

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

庄司 猛

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 植物代謝調節学講座

(新名 惇彦教授)

平成12年3月24日

目次

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	1
目次	2
略語	3
緒論	4
第1章 シロイヌナズナ熱ショックプロモーターのBY2細胞での機能	6
1.1 序論	6
1.2 実験材料と方法	7
1.3 結果	10
1.4 考察	16
第2章 熱ショック転写因子をコードするタバコ cDNA の単離	18
2.1 序論	18
2.2 実験材料と方法	19
2.3 結果	22
2.4 考察	31
第3章 タバコの熱ショック転写因子の機能解析	33
3.1 序論	33
3.2 実験材料と方法	34
3.3 結果	38
3.4 考察	50
結論	53
論文目録	54
謝辞	55
参考文献	56

略語

Plants

<i>At:</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>Gm:</i>	<i>Glycine max</i> (soybean)
<i>Lp:</i>	<i>Lycopersicon peruvianum</i> (tomato)
<i>Nt:</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> (tobacco)
<i>Zm:</i>	<i>Zea mays</i> (maize)

Units

A(A600):	absorbance (absorbance at 600nm)
°C:	degree Celcius
Da:	dalton (s)
g:	gram (s)
g(700xg):	gravitational acceleration
h:	hour (s)
l(in; ml, μ l, etc):	liter (s)
min:	minute (s)
M:	Molar (mole (s) liter ⁻¹)
s:	second (s)

Prefixes to the names of units

k:	kilo (10 ³)
m:	milli (10 ⁻³)
μ :	micro (10 ⁻⁶)

Others

bp:	base pair (s)
DNA:	deoxyribonucleic acid
cDNA:	complementary DNA
PCR:	polymerase chain reaction
RT-PCR:	reverse transcriptase polymerase chain reaction
RNA:	ribonucleic acid
mRNA:	messenger RNA
SDS:	sodium dodecyl sulfata
Tris:	tris (hydroxymethyl) aminomethane
w/v:	weight per volume

緒論

動物と違って、移動することのできない植物は、絶えず種々の外部環境にさらされている。植物は、これらの外部環境から生じてくるストレスから自身を守り、かつ、生存領域を拡げるための仕組みを備えている。この仕組みとして遺伝子発現制御の多様性が、あげられているが、まだ不明な点が多い。環境ストレスへの応答機構を分子レベルで解明するには、シグナル因子が、人為的に制御可能であることが望ましい。そこで、シグナルを人為的に制御することが比較的容易である熱に着目し、熱ショック応答に焦点を当てた。

熱ショックストレス応答は、生物種間を越えて幅広く保存されている応答である (Ritossa, 1962; Tissieres et al., 1974; Barnett et al., 1980; Nover, 1991; Morimoto et al., 1990)。生物の細胞や組織、個体を一時的に通常成育温度よりも 10°C 高温にさらしたときに、熱ストレスに対する応答として熱ショックタンパク質 (Heat Shock Protein; HSP) を合成する。熱ショック応答は、1974年に初めてショウジョウバエの染色体パフが、熱及び化学的ストレスにより特異的に誘導されることから発見された (Tissieres et al., 1974)。HSPは、アミノ酸配列が保存されていることから、細胞にとって非常に重要な機能を担っていると考えられる。高等真核生物でのHSPは、次に示すように分子量ごとのファミリーに分類される (Gething et al., 1992; Craig et al., 1993; Hendrick et al., 1993; Georgopoulos et al., 1993; Parsell et al., 1993)。(1)HSP100ファミリーは、タンパク質の折畳みなどの分子シャペロンとして機能する。(2)HSP90ファミリーは、ステロイドホルモン受容体タンパク質の折畳みを始めとして、この受容体タンパク質がDNAへ結合して機能を発揮するまでの過程を制御している。(3)HSP70ファミリーは、タンパク質の折畳み、膜透過、解離会合及び分解に重要な役割を演じている。(4)低分子量HSPファミリーは、タンパク質の折畳みを介護する分子シャペロニン機能を有している。HSP100や低分子量HSPファミリー以外は、通常の生育温度においても発現している。植物にも、それぞれのファミリーに該当するHSPが単離されており、中でも低分子量のHSPは、種類存在量ともに他の生物種に比べて極めて高いという特徴がある (Almoguera et al., 1993)。

熱ショックストレスに応答をして遺伝子発現を行う遺伝子群(主に、HSPをコードする遺伝子)の 5'上流域には、種を越えて保存された共通のシス配列を見ることができる。このシス配列は熱ショックエレメント (Heat Shock Element; HSE) と呼ばれ、複数の NGAAN-NTCCNから成る (Livak et al., 1978; Pelham, 1982; Amin et al., 1988; Xiao and Lis, 1988; Barros et al., 1992)。このHSEに結合するトランス因子が、明らかになっており、熱ショック転写因子 (Heat Shock transcription Factor; HSF) と呼ばれている。酵母 (Wiederrecht et al., 1988) やショウジョウバエ (Clos et al., 1990) においてHSFは、1つのしか存在しない。一方、植物 (Scharf et al., 1990, Hubel and Schoffl, 1994, Gagliardi et al., 1995, Czamecka-Vemer et al, 1995, Prandl et al, 1998) や、ニ

ワトリ (Nakai and Morimoto, 1993)、マウス (Sarge et al., 1991)、ヒト (Rabindaran et al., 1991, Schuet et al., 1991, Nakai et al., 1997) には、複数のHSFが存在することが報告されている。熱ショックタンパク質をコードする遺伝子の転写調節は、三量体のHSFが、HSEへ結合することにより行われると考えられている。

HSFは、アミノ酸配列において特徴的な4つのドメイン構造 (DNA 結合ドメイン、疎水性領域、核移行シグナル、転写活性化領域) を有している。N末端側に位置するDNA 結合ドメインは、典型的なヘリックス-ターン-ヘリックス-モチーフ (Vuister et al., 1994A, 1994B; Harisson et al., 1994) であり、生物種を越えて最も保存されたドメインである。疎水性領域は、この領域中にあるロイシンジッパーモチーフを介して他のHSFと三量体を形成する (Landschulz et al., 1988; Rabindran et al., 1993; O'Shea et al., 1991; Zou et al., 1994)。転写活性化領域は、C末端側に位置する。

熱ショック遺伝子の転写活性化機構に関して、2つのモデルが提唱されている (Tanabe and Nakai, 1999)。1つ目は、熱ショックの有無にかかわらず、構成的にHSEへ三量体のHSFが結合している。熱ショックにより、この三量体HSFが、リン酸化され、転写を活性化するモデルである。これは、酵母において唯一見られる。2つ目は、非熱ショック時には、HSFは、細胞質に存在するが、熱ショックにより、核へ移行し、同時にリン酸化、三量体化され、転写を活性化するモデルである。こちらは、ヒト、マウス、ニワトリ、ショウジョウバエなどに広く見られる。

本論文では、植物細胞が、熱ショックストレスを受けた際の熱ショック信号の伝達機構を解析し、一群の熱ショック遺伝子の発現が誘導される仕組み(機構)を明らかにすることを目的としている。第1章では、熱ショックストレスに応答する遺伝子群の発現制御を理解するために、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を対象にしてタバコ培養細胞内で、この熱ショックプロモーター遺伝子の活性が、熱処理により厳密に制御されていたことを示した。第2章では、熱ショック遺伝子の発現を制御していると考えられている、熱ショック転写因子cDNAをタバコ培養細胞から2種類単離した。この2種のcDNAがコードするタンパク質は、熱ショック転写因子に特徴的にみられるドメイン構造を有していた。タバコ培養細胞での熱ショック転写因子をコードすることを明らかにした。第3章では、この2種の遺伝子産物が、タバコ培養細胞において熱ショックストレスに依存した熱ショック遺伝子の発現調節を行っていることを明らかにした。

本論文では、タバコ培養細胞における熱ショック応答を分子レベルで初めて明らかにした。また、植物におけるストレス応答機構に新たな知見を与え、この系を植物における外来遺伝子発現制御に応用する際に必要な示唆を与えるものである。

第1章 シロイヌナズナ熱ショックプロモーターのBY2細胞での機能

1.1 序論

真核生物のHSPは、分子量の大きさによりHSP100, HSP90, HSP70, HSP60, 低分子量HSPファミリーに分類される。これらのHSPの多くは、分子シャペロンとして機能し、タンパク質の折り畳み、局在化、高次構造形成、タンパク質分解 (Gething and Sambrook, 1992; Craig et al., 1993; Hendrick and Hartl, 1993; Georgopoulos and Welch, 1993; Parsel and Lindquist, 1993) に関与している。HSP100, 低分子量HSP以外は、通常生育温度でも発現している。植物のHSPの特徴は、他の生物種と比較して低分子量HSPが、分子種、存在量ともに豊富である点である (Schoffl et al., 1986; Schoffl et al., 1992)。

遺伝子発現のシグナル伝達を解析する場合、シグナルの人為的調節が容易でなければならぬ。そのためにシグナルを人為的に制御することが比較的容易である熱に着目し、植物に特徴的な低分子量HSP遺伝子のプロモーターを対象遺伝子に選んだ。また、均一な熱処理を行う必要から、均一な多量の細胞を扱うことのできるタバコ培養細胞を解析の宿主に選んだ。

本章では、*Arabidopsis thaliana* HSP18.2遺伝子 (Takahashi and Komeda, 1989) のプロモーター領域にGUSを連結したキメラ遺伝子と均一な熱処理を行うことのできるタバコ培養細胞 (Nagata et al., 1987) を用いて熱ショックプロモーターの発現様式の解析について述べる。

1.2 実験材料と方法

1.2.1 一般的な方法

DNA、RNAの取扱いは、Molecular Cloning (Maniatis et al., 1989) に従った。

1.2.2 タバコ培養細胞の培養

タバコ培養細胞 (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY2) は、300 mlのマイヤーフラスコに改変LS培地 (Linsmaier and Skoog, 1965) を95 ml入れ、27°Cで、130 rpmの攪拌速度、暗所下にて培養した(BR-3000,TAITEC, Saitama, Japan)。細胞の継代培養は、7日ごとに定常期に達した細胞を次の新しい培地へ 2 ml植え継いだ (Nagata et al., 1987)。

1.2.3 BY2細胞を用いた*AtHSP18.2-GUS*融合遺伝子の一過性発現解析 particle bombardmentによるBY2細胞へのDNAの導入

培養2日目の20 mlの培養液を濾紙 (ϕ 47 mm, Advantec, Toyo Roshi Kaisha, Japan) で吸引濾過し、改変LS寒天培地上に乗せた。BY2細胞へのDNA導入は、Particle Delivery System (Biolistic™ PDS-1000/He, BIO-RAD, CA, USA) を用い、その使用説明書に従って行った。金粒子は、 ϕ 1 mmのものを使用し、ヘリウムのガス圧は、1100 psiとした。BY2細胞は、particle bombardmentを行った後、暗所下で25°C、24時間培養した。

使用したプラスミド

シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)の 18.2 kDaの熱ショックタンパク質をコードする *HSP18.2* 遺伝子 (*AtHSP18.2*) のプロモーター領域 (-793 ~ +111) を pTT119 (Takahashi and Komeda, 1989) から切り出し、pBI221.1 (Clontech, Palo Alto, CA, USA) のマルチクローニングサイト (*Hind*III, *Bam*HI) へ導入し、pBI221.1::p*AtHSP18.2-GUS*を作製した。コントロールプラスミドとしてカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)35S (Odell et al., 1985; Benfy and Chua, 1990) プロモーター(Clontech, Palo Alto, CA, USA) が導入されてあるpBI221::pCaMV35S-GUSを用いた。

GUSの組織染色

2 gの形質転換BY2細胞を2.0 mM 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-s-D-glucronide cyclohexyl ammonium (X-gluc)塩を含むリン酸緩衝液pH 7.0に懸濁し、12時間、25°Cまたは、37°Cで反応させた。GUS活性を有する細胞は、X-glucの分解産物により青色を呈した。

1.2.4 形質転換体BY2細胞の作出

BY2細胞への形質転換は、アグロバクテリウム感染法 (Gynheung et al., 1985) により行った。

使用したプラスミド

pGA482 (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala Sweden) のマルチクローニングサイト (*Hind*III, *Eco*RI) へ、pBI221.1::pAtHSP18.2-GUSの*Hind*IIIと*Eco*RIにより切り出されるDNAフラグメントを導入し、pGA482::pAtHSP18.2-GUSを作製した。

目的遺伝子の導入方法

培養4日目の BY2 細胞懸濁液 4 mlに、LS培地 5 mlを加えて、これに28°Cで2日間培養した形質転換アグロバクテリウムEHA101 (バイナリーベクターを有する) を 100 μ lを添加し、シャーレ中でよく混ぜ、25°Cで2日間暗所で共存培養した。2日後、共存培養液を15 ml容チューブへ移し、800 rpmで10分、遠心分離 (GS6-KR, BECKMAN, CA, USA) により上清の過剰なアグロバクテリウムを除いた。BY2細胞をLS培地で3回洗浄した後に2 mlのLS培地を加えてカナマイシン (100 mg/1 L) を含む改変LSゲランガム培地に展開した。2~3週間後に形成してきたカナマイシン耐性カルスを選択し、形質転換体候補とした。

GUSの組織染色

X-glucによるBY2細胞の染色は、1.2.3に従った。

1.2.5 *AtHSP18.2*プロモーターの転写開始点

転写開始点の決定は、プライマー伸長法 (Hai et al., 1988) に準じて行った。37°Cで1時間、振とう培養した形質転換BY2細胞 (*AtHSP18.2-GUS*) から、グアニジン変性法により全RNAを抽出した (Logan et al., 1987)。50 μ gの全RNAと5 ngの5'末端を[γ -³²P]ATPでラベルしたプライマー (5'-CAGGACGTAAGGGACTGACC-3') を30 μ lのハイブリダイゼーション溶液 (40 mM Tris-HCl pH 7.4, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.2% SDS) に混ぜ、20分間、90°Cで熱変性させた後に44°Cで2時間アニールさせた。エタノール沈殿後、ドライアップした後に 50 μ l の逆転写反応緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 2.5 mM dNTPs, actinomycin D) に溶解し、M-MLV reverse transcriptaseを加えて、42°Cで1時間反応させた。エタノール沈殿後、ドライアップ、3 μ lの滅菌水に溶解した。5 μ lのサンプル溶液 (1mM EDTA, 5M urea, 0.1% (V/V) bromophenol blue) を加え、95°Cで3分間熱変性した後に、6% polyacrylamide-8M urea変性ゲル電気泳動を行った。電気泳動終了後、ゲルを乾燥させてImaging Plate (IP) プレートへ接触させ、BAS2000イメージアナライザー (FUJI FILM, Kanagawa, Japan) を用いて解析した。

1.2.6 GUS活性測定

BY2細胞0.2 gとGUS lysis buffer (50 mM phosphate-sodium buffer pH 7.0, 10 mM EDTA, 0.1% TritonX-100, 0.1% sarcosyl, 10 mM β -mercapto ethanol) を混合し、マイ

クロ超音波破碎機U-20 (TOMY, Tokyo, Japan) にて細胞を破碎した。出力ダイヤルを7~8に調節し10秒間パルスを、5秒間隔で10回繰り返した。15 krpm、10分の遠心分離MX-150 (TOMY, Tokyo, Japan) により、得られた上清を粗酵素抽出液とした。

GUS活性の測定は、Jeffersonら (Jefferson et al., 1987A; Jefferson, 1987B) の方法にしたがった。分光蛍光光度計HITACHI F-3010 (HITACHI, Ibaraki, Japan) を用いて、励起波長365 nm、蛍光波長455 nmで反応生成物4-MUの蛍光強度を測定した。タンパク質濃度の測定は、Bradfordの方法に従った (Bradford, 1976)。BSAを用いて作製した標準曲線からタンパク質濃度を決定した。

1.2.7 ノザン解析

1.5 gのアガロースHS (NIPPONGENE, Toyama, Japan) を79 mlの蒸留水で溶解し、16 mlのホルムアルデヒドと5 mlの20×MOPS緩衝液を加えてサブマリン型電気泳動ゲルを作製した。培養4日目のBY2細胞から、1.2.5と同様にグアニジン変性法により抽出した全 RNA10 µgを、70°Cで10分間加熱し、氷冷した後にアプライした。電気泳動は、一定電圧 (48~96 V)、1×MOPS緩衝液中で泳動した。Hybond N+ナイロンメンブレンに電気泳動により分離したRNAをキャピラリー法で12時間以上トランスファーした。トランスファーには、20×SSC (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate) を用いた。トランスファー終了後、GS GENE LINKER UV CHAMBER (BIO-RAD, CA, USA) のプログラム3でUVクロスリンクした。メンブレンとハイブリダイゼーション溶液 (0.12 M Na₂HPO₄, 0.25 M NaCl, 7%(W/V) SDS, 50% formamide) とをハイブリバックに入れ、42°Cで1時間以上、プレハイブリダイゼーションを行った。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ によりランダムラベルしたGUSプローブDNAは、95°Cで10分間加熱し、氷冷したのちにハイブリダイゼーションに用いた。16時間以上、42°Cでハイブリダイゼーションを行った。プローブのランダムラベルには、*BcaBest*TM Labeling kit (TAKARA SHUZO, Shiga, Japan) を使用した。メンブレンを室温で洗浄溶液中 (2×SSC, 0.1%SDS) 10分間、振盪させながら洗浄した。洗浄溶液を (0.5×SSC, 0.1%SDS) に変更し、同様に洗浄した。最後に40°Cで洗浄溶液中 (0.5×SSC, 0.1%SDS) 10分間、振盪させながら洗浄した。IPプレートと1時間、接触させた後にBAS2000イメージアナライザー (FUJI FILM, Kanagawa, Japan) を用いてイメージを解析した。

1.3 結果

1.3.1 *AtHSP18.2*プロモーターの構造

*Arabidopsis thaliana*の熱ショックプロモーター *AtHSP18.2*は、18.2 kDaの熱ショックタンパク質をコードする遺伝子 (accession number; X17295) の5'上流域(プロモーター領域)に相当する部分であり、Fig.1-1に示す。通常、真核生物の熱ショックプロモーターには、熱ショックストレス応答に必要なシス配列である (NGAANNTCCN) という熱ショックエレメント (Heat Shock Element; HSE) を複数コピー保存している。*AtHSP18.2*プロモーターにも複数のHSEが存在する。熱ショックエレメントは、HSEと示しボックスで囲んだ。また、TATAも同様にボックスで囲んだ。シロイヌナズナにおける転写開始点を矢印で示した。左に示した塩基の番号は、転写開始点を+1として表記した。

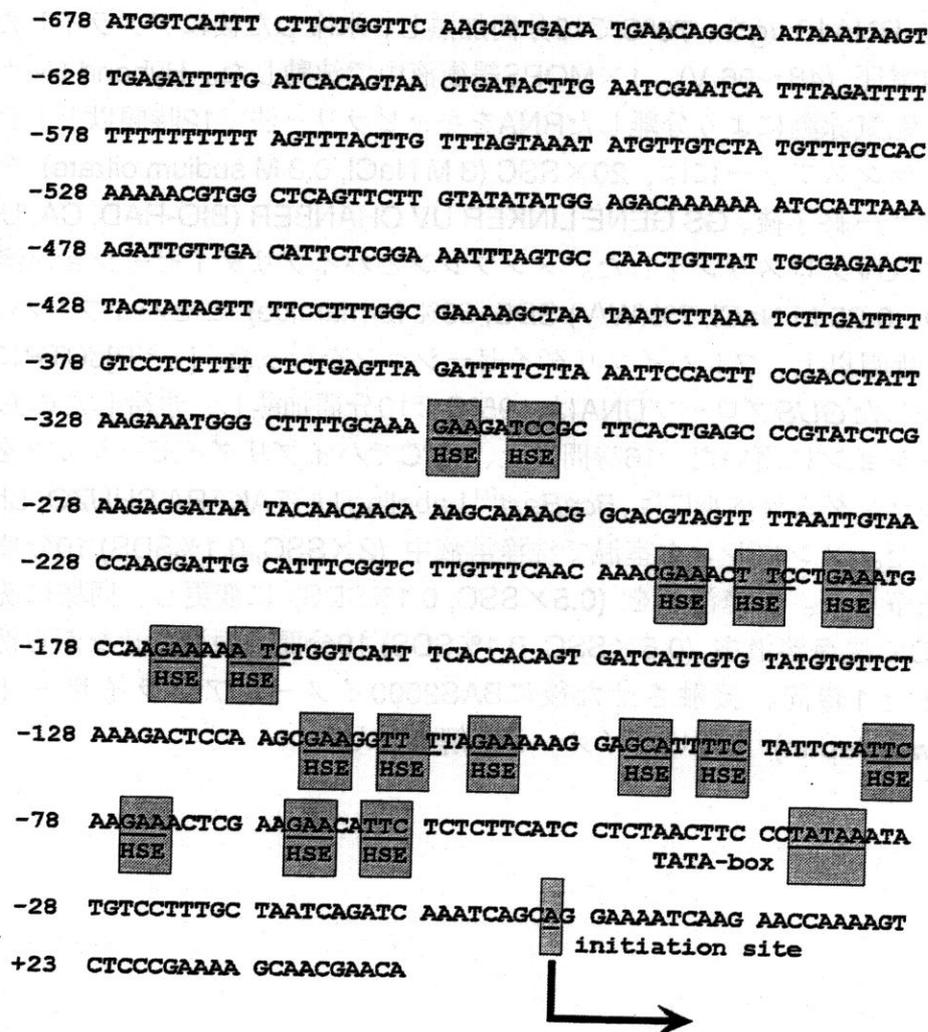


Figure-1-1. The 5' region of nucleotide sequence of *AtHSP18.2* gene.

1.3.2 *AtHSP18.2-GUS*融合遺伝子の一過性発現解析

BY2細胞を用いてpBI221::pCaMV35S-GUS, pBI221.1::pAtHSP18.2-GUS融合遺伝子の一過性発現解析を行った。培養2日目のBY2細胞へparticle bombardment法により、Fig.1-2に示したpBI221::pCaMV35S-GUS、pBI221.1::pAtHSP18.2-GUSを導入し25°C、または、37°Cで6時間培養した。X-glucにより細胞を染色し、GUSの発現を確認した結果、pBI221::pCaMV35S-GUSは、25°C、37°CのどちらにおいてもGUSの染色を確認した。一方、pBI221.1::pAtHSP18.2-GUSは、25°Cでは、細胞の染色は、観察できないが、37°Cでは、X-glucが分解され青く染色された。

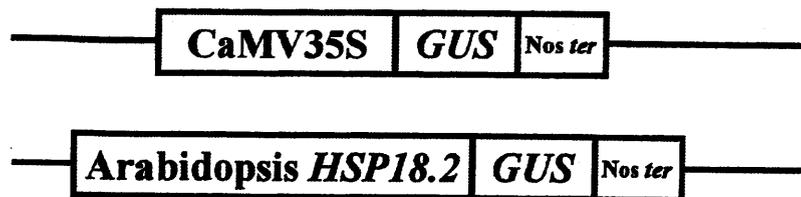


Figure-1-2. Expression of *AtHSP18.2-GUS* or *CaMV35S-GUS* chimeric gene in bombarded BY2 cells. Schematic representation of plasmid pBI221::CaMV35S-GUS and pBI221.1::AtHSP18.2-GUS.

1.3.3 *AtHSP18.2-GUS*キメラ遺伝子を導入した形質転換体の選択

1.3.3.1 pGA482::pAtHSP18.2バイナリープラスミドの作製

BY2細胞における熱ショックストレスに対して応答を示す熱ショック遺伝子の熱ショックストレス依存的な誘導遺伝子発現を理解するために、*AtHSP18.2*プロモーターへGUS遺伝子を連結した融合遺伝子を作製した。この融合遺伝子をバイナリーベクターへ導入しpGA482::pAtHSP18.2を作製した。Fig.1-3に、pGA482::pAtHSP18.2の概略図を示す。

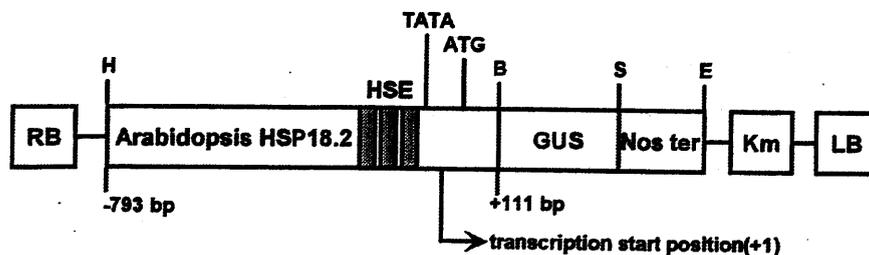


Figure 1-3. Schematic representation of T-DNA region of the binary plasmid pGA482-pAtHSP18.2 promoter contains putative heat-shock elements (HSEs), RB (right borders), LB (left borders), Km (the neomycin phosphotransferase gene), Nos ter (the poly (A)-addition site of the nopaline synthase gene), TATA (TATA-box), transcription start position

and ATG (translated initiation base). B (*Bam*HI), E (*Eco*RI), H (*Hind*III) and S (*Sac*I) indicate restriction site.

1.3.3.2 *AtHSP18.2-GUS*融合遺伝子を導入した形質転換BY2の単離とGUS組織染色
BY2細胞へアグロバクテリウム感染法によりpGA482::p*AtHSP18.2*のT-DNA領域を導入し、カナマイシンにより耐性を示す独立した形質転換BY2細胞 (BC2, BC5, BC7) を単離した。GUS組織染色法により、GUSの発現を調べた。野生型BY2細胞及び、形質転換BY2細胞を、2時間、37°Cで熱処理を行った後に、X-glucにより組織染色を行った。Fig.1-4 に示すように、独立した3つの形質転換BY2細胞は、すべて、熱処理を施した細胞のみが、青く染色された。一方、野生型BY2細胞は、熱処理の有無に関わらず染色を観察する事はできなかった。

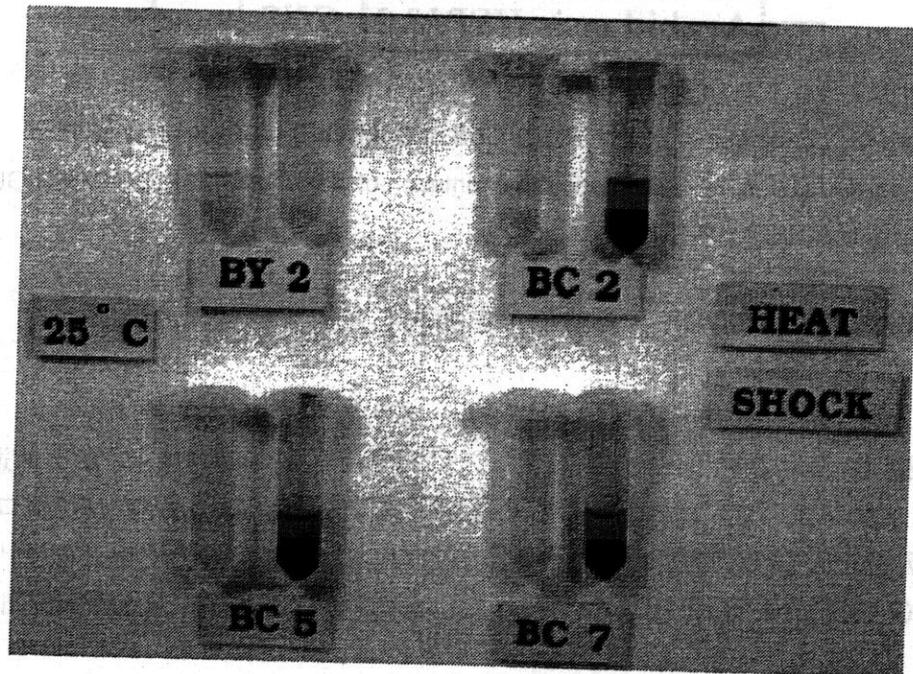


Figure 1-4. β -Glucuronidase (GUS) activity of the three independently transformed BY2 clones, BC2, BC5 and BC7, harboring pGA482::p*AtHSP18.2*, and the wild type BY2 host cells. Tubes on the left in each pair contain clones cultured at 25°C and on the right contain clones cultured at 37°C for 2 h.

1.3.4 形質転換BY2細胞での*AtHSP18.2*プロモーターの転写開始点

形質転換BY2細胞での*GUS*遺伝子の転写開始点を決定するためにプライマー伸長法によるヌクレオチド解像度により*AtHSP18.2*プロモーターからの特異的な転写産物を観察した。37°Cで培養した形質転換BY2細胞より調製したRNAを、5'末端を[γ ³²P]ATPで放射能標識した1本鎖DNAプライマーとDNA/RNAハイブリダイゼーションさせ、逆転写酵素を用いて伸長させた。DNAプライマーにより伸長させた結果、生じたDNA産物の大きさは、電気泳動により決定した(レーン1)。また、対照としては、*AtHSP18.2-GUS*キメラ遺伝子の転写開始点と思われる部分の近傍の配列を用いた(レーンT, G, C, A)。その結果、転写開始点は、翻訳開始点(+1)から、上流へ-45 bpに位置することがわかった(Fig.1-5)。また、-44~-42 bpの位置にマイナーな開始点が存在した。

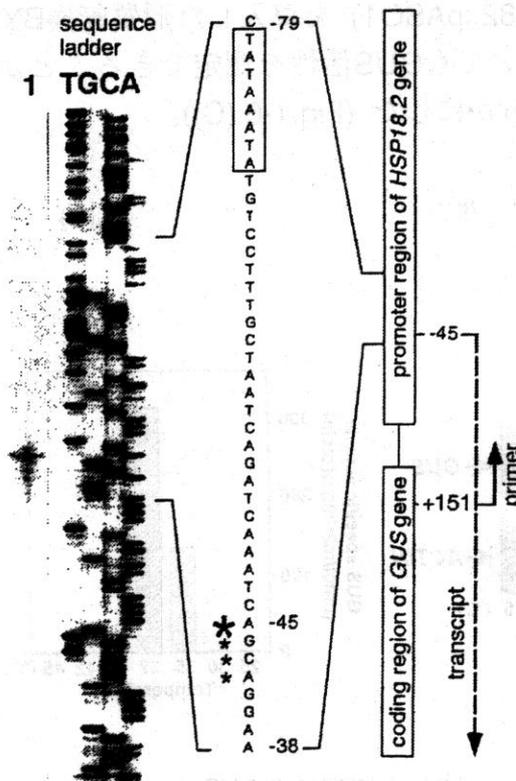


Figure 1-5. Analysis of transcription start point of the *AtHSP18.2-GUS* chimeric gene by primer extension. Lane 1 the distribution of cDNA molecules (indicated by *) synthesized *in vitro* by M-MLV reverse transcriptase with *AtHSP18.2-GUS* transcripts(-) as a templates. The DNA primer (+127 to +151 bp from ATG codon of *GUS* gene) hybridized complementary to the transcripts. The TATA element in the *AtHSP18.2* promoter is enclosed by the open box. A sequence ladder (T,G,C and A) of *AtHSP18.2-GUS*, prepared with the same primer and a T7 sequencing kit (Pharmacia LKB), was used as a reference.

1.3.5 *AtHSP18.2*プロモーターの熱処理に対する最適誘導発現の温度

形質転換体BC2を25, 30, 35, 37, 40, 42, 45°Cの各温度で2時間の熱処理を施し、*AtHSP18.2*プロモーターの転写様式を*GUS* mRNAの蓄積を指標に調べた。その結果、*GUS* mRNAの蓄積は、35°Cの熱処理から検出でき、40°Cでの熱処理で最大蓄積を検出した。さらに、42°Cの熱処理でも、*GUS* mRNAの蓄積を検出することができた。一方、30, 45°Cの熱処理では、*GUS* mRNAの蓄積は、検出できなかった (Fig.1-6 (A))。このときの*GUS*の発現を*GUS*比活性により検討した (Fig.1-6 (B))。その結果、37°Cでの熱処理が最も高い*GUS*活性値を示した。また、42°C以上の熱処理では、*GUS*活性はかなり低い値を示した。BC5, BC7についても同様の実験を行ったが同様の傾向を示した (data not shown)。40°Cにおいて、*GUS* mRNAの蓄積を検出できるにもかかわらず、*GUS*活性を検出できないことに関して、キュウリのアスコルビン酸オキシダーゼをコードする*ASO1*遺伝子 (Ohkawa et al., 1994) のプロモーターに*GUS*を連結した融合遺伝子 (pGA482::pASO1) を導入した形質転換BY2細胞を用いて、同様な熱処理を行い、40°Cにおいても*GUS*活性を測定できることから*GUS*タンパク質の熱失活ではないことを、明らかにした (Fig.1-6 (C))。

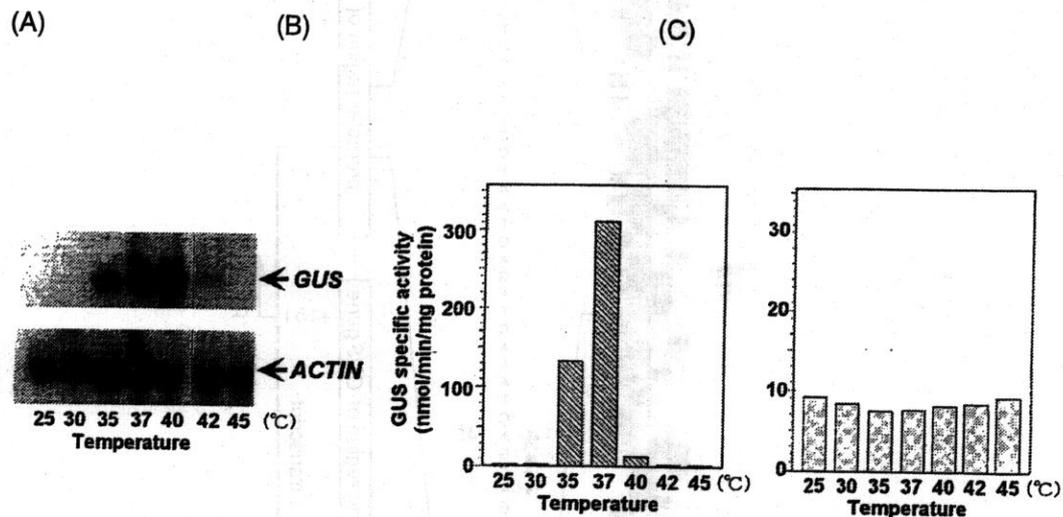


Figure 1-6. Expression of the *AtHSP18.2-GUS* chimeric gene by heat shock at various temperatures. Transcripts of the *AtHSP18.2-GUS* gene in the cells are also shown (A). There were hybridized with a [α 32 P]dCTP-labeled 2.1 kbp DNA fragment of *GUS* gene or a 0.8 kbp *ACTIN* cDNA fragment encoding rice actin (Sano and Youssefin, 1991). The specific activity of the probe was approximately 1.0×10^8 cpm/mg DNA. *Actin* mRNA was used as the internal control. Samples of 10 μ g total RNA were introduced in each lane. *GUS* activities in the cells of clone BC2 (B) and BY2 cells transformed with pGA482-pASO1 (C) were determined after 2 h culture at various temperatures indicated.

1.3.6 37°Cの熱処理後の*AtHSP18.2*プロモーター活性の経時変化

*AtHSP18.2-GUS*融合遺伝子の転写活性の経時変化を解析するために、BC2クローンを用いて37°Cの熱処理による*GUS* mRNAの蓄積量と*GUS*活性について検討した。*GUS* mRNAは、熱処理後、15分後に検出され2時間後に最大を示し、4時間後から減少に転じ、8時間後には、検出できなかった (Fig. 1-7 (A))。また、*GUS*活性値は、熱処理1時間後から急激に増大し、4時間目まで上昇を示したが、8時間目に減少に転じた (Fig. 1-7 (B))。25°Cでの*GUS*活性値は、 $39.0 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ であるのに対して37°Cで8時間の熱処理では、 $41000 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ であり、約1050倍の誘導を示した。(Fig.1-7 (B))。

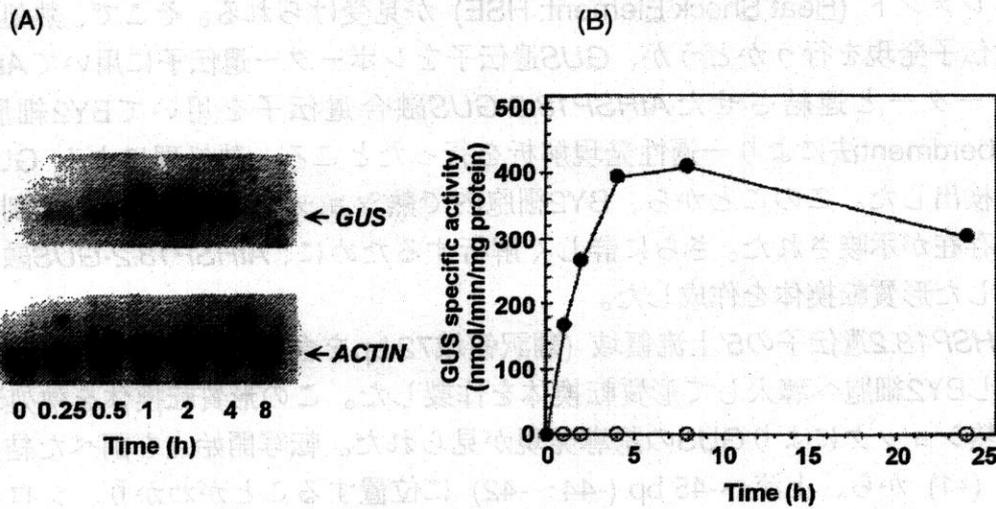


Figure 1-7. Time course of expression of the *AtHSP18.2-GUS* chimeric gene in BY2 cells after heat shock at 37°C. (A) accumulation of *GUS* transcripts during incubation of clone BC2 at 37°C. Samples of 10 µg total RNA were introduced in each lane. These were hybridized with the same probe for *GUS* or *ACTIN* mRNA as used in Fig.1-6. (B) Change in *GUS* activity in clone BC2 cultured at 25°C (○) and at 37°C (●).

1.4 考察

本研究は、植物細胞が熱ショックストレスを受けた際の熱ショック信号の伝達機構を解析し、一群の熱ショック遺伝子の発現が誘導される仕組みを明らかにすることである。そこで、本章では、多量の細胞を扱うことが比較的容易であり、均一な熱処理を行うことができるBY2細胞を解析の宿主に用いて、シロイヌナズナの*AtHSP18.2*プロモーターに*GUS*遺伝子を連結したキメラ遺伝子の、熱ショックに应答した遺伝子発現を*GUS*をレポーターとして一過性発現解析、及び*AtHSP18.2-GUS*遺伝子を導入した形質転換BY2細胞を用いて解析した。

初めに、本研究に用いたシロイヌナズナの*AtHSP18.2*遺伝子には、複数の熱ショックエレメント (Heat Shock Element; HSE) が見受けられる。そこで、熱処理に应答した遺伝子発現を行うかどうか、*GUS*遺伝子をレポーター遺伝子に用いて*AtHSP18.2*プロモーターと連結させた*AtHSP18.2-GUS*融合遺伝子を用いてBY2細胞へparticle bombardment法により一過性発現解析を行ったところ、熱処理による*GUS*の誘導発現を検出した。このことから、BY2細胞内で熱ショックにより誘導発現制御を行う機構の存在が示唆された。さらに詳しく解析するために、*AtHSP18.2-GUS*融合遺伝子を導入した形質転換体を作成した。

*AtHSP18.2*遺伝子の5'上流領域 (翻訳領域72 bpを含む全長925 bp) を*GUS*遺伝子に連結しBY2細胞へ導入して形質転換体を作製した。この形質転換体を熱処理したところ、熱ショックにより*GUS*の誘導発現が見られた。転写開始点を調べた結果、翻訳開始点 (+1) から、上流へ-45 bp (-44~-42) に位置することがわかり、シロイヌナズナで報告 (Takahashi and Komeda, 1989) されている位置 (-42) と近接していることが解った。

これらのことから、BY2細胞内においても*AtHSP18.2*プロモーターは、熱ショックによる厳密な転写制御がなされていると考えられ、BY2細胞自身も、シロイヌナズナの熱ショック遺伝子 (*AtHSP18.2*) に対する熱ショックストレス应答機構を保存していると考えられる。

*AtHSP18.2-GUS*融合遺伝子のBY2細胞での最適誘導温度は、37°Cであった。Takahashiら (Takahashi et al, 1992) は、シロイヌナズナを宿主としたときの*AtHSP18.2*プロモーターの最適誘導発現の温度は、35°Cと報告している。宿主によるこれらの最適誘導温度の違いは、宿主側に存在する転写制御因子である熱ショック転写因子 (Heat Shock Factor; HSF) の性質の違いを、反映していると考えられる。また、40°C以上の熱処理で*GUS*mRNAの蓄積がみられるのに対して*GUS*活性が低い、あるいは検出されないことは、高温での翻訳機構に何らかの調節機構がある可能性が高い (Schoffl et al., 1989; Yost et al., 1990)。なお、*ASO1*プロモーターを用いたときの*GUS*比活性は、高温領域でも一定であったことから、*GUS*タンパク質の熱失活ではなく、おそらく、*GUS*タンパク質自体が産生されていないと思われる。また、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35Sプロモーターを用いた融合遺伝子CaMV35S-*GUS*を導

入した形質転換BY2細胞を同様に解析したところ、GUS酵素の熱安定性は、25~45°Cの間ではほぼ同じであった (date not shown)。

次に、継続した熱処理に対する*AtHSP18.2*プロモーターの活性を調べた。連続した熱処理に対しての転写応答は、一過的であることがGUS mRNAの蓄積パターンからわかった。これは、BY2細胞における*AtHSP18.2*プロモーターの発現は、転写レベルにおいて制御がされていることを示している。植物のHSFには、構成的に発現するHSFと熱ショック後に発現するHSFの2種類が報告されている。形質転換BY2細胞 (*AtHSP18.2-GUS*) は、熱処理後、15分にてGUS mRNAの蓄積を検出することから、構成的に存在するHSFにより遺伝子発現の活性化制御が行われていると考えられる。

Wuらは、一度、熱応答を行った細胞は、熱処理に対する耐性を獲得して複数回の熱ショックには応答しなくなることを報告している (Wu et al., 1995)。そこでBY2細胞においても、熱応答能が変化し熱ストレス耐性を獲得するかどうかを調べた。培養4日目の形質転換BY2細胞 (*AtHSP18.2-GUS*) を2時間、37°Cで熱処理を行い、再び通常培養温度である 25°Cに戻して24時間培養後に、再度2時間37°Cで熱処理を行った。この2回目の熱処理の前後におけるGUS mRNAの蓄積を調べたところ、どちらの温度においても GUS mRNAの蓄積は検出できなかった (date not shown)。これは、細胞が、一度熱ショックを受けて熱応答を行うと2度目の熱ショックには応答しないことを示している。2度目の熱処理を行った形質転換BY2細胞 (*AtHSP18.2-GUS*) をさらに通常培養温度 (25°C) に戻して7日培養後に再び37°Cで2時間熱処理を行った。この3度目の熱処理の前後におけるGUS mRNAの蓄積パターンは、1度目と同じように熱処理後においてのみGUS mRNAを確認した (date not shown)。これは、さらに7日培養した結果、再び熱応答能が、回復したと考えられる。このように、熱ショックプロモーターの発現は、単に熱処理により転写活性化の制御になるだけでなく、積極的な転写不活性化の制御も有していると考えられる。環境ストレスに対する植物遺伝子の発現応答は、一過性である例が多い。これまでに、熱ショックプロモーターの転写を活性化にする制御 (activation) には、HSFの関与が報告されている。しかし、転写を不活性化する制御 (inactivation) に関する解析はなく、転写不活性化の制御機構の解明が今後の興味深い課題である。

第2章 熱ショック転写因子をコードするタバコcDNAの単離

2.1 序論

熱ショック転写因子 (Heat Shock Factor ;HSF) は、熱ショック遺伝子の転写開始部位の 5' 上流域にある、非常によく保存された熱ショックエレメント (Heat Shock Element; HSE) と呼ばれる10塩基対 (NGAANNTCCN) の共通配列に結合して転写調節を行うタンパク質因子である。HSF遺伝子は、最初に酵母 (Wiederrecht et al., 1988) から単離され、以後、ショウジョウバエ (Clos et al., 1990)、ニワトリ (Nakai and Morimoto, 1993)、マウス (Sarge et al., 1991)、ヒト (Rabindaran et al., 1991, Schuet et al., 1991, Nakai et al., 1997) 及び植物 (Scharf et al., 1990, Hubel and Schoffl, 1994, Gagliardi et al., 1995, Czamecka-Verner et al., 1995, Prandl et al., 1998) からも単離されている。酵母やショウジョウバエのHSF遺伝子は1つであるが、ニワトリでは3種類、マウスでは2種類、ヒトでは4種類、トマトでは3種類、シロイヌナズナでは9種類、大豆では6種類の複数のHSF遺伝子が単離されている。HSF遺伝子の発現様式は、2タイプが報告されている。1つは、熱ショックの有無にかかわらず構成的な mRNAの蓄積を示すタイプで、すべての高等真核生物に見られる。もう1つは、熱ショックによってmRNAが合成されるタイプで、植物に特異的に見られる。

HSFは、4つの機能ドメイン (DNA 結合ドメイン、疎水性領域、核移行シグナル、転写活性化領域) から成る。N末端側に位置するDNA結合ドメインは、種を越えて最も保存されており、典型的なヘリックス-ターン-ヘリックスタイプのDNA結合モチーフ (Vuister et al., 1994A, 1994B; Harisson et al., 1994) を有している。疎水性領域には、ロイシンジッパーモチーフ (Landschulz et al., 1988; Rabindran et al., 1993; O'Shea et al., 1991) を含んでいて、三量体形成 (Zou et al., 1994) に必要なドメインである。核移行シグナル (Kalderon et al., 1984; Robbins et al., 1991) は、HSFの核への移行に必要である。C末端側には転写活性化領域 (Shi et al., 1995) が存在する。

前章において、タバコ培養細胞へシロイヌナズナのAtHSP18.2遺伝子のプロモーターとGUSレポーター遺伝子を連結した融合遺伝子を導入した形質転換体が、熱ショックに依存したGUS遺伝子の発現を確認した。一般に熱ショックプロモーターの発現は、基本転写因子と転写調節因子により制御されており、この転写調節因子は、構造的に種を越えて保存されている。植物細胞での熱ショック転写制御機構をさらに詳細に調べるためには、この転写制御因子を含めた解析が必須である。本章では、タバコ培養細胞からHSFをコードすると思われる2種のcDNAの単離し、構造と遺伝子の発現様式に関しての解析結果を述べる。

2.2 実験材料と方法

2.2.1 一般的な方法

DNA、RNAの取扱いは、Molecular Cloning (Maniatis et al., 1989)に従った。

2.2.2 ゲルシフト解析

BY2細胞から粗核抽出液の調整

Schofflらの方法に従い粗核抽出液を調整した (Schoffl et al., 1990)。培養4日目のBY2細胞(新鮮重量) 1gを氷冷した12.5 mlのHomogenizing buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 1 mM EDTA, 0.1% Np-40, 14 mM β -mercapto ethanol, 5% sucrose, 30% glycerol, 2.4 μ M leupeptin, 8 μ M pepstatin) を加えて日立ホモジナイザー HG-30 (HITACHI, Ibaraki, Japan) で、最大スピード30秒を3回、温度上昇に注意を払いつつホモジナズした。遠心分離 (3000 rpm, 10 min, 4°C, J2M1, Beckman, CA, USA) により上清を除き、沈殿を等量のExtraction buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 400 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% glycerol, 2.4 μ M leupeptin, 8 μ M pepstatin) に懸濁した。再度遠心分離し得られた上清を粗核抽出液とした。

ゲルシフトに用いるプローブDNA作成

Mega Label Kit (TAKARASHUZO, Siga, Japan) を用いて*AtHSP18.2*遺伝子のプロモーター領域 -324 bp~-146 bp (転写開始点+1からの距離) までのDNA断片を[γ -³²P]ATPにより末端標識して作製した。

プローブDNAと粗核抽出液との結合反応

末端を放射標識したプローブDNA断片9000 cpm、1 μ gのpoly(dI-dC)、2 μ gの粗核タンパク質をbinding buffer (12.5 mM Tris-HCl pH 7.8, 5 mM EDTA, 100 mM KCl) 中で23°Cで10分間、結合反応を行った。競合実験には、未放射標識のDNA断片を加えた。

ゲル作成と電気泳動とシグナル検出

低イオン強度緩衝溶液 (6.7 mM Tris-HCl pH7.5, 3.3 mM sodium acetate, 1 mM EDTA) を泳動用緩衝溶液とし、4%ポリアクリルアミドゲルにサンプルをアプライし、一定電圧 (200 V) で電気泳動を行った。泳動終了後、ゲルをゲル乾燥機 (BIO-RAD, CA, USA) で80°Cで30分間、乾燥しImaging Plate (IP) に接触させた。BAS2000イメージアナライザー (FUJI FILM, Shizuoka, Japan) を用いてIPを解析した。

2.2.3 HSF遺伝子のcDNAクローニング

コンピュータを用いたアミノ酸配列モチーフの解析

塩基配列から推定されるアミノ酸配列への翻訳、塩基配列及びアミノ酸配列のアラ

イメントは、Gene Works (Oxford Molecular Group. Inc., CA, USA) を用いた。

タバコ HSF 遺伝子の部分配列を単離するための RT-PCR

トマトの HSF 遺伝子 *LpHSF8* [X67599], *LpHSF24* [X55347], *LpHSF30* [X67601] と出芽酵母の HSF 遺伝子 *YScHSF1* [J03139] の DNA 結合領域内で高度に保存されているアミノ酸配列をもとにプライマー (5'-CTI-CCI-AAA-TAG-TTC-ARC-AYA-AYA-AYT-TY, 5'-GAA-ATT-CTC-ATT-IGC-RAA-YTC-CCA-YTT-RTC) を作製し、培養 7 日目の BY2 細胞から調整した全 RNA を鋳型にして GeneAmp RNA PCR Kit (Perkin Elmer, CA, USA) を用いて RT-PCR を行った。cDNA 合成、PCR 等の条件は、付属説明書にしたがった。

BY2 細胞の cDNA ライブラリー作成

培養 7 日目の BY2 細胞から全 RNA を抽出し、oligo(dT)-cellulose Type 7 を用いて poly(A)⁺RNA を調製した。この poly(A)⁺RNA を用いて cDNA ライブラリー (λ ZAP, CLONTECH, Palo Alto, CA, USA) を作製した。さらに、培養 7 日目の BY2 細胞を 2 時間 37°C で熱処理を施した後に、同様の手法で poly(A)⁺ RNA を調製した。この poly(A)⁺ RNA を用いて λ *gt11* cDNA ライブラリー (CLONTECH, Palo Alto, CA, USA) を作製した。cDNA 合成、ファージへの cDNA 導入は、付属の説明書に従った。

タバコ HSF cDNA のスクリーニング

RT-PCR により単離してきた BY2 細胞の HSF の DNA 結合領域に相当する DNA を *BcaBest*TM Labeling Kit (TAKARASHUZO, Siga, Japan) を用いて [α ³²P]dCTP でランダムラベルし、放射能標識した DNA プロブを作製し、ブランクハイブリダイゼーションに用いた。1 回目のスクリーニングには、 λ ZAP により作製したライブラリーを、2 回目のスクリーニングには、 λ *gt11* により作製した cDNA ライブラリーを用いた。ハイブリダイゼーション溶液中 (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1% (W/V) SDS, 10% dextran, 1×denhartrts, 48% (W/V) formamide) で、37°C、48 時間以上ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション終了後、メンブレン (HybondTM-N; Amersham, UK) は、2.5×SSC、0.5% SDS 溶液を用いて室温で 2 回、洗浄した。さらに、37°C で同様に洗浄した。メンブレンは、X 線フィルムに 2 日間、接触させた後に現像した。

タバコ HSF 遺伝子の塩基配列決定

候補 cDNA を持つ組換えファージからファージゲノム DNA を単離し、cDNA を含む領域を pSK へ、サブクローニングした。塩基配列は、Dye-primer cycle sequencing kit (Perkin Elmer, CA, USA) を用いて、dideoxy chain termination 法 (Sanger et al., 1977) により ABI sequencer model 373 (Applied Biosystems, CA, USA) により決定した。それぞれの塩基配列は、DDBJ/EMBL/GenBank の塩基配列データベースへ、*NtHSF1*

[AB014483]、*NtHSF2* [AB014484]として登録した。

2.2.4 サザン解析

BY2細胞のゲノムDNAは、Watosonら (Watoson and Thompson, 1986) に従って調製した。10 µgのBY2細胞のゲノムDNAを種々の制限酵素を用いて完全に消化し0.8% アガロースゲル電気泳動により分離した。ナイロンメンブレン (Hybond™-N; Amersham, UK) へ転写後、*NtHSF1* cDNAの5'非翻訳領域 (Probe 1A)、及び *NtHSF2* cDNAの 5'領域の DNA フラグメント (Probe 2A) を[α ³²P]dCTPにより放射能標識し、ハイブリダイゼーション液 (0.5 M Na₂HPO₄ pH 7.2, 7% SDS) で16時間、ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション終了後、メンブレンは 0.1×SSC, 0.1%(W/V) SDS 中で65°C、15分洗浄し、-80°CでX線フィルムに感光させた。

2.2.5 ノザン解析

タバコ*HSF*遺伝子のノザン解析は、1.2.6と同様に行うが、プローブ及びハイブリダイゼーションの条件を変更した。*NtHSF1*、*NtHSF2* cDNAを鋳型にして、DNA結合ドメインに相当する部分を除いて*NtHSF1*の741 bp～1322 bp をプライマー5'-ACA-GAT-CTA-CGC-CGT-CGG-AAA-ACC-GTG-Aとプライマー5'-TCT-CAG-ATC-AGT-TAC-CAG-ACC-TTG-TTA-CTC-TC、*NtHSF2*の587 bp～1511 bpをプライマー5'-AAA-GAT-CTC-CAT-AGA-CGT-AAA-CCG-GTT-CAT-AGとプライマー5'-CTT-CTA-GAT-TAT-GTT-TTC-TCT-GCT-GGA-GTA-AGを用いてPCRにより増幅した。増幅したDNA フラグメントは、pSK-ヘサブクロニングし[α ³²P]dUTPで放射能標識したアンチセンスRNAを*in vitro* 転写 (Promega, MA, USA) により作成した。ハイブリダイゼーション液 (0.12 M Na₂HPO₄ pH 7.0, 7% SDS, 0.25 M NaCl, 50% (W/V)formamide) を用いて、65°Cで16時間ハイブリダイゼーションを行い、最終的に、65°Cの0.5×SSC、0.1% SDS 溶液中で洗浄し、-80°Cで4時間、X線フィルムに感光させた後に現像した。

2.2.6 アミノ酸配列解釈ツール

計算機は、塩基配列から推定されるアミノ酸配列への翻訳は、Gene Works (Oxford Molecular Group, Inc., CA, USA) を、複数のアミノ酸配列間のアライメント及び遺伝系統樹は、国立遺伝学研究所のMALAIN (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/htmls/E-mail/clustalw-e.html>) を、タンパク質のモチーフ構造検索は、ゲノムネット内の配列解釈ソフト (<http://www.genome.ad.jp/>) を用いた。

2.3 結果

2.3.1 BY2細胞の核タンパク質中のHSE配列結合因子の検索

シロイヌナズナの*HSP18.2*遺伝子 (*AtHSP18.2*) の熱ショックプロモーターが、BY2細胞において熱ショックストレスに依存したレポーター遺伝子の遺伝子発現を顕著に行うことを第1章で示した。このプロモーターには、熱ショック応答に依存した遺伝子発現に必要なシス配列である熱ショックエレメント (Heat Shock Element; HSE) が保存されている。高等真核生物において、このHSEに結合し転写を活性化する因子が、既に同定されており、熱ショック転写因子 (Heat Shock Factor; HSF) という。BY2細胞におけるこのプロモーターの熱に依存した誘導発現には、タバコHSFが関与している可能性が挙げられる。そこで、*AtHSP18.2*遺伝子のHSEへ結合する因子がBY2細胞において存在するかどうかをBY2細胞の粗核抽出液を用いてゲルシフト解析により検討した。BY2細胞の粗核抽出液 (Tobacco Nuclear Extract; TNE) を調製し、*AtHSP18.2*プロモーターのHSEを含む領域-324 bp~-146bpをPCRにより増幅し、末端を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ により放射標識したDNAプローブを用いてゲルシフトアッセイを行った。その結果、特異的なシフトバンドを検出した(Fig.2-1)。粗核抽出液中には、この*AtHSP18.2*プロモーターのHSEへ結合する因子の存在が示唆された。

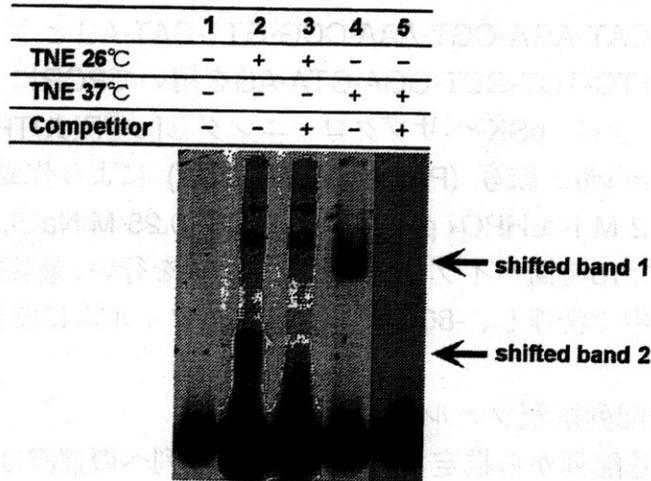


Figure 2-1. Gel shift assay with BY2 crude nuclear extract. A double stranded 178bp DNA fragment, containing 6 HSEs, from *AtHSP18.2* promoter was used as probe for a gel shift assay. $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ labeled HSE probe was incubated with sterilized water instead of nuclear extract in lane1, with BY2 nuclear protein extract (TNE) at 25°C in lane2 and 3, with BY2 nuclear protein extract after heat treatment at 37°C for 2 h in lane4 and 5. Non radio labeled 178 bp DNA fragment is used as a competitor DNA. Competitor DNA was added to the incubation mixture when radio labeled DNA probe and BY2 nuclear protein were mixed in lane3 and 4.

また、BY2細胞の粗核タンパク質中にはこの*AtHSP18.2*プロモーターに結合するタンパク質因子の存在が、Shimizuら (Shimizu et al., 1995) により明らかにされている。さらに、詳細に*AtHSP18.2*プロモーターの発現制御を理解するには、このプロモーターの転写制御に関与していると考えられる転写制御因子を含めた総合的な解析が必要である。そこで、BY2細胞からこの熱ショックプロモーターの転写制御に関わると考えられる熱ショック転写因子(Heat Shock Factor; HSF) cDNAの単離を行った。

2.3.2 BY2細胞の熱ショック転写因子をコードするcDNAの単離

初めに、スクリーニングに使用するプローブを作製した。真核生物のHSFは、DNA結合領域が種を越えて広く保存されている。そこで、出芽酵母 *YSCHSF1* [J03139] とトマトの熱ショック転写因子 *LpHSF8* [XZ67600], *LpHSF24* [X55347], *LpHSF30* [X67601]のDNA結合領域内で高度に保存されているアミノ酸配列 (LPKYFKHNNF) および (DRWEFANEGZ) に相当するデジェネレイトドプライマーを作製した (Fig.2-2)。

Primer	LPKYFKHNNF	DRWEFANEGZ	
<i>LpHSF8</i>	WSPTNNSFVVDPPFAKDLLPKYFKHNNFSSFVRLNTYGFVKV-----	DPDRWEFANEGFLRQKHLKSI	128
<i>LpHSF24</i>	WNEIGTTFVVKETAEPKADLLPKYFKHNNFSSFVRLNTYGFVKI-----	VDRWEFANEFKRGKELLTAI	96
<i>LpHSF30</i>	WSTLNSFIVDSEKFSITILLPRFFKHSNFSSFVRLNTYGFVKV-----	DFDRWEFANEGFLGQKHLKTI	118
<i>Yschsf1</i>	WAEDGKSEFIVTNRREFVHQILPKYFKHNFASFVRLNMYGHWKVDVKSQSSSDDRWQFENEFIRGREDLLEKI		272
Consensus	W-----F-V-----F-----LP--FKH-NF-SF-RQLN-YG--K-----	D-W-F-NE-F--G---LL--I	

Figure 2-2. Amino acid sequence of potential DNA binding domain of HSF. Three partial sequence of tomato HSF clones and a partial sequence of yeast HSF are compared. The consensus sequence denotes invariable amino acid residues. Primeres position for RT-PCR were indicated at top. Numbers at the right side show position from N-terminal in each proteines.

このプライマーセットを用いて培養7日目のBY2細胞から調製した全RNAを鋳型としたRT-PCRを行った。PCRにより増幅されたDNA断片 (Product1, Product2) の塩基配列を確認したところ、出芽酵母、トマトの熱ショック転写因子のDNA結合領域と高い相同性を示した (Fig.2-3)。この DNA断片をcDNAスクリーニングのためのプローブに用いた。

Product1	-----LP KYFKHNNFSS FVRKLNLYGF RKIVPDKWEF PNMNE-----	37
Product2	-----LP KYFKHNNFSS FVRQLNTYGF QKIVPDKWEF ANENF-----	37
<i>LpHSF24</i>	-----LP KYFKHNNFSS FVRQLNTYGF RKIVPDKWEF ANENF-----	85

Figure 2-3. Comparison of nucleotide sequence of *LpHSF24* and PCR product. Numbers at the right side show position from N-terminal in each proteines.

培養7日目のBY2細胞から全RNAを抽出し、poly(A)⁺ RNAを調製した。これを用いてλ ZAP cDNAライブラリーを作製してスクリーニングした結果、6.0×10⁶のプラークから3個の陽性プラークを獲得した。このプラークからcDNAを抽出しpSKへサブクローニングし塩基配列を決定した。その結果、1つは、完全長cDNAを有していることがわかり、*NtHSF1*と名付けた (Fig.2-4)。残りの2つは、完全長cDNAではなかった。そこで、新たに培養7日目のBY2 細胞を37°Cで2時間、熱処理後に全RNAを抽出した。poly(A)⁺RNAを調製し、λ *gt11*cDNAライブラリーを作製した。先に単離した*NtHSF1*をプローブに用いて、5.0×10⁶のプラークをスクリーニングした結果、複数の陽性プラークを獲得した。塩基配列を決定した結果、すでに単離した*NtHSF1*以外に新たに完全長cDNAの存在が分かった (Fig.2-4)。そのクローンを*NtHSF2*と名付けた。*NtHSF1*、*NtHSF2*のcDNA長は、それぞれ、1639 bp, 1690 bpであった。*NtHSF1*、*NtHSF2*のアミノ酸をコードしていると考えられる領域は、それぞれ、454 bpから 1329 bpまでの876 bp、285 bpから1508bpまでの1224bpであった。推定されるアミノ酸からの分子量は、それぞれ、32.1 KDa, 46.5 KDaであった。*NtHSF1*と*NtHSF2*の推定されるアミノ酸配列を比較した (Fig.2-5)。*NtHSF1*、*NtHSF2*のどちらも、N末端側にDNA結合ドメイン (DNA binding domain と記し、ボックスで囲んだ領域) を有していた。また、ロイシンジッパー (疎水性アミノ酸をボックスで囲んだ) 及び核移行シグナル (NLS と記し、ボックスで囲んだ領域) を保存していた。また、C末端側にトマトのHSFに保存されているトリプトファン残基 (ボックスで囲んだ領域) が、*NtHSF1*及び*NtHSF2*にも保存されていた。

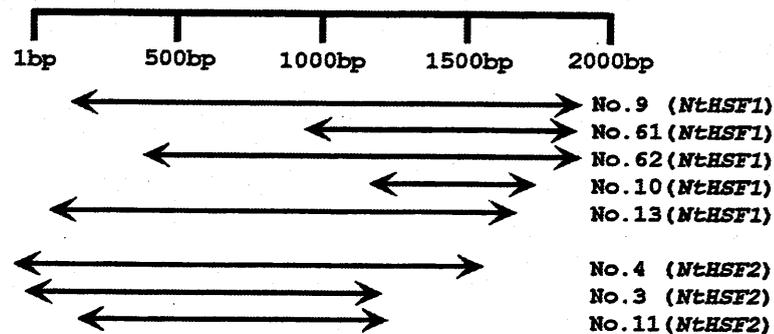


Figure 2-4. Diagrammatic representation of the *NtHSFs* cDNAs.

```

NtHSF1  ----MSQRTVBPAPFLTKTYQLVDDATTDVVSWNESGTTFFVVKTAEFAKDLVPTTFKHN 56
NtHSF2  MDEATCSTNALPPFLTKTYEMVDDPSSDAIVSWSSSNKSFVWNPPDFARDLLPRYFKHN 60
      .. . . *****:****:* :***. . .:****:..:****:* *****

      DNA binding domain                                NLS
NtHSF1  NFSSFVROLNTYGFRKIVPPDKWEPAN-ENFKRGOKELLTAIRRKKVTPTPPAGGKS--VV 113
NtHSF2  NFSSFVROLNTYGFRKVDEKWEEFANEDNEFRGOPHLLKNIRKKVPVHSHAQNLHGLSS 120
      *****:*****: *:* ***** :** ** * . * . * :***. * . . *
      NLS

NtHSF1  PGTSASPDNSGEDLGSSTSSP-----DSK----- 138
NtHSF2  PLTESERQGYKEDIQLKLHENESLHLDLORHQDRQLELQMQVFTERVOHVEHROKTML 180
      * * . . . : . * . . . * :

NtHSF1  -----NPGSVDTPPKG--SQFADISDE--NEKIKKDNOMIS 169
NtHSF2  SALARMLDKPVTDLSRPQLQVNDIKRELPGNSCLYNETDLEDTRAISSRALTWENMNPS 240
      * . . . ** : : : ** . * . . * : *
      NLS

NtHSF1  SELAQAKKQCDEVAFLNOYVKVAPDMINRISQGTS-----GSYGELVKE 216
NtHSF2  SIETINAEINQLDSSTFWENVQDVQAWIQONCSLELDESTSCADSPAISTQLNVD 300
      * * : : : * : * . : * * : * . * . * . * . * : * : * :

NtHSF1  VIGGVNDLEAQ-----GSDD-----EKGDTLKLFGVLLKEN--KK 250
NtHSF2  VGPKASDIDMNSEPNANTNPEVAPEDQAAVAGTTTNVPTGVNDIFWEQLTENPGSVDA 360
      * . . : : : : : * : * . : : : * . * .

NtHSF1  KSGPENADISGSRGKMKTMDYNLIKMSSAPGESNKVCN----- 292
NtHSF2  SEVQSERKDIGNKKN-ESKPVDSGKERNMKSVNSLAEQLHLTPAERT 406
      .. . * . * . . . . * . * . * . * . . : : : :

```

Figure 2-5. Deduced amino acid sequences of NtHSF1 and NtHSF2. Alignment was done to best match in both sequences. Same and similar amino acids in both HSFs are (*), (:), and (.), respectively. Amino acid residues in conserved DNA-binding domain, nuclear localization domain (over or under bars), boxed L residue is leucine zipper repeat, and boxed W residue is conserved Trp repeat.

2.3.3 植物HSFの遺伝系統樹解析

植物ですでに報告されている熱ショック転写因子とNtHSF1、NtHSF2との遺伝系統樹をFig.2-6に示す。各タンパク質名に続いて、NtHSF1、NtHSF2との相同性を示した。植物のHSFは、大きく3つのグループに分かれる。NtHSF1は、トマトのLPHSF24と非常に高い相同性 (84%) を示した。一方、NtHSF2は、NtHSF1とは、異なるグループに属し、どのHSFとも、相同性は低い値 (15~47%) を示した。

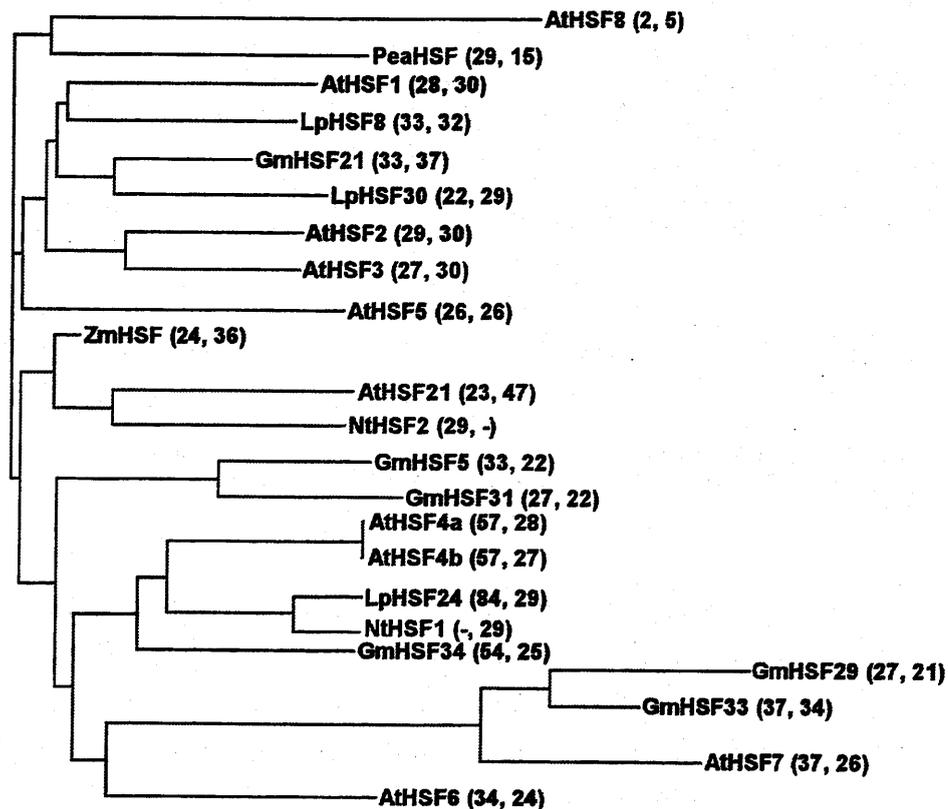


Figure 2-6. HSF consensus tree from parsimony analysis. The analysis was conducted using the MALIN software at the National Institute of Genetics (Mishima, Shizuoka, Japan). AtHSF1 (X76167), AtHSF2 (AJ251865), AtHSF21 (U68561), AtHSF3 (Y14068), AtHSF4a (Y14069), AtHSF4b (U68017), AtHSF5 (AJ251866), AtHSF6 (AJ251867), AtHSF7 (AJ251868), AtHSF8 (AC002986), LpHSF8 (X67600), LpHSF24 (X55347), LpHSF30 (X67601), ZmHSF (X82943), GmHSF5 (Z46956), GmHSF21 (Z46952), GmHSF29 (Z46951), GmHSF31 (Z46955), GmHSF33 (Z46954), GmHSF34 (Z46953), NtHSF1 (AB014483), NtHSF2 (AB014484), PeaHSF (AJ010643),

2.3.4 *NtHSF1*、*NtHSF2*遺伝子のゲノムコピー数

ゲノム上でのコピー数を調べるために、サザン解析を行った。Fig.2-7 に示すように、*NtHSF1*は、プローブ1Aを用いたときに、*Hind*III、*Eco*RIで制限酵素消化したレーンでは、2つのバンドを検出した。*Eco*RIは、*NtHSF1*cDNA中に制限酵素消化部位が存在する。*Eco*RVで制限酵素消化したレーンでは、1つのバンドを検出した。*Hind*III、*Eco*RVは、*NtHSF1*cDNA中には制限酵素消化部位は無い。また、*NtHSF2*は、プローブ2Aを用いたときに、*Hind*III、*Eco*RIで制限酵素消化したレーンでは、2つのバンドを検出した。*Hind*III、*Eco*RIともに、*NtHSF2* cDNA中に制限酵素消化部位が存在する。*Eco*RVは、*NtHSF2* cDNA中には制限酵素消化部位は無い(Fig.2-7, -8)。以上の結果から、*NtHSF1* 遺伝子は1コピー、若しくは2コピー、*NtHSF2*遺伝子は、2コピー存在すると思われる。プローブは、相同性の高いDNA結合ドメインを除く領域を [α 32 P]dCTPで放射能標識し、ハイブリダイゼーションに用いた。

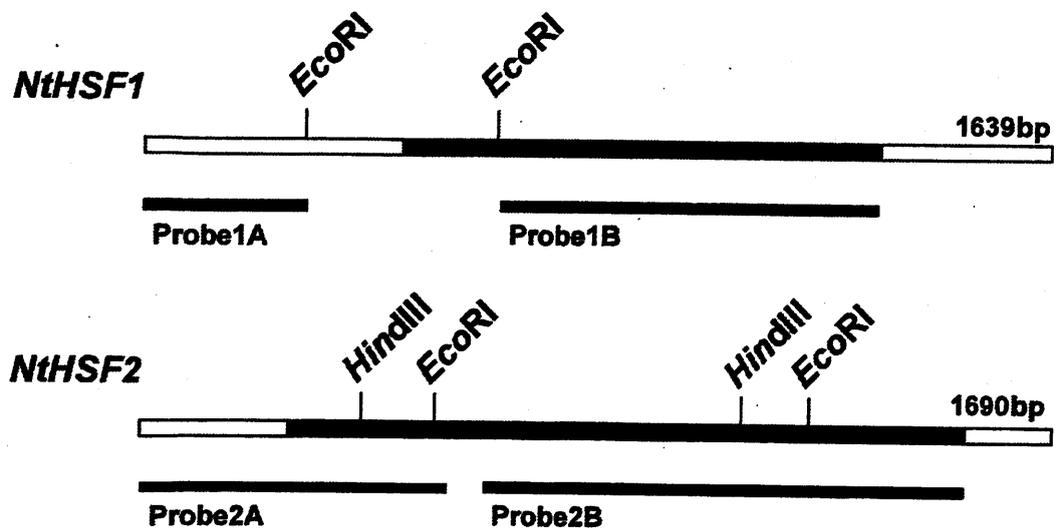


Figure 2-7. Structure of cDNA for *NtHSF1* and *NtHSF2*. The coding region was shown by a closed box, and non homologous probes 1A (271 bp) and 2A (532 bp) were used for genomic Southern hybridization. Antisense probes used in northern hybridization were synthesized in vitro from cDNA regions indicated by probe1B and 2B.

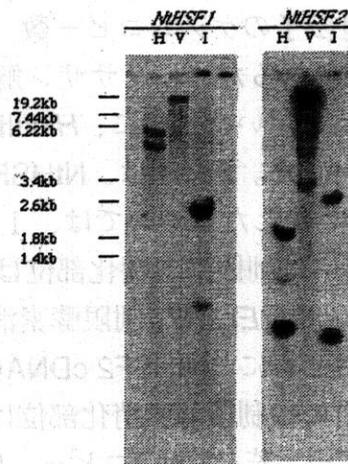


Figure 2-8. Genomic Southern blot analysis of *NtHSF1* and *NtHSF2*. Ten micrograms of tobacco BY2 genomic DNA was digested with I (*EcoRI*), V (*EcoRV*), or H (*HindIII*). Hybridization was done at high stringency using [α 32 P]dCTP-labeled probe 1A or 2A (see Fig.2-7). Molecular size markers indicated in kilo base were lamda DNA digested with *StyI*.

2.3.5 *NtHSF1*、*NtHSF2*遺伝子mRNAの蓄積様式

培養4日目のBY2細胞を37°Cで2時間、熱処理を行った。Fig.2-9に示す各時間の細胞から全RNAを抽出し、ノザン解析を行った。用いたプローブは、*NtHSF1*、*NtHSF2*のDNA結合ドメインからC末端側のアンチセンス鎖RNA (Probe1B, Probe2B) を [α 32 P]dUTPの取り込みにより放射能標識したものを *in vitro*で合成して用いた (Fig.2-7)。内部標準には、放射能標識したイネのアクチン遺伝子のアンチセンスRNAを用いた。*NtHSF1*、*NtHSF2*のいずれも、熱処理に関係なく構成的にmRNAの蓄積がみられた。

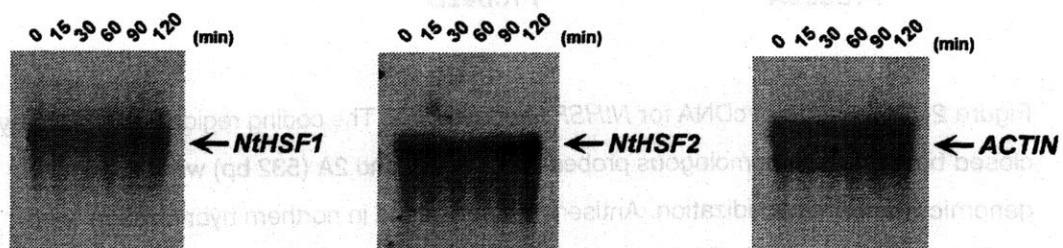


Figure 2-9. Northern hybridization analysis of *NtHSF1* and *NtHSF2*. BY2 cells grown at 27°C for 7 days and then incubated at 37°C for various periods as indicated. Twenty micrograms of total RNA was loaded on 1% agarose-formaldehyde gels, transferred to a charged nylon membrane, and then hybridized to [α 32 P]dUTP-labeled antisense RNA for *NtHSF1* or *NtHSF2* (probe 1B and probe 2B, respectively, see Fig. 2-7). Rice actin DNA (Sano and Youssefians., 1991) was also used as probe for constitutive expression gene.

(C)

Type (SV40)				Type (nucleoplasmin)				
AtHSF1	KKRR	265	GmHSF21	KRRR	135	AtHSF4a	RRGGEDLLTDIRRRKSV	106
AtHSF2	RRKP	114	GmHSF31	RRRK	57	AtHSF4b	RRGGEDLLTDIRRRKSV	106
AtHSF2	KRRR	226	GmHSF34	KRRK	99	AtHSF6	RRGKRLLRDIQRRTT	115
AtHSF21	RRRK	105	GmHSF35	RRRK	114	AtHSF7	RRGKRLLRDIQRRTT	103
AtHSF21	RRKP	106	LpHSF8	RRKP	132	GmHSF5	RRGKRLLRDIQRRTT	116
AtHSF21	KRRR	209	LpHSF8	KRRR	256	GmHSF29	RRGERALLLDIQRRLKLL	59
AtHSF3	RRKP	157	LpHSF24	KRRR	99	GmHSF31	RRGERALLLDIQRRLKLL	59
AtHSF3	KRRR	271	LpHSF24	KRRK	256	GmHSF33	RRGERALLLDIQRRLKLL	69
AtHSF4a	KRRK	104	LpHSF24	KRRR	257	GmHSF34	RRGQKELLSEIKRRKTV	102
AtHSF4a	KRRR	249	LpHSF30	KRRR	121	GmHSF34	RRGQKELLSEIKRRKTV	176
AtHSF4b	RRRK	104	PeaHSF	KRRR	39	LpHSF24	RRGQKELLTAIRRRKTV	101
AtHSF4b	RRKR	249	PeaHSF	KRRR	144	NtHSF1	KRGQKELLTAIRRRKTV	101
NtHSF1	RRRK	99	PeaHSF	KRRR	145			
NtHSF1	KRRR	251	ZmHSFb	RRRK	99			
NtHSF2	RRRK	104	ZmHSFb	RRKP	100			
NtHSF2	RRKP	105	ZmHSFb	KRRR	200			
NtHSF2	RRRR	204						

Figure 2-10. Characteristic motifs in NtHSF1 and NtHSF2. (A) DNA-binding domain (Mager et al., 1993), (Sorger, 1991), (Vuister, 1994) of plant HSFs. (B) asterisk (*) is Leucine zipper region (Landschultz et al., 1988), (O'Shea et al., 1991) of plant HSFs. (C) Nuclear localization signal of plant HSFs. Right alignment is nucleoplasmin type motif (Robbins et al., 1991) and left alignment is SV40 type motif (Kalderon et al., 1984). Gene accession number of all HSF were showed in Fig.2-6. Numbers at the right side show position from N-terminal in each proteins.

2.4 考察

これまでに種々の生物種から単離された熱ショック転写因子 (Heat Shock Factor, HSF) の構造、及び機能ドメイン解析によると、DNA結合ドメインを構成するアミノ酸配列が高度に保存されていることがわかっている (Mager et al., 1993)。そこで、パン酵母のHSF/YScHSF1 (Wiederrecht et al., 1988) とトマトHSF/LpHSF8, LpHSF24, LpHSF30 (Scharf et al., 1990) のDNA結合ドメインに相当する領域の塩基配列をもとにPCRプライマーを作製し、BY2細胞のHSFのcDNA部分をコードすると考えられるDNA断片をPCRにより合成した。得られたcDNA断片をプローブとしたスクリーニング、さらに最初のスクリーニングで得られたcDNAをプローブとしたスクリーニングにより、計8個のHSFcDNAクローンを単離した。そのうち6つは重複するもので最終的に2種類のHSFグループに分け、それぞれを*NtHSF1*、*NtHSF2*と名付けた。染色体上のコピー数は、複数 (2コピー) と考えられるのは、BY2細胞が複二倍体であるからと思われる。

NtHSF1、*NtHSF2*のmRNAの蓄積様式は、どちらも熱ショックの有無にかかわらずほぼ一定であったことから、ヒトのHSFに近い転写制御がされている可能性が高い。アミノ酸配列を比較した結果、トマトのLpHSF24と*NtHSF1*が84%と高く、DNA結合ドメインや転写活性化に必要なトリプトファン残基が保存されており、mRNAが構成的に蓄積している点からも、*NtHSF1*はLpHSF24のホモログであると考えられる。一方、*NtHSF2*は、*NtHSF1*や、すでに単離されている他の種のHSFとは、DNA結合ドメインを除いて、あまり高い相同性 (最大*AtHSF21*と47%程度) を示さず、新規なHSFである可能性がある。

どちらの*NtHSFs*も、HSFに一般的に保存されている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、転写活性化領域)を有している。DNA結合ドメインに関しては、すでに報告されているHSFと比べて差は、ほとんどなく高度に保存されていた。多量体形成ドメインに関して、疎水性アミノ酸の繰り返し数が、*NtHSF1*と*NtHSF2*とは異なるが、この数の違いと多量体形成との関係は、明らかになっていない。ニワトリのHSF (Nakai and Morimoto, 1993) は、組織、器官によりホモ3量体ではなくヘテロ3量体を形成することが報告されているが、植物ではシロイヌナズナにおいて、ホモ3量体を形成することが報告されているのみである (Hubel and Schoffl, 1994)。HSFの核移行シグナルのカテゴリーは、2種類見受けられるが、現在のところ、これらのカテゴリーの違いによる核移行様式の違いなどは、明らかではない。唯一トマトHSFに関しては、タバコの葉肉プロトプラストを用いた一過性発現解析により細胞内局在が調べられており (Lyck et al., 1997)、LpHSF24は構成的に核に局在するが、LpHSF8, LpHSF30は、細胞を熱処理することにより細胞質から核へ移行することが報告されている。*NtHSF1*とGreen Florescence Protein (GFP) との融合タンパク質をタマネギの表皮細胞を用いて一過性発現解析を行ったところ、熱処理に関係なく構成的に核に局在することが観察した (data not shown)。HSFの転写活性

化領域に関しては、植物では、唯一トマトの3つのHSF (LpHSF8, LpHSF24, LpHSF30) において転写活性化に必須なアミノ酸残基が限定されており、いずれのトマトHSFも、タバコの葉肉プロトプラストを用いた一過性発現解析において、転写活性化能を示すことが報告されている (Treuter et al., 1993)。したがって、NtHSF1は、(1) LpHSF24と相同性が高いこと、(2) 構成的な核局在を示すことから、機能的にLpHSF24のホモログであると考えられる。ただし、トマトHSFに関して、HSF欠失させた酵母変異株を用いた相補性試験において、唯一LpHSF24のみ、酵母HSFを相補できないことが報告されている (Boscheinen et al., 1997)。このことから、LpHSF24は、転写活性化能を有してはいるが、熱ショック応答時のHSP遺伝子の転写活性化には、関与していない可能性がある。高い相同性を示したNtHSF1が、LpHSF24と同様に転写活性化能を有しているか、さらに、どのような遺伝子の転写を調節しているか、今後の興味深い課題である。NtHSF2に関しては、(1) 47%の相同性を示したAtHSF21が、転写活性化能を有することが報告されており (Nover et al., 1996)、(2) トマトHSFに報告されているトリプトファン残基がNtHSF2のC末端側に同様に存在することから、転写活性化能を有している可能性が高い。

第3章 タバコの熱ショック転写因子の機能解析

3.1 序論

転写因子は、一般にDNA結合ドメインと転写調節ドメインから構成される。熱ショック転写因子 (Heat Shock Factor; HSF) は、すでに前章で示したように4つの機能ドメイン (DNA 結合ドメイン、疎水性領域、核移行シグナル、転写活性化領域) から構成されている。HSFは、N末端側にDNA結合ドメインを、C末端側に転写活性化ドメインを保持している。疎水性領域内にあるロイシンジッパーモチーフは、三量体の形成に必要であることがわかっている。現在報告されているHSFには、転写活性化能に関して2種類のタイプに分類される。酵母からヒトまでの大部分のHSF (HSF1, HSF2, HSF3) は、転写活性化に働くタイプである (Green et al., 1995)。一方、ヒト、マウスの HSF4aは、転写活性化領域を欠いており、転写活性化能を保持していないタイプである (Nakai et al., 1997)。

熱ショック遺伝子の転写活性化機構に関して、2つのモデルが提唱されている (Tanabe and Nakai., 1999)。1つ目は、熱ショックの有無にかかわらず、構成的にHSEへ三量体のHSFが結合している。熱ショックにより、この三量体HSFが、リン酸化され、転写を活性化するモデルである。これは、酵母において唯一見られる (Halladay et al., 1995)。2つ目は、非熱ショック時にHSF1は、HSP90と会合して細胞質に存在するが、熱ショックにより核へ移行し、同時にリン酸化、三量体化されたHSFにより転写を活性化するモデルである (Zou et al., 1998)。こちらは、ヒトやニワトリなどに見受けられる。

植物におけるHSFの解析は、シロイヌナズナが、よく解析されている。シロイヌナズナでは、染色体上に8個のHSFが存在する。構成的なmRNAの蓄積を示すタイプのシロイヌナズナ *AtHSF1*, *AtHSF3* mRNAを過剰発現させたシロイヌナズナは、非熱ショック下において低分子量HSP mRNAの蓄積が見られ、植物体自身は、野生型に比べて、熱ショックに対して耐性を示す。また、熱ショックによりmRNAが蓄積する*AtHSF4*は、同様の実験から、熱耐性を示さないことが報告されている (Hubel and Schoffl., 1994 ; Prandel et al., 1998)。植物に特徴的に見られる熱ショックによりHSF mRNAが蓄積するタイプのHSFの機能に関してはまだ不明な点が多い。一方、熱処理に関係なく構成的なmRNAの蓄積を示すタイプの植物HSFは、他の真核生物にも見られるタイプのHSF (HSF1, HSF2, HSF3) と同様に熱ショックストレス下でのHSP遺伝子の転写活性化に関与すると考えられる。

前章において、タバコHSF遺伝子の推定されるアミノ酸配列にも、他の真核生物のHSFに共通に見られる機能ドメインを有していることを示した。本章では、組換えタンパクを用いてタバコHSFの性状解析を行い、さらに、タバコ培養細胞を実験材料に用いて、タバコHSFsの転写活性化領域を限定し、*in vivo*での機能を調べることで、植物のHSFによる熱ショック遺伝子の転写活性化機構を明らかにすることを目的とした。

3.2 実験材料と方法

3.2.1 一般的な方法

DNA、RNAの取扱いは、Molecular Cloning (Maniatis et al., 1989) に従った。

3.2.2 大腸菌での組み換えNtHSF1, NtHSF2タンパク質の生産

NtHSF1、NtHSF2のコード領域をプライマーセット (5'-GCA-TAT-GTC-GCA-GAG-GAC-CGT-TCC-Gと5'-CGG-ATC-CCT-ATC-AGT-TAC-AGA-CCT-T) を用いて *NtHSF1* を、また (5'-CCA-TAG-GAT-GAA-GCT-ACG-TGC-AGCと5'-GGA-TCC-TTA-TGT-TTT-CTC-TGC-TGG-AGT-AAG) を用いて *NtHSF2* を増幅し、大腸菌発現ベクター-pET15b (Novagen, MA, USA) の *T7*プロモーターの制御下において6個のヒスチジンアミノ酸残基と融合するように組み込んだ。M9ZB培地を用いてpET15b::pNtHSF1、pET15b::pNtHSF2を有する大腸菌を25°Cで培養しA(A₆₀₀)が0.5になったときに、Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度0.4 mMになるように加えた。組み換えタンパク質の精製は、pET System Manual, 6th Edition (Novagen, MA, USA) に従った。精製タンパク質は、20 mM Hepes-KOH pH 7.9、20% (W/V) glycerol、1mM DTT、100 mM KClに対して透析し、-80°Cで保存した。

3.2.3 組み換えNtHSF1, NtHSF2タンパク質のDNA結合能

*AtHSP18.2*遺伝子の転写開始点から上流 -269 bp~-118 bpまでの183 bpのDNAフラグメントの5'末端を[γ ³²P]ATPを用いてT4 polynucleotide kinaseより放射能標識した。DNAと組み換えNtHSF1、NtHSF2タンパク質 (rNtHSF1, rNtHSF2) の結合反応、ポリアクリルアミド電気泳動、ゲル乾燥及び、BAS2000を用いた電気泳動のイメージ解析は、Shimizuら (Shimizu et al., 1996) に従った。

3.2.4 キメラ転写因子の一過性発現解析

一過性発現解析に用いたプラスミドDNA (pG4DD, pG4DD-VP16, pG4TS-50 35S/GUS) は、Nakayamaら (Nakayama et al., 1997) に準じた。pBI221-LUC+ (Clontech, Palo Alto, CA, USA)は、市販しているのを用いた。プライマーセット (5'-ACA-GAT-CTA-CGC-CGT-GGG-AAA-ACC-GTG-ACA-CCと5'-TCT-CTA-GAT-CAG-TTA-CAG-ACC-TTG-TTA-CTC-TC) により NtHSF1(97-292) を、プライマーセット (5'-ACA-GAT-CTA-CGC-CGT-GGG-AAA-ACC-GTG-ACA-CCと5'-ATT-CTA-GAT-CAA-GGC-AAA-TTG-TAG-TCC-ATA-G) によりNtHSF1(97-276) を、プライマーセット (5'-GCA-GAT-CTT-TCT-GGG-TCC-CGT-GGG-AAA-ATG-ATGと5'-TCG-GAT-CCT-CAG-TTA-CAG-ACC-TTG-TTA-CTC-TC) によりNtHSF1(261-292) を、プライマーセット (5'-AAA-GAT-CTC-CAT-AGA-CGT-AAA-CCG-GTT-CAT-AGと5'-CTT-CTA-GAT-TAT-GTT-TTC-TCT-GCT-GGA-GTA-AG) によりNtHSF2(102-408) を、プライマーセット (5'-AAA-GAT-CTC-CAT-AGA-CGT-AAA-CCG-GTT-CAT-AGと5'-

ATT-CTA-GAT-TAA-AAT-TTT-CCA-CTG-TCT-ACT-GG) によりNtHSF2(102-385) を、プライマーセット (5'-AAA-GAT-CTC-CAT-AGA-CGT-AAA-CCG-GTT-CAT-AGと5'-TCT-CTA-GAT-TAC-TCT-AAT-GAA-CAA-TTC-TG) によりNtHSF2(102-279) を、プライマーセット (5'-AAA-GAT-CTC-CAT-AGA-CGT-AAA-CCG-GTT-CAT-AGと5'-TCT-CTA-GAT-TAA-CGT-TCA-GTG-AAA-AC) によりNtHSF2(102-168) を、プライマーセット (5'-GAA-GAT-CTC-AAC-AAA-AAG-AAT-GAA-AGC-AAA-CCと5'-CTG-GAT-CCT-TAT-GTT-TTC-TCT-GCT-GGA-GTA-AG) によりNtHSF1(372-408) を作製した。これらのDNA断片をpG4DDの*Bgl*II部位へ導入して各エフェクター遺伝子を作製した。

タバコ培養細胞の継代培養

BY2細胞の継代培養は、1.2.2に従った。

particle bombardmentによるタバコ培養細胞へのDNAの導入

BY2細胞へのDNA導入は、1.2.3に従った。

GUS/Luciferase活性測定

GUS活性の測定は、1.2.6 に示したJeffersonの方法に従った (Jefferson et al, 1987A; Jefferson, 1987B)。Luciferase活性の測定は、PicaGene Luminescence Kit (TOYO INKI, Tokyo, Japan) を用い、使用説明書に従って行った。Lumat (berthold LB9501) を用いて、発光量を測定した。タンパク質濃度の測定は、Bradfordの方法に従った (Bradford, 1976)。BSAを用いて作製した標準曲線からタンパク質濃度を決定した。

3.2.5 アンチセンスRNAによる内在NtHSF1、NtHSF2への抑制効果

3.2.2 で作製した pET15b::p*NtHSF1*, pET15b::p*NtHSF2*プラスミドの*Bgl*II、*Bam*HIにより切り出されるDNAフラグメント (NtHSF1、NtHSF2のそれぞれのコード領域) を pBI101Hmバイナリープラスミドの*Bam*HI部位へ導入した。

形質転換BY2細胞の作出

タバコ培養細胞へのNtHSF1、NtHSF2のアンチセンスを発現するキメラ遺伝子 (pCaMV35S-antisense*NtHSF1*, pCaMV35S-antisense*NtHSF2*) の導入は、1.2.4に示したアグロバクテリウム法により行ったが、アグロバクテリウムはEHA105を用いた。形質転換の宿主に用いたBY2細胞には、すでに*AtHSP18.2-GUS*融合遺伝子を導入しており、カナマイシン耐性であるため、ハイグロマイシンにより形質転換カルの選抜を行った。

導入アンチセンス遺伝子の確認

BY2細胞の染色体上に導入した遺伝子が組み込まれていることを調べるために、導入した遺伝子に特異的なプライマーセット (A1: 5'-TCG-GAT-CCT-CAG-TTA-CAG-ACC-TTG-TTA-CTC-TC, S1: 5'-GCA-TAT-GTC-GCA-GAG-GAC-CGT-TCC-G, A2: 5'-CTG-GAT-CCT-TAT-GTT-TTC-TCT-GCT-GGA-GTA-A, S2: 5'-AAA-GAT-CTC-CAT-AGA-CGT-AAA-CCG-GTT-CAT-AG, NT: 5'-ACC-GGC-AAC-AGG-ATT-CAA-TC) を用いて、BY2ゲノム DNAを鋳型としたPCRを行った。BY2ゲノムDNAは、Isogen (NIPPON GENE, Toyama, Japan) を用いて調製した。PCRの条件は、rTaq polymerase (TOYOBO, Osaka, Japan) の添え付けマニュアルに従った。

アンチセンス遺伝子の発現

導入したアンチセンス*NtHSF1*、*NtHSF2*遺伝子に対応するcDNAに特異的なプライマーセット (アンチセンス*NtHSF1*用に、5'-ATG-CTG-ATG-TGC-CTG-GTA-CCと5'-GAT-ATA-CCA-TGG-GCA-GCA-GC)、(アンチセンス*NtHSF2*用に、5'-AGG-CCA-TGA-AGA-TTC-TGT-GCと5'-GAT-ATA-CCA-TGG-GCA-GCA-GC)、及び、内在性の*NtHSF1*、*NtHSF2*遺伝子に対応するcDNAに特異的なプライマーセット (内在*NtHSF1*用に、5'-CAA-CCG-TAT-CAT-TAG-CCA-AGGと5'-GAT-GCA-TGA-AGC-TAA-TCT-GC)、(内在*NtHSF2*用に、5'-GAT-CAA-GCT-TGG-ATA-CAG-CAGと5'-TAC-AAC-AAG-CCA-GAA-GGC-A) を用いて、培養4日目の各形質転換BY2細胞から全RNAを調製し、cDNAを合成した。RT-PCRにより内在性 *NtHSF1*、*NtHSF2*遺伝子とアンチセンス*NtHSF1*、*NtHSF2*遺伝子のmRNAの蓄積量を調べた。内部標準としてタバコ*Actin* 遺伝子の蓄積量をプライマーセット (5'-CCTCTTAACCCGAAGGCTAAと5'-GAAGGTTGGAAAAGGACTTC) を用いて同様に調べた。RT-PCRの条件等は、2.2.3 に準じた。

GUS活性測定

GUS活性の測定は1.2.3に従った。

タバコ熱ショックタンパク質をコードする遺伝子の単離

熱ショックタンパク質HSP18、HSP70、HSP101をコードする遺伝子のBY2細胞でのホモログを単離するために、シロイヌナズナとタバコにおいて既に単離されていた各遺伝子 (*AtHSP18* [X17295], *NtHSP18* [AF166277], [X70688], *AtHSP70* [AJ002551], *AtHSC70* [Y17053], *NtHSP70* [X63106], *AtHSP101* [AF218796], *NtHSP101* [AF083343]) の保存されている領域において以下に示すデジェネレイテッドプライマーを作製した。BY2細胞の*HSP18*ホモログを単離するためのプライマーセット (5'-ATT-CCA-AGY-WTY-TTT-GGW-GGW-MGM-AG と 5'-AGY-ACW-CCA-TTY-TCC-ATW-GYW-GCY-TT)、*HSP70*ホモログを単離するためのプライマーセット (5'-AAC-CCA-ATY-ATY-GCS-AAR-ATG-TAC-C と 5'-CTT-CTT-CAA-TYT-TWG-GSC-CWG-CAC-C)、*HSP101*ホモログを単離するためのプライマーセット (5'-TTC-RAT-CCT-

CAT-CTT-CTT-SAC-YGC-YTG と 5'-GAT-GAR-AAC-TCM-ACK-GTT-TAC-ATA-GAT-GC) を用いて、培養4日目の BY2細胞から調製した全RNAを用いてRT-PCRを行った。RT-PCRは、GeneAmp RNA PCR Kit (Perkin Elmer, CA, USA) を用いて行った。増幅されたDNAは、pSKにサブクローニングし、塩基配列を決定した。これらの塩基配列を National Center for Biotechnology Information の BLAST データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) に対してホモロジー検索を行った。

HSP18, HSP70, HSP101 及び *GUS* mRNA のノザン解析

GUS 遺伝子のコード領域、及び、BY2細胞の熱ショックタンパク質遺伝子 (*HSP18, HSP70, HSP101*) の部分cDNAを鋳型として *BcaBest*TM labeling Kit (TAKARASHUZO, Siga, Japan) を用いて [α -³²P]dCTP により放射能標識し、プローブとして用いた。ハイブリダイゼーション等の条件は、1.2.6に準じた。

(C)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentration of rNtHSF1	1	1	1	1	1					
rNtHSF2						1	1	1	1	1
Specific competitor monomer		25	50				25	50		
ligated monomer				25	50				25	50

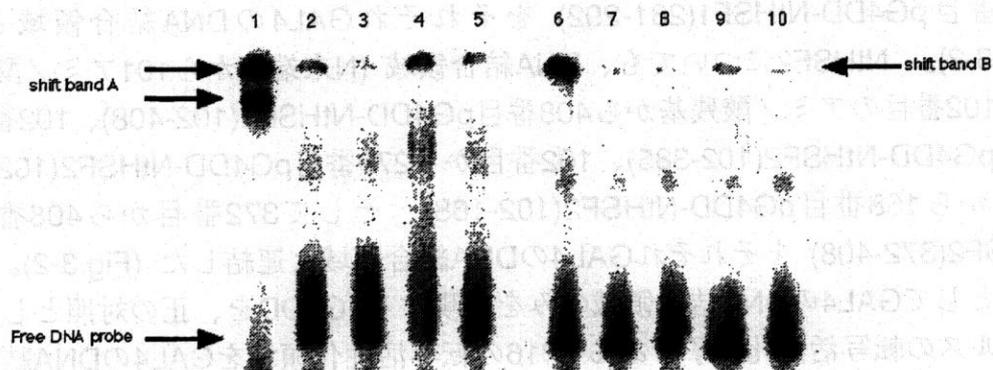


Figure 3-1. (A) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purification rNtHSFs. *E. coli* BL21DE3pLys cells harboring pET15b::pNtHSF1 or pET15b::pNtHSF2 with His-tag were grown in M9ZB medium and treated with 0.4mM IPTG for 6h. rNtHSFs in cell lysate were purified through a Ni-agarose column, and applied to SDS-PAGE. Protein was stained by Coomassie brilliant blue. M: marker proteins, lane 1: rNtHSF1, lane 2: rNtHSF2. (B) Sequence of *Arabidopsis thaliana* HSE used in vitro binding of rNtHSFs. Under lined 5'-Upstream DNA fragment of *AtHSP18.2* promoter used as a DNA probe. Consensus nucleotides in HSE are shown by capital letters. Monomer HSE was used as competitor oligonucleotide sequences. Consensus nucleotides in HSE are underlined. Monomer HSE were ligated with T4 DNA ligase to form ligated monomer HSE. (C) Electrophoresis mobility shift assay of *Arabidopsis thaliana* HSE with rNtHSFs. One ng of free DNA probe was incubated for 10 min at 25°C with rNtHSF1 (lanes from 1 to 5) or rNtHSF2 (lanes from 6 to 10). A specific monomeric or ligated competitor as shown was added to the incubation mixture when the DNA and protein were mixed. The rNtHSF1-DNA complex is indicated as shift band A. The rNtHSF2-DNA complex is indicated as shift band B.

3.3.2 転写活性化能の検討

3.3.2.1 一過性発現に用いた欠失コンストラクトの作製

CaMV35Sプロモーターの支配下に出芽酵母の転写因子であるGAL4のDNA結合領域に相当するDNA断片を連結したpG4DD (Nakayama et al., 1997) を用いて、GAL4のDNA結合領域とNtHSFsとの融合タンパク質を発現するエフェクターの構築を行った。NtHSF1については、内在のHSEとの相互作用を防ぐために、DNA結合領域 (N末端側から96アミノ酸残基) を除き、97番目のアミノ酸残基から292番目pG4DD-NtHSF1(97-292)、97番目から276番目pG4DD-NtHSF1 (97-276)、および261番目から292番目pG4DD-NtHSF1(261-292) をそれぞれGAL4のDNA結合領域と連結した (Fig.3-2)。NtHSF2についても、DNA結合領域 (N末端側から101アミノ酸残基) を除き、102番目のアミノ酸残基から408番目pG4DD-NtHSF2(102-408)、102番目から385番目pG4DD-NtHSF2(102-385)、102番目から279番目pG4DD-NtHSF2(102-279)、102番目から168番目pG4DD-NtHSF2(102-168)、そして372番目から408番目pG4DD-NtHSF2(372-408) をそれぞれGAL4のDNA結合領域と連結した (Fig.3-2)。また、負の対照としてGAL4のDNA結合領域のみを発現するpG4DDを、正の対照としてヘルペスウイルスの転写活性化因子であるVP16の転写活性化領域をGAL4のDNA結合領域と連結したpG4DD-VP16を用いた (Fig.3-2)。レポーターとしては、GAL4の認識配列 (17mer) を11個持つCaMV35Sの最小プロモーターとGUS遺伝子を連結した (pG4TS-50-35S/GUS) を用いた (Fig.3-2)。

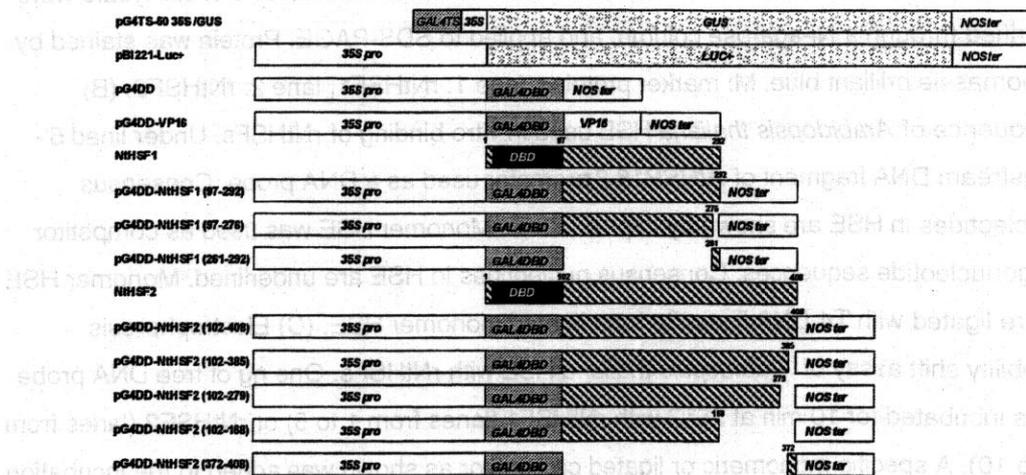


Figure 3-2. Schematic diagram of reporter and effector genes in transient assay. Putative DNA binding domains of NtHSFs were shown. GAL4TS (GAL4 targeting sequence), 35S pro (promoter region of the califlower mosaic virus 35S ribosomal RNA gene), 35S cpro (35S core promoter), NOS ter (polyadenylation signal of the nopaline synthase gene). GAL4 DBD (GAL4 DNA binding domain), VP16 (activation domain of VP16) were shown. The numbers indicate amino acid residues.

3.3.2.2 一過性発現によるNtHSF1及びNtHSF2の転写活性化能

GAL4のDNA結合領域とNtHSFsのDNA結合領域を除いた融合遺伝子pG4DD-NtHSF1(97-292)、とpG4DD-NtHSF2(102-408)を用いて、タバコ培養細胞を宿主に用いてparticle bombardment法により一過性発現実験を行い、GAL4-NtHSFsキメラ転写因子の転写活性化能を検討した。一過性発現実験には、Fig.3-2に示したエフェクターとしてpG4DD、pG4DD-VP16、pG4DD-NtHSFsのいずれかを0.2 μ g、レポーターとしてpG4TS-50-35S/GUSを2 μ g、そして内部標準としてpBI221-LUC+を1 μ g用いた。導入後24時間経過した細胞抽出液のGUS活性及びLUC活性を測定し、GUS活性をLUC活性で補正した相対GUS比活性をFig.3-3に示した。なお、pG4DDを用いた時の相対GUS比活性を100%とした。その結果、pG4DD-NtHSF1(97-292)では、pG4DD-VP16よりもかなり低い相対GUS比活性を示し、また、pG4DDを用いた場合よりも低かった。pG4DD-NtHSF2(102-408)では、pG4DD-VP16に近い相対GUS比活性を示した。

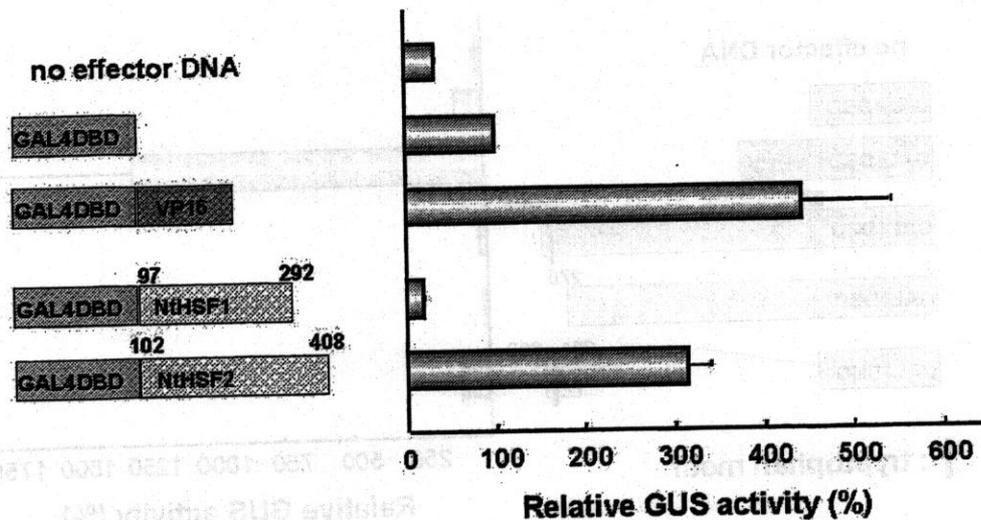


Figure 3-3. Trans-activating function of the NtHSFs. The relative GUS activity in presence of pG4DD is set at 100. Average values and standard deviations from three independent experiments are shown.

3.3.2.3 NtHSF1の各欠失コンストラクト

3.3.2.2で示したpG4DD-NtHSF1(97-292)は、転写活性化能を示さず、逆に抑制する傾向が見られた。融合タンパク質の分子内相互作用等が、抑制に働いている可能性を考慮し、さらに領域を限定した。トマトのHSFsで行われた一過性発現実験 (Treuter et al., 1993) をもとに、トリプトファンモチーフが転写活性化領域であると考え、トリプトファンモチーフを欠失させたpG4DD-NtHSF1(97-276) とトリプトファンモチーフのみを持つpG4DD-NtHSF1(261-292) を用いて先程と同様に一過性発現実験を行った (Fig.3-4)。その結果、NtHSF1については解析に用いたすべての構築において、pG4DDとほぼ同じか、それよりも低い相対GUS比活性を示し、転写活性化能は認められなかった。

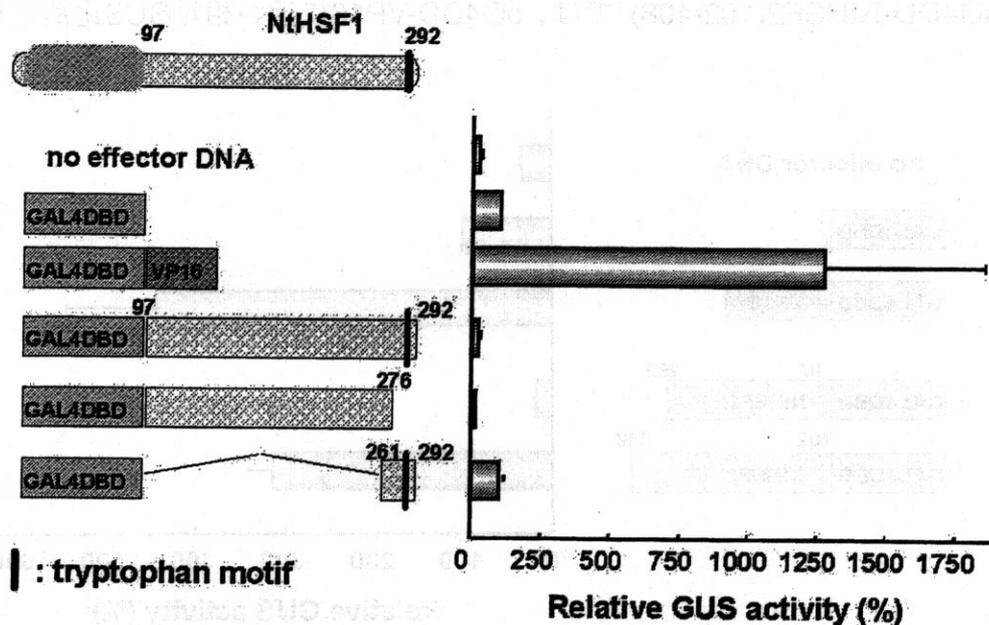


Figure 3-4. Trans-activating function of truncated NtHSF1. The relative GUS activity in presence of pG4DD is set at 100. Average values and standard deviations from three independent experiments are shown.

3.3.2.4 NtHSF2の各欠失コンストラクト

3.3.2.2においてpG4DD-NtHSF2(102-408)の相対GUS比活性は、pG4DD-VP16に近い値を示し、転写活性化能を保持していたので、更に転写活性化能の保持に必要な領域を限定した。NtHSF1と同様にトリプトファンモチーフを欠失させたpG4DD-NtHSF2(102-385)、SV40のGCボックスと特異的に結合する転写因子であるSp1の転写活性化領域である高グルタミン領域 (Courey, and Tjian, 1988) を二つ含むpG4DD-NtHSF2(102-279)、高グルタミン領域を一つ含むpG4DD-NtHSF2(102-168)、トリプトファンモチーフのみを含むpG4DD-NtHSF2(372-408)を用いてさきほどと同様に一過性発現実験を行った (Fig.3-5)。その結果、pG4DD-NtHSF2(102-385)では、pG4DD-NtHSF2(102-408)と同程度の転写活性化能を検出したが、pG4DD-NtHSF2(102-279)、pG4DD-NtHSF2(102-168)、pG4DD-NtHSF2(372-408)では、pG4DDとほぼ同じ相対GUS比活性を示し、転写活性化能は認められなかった。また、pG4DD-NtHSF2(372-408)は、転写活性化能を検出できなかった。

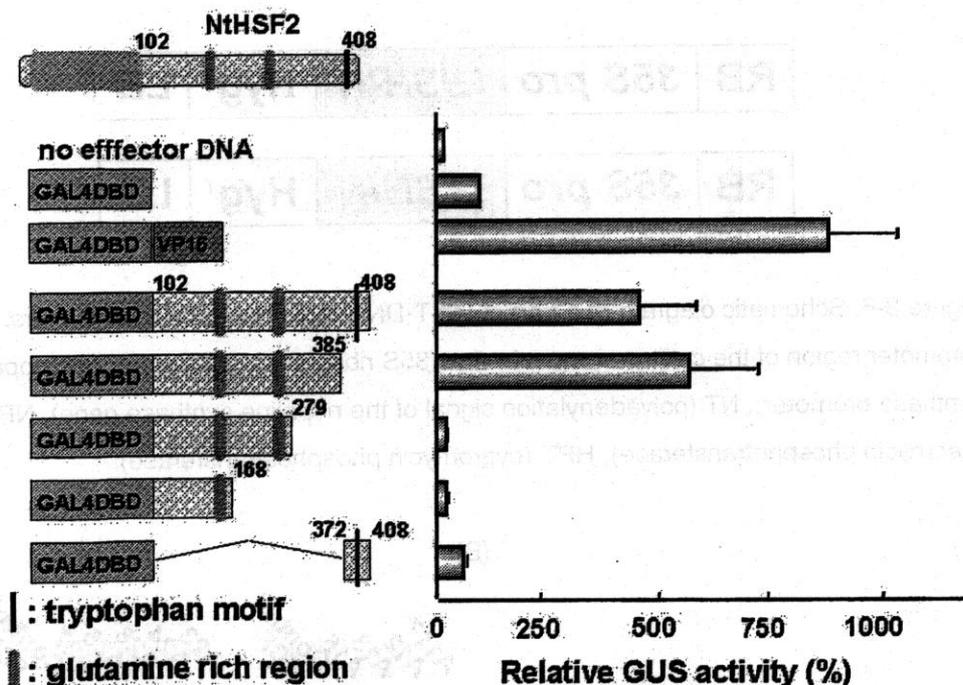


Figure 3-5. Trans-activating function of truncated NtHSF2. The relative GUS activity in presence of pG4DD is set at 100. Average values and standard deviations from three independent experiments are shown.

3.3.3 *NtHSFs* アンチセンス鎖を過剰発現させた形質転換BY2の熱ショック応答への影響

3.3.3.1 *NtHSFs*の発現を抑制したタバコ培養細胞の作製

*in vivo*での*NtHSFs*の機能を解明するために、各アンチセンス *NtHSF1*、*NtHSF2*を過剰発現させた形質転換体BY2を作製した。その際、導入した遺伝子発現の影響を解析するための宿主には、*AtHSP18.2-GUS*融合遺伝子が導入されている形質転換体BY2細胞TCF (Dansako, 1998) を用いた。CaMV35Sプロモーターの制御下で各アンチセンス *NtHSF1*、*NtHSF2*を発現する遺伝子を構築し、バイナリーベクターpBI101Hm2に連結した (Fig.3-6)。各遺伝子をアグロバクテリウム感染法により、既に *AtHSP18.2-GUS* 融合遺伝子を導入してある形質転換BY2細胞TCFへ導入した。用いた宿主のBY2は既にカナマイシン (Km) 耐性であるので、ハイグロマイシンB (Hg) による選抜を行った。得られたカルスを無作為に選抜し、ゲノミックPCRを行った結果、選抜した細胞で目的遺伝子の導入が確認された (Fig.3-8)。

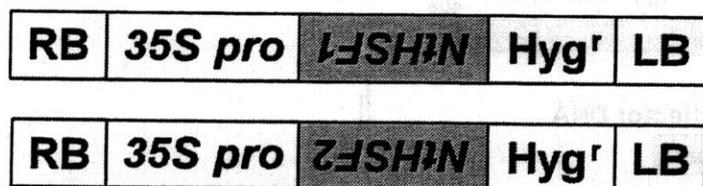


Figure 3-6. Schematic diagram of a part of the T-DNA region of transgenic vectors. 35S (promoter region of the califlower mosaic virus 35S ribosomal RNA gene), NP (nopaline synthase promoter), NT (polyadenylation signal of the nopaline synthase gene), NPTII (neomycin phosphotransferase), HPT (hygromycin phosphotransferase).

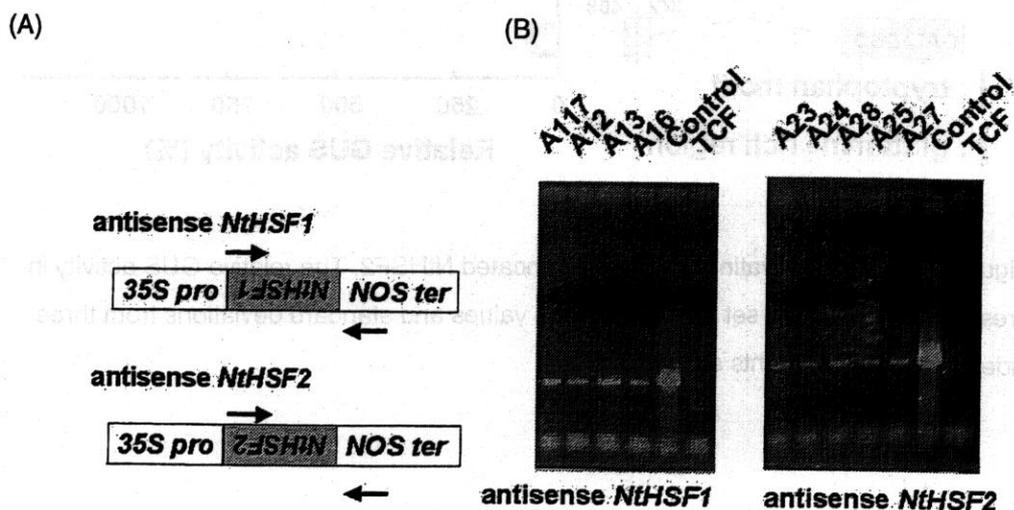


Figure 3-7. Positions and directions of PCR primers on transgenic BY2 DNA. (A) Each

primer is indicated by arrow. 35S pro (promoter region of the califlower mosaic virus 35S ribosomal RNA gene), NOS ter (poly- adenylation signal of the nopaline synthase gene). (B) PCR analysis of genomic DNA from transgenic BY2 cells. Amplified fragments were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis and detected by ethidium staining. The clone numbers are indicated the upper each panel. PC: binary vectors used as template.

3.3.3.2 形質転換体でのアンチセンス遺伝子の発現

得られた形質転換体BY2細胞から全RNAを調製し、oligo-dTプライマーを用いてcDNAを合成した。このcDNAを鋳型に用いてPCRにより、導入遺伝子の発現を確認した。用いたプライマーセットは、Fig.3-8に示す。初めに調整した全RNAに染色体DNAが混入していないことを確かめた。その後、内在性の*NtHSF1*、*NtHSF2*及び、導入したアンチセンス*NtHSF1*、*NtHSF2*をそれぞれの形質転換体に対して調べた。その結果、形質転換体(A13、A16、A23、A27)において、導入したアンチセンス*NtHSF1*、*NtHSF2*の発現が、観察できた (Fig.3-9)。

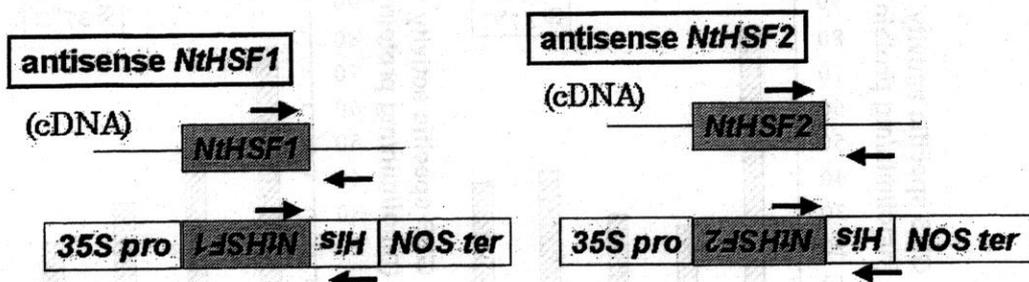


Figure 3-8. Positions and directions of PCR primers on transgenic BY2 mRNA. Each primer is indicated arrow.

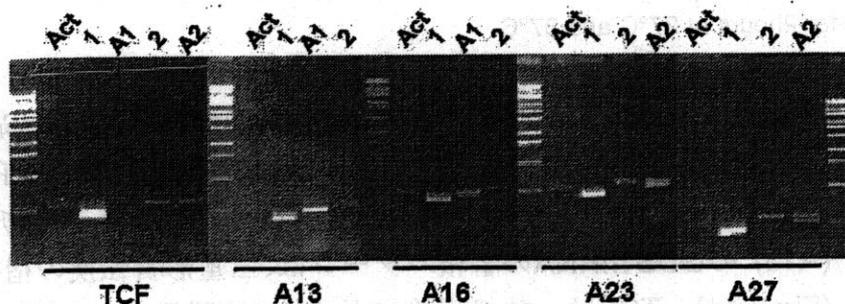


Figure 3-9. RT-PCR analysis of cDNA from transgenic BY2 cells. Amplified fragments were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis and detected by ethidium bromide staining.

3.3.4 各形質転換体の熱処理による*AtHSP18.2-GUS*の発現様式

3.3.4.1 37°Cでの熱処理を継続させたときの*GUS*遺伝子の蓄積様式

*AtHSP18.2-GUS*融合遺伝子を導入した形質転換BY2細胞へ、CaMV35S-antisense*NtHSF1*、CaMV35S-antisense*NtHSF2*融合遺伝子を導入し、二重形質転換体BY2細胞を用いて、導入した各アンチセンス*NtHSFs*が、*AtHSP18.2-GUS*融合遺伝子の発現に及ぼす影響を調べた。*AtHSP18.2*プロモーターは、HSEを複数個持っており、*NtHSFs*が*AtHSP18.2-GUS*融合遺伝子の発現制御に関与していることが予想される。継代後4日培養した形質転換体BY2細胞を27°Cもしくは37°Cで2時間の熱処理を行い、粗酵素溶液を調製し、*GUS*活性を測定した (Fig.3-10)。その結果、どの形質転換体においても、27°Cでの*GUS*比活性は、二重形質転換の宿主に用いたTCFと変わらないが、37°Cで熱処理した後は、TCFよりも低い*GUS*比活性を示した。

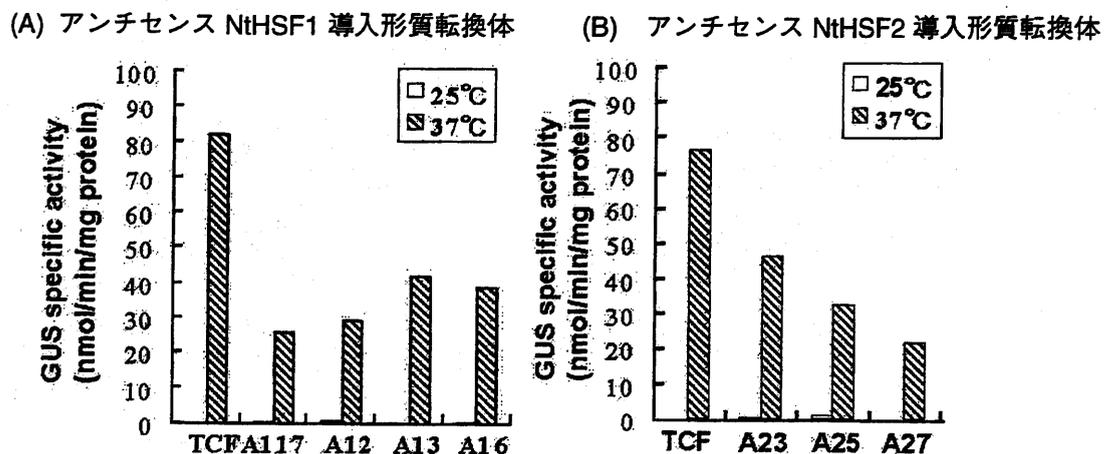


Figure 3-10. Expression of the *AtHSP18.2-GUS* chimeric gene by heat treatment of BY2 cells introduced antisense *NtHSF1* and *NtHSF2*. Cells of 4days grown at 27°C were treated for 2hours at 27°C and 37°C.

次に、アンチセンスを導入した形質転換体における*AtHSP18.2-GUS*融合遺伝子の転写活性の経時変化を解析するために、37°Cでの熱処理による*GUS* mRNAの蓄積量について調べた。*GUS*プローブを用いたノザン解析を行ったところ、アンチセンス*NtHSF1*形質転換体 (A13) の*GUS* mRNAの蓄積パターンは、二重形質転換の宿主に用いたTCFと異なった (Fig.3-11)。TCFは、熱処理後15分から1時間目までの間に、*GUS* mRNAの蓄積をみることができたのに対してアンチセンス*NtHSF1*形質転換体は、熱処理後1時間から3時間目までというようにずれることが判った。アンチセンス*NtHSF2*形質転換体 (A23) の*GUS* mRNAの蓄積パターンは、熱処理後15分から1時間目までの間に見ることができ、二重形質転換の宿主に用いたTCFとあまり大差はなかった。

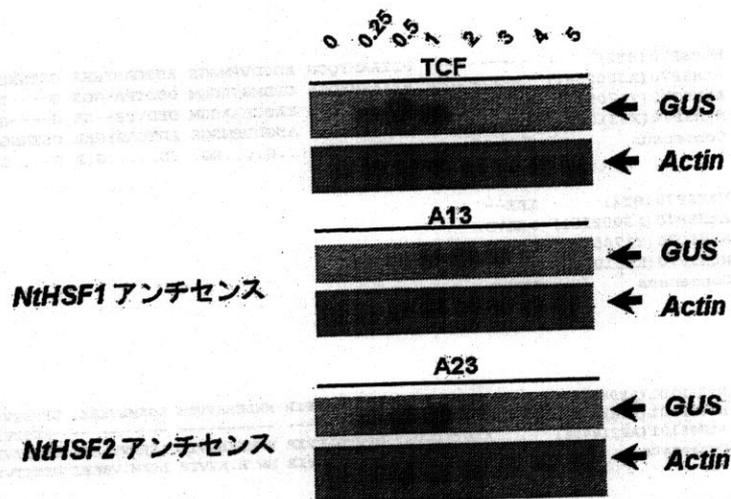


Figure 3-11. Northern analysis of *GUS* mRNA in the antisense *NtHSF1* and in the antisense *NtHSF2*. Total RNA (10 μ g) were separated on 1.0% formaldehyde/agarose gel, transferred to a nylon membrane, and probed with the oligonucleotide corresponding to the *GUS* gene. Blots were exposed to X-ray film with an intensifying screen at -80°C .

3.3.4.2 BY2細胞の内在する熱ショック遺伝子の発現様式

3.3.4.2.1 BY2熱ショック遺伝子 *NtHSP18*, *NtHSP70*, *NtHSP101*部分配列cDNA単離
シロイヌナズナとタバコにおいてすでに単離されている熱ショック遺伝子のC末端側の相同性の高い領域においてプライマーを作製し、BY2細胞から調整した全RNAから合成したcDNAを鋳型に用いて、RT-PCR法によりBY2の各ホモログ遺伝子を単離した (Fig.3-12)。相同性検索の結果、それぞれ、*NtHSP18*, *NtHSP70*, *NtHSP101*のBY2細胞でのホモログをコードする遺伝子の部分配列であることが判明した。このDNAフラグメントを用いてアンチセンス過剰発現形質転換BY2細胞での、熱処理による各mRNAの蓄積様式を調べた。

(A)

<i>NtHSP18</i> (BY2)	-----GG SRSNVDFPFS LDIWDFEGF PFSGTVANVP -----TSAPA	37
<i>NtHSP18</i> (AF16627)	MSLIPSFDFG RRSNIFDFPS LNIWDFEGF PFSGTVANIP TSTRETAAPS	50
<i>NtHSP18</i> (X70688)	MAMIPSFDFG RRSNIFDFPS LDIWDFEGF PFSGTVANVP SSARETSAPA	50
Consensus	MS . IPSFDFG RRSNIFDFPS LDIWDFEGF PFSGTVANVP .S .RETSAPA	50
<i>NtHSP18</i> (BY2)	NARIDWKETP EAEVFKVDLE GIKKEEVKVE VEEGRVLQIS GERSREQEEK	87
<i>NtHSP18</i> (AF16627)	SARIDWKETP ESHVFKVDLE GIKKEEVKVE VEEGRVLQIS GERSREQEEK	100
<i>NtHSP18</i> (X70688)	NARIDWKETP DSHIFKMDVP GIKKEEVKVE VEEGRVLQIS GERSREQEEK	100
Consensus	NARIDWKETP ESHVFKVDLE GIKKEEVKVE VEEGRVLQIS GERSREQEEK	100
<i>NtHSP18</i> (BY2)	NDKWHRMERS SGKFLRRFRL PENIKMEEIK ATMENGV-----	124
<i>NtHSP18</i> (AF16627)	NDKWHRMERS SGKFLRRFRL PENIKMEEIK ATMENGVLTV TVPKMEEKKP	159
<i>NtHSP18</i> (X70688)	NDTWHRMERS SGKFMRRFRL PGNAMMEEIK AAMENGVLTV TVPKMEEKKS	159
Consensus	NDKWHRMERS SGKFLRRFRL PEN .KMEIK ATMENGVLTV TVPK .EEKK .	159
<i>NtHSP18</i> (BY2)	-----	124
<i>NtHSP18</i> (AF16627)	EVKALDISG	169
<i>NtHSP18</i> (X70688)	EVKALDISG	169
Consensus	EVKALDISG	169

(B)

```
NtHSP70 (BY2) ----- PIIAKMYQGG ADGDVPMGGG ADTGAGYGKA GSTNNGAGFK 40
AtHSP70 (AJ002551) KMKELESICN PIIAKMYQGA GYDMGGAGCM DDDTPA-GGS G----GAGFK 645
AtHSC70 (Y17053) KMKELESICN PIIAKMYQGG EAGGFLAAGCM DEDVFP--SA G----GAGFK 644
NtHSP70 (X63106) KMKELESICN PIIAKMYQGG ADGDVPMGGG ADTGAGYGKA GSTNNGAGFK 568
Consensus K.K.LE..CN PIIAKMYQGG ..G....GG. .D.....G.A G....GAGFK 650

NtHSP70 (BY2) IEE-- 43
AtHSP70 (AJ002551) IEEVD 650
AtHSC70 (Y17053) IEEVD 649
NtHSP70 (X63106) IEEVD 573
Consensus IEEVD 655
```

(C)

```
NtHSP101 (AF083343) ALDVILLESY DFVIGARPIR RWLERKVVTE LSKMLVKEEI DENSTVYIDA 848
NtHSP101 (BY2) ----- ERSTVYIDA 9
AtHSP101 (AF218796) ALDYILLESY DFVIGARPIR RWLERKVVTE LSKMLVKEEI DENSTVYIDA 850
Consensus ALD..IL..ESY DFVIGARPIR RW..E..KVVTE LSKM.VKEEI DENSTVYIDA 850

NtHSP101 (AF083343) GVSQKDLTYR VEKNGGLVNA ATGQKSDILI QLENGP-RSD AVQAVKMKRI 897
NtHSP101 (BY2) GVSQKDLTYR VEKNGGLVNA ATGQKSDILI QLENGP-RSD AVQAVKMKRI 59
AtHSP101 (AF218796) G-AG-DLTYR VE-SGGLVNA STGKSDVLI HLANGPERSD AAQAVKMKRI 897
Consensus GVSQKDLTYR VEKNGGLVNA ATGQKSDILI QLENGP-RSD AVQAVKMKRI 900

NtHSP101 (AF083343) EEIEDEMED ---- 907
NtHSP101 (BY2) E----- 60
AtHSP101 (AF218796) EEIEEDDNEE MIED 911
Consensus EEIEEDD..E. ---- 914
```

Figure 3-12. Deduced amino acid sequences of (A) NtHSP18, (B) AtHSP70 and NtHSP70, (C) AtHSP101 and NtHSP101. Alignment was done to best match in both sequences. Same amino acids in both HSPs are indicated in consensus. (*AtHSP18.2* [X17295], *AtHSP70* [AJ002551], *AtHSC70* [Y17053], *AtHSP101* [AF218796], *NtHSP18* [AF166277], [X70688], *NtHSP70* [X63106], *NtHSP101* [AF083343])

3.3.4.2.2 BY2熱ショック遺伝子*NtHSP18*, *NtHSP70*, *NtHSP101*mRNA蓄積パターン
HSP18, *NtHSP70*, *NtHSP101*それぞれを、プローブとして37℃で5時間熱ショックを行ったTCF (二重形質転換の宿主) の*HSP18*, *NtHSP70*, *NtHSP101*mRNAの蓄積をノザン解析した (Fig.3-13)。その結果、*NtHSP18*, *NtHSP70*, *NtHSP101*は、TCFにおける*GUS*と同様なmRNA (15分~2時間) の蓄積様式を示した。次に、アンチセンス*NtHSF1*、*NtHSF2*を過剰発現させた形質転換BY2 (A13) を同様に5時間熱ショックを行い、*NtHSP18*、*NtHSP70*、*NtHSP101*のmRNAの蓄積様式を調べた (Fig.3-13)。その結果、すでに示した*GUS* mRNAと同様に、mRNAが蓄積してくるまで、15~30分かかり、通常、二重形質転換の宿主に用いたTCFでは4~5時間目には蓄積していないはずの mRNAの蓄積が観察できた。これは、*NtHSP18*、*NtHSP70*、*NtHSP101*の3種類の遺伝子すべてに同じことが観察できた。また、アンチセンス*NtHSF2*を過剰発現させた形質転換BY2 (A23) に対しても同様のノザン解析を行った (Fig.3-13)。その結果、二重形質転換の宿主に用いたTCFと比べて *NtHSP18*、*NtHSP70*、*NtHSP101* の3種のmRNAの蓄積様式に大きな変化はなかった。

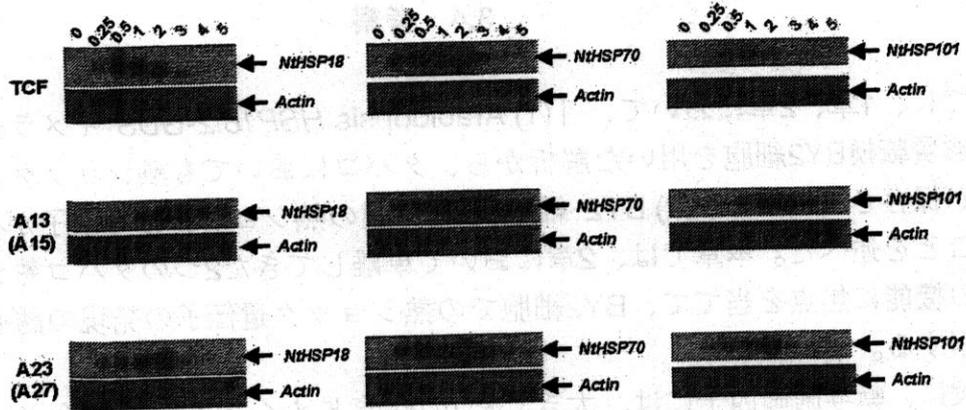


Figure 3-13. Northern analysis of *NtHSP18*, *NtHSP70*, *NtHSP101* mRNA in the antisense *NtHSF1* and in the antisense *NtHSF2*. Total RNA (10 μ g) were separated on 1.0% formaldehyde/agarose gel, transferred to a nylon membrane, and probed with the oligonucleotide corresponding to the *NtHSP18*, *NtHSP70* or *NtHSP101* gene. Blots were exposed to X-ray film with an intensifying screen at -80°C .

3.4 考察

すでに、1章、2章において、「(1) *Arabidopsis HSP18.2-GUS* キメラ遺伝子を導入した形質転換BY2細胞を用いた解析から、タバコにおいても熱ショックストレス応答機構が保存されている、(2) BY2 細胞には、2種の熱ショック転写因子が存在する」ということを述べた。本章では、2章において単離してきた2つのタバコ熱ショック転写因子の機能に焦点を当てて、BY2細胞での熱ショック遺伝子の発現の誘導機構に関して考察する。

一般に、転写制御因子には、大きく3つの機能ドメイン (DNA 結合ドメイン、核移行シグナル、転写活性化能) がある。前章で示したように、NtHSF1、NtHSF2 にも、これらの機能ドメインがみられる。そこで、これらの機能ドメインについて、*GAL4* 遺伝子を用いたワンハイブリッド系やアンチセンス遺伝子導入による効果をBY2細胞を用いて検討した。

ショウジョウバエの DmHSF1や、シロイヌナズナの AtHSF1 を大腸菌で生産させた組換えタンパク質は、アミノ酸配列から推定される分子量よりも大きいことが報告されている (Clos et al., 1990, Hubel and Schoffl, 1994)。大腸菌で大量生産した組換え NtHSF (rrNtHSF1, rNtHSF2) も、同様に推定アミノ酸から算出される分子量 (42.4 kDa, 66.2 kDa) よりも大きい値を示した。rNtHSF1, rNtHSF2 のどちらも、AtHSP18.2 プロモーターの5'上流域183 bp (-269 bp~-118 bp) へ結合し、モノマー及びポリマーのHSEによりシフトバンドが競合したことから、両rNtHSFは、HSE配列へ塩基配列特異的なDNA結合能を有していると考えられる。Shimizuらは、BY2細胞の粗核抽出液には、モノマーHSEによりシフトバンドが競合されるタンパク質因子とライゲータイドモノマーHSEによりシフトバンドが競合されるタンパク質因子の2種類が存在することを報告しており、結合しているタンパク質因子が単量体と多量体の違いによるのではないかと推定している (Shimizu et al., 1996)。両rNtHSFは、用いた競合DNAの種類に関係なくシフトバンドが競合されることから、単量体と多量体の混合した状態にあるのではないかと考えられる。

酵母の転写因子GAL4のDNA結合ドメインとその標的シス配列をCaMV35Sコアプロモーターの5'上流に挿入し、*GUS*遺伝子を3'下流に挿入したpG4TS50-35S/GUSキメラ遺伝子とを用いて、GAL4のDNA結合ドメインにNtHSF1、NtHSF2の各種領域を連結したキメラ転写因子を用いて転写活性化に必要な領域の限定をBY2への一過性発現解析により行った。

NtHSF1は、用いたすべてのキメラ転写因子 pG4DD-NtHSF(97-292)(97-276)(261-292) において転写活性化能を示さなかった。一般に、転写活性化能を有しているタイプのHSFは、C末端側に転写活性化を抑制する領域があり、この抑制領域を欠失させると転写活性化能を示すことが判っている (Shi et al 1995)。C末端領域を欠失させたNtHSF1(97-276) は、転写活性化能を示さなかったことから、2つの可能性が考えられる。1つ目は、ヒトや、マウスにおいて報告されている転写活性化能を有していな

いタイプの HSF (HSF4a) である可能性と、もう一つは、GAL4とのキメラ転写因子であるため立体構造などのタンパク質レベルの修飾が、本来と異なるために転写活性化能を示すことができない可能性である。そこで、これらの可能性は、アンチセンスmRNAを発現させた形質転換体を用いて調べることにした。なお、転写活性化能を見ることができなかったのも、NtHSF1に関して、GFPとNtHSF1の融合タンパク質をタマネギの表皮細胞において一過性発現解析を行ったところ、各へ局在することが判った (data not shown)。

NtHSF2は、調べたキメラ転写因子のうち、全長(DNA 結合ドメインを除いた)を用いた pG4DD-NtHSF2(102-408) や、さらに、C末端側を23アミノ酸残基欠失させた pG4DD-NtHSF2(102-385) は、転写活性化を示した。C末端側から279アミノ酸残基まで欠失させると、転写活性化能を示さなくなることから280~385番目のアミノ酸残基が転写活性化に必要な領域であると考えられる。この領域の306~327番目のアミノ酸残基には、一般的な転写活性化領域と考えられている酸性アミノ酸や水酸基を持つアミノ酸などを多く含んでおり、この領域が転写活性化に効いていると考えられる。

2章で示したように推定されるアミノ酸配列から構造がHSFに酷似していること、DNA結合能、核局在性、転写活性化能などから、NtHSF1、NtHSF2は、熱ショック転写因子である考えられる。

そこで、*in vivo*でのこれら NtHSF1、NtHSF2の熱ショックプロモーターへの影響を調べるためにそれぞれのアンチセンスRNAを構成的に過剰発現させた形質転換体を作成し、熱ショック遺伝子の発現への影響を調べた。すでに、熱ショックにより誘導発現することがわかっている*AtHSP18.2-GUS*融合遺伝子を導入した形質転換BY2細胞を宿主に用いて (Dansako, 1998)、CaMV35S-antisense*NtHSF1*、CaMV35S-antisense*NtHSF2*融合遺伝子を導入して2重形質転換BY2細胞を作成した。アンチセンス*NtHSF1*、*NtHSF2*を過剰発現させたどちらの形質転換体において、37°Cで2時間の熱ショック後のGUS活性が減少している形質転換体が単離できた。これらの形質転換体において37°Cでの熱ショックを持続させたときのGUS mRNAの蓄積を調べたところ、NtHSF1のアンチセンス形質転換体に関しては、GUS mRNAの蓄積様式に変化がみられた。特に、熱処理、2~3時間目においてもまだGUS mRNAの蓄積がみられたことから、転写の不活性化の制御が正常に機能していない可能性がある。NtHSF1は、一過性発現解析から転写活性化能を示さなかったことも合わせると、負の転写調節因子として転写の不活性化制御 (inactivation) に関与しているのではないかと考えられる。

一方、NtHSF2のアンチセンス形質転換体に関して、GUS mRNAの蓄積様式に大きな変化がみられなかったという点、熱ショック時のGUS活性の低下という点、また、一過性発現解析では転写活性化能を有することを示したことからNtHSF2は、正の転写制御因子として転写の活性化の制御に働いていると考えられる。

BY2 細胞の内在性の熱ショックタンパク質をコードする遺伝子のうち、熱ショックに応答して誘導発現を示す *NtHSP18*、*NtHSP70*、*NtHSP100* 遺伝子のmRNAの蓄積パターンに関して両 *NtHSF* のアンチセンスの影響を調べた。*NtHSF1* のアンチセンス形

質転換体では、GUS mRNAと同様なmRNAの蓄積が遅れるパターンを示した。また、NtHsf2のアンチセンス形質転換体においてもGUS mRNAと同様な蓄積パターンを示したことから、NtHsf1、NtHsf2は、熱ショックに依存して誘導発現を行うBY2細胞の内在性の熱ショックタンパク質をコードする遺伝子群の転写の活性化と不活性化の制御も行っていると考えられる。

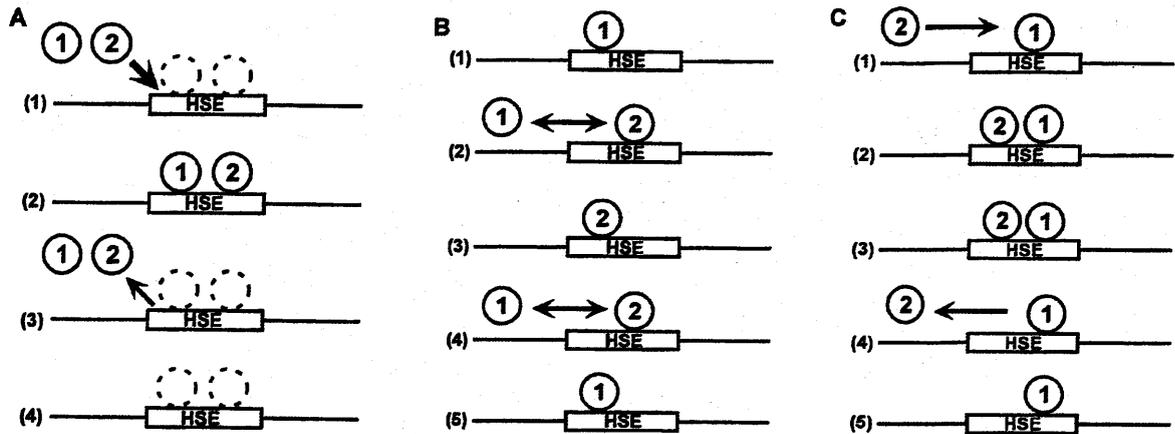


Figure 3-14. Model for transcriptional regulation of plant HSP gene. 1 (NtHsf1), 2 (NtHsf2), HSE (heat shock element).

以上の結果を総合して、NtHsf1、NtHsf2による熱ショック遺伝子の転写活性化の調節に関するモデルをFig.3-14に示す。Aは、NtHsf1、NtHsf2のどちらもHSP遺伝子の転写活性化に必要であるというモデルを示す。非熱ショック条件下においてHSEに結合していないNtHsf1及びNtHsf2は、熱ショックにより、NtHsf1及びNtHsf2が、HSEへ結合し(A(1))、NtHsf1およびNtHsf2により転写が行われる(A(2))。熱ショック中、ある一定時間経過すると、NtHsf1及びNtHsf2は、HSEから解離し(A(3))、転写の活性化が、終結する(A(4))。Bは、NtHsf2のみ転写活性化能を有しており、熱ショック遺伝子の転写活性化に必要であるというモデルを示す。NtHsf1が、熱ショックに関係なく絶えずHSEに結合していて(B(1))、熱ショックによりNtHsf1が解離してNtHsf2が結合し(B(2))、HSP遺伝子の転写を活性化しB(3)、熱ショック中、ある一定時間経過すると、NtHsf2が解離して(B(4))、NtHsf1が再びHSEへ結合する(B(5))。Cは、NtHsf1は、構成的にHSEへ結合し(C(1))、熱ショックにより、モデルAやモデルBのようにNtHsf2(C(2))が結合し、HSP遺伝子の転写を活性化し(C(3))、NtHsf2が解離し(C(4))、再びNtHsf1がHSEへ結合して転写を終結する(C(5))モデルをしめす。これら3つのモデルをより正確なモデルにするためには、NtHsf1およびNtHsf2のHSEへの熱処理中のDNA結合特異性や熱処理中の局在や、分子形態を調べていくことも必要になるだろう。

結論

熱ショックストレスに応答する遺伝子群の発現制御を理解するために、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 (*AtHSP18.2*) を対象にしてタバコ培養細胞を宿主に用いて解析した。このプロモーターの発現活性が、熱ショックにより約1000倍に上昇すること、発現誘導の最適温度が、37°Cであること、この発現は、主に転写レベルで制御されていることを示した。以上の結果より、この熱ショックプロモーター遺伝子の活性が、熱ショックにより厳密に転写の活性化、不活性化に制御されていることを明らかにした。

熱ショック遺伝子の発現を制御していると考えられている、熱ショック転写因子 cDNA をタバコ培養細胞から2種類単離し、*NtHSF1*、*NtHSF2* と名付けた。この2種の cDNA がコードする推定アミノ酸配列には、熱ショック転写因子に特徴的にみられるドメイン (DNA 結合ドメイン、疎水性領域、核移行シグナル、転写活性化ドメイン) を有していた。この単離した2種の cDNA のコードするタンパク質の組換えタンパク質を大腸菌を用いて発現させた。両組換えタンパク質は、シロイヌナズナの熱ショックエレメントに対して塩基配列特異的な DNA 結合能を示した。さらに、出芽酵母の転写因子 GAL4 と *NtHSF1*、*NtHSF2* とのキメラ転写因子を用いた転写活性化能の解析から、*NtHSF1* には、転写活性化に必要な領域を見付け出せなかった。一方、*NtHSF2* には、転写活性化に必要なドメインが存在することを示した。

2種の *NtHSF* の *in vivo* での機能を解析するために、*AtHSP18.2-GUS* を導入してある形質転換 BY2 細胞へ、それぞれのアンチセンス遺伝子を発現させた2重形質転換 BY2 細胞を作出した。アンチセンス *NtHSF1* を発現させた形質転換体では、熱ショックに反応した *GUS* 遺伝子及び、内在性の熱ショック遺伝子の転写の不活性化制御が遅れることを示し、*NtHSF1* は、不活性化制御に関わる熱ショック転写因子であることを植物で初めて明らかにした。また、アンチセンス *NtHSF2* を発現させた形質転換体では、熱ショックに反応した *GUS* 遺伝子及び、内在性の熱ショック遺伝子の発現活性の減少を示し、*NtHSF2* は、既知の正の転写調節を行う熱ショック転写因子に分類された。

以上の結果から、タバコ培養細胞における熱ショック応答における熱ショック遺伝子の転写制御機構に関して以下のように結論づけた。2種の *NtHSF* 遺伝子産物が、タバコ培養細胞において熱ショックストレスに依存した熱ショック遺伝子の発現調節 (転写活性化、及び転写不活性の制御) を行っており、*NtHSF2* は、正の発現活性 (転写活性化制御) に関与し、*NtHSF1* は、負の発現活性 (不活性化制御) に関与している。

論文目録

学位論文の主たる部分を公表した論文

Shoji, T., Kato, K., Sekine, M., Yoshida, K., Shinmyo, A. (2000). Two types heat shock factors exist in tobacco cultured cells. Plant Cell Report in press

Shoji, T., Itoh, H., Dansako, T., Kato, K., Sekine, M., Yoshida, K., Shinmyo, A. Characterization of transcription activation ability using transgenic BY2 which expressed antisense NtHSF-1 or NtHSF-2 gene. in preparation..

参考論文

Shinmyo, A., Shoji, T., Bando, E., Nagaya, S., Nakai, Y., Kato, K., Sekine, M., Yoshida, K. (1998). Metabolic Engineering of Cultured Cells Biotechnology and Bioengineering vol.58, No 329-332.

Yoshida, K., Kasai, T., Gracia, M.R.C., Sawada, S., Shoji, T., Shimizu, S., Yamazaki, K., Komeda, Y., Shinmyo, A. (1995). Heat-inducible expression system for a foreign gene in cultured tobacco cells using the HSP18.2 promoter of *Arabidopsis thaliana*. Applied Microbiology Biotechnology 43: 466-472

吉田和哉、浅尾浩史、庄司猛、新名惇彦 1995年12月 植物における外来遺伝子発現システムの構築を考えたプロモーター解析 植物分子育種や植物代謝工学の発展に向けて「日本植物組織培養学会」第12巻 第3号

謝辞

本研究は、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科・植物代謝調節学講座で行われたものである。この論文をまとめるにあたり多くの方から様々な形の協力を頂きました。本研究を御指導くださいました新名惇彦教授に深く感謝いたします。また、本研究の内容に関して適切な御指導をくださいました吉田和哉助教授、加藤晃助手には、ただ感謝するばかりで、その思いは筆舌に尽くしがたいものがあります。本研究に御拝領いただきました関根政実助手には、厚くお礼申し上げます。

北海道大学理学部米田好文教授、高橋卓助教授には、シロイヌナズナ*HSP18.2*遺伝子を分与していただきました。深く感謝いたします。

一過性発現解析のプラスミドDNAを分与していただきました、現岡山生物科学総合研究所所長岩淵雅樹博士に深く感謝いたします。

北海道大学地球環境科学研究科山崎健一助教授、伊藤嘉信様には、転写活性化能等の実験を手伝っていただき、多くの有意義な討論をする機会を頂きましたことに深く感謝いたします。

私にとって唯一の先輩である笠井隆秀様（現キリンビール）には、修士の一年間ではありましたが御指導いただきましてありがとうございました。

共同研究者である伊藤博史様（現ホーネンコーポレーション）、團迫智子様（現博士後期課程2年）、そして、6年の間、共に実験を行い過ぎてきた研究室と研究科の皆様、本当にありがとうございました。

最後に、精神面及び経済面において援助を続けていただいた両親に、深く感謝致します。

参考文献

- Almoguera, C., Coca, M.A., and Jordano, J. (1993). Tissue-specific expression of sunflower heat shock proteins in response to water stress. *Plant J.* 4:947-958
- Amin, J., Anantha, J., and Voellmy, R. (1988). Key features of heat shock regulatory elements. *Mol. Cell Biol.* 8:3761-3769.
- Barnett, T., Altschuler, M., Mcdaniel, C.N., and Mascarenhas, J.P. (1980). Heat shock induced protein in plant cells. *Dev. Gene.* 117, 1137-1150.
- Barros, M.D., Czarnicka, E., and Gurley, W.B. (1992). Mutational analysis of a plant heat shock element. *Plant Mol. Biol.* 19, 665-675.
- Benfey, P.N., and Chua, N.H. (1990). The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science* 250: 959-966.
- Boscheinen, O., Lyck, R., Queitsch, C., Treuter, E., Zimarino, V., and Scharf, K.D. (1997). Heat stress transcription factors from tomato can functionally replace HSF1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 255, 322-331.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Clos, J., Westwood, J.T., Becker, P.B., Wilson, S., Lambert, K., and Wu, C. (1990). Molecular cloning and expression of a hexameric *Drosophila* heat shock factor subject to negative regulation. *Cell* 63:1085-1097.
- Courey, A.J., and Tjian, R. (1988). Analysis of Sp1 *in vivo* reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell* 55, 887-898.
- Craig, E.A., Gambill, B.D., and Nelson, R.J. (1993). Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Rev.* 57, 402-414.
- Czarnicka-Verner, E., Yuan, C.X., Fox, P.C. and Gurley, W.B. (1995). Isolation and characterization of six heat shock transcription factor cDNA clones from soybean. *Plant Mol. Biol.* 29:37-51.
- Dansako, T. (1998). unpublished data.
- Gagliardi, D., Breton, C., Chabound, A., Vergne, P., and Dumas, C. (1995). Expression of heat shock factor and heat shock protein 70 genes during maize pollen development. *Plant Mol. Biol.* 29:841-856.
- Georgopoulos, C., and Welch, W.J. (1993). Role of major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu. Rev. Cell* 9, 601-635.
- Gething, M.J., and Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33-45.
- Green, M.T., Schuetz, T.J., Sullivan, E.K., and Kingston, R.E. (1995). A heat shock-

- responsive domain of human HSF1 that regulates transcription activation domain function. *Mol. Cell Biol.* 15, 3354-3362.
- Gynheung. (1985). High-efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* 79:568-570.
- Hai, T., Horikosi, M., Roeder, R.G., and Green, MR. (1988). Analysis of the role of the transcription factor ATF in the assembly of a functional preinitiation complex. *Cell* 54:1043-1051
- Halladay, J.T., Craig, E.A., Harrison, C.J., Bohm, A.A., and Nelson, H.C. (1995). A heat shock transcription factor with reduced activity suppresses a yeast HSP70 mutant. *Mol. Cell Biol.* 15, 4890-4897.
- Harrison, C.J., Bohm, A.A., and Nelson, H.C.M.(1994). Crystal structure of the DNA binding domain of the heat shock transcription factor. *Science* 263:224-227.
- Hendrick, J.P., and Hartl, F.U. (1993). Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 349-384.
- H'bel, A., and Schoffl, F. (1994). Arabidopsis heat shock factor:isolation and characterization of the gene and the recombinant protein. *Plant Mol. Biol.* 26:353-362.
- Jefferson, RA., Kavanagh, A., and Beven, MW. (1987). GUS fusions: gulucronidase as a versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6:3901-3907.
- Jefferson, R.A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5, 387-405.
- Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D., and Smith, A.E. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39:499-509.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F., and Mcknigh, S.L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240:1759-1764.
- Livak, K.J., Freund, R., Schweber, M., Wensink, P.C., and Meselson, M. (1978). Sequence organization and transcription at two heat shock loci in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 5613-5617.
- Linsmaier, EM., and Skoog, F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. *Plant Physiol.* 18: 100-127.
- Logan, J., Shell, J., and Willmizer, L. (1987). Improved methods for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* 163:16-20.
- Lyck, R., Harmening, U., Hohfeld, I., Treuter, E., Scharf, K.D., and Nover, L. (1997). Intracellular distribution and identification of the nuclear localization signals of two plant heat-stress transcription factors. *Planta* 202(1):117-25.
- Mager, W.H., and Ferreira, P.M.(1993). Stress response of yeast. *Biochem. J.* 15;290:1-13.
- Maniatis, T., Fritsh, E.F., and Shamrock, J. (1989). *Molecular cloning.*

- Morimoto, R.I., Tissieres, A., and Georgopoulos, C. (1990). The stress response, function of the proteins, and perspectives. *Stress proteins in biology and medicine* Cold Spring Laboratory Press, NY, pp1-36.
- Nagata, T. (1987). Interaction of plant protoplast and liposome. *Methods Enzymol.* 148:34-39.
- Nakai, A., Tanabe, M., Kawazoe, Y., Inazawa, J., Morimoto, R.I., and Nagata, K. (1997). HSF4, a new member of the human heat shock factor family which lacks properties of a transcriptional activator. *Mol. Cell Biol.* 17, 469-481.
- Nakai, A., and Morimoto, R.I. (1993). Characterization of a novel Chicken heat shock transcription factor, heat shock factor 3, suggests a new regulatory pathway. *Molecular and Cellular Biology* vol13, No4, 1983-1997.
- Nakayama, T., Okanami, M., Meshi, T., and Iwabuchi, M. (1997). Dissection of the wheat transcription factor HBP-1a (17) reveals a modular structure for the activation domain. *Mol. Gen. Genet.* 253, 553-561.
- Nover, L. (ed) (1991). *Heat shock response*. CRC, BocaRaton, FLA, USA
- Nover, L., Scharf, K.D., Gagliardi, D., Vergne, P., Czamecka-Verner, E., and Gurley, W.B. (1996). The Hsf world: classification and properties of plant heat stress transcription factors. *Cell Stress Chaperones* 1 (4), 215-223.
- Odell, J.T., Nancy, F., and Chua, N.H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313:810-812.
- Ohkawa, J., Oya, T., Ito, T., Nozawa, H., Nishi, Y., Okada, N., Yoshida, K., Takano, M., and Shinmyo, A. (1994). Structure of the genomic DNA encoding cucumber ascorbate oxidase and its expression in transgenic plants. *Plant Cell Report* 13:481-488.
- O'Shea, E.K., Klemm, J.D., and Alber, T. (1991). X-ray structure of GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science* 254:539-544.
- Parsell, D.A., and Lindquist, S. (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27, 437-496.
- Pelham, H.R.B. (1982). A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp70 heat shock gene. *Cell*, 46:959-961.
- Prandl, R., Hinderhofer, K., Egger-Schumacher, G., and Schoffl, F. (1998). HSF3, a new heat shock factor from *Arabidopsis thaliana*, derepresses the heat shock response and confers thermotolerance when overexpressed in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.* 258(3):269-78.
- Rabindaran, S.K., Giorgi, G., Clos, J., and Wu, C. (1991). Molecular cloning and expression of a human heat shock factor, HSF1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6906-6910.
- Rabindran, S.K., Wisniewski, J., Li, L., L. G.C., Wu, C. (1994). Interaction between

heat shock factor and hsp70 is insufficient to suppress induction of DNA-binding activity *in vivo*. *Mol. Cell Biol.* 14(10):6552-6560.

Robbins, J., Dilworth, M., Raskey, R.A., and Dingwall, C. (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64:615-623.

Ritossa, F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 8, 571-573.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequence with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74., 5463-5467.

Sano, H., and Youssefians, S. (1991). A novel ras-related *rgp1* gene encoding a GTP-binding protein gas reduced expression in 5-azacytidine induced dwarf rice. *Mol. Gen. Genet.* 228:227-232.

Sarge, K.D., Zimarino, K., Holm, K., Wu, C., and Morimoto, R.I. (1991). Cloning and characterization of two mouse heat shock factors with distinct inducible and constitutive DNA-binding ability. *Genes Dev.* 5:1902-1911.

Scharf, K.D., Rose, S., Zott, W., Schoffl, F., and Nover, L. (1990). Three tomato genes code for heat stress transcription factors with a region of remarkable homology to the DNA-binding domain of the yeast HSF. *EMBO J.* 9:4495-4501.

Schoffl, F., Baumann, G., Raschke, E., and Beaven, M. (1986). The expression of heat-shock genes in higher plants. *Philos. Trans. R. Soc. London* 314:453-468.

Schoffl, F., Riping, M., Baumann, G., Beven, M., and Angermuller, X. (1989). The function of plant heat shock promoter elements in the regulated expression of chimeric gene in transgenic tobacco. *Mol. Gen. Genet.* 217:245-253.

Schoffl, F., Diedring, V., Kliem, M., Pieping, M., Schroder, G., and Severin, K. (1992). The heat shock response in transgenic plants: the use of chimeric heat shock genes. In: Wary (ed) *Inducible plant proteins*. Cambridge University Press, Cambridge., pp 247-266.

Schuet, T.J., Gallo, G.J., Sheldon, L., Tempst, P., and Kingston, R.E. (1991). Isolation of a cDNA for HSF2: Evidence for two heat shock factor genes in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6911-6915.

Shi, Y., Kroeger, P.E., and Morimoto, R.I. (1995). The carboxyl-terminal transactivation domain of heat shock factor 1 is negatively regulated and stress responsive. *Mol. Cell Biol.* 15, 4309-4318.

Shi, Y., Mosser, D.D., and Morimoto, R.I. (1998). Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev.* 12, 654-666.

Shimizu, S., Itoh, Y., and Yamazaki, K. (1996). Temperature-dependent increases in the DNA-binding activity of a heat shock factor in an extract of tobacco cultured cells. *Plant Molecular Biol.* 31:13-22.

- Sorger, P.K. (1991). Heat shock factor and heat shock response. *Cell* 65: 363-366.
- Takahashi, T., and Komeda, Y. (1989). Characterization of two genes encoding small heat shock proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 219:365-372.
- Takahashi, T., Naito, S., and Komeda, Y. (1992). The ARABIDOPSIS HSP18.2 promoter/GUS gene fusion in transgenic *Arabidopsis* plants : a powerful tool for the isolation of regulatory mutants of the heat shock response. *Plant J.* 2:751-761.
- Tanabe, M., and Nakai, A. (1999). 3. ストレス応答系の発現制御機構「高等動物における熱ショック応答のシグナル伝達機構」 pp2434-2441.
- Tissieres, A., Mitchell, H.K., and Trancy, U.M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *D. melanogaster*. Relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* 84, 389-398.
- Treuter, E., Nover, L., Ohme, K., and Scharf, K.D. (1993). Promoter specificity and deletion analysis of three heat stress transcription factors of tomato. *Mol. Gen. Genet.* 240:113-125.
- Vuister, G.W., Kim, S., Wu, C., and Bax, A. (1994). NMR evidence for similarities between the DNA-binding regions of *Drosophila melanogaster* heat shock factor and HFN-3/forkhead families of transcription factors. *Biochemistry.* 33(1):10-16.
- Vuister, G.W., Kim, S.J., Orosz, A., Marquardt, J., Wu, C., and Bax, A. (1994). Solution structure of the DNA-binding domain of *Drosophila* heat shock transcription factor. *Nat. Struct. Biol.* (9):605-614.
- Watson, J.C., and Thompson, W.F. (1986). Purification and restriction end nuclease analysis of plant nuclear DNA. *Meth. Enzymol.* 118:57.
- Wiederrecht, G., Seto, D., and Sparker, C. (1988). Isolation of the Gene Encoding the *S.cerevisiae* Heat Shock Transcription Factor. *Cell* 54:841-853.
- Xiao, H., and Lis, J.T. (1988). Germline transformation used to define key features of heat-shock response elements. *Science* 239:1139-1142.
- Yost, H.J., Peterson, R.B., and Lindquist, S. (1990). RNA metabolism: strategies for regulation in the heat shock response. *Trends Genet.* 6:223-227.
- Zou, J., Baler, R., Dahl, G., and Voellmy, R. (1994). Activation of the DNA-binding ability of human heat shock transcription factor 1 may involve the transition from an intramolecular to an intermolecular triple-stranded coiled-coil structure. *Mol. Cell Biol.* 14, 7557-7568.
- Zou, J., Guo, Y., Guettouche, T., Smith, D.F., and Voellmy, R. (1998). Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* 94, 471-480.