

助成番号 0905

植物の塩ストレス応答に対するオーキシン誘導性転写因子の機能解析

小田 賢司

岡山県生物科学総合研究所

概要 イネの完全長 cDNA を過剰発現するシロイヌナズナの形質転換体を 20,000 種類以上作成し、塩ストレス条件下で選抜したところ、塩ストレスに高い耐性を示すラインが 208 種類見つかった。本研究では、このうちの R02819 と名づけた形質転換ラインについて詳細な解析を行った。このラインには、2 種類の cDNA が挿入されている。前者の cDNA にはフレームシフトを引き起こす欠失変異があつて完全なタンパク質を作れないことから、後者の cDNA (AK073365) に着目し、これを野生型のシロイヌナズナに再導入したところ、塩耐性の表現形が再現した。このことから、R02819 の塩ストレス耐性はこの cDNA の過剰発現によるものと結論付けられた。この cDNA には Aux/IAA 型転写因子 OsIAA9 がコードされている。Aux/IAA はオーキシン早期応答遺伝子であり、オーキシン情報伝達に関わる因子として知られている。OsIAA9 は核内で転写調節因子として機能することが予想されるが、OsIAA9 と GFP の融合タンパク質をイネの細胞で一過的に発現させたところ、融合タンパク質は核に特異的に局在した。AK073365 再導入植物は塩ストレス条件下だけでなく、浸透圧ストレス条件下でも野生型よりも高い発芽率を示した。この遺伝子の発現を定量的 RT-PCR により調べたところ、塩ストレスにより誘導されることが明らかとなった。また、植物ホルモン応答性を調べたところ、オーキシンに強く誘導された。AK073365 再導入植物の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ法により調べたところ、42 個の遺伝子の発現が 2.5 倍以上に上昇し、52 個の遺伝子の発現が 2.5 分の 1 以下に低下していた。これらの遺伝子の塩および浸透圧ストレス応答性を公開アレイデータを利用して調べたところ、上昇していた遺伝子は塩および浸透圧に誘導されるものが多く、低下していた遺伝子は塩および浸透圧に抑制されるものが多かった。これらのことから、OsIAA9 の高発現は、植物に塩や浸透圧ストレスに対する分子レベルでの応答反応を引き起こしていると考えられた。一方、AK073365 再導入植物はオーキシン応答性遺伝子の発現に変化を与えていた他、オーキシン変異体に見られる形態異常を示したことから、OsIAA9 はオーキシン情報伝達にも関わっていると考えられた。

1. 研究目的

塩ストレスは植物の生育を阻害し、農産物の収穫に多大な影響を及ぼす環境ストレスの一つである。自ら移動することのできない植物は環境の変化に適応するため、環境ストレスに対して高度な耐性機構を発達させている。塩ストレスに対する耐性機構の分子メカニズムは多くの研究者により精力的に解析されているが、まだ不明の点が多い。そこで、植物の塩ストレス耐性を向上させる遺伝子を単離し、その機能を解析することを目指して研究を行っている。これまでに、約 13,000 種類のイネ完全長 cDNA を発現ベクターに組み込み、アグロバクテリウムを介してシロ

イヌナズナに導入した (Kondou *et al.*, 2009)。独立した 21,048 の形質転換ライン (イネ FOX ライン) の T2 種子を 150 mM の塩を含む寒天培地上に無菌播種し、発芽ならびにその後の初期生育を比較することで、塩ストレスに耐性を示すラインを選抜した。その結果、208 の塩耐性候補ラインを見出し、個別に解析を進めている (Yokotani *et al.*, 2009)。本研究では、この中の R02819 と名付けたラインについて解析を行った。発現ベクターに存在する 35S プロモーターと NOS ターミネーターに相補的なプライマーを用いて gPCR を行ったところ、AK073432 と AK073365 の二つの cDNA が R02819 のゲノムに挿入されていた。しかし、

前者の cDNA にはコーディング領域中央付近に1塩基の欠失変異があって正常なタンパク質が合成できず、後者の cDNA が塩ストレス耐性の原因遺伝子と考えられた。そこで、本研究では AK073365 に着目し、コードする Aux/IAA 型転写因子について機能解析を行った。

2. 研究方法

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の栽培は、寒天培地 (1/2 x Murashige & Skoog salt, 1% ショ糖, 0.8% 寒天, pH 5.7) 上で、22°C、24 時間明条件で行った。イネ (*Oryza sativa*) は農業生物資源研究所の森昌樹博士から分譲いただいた日本晴を用いた。栽培は、寒天培地 (Murashige & Skoog salt, 0.5% Gellan gum) 上で、26°C、16 時間明 8 時間暗の条件で行った。イネの塩ストレス処理やホルモン処理は、寒天培地上で栽培した植物を塩やホルモンを含む液体培地 (Murashige & Skoog salt) に浸し、振とう培養することで行った。

GFP との融合タンパク質発現プラスミドの作成は横谷ら (2008) の方法に従い、イネの細胞への一過的遺伝子導入は PDS-1000He (BioRad) により行った。蛍光シグナルの検出は、レーザー共焦点顕微鏡 LSM510 (Zeiss) を用いた。

RNA の抽出は RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を利用し、ランダムプライマーによる逆転写反応は Superscript VILO cDNA synthesis kit (Invitrogen) を用いた。Real-time PCR 反応は Power Syber Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用い、25 μ l の反応液量で3連で行った。プライマーセットは、*OsIAA9* 用に 5'-ACCAACGACCACCAAGGCGA-3' および 5'-CAGGCGTTTCACAGATCGTG-3' を、*OsIAA20* 用に 5'-GCGAAATGGGCAACAAGAGG-3' および 5'-CCGAGGATGGACAAGTCCAG-3' を用いた。コントロールとして用いた 18S ribosomal RNA 遺伝子用には 5'-AGTCATCAGCTCGCGTTGAC-3' および 5'-TCAATCGGTAGGAGCGACG-3' を用いた。発現量はコントロールとの相対量で比較した。検出は Applied Biosystems 7900 リアルタイム PCR システムを利用した。

マイクロアレイは *Arabidopsis* ATH1 Genome Array (Affymetrix) を用いた。プローブ合成は One-Cycle Target Labeling and Control Reagents (Affymetrix) を用いて行った。発現データの解析は、R プログラムの affylmGUI パッ

ケージを利用した。

3. 研究結果

3.1 R02819 の塩ストレス耐性

R02819 は 150 mM NaCl を含む寒天培地上に無菌播種すると、発芽および初期成育が野生型よりも優れるラインとして選抜された。この表現形が挿入されている挿入 cDNA AK073365 に起因することを証明するため、AK073365 を野生型シロイヌナズナに再導入した。まず、再導入形質転換体がこの cDNA を高発現しているか定量的 RT-PCR 法により調べたところ、いずれも高い発現が認められた (Fig. 1. A)。得られた T2 種子を 120 mM NaCl を含む寒天培地上に無菌播種し、表現形が再現するかどうかを調べた。その結果、再導入形質転換体の多くが塩耐性を示した (Fig. 1. B)。このことから、R02819 の塩ストレス耐性は AK073365 の高発現によるものと考えられた。R02819 は AK073365 以外にもう一種類の cDNA (AK073432) が挿入されている。27 の T3 個体に対しこれら二つの cDNA の有無を gPCR により調べたところ、二つの cDNA の有無は完全に一致しており、遺伝的挙動は強くリンクしていた (data not shown)。このことは、これら二つの cDNA が同一部位かあるいは極めて近接した部位に挿入されていることを示しており、互いに分離することは困難と考えられた。そこで、以降の解析に用いるラインとして、発現が比較的強く、抗生物質耐性の分離比からシングルローカスに T-DNA が挿入されていると予想された再導入ライン Re#15 および Re#17 の2種類を選んだ。これらのラインの中から T3 世代で挿入 cDNA をホモに持つものを探し、実験に供した。

まず、再導入ライン Re#15 および Re#17 の塩ストレス条件下での発芽率を定量的に調べた。NaCl を含む寒天プレートに 30 粒の種子を無菌播種し、発根を基準に発芽を観察した。発芽率は4枚のプレートの平均値として算出した。その結果、Re#15 および Re#17 はいずれも Vector コントロールに比べて高い発芽率を示した (Fig. 1. C)。植物が塩ストレスを受けると、浸透圧ストレスやイオン毒性などが複合的に作用することが知られている。そこで、これらのラインが浸透圧ストレスにも耐性を示すかどうか、高濃度のマンニトールを含む寒天プレートを用いて塩ストレス試験と同様の手法により試験した。Re#15 および Re#17 は塩ス

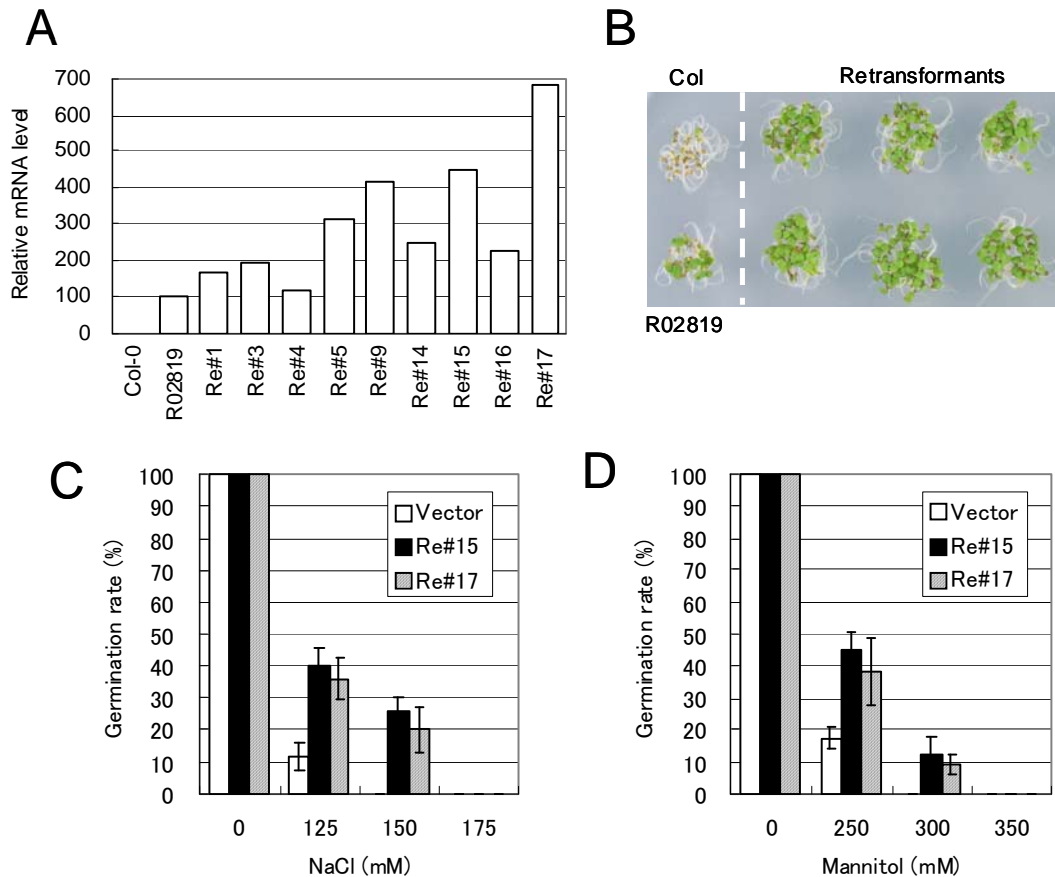


Fig. 1. Salinity-tolerant phenotype caused by overexpression of a rice cDNA AK073365. (A) Expression of AK073365 in wild type, R02819, and retransformed lines. Transcript levels were determined by quantitative RT-PCR. The transcription levels were expressed as a percentage relative to that of R02819 (ND, not detected). (B) Salt-tolerant phenotype of R02819 and the retransformed lines. Seeds were sown on agar medium containing 120 mM NaCl. (C) Germination rate of vector control plants and the retransformed lines (Re#15 and Re#17) under salt stress. (D) Germination rate of vector control plants and the retransformed lines (Re#15 and Re#17) under osmotic stress.

トレス試験と同様に Vector コントロールに比べて高い発芽率を示し、浸透圧ストレスにも耐性を示すことが明らかとなった (Fig. 1. D)。

3. 2 挿入遺伝子の局在性解析

AK073365 はイネの2番染色体にコードされている遺伝子 Os02g0805100 の cDNA である。この遺伝子は182アミノ酸からなる Aux/IAA 型転写因子 OsIAA9 をコードすると推定されている。Aux/IAA は植物ゲノムに大きな遺伝子ファミリーを作って存在しており、イネには31の IAA タンパク質が、シロイヌナズナには34の IAA タンパク質が見出されている (Jain *et al.*, 2005; Reed, 2001)。ホモロジー検索の結果、OsIAA9 と高い相同性を示し、同じサブファミリーに属すると考えられる遺伝子 OsIAA4、OsIAA8、

OsIAA20 がイネゲノム中に見出された (Fig. 2. A)。シロイヌナズナでは AtIAA20、AtIAA30、AtIAA31 の3つが特に高い相同性を示した。

OsIAA9 の細胞内局在性を調べるため、GFP タンパク質との融合タンパク質をイネの細胞に一過的に発現させた。OsIAA9 が転写因子として機能するならば、融合タンパク質は核に局在すると予想される。実際、GFP の蛍光をレーザー共焦点顕微鏡で観察すると、核に強いシグナルが認められた (Fig. 2. B)。

3. 3 挿入遺伝子の発現解析

OsIAA9 およびこれに特に高い相同性を示す OsIAA20 の二つの遺伝子について、遺伝子の発現解析を行った。塩ストレスに対する応答性を調べるため、培養6日目のイ

A

```

OsIAA9  MELELGLAPPNSGHLVVDLELSSSSSSGGGSGSAPVSASS-----AKGRGFREAFQETLLFDD-----GSQNTSDDDQRRRKTIVGWPP
OsIAA20 MELELGLRLALPSPSPSPATATAAG---SELDLLNSAPG-----SCRKRGFEALGGFKTDDNDND-----GNGRGGDSDGEMGNKRRRLVWPPVKC
OsIAA8  MEQMASTEESLPASSMDSGSGELPTTTTAPAGSASSGRPPATAAKRRLISTDLRLGLTLSSVWH-----IDGNPSTPRS---SLTTATVTADRG
OsIAA4  MEECKGGGMS---PSSMDS---THPALSTTSS-----AATARFDLSTDLRLGLSLTSSSSLQAATAAADDSTPS TPRSNSQVHADWPPIKPFLRSALQKASA
AtIAA20 ---MGRGRSS---SSSIESSS---KSNPFGASSS-----TRNLSIDLRLGLSFGTSSGT-----QYFNGGYGYSAVAPAVEDA EYVA AVEE
AtIAA30 ---MGRGRSS---SSSIESSS---KSNPFGASSS-----TRNLSIDLRLGLSFGTSSGT-----QYFNGGYGYSAVAPAVEDA EYVA AVEE
AtIAA31 MEVNSCSSF---SSSVD S---TKPSPSESS-----VNLSSLST-----FPS TSPQREARQDWPPIKSRLRDLTKGRRL
<-----domain I----->

OsIAA9  VSSARRACGGANYVKVKEGDAIGRKVDLALHSSYDELAATLARFMFPTNDHGGKEMANDHDGAAAG---PVVTYEDGDGDWMLVGDVPWDDFARSVKRLKILG-----
OsIAA20 LHRRRDGGCGGGYVKVMEGLAIGRKLDL S LGSYAELLDLHLMFPSTNQEDGHDR---RRRHP---YAVTYEDGEGDWMMVGDVPWEAF AKSVKRLKILV-----
OsIAA8  GGGGHGRRRSLFVKVYMEGVP IGRKLDL LPLDGYKGLVARLASMFRASIT YHHCHR-QFAVVGKTKNVHHLT YE DQEGDWMMAGDVPWELFLTSVKRLRIARADKYCYSC
OsIAA4  AGGGGARRRRTLVKVMYEGVP IGRKLDL LLDGYDSL I KLCHMFKTPIT YADVMECHQQVPGQKA---AHVLT YE DQGDWMMVGDVPWELFLSSVKRLRIARMDK---
AtIAA20 EEENECSVGSFYVKVMEGVP IGRKIDLMSLNGYRDLIRTLDFMNASILWAEEE---DMCEKS---HVLTYADKEGDWMMVGDVPWEMFLSTVRLKISRANVHY---
AtIAA30 EEENECSVGSFYVKVMEGVP IGRKIDLMSLNGYRDLIRTLDFMNASILWAEEE---DMCEKS---HVLTYADKEGDWMMVGDVPWEMFLSSVRLKISRANVHY---
AtIAA31 LRGGD---TSLFVKVYMEGVP IGRKLDLQVSGYESLL ENL SHMFDTSI ICGN---RDRK---HHVLT YE DKGDWMMVGDIPWDMFLET VRLK ITRPERY---
<-----domain III-----> <-----domain IV----->
    
```

B



Fig. 2. Amino acid sequence and subcellular localization of OsIAA9. (A) Comparison of amino acid sequences of OsIAA9 and homologous proteins found in rice and Arabidopsis. The alignment was performed using CLUSTAL W program. (B) Subcellular localization of OsIAA9. The OsIAA9-GFP fusion protein was expressed in the rice cells. Left to right: the fluorescent image of OsIAA9-fused GFP, the fluorescent image of DsRed (control), nomarski image.

ネを 0.2 M NaCl を含む液体培地に浸し、1、3、6、12、24 時間後にサンプリングして RNA を抽出した。遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR 法により測定したところ、いずれの遺伝子の発現も塩ストレスにより上昇することが明らかとなった (Fig. 3. A)。OsIAA9 は処理後 1 時間以内に誘導が始まり、3~6 時間後あたりに一度ピークを迎えた後、12 時間後にやや減少して、24 時間後に再び強い誘導が観察された。OsIAA20 は 3 時間後あたりに誘導のピークを迎え、12 時間後にはほぼ定常レベルに戻る。OsIAA9 と異なり、24 時間後はわずかな誘導しか認められない。

昨年、マイクロアレイを利用したイネの Aux/IAA 遺伝子群の発現解析が報告され、Aux/IAA 遺伝子はさまざまな環境ストレスに応答することが示された (Jain and Khurana, 2009; Song *et al.*, 2009)。Jain and Khurana (2009) によると、OsIAA9 および OsIAA20 は低温ストレスには応答しないが、塩ストレスのみならず乾燥ストレスによっても誘導される。

続いて OsIAA9 および OsIAA20 の植物ホルモンに対する応答性を調べたところ、両遺伝子はオーキシン (IAA) に

より誘導された (Fig. 3. B)。特に、OsIAA20 は 1,000 倍以上の誘導が認められた。ジベレリン (GA₃) およびジャスモン酸にはほとんど応答しなかったが、アブシジン酸によりわずかに誘導された。

3. 4 R02819 のマイクロアレイ解析

転写調節因子である OsIAA9 の過剰発現が植物体内でどのような遺伝子発現の変化を引き起こしているかを明らかにするため、AK073432 再導入形質転換体の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイにより野生型と比較した。その結果、42 個の遺伝子が 2.5 倍以上誘導され、52 個の遺伝子が 2.5 分の 1 以下に抑制されていた (Table 1)。塩ストレス応答に関わる dehydrin などの遺伝子が誘導されていた他、オーキシン関連遺伝子として不活化に関わるオーキシン誘導性酵素 IAA-amido synthase (GH3) が 2 種類抑制されていた。

次に、AK073432 再導入形質転換体で発現が上昇していた遺伝子は塩ストレスによって誘導されるか、AK073432 再導入形質転換体で発現が減少していた遺

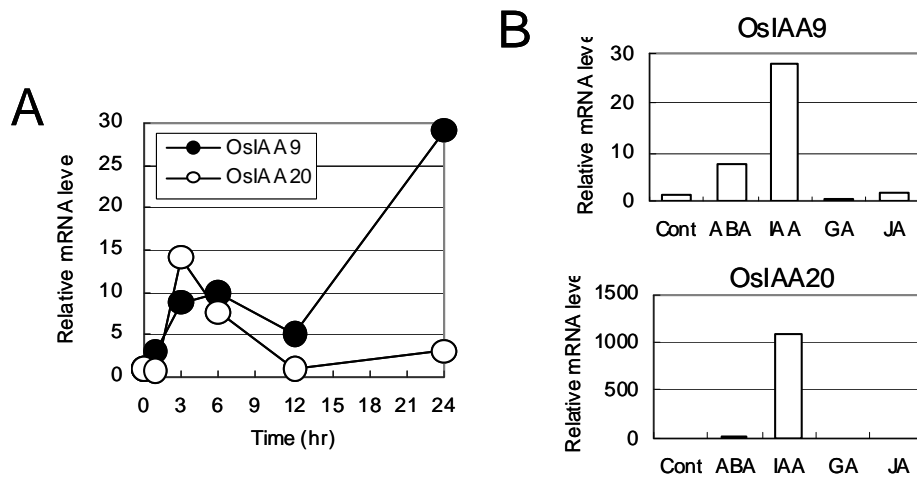


Fig. 3. Induction of *OsIAA9* and *OsIAA20* by salt stress and plant hormones. (A) Time cause of *OsIAA9* and *OsIAA20* expressions under 0.2 M NaCl. (B) Responsiveness of *OsIAA9* and *OsIAA20* to ABA, IAA, GA₃ and JA.

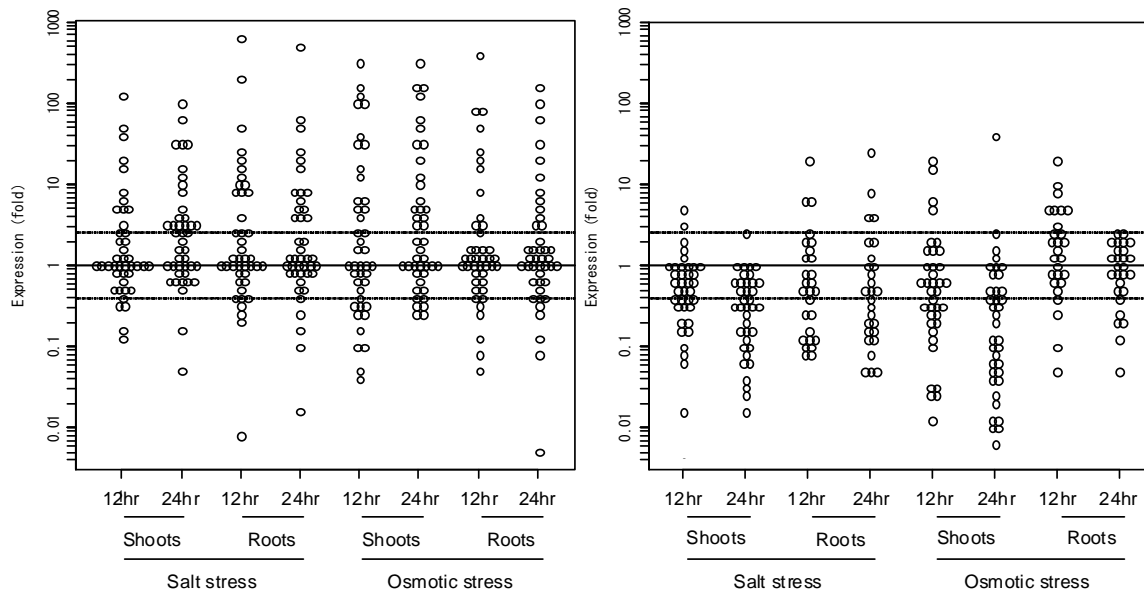


Fig. 4. Responsiveness of the genes changed transcriptionally in *OsIAA9*-overexpressing Arabidopsis to salt and osmotic stresses. Left: Relative expression of the up-regulated genes. Right: Relative expression of the down-regulated genes. Expression data was obtained from the report of microarray analysis by Kilian *et al.* (2007).

伝子は塩ストレスによって抑制されるかどうかを既報のマイクロアレイデータ (Kilian *et al.*, 2007) をもとに調べた (Fig. 4)。塩ストレス処理後、12 時間または 24 時間目の発現変化の割合をグラフにプロットした。アレイデータは地上部と地下部が別々に測定されているので、それぞれ別々にプロットした。但し、AK073432 再導入形質転換体で発現が減少していた遺伝子については、未処理の段階で地上部と地下部で遺伝子発現に 10 倍以上の開きがある場合、少

ない側のデータは省略した。解析の結果、AK073432 再導入形質転換体で発現が上昇していた遺伝子は塩ストレスによって誘導されるものが多く、逆に、発現が減少していた遺伝子は塩ストレスによって抑制されるものが多かった。同じ手法により浸透圧ストレス処理による変化を調べたところ、塩ストレスと同様、AK073432 再導入形質転換体で発現が上昇していた遺伝子は誘導され、発現が減少していた遺伝子は抑制される傾向が観察された。

Table 1. List of the genes changed transcriptionally in *OsIAA9*-overexpressing *Arabidopsis*

Up-regulated genes	AGI Code	Ratio	P-Value
bHLH family protein (ORG3)	AT3G56980	21.14	2.48E-05
expressed protein	AT1G47400	16.30	9.99E-05
iron-responsive transporter (IRT1)	AT4G19690	11.03	3.97E-03
bHLH family protein	AT5G04150	7.72	1.18E-05
glucose-6-phosphate/phosphate translocator, putative (GPT2)	AT1G61800	7.07	9.25E-05
ferric-chelate reductase, putative	AT1G23020	5.94	3.56E-05
protein kinase family protein	AT5G53450	5.71	2.81E-05
expressed protein	AT5G42900	4.22	1.12E-04
expressed protein	AT1G12030	4.20	2.81E-05
CONSTANS-like protein	AT1G07050	3.96	2.11E-04
expressed protein	AT5G05250	3.78	3.44E-05
glycine-rich cell wall protein-related	AT4G18280	3.60	2.32E-04
short-chain dehydrogenase/reductase family protein	AT3G29250	3.46	4.01E-03
low temperature and salt responsive protein, putative	AT4G30650	3.41	1.11E-04
major latex protein-related	AT2G01530	3.24	3.58E-04
high-affinity nitrate transporter (ACH1/NRT2:1)	AT1G08090	3.22	5.32E-05
major latex protein-related	AT2G01520	3.15	3.38E-03
galactinol synthase, putative	AT1G60470	3.13	2.48E-05
protein phosphatase 2C, putative	AT1G07430	3.06	3.52E-04
DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	AT1G56300	3.05	3.56E-05
dehydrin (RAB18)	AT5G66400	3.01	5.20E-05
peroxidase, putative	AT5G64120	2.98	1.32E-03
male sterility MS5 family protein	AT5G48850	2.97	8.76E-03
expressed protein	AT4G16146	2.80	5.20E-05
zinc finger protein-related	AT3G18290	2.80	1.96E-04
germin-like protein (GLP9)	AT4G14630	2.79	2.49E-05
glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit, putative / ADP-glucose pyrophosphorylase, putative (APL4)	AT2G21590	2.70	1.23E-04
sigA-binding protein (SIB1)	AT3G56710	2.69	3.80E-03
transcription factor jumonji (jmjC) domain-containing protein	AT3G20810	2.67	1.61E-04
peroxidase (ATP3a)	AT5G64100	2.66	3.64E-04
similar to protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	AT4G33550	2.59	2.32E-04
gibberellin-regulated family protein	AT5G14920	2.59	1.85E-04
alanine-glyoxylate aminotransferase, putative / beta-alanine-pyruvate aminotransferase, putative	AT3G08860	2.57	1.76E-02
plastid localized alpha-amylase	AT1G69830	2.56	5.18E-05
low temperature and salt responsive protein, putative	AT4G30660	2.56	6.18E-04
auxin-responsive family protein	AT3G53250	2.55	2.35E-04
senescence-associated protein (SEN1)	AT4G35770	2.54	1.43E-03
expressed protein	AT1G11210	2.53	2.81E-05
dormancy-associated protein, putative (DRM1)	AT1G28330	2.52	2.81E-05
expressed protein	AT4G04330	2.51	3.35E-05
MutT/nudix family protein	AT5G19470	2.51	1.08E-03
glutathione S-transferase, putative	AT5G62480	2.51	3.01E-03
Down-regulated genes	AGI Code	Ratio	P-Value
protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	AT4G12490	17.27	9.24E-06
expressed protein	AT5G51720	14.41	9.24E-06
expressed protein	AT1G13650	8.88	1.73E-04
chitinase, putative	AT2G43590	8.30	1.03E-05
germination protein-related	AT3G29970	6.33	2.24E-03
gibberellin-responsive protein, putative	AT1G22690	5.43	1.02E-04
cysteine proteinase, putative	AT2G27420	5.35	9.24E-06
IAA-amido synthase (GH3.4)	AT1G59500	5.04	3.96E-05
beta-carotene hydroxylase, putative (BETA-OHASE 2)	AT5G52570	4.35	6.64E-05
glutamyl-tRNA reductase 1 (HEMA1)	AT1G58290	4.21	5.20E-05
ferritin 1 (FER1)	AT5G01600	4.20	2.32E-04
chlorophyll A-B binding protein (LHCB2:4)	AT3G27690	3.92	3.24E-04
triose phosphate/phosphate translocator, putative	AT3G01550	3.87	7.26E-05
zinc finger protein CONSTANS-LIKE 2 (COL2)	AT3G02380	3.86	1.13E-04
IAA-amido synthase (GH3.3)	AT2G23170	3.48	2.49E-04
nodulin MtN21 family protein	AT2G39510	3.44	1.52E-04
protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein (AIR1)	AT4G12550	3.40	6.95E-04
thionin, putative	AT1G66100	3.38	8.03E-04
legume lectin family protein	AT3G16530	3.23	1.29E-02
protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	AT4G12500	3.20	1.72E-04
expressed protein	AT1G65490	3.18	9.42E-06
acireductone dioxygenase (ARD/ARD') family protein	AT2G26400	3.18	4.91E-04
ferritin, putative	AT2G40300	3.17	2.58E-04
expressed protein	AT2G36885	3.07	2.49E-05
protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	AT5G48490	3.07	1.66E-03
alcohol dehydrogenase (ADH1)	AT1G77120	3.05	1.33E-03
Myb family transcription factor	AT5G17300	3.02	1.85E-04
acyl-acyl-carrier-protein) desaturase, putative / stearoyl-ACP desaturase, putative	AT1G43800	3.01	3.83E-03
expressed protein	AT4G19430	2.98	2.94E-04
wound-responsive family protein	AT4G10270	2.88	2.10E-03
disease resistance-responsive family protein	AT1G65870	2.85	1.66E-03
expressed protein	AT5G15600	2.85	1.95E-05
LATE ELONGATED HYPOCOTYL MYB transcription factor (LHY)	AT1G01060	2.83	1.12E-04
expressed protein	AT4G39675	2.81	1.98E-03
expressed protein	AT1G55960	2.81	8.73E-05
glycosyl hydrolase family 1 protein	AT1G26560	2.76	1.40E-04
universal stress protein (USP) family protein	AT3G25930	2.72	1.48E-04
rubredoxin family protein	AT5G17170	2.70	1.23E-04
glucosamine/galactosamine-6-phosphate isomerase-related	AT5G24420	2.70	1.10E-03
invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein	AT4G00080	2.69	1.99E-03
bZIP transcription factor family protein	AT3G17609	2.69	1.23E-04
Internal NAD(P)H dehydrogenase	AT1G07180	2.68	1.29E-04
pyruvate decarboxylase, putative	AT4G33070	2.68	1.44E-04
FAD-binding domain-containing protein	AT1G26380	2.66	1.07E-03
expressed protein	AT4G27450	2.59	2.57E-04
hypothetical protein	AT5G66740	2.57	5.94E-05
myb-related transcription factor (CCA1)	AT2G46830	2.56	8.64E-04
myb family transcription factor (MYB29)	AT5G07690	2.52	1.13E-04
expressed protein	AT4G33560	2.52	7.92E-04
polygalacturonase, putative / pectinase, putative	AT5G14650	2.52	3.38E-03
pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	AT4G02270	2.51	2.65E-02
potassium transporter (HAK5)	AT4G13420	2.51	9.34E-05

Genes with expression that increased at more than 2.5 times or decreased in less than 1/2.5 in *OsIAA9*-overexpressing *Arabidopsis* are shown.

4. 考察

OsIAA9 は塩耐性イネ FOX ライン R02819 に挿入されている遺伝子である。この遺伝子の発現は塩ストレスにより誘導される (Fig. 3. A) 他、乾燥ストレスにも誘導される (Jain and Khurana, 2009)。本研究は、*OsIAA9* 過剰発現シロイヌナズナのストレス耐性試験により、この遺伝子が植物の塩ストレス耐性や浸透圧ストレス耐性に関わることを生理学的に示した。*OsIAA9* が塩ストレス耐性を付与する機構は正確には解明されていない。しかし、*OsIAA9* 過剰発現シロイヌナズナのマイクロアレイ解析の結果、*OsIAA9* は塩ストレス誘導遺伝子の発現を上昇させ、塩ストレス抑制遺伝子の発現を減少させる傾向にあることが明らかとなった (Fig. 4)。このことから、*OsIAA9* は遺伝子の発現調節を通じて、塩ストレスや浸透圧ストレスに対する適応反応を引き起こしているのであろうと考えられる。

Aux/IAA タンパク質はオーキシン応答性遺伝子の抑制因子であり、オーキシン存在下で分解されることでオーキシン応答性遺伝子が脱抑制されることが知られている。Aux/IAA タンパク質には通常、IからIVの4つのドメインが保存されている。*OsIAA9* の属するサブファミリーのタンパク質は正常なドメイン II を欠いている (Fig. 2. A)。ドメイン II はタンパク質の分解に必要な領域であり、オーキシンによる急速な分解に関わるドメインである。ドメイン II の変異はさまざまな生理学的発生的異常を引き起こすことが知られている (Reed, 2001)。もともとドメイン II を欠く AtIAA20 および AtIAA31 タンパク質は他の Aux/IAA タンパク質に比べて長い半減期を持つことが示されている (Dreher *et al.*, 2006)。*OsIAA9* はオーキシンによる分解に必要なドメイン II を欠いているが、オーキシン情報伝達と無関係とは考えにくい。*OsIAA9* の発現はオーキシンにより強く誘導される (Fig. 3. B)。また、*OsIAA9* の過剰発現はオーキシンの不活化に関わる GH3 遺伝子を抑制する (Table 1)。さらに、R02819 や *OsIAA9* 再導入形質転換体は、通常条件下でポット栽培した場合、半矮性や上偏成長などの形態変化が見られる (data not shown)。同様の形態異常はシロイヌナズナの相同遺伝子の過剰発現体においても観察されている (Sato and Yamamoto, 2008) が、オーキシンの情報伝達の変異体に見られるものである。これらのことから、*OsIAA9* は塩・浸透圧ストレス耐性に関わる機能とオーキシン情報伝達に関わる機能を有すると考

えられる。

5. 今後の課題

本研究は *OsIAA9* の過剰発現体の解析研究である。*OsIAA9* の生理機能を証明するためには、最終的には、イネの *OsIAA9* 遺伝子の欠損変異体を見つけて解析することが必要であろう。

一方、実用的見地から見ると、*OsIAA9* による塩ストレス耐性の付与は、現時点では、シロイヌナズナ以外の植物では試験されていないため、この遺伝子が有用作物においても同様の効果があるかどうかの試験が必要となる。また、*OsIAA9* の過剰発現が形態異常を引き起こすことは、実用化を考える上で、大きな障害となる。将来的には、*OsIAA9* による塩・浸透圧ストレス耐性の機能とオーキシン情報伝達の機能を分離する手段を考えなければならないかも知れない。

謝辞

本研究にご援助頂きましたソルト・サイエンス研究財団に感謝申し上げます。本研究の一部は、岡山県生物科学総合研究所横谷尚樹流動研究員と共に、理化学研究所植物科学研究センター植物ゲノム機能研究グループ松井南グループリーダー、農業生物資源研究所廣近洋彦基盤研究領域長との共同研究として行いました。

文献

- KA Dreher, J Brown, RE Saw and J Callis (2006) The Arabidopsis Aux/IAA Protein Family Has Diversified in Degradation and Auxin Responsiveness. *Plant Cell*, 18: 699-714.
- M Jain, N Kaur, R Garg, JK Thakur, AK Tyagi and JP Khurana (2005) Structure and expression analysis of early auxin-responsive Aux/IAA gene family in rice (*Oryza sativa*). *Funct. Integr. Genomics*, 6: 36-46.
- M Jain and JP Khurana (2009) Transcript profiling reveals diverse roles of auxin-responsive genes during reproductive development and abiotic stress in rice. *FEBS J.*, 276: 3148-3162.
- J Kilian, D Whitehead, J Horak, D Wanke, S Weinl, O Batistic, B-BE D'Angelo, J Kudla, and K Harter (2007)

- The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J.*, 50: 347-363.
- Y Kondou, M Higuchi, S Takahashi, T Sakurai, T Ichikawa, H Kuroda, T Yoshizumi, Y Tsumoto, Y Horii, M Kawashima, Y Hasegawa, T Kuriyama, K Matsui, M Kusano, D Albinsky, H Takahashi, Y Nakamura, M Suzuki, H Sakakibara, M Kojima, K Akiyama, A Kurotani, M Seki, M Fujita, A Enju, N Yokotani, T Saitou, K Ashidate, N Fujimoto, Y Ishikawa, Y Mori, R Nanba, K Takata, K Uno, S Sugano, J Natsuki, JG Dubouzet, S Maeda, M Ohtake, M Mori, K Oda, H Takatsuji, H Hirochika, and M Matsui (2009) Systematic approaches to using the FOX hunting system to identify useful rice genes. *Plant J.*, 57: 883-894.
- JW Reed (2001) Roles and activities of Aux/IAA proteins in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.*, 6: 420-425.
- A Sato and KT Yamamoto (2008) Overexpression of the non-canonical Aux/IAA genes causes auxin-related aberrant phenotypes in Arabidopsis. *Physiol. Plant.*, 133: 397-405.
- Y Song, L Wang, L Xiong (2009) Comprehensive expression profiling analysis of OsIAA gene family in developmental processes and in response to phytohormone and stress treatments. *Planta* 229: 577-91.
- N Yokotani, T Ichikawa, Y Kondou, M Matsui, H Hirochika, M Iwabuchi, and K Oda (2008) Expression of rice heat stress transcription factor OsHsfA2e enhances tolerance to environmental stresses in transgenic Arabidopsis. *Planta*, 227: 957-967.
- N Yokotani, T Ichikawa, Y Kondou, S Maeda, M Iwabuchi, M Mori, H Hirochika, M Matsui, and K Oda (2009) Overexpression of a rice gene encoding a small C2 domain protein OsSMCP1 increases tolerance to abiotic and biotic stresses in transgenic Arabidopsis. *Plant Mol Biol*, 71: 391-402.

No. 0905

Functional Analysis of an Auxin-Inducible Transcription Factor to Salinity Responses in Plants

Kenji Oda

Research Institute for Biological Sciences, Okayama

Summary

Salt stress is one of the major extrinsic factors that affect plant growth and crop productivity. Because of their sessile nature, plants have developed various adaptive responses to salt stress. Elucidation of a complex network of the stress responses is expected to engender reduction of crop yield loss caused by salt stress. To identify genes that confer improved tolerance to salt stress, we have constructed more than 20,000 transgenic *Arabidopsis* overexpressing about 13,000 kinds of rice full-length cDNAs, and isolated 208 lines as candidates for salinity tolerant lines by screening the library under salinity stress. In this study, the salinity-tolerant line R02819 was characterized in detail. An Aux/IAA gene *OsIAA9* was identified as the gene responsible for the salinity tolerance of R02819. *OsIAA9*-overexpressing *Arabidopsis* showed enhanced tolerance to osmotic stress as well as salt stress. *OsIAA9* was highly induced by salt stress and auxin. Gene expression profile of *OsIAA9*-overexpressing *Arabidopsis* was examined by microarray analysis. Interestingly, many of the up-regulated genes were induced by both salinity and osmotic stresses. On the other hand, many of the down-regulated genes were repressed by these stresses, showing that *OsIAA9* induces molecular responses to the stresses. Overexpression of *OsIAA9* also affected the expression of auxin-inactivation enzyme, IAA-amido synthase (GH3). *OsIAA9*-overexpressing *Arabidopsis* represented morphological defects that are often observed in auxin mutants. These results indicate that *OsIAA9* has dual functions - auxin-signal transduction and salt-stress tolerance. *OsIAA9* might function at the intersection between auxin and abiotic stress signaling.