

【論文内容の要旨】

申請者氏名 庄 司 猛

【研究題目】 タバコ培養細胞における熱ショックプロモーターの転写制御機構

【要 旨】

本論文では、シロイヌナズナの低分子量熱ショックタンパク質をコードする遺伝子 *HSP18.2*、の熱による発現誘導の転写制御機構をタバコ培養細胞 (*Nicotiana tabacum* BY2) を用いて解析した結果を述べた。

第1章では *HSP18.2* の熱ショックエレメント (HSE) を複数含むプロモーター断片、約 900 bp に、 β -グルクロニダーゼ遺伝子 (*GUS*) を連結した融合遺伝子 (*HSP18.2-GUS*) をタバコ培養細胞に導入し、発現解析を行った。培養温度を 27℃ から 37℃ にシフトすると、15 分後に *GUS* mRNA が合成されると共に顕著な *GUS* 活性の上昇が起り、熱ショックにより転写レベルで発現誘導が起こることを示した。また *HSP18.2* 遺伝子の転写開始点を決定した。

第2章では *HSP18.2* の転写因子 (HSF) について記述した。HSE に結合する転写因子の cDNA を 2 種類、タバコから単離した。塩基配列を決定し、推定されるアミノ酸配列をもとに他の真核生物の HSF と比較したところ、両者とも HSF に広く保存された 4 つのドメイン (DNA 結合ドメイン、核移行シグナル、多量体形成ドメイン、転写活性化ドメイン) の存在が確認され、NtHSF1、NtHSF2 と名付けた。ゲノムサザン解析から、両 *NtHSF* 遺伝子はタバコ染色体上で複数コピー存在すると思われた。また、どちらの *NtHSF* も、熱ショックの有無にかかわらず構成的に転写されていた。

第3章では NtHSF1、NtHSF2 の性質を解析した。His タグを付けた NtHSF1、NtHSF2 組換えタンパク質を大腸菌で生成させ、精製した標品を用いたゲルシフトアッセイによって、両組換えタンパク質は、HSE を含む DNA プローブに特異的に結合した。酵母の *GAL4* 遺伝子を用いる系で各 NtHSF の転写活性化能を検討した結果、NtHSF2 は転写活性化能を示したが、NtHSF1 は示さなかった。各 *NtHSF* のアンチセンス遺伝子を導入したタバコ培養細胞において、アンチ *NtHSF2* では熱ショック応答は低下したが、アンチ *NtHSF1* では応答に時間遅れが観察された。

以上の結果は、NtHSF2 は通常の熱ショック転写因子として機能するが、NtHSF1 は熱ショック応答を負に制御する、新規転写因子であることを示唆している。

【論文審査結果の要旨】

植物の環境ストレスによる遺伝子発現の応答機構の解析は、植物分子生物学の重要な課題であるが、本論文では、外部ストレスが直接細胞に伝わる熱ショック応答について、遺伝子発現機構をシロイヌナズナの低分子量熱ショックタンパク質をコードする遺伝子 *HSP18.2* を対象にタバコ培養細胞 (*Nicotiana tabacum* BY2) で解析したもので、以下の成果を収めている。

1) *HSP18.2* の熱ショックエレメント(HSE)を複数含むプロモーター断片、約900 bpに、 β -グルクロニダーゼ遺伝子(*GUS*)を連結した融合遺伝子(*HSP18.2-GUS*)をタバコ培養細胞に導入した。培養温度を27℃から37℃にシフトすると、1時間以内に顕著なGUS活性の上昇が起り、4時間後にピークを迎えること、発現誘導は転写レベルで起こることを示している。

2) HSEに結合する転写因子のcDNAを2種類、タバコから単離している。コードするアミノ酸配列をもとに他の真核生物のHSFと比較し、両者ともHSFに広く保存された4つのドメイン(DNA結合ドメイン、核移行シグナル、多量体形成ドメイン、転写活性化ドメイン)を持つことから、この転写因子をNtHSF1、NtHSF2と名付けている。

3) ゲノムサザン解析により、両転写因子の遺伝子はタバコ染色体上で複数コピー存在すると推定している。また、どちらの遺伝子も、熱ショックの有無にかかわらず構成的に転写されていた。

4) Hisタグを付けたNtHSF1、NtHSF2組換えタンパク質を大腸菌で生成させ、精製した標品を用いた、インビトロ結合解析によって、両組換えタンパク質は、HSEを含むDNAプローブに対して特異的に結合することを明らかにしている。

5) 酵母の*GAL4*遺伝子を用いる解析系により、タバコ細胞内でNtHSF2は転写活性化能を持つが、NtHSF1は持たないことを示している。

6) 各NtHSFのアンチセンス遺伝子を導入したタバコ培養細胞では、アンチNtHSF2は熱ショック応答が低下したが、アンチNtHSF1は応答に時間遅れがあることを観察している。これらの結果より、NtHSF2は通常の熱ショック転写因子として機能するが、NtHSF1は熱ショック応答を負に制御する、新規転写因子であることを示唆している。

以上、本論文は、シロイヌナズナの*HSP18.2*プロモーターの熱ショックによる遺伝子発現制御機構をタバコ培養細胞において詳細に解析し、全貌を明らかにすると共に、新たな基礎知見を加えた。よって審査委員一同は、本論文が博士(バイオサイエンス)学位論文として価値あるものと認めた。