

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780331

研究課題名(和文)シロイヌナズナ熱ショック転写因子A1dおよびA1eの活性化機構の解明とその利用

研究課題名(英文)Analyses of activation system of Arabidopsis heat shock transcription factor A1d and A1e and its application

研究代表者

藪田 行哲 (YABUTA, Yukinori)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：00379562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナの熱ショック転写因子(Hsf)A1dおよびA1eはストレス耐性獲得に重要であるHsfA2の発現を制御している。本タンパク質の活性化機構を明らかにすることで、植物のストレス応答機構に関する重要な知見が得られるのではないかと考え、本研究ではスプリットユビキチン法をベースとした酵母ツーハイブリッド法によりHsfA1d/A1eの転写活性化に関わるタンパク質の単離・同定を試みた。しかしながら、擬陽性が多く同定には至らなかった。そこで大腸菌BiFC法による単離を行った。その結果、多数のポジティブクローンが得る事ができ、そのうちのいくつかはこれまでに熱耐性に関わる事が報告されていた。

研究成果の概要(英文)：Arabidopsis heat shock transcription factor (Hsf) A1d and A1e regulate the expression of HsfA2 which plays an important role in responses and adaptations to stress. Elucidation of activation system of HsfA1d and A1e proteins will help to clarify the stress response system of plants. In this study, I tried the isolation and identification of HsfA1d-interacting protein by the cytosolic yeast two-hybrid system, which is based on the split-ubiquitin technique. However, I did not identify them. Therefore, I attempted to isolate the HsfA1d-interacting protein by Escherichia coli bimolecular fluorescence complementation. As a result, many positive clones were obtained. It has been reported that some of these clones were involved in thermotolerance.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：熱ショック転写因子 ストレス応答機構 シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

熱ショック転写因子 (Hsf) は真核生物全般に広く保存され、ストレス応答に重要である。ヒトや線虫、酵母には 1~4 つの Hsf が存在する。それに対して、高等植物では 20 以上ものホモログが存在し、構造の違いからクラス A から C の 3 クラスに分類され、さらにそれらは細かく分類されている (図 1)。

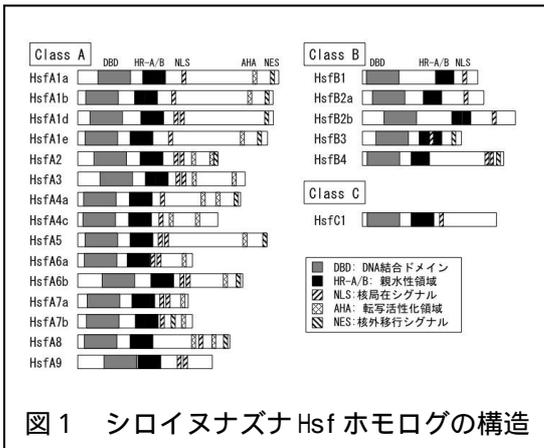


図 1 シロイヌナズナ Hsf ホモログの構造

この事実は移動の自由を持たない植物が、強光、乾燥、塩、高温など複合的な激しい環境変化 (ストレスと呼ぶ) に適応し生き残るため、動物と比べ複雑な遺伝子発現調節機構を持つことを反映するものと考えられている。

申請者らは植物の酸化的ストレス応答を解析する過程でシロイヌナズナより HsfA2 を単離し、その機能解析を行ってきた。その結果、HsfA2 は酸化ストレス付与後わずか 15 分以内に発現が誘導され、熱ショックタンパク質 (Hsp) だけでなく、種々の防御関連遺伝子の発現を制御し、HsfA2 過剰発現は植物に著しいストレス耐性を付与することから、HsfA2 は酸化的ストレス耐性能の獲得に寄与する重要な転写因子であることを明らかにした (Plant J.2006, Plant Physiol. 2008, Plant Signaling Behav.2008, Biosci. Biotechnol. Biochem.2009)。

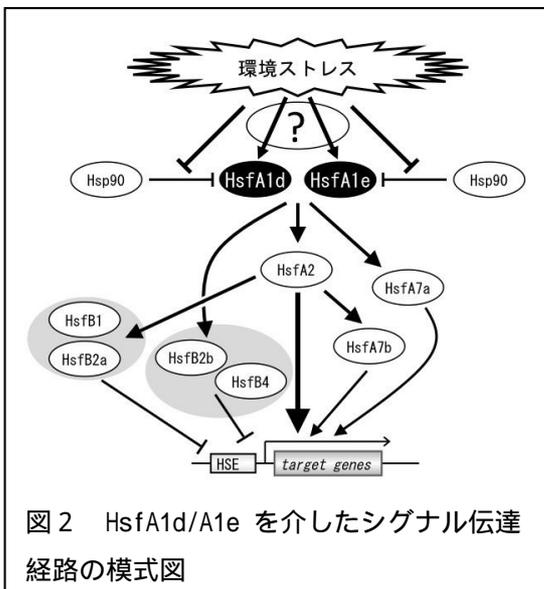


図 2 HsfA1d/A1e を介したシグナル伝達経路の模式図

さらに HsfA2 の発現制御機構について解析を行った結果、26S プロテアソームおよび Hsp90 が関与しており (Plant Cell Physiol. 2010)、HsfA2 のプロモーター解析から Hsf 認識配列である熱ショックエレメントが HsfA2 のストレス応答に必須であることを明らかにし、HsfA1d および HsfA1e が HsfA2 の発現を制御していることを突き止めた (Plant Cell Physiol. 2011, 図 2)。

2. 研究の目的

我々を含めた国内外の研究により、HsfA1d/A1e はシロイヌナズナの Hsf を介したストレス応答のマスターレギュレーターであることが明らかになりつつある。HsfA1d/A1e は通常条件下で発現しており、Hsp90 との結合により不活化されている。ストレス下では Hsp90 と解離し、活性化を受け標的遺伝子を誘導していると考えられる。動物では不活化は同様のメカニズムが、活性化には Hsf のリン酸化などのタンパク質の修飾が関与していることが明らかになっている。しかしながら、HsfA1d/A1e の活性化に関わるタンパク質など分子メカニズムは不明である。そこで本研究は HsfA1d/A1e 活性化機構を明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

酵母ツーハイブリッド (Y2H) 法により HsfA1d/A1e と相互作用するタンパク質の単離・同定を試みた。しかし HsfA1d/A1e を bait とした場合、転写活性化因子である HsfA1d/A1e がレポーター遺伝子の発現を誘導するため、一般的な Y2H 法では擬陽性のクローンが多数生じる事が推測された。そこで本研究では転写因子と相互作用するタンパク質の単離・同定が可能であるスプリットユビキチン法をベースとした Y2H 法により、先ず構成的に発現している HsfA1d と相互作用するタンパク質のスクリーニングを行った。一方、これまでに植物の熱応答にカルシウム (Ca^{2+}) シグナルが関与することが報告されている。このことから HsfA1d/A1e を介した HsfA2 の誘導に Ca^{2+} シグナリングが関わっている事が推測されたため、HsfA2 の熱ストレス応答へ及ぼす種々の Ca^{2+} シグナリング阻害剤の影響についても解析した。

4. 研究成果

スプリットユビキチン法を応用した Y2H 法により、HsfA1d と相互作用すると思われる 12 個のクローンを得る事ができた。しかしながら、これらのクローンとの相互作用を再度検定したが、相互作用は認められなかった。従ってこれらのクローンは擬陽性であると判断した。以上のことから、真核生物である酵母を用いた Y2H 法では転写因子と相互作用するタンパク質を単離することは困難であると判断した。そこで次に原核生物である大腸菌を用いた Bimolecular fluorescence

complementation (BiFC) 法により検討を行った (図 3、4)。

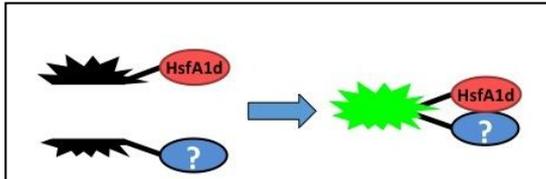


図 3 BiFC 法の原理

2 つに分割した蛍光タンパク質と目的のタンパク質および調べたいタンパク質を連結させる。これら 2 つのタンパク質が相互作用した場合蛍光が回復する事を利用した方法。

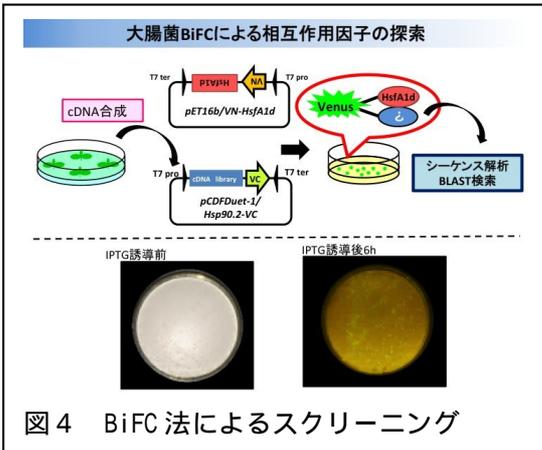


図 4 BiFC 法によるスクリーニング

77,500 クローンに対してスクリーニングを行った結果、蛍光を示すコロニーが 970 個得る事ができた。BiFC 法は発現量が多いと擬陽性が生じる事が多いことから、本法でも擬陽性が多く含まれる事が示唆された。しかしながら、これまでに熱ストレス耐性に関わることが報告されている核タンパク質をコードするクローンが 3 つ単離されたことから、本タンパク質が HsfA1d の活性化の制御に関わっている事が考えられる。今後、pull down assay などにより相互作用の検証を行う必要があることから、抗 HsfA1d 抗体を作成した。今後、pull down 法による検定や遺伝子破壊株を用いた in vivo での HsfA1d との相互作用について解析する予定である。

また、最近 HsfA1d のシステイン残基のレドックスが転写活性化能の制御に関わっていることが報告された。そこでネイティブおよび 2 つのシステイン残基をセリンに置換した変異型 HsfA1d リコンビナントタンパク質を作成し、ゲルシフトアッセイを行った結果、どちらのタンパク質も熱ショックエレメントに結合した。このことから、レドックスがシス配列への結合に関与するのではなく、HsfA1d と基本転写因子との結合に関与している事が推測された。また Hsp90 と HsfA1d の結合にこれらのシステイン残基は関わっていないことが明らかになった。

HsfA2 の熱応答へ及ぼす種々の Ca²⁺シグナリング阻害剤の影響を解析したところ、

HsfA2 の応答は抑制された。また Ca²⁺結合タンパク質であるカルモジュリン 3(CaM3)が熱応答に関わることから、HsfA2 の発現にも関与していると考え、CaM3 遺伝子破壊株の単離と、その植物での HsfA2 の熱応答を解析したところ、HsfA2 の熱応答は野生株と比較して抑制されていた (図 5)。現在、CaM3 と HsfA1d との関係について解析を行っている。

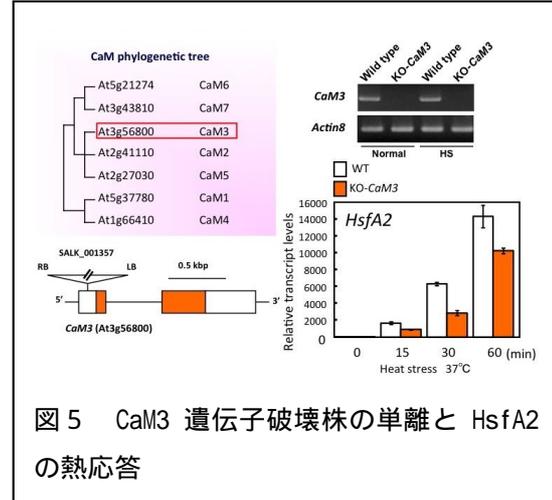


図 5 CaM3 遺伝子破壊株の単離と HsfA2 の熱応答

さらに Ca²⁺シグナリングの関与について解析する過程で新規の HsfA2 の誘導機構について解析した。その結果、HsfA4c は HsfA1d/A1e とは独立して制御に関わっている事が明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 8 件)

小林宏太、野坂亮太、中村朋美、田部記章、藪田行哲、田茂井政宏、重岡成、シロイヌナズナ HsfA1d の酸化還元が熱ショックエレメントの結合に及ぼす影響の解析日本農芸化学会 2014 年度大会 2014 年 3 月 29 日、明治大学生田キャンパス
中村朋美、野坂亮太、小林宏太、田部記章、藪田行哲、丸田隆典、田茂井政宏、重岡成、Ca²⁺シグナリングによるシロイヌナズナ熱ショック転写因子 HsfA2 の発現制御機構の解明、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 28 日、明治大学生田キャンパス

野坂亮太、藪田行哲、丸田隆典、田茂井政宏、重岡成、シロイヌナズナ熱ショック転写因子 HsfA4c による HsfA2 の発現を介した熱ストレス応答機構、第 55 回日本植物生理学会年会、2014 年 3 月 18 日、富山大学五福キャンパス

野坂亮太、中村朋美、小林宏太、田部記章、丸田隆典、藪田行哲、田茂井政宏、重岡成、大腸菌を用いた Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 法によるシロイヌナズナ熱ショック転写因子 HsfA1d の相互作用タンパク質の探

索、第 55 回日本植物生理学会年会 2014 年 3 月 18 日、富山大学五福キャンパス
野坂亮太、林秀樹、小林宏太、丸田隆典、高木優、藪田行哲、田茂井政宏、重岡成、シロイヌナズナ HsfA4c による HsfA2 発現制御機構の解明、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 25 日、東北大学川内北キャンパス

藪田行哲、野坂亮太、林秀樹、西澤（横井）彩子、高木優、重岡成、シロイヌナズナにおけるクラス A1 Hsf による Hsf シグナリングシステムの制御、第 54 回日本植物生理学会年会 2013 年 3 月 21 日、岡山大学津島キャンパス

藪田行哲、野坂亮太、林秀樹、池田美穂、高木優、重岡成、CRES-T 法を用いたショック転写因子(Hsf)シグナリングネットワークの解析、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 12 日、福岡国際会議場・マリノメッセ福岡

藪田行哲、野坂亮太、林秀樹、池田美穂、高木優、重岡成、シロイヌナズナにおける熱ショック転写因子(Hsf)シグナリングネットワークの解析、日本農芸化学会中四国支部第 34 回講演会、2012 年 9 月 21 日、山口大学工学部常盤台キャンパス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藪田 行哲 (YABUTA Yukinori)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：00379562