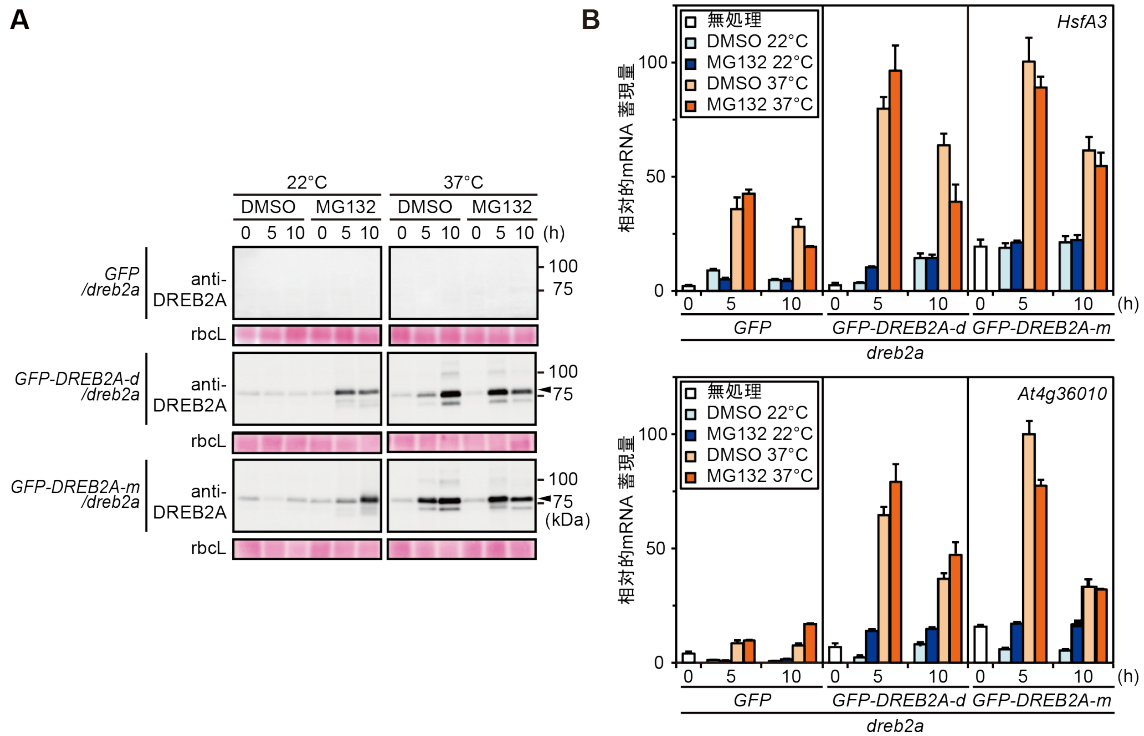


図 II-11 プロテアソーム阻害剤 MG132 処理を行った *GFP-DREB2A/dreb2a* における DREB2A タンパク質の安定性と転写活性化能の解析

(A) 通常条件および高温条件下でプロテアソーム阻害剤 MG132 処理を行った場合の *GFP-DREB2A* の蓄積量。GM 寒天培地上で 10 日間生育させた *GFP/dreb2a* および独立した 2 ラインの *GFP-DREB2A/dreb2a* を通常条件下 (22°C)、あるいは高温条件下 (37°C) で、200  $\mu$ M MG132 処理、あるいは終濃度 1% (v/v) の DMSO のみによる処理を行い、時間軸に沿って *GFP-DREB2A* の蓄積量をイムノブロット法により解析した。

(B) プロテアソーム阻害剤処理を行った *GFP-DREB2A/dreb2a* における DREB2A の蓄積量および DREB2A の標的遺伝子の mRNA 蓄積量の解析。(A) と同時に処理した植物体から抽出した全 RNA から合成した cDNA を用い、定量的 RT-PCR を行った。内部標準として *ACT8* 遺伝子を用い、それぞれの形質転換体における各処理時の mRNA の蓄積量は、最も高い値を 100 として相対値で示した。値は 3 つの測定区の平均値を、エラーバーは標準偏差を示している。それぞれの植物体ごとに、横軸は処理時間を、縦軸に mRNA 蓄積量を示した。DREB2A の標的遺伝子として高温ストレス特異的に誘導される *HsfA3* および *At4g36010* の mRNA 蓄積量示した。グラフ内に凡例を示した。白抜きのバーは無処理を、水色は 22°C DMSO 処理区を、青色は 22°C MG132 処理区を、琥珀色は 37°C DMSO 処理区を、橙色は 37°C MG132 処理区をそれぞれ示す。実験は 2 反復行い、得られた同様の結果から代表的なものを示した。

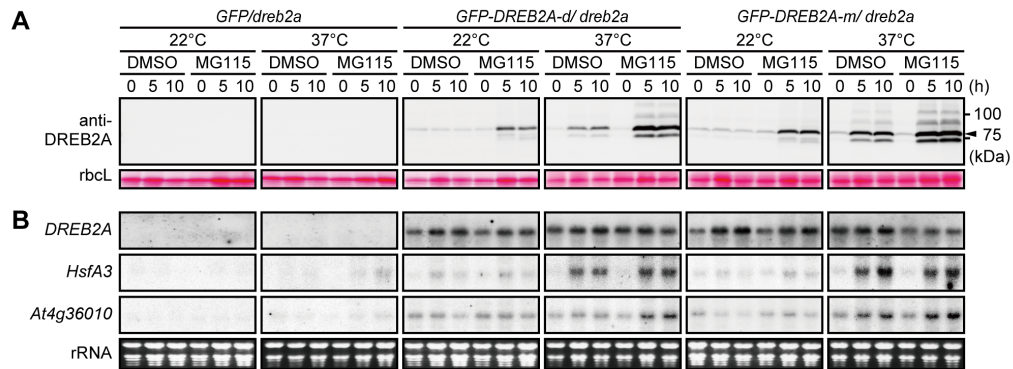


図 II-12 プロテアソーム阻害剤 MG115 処理を行った *GFP-DREB2A/dreb2a* における DREB2A タンパク質の安定性と転写活性化能の解析

(A)通常条件あるいは高温条件下でプロテアソーム阻害剤 MG115 処理を行った場合の GFP-DREB2A の蓄積量。GM 寒天培地上で 10 日間生育させた *GFP/dreb2a* および独立した 2 ラインの *GFP-DREB2A/dreb2a* に通常条件下 (22°C)、あるいは高温条件下 (37°C) で、200  $\mu$ M MG115 処理あるいは DMSO 処理し、時間軸に沿って GFP-DREB2A の蓄積量をイムノブロット法により解析した。

(B)プロテアソーム阻害剤 MG115 処理を行った *GFP-DREB2A/dreb2a* における *DREB2A* mRNA の蓄積量および *DREB2A* の標的遺伝子の mRNA 蓄積量。(A) と同時に処理した植物体から抽出した全 RNA を用い、RNA ゲルブロット法により、*DREB2A* mRNA と *DREB2A* の標的遺伝子の mRNA 蓄積量を解析した。*DREB2A* の標的遺伝子として、高温ストレス誘導性の *HsfA3* と *At4g36010* を示した。各レーンには全 RNA を 10  $\mu$ g 用い、rRNA のエチジウムブロマイド染色像を RNA 量の対照として示した。実験は 2 反復行い、得られた同様の結果から代表的なものを示した。

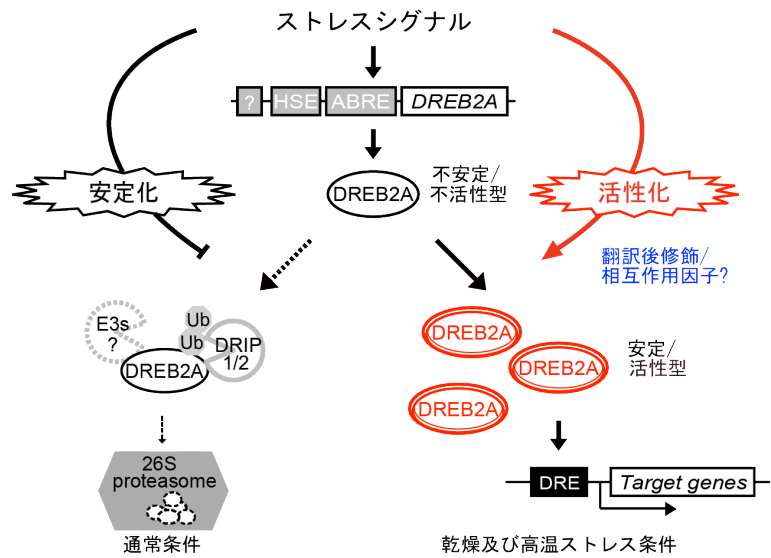


図 II-13 DREB2A の安定化と活性化による標的遺伝子の転写制御機構の概念図

DREB2A は乾燥および高ストレスに応答して安定化し、さらに活性化を受けることで、下流の標的遺伝子の転写を活性化すると考えられる。この過程では、未知の翻訳後修飾や共役因子との相互作用が関与している可能性がある。

表 II-1 JPL 液体培地の組成 (1 L 作製する場合)

(/L) ストック溶液	(/L)	試薬名
30 mL	溶液A	65.5 g 硝酸カリウム
		4.4 g 塩化カリウム二水和物
		3.7 g 硫酸マグネシウム
		1.7 g リン酸二水素カリウム
0.3 mL	溶液B	6.2 g ホウ酸
		22.3 g 硫酸マンガン(II)四水和物
		10.6 g 硫酸亜鉛七水和物
		0.83 g ヨウ化カリウム
		0.25 g モリブデン酸ナトリウム二水和物
		0.025 g 塩化コバルト(II)六水和物
2 mL	溶液C	0.025 g 硫酸銅(II)五水和物
		2.78 g 硫酸鉄(II)七水和物 (Wako)
		3.72 g エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 (Wako)
10 mL	溶液D	10 g myo-イノシトール (SIGMA-ALDRICH)
		0.2 g グリシン
1 mL	溶液V.T.	0.5 g ニコチン酸 (SIGMA-ALDRICH)
		0.5 g ピリドキシン塩酸塩 (SIGMA-ALDRICH)
		0.4 g チアミン塩酸塩 (SIGMA-ALDRICH)
100 $\mu$ M	リン酸緩衝液 (pH7.0)	
	1 $\mu$ M	NAA
	0.1 g	カサミノ酸、ビタミンアッセイ (BD)
	15 g	スクロース

表 II-2 コンストラクションに用いたプライマー

プライマー名	プライマー配列 (5'-3')
DREB2A/F- <i>Not</i> I	5'-AAGCGGCCGCATGGCAGTTTATGATCAGA-3'
DREB2A/R- <i>Not</i> I	5'-AAGCGGCCGCGTTCTCCAGATCCAAGTAACT-3'

表 II-3 RNA ゲルブロット解析に用いたプローブ

遺伝子名	鑄型プラスミドDNA	順方向プライマー (5'-3')	逆方向プライマー (5'-3')
<i>DREB2A</i> ( <i>At5g05410</i> )	35S- $\Omega$ -DREB2A	5'-CGTCTTAATTCCTGATCCAGATTGTGAA-3'	5'-GGGGCGGCCGCTTTAGTTCTCCAGATCCAAGT-3'
<i>RD29B</i> ( <i>At5g52300</i> )	pBSIIsk- <i>RD29B</i>	1502-1507 <i>Hind</i> IIIおよびMCS の <i>Hind</i> IIIにおいて制限酵素処理してプラスミドから切り出したDNA 断片	
<i>At1g52690</i>	RAFL08-14-E03	5'-GCAATCAAGAACAAGGCACA-3'	5'-AGCCATCTGTTTCACCTGCT-3'
<i>HsfA3</i> ( <i>At5g03720</i> )	RAFL16-88-H09	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
<i>At4g36010</i>	RAFL09-15-L16	5'-ATGGGTCAATCTCAAGTTTCTCTCT-3'	5'-ACCCACTACGTTGCGCAAAACACT-3'



表 II-4 定量的 RT-PCR に使用したプライマー

遺伝子名	順方向プライマー (5'-3')	逆方向プライマー (5'-3')
<i>ACT8</i>	5'-CAGGCATTGTCCACAGAAAA-3'	5'-CTGAGTTTGAAAACGCGGATT-3'
<i>18S rRNA</i>	5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3'	5'-CCTCCAATGGATCCTCGTTA-3'
<i>DREB2A (At5g05410)</i>	5'-CAGTGTTGCCAACGGTTCAT-3'	5'-AAACGGAGGTATTCCGTAGTTGAG-3'
<i>RD29B (At5g52300)</i>	5'-GAATCAAAAAGCTGGGATGGA-3'	5'-TGCTCTGTGTAGGTGCTTGG-3'
<i>At1g52690</i>	5'-GCAATCAAGAACAAGGCACA-3'	5'-TCAGTGCGAAGCCCTAAAGT-3'
<i>HsfA3 (At5g03720)</i>	5'-TTCGCTAACGAGGCTTCC-3'	5'-CCTCAGTAGGTGACCCTT-3'
<i>At4g36010</i>	5'-CTTGTGGCGGAGCTGATTAC-3'	5'-CCTTCGTTGCACTCTCACA-3'

### 第 III 章

#### DREB2A のタンパク質複合体解析による 新規相互作用因子の単離・同定

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公表できない。5年以内に出版予定。

## 第IV章

### 総括

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公表できない。5年以内に出版予定。

## 引用文献

**Agarwal, P. K., and Jha, B.** (2010). Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. *Biologia Plantarum* 54, 201–212.

**Agarwal, P., Agarwal, P.K., Nair, S., Sopory, S.K., and Reddy, M.K.** (2007). Stress-inducible DREB2A transcription factor from *Pennisetum glaucum* is a phosphoprotein and its phosphorylation negatively regulates its DNA-binding activity. *Mol. Genet. Genomics* 277, 189–198.

**Alberts, B., Johnson, J., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P.** (2008). *Molecular biology of the cell*, 5th edition. (New York: Garland Science).

**Antoni, R., Rodriguez, L., Gonzalez-Guzman, M., Pizzio, G.A., and Rodriguez, P.L.** (2011). News on ABA transport, protein degradation, and ABFs/WRKYs in ABA signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 14, 547–553.

**Bengoechea-Alonso, M. T., and Ericsson, J.** (2007). SREBP in signal transduction: cholesterol metabolism and beyond. *Curr Opin Cell Biol.* 19, 215–22.

**Blomberg, J., Aguilar, X., Brännström, K., Rautio, L., Olofsson, A., Wittung-Stafshede, P., and Björklund, S.** (2012). Interactions between DNA, transcriptional regulator Dreb2a and the Med25 mediator subunit from *Arabidopsis thaliana* involve conformational changes. *Nucleic Acids Res.* 40, 5938–5950.

**Chiu, W.L., Niwa, Y., Zeng, W., Hirano, T., Kobayashi, H., and Sheen, J.** (1996). Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr Biol.* 6, 325–330.

**Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735–743.

**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.

**Furihata, T., Maruyama, K., Fujita, Y., Umezawa, T., Yoshida, R., Shinozaki, K., and**

- Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2006). Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 1988–1993.
- Giandomenico, V., Simonsson, M., Grönroos, E., and Ericsson, J.** (2003). Coactivator-dependent acetylation stabilizes members of the SREBP family of transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 2587–2599.
- 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*, 819–832.
- Hirano, Y., Murata, S., Tanaka, K., Shimizu, M., and Sato, R.** (2003). Sterol regulatory element-binding proteins are negatively regulated through SUMO-1 modification independent of the ubiquitin/26 S proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* *278*, 16809–16819.
- Kidokoro, S., Maruyama, K., Nakashima, K., Imura, Y., Narusaka, Y., Shinwari, Z.K., Osakabe, Y., Fujita, Y., Mizoi, J., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2009). The phytochrome-interacting factor PIF7 negatively regulates DREB1 expression under circadian control in Arabidopsis. *Plant Physiol.* *151*, 2046–2057.
- Kim, J.S., Mizoi, J., Kidokoro, S., Maruyama, K., Nakajima, J., Nakashima, K., Mitsuda, N., Takiguchi, Y., Ohme-Takagi, M., Kondou, Y., Yoshizumi, T., Matsui, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2012). Arabidopsis GROWTH-REGULATING FACTOR7 Functions as a Transcriptional Repressor of Abscisic Acid- and Osmotic Stress-Responsive Genes, Including DREB2A. *Plant Cell* *24*, 3393–3405.
- Kim, J.S., Mizoi, J., Yoshida, T., Fujita, Y., Nakajima, J., Ohori, T., Todaka, D., Nakashima, K., Hirayama, T., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2011). An ABRE promoter sequence is involved in osmotic stress-responsive expression of the DREB2A gene, which encodes a transcription factor regulating drought-inducible genes in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* *52*, 2136–2146.
- Kisselev A.F., and Goldberg, A.L.** (2001). Proteasome inhibitors: from research tools to drug

candidates. *Chem. Biol.* 8, 739–758.

**Kobayashi, M., Ohura, I., Kawakita, K., Yokota, N., Fujiwara, M., Shimamoto, K., Doke, N., and Yoshioka, H.** (2007). Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *Plant Cell* 19, 1065–1080.

**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.

**Lyzenga W.J., and Stone, S.L.** (2012). Abiotic stress tolerance mediated by protein ubiquitination. *J. Exp. Bot.* 63, 599–616.

**Mahajan, S., and Tuteja, N.** (2005). Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Arch. Biochem. Biophys.* 444, 139–158.

**Mitsuhara, I., Ugaki, M., Hirochika, H., Ohshima, M., Murakami, T., Gotoh, Y., Katayose, Y., Nakamura, S., Honkura, R., Nishimiya, S., Ueno, K., Mochizuki, A., Tanimoto, H., Tsugawa, H., Otsuki, Y., and Ohashi, Y.** (1996). Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiol.* 37, 49–59.

**Mittler, R., and Blumwald, E.** (2010). Genetic engineering for modern agriculture: Challenges and perspectives. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 443–462.

**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, 346–361.

**Mizoi, J., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *BBA-Genet. Regul. Mech.* 1819, 86–96.



**Morimoto, K., Mizoi, J., Qin, F., Kim, J-K., Sato, H., Osakabe, Y., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2013) Stabilisation of Arabidopsis DREB2A is required but not sufficient for induction of its target genes under stress conditions. *PLoS ONE* 8, e80457.

**Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T., and Shinshi, H.** (2006). Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. *Plant Physiol.* 140, 411–432.

**Nishimura, N., Sarkeshik, A., Nito, K., Park, S.Y., Wang, A., Carvalho, P.C., Lee, S., Caddell, D.F., Cutler, S.R., Chory, J., Yates, J., and Schroeder, J.I.** (2010). PYR/PYL/RCAR family members are major in-vivo ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in Arabidopsis. *Plant J.* 61, 290–299.

**Osakabe, Y., Maruyama, K., Seki, M., Satou, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2005). An LRR receptor kinase, RPK1, is a key membrane-bound regulator of abscisic acid early signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* 17, 1105–1119.

**Pauwels, L., Barbero, G., Geerinck, J., Tilleman, S., Grunewald, W., Pérez, A., Chico, J., Bossche, R., Sewell, J., Gil, E., García-Casado, J., Witters, E., Inzé, D., Long, J., Jaeger, D., Solano, R., and Goossens, A.** (2010). NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* 464, 788–791.

**Qin, F., Sakuma, Y., Tran, L.S.P., Maruyama, K., Kidokoro, S., Fujita, Y., Fujita, M., Umezawa, T., Sawanod, 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.

**Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J.G., 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., Osakabe, Y., Qin, F., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2006). Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor,

DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell* 18, 1292–1309.

**Sakuma, Y., Maruyama, K., Qin, F., Osakabe, Y., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2006). 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.

**Satoh, R., Fujita, Y., Nakashima, K., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2004). A novel subgroup of bZIP proteins functions as transcriptional activators in hypoosmolarity-responsive expression of the ProDH gene in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 45, 309–317.

**Sokol, A., Kwiatkowska, A., Jerzmanowski, A., and Prymakowska-Bosak, M.** (2007). Up-regulation of stress-inducible genes in tobacco and Arabidopsis cells in response to abiotic stresses and ABA treatment correlates with dynamic changes in histone H3 and H4 modifications. *Planta* 227, 245–254.

**Suzuki, N., Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., and Mittler, R.** (2005). Enhanced tolerance to environmental stress in transgenic plants expressing the transcriptional co-activator Multiprotein Bridging Factor 1c. *Plant Physiol.* 139, 1313–1322.

**Vainonen, J.P., Jaspers, P., Wrzaczek, M., Lamminmäki, A., Reddy, R.A., Vaahtera, L., Brosché, M., Kangasjärvi, J.** (2012). RCD1-DREB2A interaction in leaf senescence and stress responses in Arabidopsis thaliana. *Biochem. J.* 442, 573–581.

**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-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.

**Yoo, S.D., Cho, Y.H., and Sheen, J.** (2007). Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat. Protoc.* 2, 1565–1572.

**Yoshida, T., Ohama, N., Nakajima, J., Kidokoro, S., Mizoi, J., Nakashima, K., Maruyama,**

**K., Kim, J.M., Seki, M. Todaka, D., Osakabe, Y., Sakuma, Y., Schöfl, F., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2011). Arabidopsis HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression. *Mol. Genet. Genomics* 286, 321–332.

**Food and Agriculture Organization (FAO, 国連食糧農業機関)** (2011) "Global Food Losses and Food Waste." 稲垣春郎訳 『世界の食料ロスと食料廃棄—その規模、原因および防止策』 国際農林業協働協会

## 謝辞

本研究の推進にあたり、恵まれた研究環境を与えてくださり、懇篤なる御指導および適切な御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致します。また、本研究の遂行にあたりご支援頂いた植物分子生理学研究室の溝井順哉講師、城所聡助教、吉田拓也特任助教、戸高大輔特任助教並びに小平憲祐博士に感謝致します。特に、溝井順哉講師には研究を進めるにあたり、実験計画、実験方法について終始適切なお指導、貴重なご助言を頂き、また本論文の執筆にあたり科学的な思考力の育成に尽力くださったことを心より感謝致します。また、本研究の遂行にあたり、貴重なご助言を賜りました環境資源科学研究センターの篠崎一雄先生をはじめ、質量分析を引き受けてくださった高橋史憲博士、機能開発研究グループの皆様にも深く感謝致します。また、本研究の遂行にあたり、ご支援を頂いた国際農林水産業研究センターの研究員、技術補佐官および秘書の方々にも感謝致します。最後に、日々の研究生活を支えてくださった植物分子生理学研究室の皆様に、この場を通じて心より御礼申し上げます。