

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻  
平成 24 年度博士課程 進学  
氏名 大濱直彦  
指導教員 篠崎和子

### 論文題目

植物の高温ストレス応答の初期に機能する転写因子 HsfA1 の活性制御機構の解析

#### 序論

高温ストレスはあらゆる生物が遭遇しうる普遍的なストレスである。高温ストレスは細胞に大きなダメージを与えるため、高温ストレスに曝された細胞は速やかに転写をリプログラミングし、Heat shock protein (HSP) の発現を誘導することで高温ストレスに対応する。真核生物の細胞において、高温ストレス応答時の転写制御で中心的な役割を担うのは Heat shock transcription factor (HSF) と呼ばれる転写因子である。HSF は真核生物に広く保存されているが、植物ではその種類が動物と比べて非常に多様化している。

植物の高温ストレス応答では HSF が別の HSF の発現を誘導し、高温ストレス応答を増幅、持続させる転写カスケードが存在している。これは動物の高温ストレス応答では見られない転写制御機構であり、環境ストレスから逃れることのできない植物が生き残るために発達させてきた独自の仕組みであると考えられる。その転写カスケードの最上流因子は A1 サブクラス HSF (HsfA1) であることが明らかにされている。シロイヌナズナでは HsfA1a、HsfA1b、HsfA1d が重複して機能しており、それらの三重変異体は高温ストレス応答を起こさない。そのため、細胞が受容した高温ストレスシグナルは HsfA1 に集積され、HsfA1 の活性という形に変換されて転写カスケードへ入力されると考えられる。適切に高温ストレス応答を起こすためには、転写カスケードを制御する鍵因子である HsfA1 の活性を厳密に制御する必要があるが、その制御機構についてはほとんどが未解明である。

本研究では植物における高温ストレス応答の制御機構を明らかにする目的で、HsfA1 の活性制御機構の解析を行った。材料としてシロイヌナズナを用い、HsfA1 のリン酸化に着目した解析と活性制御に関わるドメインの解析という二つの切り口から解析を進めた。

## 1. HsfA1 のリン酸化部位の同定と機能解析

本研究室での先行研究により、HsfA1 は恒常的に発現し、タンパク質レベルで活性が厳密に制御されることが示唆されていた。HsfA1 過剰発現体における高温ストレス誘導性遺伝子の発現を解析することで、HsfA1 の活性が高温ストレス応答中においても制御され続けていることを示した。また、抗 HsfA1d 抗体を用いたイムノブロット解析から HsfA1d の発現量はタンパク質レベルで一定であり、タンパク質安定性レベルでの活性制御は受けていないことも示された。

HsfA1 の活性制御に関わる因子を推定するため、シロイヌナズナの培養細胞である T87 培養細胞を細胞内シグナル伝達に関わる因子の阻害剤で処理し、高温ストレス誘導性遺伝子の発現を解析した。タンパク質キナーゼ阻害剤で処理したときに、特に顕著に *HSP* や *HSF* の発現誘導が抑制されたことから、高温ストレスシグナル伝達においてタンパク質のリン酸化が重要な役割を果たすことが示唆された。HsfA1b、HsfA1d のリン酸化状態の解析から、それら HsfA1 のリン酸化が高温ストレスにより促進されることが示された。それらのリン酸化が持つ機能を明らかにするため、質量分析計を用いて HsfA1b、HsfA1d のリン酸化サイトを特定した。すべてのリン酸化サイトの同定には至らなかったが、HsfA1b で 2 カ所、HsfA1d で 3 カ所のリン酸化サイトが同定された。それらのアラニン置換体、アスパラギン酸置換体を作成し、リン酸化が HsfA1 の活性に与える影響をシロイヌナズナ葉肉細胞由来プロトプラストを用いたレポーターアッセイにより解析した。HsfA1b のリン酸化は活性抑制に、HsfA1d のリン酸化は活性化に関与する可能性が示唆されたが、変異で活性変化を示したリン酸化サイトのアラニン置換体とアスパラギン酸置換体における変化の傾向が逆になることはなかった。

これまでのレポーターアッセイ系では HsfA1 の活性が高温ストレスによって変化せず、HsfA1 の高温ストレスに対する応答性を解析することが困難であった。エフェクタープラスミド量の調整やプロトプラスト作製に *hsfala hsfalb hsfald* 三重変異体を用いることによって、高温ストレス活性化対応型のレポーターアッセイ系を構築した。この実験系を用い、各リン酸化サイトの変異が HsfA1 の高温ストレス応答性に与える影響を解析した。HsfA1b で抑制的な働きを持つリン酸化サイト以外は、それらの変異が高温ストレス応答性に影響を与えることはなかった。未同定のリン酸化サイトを含めた全体のリン酸化パターンによって、HsfA1 の活性

が制御されている可能性が考えられた。

## 2. HsfA1 の活性制御領域の同定と機能解析

シロイヌナズナの高温ストレス応答で中心的な役割を果たす 3 つの HsfA1 のうち、特に寄与度が高い HsfA1d に着目してプロトプラストを用いたドメイン解析を行った。HsfA1 の活性制御に関わると推定された領域を 5 つに分割し、それぞれを N 末端側から領域 1~領域 5 と名付けてデリションシリーズを作出した。DNA 結合活性やタンパク質安定性、細胞内局在は、これらデリションシリーズ間で差は見られなかったにもかかわらず、転写活性化能は領域 1 の欠損変異型 HsfA1d である  $\Delta 1$  において高い値を示した。そのため、領域 1 には HsfA1d の転写活性化能を抑制する働きがあると考えられた。欠損変異型 HsfA1d の転写活性化能は欠損領域を領域 1 から C 末端側へ広げることでさらに高まったが、そこに領域 1 を戻すことで活性は全長 HsfA1d (FL) と同程度まで抑制された。これらの変異型 HsfA1d の高温ストレス応答性を解析すると、領域 1 は HsfA1d の高温ストレスに応じた活性変化をもたらすのに十分な領域であることが示された。このため、領域 1 は HsfA1d の活性制御における中枢であり、その機能を解明することで HsfA1d の活性制御機構を明らかにできるのではと考え解析を進めた。

HsfA1d と VP16 のキメラ転写因子を用いた解析から、領域 1 は転写活性化ドメインとは独立して機能しており、コリプレッサーの結合部位である可能性が考えられた。これまでに、当研究室では HSP70 が HsfA1d の *in vivo* での主要な相互作用因子であり、HsfA1d の活性抑制に関わることを明らかにしてきた。酵母ツーハイブリッド法を用いた解析から、HSP70 と HsfA1d の相互作用には領域 1 が必要であることが示された。ただし、組換えタンパク質を用いたプルダウン法では相互作用が確認できなかったことから、この相互作用には第 3 の因子の仲介が必要である可能性が示唆された。

領域 1 の機能を植物体内で解析するため、FL や  $\Delta 1$  を GFP 融合タンパク質として野生型植物体中で過剰発現させた。HsfA1d は高温ストレス処理によって核へ移行することが示されているが、 $\Delta 1$  では通常生育条件下でも核への移行が見られた。この核移行には HSP90 が抑制的に働くことが示されているため、領域 1 は HSP70 だけでなく HSP90 との相互作用部位でもある可能性が考えられた。共免疫沈降法による相互作用解析から、 $\Delta 1$  では FL に比べて HSP70、HSP90 との相互作用が減少していることが示された。 $\Delta 1$  の過剰発現体では通常生育条件下でも高温ストレス誘導性遺伝子の発現が活性化しており、非常に強い高温ストレス耐性を示した。

$\Delta 1$  過剰発現体のトランスクリプトームを解析すると、 $\Delta 1$  の過剰発現では HsfA1 の下流遺伝子のうち約 3 分の 1 しか発現が活性化されないことが示された。これら

の遺伝子の機能分類から、特に転写因子が  $\Delta 1$  の過剰発現に応答しない遺伝子群に含まれることが明らかとなった。高温ストレス誘導性転写因子の発現は高温ストレス応答を急速に増幅するため、そのレベルの応答が必要な状況にならない限り発現を抑制する機構が存在するのかもしれない。

続いて FL、 $\Delta 1$  過剰発現体を高温ストレス処理し、高温ストレス誘導性遺伝子の発現を解析した。トランスクリプトーム解析で明らかになった  $\Delta 1$  に対する応答性に関わらず、各遺伝子のピークの発現量や発現減衰のパターンは FL、 $\Delta 1$  過剰発現体の間で差が見られなかった。そのため、HsfA1d の活性制御機構には領域 1 を介さない経路も働いていると考えられる。

### 3. 総括

本研究によって、シロイヌナズナの HsfA1 が高温ストレス応答によってリン酸化されることが示された。これらのリン酸化の機能の解明には更なる解析を要するが、個々のサイトのリン酸化状態ではなく全体のリン酸化パターンが重要な役割を果たしている可能性がある。HsfA1 の活性制御ドメインの解析では、通常生育条件下での HsfA1 の活性抑制に関与する部位として領域 1 を見出した。この領域は HSP70、HSP90 との相互作用に関わる領域であることから、領域 1 は HSP を介した高温ストレスシグナルが HsfA1 へ入力される部位であると考えられる。 $\Delta 1$  の過剰発現だけでは転写カスケード全体を動かすことはできなかったが、 $\Delta 1$  過剰発現体では通常生育条件下でも HSP が高発現しており、高温ストレス耐性が向上した。 $\Delta 1$  過剰発現体のトランスクリプトーム解析から、植物の高温ストレス応答は活性化と抑制の両面から複雑に制御されていることが示唆された。複雑な制御機構の存在は、植物の生存にとって温度変化に適応することがいかに重要であるかを示しているのかもしれない。