

審査の結果の要旨

氏名 文辰錫

イネの転写因子をコードする *OsPIL1* 遺伝子の発現は概日リズムに従った発現を示すが、乾燥や低温ストレス下ではその発現が低下する。この遺伝子発現の抑制はストレス下の植物の成長抑制に関与することが示されている。本研究では、*OsPIL1* 相同遺伝子であるシロイヌナズナの *PIF4* と *PIF5* 遺伝子の発現解析を行い、これらの遺伝子の乾燥や低温ストレス下での発現抑制の制御機構を明らかにすることを目的とした。*PIF4* と *PIF5* 遺伝子は、*OsPIL1* 遺伝子と同様に概日リズムに従った発現を示し、その発現は乾燥によって抑制された。そこで、これらの遺伝子のプロモーター解析を行い、概日リズムに従った発現と乾燥による発現抑制に関与するプロモーター上の *cis* 領域を同定した。また、酵母のワンハイブリッド法を用いて、同定された *cis* 領域と相互作用するタンパク質の単離を試みた。

第1章の序論に続き、第2章では *OsPIL1* の相同遺伝子を探索するため、種々の植物遺伝子の系統解析を行った。その結果、*PIF4* と *PIF5* がシロイヌナズナにおいて *OsPIL1* に最も相同性が高い遺伝子であることが明らかになった。*PIF4* と *PIF5* の発現は、明期にピークをもつ概日リズムを示し、乾燥や低温ストレス条件下で抑制された。*PIF4* と *PIF5* のプロモーターに結合した *GUS* レポーター遺伝子を導入した形質転換植物体において、*GUS* 遺伝子の発現は乾燥や低温、明暗サイクルに応答して抑制されたことから、この応答がプロモーター配列に依存し転写レベルで制御されていることが示された。*PIF4* プロモーターの制御領域を特定するため deletion 解析を行った結果、プロモーターの -288 から -163 の領域が明期での発現を正に制御していることが示された。また、-117 から -90 の領域が乾燥条件下での発現を負に制御していること、-130 から -70 の領域が暗期での負の発現制御に関わっていることが示唆された。概日時計の構成因子の変異体を用いた解析から、乾燥条件下での *PIF4* と *PIF5* の発現低下には概日時計が部分的に関わっているものの、他の抑制機構も存在することが示唆された。

第3章では相互作用因子を探索するため *PIF4* プロモーターの -288 から -163 までの領域を用いて酵母ワンハイブリッド法で探索を行った結果、HD-ZIP I

subfamilyの因子であるHB5が単離された。系統解析を行った結果、HB6とHB16がシロイヌナズナの相同タンパク質であることが示された。また、ゲルシフト法によりHB5は*PIF4*プロモーターの-288から-163の領域と相互作用する事が明らかになった。HB遺伝子のプロモーターに結合した*GUS*レポーター遺伝子を導入した形質転換植物体を用いて解析を行った結果、HB5遺伝子は*PIF4*や*PIF5*遺伝子に類似して葉で強い発現を示した。HB6やHB16遺伝子の発現は葉では弱く、根で強く発現する傾向が見られた。また、HB5とHB16の発現は乾燥ストレス条件下で顕著に低下した。sGFPにつないだHB遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナでは、GFP蛍光が核で特異的に検出された。シロイヌナズナのプロトプラストを用いてHB5、HB6、HB16の*PIF4*プロモーターに対する転写活性化能を解析した結果、特にHB5が*PIF4*の発現を強く活性化することが示された。HB5の機能を調べるためHB5を過剰発現する形質転換植物体(HB5-OX)とrepression domainにつないだHB5を発現する形質転換植物体(HB5-SRDX)を作成し、その表現型と*PIF*遺伝子の発現を調べた。HB5-OX植物体は、vector control植物体と比べて顕著な変化は見られなかった。一方、HB5-SRDX植物体は矮化を示すとともに花成が早い表現型が見られ、明期で*PIF4*と*PIF5*の発現が減少する傾向が見られた。これらの結果から、HB5は*PIF4*プロモーターを正に制御する転写因子であると考えられた。

本研究によって、*PIF4*と*PIF5*がシロイヌナズナにおいて*OsPIL1*に最も近い相同遺伝子であること、その発現が乾燥と低温条件下で低下することが明らかになった。明暗サイクルと乾燥条件下で*PIF4*の発現を制御する正と負のプロモーター領域が同定された。また、HB5が*PIF4*プロモーターの正の制御領域の相互作用因子として単離され、*PIF4*遺伝子の発現において転写活性化因子である可能性が示された。

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