

## 審査の結果の要旨

氏名 大濱 直彦

本研究では、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知られる A1 サブグループの Heat shock transcription factor (HsfA1) の活性制御機構について解析した。植物では高温ストレスのシグナルが HsfA1 を活性化することで高温ストレス応答が起こると考えられているが、高温ストレスシグナルの伝達経路を含め、HsfA1 の活性制御に関わる機構はほとんど解明されていない。本研究ではシロイヌナズナの HsfA1 の活性制御に関わる要因を明らかにするため、リン酸化解析とドメイン解析という 2 つの切り口から HsfA1 の活性制御機構の解析を行った。

リン酸化に関する解析では、リン酸基を特異的に認識する分子である Phos-tag を用いた解析により、HsfA1 が *in vivo* でリン酸化され、リン酸化状態は高温ストレスにより大きく変化することを示した。さらに質量分析計を用いた解析により、いくつかのリン酸化サイトを同定することに成功した。リン酸化サイトに変異を加えた HsfA1 を用いた解析により、それらの中には HsfA1 の活性化や抑制に関わるものが含まれることが明らかとなった。それらの効果は複数の変異を同時に加えることで打ち消されたり、増幅されたりした。そのため、HsfA1 の活性制御においては、複数のリン酸化サイトにおけるリン酸化のパターンが活性を決める重要な要因のひとつなのではないかと考えられた。しかし、リン酸化だけで HsfA1 の活性化を十分に説明することはできなかったため、HsfA1 の活性制御では複数の要因が複合的に関与していると考えられた。

ドメイン解析では HsfA1 のうち HsfA1d を用い、活性制御に重要な役割を果たす領域を同定した。HsfA1d 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 と名付けてデリーションシリーズを作出した。レポーターアッセイでは領域 1 の欠損変異型 HsfA1d である  $\Delta 1$  が特に高い転写活性化能を示したため、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。領域 1 の抑制機能は高

温ストレスにより不活性化されたことから、この領域が HsfA1d の高温ストレスに応じた活性変化をもたらす中枢であると考えられた。HsfA1 の負の制御因子として HSP70 が知られるため、領域 1 が HsfA1d と HSP70 の相互作用領域である可能性が考えられた。そこで酵母ツーハイブリッド法により HsfA1d と HSP70 の相互作用領域を特定すると、両者の相互作用には領域 1 が必要であることが示された。

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。導入した HsfA1d の細胞内局在を観察すると FL は普段は細胞質に局在し、高温ストレス依存的に核へ移行した。一方、 $\Delta 1$  では通常生育条件下でも核に局在していた。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。このため、領域 1 は変性タンパク質量に関するシグナルが HSP との結合を介して HsfA1 へ入力される部位であると考えられた。

$\Delta 1$  は植物体内でも恒常的に活性型であり、その過剰発現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を活性化し、非常に強い高温ストレス耐性をもたらした。 $\Delta 1$  過剰発現体のトランスクリプトームを解析すると、発現上昇した遺伝子には高温ストレス誘導性遺伝子が多く含まれていた。しかし、HsfA1 下流遺伝子と比較すると、 $\Delta 1$  過剰発現体で発現が活性化されたのは HsfA1 下流遺伝子のうち約 3 分の 1 であった。残りの 3 分の 2 の遺伝子には、HsfA1 の特徴的下流遺伝子である転写因子が特に偏って含まれていた。このため、HsfA1 を活性化するだけでは高温ストレス応答を完全に引き起こすためには不十分であると考えられた。その理由として、高温ストレス応答には抑制的な制御経路も存在しており、一部の遺伝子の発現誘導にはこの制御を無効化することも必要である可能性が考えられる。

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。