

博士論文

シロイヌナズナの C2H2 型 zinc-finger タンパク質
AZF1、AZF2 の機能解析

東京大学大学院農学生命科学研究科
応用生命化学専攻 植物分子生理学研究室
平成 19 年度入学 小平 憲祐
指導教員 篠崎 和子

目次

目次

略語一覧

第 I 章 序論	1
第 II 章 シロイヌナズナの STZ ファミリー遺伝子 (AZF1、AZF2、AZF3、ZAT6、ZAT8、STZ/ZAT10) の比較解析	6
II-1. 序論	6
II-2. 目的	7
II-3. 材料と方法	7
II-4. 結果	16
II-4-1. STZ ファミリータンパク質の一次構造と系統解析	16
II-4-2. STZ ファミリータンパク質の細胞内局在の解析	17
II-4-3. STZ ファミリー遺伝子の乾燥、塩、低温、高温ストレスおよび ABA 処理下における発現の解析	17
II-4-4. 乾燥ストレス下における STZ ファミリー遺伝子の組織特異的発現部位の解析	18
II-4-5. GVG 転写誘導系を用いた STZ ファミリー遺伝子の過剰発現体の作出と導入遺伝子の発現解析	18
II-4-6. AZF1、ZAT8、AZF2 の過剰発現体における遺伝子発現パターンの比較解析	19
II-5. 考察	20
第 III 章 AZF1 と AZF2 の機能解析	37
III-1. 序論	37
III-2. 目的	38
III-3. 材料と方法	38

III-4. 結果	48
III-4-1. AZF1 および AZF2 の植物体における発現部位の解析	48
III-4-2. GVG 転写誘導系の制御下で AZF1 および AZF2 を過剰発現した植物の表現型の解析	48
III-4-3. GVG 転写誘導系の制御下で AZF1 および AZF2 を過剰発現した植物の塩ストレス感受性の評価	49
III-4-4. RD29A プロモーターの制御下で AZF1 および AZF2 を発現した植物の塩ストレス感受性の評価	49
III-4-5. AZF2 プロモーターの制御下で AZF2 を発現した植物の塩ストレス感受性の評価	50
III-4-6. RD29A や AZF2 プロモーターの制御下で AZF1 および AZF2 を発現した植物の成長の観察	50
III-4-7. AZF1 および AZF2 を過剰発現した植物の遺伝子発現パターンの解析	50
III-4-8. AZF1 および AZF2 の下流遺伝子の発現解析	51
III-4-9. AZF1 および AZF2 とゲノム DNA の相互作用の解析	52
III-4-10. SAUR ファミリーの分子系統解析	52
III-4-11. SAUR ファミリー遺伝子の発現パターンの解析	53
III-4-12. AZF1 と AZF2 の機能欠損変異体の解析	53
III-5. 考察	54
第 IV 章 総括	89
引用文献	96
謝辞	107

略語一覽

ABA;	Abscisic acid
ABRE;	ABA-responsive element
AREB;	ABRE-binding protein
AUX/IAA;	Auxin/Indole-3-Acetic Acid
AZF;	Arabidopsis zinc-finger protein
BSA;	Bovine serum albumin
CaMV;	Califlower mosaic virus
cDNA;	complementary DNA
CDS;	Coding sequence
DAPI;	4',6-Diamino-2-phenylindole
dCTP;	deoxycytidine triphosphate
DIC;	Differential interference contrast
DNA;	Deoxyribonucleic acid
DRE;	Dehydration responsive element
DREB;	DRE-binding protein
DTT;	Dithiothreitol
EAR;	ERF-associated amphiphilic repression
EDTA;	Ethylenediaminetetra acetate
ERF;	Ethylene-responsive element binding factor
EtBr;	Ethidium bromide
GFP;	Green fluorescence protein
GM;	Germination medium
GUS;	β -glucuronidase
HEPES;	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
JAZ;	Jasmonate ZIM-domain
MES;	2-Morpholinoethanesulfonic acid
MOPS;	3-Morpholinopropanesulfonic acid
mRNA;	messenger RNA

MS;	Murashige and Skoog
ORF;	Open reading frame
PBS;	Phosphate buffered saline
PCR;	Polymerase chain reaction
PEG;	Polyethylene glycol
RI;	Radioisotope
RNA;	Ribonucleic acid
rRNA;	ribosomal RNA
RT-PCR;	Reverse transcription PCR
SAUR;	Small auxin-up RNA
SDS;	Sodium dodecyl sulfate
sGFP;	synthetic GFP
STZ;	Salt tolerance zinc finger
T-DNA;	Transfer DNA
Tris;	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
ZAT;	Zinc finger of Arabidopsis

第1章 序論

近年、発展途上国を中心に人口が著しく増加している。世界の人口は、2011 年には 70 億人、2100 年には 80-90 億人に達すると推定されている (John Bongaarts and Steven Sinding, 2011)。増え続ける人口を支えるために、より多くの食料を生産することが求められるが、地球規模での気温の上昇は、水資源の枯渇などの様々な環境の劣化を生じている (Godfray et al., 2010)。近年の地球規模での気温の上昇により、世界の主要作物であるトウモロコシとコムギの生産量は減少している (Lobell et al., 2011)。これまでは、農地の拡大や単位面積あたりの収量を増加させるための技術革新により、食料の増産に対応してきた。しかし、近年の地球規模での温暖化や人間の活動が生み出す要因で、作物の栽培に有用な有良土壌の面積は減少しており、乾燥や高塩類、重金属の集積などによる不良土壌は、全陸地面積の 70%に達すると推定されている。したがって、半不良環境でも生育する作物の開発は、食料の安定供給と地球環境の保全の両面において非常に重要な課題である。

植物は、移動の自由を持たないため、環境の影響を直接に受けて生育する。植物の生育に影響を及ぼす要因としては、温度 (低温、高温)、乾燥、高塩濃度、重金属、光、微生物や害虫などによる環境ストレスが挙げられる。温度や乾燥、高塩濃度などの環境ストレスは、植物の成長や発達を阻害して、作物の生産量を減少させる。植物は、細胞や組織レベルで多様な分子種による生理反応を制御して、乾燥や高塩濃度などの環境ストレスを克服する。植物の環境ストレス応答には、多数の遺伝子発現の変化を伴うことが明らかにされている (Thomashow, 1999、Zhu, 2002、Bartels and Sunkner, 2005、Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006)。

環境ストレス応答性遺伝子は、機能遺伝子と制御遺伝子に分類される。これまでに、植物の環境ストレス耐性の獲得に関与する機能遺伝子を導入した遺伝子組換え植物が作出されている (Holmberg and Bülow, 1998、Taji et al., 2002)。一方、転写因子等をコードする制御遺伝子を導入して、多数の機能遺伝子の発現を同時に制御することで、環境ストレス耐性作物を開発しようとする研究が進められている (Vinocur and

Altman, 2005)。これまでの研究から、植物に環境ストレス耐性を付与するためには、植物のストレス応答におけるシグナル経路で、特定の機能を持つ制御因子を解明することが重要であると考えられる。

制御因子の一つである転写因子は、標的遺伝子のプロモーター中にある特異的なシス配列を認識して結合することで、それらの遺伝子の転写を調節する(Thomashow, 1999、Chinnusamy et al., 2004、Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006)。これまでに、DREB、ERF、zinc-finger、WRKY、MYB/MYC、bZIP などが、高等植物の環境ストレス誘導性の転写因子ファミリーとして報告されている(Nakashima et al., 2009)。これらの転写因子は、転写活性化因子、および転写抑制因子として機能することで、環境ストレス応答性遺伝子群の発現を正または負に制御することが示されている(Chen et al., 2002、Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006)。

DREB1 と DREB2 は、AP2/ERF 型の転写因子であり、DRE のコア配列 (A/GCCGAC) を認識して結合し、下流遺伝子の転写を活性化することが示されている (Stockinger et al., 1997、Liu et al., 1998)。DREB1A 遺伝子は主に低温ストレスで誘導されるが、DREB2A 遺伝子は、主に乾燥や塩ストレスで誘導される。これらの転写因子は、植物の低温、乾燥、塩ストレスに対する耐性の獲得に関与している。AREB は bZIP 型の転写因子であり、ABA 応答性のシスエレメントである ABRE 配列 (PyACGTGG/TC) に結合して、下流遺伝子の転写を活性化することが示されている (Choi et al., 2000、Uno et al., 2000、Fujita et al., 2005)。AREB 遺伝子は、乾燥や塩ストレス、アブシシン酸 (ABA) で誘導され、植物の乾燥、塩ストレス耐性の獲得に関与している。ERF ファミリーは、エチレン応答性エレメントである GCC-box に結合する転写因子群である。シロイヌナズナの AtERF3、AtERF4、AtERF7、AtERF10、AtERF11、AtERF12 は、転写抑制因子として機能することが報告されている (Ohta et al., 2001、Yang et al., 2005)。これらの転写抑制因子の中で、AtERF7 は、植物の乾燥ストレス応答の制御に関与すると考えられている (Song et al., 2005)。ペチュニアの ZPT2 ファミリーは、DNA 結合性を持つ C2H2 型 zinc-finger タンパク質群である (Takatsuji et al., 1999)。ZPT2-3 (EPF2-7) は、乾燥、低温ストレス下で機能する転写

抑制因子であると考えられている (Sugano et al., 2003)。

転写抑制因子として機能する ERF は、タバコの NtERF3 のドメイン解析の結果、C 末端領域に転写抑制に必要な L/FDLNL/F(X)P 配列を持つことが示された (Ohta et al., 2001)。この配列は、EAR モチーフと命名され、シロイヌナズナやペチュニアの多くの C2H2 型 zinc-finger タンパク質に保存されていることが報告された。ERF や C2H2 型 zinc-finger タンパク質の他に、オーキシン応答性遺伝子の転写を抑制する AUX/IAA や、ジャスモン酸応答性遺伝子の転写を抑制する JAZ が、転写抑制因子として報告されている (Tiwari et al., 2004, Chini et al., 2007)。AUX/IAA および JAZ は、EAR モチーフを介して Groucho/Tup1 型の抑制補体である TOPLESS と相互作用することが示されている (Szemenyei et al., 2008, Pauwels et al., 2010)。これらの報告により、EAR モチーフを介した転写抑制機能が明らかになってきた。

ペチュニアやシロイヌナズナにおいて、EAR モチーフを持つ多数の C2H2 型 zinc-finger タンパク質が同定されており、これらのタンパク質は、転写抑制因子であると考えられる (Ohta et al., 2001)。C2H2 型 zinc-finger モチーフは、アフリカツメガエルの 5S リボソーム RNA の転写因子 TFIIIA に存在する DNA 結合モチーフとして最初に同定され、解析が進められた (Miller and Klug, 1985, Pavletich and Pabo, 1991, Pabo et al., 2001)。植物の C2H2 型 zinc-finger タンパク質としては、DNA 結合タンパク質である ZPT2-1 (EPF1) が、ペチュニアから単離された (Takatsuji et al., 1992)。動物や植物を含めて、真核生物の C2H2 型 zinc-finger タンパク質は、高度に保存された DNA 結合モチーフ (CX₂₋₄CX₃FX₅LX₂HX₃₋₅H 配列) を持っている。配列内のそれぞれ 2 個のシステイン残基とヒスチジン残基は、亜鉛イオンに配位結合して四面体型構造を形成する。この四面体構造により、DNA 結合モチーフは ββα 折りたたみ構造を形成することが示されている (Pabo et al., 2001)。C2H2 型の zinc-finger タンパク質は、この α ヘリックスを DNA の主溝に提示することで、配列特異的に DNA に結合することが可能である。コンピュータによる解析の結果、シロイヌナズナには 176 個の C2H2 型 zinc-finger タンパク質が存在することが示されている (Englbrecht et al., 2004)。シロイヌナズナの 176 個の zinc-finger タンパク質のうち、33 個は真核生物に保存されて

いるが、残りの 143 個は植物に固有であると考えられている。動物や酵母の C2H2 型 zinc-finger タンパク質は、連続した多数の zinc-finger モチーフを持っており、それらのモチーフは、H-C リンクと呼ばれる 6-8 個の保存されたアミノ酸配列によって隔てられている (Klug and Schwabe, 1995)。一方、植物の C2H2 型 zinc-finger タンパク質が持つ複数の zinc-finger モチーフは、長いスペーサー配列により隔てられている (Takatsuji et al., 1999)。また、植物の C2H2 型 zinc-finger タンパク質の多くは、zinc-finger モチーフ内の α ヘリックス領域に QALGGH という植物に固有なアミノ酸配列を持っている。QALGGH 配列は、C2H2 型 zinc-finger タンパク質と DNA の結合に必須であり、植物の C2H2 型 zinc-finger タンパク質は、植物に固有な DNA の認識様式を持つことが示唆されている (Takatsuji et al., 1999)。

ペチュニアでは、ZPT2-1 に相同性の高い 13 個の C2H2 型 zinc-finger タンパク質が同定されており、これらの ZPT2 ファミリータンパク質は、すべて 2 個の zinc-finger モチーフを持っている (Takatsuji et al., 1999)。ZPT2 に相同性の高い C2H2 型 zinc-finger タンパク質としては、コムギの WZF1 (Sakamoto et al., 1993)、シロイヌナズナの AZF/ZAT (Lippuner et al., 1996、Meissner and Michael, 1997)、エンドウの Pszf1 (Michael et al., 1996)、アルファルファの Mszpt2-1 (Frugier et al., 2000)、ダイズの SCOF-1 (Kim et al., 2001) などが同定されている。これらのタンパク質は、すべて EAR モチーフを保存しており、転写抑制因子として機能していると考えられる (Ohta et al., 2001)。

シロイヌナズナの C2H2 型 zinc-finger 遺伝子である *STZ/ZAT10* は、酵母のカルシニューリン遺伝子の欠損株が示す高塩感受性を相補する因子として単離された (Lippuner et al., 1996)。*ZAT10* 遺伝子を導入した酵母株が、野生型の酵母株に比べて耐塩性を示したことから、*ZAT10* はシロイヌナズナの塩ストレス応答に関与すると考えられた。*ZAT10* 遺伝子は、シロイヌナズナにおいて、乾燥、塩、低温ストレス、および ABA で誘導されることが示され、植物のストレス応答において重要な因子として認識されている (Sakamoto et al., 2000、Gong et al., 2001、Lee et al., 2002)。また、*ZAT10* 遺伝子を構成的に発現した植物は、植物体の矮化と、乾燥、塩、浸透圧ストレ

スに対する耐性を示すことが報告されている (Sakamoto et al., 2004, Mittler et al., 2006)。坂本ら (2000) は、ホモロジークローニングにより *ZAT10* 遺伝子に相同性の高い *AZF1* と *AZF2* および *AZF3* 遺伝子を同定した。これら 4 個の zinc-finger タンパク質は、ペチュニア由来の EP2 配列に結合して、転写抑制因子として機能することが示されている (Sakamoto et al., 2004)。EP2 配列は、ペチュニアの *ZPT2-1* が結合する EP1S 配列 (TTGACAGTGTCAC) を 2 個連続してつないだ人工的な配列である。*AZF* と *ZAT10* は、EP2 配列中の 2 個の連続した A(G/C) 配列を認識すると考えられている。これらの報告から、*ZAT10* は乾燥、塩、浸透圧ストレス下において、下流遺伝子の発現を抑制することで、植物の成長制御、およびストレス耐性の獲得機構に関与すると考えられている (Sakamoto et al., 2004)。

シロイヌナズナの *ZAT6* と *ZAT8* は、*AZF* と *ZAT10* 遺伝子に相同性の高い遺伝子である (Englbrecht et al., 2004)。*ZAT6* 遺伝子は、低温、塩、浸透圧ストレスにより誘導されることが示されている (Vogel et al., 2005, Mito et al., 2011)。また、*ZAT6* 遺伝子は、根の形態形成の制御と植物体における無機リン酸の恒常性の維持に関与することが報告されている (Devaiah et al., 2007)。他方、*ZAT8* 遺伝子に関する研究報告は、現段階で得られていない。

本研究では、シロイヌナズナの C2H2 型 zinc-finger 遺伝子である *AZF1*、*AZF2*、*AZF3*、*ZAT6*、*ZAT8*、*ZAT10* に注目して、これらの遺伝子の環境ストレス下における転写応答を比較解析した。さらに、*AZF1* と *AZF2* の転写抑制因子としての機能の重複に着目して、塩、浸透圧ストレス下の植物における *AZF1* と *AZF2* の機能を解析した。

第 II 章. シロイヌナズナの STZ ファミリー遺伝子 (*AZF1*、*AZF2*、*AZF3*、*ZAT6*、*ZAT8*、*STZ/ZAT10*) の比較解析

II-1. 序論

Englbrechtら (2004) は、相同性解析により、シロイヌナズナのゲノムに 176 個の zinc-finger タンパク質がコードされていることを見い出した。これら 176 個の zinc-finger タンパク質のうち、33 個が他の真核生物に保存されているのに対して、残りの 143 個は植物に特異的な zinc-finger タンパク質であった。これらの植物に特異的な zinc-finger タンパク質は、1 個、または長いスペーサーにより分断された 2-5 個の zinc-finger モチーフを持っており、グループ C に分類された。グループ C は、亜鉛イオンと配位結合を形成する 2 個のヒスチジン残基間のアミノ酸数により、さらに 3 つのサブグループ (C1、C2、C3) に分類された。サブグループ C1 に属するタンパク質の多くは、2 個のヒスチジン残基が 3 個のアミノ酸により分離した HX₃H 型の zinc-finger モチーフを保存していた。サブグループ C1 には 77 種類のタンパク質が含まれており、その中で、zinc-finger モチーフ内に植物に固有な QALGGH 配列を保存する 64 種類のタンパク質群を C1 ファミリーと命名した。C1 ファミリータンパク質は 1-5 個の zinc-finger モチーフを持ち、その数に対応して、それぞれ 5 個のサブクラス (C1-1i、C1-2i、C1-3i、C1-4i、C1-5i) に分類された。

ZAT10 は、浸透圧や塩ストレス下において転写抑制因子として機能して、植物の成長制御とストレス耐性の付与に関与すると考えられている (Sakamoto et al., 2004、Mittler et al., 2006)。一方、*CaMV35S* プロモーターの制御下で *AZF1*、*AZF2*、*AZF3* を過剰発現した形質転換植物の作出は非常に困難であることが報告されており、これらの遺伝子の機能獲得型の植物を用いた解析は行われていない (Sakamoto et al., 2004)。シロイヌナズナの STZ ファミリーには、*AZF1*、*AZF2*、*AZF3* に加えて、*ZAT6* と *ZAT8* が含まれる (Englbrecht et al., 2004、Meissner et al., 1997)。*ZAT6* の環境ストレスによる誘導性は、断片的に報告されているが (Vogel et al., 2005、Mito et al., 2011)、STZ ファミリー遺伝子の環境ストレス誘導性や植物体における発現部位の比

較解析は行われていない。

II-2. 目的

本章では、STZファミリーに属する6 個の遺伝子の性質を比較解析することを目的とした。はじめに、植物界におけるSTZファミリー遺伝子の進化的関係を推定するために、種々の植物に保存されたC1ファミリー型のzinc-fingerタンパク質の配列を用いて分子系統解析を行った。STZファミリータンパク質は、転写抑制因子であると考えられるため、これらのタンパク質の細胞内局在を解析した。また、STZファミリー遺伝子の、乾燥、塩、低温、高温ストレスによる誘導性、ならびに植物体における発現部位を比較解析した。STZファミリー遺伝子を高発現した形質転換植物の作出を行った。得られた形質転換体の遺伝子発現解析を行うことで、AZF1とAZF2およびZAT8の機能を比較した。

II-3. 材料と方法

II-3-1. 分子系統解析

Phytozome (<http://www.phytozome.net/index.php>)を用いて、STZ と相同性の高いアミノ酸配列をもつシロイヌナズナの遺伝子を 18 種類抽出した。これら、18 種類の遺伝子から予測されるアミノ酸配列を、シロイヌナズナのデータベース TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) から入手した。これらの配列を Clustal X プログラム (Ver. 2.0)を用いてアライメントすることで、タンパク質間に保存された配列を検討した。遺伝子間で高度に保存された L-Box と 2 個の C2H2 型 zinc-finger モチーフ、ならびに DLN-Box の配列を基に、MEGA4 プログラム (<http://www.megasoftware.net/>) を使用して近隣結合法により解析することで、これらの遺伝子の分子系統樹を作成した。系統樹の分枝の信頼性は、ブートストラップ検定法(1000 反復)により評価した。

次に、サブクラス C1 に属しており、STZ ファミリーに相同性の高い被子植物のタンパク質のアミノ酸配列を Phytozome から抽出した。被子植物以外の、ヒメツリガネゴケ

(*Physcomitrella patens*; Pp)、イヌカタヒバ(*Selaginella moellendorffii*; Sm)におけるオルソログの配列は、SALAD DATABASE (<http://salad.dna.affrc.go.jp/salad/>) から抽出した。カナダトウヒ(*Picea glauca*)のオルソログの配列には、NCBI-BLAST データベース (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) から入手した cDNA の配列を用いた。このように収集した STZ ファミリータンパク質に相同性の高い C1 ファミリー型の zinc-finger タンパク質のアミノ酸配列を全てアライメントした。整列した L-Box、C2H2 型 zinc-finger モチーフ、DLN-Box の領域を用いて、MEGA4 プログラムにより分子系統解析を行った。系統樹は、シロイヌナズナの 18 個の C1-2i 型 zinc-finger タンパク質の配列を用いて作成した。一方、他の植物種の C1-2i 型 zinc-finger タンパク質の配列は、各分枝においてシロイヌナズナの zinc-finger タンパク質に相同性の高いものをそれぞれ代表として用いた。C1-2i 型以外の配列に関しては、STZ ファミリータンパク質に相同性の高いタンパク質配列を代表とした。

II-3-2. 植物材料と生育条件

実験には、野生型株としてシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Ecotype Columbia)を用いた。シロイヌナズナの無菌培養には、GM または GMK、GMH 寒天培地を用いた。プレート内の培地に種子を播種して、発芽を同調させるために暗所に 2 日間、4 °C で静置した。プレートを植物培養器内に移して、22 °C、16 時間の明($40 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$)、8 時間の暗条件で生育させた。種子は、表面を滅菌処理して播種した。具体的には、乾燥種子を 70% エタノールにより洗浄後、種子滅菌液[1% 次亜塩素酸ナトリウム、0.02% Triton X-100]で 5 分間攪拌して、滅菌水で 5 回洗浄した。

GM 寒天培地の調製では、4.7 g/l ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類(日本製薬)、30 g/l スクロース(和光純薬工業)、112 $\mu\text{g}/\text{l}$ B5 ビタミン(GAMBORG'S VITAMIN SOLUTION 1000x; SIGMA)、2.0 g/l MES(和光純薬工業)、8.0 g/l Bacto Agar (Becton Dickinson and company)を混合した水溶液に水酸化カリウムを加えて、pH 5.7 に調整した。GMK 寒天培地では、GM 寒天培地に 30 mg/ml になるように硫酸カ

ナマイシン(明治製菓)を加えた。GMH 寒天培地では、GM 寒天培地に 25 mg/ml になるようにハイグロマイシン(SIGMA)を加えた。

鉢植えの植物は、以下のように生育させた。野生型株の種子を 4 °C、暗所で 12 時間静置した後、培養土に播種した。播種後、明期 12 時間($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、暗期 12 時間の明暗条件で生育させた。

II-3-3. 植物形質転換用ベクター

植物内における GUS の発現には pGK-GUS を、プロトプラスト内における GFP の発現には pGK-EI2-35S Ω -CsGFP を用いた(Qin et al., 2008)。いずれのベクターも pGreen0029 を改変しており、植物におけるカナマイシン耐性遺伝子を有している(Hellens et al., 2000)。これらのベクターは、理化学研究所の藤田美紀博士から分与されたものである。GVG 転写誘導系を用いた DEX 誘導性形質転換植物の作出には、pTA7002 を使用した。

II-3-4. 組換え DNA の作製

表 1 に示したプライマーを用いて、シロイヌナズナのゲノム DNA を鋳型として PCR 反応を行い、各遺伝子のプロモーター断片、および CDS 断片を増幅した。サーマルサイクラー装置は、GeneAmp PCR System 2400(Applied Biosystems)を用いた。反応液の組成は、50 ng 鋳型 DNA、1×緩衝液、20 μM dNTP 混合液、0.2 μM プライマー、2 unit PrimeSTAR DNA polymerase(TaKaRa)/総量 50 μl とした。反応条件は、98 °C で 3 分間、(98 °C で 10 秒間、55 °C で 20 秒間、72 °C で 1 分間/1 k 塩基)を 30 回、72 °C で 5 分間とした。増幅断片を制限酵素で処理して、Rapid Ligation Kit(Roche)を用いてベクターに導入した。

本章で用いたプラスミドの構築、および DNA 断片の由来は、以下に示す通りである。AZF/ZAT は、AZF1、AZF2、AZF3、ZAT6、ZAT8、ZAT10 のいずれかを意味する。

pGK-35S-(AZF/ZAT)-sGFP

プライマー対 AZF-35S:GFP-FW と RV、および ZAT-35S:GFP-FW と RV を用いて、

ゲノム DNA を鋳型として PCR 反応を行うことで、各遺伝子の CDS 断片を増幅した。得られた PCR 断片を *Xba*I と *Sma*I で処理して、pGK-EI2-35SΩ-CsGFP の同じ部位にそれぞれ挿入した。

pGK-(AZF/ZAT)pro:GUS

プライマー対 AZFp-FW と RV、および ZATp-FW と RV を用いて、ゲノム DNA を鋳型として PCR 反応を行うことで、各遺伝子のプロモーター断片を増幅した。得られた PCR 断片を *Kpn*I と *Sma*I で処理して、pGK-GUS の同じ部位にそれぞれ挿入した。プロモーター断片の配列には、TAIR (The Arabidopsis Information Resource; <http://www.arabidopsis.org/index.jsp>) に登録されている各遺伝子の翻訳開始点より上流の塩基対 (AZF1 では 1.6 k、AZF2 では 2.2 k、AZF3 では 1.3 k、ZAT6 では 2.2 k、ZAT8 では 2.0 k、ZAT10 では 2.6 k 塩基対) を使用した。

pTA7002-(AZF/ZAT)

プライマー対 AZF-D-FW と RV、および ZAT-D-FW と RV を用いて、ゲノム DNA を鋳型として PCR 反応を行うことで、各遺伝子の CDS 断片を増幅した。得られた PCR 断片を *Xba*I で処理して、pTA7002 の同じ部位にそれぞれ挿入した。

II-3-5. GFP 蛍光による細胞内局在の解析

II-3-5-1. 葉肉細胞のプロトプラスト化と PEG 法によるプラスミドの導入

シロイヌナズナの葉肉細胞のプロトプラスト化は、Yoo et al. (2007) の方法を改良して行った。鉢植えて 6 週間生育したシロイヌナズナのロゼット葉を 0.5–1 mm 片に刻んだ。得られた葉片をプロトプラスト単離用酵素液 [0.4 M マンニトール (和光純薬工業)、20 mM 塩化カリウム、20 mM MES-KOH (pH 5.7)、1.5% セルラーゼ R10 (ヤクルト)、0.4% マセロザイム R10 (ヤクルト)、0.1% BSA (SIGMA)、10 mM 塩化カルシウム (和光純薬工業)] に加えた。この溶液を減圧下で 15 分間静置した後、22 °C、暗所に 3.5 時間静置した。反応液に等量の W5 溶液 [154 mM 塩化ナトリウム、125 mM 塩化カルシウム、5 mM 塩化カリウム、2 mM MES-KOH (pH 5.7)] を加えて、溶

液をメッシュでろ過した。ろ液を室温、100xg で 2 分間遠心分離して、プロトプラストを沈降させた。上清を除き、得られた沈降物に 10 ml W5 溶液を加えて、この溶液を室温で 30 分間静置した。上清を除き、プロトプラストの濃度が、約 1.2×10^5 個/ml になるように MMg 溶液[0.4 M マンニトール、15 mM 塩化マグネシウム(和光純薬工業)、4 mM MES-KOH(pH 5.7)]を加えた。7.5 μ g pGK-35S-sGFP、pGK-35S-AZF-sGFP、pGK-35S-ZAT-sGFP をそれぞれ含む 15 μ l DNA 溶液に、100 μ l プロトプラスト液、ならびに 110 μ l PEG 溶液[40% PEG4000(Fluka)、100 mM 硝酸ナトリウム(和光純薬工業)、0.2 M マンニトール]を加えた溶液を、穏やかに混合して、室温で 20 分間静置した。反応液に 440 μ l W5 溶液を添加して穏やかに混合した溶液を、室温、100xg で 2 分間遠心分離してプロトプラストを沈降させた。上清を除き、得られたプロトプラスト液と 500 μ l WI 溶液[0.5 M マンニトール、4 mM MES-KOH(pH 5.7)、20 mM 塩化カリウム]を混合した溶液を、暗条件下で約 16 時間静置した。得られたプロトプラスト液をプレパラートに封入して、GFP 蛍光の観察に供した。

II-3-5-2. 共焦点顕微鏡による蛍光の検出

GFP、DAPI の蛍光を、共焦点顕微鏡 LSM5 PASCAL (Carl Zeiss) を用いて検出した。各蛍光の励起および検出に用いた波長は、それぞれ GFP では、488 nm (励起) /505-530 nm (検出)、DAPI では 405 nm/420-480 nm とした。

II-3-6. 形質転換シロイヌナズナの作出

各形質転換用プラスミドを、エレクトロポレーション法により *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 株に導入した。Bechtold らの方法に改変を加えた減圧浸潤法を用いて、In planta 形質転換法により形質転換アグロバクテリウムを植物体に感染させた(Bechtold and Pelletier, 1998)。鉢植えで生育させた野生型株の主軸を摘心して側軸を発育させた。結実した鞘を切除した植物を感染に用いた。各形質転換用プラスミドを導入した *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 株を YEP 培地[10 g/l Bacto Peptone(BD)、10 g/l Yeast Extract(BD)、5 g/l 塩化ナトリウム、pH 7.0(NaOH)]に

植菌して、28 °Cで約1 日間、OD₆₀₀が1.5 前後になるまで培養した。YEP 培地には、終濃度で50 mg/l のカナマイシン、および100 mg/l のゲンタマイシン(SIGMA)を加えた。その後、集菌して、OD₆₀₀ が0.8 になるように浸潤用懸濁培地[1/2xMS 塩、1/2xGanborg B5 ビタミン、5% スクロース、0.044 μM N6-ベンジルアデニン、0.02% Silwet L-77]に懸濁した。500 ml ビーカーに約250 ml のアグロバクテリウム懸濁液を分取して、植物の地上部を懸濁液に浸した。このビーカーを真空デシケーターに入れて、減圧下に10 分間静置した。植物をアグロバクテリウム懸濁液から取り出し、蒸留水で洗浄した。感染後の植物を数週間生育させた後、T1 種子を収穫した。T1 種子を30 mg/l カナマイシン(または、50 mg/l ハイグロマイシン)と200 mg/l クラフォラン(サノフィ・アベンティス)を含む GM 寒天培地上に播種して形質転換シロイヌナズナ(T1)を選抜した。選抜した植物体(T1)の自家受粉により得られる T2 種子を解析に用いた。

II-3-7. RNA ゲルブロット解析用の植物の調製

植物体の環境ストレス処理には、GM 寒天培地上で3 週間育てた野生型株を用いた。寒天培地から引き抜いた植物体を、植物体の根が浸る程度の水を入れたプレートに移して水処理した。水処理を24 時間行った後、プレートの水を250 mM 塩化ナトリウム水溶液、または100 μM ABA(SIGMA)水溶液で置換することで、植物体の塩ストレスおよびABA 処理を行った。乾燥処理は、水処理後のプレートから水を除くことで行った。低温および高温処理は、寒天培地上で生育した植物体を、プレートごと4 °Cおよび37 °Cに設定した人工気象器 LH-1-120.S.S(日本医化器械製作所)に静置して行った。各種ストレス処理を開始してから0、10、20、40 分後、ならびに2、5、10、24 時間後の植物体をそれぞれ液体窒素で凍結させて検体とした。検体には約100 mg 分の植物体を用いた。

DEXによる処理は、GMH 寒天培地上で3 週間育てた植物体を上述と同様の方法で水処理した後、プレートの水を10 μM DEX(SIGMA)に置換することで行った。DEX 処理開始後24 時間の植物体を液体窒素で凍結させて検体とした。

上記の環境ストレス、ABA、DEX 処理において、無処理の植物体を調製して検体に加えた。

II-3-8. RNA の調製

凍結した植物体を Shake Master BMS-12(バイオメディカルサイエンス)で破碎した後、1 ml RNAiso(TaKaRa)を加えて攪拌した。破碎液を室温、25000xg で 10 分間遠心分離して、RNAを含む上清(水相)を回収した。上清に 200 μ l クロロホルムを加えて攪拌した。得られた懸濁液を 4 °C、25000xg で 15 分間遠心分離した。RNAを含む上清を回収して、200 μ l High Salt 溶液[0.8 M クエン酸ナトリウム(和光純薬工業)、1.2 M 塩化ナトリウム]と 200 μ l イソプロパノールの混合液に加えて十分に攪拌した。混合液を 4 °C、25000xg で 10 分間遠心分離して、析出した RNA を 100 μ l MilliQ 水に溶解した。この水溶液に 250 μ l エタノール溶液[エタノール/3 M 酢酸ナトリウム pH 5.2(氷酢酸)= 20:1]を加えて攪拌し、4 °C、25000xg で 20 分間遠心分離して RNA を析出させた。回収した RNA を 70% エタノールで洗浄した後、30 μ l MilliQ 水に溶解して解析に用いた。

II-3-9. RNA ゲルブロット解析

RNA ゲルブロット解析には、検体から調製した全 RNA を用いた。20 μ g RNA を 20 μ l RNA 染料溶液[0.1% BPB、20% ホルムアルデヒド(SIGMA)、60% ホルムアミド(関東化学)、33 mg/l EtBr、20 mM MOPS(DOJINDO)、8 mM 酢酸ナトリウム、1 mM EDTA(和光純薬工業)]に溶解した。この溶液を、65 °C で 15 分間熱処理した後、5 分間氷冷した。得られた RNA 溶液を 1% RNA 用アガロースゲル[1% アガロース(和光純薬工業)、5% ホルムアルデヒド、20 mM MOPS、8 mM 酢酸ナトリウム、1 mM EDTA]を用いて、80 V で 2.5 時間電気泳動した。ブロッティング台に乗せたゲルの上にナイロン膜 Biotrans B(PALL)、濾紙、ペーパータオル、ガラス板、重しをこの順に重ねて、室温で一晩静置することで RNA をナイロン膜に転写した。RNA を転写したナイロン膜は、Vacubaker AB-1890(ATTO)を用いて 2 時間、減圧乾燥した後、ハ

イブリダイゼーションに用いた。

DNA 断片の RI 標識には、BcaBEST Labeling Kit (TaKaRa) および、スピンカラム illusta MicroSpin S-200 HR columns (GE ヘルスケア) を用いた。標識反応液の組成は、約 50 ng 鋳型 DNA 断片、2 μ l ランダムプライマー、2.5 μ l dNTP 混合液、1×緩衝液、5 μ l [α -³²P] dCTP (GE ヘルスケア)、2 unit Bca DNA polymerase/総量 25 μ l とした。反応は、55°C で 10 分間静置とした。

II-3-10. 植物体の組織染色

II-3-4 で作製した pGK-(AZF/ZAT)pro:GUS を導入した形質転換シロイヌナズナを GUS 染色に用いた。GMK 寒天培地上で 2 週間生育したシロイヌナズナを培地から引き抜いて、プレートの上に 2 時間静置して乾燥させた。乾燥処理をした植物体を GUS 染色液 [50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)、10 mM EDTA、1 mM フェリシアンカリウム (和光純薬工業)、1 mM フェロシアン化カリウム (和光純薬工業)、0.4 mg/ml X-Gluc (Rose Scientific)] に浸した。植物体を真空デシケーター内に入れて、減圧下で 20 分間静置することで染色液を植物体に浸透させた。植物体の染色は、37 °C の暗所で、数時間から 24 時間行った。染色液を 70% エタノールで置換し、組織の固定、葉緑体の脱色を行った後、GUS 染色を観察した。観察には、実体顕微鏡 MZ APO (Leica) を使用した。植物体の画像は、デジタル撮影装置 AxioCam Hrc (Carl Zeiss) により取得した。無処理区では、培地から引き抜いた植物体を、そのまま GUS 染色に用いた。

II-3-11. マイクロアレイ解析

II-3-11-1. マイクロアレイ解析用の植物の調製

pTA7002:(AZF/ZAT) を導入した形質転換植物 (T2) とベクターのみを導入した対照の種子を GMH 寒天培地に播種して、2 週間生育させた。培地から引き抜いた植物体を、プレート内で 24 時間水処理した。プレートの水を 10 μ M DEX 水溶液に置換して、植物を 24 時間 DEX 処理した。植物を液体窒素で凍結させて検体とした。検体に

は約 100 mg 分の植物体を用いた。

II-3-11-2. 標識化プローブの合成

1 試料あたり 800 ng の全 RNA を使用した。各試料の全 RNA を 400 ng ずつに分割して、各 RNA を Cy3 と Cy5 で標識した。反応に用いた試薬は、すべて Agilent 社製のものを使用した。全 RNA に T7 promoter primer を加えて、65 °C で 10 分間熱変性をした後、5 分間氷冷した。これに、cDNA 合成 Master Mix (5xFirst Strand buffer 2.0 μ l、0.1 M DTT 1.0 μ l、10 mM dNTP 混合液 0.5 μ l、MMLV-RT 0.5 μ l、RNase Inhibitor 0.25 μ l) を加えて、40 °C で 2 時間処理した。その後、65 °C で 15 分間処理して反応を停止させた後、氷中で 5 分間急冷した。それぞれの反応液に 10 mM Cyanine3 CTP (cytosine triphosphate)、または、10 mM Cyanine5 CTP を 1.2 μ l ずつ加えた。この反応液に Transcription Mix (Nuclease-free water 7.65 μ l、4xTranscription buffer 10 μ l、0.1 M DTT 3.0 μ l、NTP Mix 4.0 μ l、50% PEG 3.2 μ l、RNase Inhibitor 0.25 μ l、Inorganic Pyrophosphatase 0.3 μ l、T7 RNA Polymerase 0.4 μ l) を加えて激しく攪拌した。反応液を遮光して、40 °C で 2 時間反応させた。これに 60 μ l Nuclease-free water、350 μ l RLT-buffer、250 μ l エタノールを加えて混合した。この溶液を 2 ml のコレクションチューブを付けた RNeasy mini カラム (QIAGEN) に入れて、4 °C、13,000 rpm で 30 秒間遠心した。カラムを新しいコレクションチューブに移して、500 μ l の RPE-Buffer を加えて、4 °C、13,000 rpm で 30 秒間遠心した。この作業をもう一度繰り返して、カラムを 1.5 ml のコレクションチューブに移した。カラムに 30 μ l Nuclease-free water を加えて、1 分間静置した後、4 °C、13,000 rpm で 30 秒間遠心して、cRNA を回収した。得られた溶液の吸光度を測定してプローブの濃度を決定した。

II-3-11-3. ハイブリダイゼーション

下記の操作では、Agilent 社製の試薬および機器を使用した。Fragmentation 溶液 (Cy3 ラベル化 cRNA 0.825 μ g、Cy5 ラベル化 cRNA 0.825 μ g、10xBlocking Agent

11 μ l、25xFragmentation buffer 2.2 μ l を Nuclease free water で 55 μ l にメスアップしたもの)を調製して、激しく攪拌することでターゲットを断片化した。この溶液を遮光条件下、60 °C で 30 分間処理した。これに、55 μ l 2xGE ハイブリダイゼーションバッファーを加えて十分に攪拌した。溶液を室温下、15,000 rpm で 5 分間遠心した。上清 100 μ l をマイクロアレイスライドに充填して、65 °C で約 17 時間、ハイブリダイゼーションを行った。スライドを洗浄バッファー1 (6xSSC、0.005% TritonX-102) で 10 分間洗浄した。さらに、低温下 (4 °C) で、スライドを洗浄バッファー2 (0.1xSSC、0.005% TritonX-102) で 5 分間洗浄した。フィルターエアガンを用いて窒素ガスを吹き付けることでスライドを乾燥させた。乾燥したスライドを、アジレントマイクロアレイスキャナスライドのフォルダに載せてスキャンした。スポットを数値化して、データ解析を行った。

II-4. 結果

II-4-1. STZ ファミリータンパク質の一次構造と系統解析

シロイヌナズナには、STZファミリーを含めて20 種類のC1-2i型zinc-fingerタンパク質が含まれており、その中の18 種類は、2 個のzinc-fingerモチーフ、L-Box、DLN-box (EARモチーフ) の領域を高度に保存していた(図1A)。C1-2i型zinc-fingerタンパク質の保存領域のアライメントから分子系統樹を作成した(図1B、C)。STZファミリーを構成する6 個のタンパク質、AZF1、AZF2、AZF3、ZAT6、ZAT8、ZAT10は、サブクラスC1-2iの中で独立したクラスを形成した。さらに、STZファミリーは、AZF1、ZAT8、AZF2から成るサブクラスと、AZF3、ZAT6、ZAT10から成るサブクラスに分類できることが示された(図1C)。

シロイヌナズナのSTZファミリータンパク質の進化的特徴を調べるために、ヒメツリガネゴケ (Pp)、イヌカタヒバ (Sm)、トウヒ (Pi)、イネ (Os)、ソルガム (Sb)、ダイズ (Glyma)、キュウリ (Cucsa)、トウゴマ (Rco)、ミムルス (mgf)、ペチュニア (ZPT)、パパイヤ (Cpa)、ポプラ (POPTR)、シロイヌナズナ (At) において、2 個以上のzinc-fingerモチーフを持つC1ファミリー型のタンパク質の配列を用いて、分子系統樹を

作成した(図2)。系統樹は、大きく3 個のクラス(I、II、III)に分かれた。クラスIとIIIには、2 個の zinc-fingerモチーフを持つタンパク質群が、クラスIIIには、3 個以上の zinc-fingerモチーフを持つタンパク質群が含まれていた。クラスIIは、シロイヌナズナの STZファミリーと、それらに相同性の高い被子植物のタンパク質群から構成された。クラスIIIは、STZファミリー以外のシロイヌナズナのC1-2i型のタンパク質群とそれらに相同性の高い被子植物のオルソログで構成された。クラスIIIには、3 個以上の zinc-fingerモチーフを持つタンパク質群が顕著に含まれていた。クラスIIIには、シロイヌナズナのC1ファミリー型や被子植物のタンパク質群に加えて、ヒメツリガネゴケ、イヌカタヒバ、トウヒのオルソログが含まれていた。

II-4-2. STZ ファミリータンパク質の細胞内局在の解析

STZ ファミリータンパク質の細胞内局在を、GFP 融合タンパク質を用いて観察した。各遺伝子の ORF から終止コドンを除いて、それらの ORF の 3'末端側に GFP を融合した組換え遺伝子(AZF/ZAT-sGFP)を構築した(図 3A)。これらの組換え遺伝子を *CaMV35S* プロモーターの制御下で、シロイヌナズナの葉肉細胞由来のプロトプラストで一過的に発現させた。sGFP 遺伝子のみを *CaMV35S* プロモーターにより一過的に発現させたものを対照とした。対照では GFP 蛍光が細胞全体で観察されたが、全ての STZ ファミリータンパク質と GFP の融合タンパク質の蛍光は核で観察された(図 3B)。

II-4-3. STZ ファミリー遺伝子の乾燥、塩、低温、高温ストレスおよび ABA 処理下における発現の解析

乾燥、塩、低温、高温ストレスと ABA による STZ ファミリー遺伝子の mRNA の蓄積量を RNA ゲルブロット法により解析した(図 4)。AZF1 の mRNA の蓄積量は、塩および乾燥ストレス開始後、20 分から 2 時間で一過的に増加した(図 4A)。ZAT8 は、乾燥、塩、低温、高温ストレス、および ABA などの処理においても、mRNA の蓄積の増加を示さなかった(図 4B)。AZF2 の mRNA の蓄積量は、塩、乾燥ストレスや ABA 処理で経時的に顕著に増加したが、低温や高温ストレスでは誘導されなかった(図 4C)。

AZF3の mRNA の蓄積量は、高温ストレス開始後、20 分から2 時間で一過的に増加した(図 4D)。ZAT6 の mRNA の蓄積量は、乾燥、塩、低温ストレスにより経時的に増加したが、高温ストレスでは、処理開始後 10 分から2 時間にかけて一過的に増加した(図 4E)。ZAT6の mRNA は、ABA 処理で持続的に蓄積した。ZAT10の mRNA は、乾燥や塩ストレス処理の開始後 10 分から持続的に蓄積した(図 4F)。ZAT10 の mRNA の蓄積量は、低温、高温ストレス、ABA 処理で一過的に増加し、蓄積量のピークは、処理開始から、それぞれ2 時間後、1 時間後、20 分後であった。

II-4-4. 乾燥ストレス下における STZ ファミリー遺伝子の組織特異的発現部位の解析

STZ ファミリー遺伝子のプロモーター領域をそれぞれ GUS レポーター遺伝子に連結した組換え遺伝子を植物に導入して得られた植物体を用いて、乾燥ストレス処理した後、GUS 染色した(図 5)。AZF1 のプロモーターの制御下では、乾燥ストレスの有無に関係なく根の伸長領域の上部から成熟領域で染色

が観察されたが、地上部での染色は見られなかった(図 5A)。ZAT8のプロモーターの制御下では、乾燥ストレスの有無に関係なく、明瞭な染色は見られず、子葉や本葉の葉脈でわずかに確認された(図 5B)。AZF2のプロモーターの制御下では、無処理区の根の成熟領域と子葉の葉脈で染色が観察された。また、乾燥ストレス下の AZF2 のプロモーターによる GUS の活性は、本葉で顕著に観察された(図 5C)。AZF3のプロモーターによる制御下では、GUS の染色は観察されなかった(図 5D)。ZAT6のプロモーターの制御下では、無処理区の根の伸長領域の上部から基部の領域、および子葉において強い GUS の染色が観察された。また、乾燥ストレス下における ZAT6 のプロモーターによる GUS の活性は、本葉で顕著に誘導された(図 5E)。ZAT10のプロモーターの制御下では、無処理区の根の伸長領域の上部から基部で GUS の染色が観察された(図 5F)。ZAT10 のプロモーターによる本葉での GUS の活性は、乾燥ストレス下で強く誘導された。

II-4-5. GVG 転写誘導系を用いた STZ ファミリー遺伝子の過剰発現体の作出と、導入遺伝子の発現解析

CaMV35S プロモーターの制御下で *AZF1*、*AZF2* を過剰発現した形質転換植物の作出を試みたが、成功しなかった。そこで、GVG 転写誘導系を用いて *STZ* ファミリー遺伝子をそれぞれ一過的に発現誘導した形質転換植物体の作出を行った。GVG 転写誘導系は、動物のステロイドホルモン受容体の制御系を利用して、植物にグルココルチコイドの誘導体であるデキサメタゾン (DEX) を作用させることで、導入遺伝子の発現を制御する (Aoyama and Chua, 1997)。GVG 転写誘導系は、キメラ転写因子 GAL4-VP16-GR (GVG) と、GAL4 結合配列を持つプロモーターの下流に目的の遺伝子のコード領域を連結した誘導遺伝子から構成される (図 6A)。GVG は、酵母の転写因子 GAL4 の DNA 結合ドメイン、ヘルペスウイルスの転写因子 VP16 の転写活性化ドメイン、およびラットのグルココルチコイド受容体のホルモン結合ドメイン (GR-HBD) を持つ融合タンパク質であり、グルココルチコイドの存在下で、GAL4 結合配列を持つプロモーターからの転写を活性化する。本研究では、GAL4 結合配列を持つプロモーターの下流に *STZ* ファミリー遺伝子の ORF をそれぞれ連結した遺伝子を構築して (図 6A)、シロイヌナズナに導入することで、これらの遺伝子の発現を DEX 処理により誘導する形質転換植物 (*pTA7002:AZF/ZAT*) を作出した。GMH 寒天培地上で 2 週間生育させた形質転換体を DEX 処理した。DEX 処理後の植物体から RNA を抽出して、RNA ゲルブロット法により導入遺伝子の mRNA の蓄積量を解析した。各遺伝子の形質転換植物において、それぞれ 20 ラインの植物体を発現解析に用いた。ベクター (*pTA7002*) のみを導入した対照では、DEX 処理による *STZ* ファミリー遺伝子の発現量は確認されなかった (図 6B-G)。各形質転換植物において DEX 処理で導入遺伝子が強く誘導されたラインは、*AZF1* で 11 個、*AZF2* で 7 個、*AZF3* で 13 個、*ZAT6* で 13 個、*ZAT8* で 12 個、*ZAT10* で 12 個であった。T2 世代の各形質転換植物において、2-3 個のラインを選抜して、表現型の観察や遺伝子発現解析に用いた (図 6B-G)。

II-4-6. *AZF1*、*ZAT8*、*AZF2* の過剰発現体における遺伝子発現パターンの比較解析

AZF1、*ZAT8*、*AZF2* を GVG 転写誘導系の制御下で過剰発現した植物 (*pTA7002:AZF/ZAT*) を用いて、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。DEX

処理後の *pTA7002:AZF1* では、対照に比べて 1076、468 個の遺伝子がそれぞれ mRNA の蓄積量の増加または減少を示した。DEX 処理後の *pTA7002:ZAT8* では 500、196 個、*pTA7002:AZF2* では 1772、1670 個の遺伝子で、mRNA の蓄積量の増加または減少が見られた。*AZF1* または *AZF2* の過剰発現体で mRNA の蓄積量が減少した遺伝子では、151 個が共通であった(図 7A)。同様に *AZF1* と *ZAT8* では、19 個、*AZF2* と *ZAT8* では 17 個が共通であった。

各遺伝子の過剰発現体で、mRNA の蓄積量の減少割合が大きい方から 100 個の遺伝子をそれぞれ抽出した。それら 100 個の遺伝子の乾燥、塩ストレス、ABA 処理に対する発現応答を比較した(図 7B-D、Fujita et al., 2009)。*AZF1* または *AZF2* の過剰発現体で mRNA の蓄積量が減少した遺伝子群には、乾燥、塩ストレスおよび ABA 処理で発現量が減少する多数の遺伝子が含まれていた(図 7B、C)。一方、*ZAT8* の過剰発現体で mRNA の蓄積量が減少した遺伝子は、乾燥、塩ストレスおよび ABA 処理に対して顕著な応答を示さないことが確認された(図 7D)。

II-5. 考察

STZ ファミリー遺伝子は、植物に特徴的な C2H2 型 zinc-finger タンパク質の一次構造を持ち、これらの遺伝子のオルソログは、被子植物に広範に保存されていた(図 1、2)。植物の C2H2 型 zinc-finger タンパク質は、ペチュニアから最初に単離され、1-4 個の zinc-finger モチーフをもつ ZPT 型 zinc-finger タンパク質が報告されている(Kubo et al., 1998) ZPT 型 zinc-finger 遺伝子の中では、2 個の zinc-finger モチーフをコードする ZPT2 型 zinc-finger 遺伝子における研究が進んでいる。ZPT2-2 と ZPT2-3 は、乾燥、低温、傷害などのストレスにより誘導され、ZPT2-3 を過剰発現したペチュニアの植物体は、乾燥ストレス耐性を獲得することが報告されている(van der Krol et al., 1999、Sugano et al., 2003)。ZPT2-3 は転写抑制能を持つことが確認されており、ZPT2-3 の性質はシロイヌナズナの ZAT10 と類似している。分子系統解析の結果、STZ ファミリータンパク質と ZPT2-2、ZPT2-3 はクラス I に属しており(図 2)、これらのタンパク質は同様の機能を持つことが示唆された。

クラス II には、多様な環境ストレスにより発現が誘導される遺伝子として有名な ZAT12 が含まれていた。ZAT12 の過剰発現体や変異体を用いた解析から、ZAT12 は植物の強光、浸透圧、酸化ストレス耐性に関与すると考えられている (Iida et al., 2000, Rizhsky et al., 2004, Davletova et al., 2005, Vogel et al., 2005)。また、ZAT12 に近縁な ZAT7 は、浸透圧や酸化ストレスで誘導される遺伝子であり、植物の塩ストレス耐性への関与が示唆されている (Ciftci-Yilmaz et al., 2007)。被子植物の C1-2i 型の zinc-finger 遺伝子は、STZ ファミリーとそのオルソログから構成されるクラス I と、ZAT12 や ZAT7 が含まれるクラス II に分かれており、これらのグループ間で遺伝子の機能に差異があると考えられた。

また、STZ ファミリータンパク質に相同性の高い一次構造を保存する C1-3i や C1-4i など、3 個以上の zinc-finger モチーフを持つタンパク質群は、クラス III を構成していた。クラス III には、被子植物に加えて、コケ、シダ、裸子植物の zinc-finger タンパク質が含まれていた。コケやシダ植物において、2 個の zinc-finger モチーフをコードする C1-2i 型の遺伝子は確認されていない。さらに、クラミドモナスやボルボックスなどの藻類では、C1 ファミリー型の zinc-finger モチーフをコードする遺伝子が確認されていない。STZ ファミリーに代表される被子植物の C1-2i 型の zinc-finger 遺伝子は、コケやシダ植物の C1 ファミリー型の zinc-finger 遺伝子から進化して、陸上植物に特異的な機能を獲得したと考えられた。ペチュニアの ZPT2 の多くは、花の各器官でそれぞれ発現していることが示されている (Takatsuji et al., 1994)。AZF2 の発現が花で確認され、STZ ファミリー遺伝子の多くが根で発現することを考慮すると (図 5, Sakamoto et al., 2004, Drechsel et al., 2010)、これらの遺伝子は陸上植物に特異的な器官で機能していると考えられる。

STZ ファミリー遺伝子の環境ストレスによる誘導性の解析結果から、AZF2、ZAT6、ZAT10 は植物の環境ストレス応答に深く関与することが示唆された (図 4C、E、F)。分子系統解析の結果から、STZ ファミリー遺伝子は、AZF1、ZAT8、AZF2 と AZF3、ZAT6、ZAT10 の 2 つのグループに分類されることが示されている。後者のグループの遺伝子が、低温や高温ストレスにより顕著に誘導されたのに対して、前者のグルー

プの遺伝子は、温度変化に対してほとんど応答しなかった。*ZAT6*と*ZAT10*は、プロモーター領域に DRE 配列を持っており、DREB1A や DREB2A の下流遺伝子であることが報告されている (Maruyama et al., 2004、Sakuma et al., 2006)。DREB1A は低温ストレス誘導性の遺伝子を、DREB2A は塩や高温ストレス誘導性の遺伝子の発現を制御することが知られている。*AZF3*のプロモーター領域にも DRE 配列が存在することから、後者のグループ遺伝子は、DREB1A や DREB2A の制御下で、植物の高温ストレス応答に関与すると考えられた。一方、*AZF2*は、プロモーター領域に複数の ABRE 配列を持つことから、AREB の制御下で植物の浸透圧ストレス応答に関与すると考えられた。*AZF1*の転写制御に関わる因子は不明であるが、*AZF1*は、植物の乾燥や塩ストレス応答に関係すると考えられた。*ZAT8*は、mRNA の蓄積量が少なく、温度変化や浸透圧ストレスによる誘導性を示さないことから、植物の環境ストレス応答における役割は小さいと考えられた。

GVG 転写誘導系を用いることで、*STZ* ファミリー遺伝子を植物で発現誘導することができた (図 6)。*AZF1* および *AZF2*を、*CaMV35S*プロモーターの制御下で構成的に発現する植物の作出が非常に困難であるのに対して、GVG 転写誘導系を用いた形質転換植物では、*AZF1* や *AZF2*を一過的に高発現したラインを効率よく作出できた。これらの結果から、*AZF1* および *AZF2*の構成的な発現は、植物の成長や発達において有害であることが示唆された。

本研究では、遺伝子の機能解析が遅れている *AZF1*、*ZAT8*、*AZF2* のグループに注目して研究を進めることにした。*AZF1* と *AZF2*は、転写抑制因子として機能することが報告されている (Sakamoto et al., 2004)。*ZAT8*も細胞内で核に局在したことから転写抑制因子であると考えられた (図 3)。*AZF1*、*AZF2*、*ZAT8*をそれぞれ一過的に発現誘導した植物で多数の遺伝子の mRNA の蓄積量が減少したことから、*AZF1*、*AZF2*、*ZAT8*は、下流遺伝子の発現を抑制すると考えられた。特に、*AZF1* や *AZF2*の過剰発現体で発現が抑制された遺伝子群には、塩、乾燥ストレス、ABA 処理下の野生型株で mRNA の蓄積量が減少する遺伝子が多く含まれていた (図 7B、C)。*AZF1* と *AZF2*の下流遺伝子の重なりから (図 7A-C)、*AZF1* と *AZF2*の浸透圧ストレス下における機能

の重複が示唆された。一方、ZAT8の過剰発現によりmRNAの蓄積量が減少した遺伝子と、植物の浸透圧ストレス応答には、明確な関係性が見られなかった。ZAT8 と AZF1 および AZF2 の下流遺伝子の共通性が低いことから、植物の浸透圧ストレス応答における ZAT8 の役割は、AZF1 や AZF2 とは異なると考えられた。

表 1. 本章で使したプライマーの一覧

Experiment	Name	Sequence
形質転換植物	AZF1p-FW	5'-CGG <u>GGTACC</u> ATAAGTTGCATAACGACAGC-3'
	AZF1p-RV	5'-TCC <u>CCCGGG</u> AAGATTTAATTCTGTGAGATGTG-3'
	AZF2p-FW	5'-CGG <u>GGTACC</u> ATTCCATAGCCGTCACAGTGAC-3'
	AZF2p-RV	5'-TCC <u>CCCGGG</u> GATCAGATGAATCTTCTTCTAACTG-3'
	AZF3p-FW	5'-CGG <u>GGTACC</u> AGGTCCCCCTTCCGCTTGTG-3'
	AZF3p-RV	5'-TCC <u>CCCGGG</u> CTTCAAGCGCCATTGCTATAG-3'
	ZAT6p-FW	5'-CGG <u>GGTACC</u> CACGAATTAAGACTAAAAGC-3'
	ZAT6p-RV	5'-TCC <u>CCCGGG</u> TATCTTGAAGACTAGCTACTAAG-3'
	ZAT8p-FW	5'-CGG <u>GGTACC</u> CATAACAACCTCGATACTTTGCTC-3'
	ZAT8p-RV	5'-TCC <u>CCCGGG</u> ATGGTGGTGATCTTTGATTAGAAG-3'
	ZAT10p-FW	5'-CGG <u>GGTACC</u> GCATGCACACACAGAGGAGAG-3'
	ZAT10p-RV	5'-TCC <u>CCCGGG</u> TAAGTTAAAGATTCTGAGGATTTTC-3'
	AZF1-D-FW	5'-TGC <u>TCTAGA</u> ATGGCTCTCGAGACTCTCAATTC-3'
	AZF1-D-RV	5'-TGC <u>TCTAGA</u> TTAAGAAGTCGTCAGTCTGAGAC-3'
	AZF2-D-FW	5'-CGC <u>TCTAGA</u> ATGGCCCTCGAAGCGATGAAC-3'
	AZF2-D-RV	5'-TGC <u>TCTAGA</u> TTAGATTTTAAAGATAAATCTTC-3'
	AZF3-D-FW	5'-TGC <u>TCTAGA</u> ATGGCGCTTGAAGCTCTTAATTC-3'
	AZF3-D-RV	5'-TGC <u>TCTAGA</u> TTACTTCAGGCGAGGCTTCT-3'
	ZAT6-D-FW	5'-TGC <u>TCTAGA</u> ATGGCACTTGAAACTCTTACTTC-3'
	ZAT6-D-RV	5'-TGC <u>TCTAGA</u> TTAGGGTTTCTCCGGGAAGTC-3'
	ZAT8-D-FW	5'-CGC <u>TCTAGA</u> ATGGCTCTCGACACTCTCAATTC-3'
	ZAT8-D-RV	5'-CGGTCTAGATCACAACACCGACTTTGTTTC-3'
	ZAT10-D-FW	5'-TGC <u>TCTAGA</u> ATGGCGCTCGAGGCTCTTACATC-3'
	ZAT10-D-RV	5'-TGC <u>TCTAGA</u> TTAAAGTTGAAGTTTGACCG-3'
一過的発現系	AZF1-35S-GFP-FW	5'-TGC <u>TCTAGA</u> ATGGCTCTCGAGACTCTCAATTC-3'
	AZF1-35S-GFP-RV	5'-TCC <u>CCCGGG</u> AGAAGTCGTCAGTCTGAGAC-3'
	AZF2-35S-GFP-FW	5'-CGC <u>TCTAGA</u> ATGGCCCTCGAAGCGATGAAC-3'
	AZF2-35S-GFP-RV	5'-TCC <u>CCCGGG</u> GATTTTAAAGATAAATCTTC-3'
	AZF3-35S-GF-35S-FW	5'-TGC <u>TCTAGA</u> ATGGCGCTTGAAGCTCTTAATTC-3'
	AZF3-35S-GF-35S-RV	5'-TCC <u>CCCGGG</u> CTTCAGGCGAGGCTCTTAGTCGCC-3'
	ZAT6-35S-GF-35S-FW	5'-TGC <u>TCTAGA</u> ATGGCACTTGAAACTCTTACTTC-3'
	ZAT6-35S-GF-35S-RV	5'-TCC <u>CCCGGG</u> GGGTTTCTCCGGGAAGTCAAACCGG-3'
	ZAT8-35S-GF-35S-FW	5'-TGC <u>TCTAGA</u> ATGGCTCTCGACACTCTCAATTC-3'
	ZAT8-35S-GF-35S-RV	5'-TCC <u>CCCGGG</u> CAACACCGACTTTGTTTCTTACCG-3'
	ZAT10-35S-GF-35S-FW	5'-TGC <u>TCTAGA</u> ATGGCGCTCGAGGCTCTTACATC-3'
	ZAT10-35S-GF-35S-RV	5'-TCC <u>CCCGGG</u> AAGTTGAAGTTTGACCGGAAAGTC-3'

下線は制限酵素認識部位を示している。

A

B-box										
STZ/ZAT10	At1g27730	: MALEALTSPLRLASPPI-----	PLFEDSSVFHGVHWTGK--	SKRSRSD-----					FHH--	: 46
ZAT6	At5g04340	: MALETLSPLRLSSPM-----	TLFDLSALG--FHGSKG--	SKRSRSE-----						: 43
AZF3	At5g43170	: MALEALNSPR-----	LVEDPLRFNGVQWTKCK--	SKRSRSD-----					LHHN	: 41
AZF2	At3g19580	: MALEAMNTPTSSFTRI-----	ETKEDLMNDVAFIEPWKKR--	SKRORSHSPSSSSSSPPSR--					PKSQN	: 62
ZAT8	At3g49930	: MALDTLNSPTSTTTTAPPPFLRCLDETEPENLWTKRK--	TKRHRIQPNPP-----							: 53
AZF1	At5g67450	: MALETLSPTATTAR-----	PLLYREEMEPENLEQWAKRK--	TKRORFDHGONO-----					ETNK	: 55
	At3g10470	: -----	MEAAEAEEVSAAREQSILIKGK--	TKRORPQSPIPFSIIPMSS--	HEPDAEEESTSLVSKESLNDENNNNNKNNNTLNGVTSSSSSSSSNNNATLKA					: 99
	At5g04390	: -----	MEAFEEAT--KEQSILIKGK--	TKRORPQSPIPFSIIPPIVSTPENMEEYTTDLSKDNALGNDEGNHKKDG-----	VITSSSSSSSSSSQNNHTLKA					: 91
	At2g28200	: -----	MMMGQDEVG--SDOTOIKGK--	TKRORSSSTFVVTAATVTS-----	TSSAGGSGGERAVSDEYN-----	SAVSSP---	VTTC			: 70
	At5g03510	: -----	MTSVLEESGDHARLVLLIKGK--	TKRORASPLMMAAAVSSV-----	CSGERSSEVVEEEAAEVE-----				FGA	: 66
	At3g46080	: -----								: 9
ZAT7	At3g46090	: -----								: 9
	At3g46070	: -----								: 9
ZAT12	At5g59820	: -----								: 8
	At2g28710	: -----								: 9
ZAT11	At2g37430	: -----								: 11
	At3g53600	: -----								: 11
	At1g02040	: MHVTRNVGSKQLHEVSLKQVLSYLEPHEQEDTKPVTSTKNGFLLFNSHQNTLTMHMGAMNSPCIDFVMFSRGQHDENMSRRFPWKRERS-----							MSTQHHLN	: 102
L-box										
STZ/ZAT10	At1g27730	: QNLTEEEYDGLMLMDARD-----	NROPP-----	PPPAVEKLS-----						: 107
ZAT6	At5g04340	: QSLTEEEYDGLMLMDARDGDRNRDLDPSSSSSP-----		LLPPLPTPI-----						: 116
AZF3	At5g43170	: HRLTEEEYDGLMLMDARD-----	GGOLD-----	SVTVAEKPS-----						: 99
AZF2	At3g19580	: QDLTEEEYDGLMLMDARD--	QPSQTRFHQOSQSLT-----	PPPEKSLP-----						: 133
ZAT8	At3g49930	: --PSEEEYDGLMLMDARD-----	SSDHSS-----	PPSDHSLP-----	LSDHQKDPKSVCKGKPPSS					: 121
AZF1	At5g67450	: NLPSEEEYDGLMLMDARD-----	SAVQSP-----	PLPPLPRAS-----	PLPPLPRAS					: 124
	At3g10470	: TADEEDDDGLMLMDARDAGH-----	SLPHLOPPHPQOOTROLMSYQDSGNNNNNAYRSSRRFLETSSNGTTTNGGGGRAGYVVC-----	CKRPPSS						: 209
	At5g04390	: AEDEEDDDGLMLMDARDAGH-----	SLPHN-----	NHLLPNNNNNYRTFSRRFLETSSN-----	SGGKAGYVVC					: 180
	At2g28200	: TOEEED--GLMLMDARDGT-----	VLSP-----	DLKN-----	SRKIHOKISSE-----	NSFTYVVC				: 142
	At5g03510	: TDEDED--GLMLMDARDAGH-----	QAKSS-----	DDRLSMQRMGFFSNKKPVASLG-----	LGLDGVVVC					: 145
	At3g46080	: --IVED--GLMLMDARDAGH-----	ECGG-----		GGEKRVVC					: 62
ZAT7	At3g46090	: --IVED--GLMLMDARDAGH-----	ECGGG-----		CGGDERVC					: 65
	At3g46070	: --LTVD--GLMLMDARDAGH-----	EHGD-----		RKKRVVC					: 61
ZAT12	At5g59820	: --STVD--GLMLMDARDAGH-----	QENV-----		GGDKRVVC					: 64
	At2g28710	: --MINN--GLMLMDARDAGH-----	QND-----		KSRVC					: 59
ZAT11	At2g37430	: --LKNL--GLMLMDARDAGH-----	MYKQIG-----		SNQPCVC					: 72
	At3g53600	: --MKHD--GLMLMDARDAGH-----	VVKQID-----		VKSTGSKTN-----	HNNHVC				: 74
	At1g02040	: LSPNDEEDDGLMLMDARDAGH-----	DAHGGDQKQHG-----		HGKGTVKK-----	CKTAQVVC				: 177
2nd zinc-finger										
STZ/ZAT10	At1g27730	: -----	QTLSGGGDDHSTSSATTSAVT-----	TGSG--	KSNVCHCNKSPSSGOALGGHRCCHVEGNNNIN-----	TSSVNSEGAGSTSHVSS--				: 185
ZAT6	At5g04340	: -----	LTOSAGDELSTSSAITSGIS-----	GGGGSVKSNVCHCNKSPSSGOALGGHRCCHVEGNNNGG-----	VSSSVNSEDVGSTSHVSSG--					: 198
AZF3	At5g43170	: -----	LYGGGENDKSTPSTAVKS-----		SVKVCCKSPSSGOALGGHRCCHVEGNDG-----	VNSSEGVGSTSHVSS--				: 161
AZF2	At3g19580	: -----	TVISTTADDSTAPTISIVAGEK-----	HPIAASGKTSNVCCHCNKSPSSGOALGGHRCCHVEGNLGGG-----	GGGSKSISHSGVSSSTVS-----					: 214
ZAT8	At3g49930	: -----	VDVNNNGVTNNGNISNG-----	LVGOSGKTSNVCCHCNKSPSSGOALGGHRCCHVEGNDG--GN-----	SGNDNS-----					: 184
AZF1	At5g67450	: -----	TSITSGNOELSNNSHNSGVSVINVTNGVSGSGKTSNVCCHCNKSPSSGOALGGHRCCHVEGNDGNN-----		GNSSNSVELVAGSDVDVD-----					: 215
	At3g10470	: AMGLSHNDHKKSNDYDVAVSLHNLVTTTPANNSHSLVV-----		YKGSNNVCCHCNKSPSSGOALGGHRCCHVEGNDGNN-----		GAVAVAAASTATVSVAAIPATANTALSLSMSFDW				: 321
	At5g04390	: AS-FYSNLDLKKNTYDAVSLVHTTTTVFKNNNS--RSLVV-----		YKGSNNVCCHCNKSPSSGOALGGHRCCHVEGNDGNN-----		VIVATAAANTELSLSSMSFDIS				: 287
	At2g28200	: STEEKTRLPLTP--KSSASEGQNSHFVSGSALASQANI-----	INKA--	NKVECHCNKSPSSGOALGGHRCCHVEGNDGNN-----		AEVSRNSTEEIEINIGRME				: 246
	At5g03510	: GASVFCVCEKKTAS-----	ASTVETVEAGAVGSFLSLOVTS-----	DGSKKPKTSNVCCHCNKSPSSGOALGGHRCCHVEGNDGNN-----		ATSAIKTALSS--				: 234
	At3g46080	: -----	INSSDPSLLGSLSNK-----	TKTATSPCHCNKSPSSGOALGGHRCCHVEGNDGNN-----		GLVTRSLPETTTVTLTKSS				: 136
ZAT7	At3g46090	: -----	INSDNPSLLGSLSNK-----	TKTSTSPCHCNKSPSSGOALGGHRCCHVEGNDGNN-----		GLVTRSLPETTTVTLTKSS				: 136
	At3g46070	: -----	TNSDOKSLPGSPKPKPT-----	TTTTATSPCHCNKSPSSGOALGGHRCCHVEGNDGNN-----		NVLVTRSLPETTTVTLTKSS				: 140
ZAT12	At5g59820	: -----	NND--ALSSGLMKVK-----	TSNVCCHCNKSPSSGOALGGHRCCHVEGNDGNN-----		GAIVTRALLPEP-TVTLTKSS				: 133
	At2g28710	: -----	AALGHAPSPSPKRVK-----	VNVCCHCNKSPSSGOALGGHRCCHVEGNDGNN-----		GRSLAFATAPVMMKSGG				: 126
ZAT11	At2g37430	: -----	KLTVQKQKHLND-----	YKGNHVCCHCNKSPSSGOALGGHRCCHVEGNDGNN-----		SPISPMVPMPLKGC				: 140
	At3g53600	: -----	KLIVDQOVKHRN-----	KENDHVCCHCNKSPSSGOALGGHRCCHVEGNDGNN-----		SPISVSVYRPFVFNRC				: 139
	At1g02040	: CPASQDEEEEEEEKEDDDNDEDEDEDEDEKSTAHIA-----		KRSNABCHCNKSPSSGOALGGHRCCHVEGNDGNN-----		MTS-----				: 259
DLN-box										
STZ/ZAT10	At1g27730	: -----	HRG-FDANIPPIPEFSMVN-----	GDDEVMSMPAKKPRFDFPVKLQ-----						: 227
ZAT6	At5g04340	: -----	HRG-FDANIPPIPEFSMVN-----	GDDEVMSMPAKKLRDFDFPEK-----						: 238
AZF3	At5g43170	: -----	HRG-FDANIPVQGSF-----	DEDEVMSMATKKPRK-----						: 193
AZF2	At3g19580	: -----	EERSHRGFDANLPALPELSLHN-----	PIVDEILSPETGKPKLLTDHDQVKKEDLSLKI-----						: 273
ZAT8	At3g49930	: -----	HKFQANLP-----	ADQVSETIGKSQLSGEETKSVL-----						: 215
AZF1	At5g67450	: -----	NERWSEESAIQGHG-FDANLP-----	ADQSVTS-----						: 245
	At3g10470	: -----	SEGPQAPVKRARSVSLDLDANLPAPEDENRVNGLSFASKQHEQEHEOTQOKQOREQKSLVSSAPTIVDCHY-----							: 398
	At5g04390	: DGHQDLAMPKAKKARTVVSLLDLDANLPAPEDENRVNGLSFASKQHEQEHOQ-----	KKQREEPKSLVLS-APTIVDCHY-----							: 362
	At2g28200	: QQRKYLPLDANLPAPEDD-----	LRSEKFGVLSATP-ALIDCHY-----							: 286
	At5g03510	: SHHHHEESIRPKNFLODANLPAPEDERCC-----	EKPKFAPAQDQLLLTAASNLIDCH-----							: 292
	At3g46080	: SGKRVACLDLDS-----		MESLVNKKLELGRITIS-----						: 164
ZAT7	At3g46090	: SGKRVACLDLDS-----		MESLVNKKLELGRITIS-----						: 168
	At3g46070	: SGKRVACLDLDS-----		VESVNTLELGRITY-----						: 170
ZAT12	At5g59820	: SGKRVACLDLDS-----		MVDNLNKLLELGRITY-----						: 162
	At2g28710	: GNGKRVCLDNLTP-----		LENED-LKLELGRITY-----						: 156
ZAT11	At2g37430	: GSKRILSLDNLTP-----		LENED--EYIFGKTFVPKIDMKFVL-----						: 178
	At3g53600	: SSSKEILDNLTP-----		LENED--VLIIFGKNEVPQIDLKFTVN-----						: 175
	At1g02040	: LHDHHHSVGRFPQLDQPSLDANLPACQEVSYDPTAMSVG-----		MIERDGGGNNHNTSSSLKSLASGDWS-----						: 324
DLN										

図 1. (次項に続く)

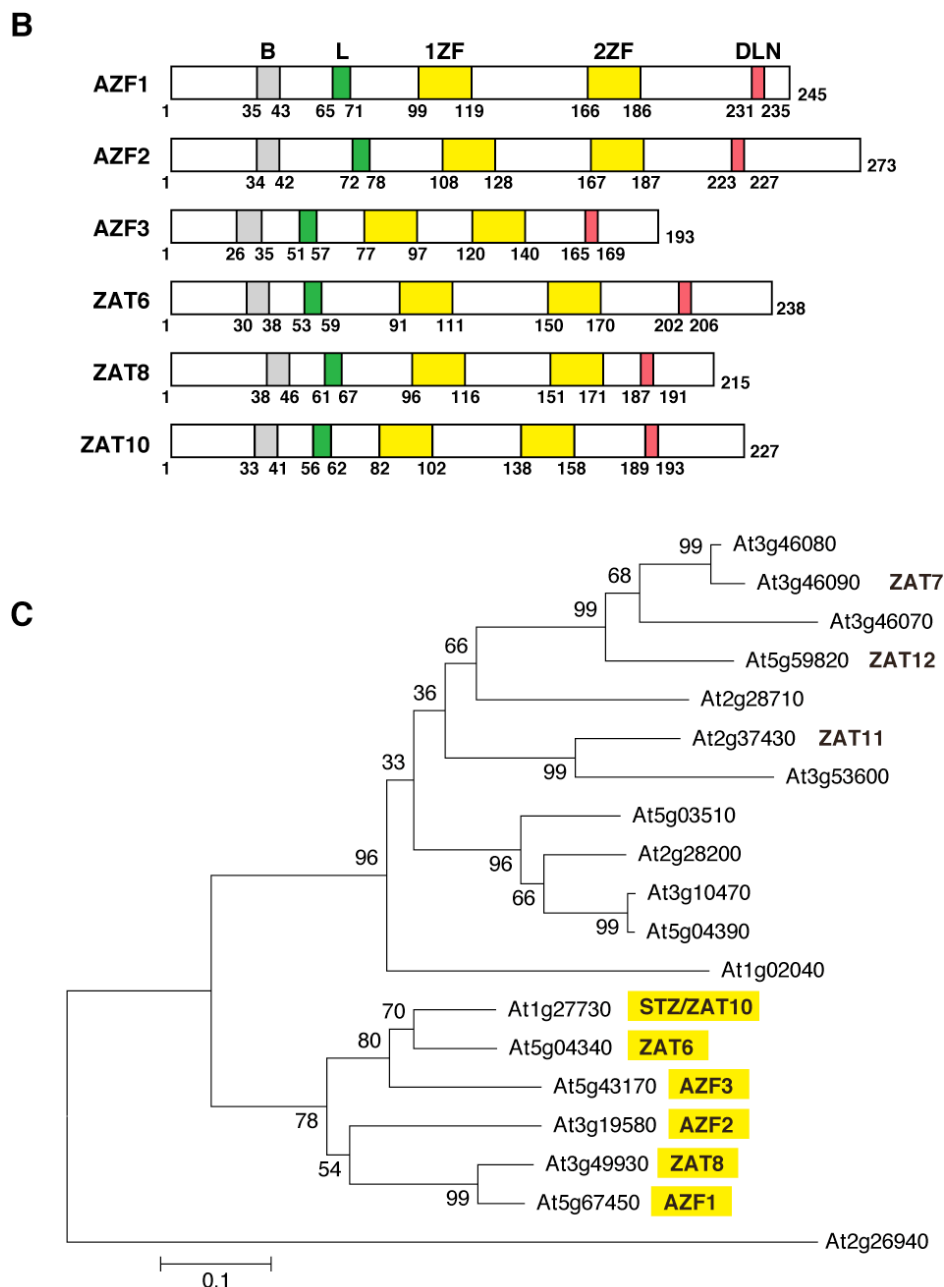


図 1. シロイヌナズナの AZF/ZAT の一次構造と系統解析

A. シロイヌナズナの C1-2i 型 zinc-finger タンパク質のアライメント: シロイヌナズナの 20 個の C1-2i 型 zinc-finger タンパク質の中で、L-box、1st zinc-finger、2nd zinc-finger、DLN-box を保存している 18 個のタンパク質のアミノ酸配列を抽出した。タンパク質の全長配列を用いて Clustal X プログラム (Ver. 2.0) でアライメントを作成した。コンセンサス配列は、80%以上のタンパク質において保存されている配列とした。各配列は、TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) から入手した。

B-box: STZ ファミリータンパク質の N 末端付近に保存された塩基性のアミノ酸を含む領域で、

既知の核移行シグナル(NLS)に類似している。

L-box: ロイシンなどの疎水性の高いアミノ酸配列から構成された短い領域である。

zinc-finger モチーフ: 真核生物の C2H2 型 zinc-finger モチーフに共通したコンセンサス配列 $CX_2CX_3FX_5LX_2HX_3H$ を保存しており、 $-X_5LX_2H-$ に相当する部分には、植物に固有な QALGGH 配列を持っている。

DLN-box: 3 個の疎水性アミノ酸からなる DLN を中心とした配列で、転写抑制ドメインとして機能する EAR モチーフ[L/FDLNL/F(X)P]のコア配列である。

B. STZ ファミリータンパク質の模式図: 各保存領域を、B-box 灰色、L-box 緑色、zinc-finger motif 黄色、DLN-box 赤色で示した。各保存領域の下の数字は、相当するアミノ酸の位置を示した。

C. シロイヌナズナの C1-2i 型 zinc-finger タンパク質の分子系統樹: L-box、1st zinc-finger、2nd zinc-finger、DLN-box の領域を用いて、Clustal X プログラム (Ver. 2.0) で作成したアライメントから、MEGA4 プログラムを利用して分子系統樹を作成した。STZ ファミリータンパク質を黄色で示した。C1-2i 型の At2g26940 がコードするタンパク質配列をアウトグループとして用いた。系統樹には、1000 回繰返しにより計算したブートストラップ値を示した。

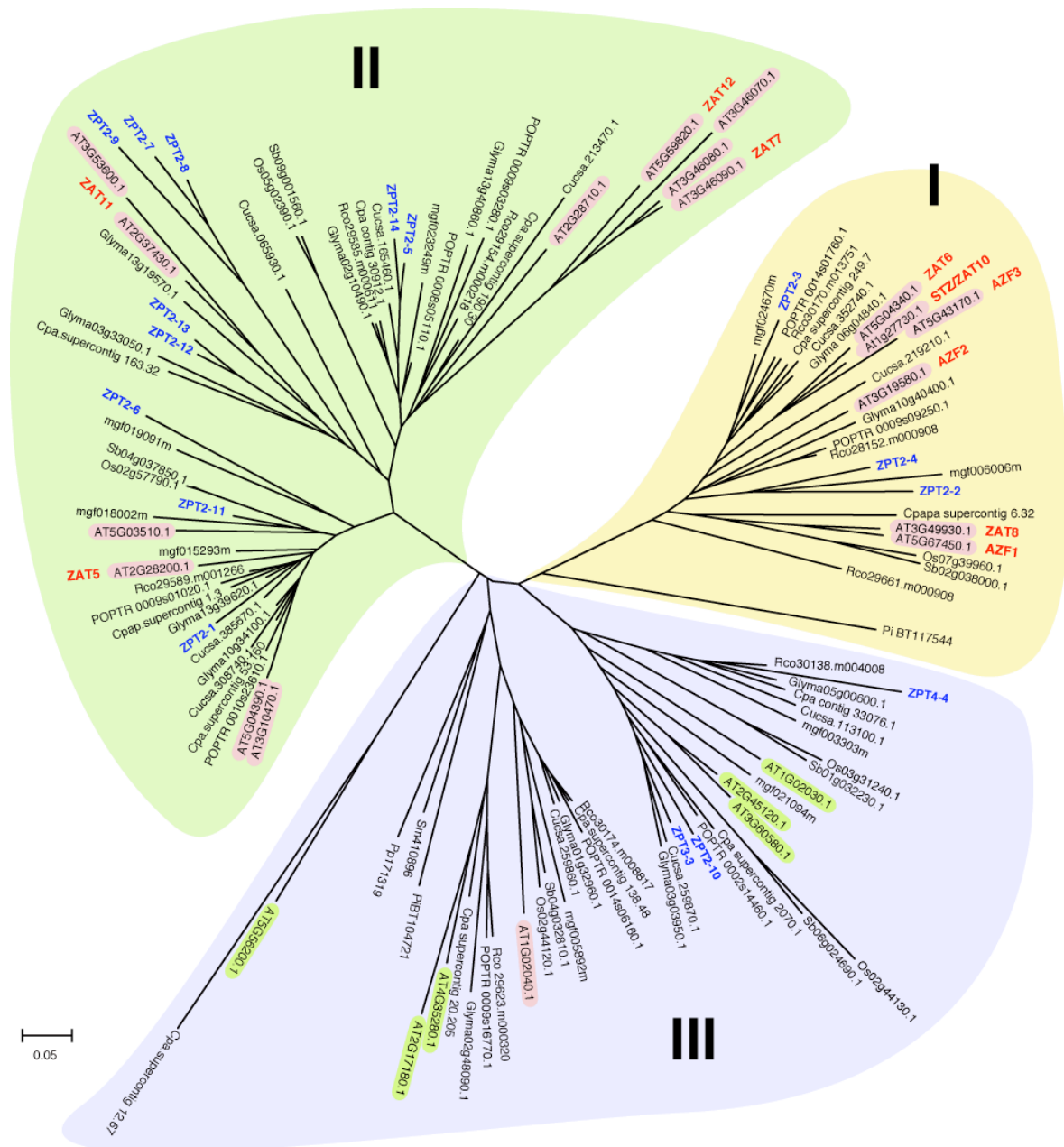


図 2. C1 ファミリー型 zinc-finger タンパク質の分子系統樹

STZ ファミリータンパク質に相同性の高い植物の zinc-finger タンパク質の配列を、Phytozome (<http://www.phytozome.net/index.php>)、SALAD DATABASE (<http://salad.dna.affrc.go.jp/salad/>)、NCBI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) データベースから入手した。各タンパク質配列に保存された L-box、zinc-finger domain、DLN-box の領域を用いて、Clustal X プログラム (Ver. 2.0) で作成したアライメントを基に、MEGA4 プログラムを利用して分子系統樹を作成した。3 個以上の zinc-finger モチーフを持つクラス III のタンパク質では、QALGGH 配列を持つ 2 個の zinc-finger モチーフをアライメントに用いた。*Arabidopsis thaliana* (At)、*Populus trichocarpa* (POPTR)、*Carica papaya* (Cpa)、

Petunia hybrida (ZPT)、*Mimulus guttatus* (mgf)、*Ricinus communis* (Rco)、*Cucumis sativus* (Cucsa)、*Glycine max* (Glyma)、*Sorghum bicolor* (Sb)、*Oryza sativa* (Os)、*Picea glauca* (Pi)、*Selaginella moellendorffii* (Sm)、*Physcomitrella patens* (Pp)をそれぞれ示す。

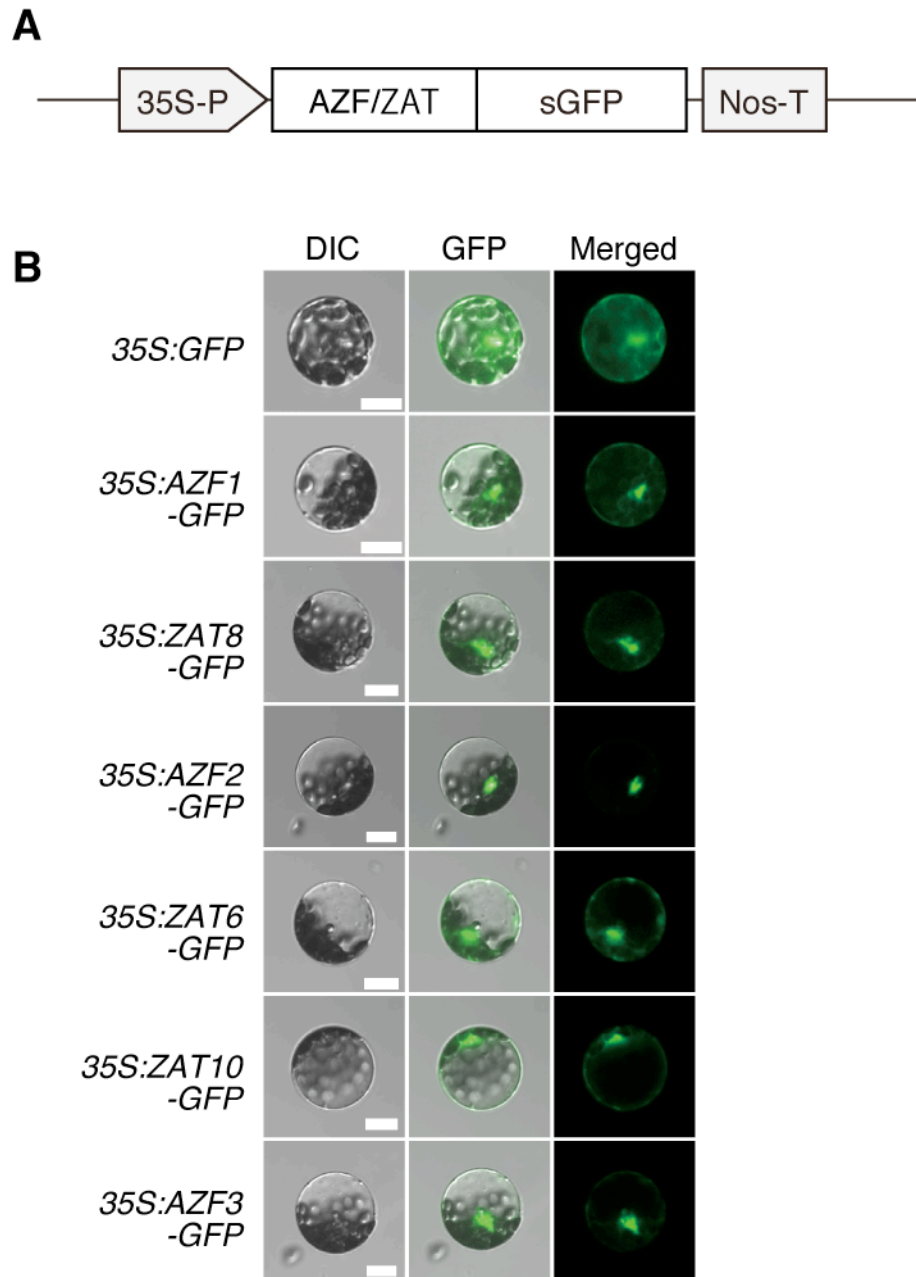


図 3. STZ ファミリータンパク質の細胞内局在

A. 組換え DNA の模式図: *CaMV35S* プロモーター (35S-P) の制御下で各 *AZF/ZAT-sGFP* を発現する組換え DNA を作製した。Nos-T はノパリン合成酵素遺伝子のターミネーターを示す。

B. GFP 蛍光の観察結果: A で示した各組換え DNA をシロイヌナズナの葉肉細胞から単離したプロトプラストに導入して、一過的に発現させた。左から、微分干渉 (DIC) 像、GFP 蛍光像、重ね合わせ像をそれぞれ示す。白色のバーは 10 μm を示す。

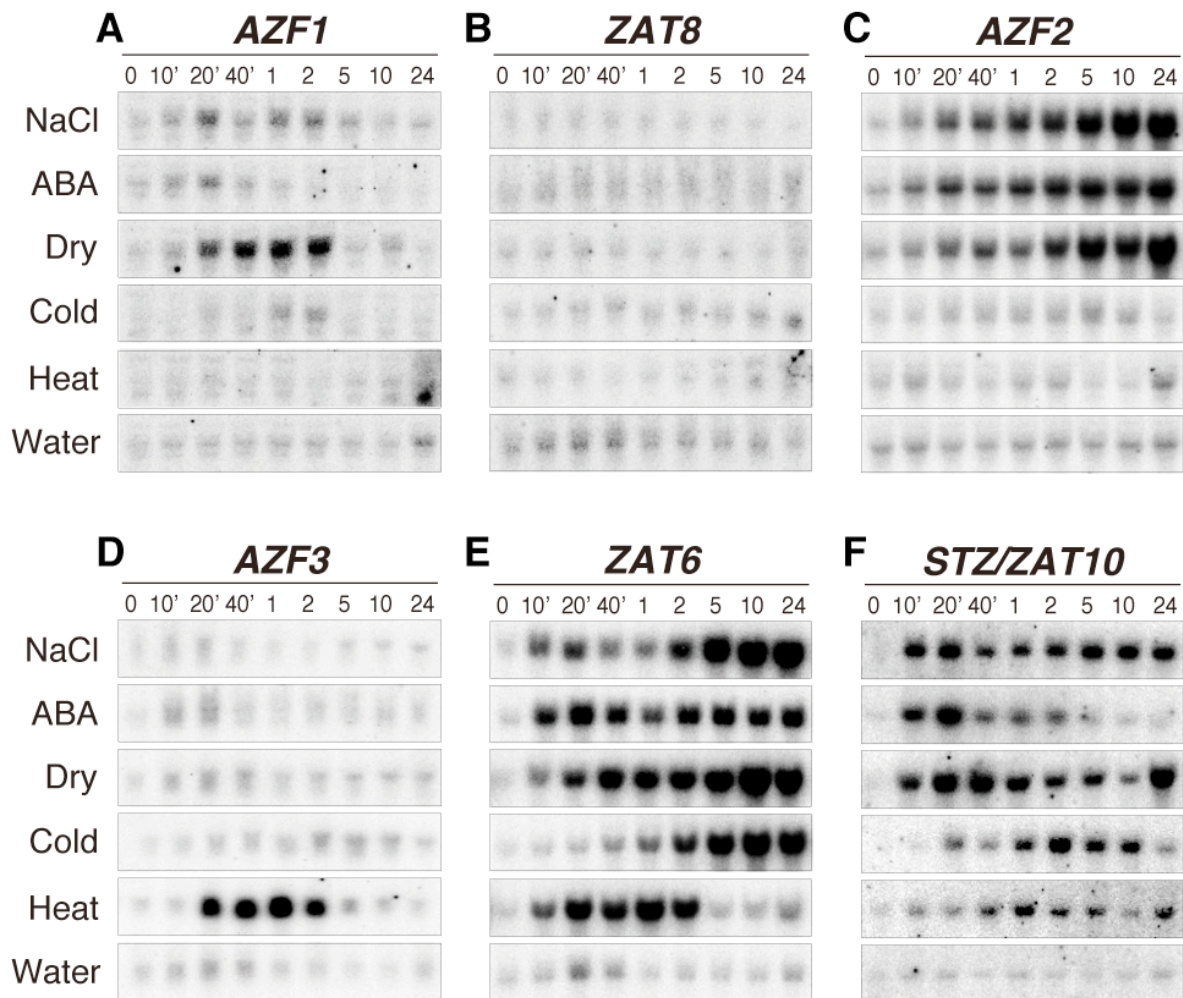


図 4. ストレス条件下における STZファミリー遺伝子の発現

A-F. NaCl、ABA、乾燥 (Dry)、低温 (Cold)、高温 (Heat) 処理したシロイヌナズナの植物体における、STZファミリー遺伝子の mRNA の蓄積量を RNA ゲルブロット法により解析した。NaCl、ABA 処理では、GM 寒天培地で播種後 3 週間生育したシロイヌナズナの野生型株を、24 時間、水処理した後、250 mM NaCl および 100 μ M ABA 水溶液で処理した。乾燥処理では、水処理後の植物体を乾燥したプレート内で 2 時間静置した。低温、高温処理では、GM 寒天培地で 3 週間生育した植物を培地ごと、4 $^{\circ}$ C および 37 $^{\circ}$ C で処理した。無処理区では、水処理を継続した。処理前、および処理開始後 10、20、40 分、1、2、5、10、24 時間の植物体から全 RNA を抽出した。AZF1、AZF2、AZF3、ZAT6、ZAT10 では 20 μ g、ZAT8 では 40 μ g の各 RNA に対して RNA ゲルブロット解析を行った。

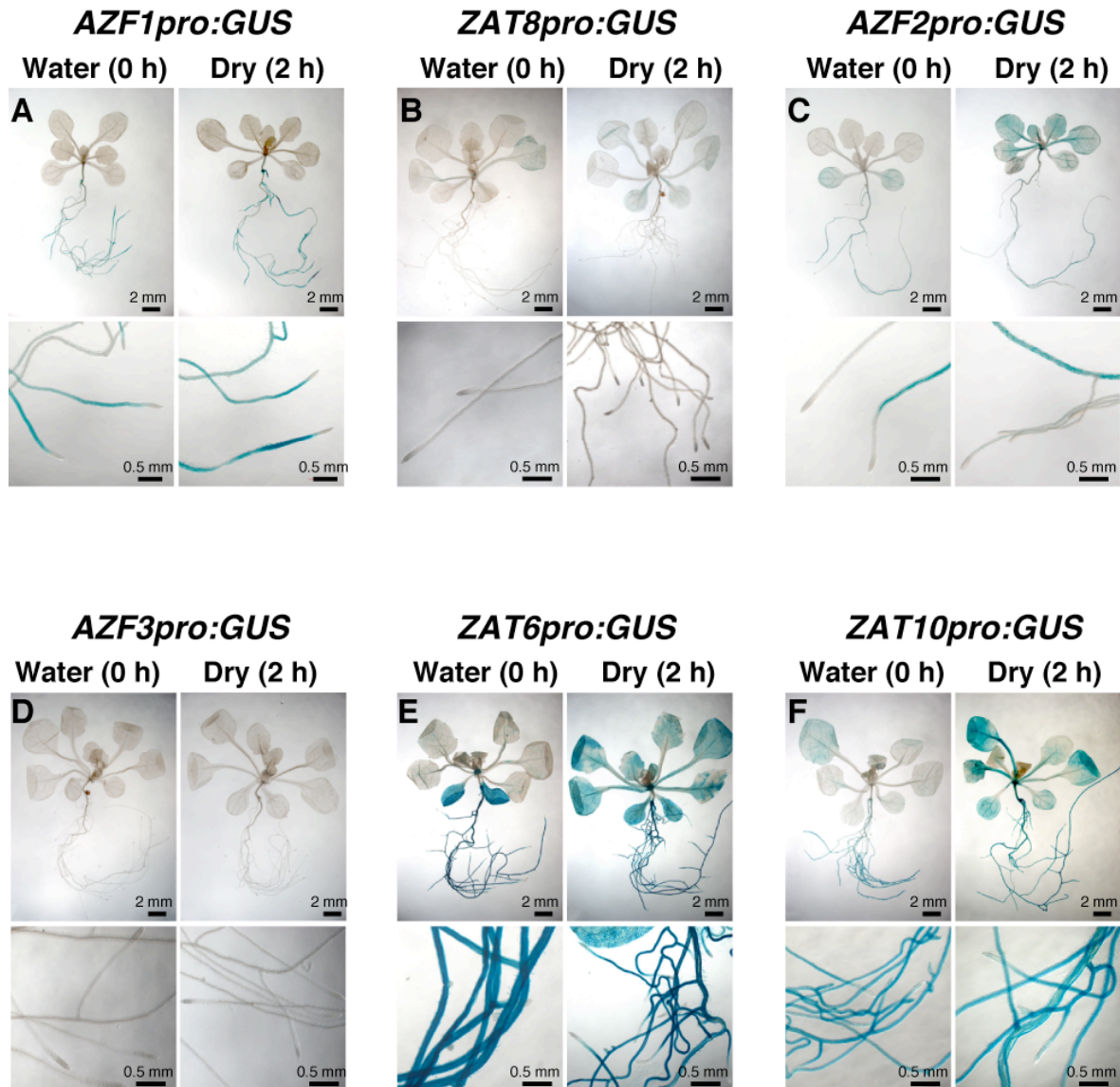


図 5. GUS 染色による *STZ* ファミリー遺伝子の発現部位の解析

A-F. 解析には、*STZ* ファミリー遺伝子のプロモーター領域に *GUS* レポーター遺伝子を連結した組換え DNA を導入した形質転換シロイヌナズナを用いた。GMK 寒天培地で播種後 2 週間生育した形質転換シロイヌナズナの植物体に *GUS* 染色液を浸透させて染色した [Water (0 h)]。乾燥処理では、形質転換シロイヌナズナの植物体を乾燥したプレート内で 2 時間静置した後、染色した [Dry (2 h)]。

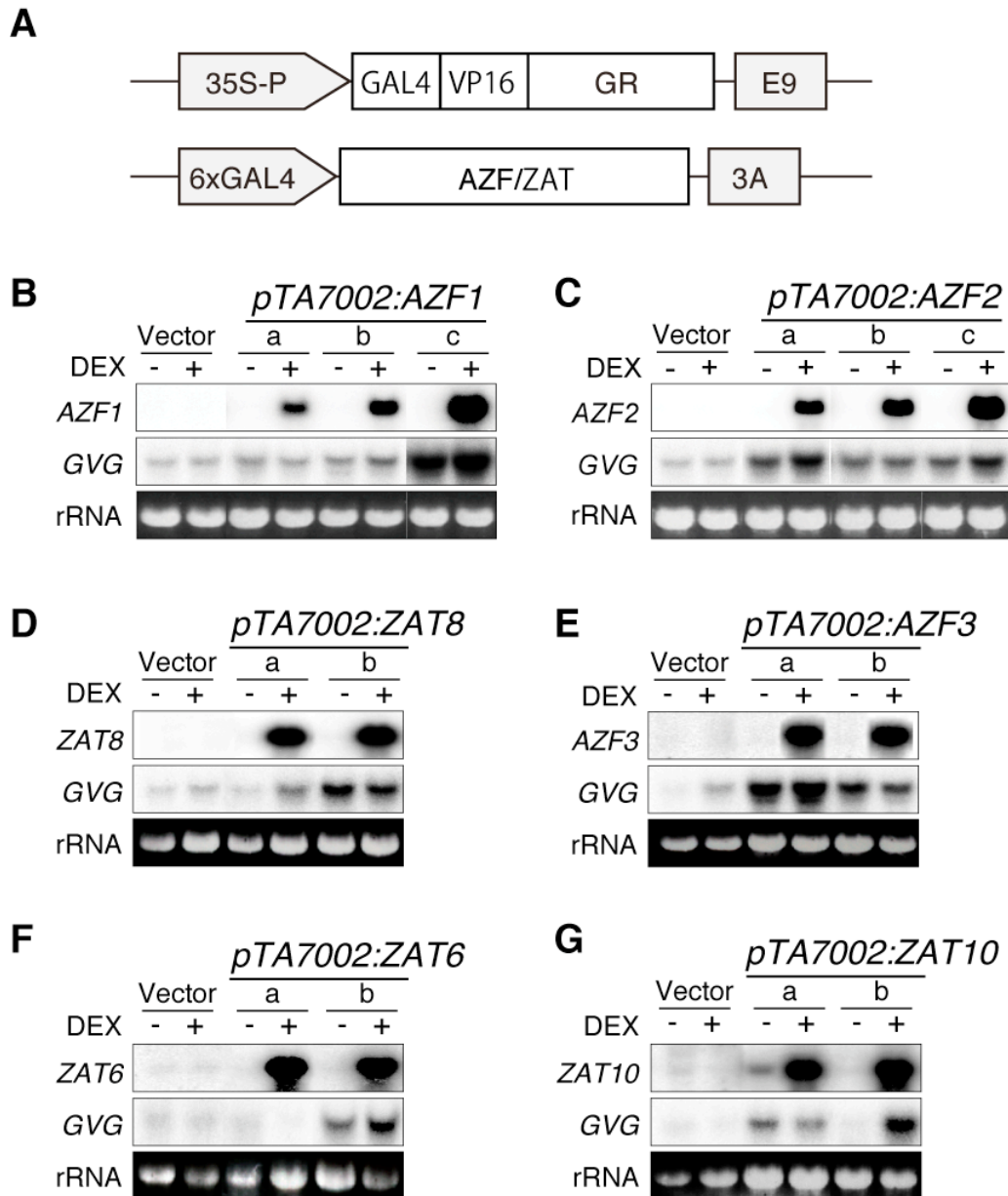


図 6. GVG 転写誘導系の制御下で STZ ファミリー遺伝子を過剰発現した形質転換シロイヌナズナの作出

A. 組換え DNA の模式図: *CaMV35S* プロモーターの下流にキメラ遺伝子 *GAL4-VP16-GR* (*GVG*) を連結した組換え DNA (上) と、*GAL4* 結合配列を持つプロモーターの下流に各 STZ ファミリー遺伝子の CDS を連結した組換え DNA (下) を示した。E9 および 3A は、リブローソ 1, 5-ビスリン酸カルボキシラーゼの小サブユニットをコードする *rbcS-E9*、-3A 遺伝子のターミネーターを示す。

B-G. 形質転換シロイヌナズナにおける導入遺伝子の発現解析: A で示した各組換え DNA を導入した形質転換シロイヌナズナ (*pTA7002:AZF/ZAT*) を作出した。ベクター (*pTA7002*) のみを導入した植物体を対照とした。形質転換植物の T2 種子を GMH 寒天培地に播種して、2 週間生育させた植物体を、24 時間、水処理した。水処理後の植物体を 10 μ M DEX 水溶液で 24 時間、処理した (DEX +)。無処理区では、水処理を継続した (DEX -)。DEX 処理後の植物体から全 RNA を抽出して、各遺伝子において 20 μ g の RNA に対して RNA ゲルブロット解析を行った。AZF1、AZF2 遺伝子では 3 ライン (a、b、c)、ZAT8、AZF3、ZAT6、ZAT10 遺伝子では 2 ライン (a、b) の形質転換体における導入遺伝子および GVG の発現量を示した。rRNA のエチジウムブロマイド染色像をコントロールとして示した。

A

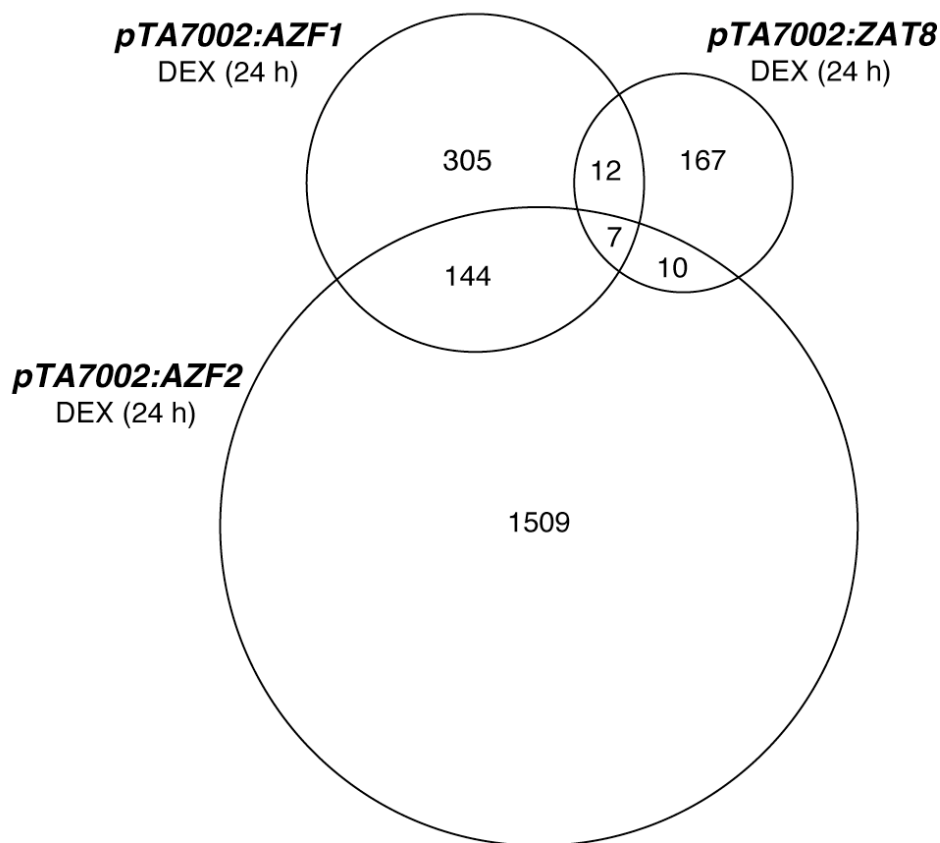
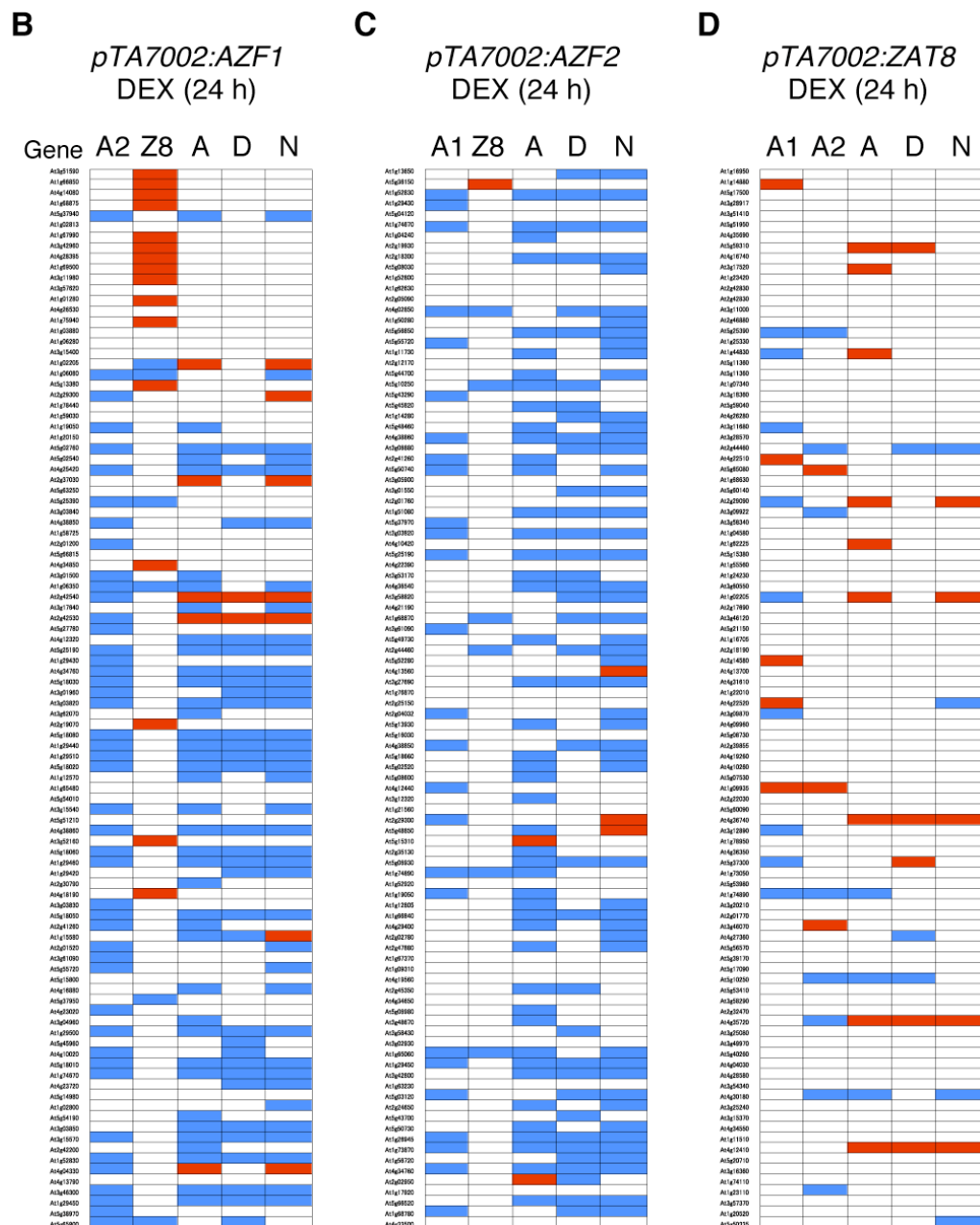


図 7. GVG 転写誘導系の制御下で *AZF1*、*AZF2*、*ZAT8* をそれぞれ過剰発現した植物において、mRNA の蓄積量が減少した遺伝子群

A. *AZF1*、*AZF2*、*ZAT8* の過剰発現体で発現量が減少した遺伝子群の重複: DEX 処理した *pTA7002:AZF1*、*:AZF2*、*:ZAT8* の植物体で、対照と比較して mRNA の蓄積量が 2 倍以上に減少した遺伝子群を用いて、ベン図を作成した。図中の数字は、各遺伝子の過剰発現体において発現量が減少した遺伝子の個数を示す。



B-D. *AZF1*、*AZF2*、*ZAT8* の過剰発現体で発現量が減少した遺伝子のストレス応答性の解析：*AZF1*、*AZF2*、*ZAT8* の過剰発現体で、対照と比較して mRNA の蓄積量が 2 倍以上に減少した遺伝子群の中から、減少割合が大きい 100 個の遺伝子を抽出した。これら 100 個の遺伝子を発現量の減少が大きい順に縦に整列した。各条件下 (A1、A2、Z8、A、D、N) における 100 個の遺伝子の発現量の変化を、増加 (赤)、減少 (青)、変化なし (白) で示した。A1、A2、Z8 は、順に DEX 処理した *pTA7002:AZF1*、*:AZF2*、*:ZAT8* 植物体を示す。A、D、N は、順に、ABA、乾燥、NaCl 処理をしたシロイヌナズナの野生型株を示す。ABA、乾燥、NaCl 処理した野生型株における遺伝子発現の評価では、先行論文における解析結果を使用した (Fujita et al., 2009)。

第 III 章 AZF1 と AZF2 の機能解析

III-1. 序論

前章において、GVG転写誘導系の制御下でAZF1やAZF2を過剰発現した植物を用いてマイクロアレイ解析を行った結果、AZF1とAZF2は、乾燥や塩ストレス下で共通の下流遺伝子の発現を抑制することが示唆された。また、ZAT8は、AZF1やAZF2とは異なる機能を持つと考えられた。先行研究により、ZAT10を構成的に過剰発現した植物は、乾燥や塩および浸透圧ストレスに対して耐性を示すことが報告されている (Sakamoto et al., 2004, Mittler et al., 2006)。また、ZAT10に近縁なZPT2-3を過剰発現したペチュニアの植物体も、乾燥耐性を示すことが報告されている (Sugano et al., 2003)。よって、STZファミリー遺伝子を過剰発現することで、植物に塩や浸透圧ストレス耐性を付与することが可能であると考えた。また、ZAT10、ZAT12、ZAT7などのC1-2型zinc-finger遺伝子をそれぞれ構成的に過剰発現した植物体は、矮化することが報告されており (Sakamoto et al., 2004, Ciftci-Yilmaz et al., 2007)、環境ストレス下におけるSTZファミリー遺伝子と植物の成長制御との関係に関心が持たれている。

ペチュニアのZPT2-1は、5-エノイルピルビニルシキミ酸-3-リン酸合成酵素をコードする遺伝子のプロモーター領域に結合するタンパク質として単離、同定された (Takatsuji et al., 1992)。ZPT2-1が結合する配列は、EP1と命名された。ZPT2型タンパク質の一部は、EP1を短縮したEP1S (TTGACAGTGTCAC) 配列に特異的に結合することが示されている (Takatsuji et al., 1994)。坂本ら (2004) は、AZF1、AZF2、AZF3、ZAT10が、2 個のEP1Sの配列を連結したEP2配列に特異的に結合することを示した。これらのタンパク質とEP2の結合には、2 個のA (G/C) T配列が重要であることが示唆された。さらに、AZFsとZAT10は、EP2との結合を介して転写抑制因子として機能することが示された。これらの知見から、STZファミリータンパク質は、シロイヌナズナのゲノム中のA (G/C) Tをコア配列とするシス因子に結合して、特定の遺伝子の発現を負に制御すると考えられる。しかし、STZファミリーに属する転写因子の直接の標的遺伝子は解明されていない。

III-2. 目的

本章では、AZF1とAZF2の標的遺伝子を同定することでAZF1とAZF2の機能を解明することを目的とした。前章から得られた知見に基づいて、AZF1とAZF2の機能の重複に注目して研究を進めた。AZF1とAZF2タンパク質の植物組織での蓄積部位を観察した。また、AZF1やAZF2の機能獲得型植物の表現型を解析した。機能獲得型植物を用いた遺伝子発現解析の結果から、AZF1やAZF2の標的候補遺伝子を探索した。さらに、標的候補遺伝子のプロモーター領域とAZF1およびAZF2の相互作用を解析した。またAZF1とAZF2の生理的機能の解明を目指して、二重変異体*azf1 azf2*の表現型を解析した。

III-3. 材料と方法

III-3-1. 植物材料と生育条件

実験には、野生型株としてシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Ecotype Columbia)を用いた。生育条件は、第II章に示した方法に従った。

III-3-2. 植物形質転換用ベクター

植物内におけるGFPの発現には、pGK-EI2-35S Ω -CsGFPを用いた(Qin et al., 2008)。乾燥や塩ストレス誘導性のプロモーターを用いた形質転換植物の作出には、pBIRD29AAP-Notを用いた(Kasuga et al., 1999)。このベクターは、バイナリーベクターpBI121に、シロイヌナズナの*RD29A*のプロモーター配列と、マルチクローニング部位、およびNos-T配列を導入したものである。

III-3-3. 組換えDNAの作製

表2に示したプライマーを用いて、シロイヌナズナのゲノムDNAを鋳型としてPCR反応を行い、各遺伝子のプロモーター断片、およびCDS断片を増幅した。PCRの反応条件は、第II章に示した条件に従った。本章で用いたプラスミドの構築、およびDNA断

片の由来は、以下に示す通りである。AZF は AZF1 および AZF2 を意味する。

pGK-AZFpro:AZF-sGFP

pGK-EI2-35S Ω -CsGFP を *KpnI* と *SmaI* で処理して得られた部位に、第 II 章で調製した *AZF1* および *AZF2* のプロモーター断片を挿入することで、pGK-AZF1pro:sGFP と pGK-AZF2pro:sGFP を得た。プライマー対として AZF1p-GFP-FW と RV、および AZF2p-GFP-FW と RV を用いて、ゲノム DNA を鋳型として PCR 反応を行うことで、*AZF1* と *AZF2* の CDS 断片を増幅した。得られた CDS 断片を *SmaI* と *BamHI* で処理して、pGK-AZF1pro:sGFP の同じ部位にそれぞれ挿入することで、pGK-AZF1pro:AZF1-sGFP と pGK-AZF2pro:AZF2-sGFP を得た。

pBI-RD29Apro:AZF

プライマー対として AZF1-R29-FW と RV、および *AZF2* は AZF2-R29-FW と RV を用いて、ゲノム DNA を鋳型として PCR 反応を行うことで、*AZF1* と *AZF2* の CDS 断片を増幅した。得られた PCR 断片を *XbaI* と *SmaI* で処理して、pBI-RD29AAP-Not の同じ部位にそれぞれ挿入することで、pBI-RD29Apro:AZF1 と pBI-RD29Apro:AZF1 を得た。同様の操作を行うことで、pBI-RD29Apro:AZF2 を得た。

pGK-AZFpro:AZF

プライマー対として AZF1-FW と RV、および AZF2-FW と RV を用いて、ゲノム DNA を鋳型として PCR 反応を行うことで、*AZF1* と *AZF2* の CDS 断片を増幅した。得られた PCR 断片を *BamHI* と *EcoRV* で処理して、pGK-AZF1pro:sGFP、ならびに pGK-AZF1pro:sGFP の同じ部位にそれぞれ挿入することで、pGK-AZF1pro:AZF1 と pGK-AZF2pro:AZF2 を得た。

pMAL-AZFb

プライマー対として AZF1b-FW と RV、および AZF2b-FW と RV を用いて、ゲノム DNA を鋳型として PCR 反応を行うことで、*AZF1* と *AZF2* の CDS 断片を増幅した。得られた PCR 断片を *BamHI* と *XbaI* で処理して、pMAL-c2x ベクターの同じ部位にそれぞれ挿入することで、pMAL-AZF1b と pMAL-AZF2b を得た。

pSK-SAUR20-G および pSK-SAUR63-G

G は G1、G2、G3、G4 を意味する。プライマー対として SAUR20-G-FW と RV、および SAUR63-G-FW と RV を用いて、ゲノム DNA を鋳型として PCR 反応を行うことで、各遺伝子のプロモーター領域の断片をそれぞれ増幅した。得られた PCR 断片を pBluscriptII SK⁺ の *EcoRV* 部位に挿入して、pSK-SAUR20-G、および pSK-SAUR63-G を得た。

III-3-4. 形質転換シロイヌナズナの作出

シロイヌナズナの形質転換体の作出は、第II章に示した方法に従って行った。

III-3-5. GFP 蛍光による組織特異的局在の解析

III-3-5-1. 共焦点顕微鏡による蛍光の検出

共焦点顕微鏡による蛍光の検出は、第II章に示した方法に従って行った。

III-3-5-2. GFP の蛍光検出に用いた植物の調製

GFP の検出には、GMK 寒天培地で2週間生育させた形質転換植物を用いた。寒天培地から引き抜いた植物体の根を、MS 液体培地[4.7 g/l ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類、112 μ g/l B5 ビタミン、2.0 g/l MES]中でプレパラートに封入した。プレパラートに封入した根の GFP 蛍光を経時的に観察した。植物体の塩ストレスや ABA 処理には、150 mM 塩化ナトリウムおよび 100 μ M ABA を含む MS 液体培地を用いた。

地上部における GFP 蛍光の観察では、寒天培地から引き抜いた植物体の根を 150 mM 塩化ナトリウム、および 100 μ M ABA を含む MS 液体培地に浸した。植物体の本葉を経時的にサンプリングして、葉における GFP 蛍光を観察した。無処理区として、MS 液体培地で処理した植物の GFP 蛍光を経時的に観察した。

植物体における核染色は、GMK 寒天培地上で 2 週間生育した植物体の根を核染色液[4 μ g/ml DAPI (SIGMA)、0.25xPBS、0.2% メタノール]に 15 分間浸すことで行った。

III-3-6. RNAゲルブロット解析用の植物の調製

植物体の塩ストレス処理では、GM および GMK 寒天培地上で 2 週間育てた植物

体を用いた。植物体を 24 時間水処理した後、200 mM 塩化ナトリウム水溶液で 5 時間処理した。塩処理後の植物体を液体窒素で凍結して検体とした。検体には、約 100 mg 分の植物を用いた。植物体を 29 時間水処理することで無処理区を得た。

III-3-7. RNAの調製

RNA の調製は、第 II 章に示した方法に従って行った。

III-3-8. RNAゲルブロット解析

RNAゲルブロット解析は、第II章に示した方法に従って行った。

III-3-9. 形質転換植物を用いた表現型の解析

III-3-9-1. 表現型の解析に用いた形質転換植物

GVG 転写誘導系および *RD29A* プロモーターの制御下で *AZF1* や *AZF2* を発現誘導した形質転換植物の表現型解析には、T2 植物を使用した。

AZF1pro:AZF1 および *AZF2pro:AZF2* を導入した形質転換シロイヌナズナの表現型の解析には、T3 ホモ導入型の植物を用いた。自家受粉により得られる T2 種子の形質転換出現比率がメンデルの法則に従うことに準拠して、以下の手順で T3 ホモ系統株を選抜した。

1. T2 種子を GMK 寒天培地上で薬剤選抜して、カナマイシン耐性または感受性を示す個体が 3 : 1 の割合で生じるラインを選抜した。
2. 上記 1 で選抜した T2 ラインの植物を自家受粉させて T3 種子を得た。得られた T3 種子を GMK 寒天培地上で薬剤選抜して、すべての個体がカナマイシン耐性を示すことを確認した。

選抜した T3 ホモ系統株の種子を GMK 寒天培地に播種して、2 週間生育させた。培地から引き抜いた植物を、24 時間水処理した後、200 mM 塩化ナトリウム水溶液で 5 時間処理した。得られた検体から RNA を抽出して、RNA ブロット解析を行うことで *AZF1* と *AZF2* の発現量を確認した。

ベクター (pGR0029 および pBI121) のみを導入した対照には、ホモ系統株を用いた。

III-3-9-2. 形質転換植物の成長の観察

*pTA7002:(AZF1/AZF2)*を導入した形質転換植物

形質転換植物(T2)とベクター(*pTA7002*)のみを導入した対照の種子を 1 μ M DEX を含む GMH 寒天培地に播種して、2 週間生育させた。DEX を含まない GMH 寒天培地で生育させた植物を無処理区とした。

形質転換植物(T2)の種子を GMH 寒天培地に播種して、2 週間生育させた。植物体を 10 μ M DEX を含む MS 寒天培地(スクロースを添加していない GM 寒天培地)に移して、さらに 1 週間生育させた。DEX 処理後の植物体を、培養土を入れたポットに移植して、さらに 3 週間生育させた。播種後 6 週齢の植物体を土から引き抜いて、地上部の長さを測定した。対照のため、ベクター(*pTA7002*)のみを導入した植物を用いて同様の操作を行った。DEX を含まない MS 寒天培地を用いて同様に生育させた植物体を無処理区とした。

*RD29Apro:(AZF1/AZF2)*を導入した形質転換植物

形質転換植物(T2)の種子を GMK 寒天培地に播種して 2 週間生育させた後、植物体の形態を観察した。対照のため、ベクター(*pBI121*)のみを導入した植物を用いて同様の操作を行った。

*AZF2pro:AZF2*を導入した形質転換植物

形質転換植物(T3)の種子を GM 寒天培地に播種して、2 週間生育させた。7 個体を新規な GM 寒天培地に移して、さらに 1 週間生育させた。播種後 3 週齢の植物体の形態を観察して、葉柄の長さを測定した。これらの植物体を、培養土を入れたポットに移植して、さらに 3 週間生育させた。播種後 6 週齢の植物体を土から引き抜いて、各個体の地上部の長さを測定した。対照のため、ベクター(*pGreen0029*)のみを導入した植物を用いて同様の操作を行った。

III-3-9-3. 形質転換植物を用いた塩ストレス感受性の評価

*pTA7002:(AZF1/AZF2)*を導入した形質転換植物では、形質転換体(T2)と対照(*pTA7002*)の種子を GMH 寒天培地に播種して、本葉の第 2 葉が展開するまで 10

日程度生育させた。20 個の植物体を寒天培地から引き抜いて、1 μ M DEX と 175 mM 塩化ナトリウムを含む 0.5xMS 寒天培地に移した。形質転換体と対照の塩感受性に差が確認されるまで 7 日程度生育させた。塩化ナトリウムを含まない 0.5xMS (1 μ M DEX) 寒天培地に移して生育させた植物を無処理区とした。

AZF2pro:AZF2 を導入した形質転換植物では、形質転換体 (T3) と対照 (pGreen0029) の種子を GM 寒天培地に播種した。*RD29Apro:(AZF1/AZF2)* を導入した形質転換植物では、形質転換体 (T2) と対照 (pBI121) の種子を GMK 寒天培地に播種した。植物体は、本葉の第 2 葉が展開するまで 10 日程度生育させた。20 個の植物体を寒天培地から引き抜いて、175 mM 塩化ナトリウムを含む 0.5xMS 寒天培地に移した。形質転換体と対照の塩感受性に差が確認されるまで 10 日程度生育させた。塩化ナトリウムを含まない 0.5xMS 寒天培地に移して生育させた植物を無処理区とした。

0.5xMS 寒天培地は、2.35 g/l ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類、56 μ g/l B5 ビタミン、1.0 g/l MES、8.0 g/l Bacto Agar (Becton Dickinson and company) を混合した水溶液に水酸化カリウムを加えて、pH 5.7 に調整した。

本研究では、すべての形質転換体において、常に独立した 3 ラインを塩感受性試験に用いた。また、各形質転換体の塩感受性試験は、3 回以上行った。植物の塩感受性においては、塩ストレス下で頂芽が白くなった個体を枯死した個体として判断した。各形質転換体と対照において、塩ストレス下で頂芽が白くない個体の数から、それぞれの植物の生存率の平均値と標準偏差を算出した。形質転換体と対照の生存率の差を Student's t-test で検定して、形質転換体の塩感受性を評価した。

III-3-10. マイクロアレイ解析

AZF2pro:AZF2 を導入した形質転換体 (T3) と対照 (pGR0029) の種子を GM 寒天培地に播種した。III-3-6 と同様の操作をして、マイクロアレイ解析用の検体を調製した。マイクロアレイ解析は、第 II 章に示した方法に従って行った。

III-3-11. RT-PCR 法による解析

III-3-11-1. RT-PCR法による解析に用いた植物の調製

形質転換植物の T3 種子を GM 寒天培地に播種して 2 週間生育させた。植物体を 24 時間水処理した後、200 mM 塩化ナトリウム水溶液で 5 時間処理した。植物体を液体窒素で凍結して検体とした。検体には、約 100 mg 分の植物を用いた。植物体を 29 時間水処理することで無処理区を得た。

III-3-11-2. cDNAの調製

SuperscriptIII Reverse Transcriptase(Invitrogen)を用いて、全 RNA から cDNA を調製した。反応液の組成は、0.5 μ g RNA、1 \times First Strand Buffer、5 mM DTT、0.5 mM dNTP 混合液、37.5 ng random primers(Invitrogen)、50 unit SuperscriptIII Reverse Transcriptase/総量 5 μ l とした。反応条件は、25 $^{\circ}$ C で 5 分間、50 $^{\circ}$ C で 1 時間、70 $^{\circ}$ C で 15 分間とした。

III-3-11-3. 定量RT-PCR法

定量的 RT-PCR 法には、SYBR Green Ex Taq(TaKaRa)を用いた。サーマルサイクラー装置は、7500 Fast Real-Time PCR System(Applied Biosystems)を用いた。反応液の組成は、1 μ g cDNA、0.2 μ M プライマー、1 \times ROX Reference Dye II、1 \times SYBR Premix Ex Taq/総量 10 μ l とした。反応条件は、95 $^{\circ}$ C で 10 秒間、(95 $^{\circ}$ C で 5 秒間、60 $^{\circ}$ C で 35 秒間)を 40 回、95 $^{\circ}$ C で 15 秒間、60 $^{\circ}$ C で 1 分間、95 $^{\circ}$ C で 15 秒間とした。表 2 に示したプライマーを用いて PCR 反応を行った。また、各検体における 18S rRNA 由来の PCR 産物の測定値を内部標準として用いた。すべての反応は、連続して 3 回行っており、それらの値の平均値と標準偏差を解析に用いた。

III-3-11-4. RT-PCR法

表 2 に示したプライマーを用いて、cDNA を鋳型として PCR 反応を行った。反応液の組成は、1 μ g cDNA、1 \times 緩衝液、0.1 μ M プライマー、0.2 mM dNTP 混合液、0.25 unit Ex Taq polymerase (TaKaRa)/総量 12 μ l とした。反応条件は、94 $^{\circ}$ C で 4 分間、

(94 °C で 10 秒間、55 °C で 15 秒間、72 °C で 1 分間/1 k 塩基)を 35 回、72 °C で 5 分間とした。

III-3-12. 組換えタンパク質の発現および精製

AZF1 と AZF2 の CDS 断片、270–579 塩基と 288–573 塩基の領域を、それぞれマルトース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質発現用のベクターに導入した (III-3-3)。pMAL-AZF1b および pMAL-AZF2b を大腸菌 BL21 (DE3) に導入した。形質転換した菌体を 330 ml Rich broth 液体培地 (10 g/l Bacto Trypton、5 g/l Bacto Yeast Extract、5 g/l 塩化ナトリウム、2 g/l グルコース) に植菌して、30 °C で培養した。OD₆₀₀ が 0.4–0.6 になった時点で、終濃度が 0.3 mM になるように IPTG を加えた。さらに 30 °C で 3 時間培養して、大腸菌内でタンパク質の発現を誘導した。4 °C、4000 g で 15 分間遠心して集菌した。得られたペレットを氷冷した 20 ml カラム緩衝液 [20 mM Tris-HCl (pH 8.0、和光純薬工業)、10 μM ZnSO₄ (和光純薬工業)、1 μM DTT、0.02% Tween20] に懸濁した。懸濁液を凍結融解した後、超音波破碎して菌体を溶菌させた。4 °C、9000 g で 30 分間遠心して、上清 (可溶成分) を分取した。上清をアミロースレジン (NEW ENGLAND BioLabs) と混合した後、レジンをカラム緩衝液で洗浄した。レジンに溶出緩衝液 [20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 μM ZnSO₄、1 μM DTT、0.02% Tween20、10 mM マルトース (和光純薬工業)] を加えて、融合タンパク質を溶出させた。精製したタンパク質を SDS-PAGE により展開した後、クマシー染色により確認した。

III-3-13. ゲルシフト法

SAUR20 および SAUR63 の翻訳開始点から上流 1030 塩基を、それぞれ 4 分割した DNA 断片 [G1 (-1030 から -751)、G2 (-780 から -501)、G3 (-530 から -251)、G4 (-280 から -1) 塩基] をプローブ DNA として用いた。III-3-3 で調製した pSK-SAUR20-G および pSK-SAUR63-G を *Hind*III または *Xho*I で処理して、DNA 断片を切り出した。

得られた断片を精製してプローブ DNA として用いた。プローブ DNA 断片の RI 標識には、Klenow Fragment (TaKaRa) を用いた。標識反応液の組成は、100 ng プローブ DNA 断片、1xKlenow 緩衝液、25 mM dATP/dGTP/dTTP、2 μ l [α - 32 P] dCTP、4 units Klenow Fragment/総量 20 μ l とした。反応液を 37 °C で 30 分間静置した。反応液をスピンカラム illustra MicroSpin S-200 HR columns (GE ヘルスケア) に通して、RI 標識した DNA 断片を精製した。MBP-AZFb タンパク質と標識プローブの結合反応液の組成は、10–200 ng MBP-AZFb タンパク質、20,000 dpm プローブ DNA、結合緩衝液 [25 mM HEPES-KOH (pH 7.6)、40 mM KCl、1 mM DTT、0.01 mM ZnCl₂]、10% グリセロール、1 μ g poly (dl-dC)、1% BSA/総量 25 μ l とした。結合反応は、室温で 20 分間行った。競合反応では、標識プローブに対して約 10、30、100 倍量の非標識プローブを加えた。結合反応液を、0.5xTBE [5.4 g/l Tris、2.75 g/l ホウ酸、1 mM EDTA (pH 8.0)] 中で、6% ポリアクリルアミドゲルを用いて 150 V で 90 分間泳動した。ポリアクリルアミドゲルをハイブリバッグ内に封入して、ImagePlate に密着させて数日間露出した。記録された標識 DNA プローブのシグナルをフルオロ・イメージアナライザー FLA-7000 で検出した。

III-3-14. 分子系統解析

SAUR に関する報告を参考にして (Paponov et al., 2008)、Phytozome や SALAD DATABASE から、シロイヌナズナの SAUR タンパク質を 66 個抽出した。SAUR のアミノ酸配列をアライメントして、相同性の高い領域を用いて分子系統樹を作成した。分子系統樹の作成は、第 II 章に示した方法に従って行った。

III-3-15. T-DNA 挿入変異植物

III-3-15-1. T-DNA 挿入変異植物体の単離

各遺伝子の T-DNA 挿入変異植物体を Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) から入手した (Sessions et al., 2002、Alonso et al., 2003)。播種後 2 週間生育させた植物体からロゼット葉を 1 枚切り取り、その葉を凍結粉碎した。葉の粉碎

物に 50 μ l DNA 抽出液[400 mM 塩化ナトリウム、5 mM EDTA、20 mM Tris-HCl(pH 8.0)、0.3% SDS(SGMA)、200 μ g/ml Protease K]を加えて、55 $^{\circ}$ C で 2 時間静置した。得られたゲノム DNA の抽出液を PCR 反応の鋳型に用いた。表 2 に示したプライマーを用いて、ゲノム DNA を鋳型に PCR 反応を行い、T-DNA の挿入された個体(ヘテロ接合体)を単離した。反応液の組成は、0.5 μ l ゲノム DNA 抽出液、1xAmpdirect Plus(島津製作所)、0.25 μ M プライマー、0.25 unit *Ex Taq* polymerase/総量 10 μ l とした。反応条件は、95 $^{\circ}$ C で 5 分間、(95 $^{\circ}$ C で 20 秒間、55 $^{\circ}$ C で 20 秒間、72 $^{\circ}$ C で 1 分間/1 k 塩基)を 35 回、72 $^{\circ}$ C で 1 分間とした。

ヘテロ接合体を自家受粉させて得られた種子を GM 寒天培地に播種して、上記の PCR 法によりホモ接合体 *azf1*、*azf2*を選抜した。

III-3-15-2. 二重変異体(*azf1 azf2*)の作出

III-3-15-1 で単離した単一変異体をそれぞれ人工的に交配して、多重変異体を作出した。交配する変異体を培養土を入れたポットでそれぞれ生育させた。雌親として用いる個体の花序から、開花直前の花を選び、その蕾から、がく片、花弁、雄しべを順にピンセットで取り除いた。花粉親として用いる個体から開花中の花を選び、がく片と花弁を取り除いた。取り出した雄しべの葯の裂開面を、先に用意した雌しべの柱頭に接触させて、雌親の個体を受粉させた。成熟した鞘より回収した種子を GM 寒天培地で栽培した。ここで得られた植物体がヘテロ接合体であることを PCR 法で確認した。ヘテロ接合体の自家受粉により得られた種子を栽培して、PCR 法によりホモ接合体を選抜した。選抜したホモ変異体 *azf1 azf2* から次世代の種子を採取して、それらの種子を実験に用いた。

III-3-15-3. 変異植物の表現型の解析

変異体と野生型株の植物を III-3-9-2 で示した *AZF2:proAZF2*を導入した植物と同様に生育させた。変異体と野生型株において 6 週齢の植物体の地上部の長さを測定した。変異体と野生型株の塩ストレス処理は、GM 寒天培地を用いて III-3-6 と同様に

行った。

III-4 結果

III-4-1. AZF1 および AZF2 の植物体における発現部位の解析

AZF1 や AZF2 のプロモーターの制御下で、AZF1-sGFP および AZF2-sGFP 融合遺伝子をそれぞれ発現した形質転換植物を作出した(図 8A)。この形質転換植物体における GFP 蛍光を観察した。AZF1-sGFP および AZF2-sGFP の蛍光は、主に根の成熟領域の表皮細胞において観察されたが、分裂領域や伸長領域では検出されなかった(図 8B、C)。一方、ABA 処理下では、AZF2-sGFP の蛍光が根端で観察された(図 8B)。AZF2-sGFP の蛍光は、塩ストレスや ABA で処理した植物の葉で観察された(図 8D)。AZF2-sGFP は、塩ストレス下では葉の表皮と孔辺細胞で、ABA 処理下では孔辺細胞で特異的に蓄積することが示された(図 8D)。AZF1-sGFP の蓄積は、塩ストレスや ABA 処理で誘導されなかった。また、AZF2-sGFP の GFP 蛍光と DAPI による核の染色を観察して、AZF2-sGFP が細胞内の核に局在していることを確認した(図 8E)。

III-4-2. GVG 転写誘導系の制御下で AZF1 および AZF2 を過剰発現した植物の表現型の解析

GVG 転写誘導系で AZF1 および AZF2 を発現誘導した形質転換植物 (*pTA7002:AZF1/AZF2*)を用いて、AZF1 や AZF2 の一過的な過剰発現が、植物に与える影響を解析した。解析には、DEX 処理下で AZF1 や AZF2 の強い誘導を示したライン(*pTA7002:AZF1-a, b, c* および *AZF2-a, b, c*)を用いた(図 6B、C)。はじめに、GVG 転写誘導系の制御下で AZF1 や AZF2 を過剰発現した植物の成長を観察した。*pTA7002:AZF1* と *pTA7002:AZF2* の T2 種子を、1 μ M DEX を含む GM 寒天培地上に播種して、2 週間生育させた。*pTA7002:AZF1* と *pTA7002:AZF2* の植物は、顕著に矮化して、葉柄の湾曲を示した(図 9A)。また、GMH 寒天培地上で播種後 3 週間生育

させた対照、*pTA7002:AZF1*、*pTA7002:AZF2* の植物体を、10 μ M DEX 水溶液で 24 時間処理した。DEX 処理した植物体を培養土に移してさらに 3 週間生育させたところ、AZF1 や AZF2 の過剰発現体は、対照に比べて顕著な成長遅延を示した(図 9B、C)。一方、無処理区では、*pTA7002:AZF1*、*pTA7002:AZF2* 植物および対照は同様の生育を示した。

III-4-3. GVG 転写誘導系の制御下で AZF1 および AZF2 を過剰発現した植物の塩ストレス感受性の評価

DEX 処理下の *pTA7002:AZF1* および *pTA7002:AZF2* 植物の塩ストレス耐性を評価するために、4 種類の培地(1 μ M DEX と 0 mM NaCl)、(1 μ M DEX と 175 mM NaCl)、(0 μ M DEX と 0 mM NaCl)、(0 μ M DEX と 175 mM NaCl)を作製した(図 10A、C)。*pTA7002:AZF1* および *pTA7002:AZF2* の植物体は、培地(1 μ M DEX と 175 mM NaCl)の条件下で、塩ストレスに対して高感受性を示した(図 10A-D)。これらの形質転換植物は、DEX を含まない培地では、対照と同様の塩ストレス感受性を示した。一方、培地(1 μ M DEX と 0 mM NaCl)の条件下では、*pTA7002:AZF1-c*、*AZF2-a*、*AZF2-c* のラインで、頂芽が白くなり枯死する個体が確認された。

III-4-4. RD29A プロモーターの制御下で AZF1 および AZF2 を発現した植物の塩ストレス感受性の評価

ストレス誘導性の *RD29A* プロモーターを用いて、*AZF1* や *AZF2* を発現した形質転換植物(*RD29Apro:AZF1/AZF2*)を作出した(図 11A、E)。*RD29Apro:AZF1/AZF2* と対照において、*AZF1* や *AZF2* の塩ストレス誘導性を比較解析した。これらの形質転換植物では、解析に用いた 16 ラインのうち、それぞれ 8 ラインで導入遺伝子の強い誘導が確認された。得られた 8 ラインから 3 ライン(*RD29Apro:AZF1-a*、*b*、*c* および *RD29Apro:AZF2-a*、*b*、*c*)を選び、表現型の解析に用いた(図 11B、F)。*RD29Apro:AZF1/AZF2* の植物体は、対照に比べて強い塩ストレス感受性を示した(図 11C、D、G、H)。無処理区では、形質転換植物と対照の生育に差は見られなかった。また、*RD29Apro:AZF1/AZF2* 植物を用いて乾燥耐性試験を行ったところ、形質転

換植物は、対照と同様の感受性を示した(資料未記載)。

III-4-5. *AZF2* プロモーターの制御下で *AZF2* を発現した植物の塩ストレス感受性の評価

AZF1 や *AZF2* のプロモーター領域により *AZF1* および *AZF2* を発現した植物 (*AZFpro:AZF1/AZF2*) を作出した(図 12A)。各遺伝子の形質転換植物において、乾燥や塩ストレス下における導入遺伝子の発現量を比較解析した。*AZF2pro:AZF2* 植物では、24 ラインのうち、6 ラインは対照に比べて強い *AZF2* の塩ストレス誘導性を示した。一方、*AZF1pro:AZF1* 植物では、対照に比べて導入遺伝子の発現量が多いラインは得られなかった(資料未記載)。得られた 6 ラインの *AZF2pro:AZF2* 植物(T2 世代)から T3 ホモ導入型のラインを作製した。これらの T3 ラインの中から、塩ストレス下で対照に比べて顕著に強い *AZF2* の誘導を示す 3 ライン(*AZF2pro:AZF2-a, b, c*)を選抜して、種々の解析に用いた(図 12B)。これら T3 ホモ導入型の *AZF2pro:AZF2* 植物は、対照に比べて顕著に強い塩ストレス感受性を示した(図 12C、D)。

III-4-6. *RD29A* や *AZF2* プロモーターの制御下で *AZF1* および *AZF2* を発現した植物の成長の観察

RD29Apro:AZF1/AZF2 の植物体は、GMK 寒天培地上で対照と同様に成長した(図 13A)。*AZF2pro:AZF2* 植物は、GM 寒天培地、および培養土において、対照と同様に成長した(図 13B-E)。

III-4-7. *AZF1* および *AZF2* を過剰発現した植物の遺伝子発現パターンの解析

塩ストレス下の *AZF2pro:AZF2* 植物と対照の遺伝子発現パターンをマイクロアレイ解析により比較解析した。200 mM 塩化ナトリウム水溶液で 5 時間処理した *AZF2pro:AZF2* 植物では、対照に比べて 89 個の遺伝子の発現量が、2 倍以上に減少していた(表 3)。これに対して、発現量が 2 倍以上に増加した遺伝子は、*AZF2* を除いて 27 個であった(表 4)。これら 89 個の遺伝子には、野生型株において ABA 処理や塩ストレスで発現量が減少する遺伝子が、31 および 27 個含まれていた(Fujita et

al., 2009)。また、これら 89 個の遺伝子には、DEX 処理下の *pTA7002:AZF1* または *pTA7002:AZF2* 植物で発現量が減少した遺伝子が、それぞれ 24 個含まれていた。それら 24 個の遺伝子のうち、18 個は共通の遺伝子であった(表 3)。AZF1 や AZF2 の過剰発現体で、対照と比較して mRNA の蓄積量が減少した遺伝子群の各種ストレスおよび植物ホルモン応答性を発現データベース: Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp>) を用いて解析した。AZF2*pro*:AZF2 の植物では、発現量が減少した 89 個の遺伝子を解析に用いた。*pTA7002:AZF1/AZF2* の植物では、発現量の減少割合が大きい上位 100 個の遺伝子を解析に用いた。AZF1 や AZF2 の過剰発現体で発現量が減少した遺伝子群は、ABA、乾燥、浸透圧ストレス処理で発現量が減少する傾向を示した(図 14A)。また、これらの遺伝子群には、オーキシン誘導性の遺伝子が含まれていた。同様にして、AZF1 や AZF2 の過剰発現体において発現量が増加した遺伝子群の環境ストレス応答性を解析した(図 14B)。AZF1 や AZF2 の過剰発現により発現量が増加した遺伝子群には、共通したストレス応答性が見られなかった。また、無処理(水処理)の AZF2*pro*:AZF2 植物で対照に比べて発現量が減少した遺伝子群は、共通したストレス応答性を示さなかった(資料未記載)。

AZF1 や AZF2 の過剰発現体で発現量が減少した遺伝子群の機能を分類した。遺伝子の機能は、The Arabidopsis Information Resource Gene Ontology annotation search tool (<http://www.arabidopsis.org/tools/bulk/go/index.jsp>) と Pfam batch sequence search tool (<http://pfam.janelia.org/search#tabview=tab1>) から得られた情報を参考にして分類した。AZF2*pro*:AZF2 の植物では、発現量が減少した 89 個すべての遺伝子の機能を分類した(図 14C)。*pTA7002:AZF1/AZF2* の植物では、発現量の減少量が大きい上位 100 個の遺伝子の機能を分類した(図 14D、E)。AZF1 や AZF2 の過剰発現体で発現量が減少した遺伝子群には、主に、mRNA の転写や糖代謝、脂質代謝、二次代謝等に関与する遺伝子が含まれていた。

III-4-8. AZF1 および AZF2 の下流遺伝子の発現解析

AZF1 および AZF2 の過剰発現体で共通に発現量が減少した遺伝子には、多数の SAUR 遺伝子が含まれていた(表 3)。表 3 に含まれる SAUR の中から、SAUR16、-20、-21、-26、-63 を AZF1 と AZF2 の下流遺伝子として選択した。塩ストレス下の AZF2*pro*:AZF2 の植物と、対照におけるこれら 5 個の SAUR の mRNA の蓄積量を定量 RT-PCR 法で解析した(図 15)。AZF2 を高発現した形質転換植物では、対照に比べて、解析に用いた全ての SAUR の発現が顕著に減少していた。

III-4-9. AZF1 および AZF2 とゲノム DNA の相互作用の解析

AZF1 や AZF2 のタンパク質断片として、DNA との結合に必須な zinc-finger モチーフを含む AZF1b(90-193 a.a.)および AZF2b(96-191 a.a.)を用いた(図 16A、C)。DNA との結合反応には、AZF1b および AZF2b と MBP の融合タンパク質(MBP-AZF1b/AZF2b)を用いた。融合タンパク質 MBP-AZF1b/AZF2b と SAUR63 のプローブ G4(-280 から-1 塩基)と SAUR20 のプローブ G2(-780 から-501 塩基)を用いてゲルシフト解析を行った。MBP-AZF1b と RI 標識した各 DNA プローブの混合液を泳動した結果、単体の標識化プローブと比較して移動度の異なるバンドが検出された(図 16B)。MBP-AZF2b と各標識化プローブの混合液も移動度の異なるバンドを示した(図 16D)。一方、MBP とこれらの標識化プローブの混合液では、バンドの移動度の変化は検出されなかった。また、非標識のプローブ(SAUR63-G4、SAUR20-G2)を用いて競合実験を行った。MBP-AZF1b/AZF2b と標識化プローブの混合液で検出された移動度の異なるバンドは、過剰量の競合プローブの添加により消失した。

III-4-10. SAUR ファミリーの分子系統解析

分子系統解析の結果から、SAUR ファミリーは、大きく 3 個のクラスに分類された(図 17)。塩ストレス下の AZF2*pro*:AZF2、および DEX 処理下の *pTA7002*:AZF2、*pTA7002*:AZF1 の植物体で発現量が減少した SAUR に、それぞれ赤、緑、黄色の印を付けた。AZF1 や AZF2 の過剰発現体で発現量が減少した SAUR は 27 個あり、ファミリー全体の約 4 割に相当した。さらに、それら 27 個の遺伝子のうち 25 個がクラ

ス I と II に属していた。クラス III は、最も多くの遺伝子から構成されるが、その中で *AZF1* や *AFF2* により発現の制御を受ける *SAUR* は 2 個であった。

III-4-11. *SAUR* ファミリー遺伝子の発現パターンの解析

シロイヌナズナの根と地上部における *SAUR* ファミリー遺伝子の発現パターンを、eFP browser (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) を用いて解析した(図 18A)。クラス I と II の *SAUR* の発現量は、根に比べて地上部で相対的に多い傾向を示した。クラス III に属する *SAUR* の発現量は、地上部に比べて根で多かった。また、Genevestigator を用いて *SAUR* の各種ストレスに対する発現パターンを比較解析した。その結果、クラス I と II に属する *SAUR* の発現は、オーキシンで誘導され、ABA 処理や浸透圧ストレスで抑制されることが示された(図 18B)。一方、クラス III に属する *SAUR* は、オーキシンや浸透圧ストレスに対して特徴的な発現応答を示さないことが示唆された。

III-4-12. *AZF1* と *AZF2* の機能欠損変異体の解析

AZF1 および *AZF2* の T-DNA 挿入変異植物体を ABRC からそれぞれ 1 アリルずつ入手した(図 19A)。変異体 *azf1*、*azf2*、*azf1 azf2* において、*AZF1* および *AZF2* の発現が抑制されていることを RT-PCR 法により確認した(図 19B)。これらの単一変異体と二重変異体は、GM 寒天培地や培養土において、野生型株と同様の成長および発達を示した(図 19C、D)。

無処理および塩ストレス下の変異体と野生型株において、*SAUR63* と *SAUR16* の mRNA の蓄積量を定量 RT-PCR 法により解析した。二重変異体 *azf1 azf2* では、対照や単一変異体 *azf1*、*azf2* に比べて、塩ストレスによる *SAUR63* と *SAUR16* の発現量の低下が顕著に小さくなっていた。(図 19E)。

azf1、*azf2*、*azf1 azf2* の各種ストレスへの感受性を評価した。これらの変異体を、III-4-5 の *AZF2pro:AZF2* 植物と同様に塩ストレス下で生育させた結果、*azf1 azf2* では野生型株と比べて頂芽の白化が遅く、根の伸長が持続した。一方、これらの表現型は

個体間でのばらつきが大きく、統計的に有意な差を出すことができなかった。乾燥、高塩、浸透圧、低温、高温、酸化ストレス、カリウム欠乏、リン欠乏など種々のストレス下における変異体と野生型株の感受性を観察したが、顕著な差は見られなかった(資料未記載)。また、変異体 *azf1 azf2* は、アブシシン酸、オーキシン、サリチル酸、ジャスモン酸メチル、1-N-ナフチルフタル酸アミドなどの植物ホルモンの処理下で野生型株と同様の生育を示した(資料未記載)。

III-5. 考察

植物では、乾燥、塩、低温などの環境ストレスに応答して、多数の遺伝子の発現が誘導、または抑制されることが報告されている(Hoth et al., 2002、Seki et al., 2002、Takahashi et al., 2004)。ABA は、植物の環境ストレス応答に関わる多数の遺伝子の発現を制御しており、植物の環境ストレス耐性の獲得において重要なホルモンである(Finkelstein et al., 2002、Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006)。AREB1、AREB2、ABF3 は、ABA 応答性シス因子 ABRE に結合する転写活性化因子である。これらの転写因子は、SnRK2D、SnRK2E、SnRK2I などのタンパク質リン酸化酵素により ABA 依存的に活性化される(Choi et al., 2000、Uno et al., 2000、Furihata et al., 2006)。C2H2 型 zinc-finger 遺伝子である *AZF2* は、プロモーター領域に ABRE 配列(PyACGTGG/TC)を持ち、ABA により発現が顕著に誘導された(図 4)。*AZF2* タンパク質の蓄積は、ABA 処理により根端や孔辺細胞で誘導された(図 8)。よって、*AZF2* タンパク質は、ABA シグナル下で植物の環境ストレス応答に関与していると考えられる。*AZF2* の発現量は、*SnRK2* や *AREB* の三重変異体 *srk2d srk2e srk2i* や *areb1 areb2 abf3* において顕著に減少することが報告されている(Fujita et al., 2009、Yoshida et al., 2010)。*AZF2* の発現は、ABA 依存的な経路下では、主に AREB により制御される可能性が高いと考えられる。一方、*AZF2* タンパク質の蓄積が、塩ストレス下で孔辺細胞だけでなく葉の表皮で観察されたことから、*AZF2* の発現は、ABA に非依存的な経路による制御も受けると考えられた。

AZF1 や *AZF2* は、塩や浸透圧ストレスで発現が誘導され、植物のストレス応答に

何らかの役割を担っていると考えられる。*AZF1* や *AZF2* を GVG 転写誘導系の制御下で過剰発現した植物は、矮化して成長が抑制された(図 9)。この結果は、*ZAT10* や *ZAT7* など C2H2 型 zinc-finger 遺伝子を過剰発現した植物が示す表現型と類似しており(Sakamoto et al., 2004、Mittler et al., 2006、Ciftci-Yilmaz et al., 2007)、*AZF1* と *AZF2* が、塩や乾燥ストレス下の植物の成長制御に関与することが示唆された。乾燥や、塩、低温ストレス下の植物では、糖代謝や光合成に関与する遺伝子群の発現量は減少することが報告されている(Seki et al., 2002)。*AZF1* や *AZF2* の過剰発現体では、糖代謝や脂質代謝に関係する遺伝子の発現量が減少していた(図 14C-E)。また、GVG 転写誘導系を用いて *AZF1* や *AZF2* を過剰発現した植物では、多数の光合成関連遺伝子の発現量が減少していた(資料未記載)。これらの遺伝子の発現量の減少が、*AZF1* や *AZF2* の過剰発現による植物の成長抑制に関係していると考えられた。

ZAT10、*ZAT12*、*ZAT7* は、乾燥、塩、浸透圧ストレス下の植物にストレス耐性を付与すると考えられている(Sakamoto et al., 2004、Davletova et al., 2005、Ciftci-Yilmaz et al., 2007)。よって、STZ ファミリー遺伝子である *AZF1* や *AZF2* は、植物の環境ストレス耐性の獲得に寄与すると考えられた。しかし、*AZF1* や *AZF2* を GVG 転写誘導系、および *RD29A* プロモーターの制御下で高発現させた植物体は、対照に比べて塩ストレス感受性を示した(図 10、11)。*AZF2* プロモーターの制御下で *AZF2* の発現量を増加させた植物体も、塩ストレスに対して高感受性を示した(図 12)。*AZF2pro:AZF2* 植物では、導入遺伝子の異所的な発現による影響は少ないと考えられ、*AZF2* の機能を反映した表現型を観察できた可能性がある。一方、GVG 転写誘導系で *AZF1* および *AZF2* を過剰発現した植物では、無処理区で枯死する個体が確認された(図 10)。また、*CaMV35S* プロモーターの制御下で *AZF1* および *AZF2* を発現した形質転換植物の作出は非常に困難であり、発現量が上昇した個体を得ることはできなかった。これらの結果から、*AZF1* や *AZF2* の過剰な蓄積は、細胞の正常な生理機能を阻害すると考えられた。

RD29Apro:AZF1/AZF2、および *AZF2pro:AZF2* 植物は、乾燥ストレスや ABA 処理下で、対照に比べて顕著な感受性を示さなかった。これらの過剰発現体の、塩、乾

乾燥、ABA 処理に対する感受性を包括的に評価するためには、各処理に用いる植物の成長段階の調整や、各処理下での導入遺伝子の発現量の比較解析など、より精緻な実験操作が必要であると考えられる。

AZF1 と AZF2 は、機能的な転写抑制ドメインである EAR モチーフを持っており、転写抑制因子として機能することが報告されている (Ohta et al., 2001, Sakamoto et al., 2004, Kazan, 2006)。AZF1 や AZF2 の過剰発現体における遺伝子発現パターンを解析した結果、AZF1 と AZF2 タンパク質は、浸透圧ストレスおよび ABA 処理で発現量が減少する遺伝子群の発現を負に制御することが示唆された (図 14A、15)。一方、これらの過剰発現体で発現量が増加した遺伝子群は、明確なストレス応答性を示さなかった (図 14B)。さらに、塩ストレス下の *AZF2pro:AZF2* 植物では、発現量が増加した遺伝子数 (27 個) に比べて、発現量が減少した遺伝子数 (89 個) が多かった (表 3、4)。以上の結果は、浸透圧ストレス下における AZF1 と AZF2 の転写抑制因子としての機能を反映していると考えられた。

AZF1 や AZF2 の下流遺伝子には、オーキシン処理で発現が誘導される遺伝子が含まれていた (図 14A)。塩ストレス下の *AZF2pro:AZF2* 植物では、*IAA5*、*IAA29*、*auxin-regulated gene involved in organ size (ARGOS)*、ならびに *SAUR* など、多数のオーキシン応答性遺伝子の発現が抑制されていた。*IAA/Aux* は、auxin response factor (ARF) に結合して、ARF 転写因子の働きを抑制することでオーキシンのシグナル伝達経路を制御している (Guilfoyle and Hagen, 2007)。*IAA5* は、オーキシンやブラシノステロイドで誘導される遺伝子であり、植物の成長促進に関与していると考えられている (Goda et al., 2002)。*IAA29* は、オーキシンを介した植物の伸長成長に関与しており、植物の日陰回避反応に寄与していると考えられている (Tao et al., 2008)。*ARGOS* は、オーキシンのシグナル伝達因子として働いて、植物の細胞増殖や器官形成に関与することが報告されている (Hu et al., 2003)。*SAUR* は、シロイヌナズナにおいて 70 個以上のホモログを持っており、多くの植物種に保存されている (Paponov et al., 2008)。*SAUR* は、オーキシン処理したダイズ胚軸で強く誘導される RNA として単離された (McClure and Guilfoyle, 1987)。*SAUR* は、オーキシンによる発現誘導や、

植物体における発現組織の解析結果から、細胞伸長に関与していると考えられている (Gee et al., 1991、Knauss et al., 2003)。シロイヌナズナの *SAUR* ファミリー遺伝子は、大きく 3 つのクラスに分類された (図 17)。クラス I と II には、オーキシン誘導性の *SAUR* が多く含まれていた (図 18B、Redman et al., 2004、Nemhauser et al., 2006、Paponov et al., 2008)。よって、*AZF1* および *AZF2* の過剰発現による植物体の成長阻害は (図 9)、*SAUR* などのオーキシン応答性遺伝子の発現量の減少と関係があると考えられた。しかし、植物の成長や発達における、オーキシン応答性遺伝子の具体的な機能は解明されていない。*SAUR* を含めて、オーキシン応答性遺伝子に関する今後の解析が期待される。

塩ストレス下の *AZF2pro:AZF2* 植物と変異体 *azf1 azf2* における *SAUR* の発現量を解析した結果 (図 15、19E)、*AZF1* と *AZF2* がクラス I と II に属する *SAUR* の発現を制御している可能性が強く示唆された。クラス I と II に属する *SAUR* の植物における発現部位、ならびに浸透圧ストレス応答性も、これらの遺伝子が *AZF1* と *AZF2* の下流遺伝子であることを支持した (図 18)。ゲルシフト解析の結果、*AZF1* および *AZF2* の zinc-finger モチーフを含むタンパク質断片が、*SAUR63* と *SAUR20* のプロモーター領域に結合することが示された (図 16)。塩ストレス下の *AZF2pro:AZF2* 植物で発現量が変化した遺伝子の中には、既知のオーキシン合成関連遺伝子や、オーキシン応答性遺伝子の発現を制御する遺伝子は含まれていなかった。よって、*SAUR63* と *SAUR20* は、*AZF1* と *AZF2* の標的遺伝子であると考えられた。

AZF1 のストレス誘導性が弱いことから、環境ストレス下の遺伝子発現における *AZF1* の寄与は小さいと考えられた。しかし、塩ストレス下の変異体 *azf1*、*azf2*、*azf1 azf2* における *SAUR* の発現量を解析した結果 (図 19E)、*AZF1* と *AZF2* は塩ストレス下で相補的に機能することが示唆された。よって、各種ストレスやホルモン処理下における *azf1 azf2* 植物の表現型を解析したが、*AZF1* と *AZF2* の機能欠損による植物のストレス応答への明確な影響は確認されなかった。

azf1 azf2 が明確な表現型を示さなかった理由としては、*AZF1* や *AZF2* の機能が、STZ ファミリーおよびそれらに相同性の高い C1-2i 型 zinc-finger ファミリーのタンパク

質により相補されることが考えられた。先行研究により、AZF1 と AZF2、および ZAT10 は 2 個の A(G/C)T 配列に結合することが報告されている (Sakamoto et al., 2004)。ペチュニアの ZPT2 型タンパク質と結合配列の親和性には、2 個の A(G/C)T 間の配列の塩基の数と組み合わせと、各タンパク質の zinc-finger モチーフ間の長さが影響することが指摘されている (Takatsuji, 1999, Sakamoto et al., 2004)。さらに、ZPT2 型タンパク質と結合配列の親和性は、A(G/C)T 間の距離に依存するが、その距離にはある程度のゆとりがあることが示されている (Takatsuji, 1999)。よって、ZAT10 に相同性の高いタンパク質の DNA 配列の認識には、以下に示す特徴があると考えられる。

- (1) 各 zinc-finger タンパク質は、個々に強い親和性を示す結合配列を持っている。
- (2) 各 zinc-finger タンパク質が認識するコア配列間の距離には、ある程度のゆとりがある。

この場合、AZF1 や AZF2 の過剰発現体では、AZF1 や AZF2 は、各タンパク質に親和性の高い配列を持つ遺伝子のプロモーター領域に優先的に結合して、遺伝子発現を抑制する。その結果、AZF1 および AZF2 の機能獲得型植物は、明確な表現型を示したと考えられる。一方、*azf1 azf2* では、AZF1 と AZF2 による転写抑制の機能は失われるが、AZF1 や AZF2 と標的遺伝子を共有するホモログにより欠損した機能が相補される。その結果、AZF1 や AZF2 の機能欠損型植物では、明確な表現型が観察されなかったと考えられる。機能欠損型の植物を用いて、植物の環境ストレス応答における AZF1 や AZF2 遺伝子の機能を解析するためには、AZF1 や AZF2 と標的遺伝子を共有するホモログを探索する必要がある。zinc-finger 遺伝子の過剰発現体における遺伝子発現解析や、ChIP シーケンス解析などを行うことで、AZF1 や AZF2 と標的遺伝子を共有するホモログを同定することが可能であると考えられる。標的遺伝子を共有する zinc-finger 遺伝子の多重変異体を解析することで、植物の環境ストレス応答における C1-2i 型 zinc-finger 遺伝子のより詳細な機能解明が可能であると考えられる。

表 2. 本章で使したプライマーの一覧

Experiment	Name	Sequence
形質転換植物	AZF1-FW	5'-CGCGGATCCATGGCTCTCGAGACTCTCAATTC-3'
	AZF1-RV	5'-CGGGATATCTTAAGAAGTCGTCACTGAGACTTG-3'
	AZF2-FW	5'-CGCGGATCCATGGCCCTCGAAGCGATGAAC-3'
	AZF2-RV	5'-CGGGATATCTTAGATTTTAAAGATAAATCTTC-3'
	AZF1-R29-FW	5'-TGCTCTAGAATGGCTCTCGAGACTCTCAATTC-3'
	AZF1-R29-RV	5'-TCCCCCGGGTTAAGAAGTCGTCACTGAGAC-3'
	AZF2-R29-FW	5'-CGCTCTAGAATGGCCCTCGAAGCGATGAAC-3'
	AZF2-R29-RV	5'-TCCCCCGGGTTAGATTTTAAAGATAAATCTTC-3'
	AZF1p-GFP-FW	5'-TCCCCCGGGATGGCTCTCGAGACTCTCAATTC-3'
	AZF1p-GFP-RV	5'-CGCGGATCCAGAAGTCGTCACTGAGACTTGATC-3'
	AZF2p-GFP-FW	5'-TCCCCCGGGATGGCCCTCGAAGCGATGAACAC-3'
	AZF2p-GFP-RV	5'-CGCGGATCCGATTTTAAAGATAAATCTTCTTTC-3'
定量RT-PCR	18SrRNA-FW	5'-CGCGAGAAGTCCACTAAACC-3'
	18SrRNA-RV	5'-CCTACGGAACCTTGTTACGA-3'
	AZF1-qRT-FW	5'-CTCGAGACTCTCAATTCTCCAAC-3'
	AZF1-qRT-RV	5'-TCACGATACCGGAGAAGAGG-3'
	AZF2-qRT-FW	5'-TCATCAACAGTCGCAATCGT-3'
	AZF2-qRT-RV	5'-ACACTTGTACGGAAGGTTCTTTG-3'
	SAUR16-qRT-FW	5'-CCTGAATCCTGATCCTTCTTC-3'
	SAUR16-qRT-RV	5'-ATGGTGAGTCCTCCCATGTC-3'
	SAUR20-qRT-FW	5'-TCTAAGCCGCTCCACCAC-3'
	SAUR20-qRT-RV	5'-TTCTTTTGCTCTCACCTACG-3'
	SAUR21-qRT-FW	5'-TTCTTGCGGTGTACGTAGGA-3'
	SAUR21-qRT-RV	5'-TTGAAATGAAGGTTGGCTCA-3'
	SAUR26-qRT-FW	5'-GGCTTTGGTGAGAAGTCTCTTT-3'
	SAUR26-qRT-RV	5'-CGGTGCCTTGCTTGTTTT-3'
	SAUR63-qRT-FW	5'-TCCAATAAGTTATCTGAGCAACTCTG-3'
	SAUR63-qRT-RV	5'-CGTTGGGAGACCGAAATCT-3'

表 2. 続き

Experiment	Name	Sequence
ゲルシフト解析	AZF1b-FW	5'-CGGGATCCTCACCGTCCGATCACCGAG-3'
	AZF1b-RV	5'-GCTCTAGATACCGTTGTTGCCACCGTC-3'
	AZF2b-FW	5'-CGGGATCCACGCCGCCGCCAGAATCAAAG-3'
	AZF2b-RV	5'-GCTCTAGAACGCCGCCGCCAGAATCAAAG-3'
	SAUR20-G1-FW	5'-CCCAAGCTTAGAAAAGATATTTGGTGCCAG-3'
	SAUR20-G1-RV	5'-CCCAAGCTTTTGGTGATAAGGAATGTATTTACAC-3'
	SAUR20-G2-FW	5'-CCCAAGCTTATAATGTGTAAATACATTCTTATCAC-3'
	SAUR20-G2-RV	5'-CCCAAGCTTAGCTGTTCTTTTTATGATATACAC-3'
	SAUR20-G3-FW	5'-CCCAAGCTTATTTGTGTATATCATAAAAAAGGAACAG-3'
	SAUR20-G3-RV	5'-CCCAAGCTTTTAATGCAGTTTGTCTTGATGAG-3'
	SAUR20-G4-FW	5'-CCCAAGCTTTAATTATCTCATCAAGACAAACTGC-3'
	SAUR20-G4-RV	5'-CCCAAGCTTATCTATTGTTTTGTTTCGAATATTAAATTC-3'
	SAUR63-G1-FW	5'-CCCAAGCTTTTGAAGTACAAGAACGTAGTAC-3'
	SAUR63-G1-RV	5'-CCCAAGCTTAAGTTAAGGCACCATTTTTTATGAC-3'
	SAUR63-G2-FW	5'-CCGCTCGAGTCTCAGTCATAAAAAATGGTGCC-3'
	SAUR63-G2-RV	5'-CCGCTCGAGACTTATTCAGGGGACAACAAATC-3'
	SAUR63-G3-FW	5'-CCCAAGCTTCAACCAGATTTGTTGTCCC-3'
	SAUR63-G3-RV	5'-CCCAAGCTTCAGCTAATCAACTTGTGGAC-3'
	SAUR63-G4-FW	5'-CCGCTCGAGAGTTGTATAGTCCACAAGTTGATTAG-3'
	SAUR63-G4-RV	5'-CCGCTCGAGCATTTTCAGGGAGAGTTAAAGC-3'
変異体の単離	AZF1-T-FW	5'-TTCTCCAACAGCTACCACCAC-3'
	AZF1-T-RV	5'-ACGTGTACGATCCAATCATCC-3'
	AZF2-T-FW	5'-ATCCCACATGGAAGGATTCTC-3'
	AZF2-T-RV	5'-AAGCGTTTCCTTCCTATCAGG-3'
	LBb1	5'-GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT-3'
RT-PCR	AZF1-RT-FW	5'-TAGTGACGTCAGCGATGTTG-3'
	AZF1-RT-RV	5'-GTCACTGAGACTTGATCAGC-3'
	AZF2-RT-FW	5'-ATCCAATCGTCGACGAAGAG-3'
	AZF2-RT-RV	5'-AATCTTCTTTCTTGATGACTTGG-3'
	Actin2-FW	5'-GGAAAGGATCTGTACGGTAAC-3'
	Actin2-RV	5'-TGTGAACGATTCTTGAC-3'

下線は制限酵素認識部位を示している。

表 3. 塩ストレス下の *AZF2pro:AZF2* の植物体において、対照と比較して mRNA の蓄積量が 2 倍以上に減少した遺伝子

Gene name	Functional classification	Description	P-value	FCA	AZF2	AZF1	ABA	NaCl
Auxin related								
At1g15580	Transcription	IAA (INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE) 5	9.50E-03	3.1		Down	Down	Up
At4g32280	Transcription	IAA29	1.90E-02	2.4			Down	Down
At2g18010	Unknown	SAUR (SMALL AUXIN UPREGULATED) 10	1.30E-02	2.3	Down	Down	Down	Down
At4g38850	Unknown	SAUR15	9.70E-03	5.7	Down	Down		Down
At4g38860	Unknown	SAUR16	1.30E-02	2.4	Down	Down	Down	Down
At5g18010	Unknown	SAUR19	1.30E-02	3.3	Down	Down	Down	Down
At5g18020	Unknown	SAUR20	1.30E-02	2.8	Down	Down	Down	Down
At5g18030	Unknown	SAUR21	1.30E-02	3.3	Down	Down	Down	Down
At5g18050	Unknown	SAUR22	1.30E-02	3.6	Down	Down	Down	Down
At5g18060	Unknown	SAUR23	1.30E-02	3.3	Down	Down	Down	Down
At5g18080	Unknown	SAUR24	1.30E-02	3.3	Down	Down	Down	Down
At3g03850	Unknown	SAUR26	9.80E-03	3.2	Down	Down	Down	Down
At3g53250	Unknown	SAUR58	1.40E-02	6.4		Down	Down	Down
At1g29430	Unknown	SAUR62	1.30E-02	3		Down	Up	
At1g29440	Unknown	SAUR63	2.00E-02	2.8	Down	Down		
At1g29450	Unknown	SAUR64	1.30E-02	3.8	Down	Down	Down	Down
At1g29460	Unknown	SAUR65	1.30E-02	2.6	Down	Down	Down	Down
At1g29500	Unknown	SAUR66	1.50E-02	2.7	Down	Down	Down	Down
At1g29510	Unknown	SAUR67	1.20E-02	2.3	Down	Down	Down	Down
At3g59900	Unknown	AUXIN-REGULATED GENE INVOLVED IN ORGAN SIZE (ARGOS)	1.20E-02	2.8	Down	Down	Down	Down
			1.10E-02	3.1				Down

表 3. 続き

Gene name	Functional classification	Description	P -value	FCA	pTA7002: AZF2	pTA7002: AZF1	ABA	NaCl
Others								
At1g44830	Transcription	AP2 domain-containing transcription factor TINY	1.40E-02	2.1		Down	Up	
At5g65130	Transcription	AP2 domain-containing transcription factor, putative	2.00E-02	2.1	Up	Up		
At3g54340	Transcription	APETALA 3 (AP3)	2.20E-02	3				
At1g69120	Transcription	APETALA1 (AP1)	1.80E-02	2.1				
At2g04038	Transcription	Arabidopsis thaliana basic leucine-zipper 48	1.70E-02	2.3				
At2g40200	Transcription	Basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	2.10E-02	2				
At1g18400	Transcription	BR Enhanced Expression 1 (BEE1)	1.20E-02	2.2	Down		Down	Down
At5g20420	Transcription	Chromatin remodeling 42 (CHR42)	2.50E-02	3.1				
At2g15400	Transcription	DNA-directed RNA polymerase II	1.80E-02	2.8				
At1g59930	Transcription	Hypothetical protein	2.00E-02	2.5		Down		
At1g59920	Transcription	Hypothetical protein	1.20E-02	2.1		Down		
At4g31610	Transcription	REPRODUCTIVE MERISTEM 1 (REM1)	1.30E-02	2.2				
At3g28857	Transcription	Transcription regulator	1.40E-02	2.1		Down		Down
At1g30100	Unclassified metabolism	NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 5	1.70E-02	4.6	Up			
At2g15790	Unclassified metabolism	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	2.60E-02	2.5				
At3g11480	Unclassified metabolism	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase	2.40E-02	2.4				
At3g29635	Unclassified metabolism	Transferase family protein	1.60E-02	3.5				
At5g28510	Carbohydrate metabolism	BETA GLUCOSIDASE 24 (BGLU24)	1.20E-02	2.8	Down			
At2g32290	Carbohydrate metabolism	BETA-AMYLAASE 6 (BAM6)	1.30E-02	2.5			Down	Down
At2g36710	Carbohydrate metabolism	Pectinesterase family protein	2.40E-02	2.8				
At5g59320	Lipid transport	Lipid transfer protein 3 (LTP3)	8.70E-03	2.1			Up	Up
At5g59310	Lipid transport	Lipid transfer protein 4 (LTP4)	1.30E-02	2.3			Up	
At4g12480	Lipid transport	Protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein	1.90E-02	2.6	Up		Down	Down
At1g57750	Secondary metabolism	CYTOCHROME P450 96 A1	2.10E-02	2.8				
At5g02760	Secondary metabolism	Protein phosphatase 2C family protein	1.60E-02	3.8	Down	Down	Down	Down
At3g32030	Secondary metabolism	Terpene synthase/cyclase family protein	2.50E-02	3.5	Down			
At5g27850	Translation	60S ribosomal protein L18	6.40E-03	4.9			Down	
At1g34140	Translation	POLY(A) BINDING PROTEIN 1	2.20E-02	2.6				
At2g10975	Translation	Hypothetical protein	9.30E-04	56.5				
At4g04180	DNA metabolism	AAA-type ATPase family protein	9.50E-03	2.2				

表 3. 続き

Gene name	Functional classification	Description	P-value	FCA	<i>pTA7002: pTA7002:</i>			ABA	NaCl
					AZF2	AZF1			
At3g42670	DNA metabolism	CHROMATIN REMODELING 38	1.40E-02	2					
At1g06080	Lipid metabolism	Delta 9 desaturase (ADS1)	1.20E-02	2.1	Down	Down			Down
At3g14210	Lipid metabolism	ESM1 (epithiospecific modifier 1)	1.30E-02	2.1					Down
At1g09260	Molecular chaperone	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	9.50E-03	20.5					
At5g07560	Molecular chaperone	GLYCINE-RICH PROTEIN 20	1.20E-02	4.1					
At1g17810	Transport	BETA-TONOPLAST INTRINSIC PROTEIN	1.60E-02	2.1					
At3g30842	Transport	PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 10	2.10E-02	2.8					
At2g47880	Redox	Glutaredoxin family protein	1.30E-02	2.5	Down		Down	Down	Down
At2g02990	RNA metabolism	RIBONUCLEASE 1 (RNS1)	9.80E-03	2.5		Up	Up	Up	Up
At1g49570	Toxin catabolic process	Peroxidase, putative	9.50E-03	2.2					
At5g62490	Unknown	ABA-responsive protein (HVA22B)	1.30E-02	2.2					
At5g52070	Unknown	Agnet domain-containing protein	1.30E-02	3.6					
At1g35730	Unknown	Arabidopsis Pumilio 9 (APUM9)	6.50E-03	30.3					
At1g05990	Unknown	Calcium-binding protein, putative	1.50E-02	3					
At3g30720	Unknown	Expressed protein	1.30E-02	6.3	Down		Up	Up	
At3g02885	Unknown	GAST1 PROTEIN HOMOLOG 5	2.40E-02	2.3			Down	Down	Down
At1g36675	Unknown	Glycine-rich protein	7.80E-03	88.6					
At5g33390	Unknown	Glycine-rich protein	1.90E-02	3.4					
At2g27535	Unknown	Ribosomal protein L10A family protein	2.10E-02	3.3					
At2g17690	Unknown	SUPPRESSOR OF DRM1 DRM2 CMT3	2.90E-03	112.7					
At3g15310	Unknown	Expressed protein	2.10E-02	3.4	Down	Up			
At1g36580	Unknown	Unknown protein	2.90E-03	56.4					
At2g10980	Unknown	Expressed protein	1.20E-02	36.7					
At5g35480	Unknown	Expressed protein	3.10E-03	18.5			Down	Down	Down
At3g30843	Unknown	Hypothetical protein	6.20E-03	17.1					
At5g35490	Unknown	Expressed protein	3.10E-03	10.3	Down	Down	Down	Down	Down
At4g01985	Unknown	Expressed protein	2.60E-02	3.7					
At3g29638	Unknown	Expressed protein	9.80E-03	3.2					
At3g61660	Unknown	Hypothetical protein	2.30E-02	2.8					
At1g47395	Unknown	Expressed protein	2.00E-02	2.6			Down	Down	Down
At5g57760	Unknown	Expressed protein	1.70E-02	2.6			Up	Up	Down

表 3. 続き

Gene name	Functional classification	Description	P-value	FCA	AZF2	AZF1	ABA	NaCl
At2g34610	Unknown	Expressed protein	1.60E-02	2.5	Up	Up	Up	Up
At5g53390	Unknown	Expressed protein	2.00E-02	2.3				
At5g62330	Unknown	Expressed protein	1.70E-02	2.2				
At1g30190	Unknown	Expressed protein	2.00E-02	2.2				
At3g15250	Unknown	Expressed protein	2.30E-02	2				
At5g50335	Unknown	Expressed protein	2.30E-02	2				Down
At3g60090	Unknown	VQ motif-containing protein	1.30E-02	2.8	Up			
At1g80730	Unknown	ZINC-FINGER PROTEIN 1 (ZFP1)	1.40E-02	3.1				

Gene name: 全ての遺伝子をオーキシン関連遺伝子 (Auxin related) とその他 (Others) に大きく分類した。

Functional classification : 各遺伝子の機能を The Arabidopsis Information Resource Gene Ontology annotation search tool (<http://www.arabidopsis.org/tools/bulk/go/index.jsp>) と Pfam batch sequence search tool (<http://pfam.janelia.org/search#tabview=tab1>) から得られた情報に基づいて推定した。

P-value: 塩処理した AZF2pro:AZF2 の植物体と対照から調製した RNA を用いて、マイクロアレイ実験を 2 回の生物学的反復で行った。全てのプロープにおいて得られた 4 個の測定値に基づいて p 値を算出した。

FCA (Fold Change Absolute) : マイクロアレイ実験で全てのプロープにおいて得られた 4 個の測定値を比較解析することにより、AZF2pro:AZF2 の植物体における対照に対する発現比の絶対値 (FCA) を算出した。

pTA7002:AZF1, pTA7002:AZF2:DEX 処理した pTA7002:AZF1 および pTA7002:AZF2 の植物体において、対照と比較して mRNA の蓄積量が 2 倍以上に増加 (Up)、減少 (Down) した遺伝子を示す。

ABA, NaCl: ABA および NaCl 処理したシロイヌナズナの野生型株において、無処理区と比較して mRNA の蓄積量が 2 倍以上に増加 (Up)、減少 (Down) した遺伝子を示す (Fujita et al., 2009)。

表 4. 塩ストレス下の *AZF2pro:AZF2* の植物体において、対照と比較して mRNA の蓄積量が 2 倍以上に増加した遺伝子

Gene name	Functional classification	Description	P-value	FCA	pTA7002: AZF2	pTA7002: AZF1	ABA	NaCl
At5g17330	Amino acid metabolism	GLUTAMATE DECARBOXYLASE 1	3.34E-03	28.7				Down
At1g13470	Unknown	Expressed protein	9.55E-03	6.9				
At5g61740	Transport	ARABIDOPSIS THALIANA ABC2 HOMOLOG 14	1.94E-02	5.6		Down		
At3g22770	Unknown	Expressed protein	2.01E-02	3.8				
At3g19580	Transcription	ARABIDOPSIS ZINC FINGER PROTEIN 2	1.43E-02	3.1	Up		Up	Up
At1g14880	Unknown	Expressed protein	1.51E-02	2.9		Up		
At1g58120	Unknown	Expressed protein	1.97E-02	2.7				
At3g20360	Unknown	Meprin and TRAF homology domain-containing protein	2.70E-02	2.6				
At3g56780	Unknown	Expressed protein	1.50E-02	2.6				
At1g28040	Protein metabolism	Zinc finger family protein	1.90E-02	2.5				Down
At4g28700	Transport	Ammonium transporter 1	1.68E-02	2.5				
At3g43870	Unknown	Hypothetical protein	1.79E-02	2.4				
At4g33370	Helicase	DEA(D/H)-box RNA helicase family protein	1.84E-02	2.4				
At1g35710	Signal transduction	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	1.32E-02	2.4	Up			
At5g13655	Unknown	Hypothetical protein	1.99E-02	2.4				
At5g55507	Unknown	Hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	2.33E-02	2.4				
At2g40330	Signal transduction	Pyrabactin resistance 1-like protein 6	1.99E-02	2.4				Down
At5g08250	Secondary metabolism	Cytochrome P450 family protein	2.47E-02	2.4	Up		-3.6115 Up	Down
At2g07701	Unknown	Expressed protein	1.89E-02	2.3				Down
At4g28088	Unknown	Hypothetical protein	1.25E-02	2.3				
At3g03670	Redox	Peroxidase superfamily protein	1.10E-02	2.2	Up		Up	
At2g21900	Transcription	WRKY DNA-BINDING PROTEIN 59	1.18E-02	2.2			Up	
At2g32200	Unknown	Hypothetical protein	1.41E-02	2.2	Up		Up	
At1g78410	Unknown	VQ motif-containing protein	1.30E-02	2.2	Up		Up	
At3g45860	Signal transduction	CYSTEINE-RICH RLK (RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE) 4	1.81E-02	2.1			Up	Down
At2g21740	Unknown	Hypothetical protein	1.74E-02	2.0				
At2g26620	Carbohydrate metabolism	Pectin lyase-like superfamily protein	1.38E-02	2.0				
At1g19640	Secondary metabolism	JASMONIC ACID CARBOXYL METHYLTRANSFERASE	2.02E-02	2.0			Down	

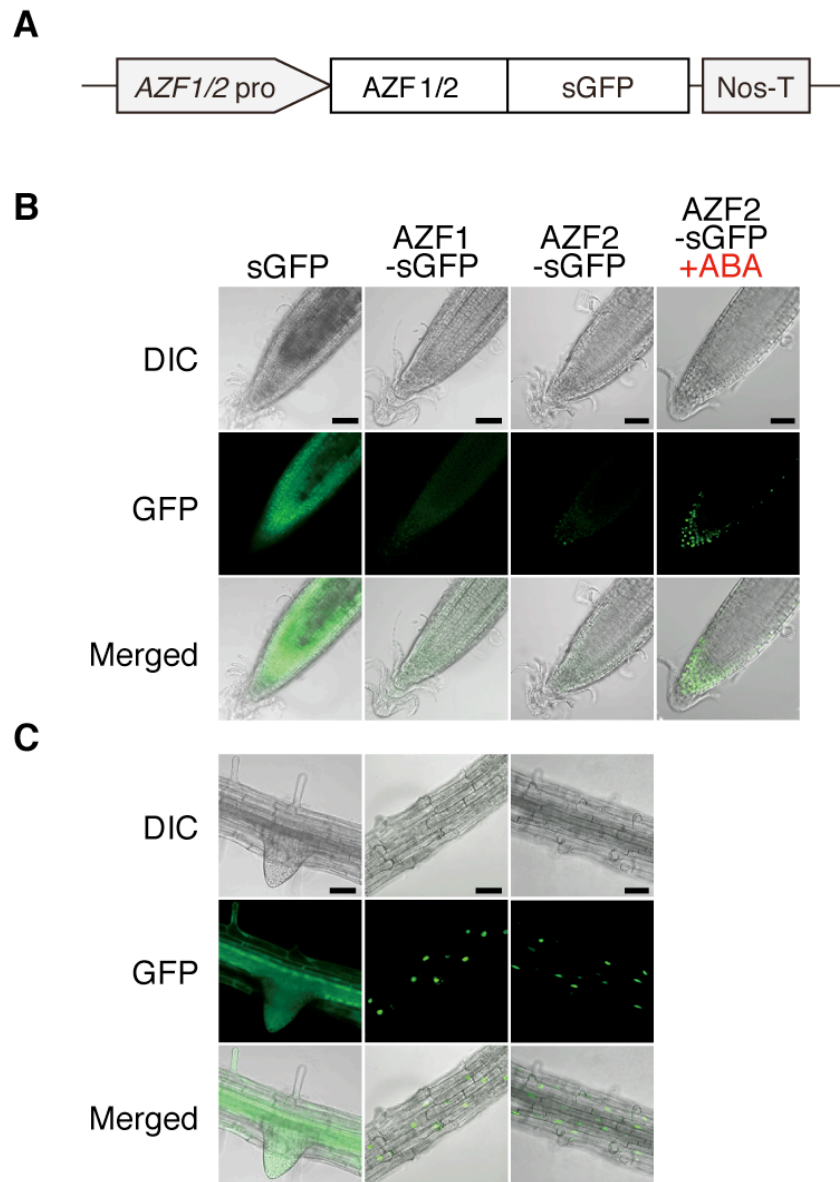
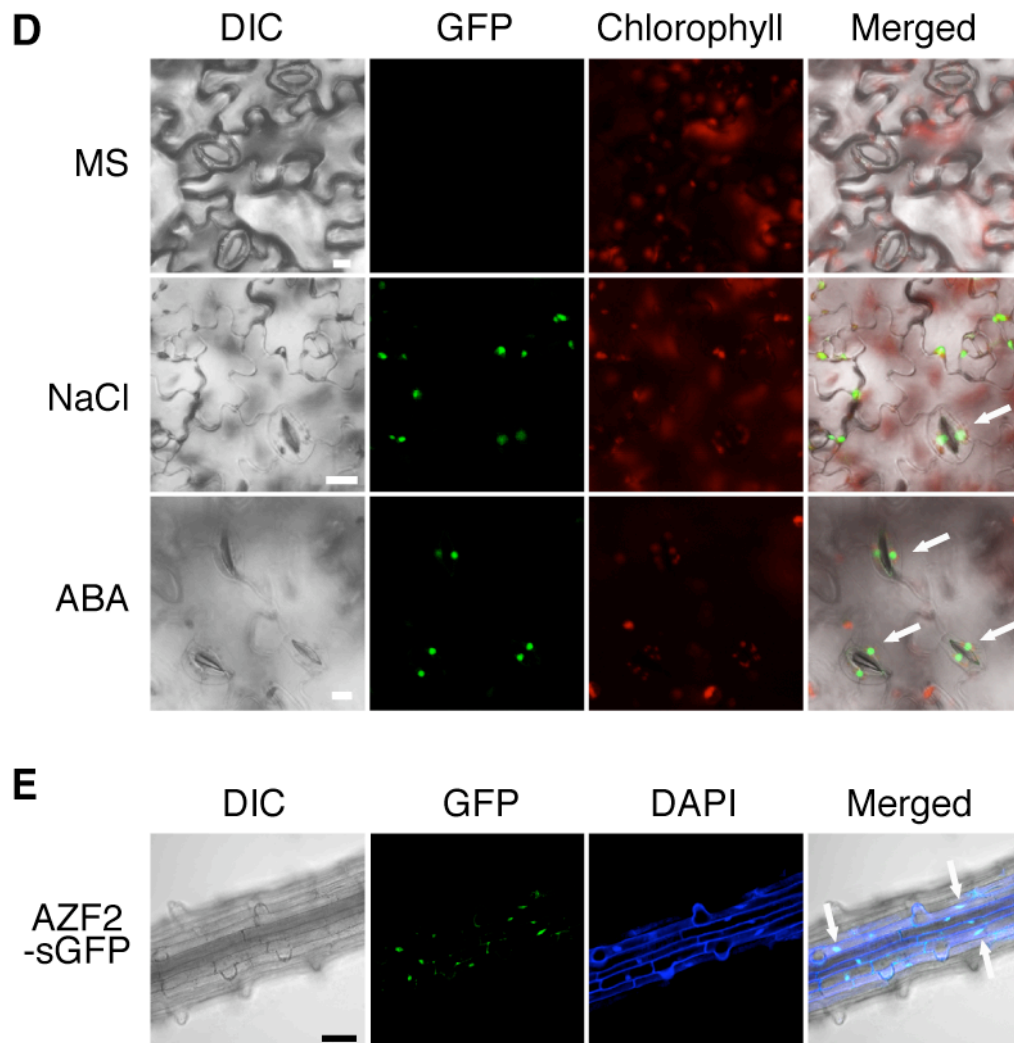


図 8. AZF1、AZF2 の植物体における発現部位と細胞内局在の解析

A. 組換え DNA の模式図: *AZF1* および *AZF2* プロモーターの下流に *AZF1-sGFP*、*AZF2-sGFP* 遺伝子を連結した組換え DNA を作製した。

B. 根端における *AZF1/AZF2-sGFP* の局在: GMK 寒天培地で、播種後 2 週間生育した形質転換シロイヌナズナの根を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。sGFP は、*CaMV35S* プロモーターの制御下で、構成的に発現した sGFP の蛍光を示す。右端は、ABA 処理した植物体の根における *AZF2-sGFP* の蛍光を示す。上段から、DIC 像、GFP 蛍光像、重ね合わせ像をそれぞれ示す。黒色のバーは 50 μm を示す。

C. 根の成熟領域における *AZF1/AZF2-sGFP* の局在: B で用いた植物体の根の成熟領域における GFP の蛍光を観察した。黒色のバーは 50 μm を示す。



D. 葉における AZF2-sGFP の局在: 葉における GFP 蛍光の観察には、GMK 寒天培地で播種後 2 週間生育した形質転換シロイヌナズナを用いた。上段から、無処理区 (MS)、150 mM NaCl、100 μ M ABA で処理した植物体を示す。NaCl では 30 時間、ABA では 10 時間、植物体を処理した。無処理区では、植物を MS 培地で 30 時間処理した。孔辺細胞を白矢印で指示した。左から、DIC 像、GFP 蛍光像、クロロフィルの蛍光像、重ね合わせ像をそれぞれ示す。白色のバーは 10 μ m を示す。

E. AZF2-sGFP の細胞内局在: GMK 寒天培地で播種後 2 週間生育した形質転換シロイヌナズナの植物体を、核染色液 (DAPI) で 15 分間処理した。処理後の植物体の根を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。左から、DIC 像、GFP 蛍光像、DAPI 蛍光像、重ね合わせ像をそれぞれ示す。GFP 蛍光と DAPI 蛍光の重なりを白矢印で指示した。黒色のバーは 50 μ m を示す。

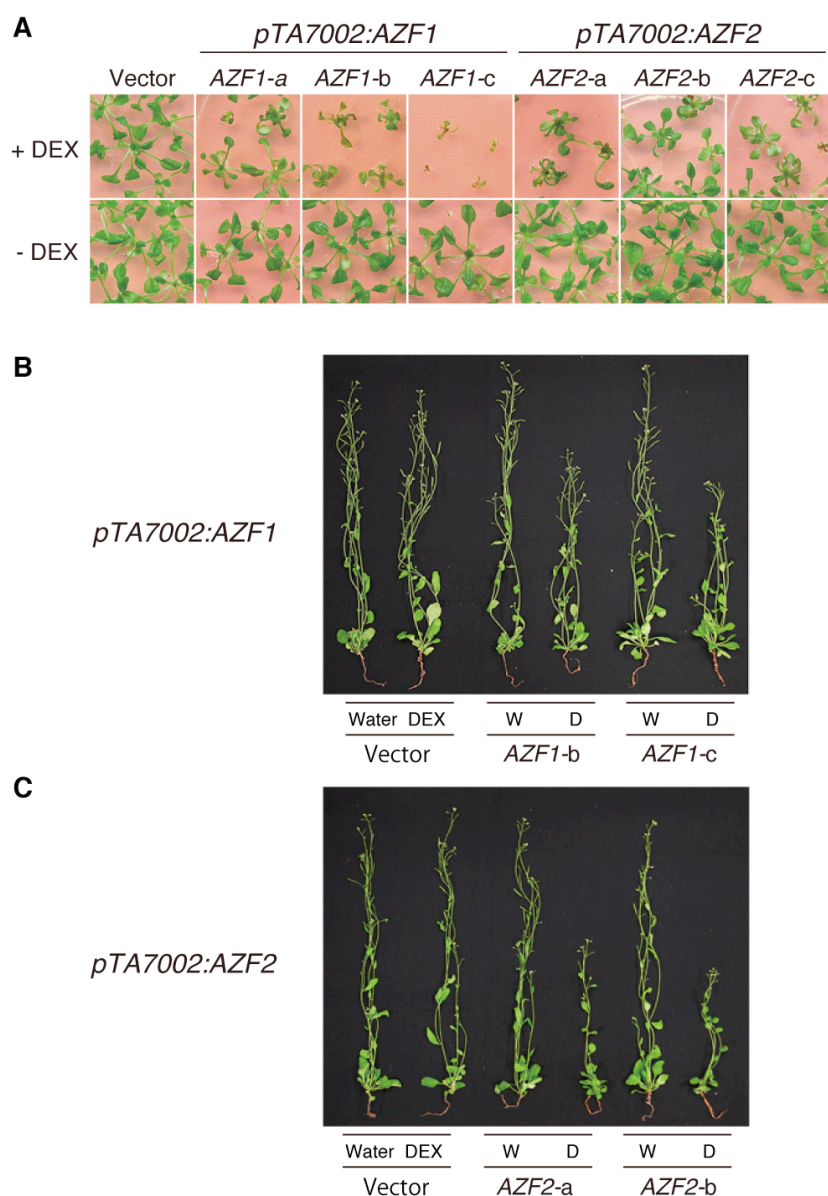


図 9. GVG 転写誘導系の制御下で *AZF1* および *AZF2* を過剰発現した植物の表現型

A. 寒天培地で生育した *AZF1* および *AZF2* の過剰発現体の表現型: 各形質転換体における表現型の観察には、図 6B、C で示した T2 ライン(a、b、c)をそれぞれ用いた。形質転換シロイヌナズナの T2 種子を 1 μ M DEX を含む GMH 寒天培地(+ DEX)に播種して、2 週間生育させた。無処理区では、DEX を含まない GMH 寒天培地(- DEX)を用いた。同様にして対照 (Vector)を生育させた。

B、C. 培養土で生育した *AZF1* および *AZF2* の過剰発現体の表現型: 形質転換シロイヌナズナの T2 種子を GMH 寒天培地に播種して、3 週間生育させた。植物体を 10 μ M DEX 水溶液で 24 時間処理した後、培養土に移してさらに 3 週間生育させた。無処理区では、水処理を行った。同様にして対照を生育させた。

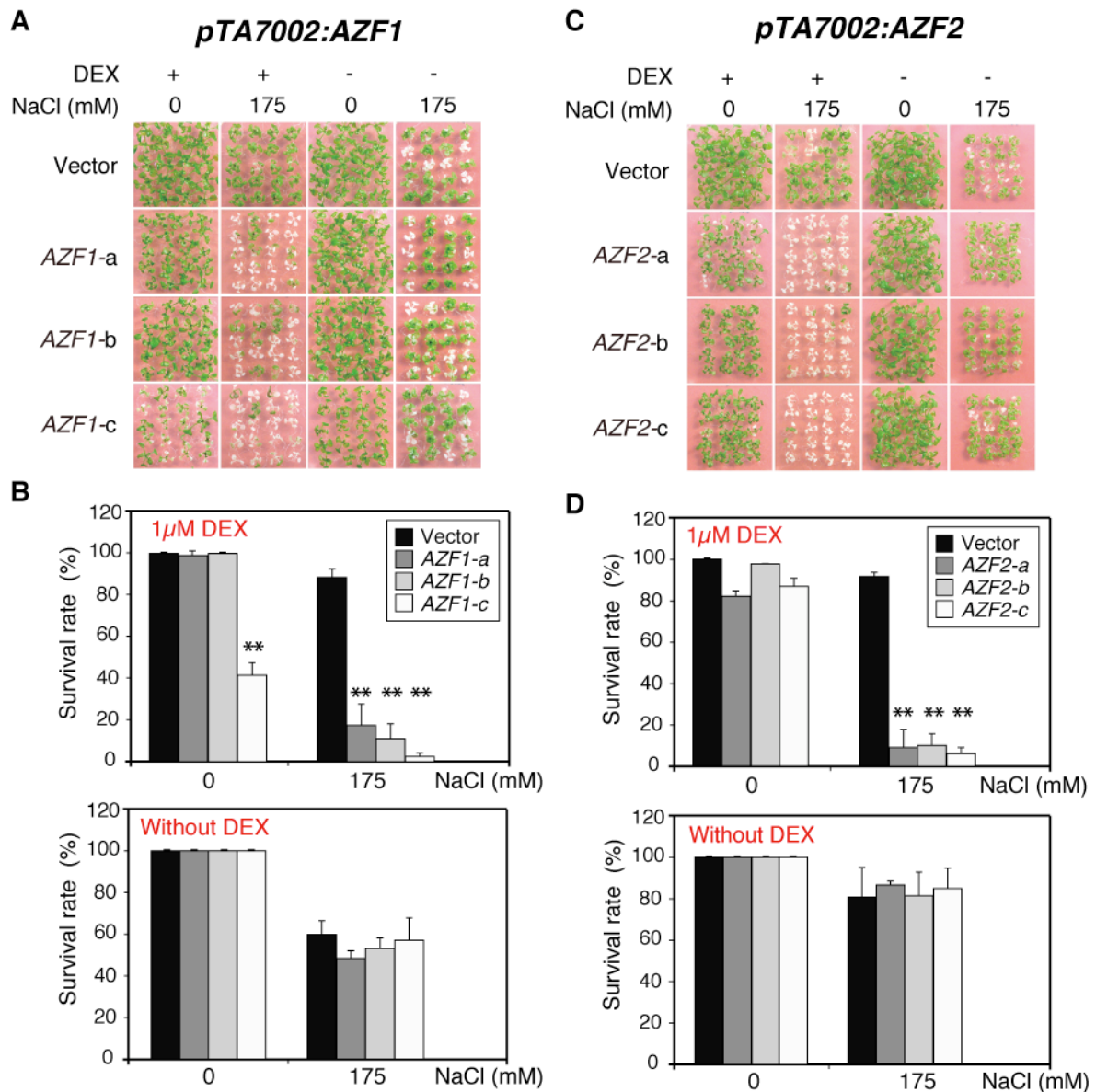


図 10. GVG 転写誘導系の制御下で *AZF1* および *AZF2* を過剰発現した植物の塩感受性の評価

A. *AZF1* の過剰発現体の高塩処理: *pTA7002:AZF1* の T2 ライン (a, b, c) の種子を GMH 寒天培地に播種して、10 日程度生育させた。同様にして対照 (Vector) を生育させた。20 個の植物体を、左から順に (1 μ M DEX、0 mM NaCl)、(1 μ M DEX、175 mM NaCl)、(0 μ M DEX、0 mM NaCl)、(0 μ M DEX、175 mM NaCl) をそれぞれ含む 0.5xMS 寒天培地に移して、*pTA7002:AZF1* の植物体が対照と比較して明確な塩感受性を示すまで、7 日程度生育させた。

B. *AZF1* の過剰発現体の塩感受性の評価: A で示した *pTA7002:AZF1* の植物体と対照の生存率を示した。各処理に用いる植物体は 30 個体以上とし、3 回の独立した実験の結果をもとに各形質転換体の生存率の平均と標準偏差を算出した。DEX 処理条件下における植物体の生存率(上)と、DEX を含まない条件下における生存率(下)をそれぞれ示す。*pTA7002:AZF1* の植物体と対照の生存率において有意差を検定した(Student's test、** $P < 0.01$)。

C. *AZF2* の過剰発現体の高塩処理: *pTA7002:AZF2* の T2 ライン(a、b、c)を用いて A と同様の操作を行った。

D. *AZF2* の過剰発現体の塩感受性の評価: C で得られた結果を基に、B と同様にして *pTA7002:AZF2* の植物体の塩感受性を評価した。

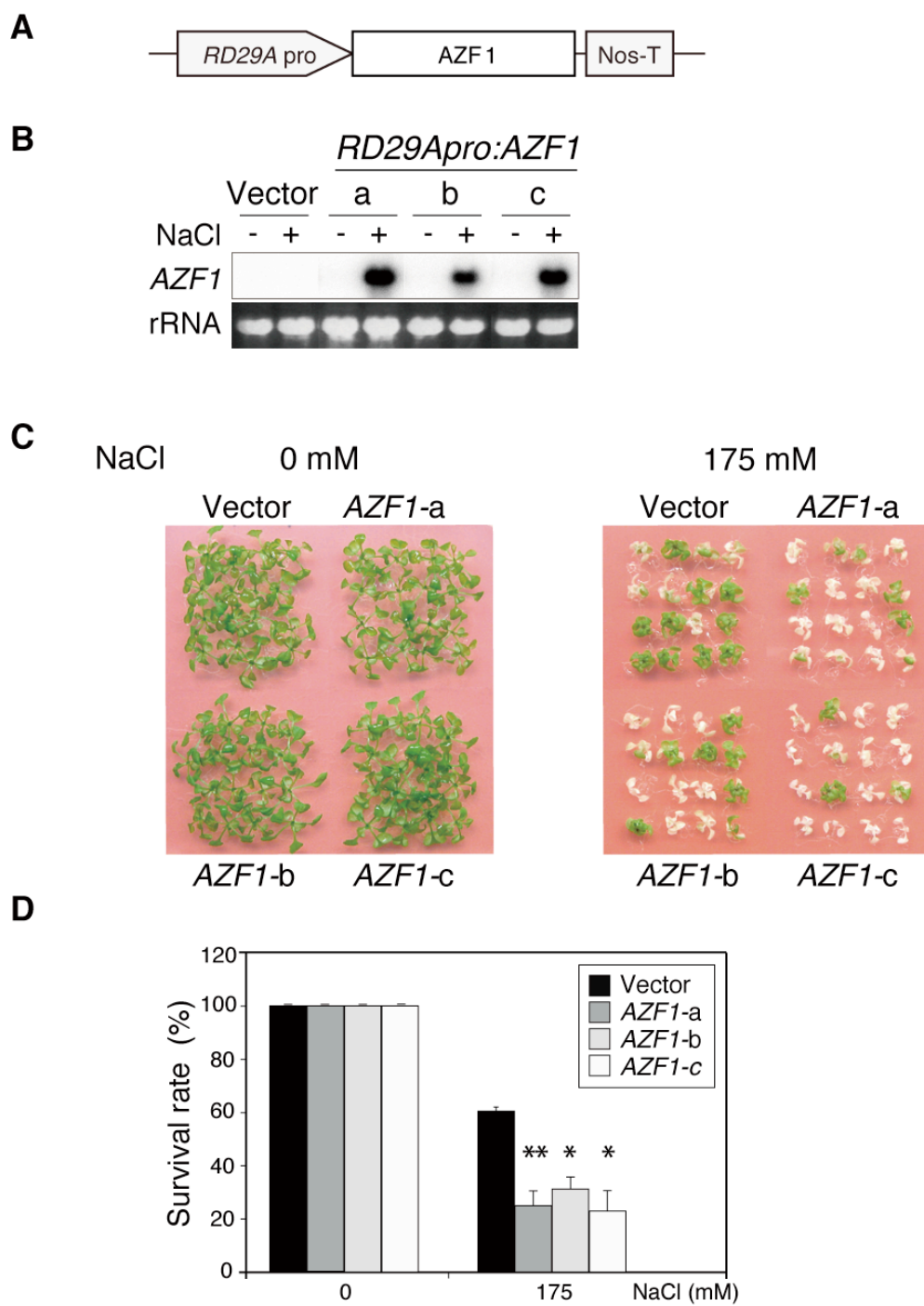


図 11.(次項に続く)

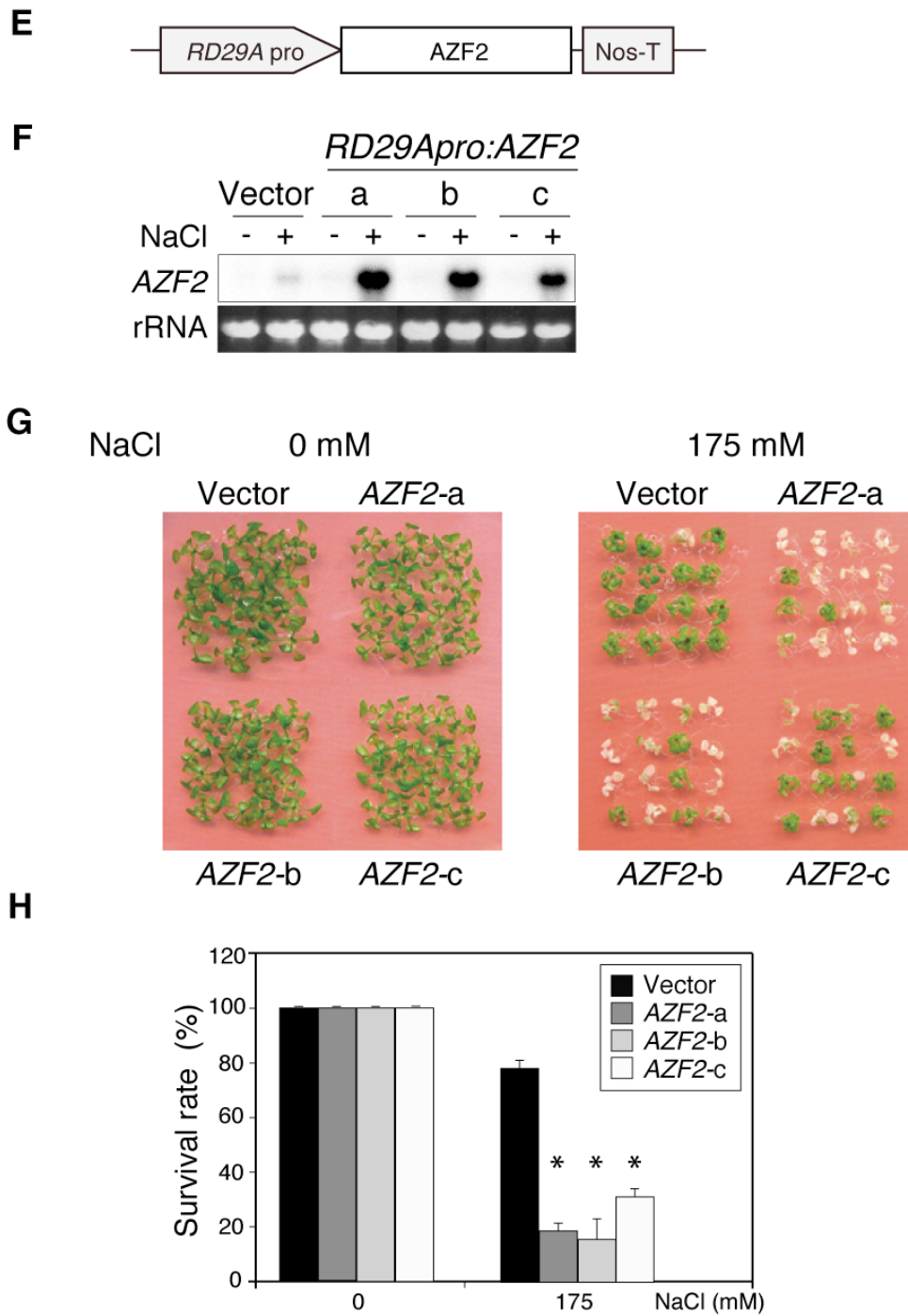


図 11. *RD29A* プロモーターの制御下で *AZF1* および *AZF2* を発現した植物の塩感受性の評価

A. 組換え DNA の模式図: *RD29A* プロモーターの下流に *AZF1* 遺伝子の CDS を連結した組換え DNA を作製した。

B. 形質転換シロイヌナズナにおける *AZF1* の発現解析: A で示した組換え DNA を導入した形質転換シロイヌナズナを作出した。ベクター (pBI121) のみを導入した植物体を対照とした。形質転換植物の T2 種子を GMK 寒天培地に播種して、2 週間生育させた。水処理後の植物体を 200 mM NaCl で 5 時間処理した。無処理区では、水処理を 5 時間継続した。塩処理後の植物体から全 RNA を抽出して、20 μ g の RNA に対して RNA ゲルブロット解析を行った。発現解析に用いた 16 ラインのうち、塩感受性の評価に用いた 3 ライン (a、b、c) を示した。rRNA のエチジウムブロマイド染色像をコントロールとして示した。

C. *RD29Apro:AZF1* の植物体の高塩処理: 形質転換植物の T2 種子を GMK 寒天培地に播種して、10 日程度生育させた。同様にして対照 (Vector) を生育させた。16 個の植物体を 175 mM NaCl を含む 0.5xMS 寒天培地に移して、*RD29Apro:AZF1* の植物体が対照と比較して明確な塩感受性を示すまで 7 日程度生育させた。無処理区では、NaCl を含まない 0.5xMS 寒天培地を用いた。

D. *RD29Apro:AZF1* の植物体の塩感受性の評価: C で示した *RD29Apro:AZF1* の植物体と対照の生存率を示した。各処理に用いる植物体は 30 個体以上とし、3 回の独立した実験の結果をもとに各形質転換体の生存率の平均と標準偏差を算出した。*RD29Apro:AZF1* の植物体と対照の生存率において有意差を検定した (Student's test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

E. 組換え DNA の模式図: *RD29A* プロモーターの下流に *AZF2* 遺伝子の CDS を連結した組換え DNA を作製した。

F. 形質転換シロイヌナズナにおける *AZF2* の発現解析: *RD29Apro:AZF2* 植物の T2 ライン (a、b、c) を用いて、B と同様にして *AZF2* 遺伝子の発現を解析した。

G、H. *RD29Apro:AZF2* 植物の T2 ラインを用いて、C、D と同様にして *RD29Apro:AZF2* の植物体の塩感受性を評価した。

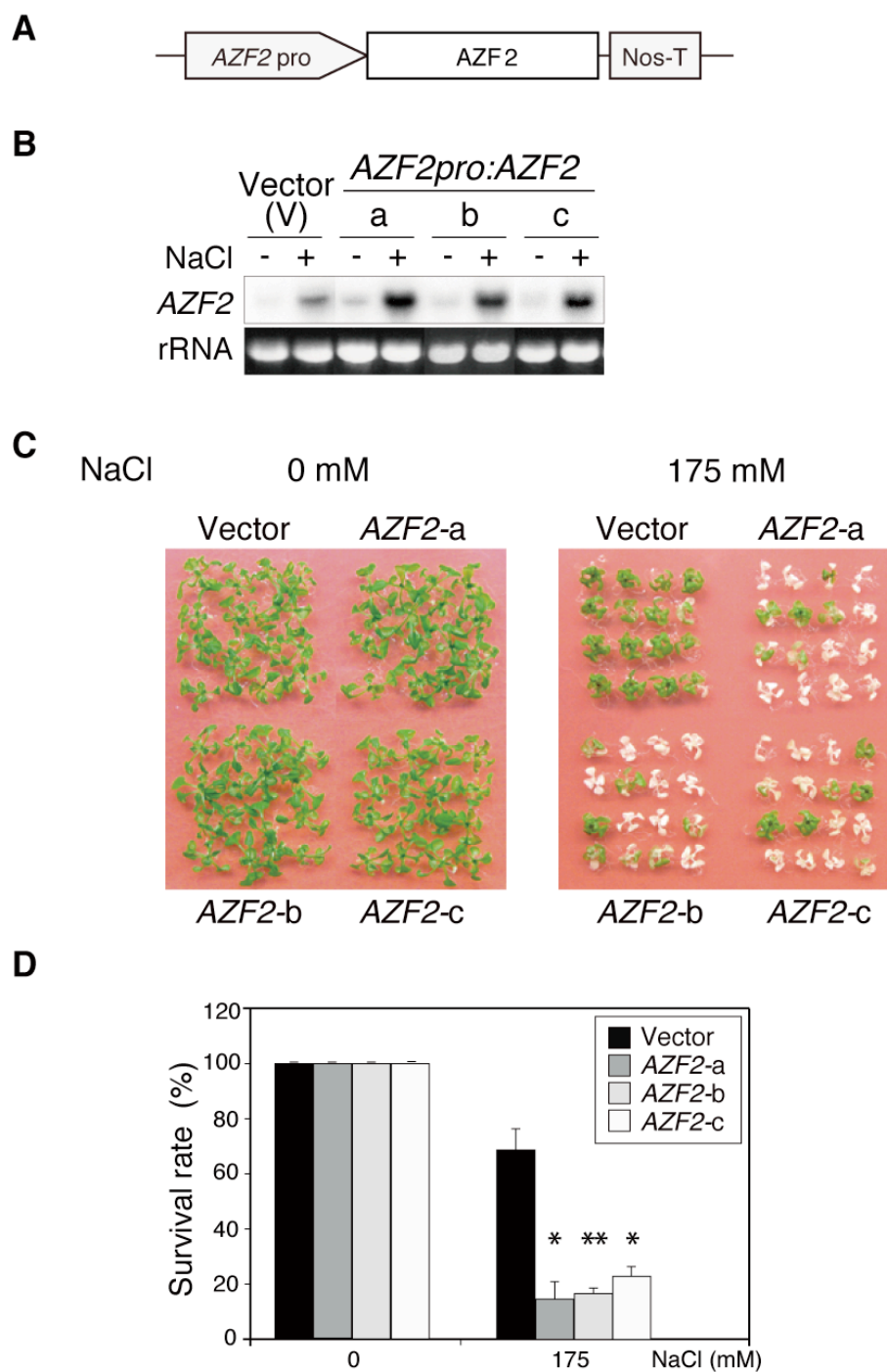


図 12. *AZF2* プロモーターの制御下で *AZF2* を発現した植物の塩感受性の評価

A. 組換え DNA の模式図: *AZF2* プロモーターの下流に *AZF2* 遺伝子の CDS を連結した組換え DNA を作製した。

B. 形質転換シロイヌナズナにおける AZF2 の発現解析: A で示した組換え DNA を導入した形質転換シロイヌナズナを作出した。ベクター (pGreen0029) のみを導入した植物体を対照とした。形質転換植物の T3 種子を GM 寒天培地に播種して、2 週間生育させた。同様にして対照を生育させた。水処理後の植物体を 200 mM NaCl で 5 時間処理した。無処理区では、水処理を 5 時間継続した。塩処理後の植物体から全 RNA を抽出して、20 μ g の RNA に対して RNA ゲルブロット解析を行った。発現解析に用いたラインのうち、塩感受性の評価に用いた 3 ライン (a、b、c) を示した。rRNA のエチジウムブロマイド染色像をコントロールとして示した。

C. *AZF2pro:AZF2* の植物体の高塩処理: 形質転換植物の T3 種子を GM 寒天培地に播種して、10 日程度生育させた。同様にして対照を生育させた。16 個の植物体を 175 mM NaCl を含む 0.5xMS 寒天培地に移して、*AZF2pro:AZF2* の植物体が対照と比較して明確な塩感受性を示すまで 7 日程度生育させた。無処理区では、NaCl を含まない 0.5xMS 寒天培地を用いた。

D. *AZF2pro:AZF2* の植物体の塩感受性の評価: C で示した *AZF2pro:AZF2* の植物体と対照の生存率を示した。各処理に用いる植物体は 30 個体以上とし、3 回の独立した実験の結果をもとに各形質転換体の生存率の平均と標準偏差を算出した。*AZF2pro:AZF2* の植物体と対照の生存率において有意差を検定した (Student's test, *P < 0.05, **P < 0.01)。

A

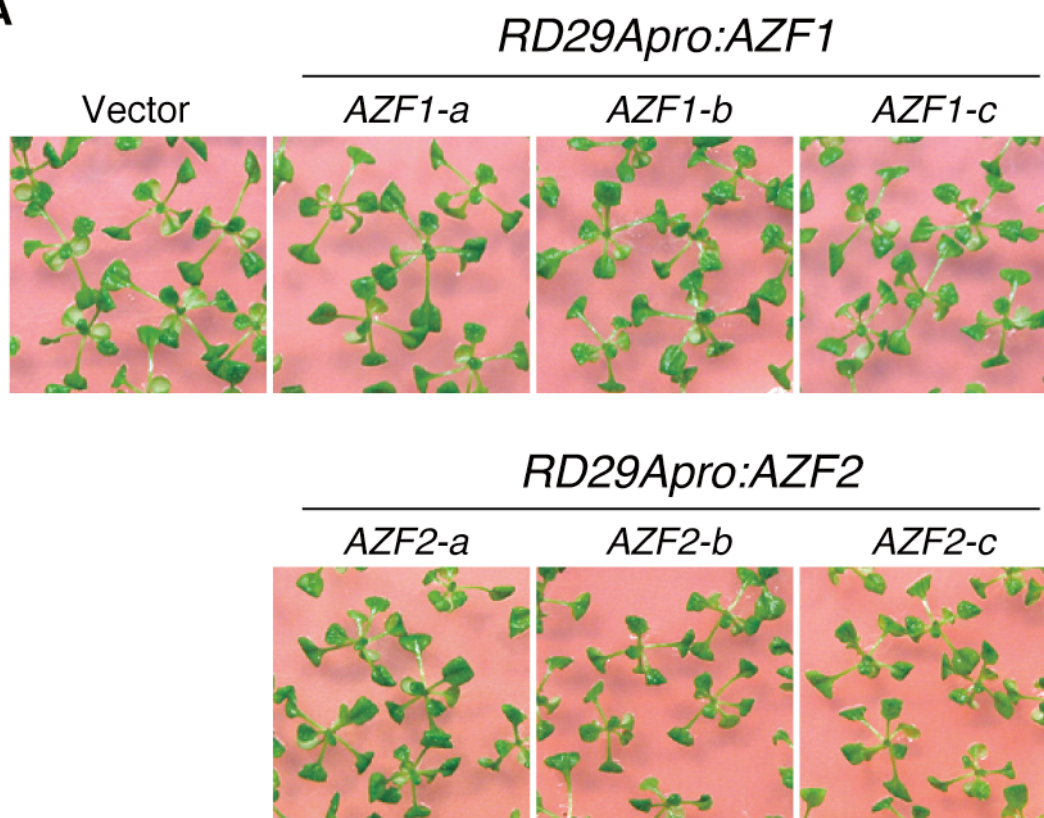
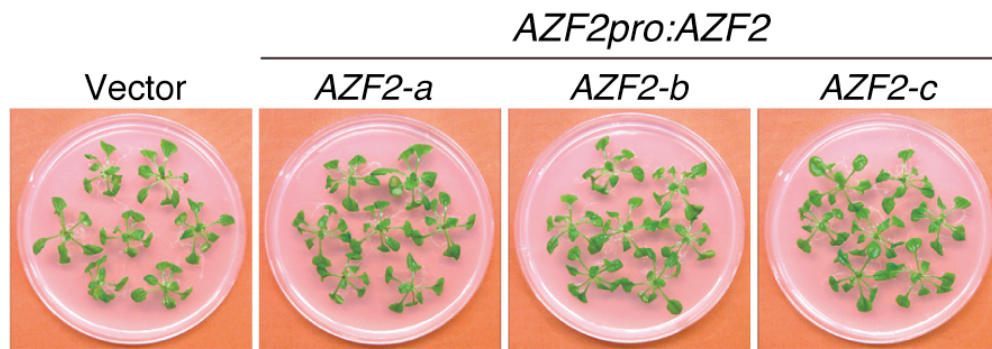
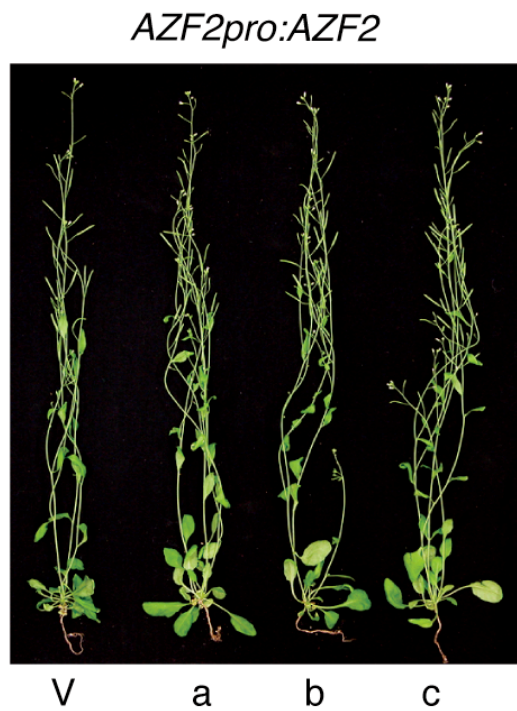
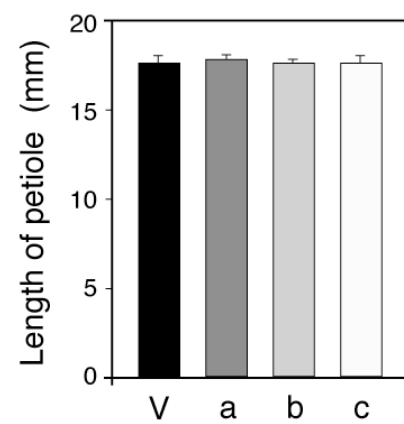
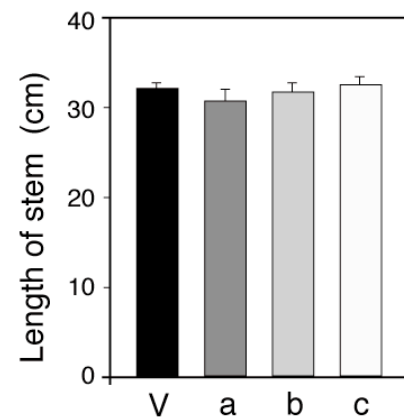


図 13. *RD29Apro:AZF1/AZF2* および *AZF2pro:AZF2* の植物体の表現型

A. *RD29Apro:AZF1* および *RD29Apro:AZF2* の植物体の表現型: 形質転換シロイヌナズナの T2 種子を GMK 寒天培地に播種して、2 週間生育させた。

B**C****D****E**

B. *AZF2pro:AZF2* の植物体の表現型: 形質転換シロイヌナズナの T3 種子を GM 寒天培地に播種して、2 週間生育させた。7 個の植物体を新たな GM 寒天培地に移してさらに 1 週間生育させた。同様にして対照を生育させた。

C. B で示した植物体を培養土に移して、さらに 3 週間生育させた。

D. B で示した植物体の葉柄の長さを測定した。

E. C で示した植物体を土から引き抜いて、地上部の長さを測定した。

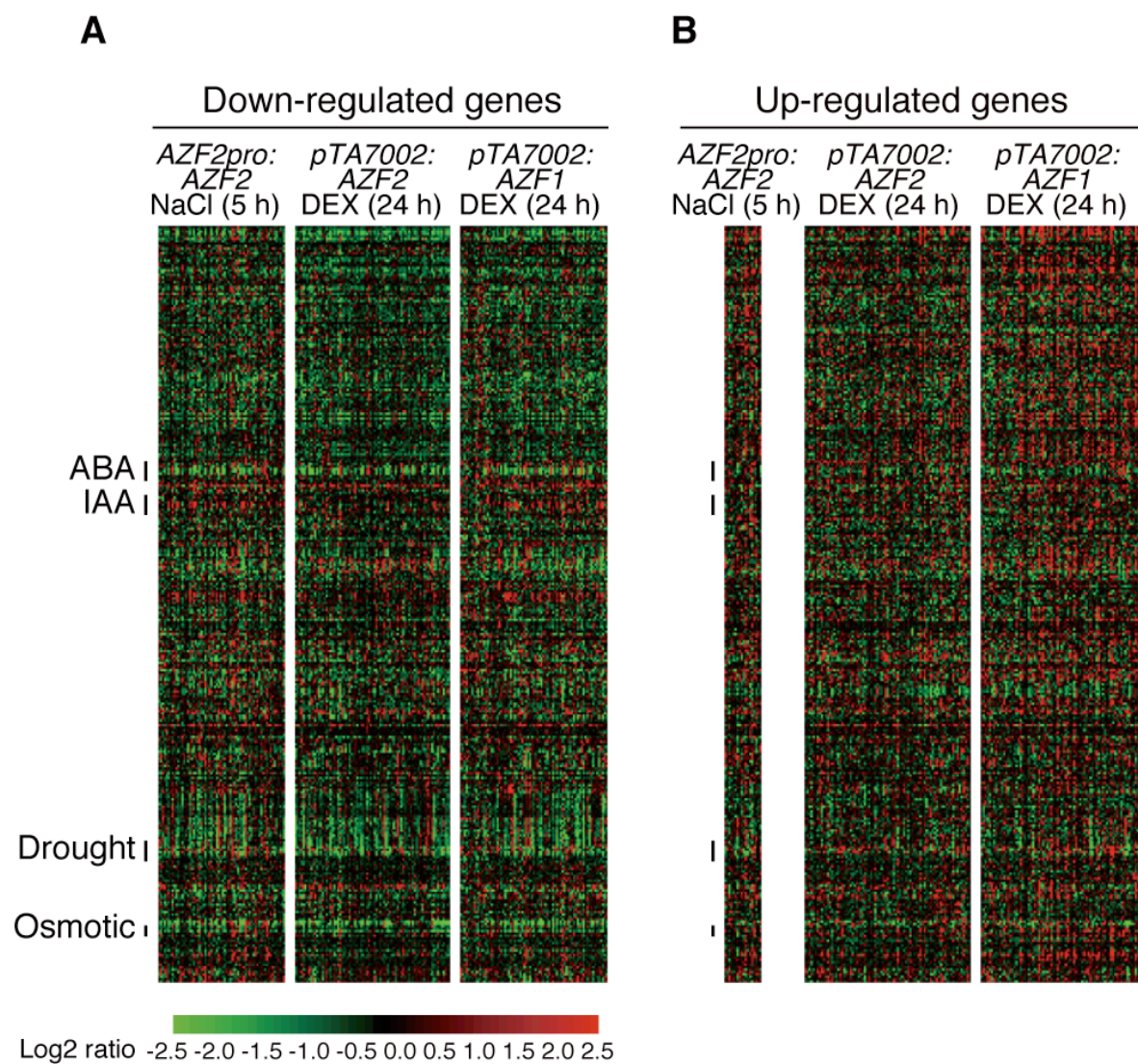


図 14.(次項に続く)

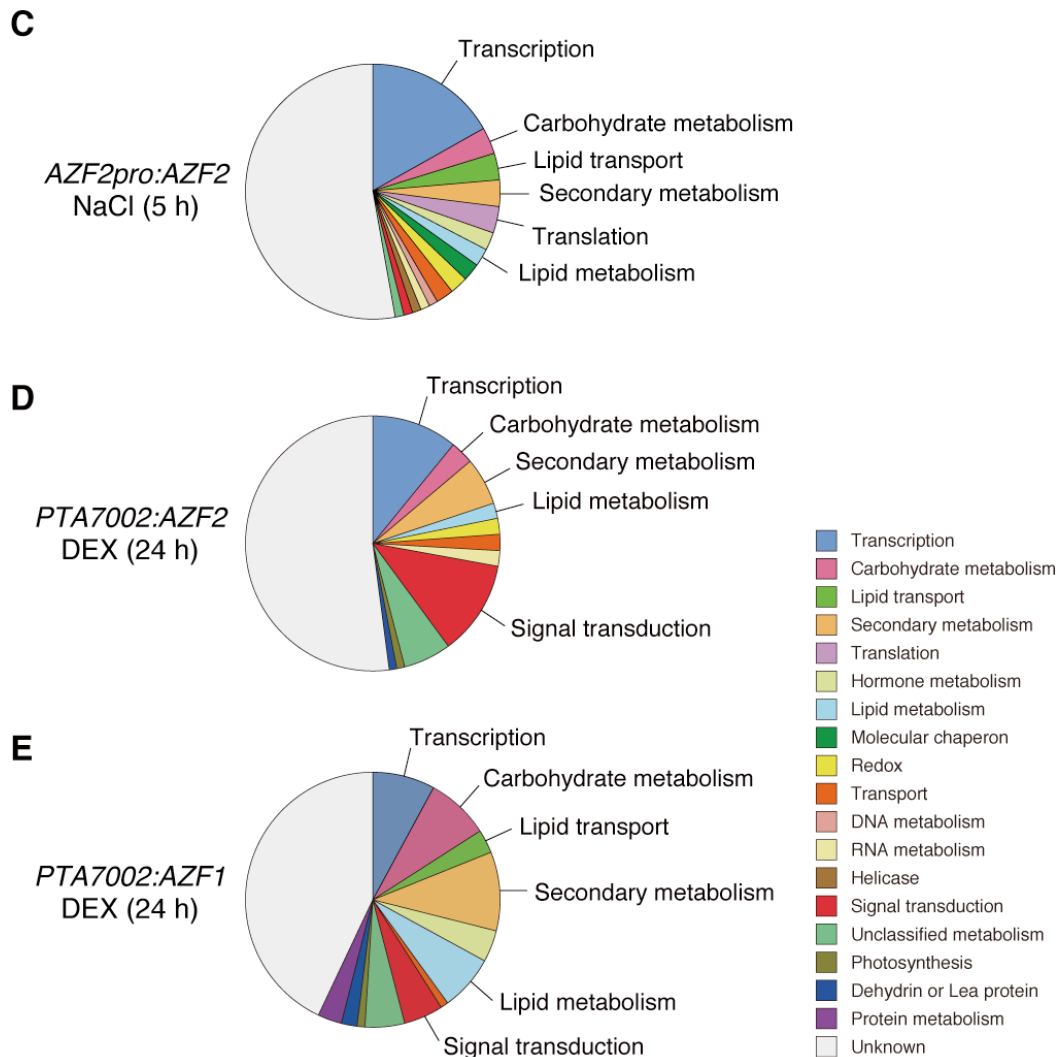


図 14. *AZF1* および *AZF2* の過剰発現体におけるマイクロアレイ解析

A. *AZF1* および *AZF2* の過剰発現体で発現量が減少した遺伝子の各種ストレスおよび植物ホルモン応答性の解析: 高塩処理した *AZF2pro:AZF2* の植物体 (図 12B、ライン a、b) において、対照の植物と比較して mRNA の蓄積量が 2 倍以上に減少した 89 個の遺伝子の各種ストレスおよび植物ホルモンに対する応答性を、発現データベース Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp>) を用いて解析した。また、DEX 処理した *pTA7002:AZF1* (図 6B、ライン b、c) および *pTA7002:AZF2* (図 6C、ライン a、b) の植物体においても同様の解析を行った。*pTA7002:AZF1/AZF2* の植物体では、対照と比較して発現量の減少割合が大きい 100 個の遺伝子を用いた。左から、高塩処理した *AZF2pro:AZF2*、DEX 処理した *pTA7002:AZF2* および *pTA7002:AZF1* の植物体をそれぞれ示す。各表では、縦軸に各種ストレスおよび植物ホルモン処理が、横軸に解析に用いた遺伝子が並べられている。ABA、IAA、乾燥 (Drought)、高浸透圧 (Osmotic) 処理に相当する部位を明示した。各種処理

(縦軸)に対する各遺伝子(横軸)の発現応答において、緑は発現量の減少を、赤は発現量の増加を示す。

B. *AZF1* および *AZF2* の過剰発現体で発現量が増加した遺伝子の各種ストレスおよび植物ホルモン応答性の解析: A と同様にして、*AZF1* および *AZF2* の過剰発現体において、対照と比較して mRNA の蓄積量が 2 倍以上に増加した遺伝子の発現応答を解析した。高塩処理した *AZF2pro:AZF2* の植物体では、対照の植物と比較して mRNA の蓄積量が 2 倍以上に増加した 27 個の遺伝子を用いた。DEX 処理した *pTA7002:AZF1/AZF2* の植物体では、対照と比較して発現量の増加割合が大きい 100 個の遺伝子を用いた。

C-E. *AZF1* および *AZF2* の過剰発現体で発現量が減少した遺伝子の機能分類: 各形質転換植物で発現量が減少した遺伝子のうち、A で用いた遺伝子の機能を分類して、機能別の割合を円グラフで示した。円グラフにおける機能名の順番は、右に示す全ての機能項目の順番に準拠した。The Arabidopsis Information Resource Gene Ontology annotation search tool (<http://www.arabidopsis.org/tools/bulk/go/index.jsp>) と Pfam batch sequence search tool (<http://pfam.janelia.org/search#tabview=tab1>) から得られた情報を参考にして、遺伝子の機能を分類した。

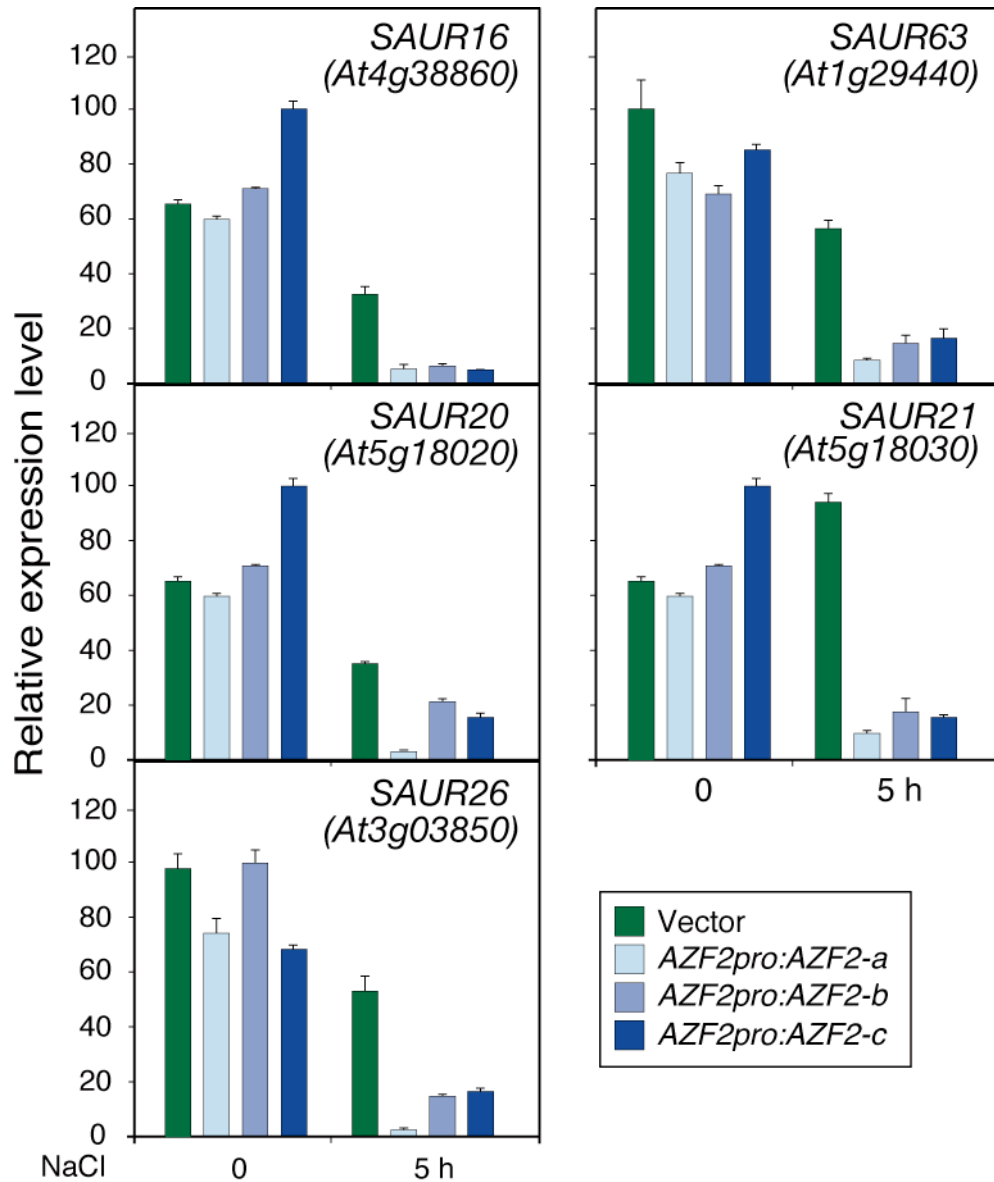


図 15. AZF1 および AZF2 の下流遺伝子の発現解析

高塩処理した *AZF2pro:AZF2* の植物体および対照(図 12B)における、5 個の *SAUR* 遺伝子の mRNA の蓄積量を定量 RT-PCR 法により測定した。無処理区を NaCl 処理、0 時間の検体として用いた。mRNA の蓄積量の最大値を 100 とした。各検体につき 3 回の測定を行い、その平均と標準偏差を示した。

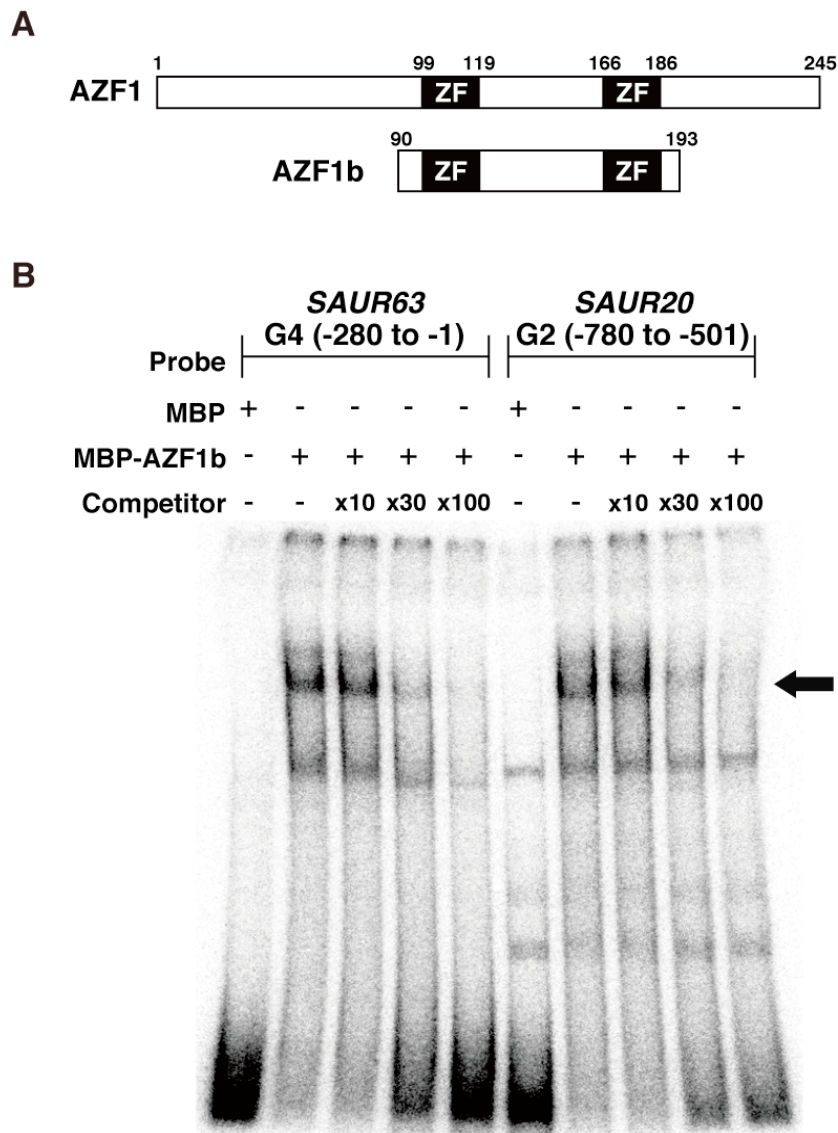
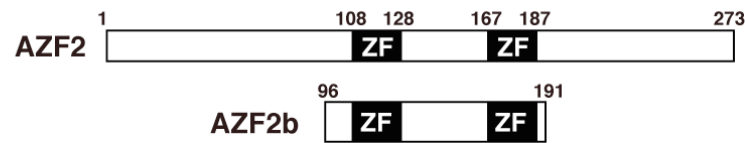


図 16. AZF1 および AZF2 とゲノム DNA の相互作用の解析

A. AZF1 のタンパク質断片の模式図: AZF1 タンパク質の全長と、2 個の zinc-finger モチーフを含む部分断片 AZF1b の構造を示した。MBP-AZF1b 融合タンパク質をゲルシフト解析に用いた。数字は、境界のアミノ酸の位置を示す。

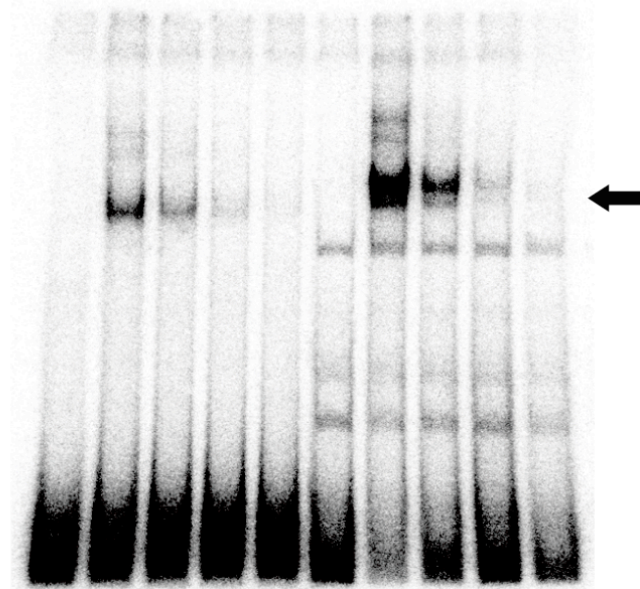
B. ゲルシフト法による MBP-AZF1b の DNA 結合能の解析: *SAUR63* および *SAUR20* 遺伝子のプロモーター断片 G4、G2 を RI 標識したプローブと、AZF1 タンパク質の相互作用をゲルシフト法により解析した。G4 および G2 は、各遺伝子の翻訳開始点から上流-280 から-1 と、-780 から-501 塩基対を示す。結合反応には、0.2 ng の標識プローブと、11 ng の MBP タンパク質(+), および 200 ng の MBP-AZF1b 融合タンパク質(+)を用いた。競合 DNA として、各標識プローブに対して 10、30、100 倍量の非標識プローブ (Competitor x10、x30、x100) を用いた。MBP-AZF1b 融合タンパク質の添加により泳動が変化したバンドを黒矢印で指示した。

C



D

Probe	SAUR63 G4 (-280 to -1)					SAUR20 G2 (-780 to -501)				
	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
MBP	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
MBP-AZF2b	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Competitor	-	-	x10	x30	x100	-	-	x10	x30	x100



C. AZF2 のタンパク質断片の模式図:AZF2 タンパク質の全長と、2 個の zinc-finger モチーフを含む部分断片 AZF2b の構造を示した。MBP-AZF2b 融合タンパク質をゲルシフト解析に用いた。

D. ゲルシフト法による MBP-AZF2b の DNA 結合能の解析: SAUR63 および SAUR20 遺伝子のプロモーター断片 G4、G2 を RI 標識したプローブと、AZF2 タンパク質の相互作用をゲルシフト法により解析した。解析には、10 ng の MBP-AZF2b 融合タンパク質を用いた。B と同様にしてゲルシフト解析を行った。

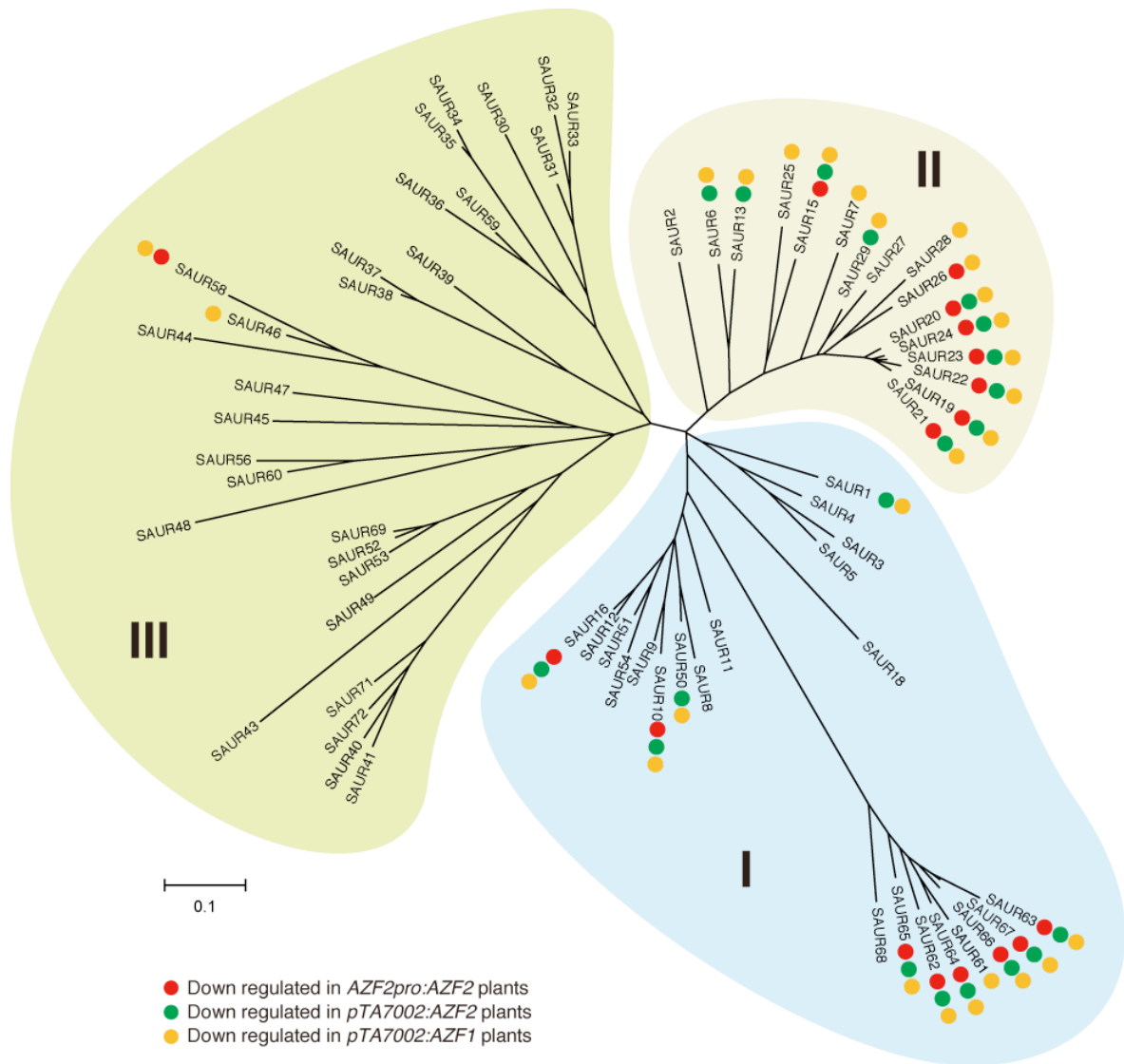


図 17. シロイヌナズナの *SAUR* の分子系統解析

Phytozome (<http://www.phytozome.net/index.php>) や SALAD DATABASE (<http://salad.dna.affrc.go.jp/salad/>) から入手した、シロイヌナズナの 66 個の *SAUR* タンパク質の配列を Clustal X プログラム (Ver. 2.0) を用いてアライメントした。タンパク質間で相同性の高い領域のアライメントを用いて、MEGA4 プログラムで分子系統樹を作成した。*SAUR* 遺伝子群を 3 つのクラス I、II、III に分類した。高塩処理した *AZF2pro:AZF2*、DEX 処理した *pTA7002:AZF2* および *pTA7002:AZF1* の植物体で発現量が減少した *SAUR* 遺伝子を、それぞれ赤、緑、黄丸で明示した。

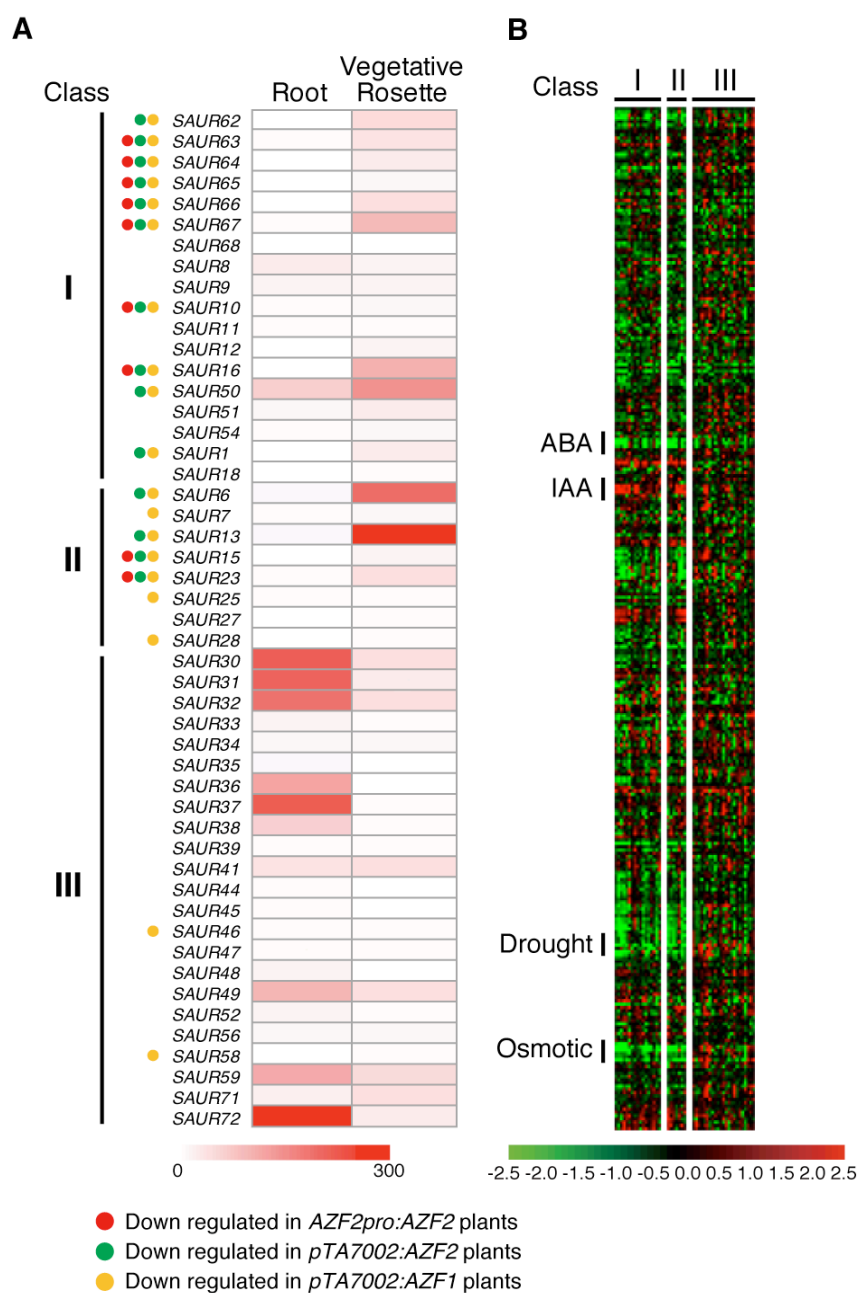


図 18. シロイヌナズナにおける *SAUR* の発現部位と発現応答の解析

A. シロイヌナズナの根と地上部における *SAUR* の発現パターン: *SAUR* ファミリー遺伝子の発現解析には、eFP browser (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) を用いた。根 (Root) や地上部 (Vegetative Rosette) における *SAUR* 遺伝子の発現量は、白から赤になるほど多いことを示す。eFP browser で解析した *SAUR* 遺伝子を、図 17 で示したクラスに分類して縦に並べた。高塩処理した *AZF2pro:AZF2*、DEX 処理した *pTA7002:AZF2* および *pTA7002:AZF1* の植物体で発現量が減少した *SAUR* 遺伝子を、それぞれ赤、緑、黄丸で明示した。

B. *SAUR*の各種ストレスおよび植物ホルモン応答性の解析: *SAUR*ファミリー遺伝子の野生型株における各種ストレスおよび植物ホルモンに対する応答性を、発現データベース Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp>) を用いて解析した。各表では、縦軸に各種ストレスおよび植物ホルモン処理を、横軸にクラス I、II、III に属する *SAUR* 遺伝子を並べた。ABA、IAA、乾燥、高浸透圧処理に相当する部位を明示した。各種処理(縦軸)に対する各遺伝子(横軸)の発現応答において、緑は発現量の減少を、赤は発現量の増加を示す。

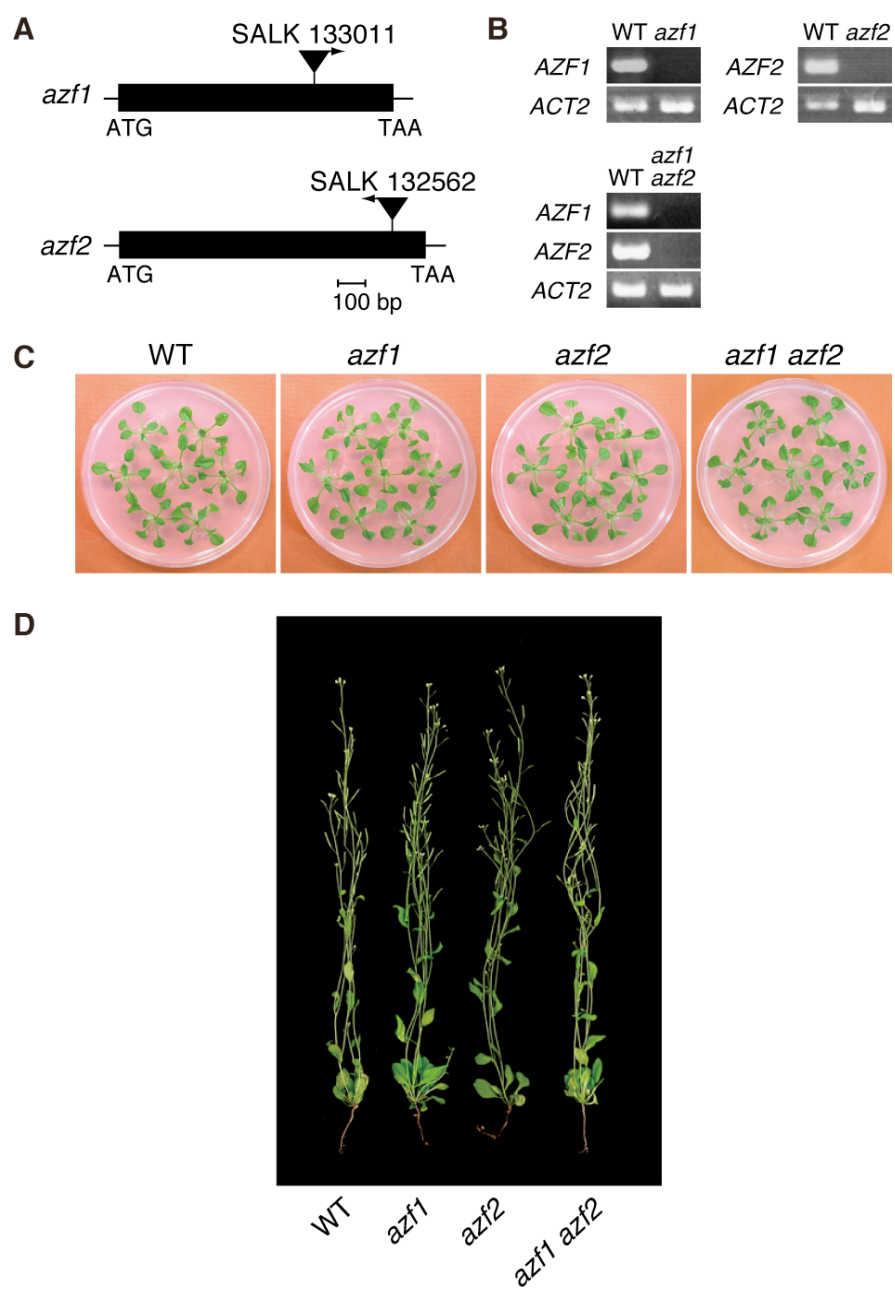


図 19.(次項に続く)

E

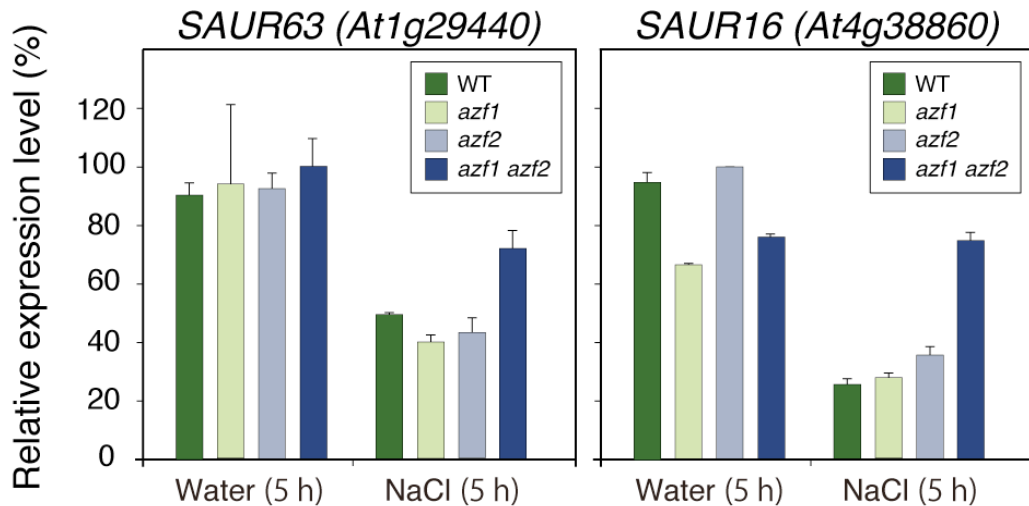


図 19. AZF1、AZF2 の機能欠損変異体の解析

A. AZF1、AZF2 の構造と T-DNA 挿入部位の模式図: 黒枠は AZF1 および AZF2 遺伝子の CDS を、黒三角は T-DNA をそれぞれ示す。

B. 単一変異体 *azf1*、*azf2* と二重変異体 *azf1 azf2* における AZF1、AZF2 の発現量: 乾燥処理 2 時間後のシロイヌナズナの野生型株 (WT、Columbia) と各変異体における AZF1 および AZF2 遺伝子の mRNA の蓄積量を RT-PCR 法により測定した。コントロールとして、アクチン (*ACT2*) 遺伝子の mRNA の蓄積量を測定した。

C. 単一変異体 *azf1*、*azf2* と二重変異体 *azf1 azf2* の表現型: 野生型株および各変異体の種子を GM 寒天培地に播種して、2 週間生育させた。7 個の植物体を新たな GM 寒天培地に移して、さらに 1 週間生育させた。

D. C で示した植物体を培養土に移して、さらに 3 週間生育させた。

E. 塩ストレス下の変異体 *azf1*、*azf2*、*azf1 azf2* における SAUR63 と SAUR16 の発現解析: GM 寒天培地で 2 週間生育させた野生型株と各変異体を、24 時間、水処理した後、200 mM NaCl で 5 時間処理した。無処理区では、水処理を 5 時間継続した。高塩処理後の植物体および無処理区における SAUR63 と SAUR16 遺伝子の mRNA の蓄積量を定量 RT-PCR 法により測定した。mRNA の蓄積量の最大値を 100 とした。各検体につき 3 回測定を行い、その平均と標準偏差を示した。

第 IV 章. 総括

本研究では、シロイヌナズナの C2H2 型 zinc-finger タンパク質をコードする AZF1 と AZF2 の機能を解析した。本研究の先行研究により、STZ ファミリーを構成する 6 個の遺伝子のうち、AZF1、AZF2、AZF3、ZAT10 は、乾燥、塩、ABA 処理で発現が誘導されることが示されている (Sakamoto et al., 2000)。また、AZF1、AZF2、AZF3、ZAT10 は、EP2 配列に結合して、転写抑制因子として機能することが報告されている (Sakamoto et al., 2004)。STZ ファミリーには、これら 4 個の遺伝子の他に、ZAT6 と ZAT8 が含まれる。ZAT6 に関しては、この遺伝子が、低温、塩、浸透圧ストレスにより発現が誘導されること (Vogel et al., 2005、Mito et al., 2011)、および、植物における無機リン酸の恒常性の維持に関与していることが示されている (Devaiah et al., 2007)。このように、STZ ファミリーを構成する 6 個の遺伝子は、個々の遺伝子ごとに解析がなされており、これらの遺伝子の機能を包括的に比較解析することが必要であると考えられた。本研究では、AZF1 と AZF2 における機能の重複に注目して、環境ストレス下の植物における AZF1 と AZF2 の機能を解析した。

II 章では、種々の植物に保存された C1-2i 型の zinc-finger タンパク質の分子系統解析、および STZ ファミリーを構成する 6 個の遺伝子の発現解析、ならびにこれらの遺伝子の過剰発現体の作出を行った。

C1-2i 型 zinc-finger タンパク質は、被子植物にのみ保存されており、被子植物に固有な機能を持つことが示唆された。STZ ファミリーを含む C1-2i 型 zinc-finger タンパク質は、コケ、シダ、裸子植物などに保存されている 3 個以上の zinc-finger モチーフを持つタンパク質から進化したことが示唆された。一方、これら C1 ファミリー型の zinc-finger 遺伝子は、クラミドモナスやボルボックスでは確認されていない。また、コケから被子植物に保存されている C1 ファミリー型の zinc-finger タンパク質は、EAR モチーフ (DLN-box) を高度に保存しており、これらのタンパク質は、転写抑制因子として機能することが予想された (Ohta et al., 2001、Kazan, 2006)。これらの結果から、STZ ファミリータンパク質は、陸上植物が獲得した zinc-finger 型転写抑制因子であり、被子

植物に特化した下流遺伝子の発現制御に関与すると考えられた。

STZ ファミリー遺伝子の乾燥、塩、低温、高温ストレス、および ABA 処理に対する発現応答を比較解析した結果、AZF2、ZAT6、ZAT10はシロイヌナズナの環境ストレス応答に深く関与することが示唆された。また、AZF3、ZAT6、ZAT10 は、低温や高温ストレス下で機能することが示唆された。一方、ZAT6 と ZAT10 は、DREB1A や DREB2A の制御下で機能すると考えられ(Maruyama et al., 2004、Sakuma et al., 2006)、低温や高温ストレス下の植物における ZAT6 や ZAT10、および AZF3 の機能に興味を持たれる。AZF2 は、プロモーター領域に複数の ABRE 配列を持ち、ABA により発現が誘導されるため、主に AREB の下流で機能すると考えられた。

GVG 転写誘導系を用いることで、すべての STZ ファミリー遺伝子をそれぞれ過剰発現した形質転換植物を作出した。得られた形質転換植物では、DEX 処理により AZF/ZAT を一過的に高発現することで、導入遺伝子の構成的な発現による植物への毒性を最小限に抑えることができたと考えられる。さらに、AZF/ZAT を一過的に高発現することで、AZF/ZAT の下流遺伝子の発現量の変化を、時期特異的に解析した。分子系統解析の結果から、AZF1 と ZAT8 における機能の重複が予想されたが、AZF1、AZF2、ZAT8 の下流遺伝子を比較解析した結果、AZF1 と AZF2 の機能の重複が強く示唆された。よって、植物のストレス応答における AZF1 と AZF2 の機能に注目して研究を進めることにした。

III 章では、AZF1 および AZF2 を過剰発現した植物の表現型を解析した。AZF1 と AZF2 の機能獲得型、および機能欠損型の植物を用いて、AZF1 と AZF2 の下流遺伝子の発現を解析した。さらに、下流遺伝子のプロモーター領域とタンパク質の相互作用を検出して、AZF1 と AZF2 の標的遺伝子を同定した。

AZF1 や AZF2 の機能獲得型植物は、塩ストレスに対して高い感受性を示した。GVG 転写誘導系を用いた形質転換植物では、GVG による植物への影響を考慮する必要がある(Kang et al., 1999)。したがって、RD29A プロモーターの制御下で AZF1 や AZF2 を発現した植物の塩ストレス感受性を評価した結果、AZF1 と AZF2 の過剰な発現が、植物の塩ストレス感受性を高めることが確認された。また、AZF2 プロモーター

の制御下で *AZF2* を高発現した植物の高塩感受性を確認することで、導入遺伝子の異所的な発現が形質転換植物の塩感受性を高める可能性を排除した。GVG 転写誘導系を用いて *AZF1* や *AZF2* を過剰発現した植物では、塩ストレスの有無に関係なく枯死する個体が確認された。以上の結果と、*AZF1* や *AZF2* を構成的に発現した形質転換植物の作出が困難であることから、*AZF1* や *AZF2* の過剰な発現は、細胞の正常な生理現象を阻害して、植物のストレス感受性を高めると考えられた。一方、*ZAT10* の構成的な過剰発現は、植物に乾燥、塩、浸透圧ストレスへの耐性を付与することが報告されている (Sakamoto et al., 2004, Mittler et al., 2006)。Mittler ら (2006) は、*ZAT10* の過剰発現は、酸化ストレス応答性遺伝子である *ascorbate peroxidase1* (*APX1*) や *APX2*、および *Fe-superoxide dismutase1* (*FSD1*) の発現を誘導することで、植物に塩、浸透圧ストレス耐性を付与すると報告している。本研究で解析した *AZF1* や *AZF2* の下流遺伝子の中に、これらの酸化ストレス応答性遺伝子は含まれていなかった。塩、乾燥ストレス下の植物において、*AZF1* と *AZF2* は、*ZAT10* と異なる下流遺伝子の発現を制御していると考えられる。

坂本ら (2004) は、*ZAT10* を構成的に発現した植物が乾燥耐性を示すことを報告したが、Mittler ら (2006) は、*ZAT10* の過剰発現体で乾燥耐性を確認できなかったとしている。この表現型の差異は、形質転換植物における *ZAT10* の発現量や、乾燥処理に用いた植物の状態、および栽培環境などに起因すると考えられる。また、過剰発現体を用いて遺伝子の機能を解析する場合、導入遺伝子の植物体における発現部位に留意する必要があると考えられる。本研究では、*AZF2* プロモーターの制御下で *AZF2* を発現した植物を作出して、表現型や遺伝子発現の解析に用いた。*ZAT6* や *ZAT10* のプロモーター活性は、乾燥、塩、低温、高温などのストレスにより強く誘導されと考えられる。よって、これらのプロモーターの制御下で *ZAT6* や *ZAT10* を高発現させた植物の作出は容易であると考えられる。今後、*ZAT6* や *ZAT10* の環境ストレス下における機能を解析するにあたり、ストレス誘導性のプロモーターによる *ZAT6* や *ZAT10* の発現誘導を利用することが重要であると考えられる。

GVG 転写誘導系の制御下で *AZF1* や *AZF2* を高発現した植物は、湾曲した葉柄

や矮化など、顕著な生育阻害を示した。植物体の矮化は、*ZAT10* や *ZAT12* および *ZAT7* を構成的に発現させた植物においても確認されている (Sakamoto et al., 2004、Mittler et al., 2006、Ciftci-Yilmaz et al., 2007)。*AZF1* や *AZF2* を含めて、これらの zinc-finger 遺伝子は、環境ストレス下における植物の成長制御に関与していると考えられる。強光、低温、浸透圧などの環境ストレス下の植物では、光合成活性の低下や細胞内の代謝変動が観察されることが報告されている (Huner et al., 1998、Tezara et al., 1999)。また、乾燥、塩、低温ストレス下の植物では、光合成、糖質代謝に関する多数の遺伝子の発現量が減少することが報告されている (Seki et al., 2002)。よって、植物は、光合成や種々の代謝に関連する遺伝子の発現を抑制することで、環境ストレス下の生育に適した成長とエネルギー収支のバランスを調節していると考えられる。*AZF1* および *AZF2* の過剰発現により転写が抑制された遺伝子には、光合成、糖代謝、脂質代謝に関する遺伝子が含まれていた。*AZF1* や *AZF2* による下流遺伝子の発現制御と、植物の成長制御との関係には大いに興味を持たれる。一方、環境ストレス下の植物における成長の制御機構を理解するためには、多数の遺伝子の発現やタンパク質の修飾、および代謝産物の調節が織りなす複雑な分子機構を解明する必要がある (Vinocur and Altman, 2005、Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006)。

ABA は、多数の遺伝子の発現を正または負に制御することで、環境ストレス下の植物の成長抑制やストレス耐性の獲得に大きく寄与することが知られている (Finkelstein et al., 2002、Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006)。*AZF1* や *AZF2* により発現が抑制された遺伝子群には、浸透圧ストレスおよび ABA 処理で発現量が減少する多数の遺伝子が含まれていた。*AZF2* は、乾燥や塩ストレス下で、ABA 依存적および非依存적経路で発現が誘導されて、標的遺伝子の発現を負に制御すると考えられた (図 20)。また、*AZF1* は、下流遺伝子の多くを *AZF2* と共有しており、乾燥や塩ストレス下で *AZF2* と協調的に働くと考えられる。

AZF1 と *AZF2* に共通の下流遺伝子には、多数のオーキシン応答性遺伝子が含まれていた。オーキシンは、植物の成長と発達の調節において重要なホルモンであり、環境の変化に対応した植物の生理応答に深く関与していると考えられている

(Benjamins and Scheres, 2008、Tomas and Perrot-Rechenmann, 2010)。近年、環境ストレスにより誘導される植物の形態形成反応に関心がもたれている(Potters et al., 2007)。ABA やオーキシンなどの植物ホルモンは、環境ストレス下の植物の形態形成において重要な働きをしていると考えられている(De Smet et al., 2006、Zolla et al., 2010)。AZF1 と AZF2 により発現が抑制された多数の *SAUR* は、シロイヌナズナの *SAUR* ファミリーの中で、オーキシン応答性を示すクラスに属していた。オーキシン応答性を示す *SAUR* の多くは、オーキシンを介した細胞伸長に関係すると考えられている(Paponov et al., 2008)。AZF1 と AZF2 が、*SAUR63* と *SAUR20* のプロモーター領域に結合したことから、*SAUR* の分子系統樹でクラス I と II に属する多くの *SAUR* は(図 17)、AZF1 と AZF2 の標的遺伝子であると考えられた。AZF1 と AZF2 により発現が抑制される下流遺伝子には、*SAUR* をはじめとして、ABA のシグナル下では発現の減少を、オーキシンのシグナル下では発現の増加を示す遺伝子が含まれていた。AZF1 と AZF2 は、環境ストレス下における植物の ABA とオーキシンのシグナル間クロストークに関与していることが示唆された。

シロイヌナズナの *SAUR* ファミリーは、分子系統解析の結果、大きく 3 つのクラスに分類された。AZF1 と AZF2 により発現が抑制された *SAUR* は、主にクラス I および II に属していた。クラス I と II に属する *SAUR* は、オーキシン誘導性を示す遺伝子であることが知られている。また、シロイヌナズナの *MINI ZINC FINGER 1* (*MIF1*) を構成的に発現させた植物は、AZF1 や AZF2 の過剰発現体と同様に、湾曲した葉と矮化を示した(Hu and Ma, 2006)。*MIF1* の過剰発現体では、オーキシンやブラシノステロイド、ジベレリンなどのシグナル伝達経路に関わる多数の遺伝子の発現量が減少していた。この *MIF1* の過剰発現体における遺伝子発現の変化が、過剰発現体の正常な成長を阻害したと考えられている。*MIF1* の過剰発現により、発現量が減少したオーキシン応答性遺伝子には、*IAA* や *SAUR* が含まれていた。発現量が減少した 19 個の *SAUR* のうち、18 個はクラス I および II に属しており、17 個は AZF1 または AZF2 の下流遺伝子であった。よって、AZF1 や AZF2 の過剰発現による植物体の成長阻害と *SAUR* などのオーキシン応答性遺伝子の関係に興味を持たれる。クラス I と II に属する *SAUR*

は、植物の環境ストレス応答におけるオーキシンを介した生理応答に関与していると予想されるが、SAUR の分子的機能、および生理的機能は十分に解明されていない。ホモログの多さや mRNA の速い代謝回転など (Gil and Green, 1996)、SAUR の機能を解析する上での障害は多いが、これらの遺伝子の機能の解明が待たれる。

AZF1 や AZF2 は、SAUR のプロモーター領域との相互作用を介して遺伝子発現を抑制すると考えられる。よって、AZF1 や AZF2 が認識する下流遺伝子のプロモーター中の配列に興味を持たれる。今後、SAUR63 や SAUR20 のプロモーター断片と AZF1 や AZF2 の相互作用を、プロトプラストを用いた一過的発現実験系、およびゲルシフト法により解析することで、AZF1 や AZF2 の結合配列を決定する予定である。また、ChIP シーケンス法など、他の手法を用いて、AZF1 や AZF2 のゲノム上の結合部位を同定することも重要であると考えられる。シロイヌナズナのゲノムにおける AZF1 や AZF2 の結合配列を決定することは、被子植物の C1-2i 型 zinc-finger 転写因子群の今後の研究に大きく貢献すると考えられる。

植物が、環境ストレスを克服するために最適な形態を、人工的に自由に制御できれば、作物に環境ストレス耐性を付与することが可能であると考えられる。例えば、植物の成長を制御して、植物体の水の消費量を抑えることで、植物に乾燥耐性を付与することが可能であると考えられる。また、強風ストレス下では、植物の成長や形態を制御することで、個体の転倒を防止することが期待される。AZF1 や AZF2、ZAT10、ZAT7、ZAT12 などの zinc-finger 遺伝子は、環境ストレス下において、植物の成長を負に制御することが示唆されている。これらの転写因子による遺伝子発現の制御と、植物の成長制御の関係を解明することは、環境ストレス耐性を付与した作物の分子育種につながり、食料の増産や地球環境の修復に貢献することが期待される。

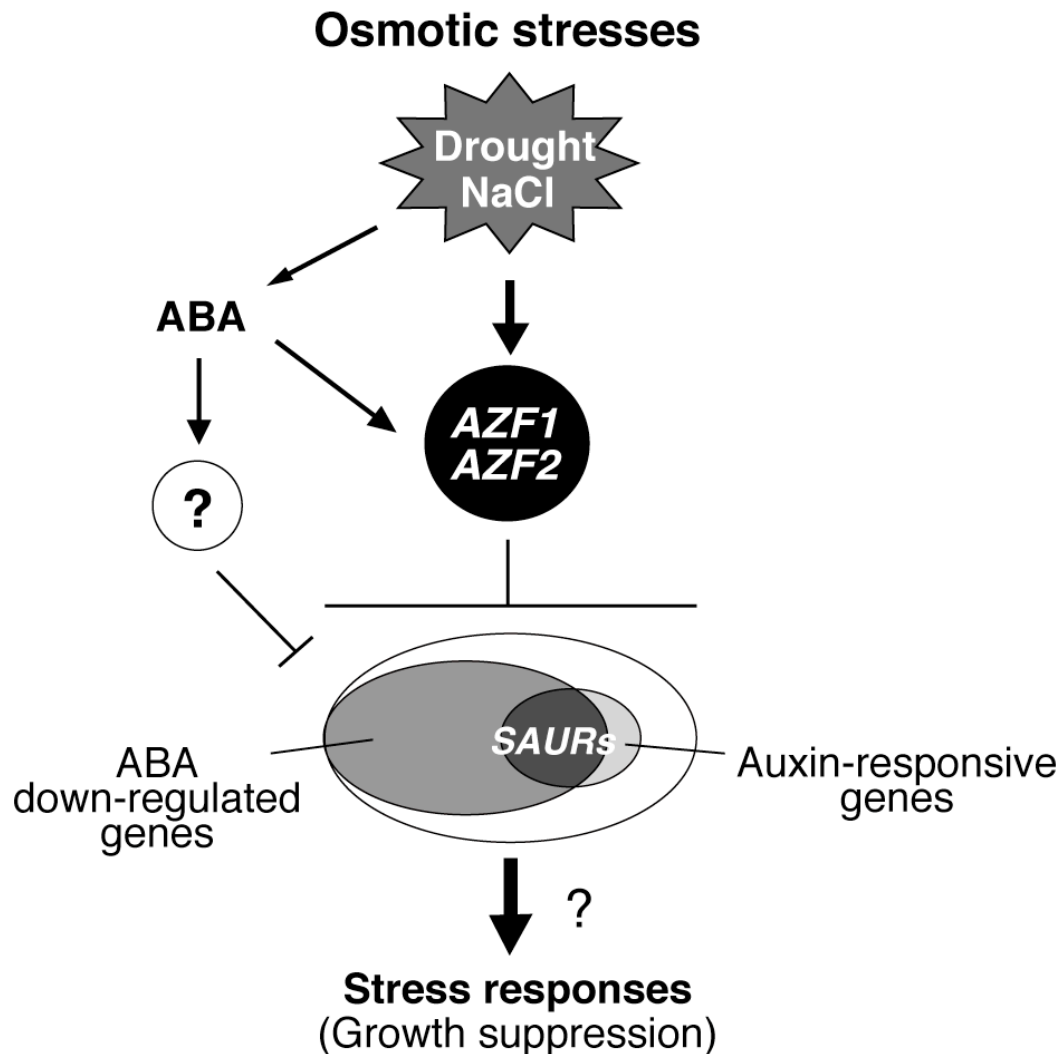


図 20. AZF1 と AZF2 の乾燥、塩ストレス下における機能モデル

AZF1 と AZF2 遺伝子は、乾燥や塩ストレス等の浸透圧ストレスにより発現が誘導される。特に、AZF2 タンパク質は、ABA 依存적および非依存적経路で誘導される。AZF1、AZF2 タンパク質は、浸透圧ストレスと ABA により mRNA の蓄積量が減少する多数の遺伝子の発現を抑制する。AZF1 と AZF2 タンパク質に共通な下流遺伝子には、SAUR 遺伝子のように ABA により発現量が減少し、オーキシンにより誘導される遺伝子が含まれている。AZF1 と AZF2 タンパク質は、転写抑制因子として ABA シグナルに依存した遺伝子の発現抑制に寄与して、植物の浸透圧ストレス応答に関与していると考えられる。

引用文献

- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR** (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653-657
- Aoyama T, Chua NH** (1997) A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J* **11**: 605-612
- Bartels D, Sunkar R** (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**: 23-58
- Bechtold N, Pelletier G** (1998) In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol* **82**: 259-266
- Benjamins R, Scheres B** (2008) Auxin: the looping star in plant development. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 443-465
- Bongaarts J, Sinding S** (2011) Population policy in transition in the developing world. *Science* **333**: 574-576
- Chen W, Provart NJ, Glazebrook J, Katagiri F, Chang HS, Eulgem T, Mauch F, Luan S, Zou G, Whitham SA, Budworth PR, Tao Y, Xie Z, Chen X, Lam S, Kreps JA, Harper JF, Si-Ammour A, Mauch-Mani B, Heinlein M, Kobayashi K, Hohn T, Dangl JL, Wang X, Zhu T** (2002) Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* **14**: 559-574

- Chini A, Fonseca S, Fernandez G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, Garcia-Casado G, Lopez-Vidriero I, Lozano FM, Ponce MR, Micol JL, Solano R** (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**: 666-671
- Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu JK** (2004) Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany* **55**: 225-236
- Choi H, Hong J, Ha J, Kang J, Kim SY** (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem* **275**: 1723-1730
- Ciftci-Yilmaz S, Morsy MR, Song L, Coutu A, Krizek BA, Lewis MW, Warren D, Cushman J, Connolly EL, Mittler R** (2007) The EAR-motif of the Cys2/His2-type zinc finger protein Zat7 plays a key role in the defense response of Arabidopsis to salinity stress. *J Biol Chem* **282**: 9260-9268
- Davletova S, Schlauch K, Coutu J, Mittler R** (2005) The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology* **139**: 847-856
- De Smet I, Zhang H, Inze D, Beeckman T** (2006) A novel role for abscisic acid emerges from underground. *Trends Plant Sci* **11**: 434-439
- Devaiah BN, Nagarajan VK, Raghothama KG** (2007) Phosphate homeostasis and root development in Arabidopsis are synchronized by the zinc finger transcription factor ZAT6. *Plant Physiology* **145**: 147-159
- Drechsel G, Raab S, Hoth S** (2010) Arabidopsis zinc-finger protein 2 is a negative regulator of ABA signaling during seed germination. *Journal of Plant Physiology* **167**: 1418-1421
- Englbrecht CC, Schoof H, Bohm S** (2004) Conservation, diversification and expansion of C2H2 zinc finger proteins in the Arabidopsis thaliana genome. *BMC Genomics* **5**: 39

- Finkelstein RR, Gampala SS, Rock CD** (2002) Absciscic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* **14 Suppl**: S15-45
- Frugier F, Poirier S, Satiat-Jeunemaitre B, Kondorosi A, Crespi M** (2000) A Kruppel-like zinc finger protein is involved in nitrogen-fixing root nodule organogenesis. *Genes Dev* **14**: 475-482
- Fujita Y, Fujita M, Satoh R, Maruyama K, Parvez MM, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2005) AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* **17**: 3470-3488
- Fujita Y, Nakashima K, Yoshida T, Katagiri T, Kidokoro S, Kanamori N, Umezawa T, Fujita M, Maruyama K, Ishiyama K, Kobayashi M, Nakasone S, Yamada K, Ito T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2009) Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of absciscic acid signaling in response to water stress in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **50**: 2123-2132
- Furihata T, Maruyama K, Fujita Y, Umezawa T, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2006) Absciscic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 1988-1993
- Gee MA, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1991) Tissue-specific and organ-specific expression of soybean auxin-responsive transcripts GH3 and SAURs. *Plant Cell* **3**: 419-430
- Gil P, Green PJ** (1996) Multiple regions of the Arabidopsis SAUR-AC1 gene control transcript abundance: the 3' untranslated region functions as an mRNA instability determinant. *EMBO J* **15**: 1678-1686
- Goda H, Shimada Y, Asami T, Fujioka S, Yoshida S** (2002) Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis. *Plant Physiology* **130**: 1319-1334
- Gong Z, Koiwa H, Cushman MA, Ray A, Bufford D, Kore-eda S, Matsumoto TK, Zhu J, Cushman JC, Bressan RA, Hasegawa PM** (2001) Genes that are uniquely

- stress regulated in salt overly sensitive (sos) mutants. *Plant Physiol* **126**: 363-375
- Guilfoyle TJ, Hagen G** (2007) Auxin response factors. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 453-460
- Hagen G, Guilfoyle T** (2002) Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol Biol* **49**: 373-385
- Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S, Mullineaux PM** (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology* **42**: 819-832
- Holmberg N, Bülow L** (1998) Improving stress tolerance in plants by gene transfer. *Trends in Plant Science* **3**: 61-66
- Hoth S, Morgante M, Sanchez JP, Hanafey MK, Tingey SV, Chua NH** (2002) Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. *J Cell Sci* **115**: 4891-4900
- Hu W, Ma H** (2006) Characterization of a novel putative zinc finger gene MIF1: involvement in multiple hormonal regulation of *Arabidopsis* development. *Plant J* **45**: 399-422
- Hu YX, Xie O, Chua NH** (2003) The *Arabidopsis* auxin-inducible gene ARGOS controls lateral organ size. *Plant Cell* **15**: 1951-1961
- Huner NPA, Öquist G, Sarhan F** (1998) Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends in Plant Science* **3**: 224-230
- Iida A, Kazuoka T, Torikai S, Kikuchi H, Oeda K** (2000) A zinc finger protein RHL41 mediates the light acclimatization response in *Arabidopsis*. *Plant J* **24**: 191-203
- Kang HG, Fang Y, Singh KB** (1999) A glucocorticoid-inducible transcription system causes severe growth defects in *Arabidopsis* and induces defense-related genes. *Plant J* **20**: 127-133
- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (1999) Improving

- plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat Biotechnol* **17**: 287-291
- Kazan K** (2006) Negative regulation of defence and stress genes by EAR-motif-containing repressors. *Trends Plant Sci* **11**: 109-112
- Kim JC, Lee SH, Cheong YH, Yoo CM, Lee SI, Chun HJ, Yun DJ, Hong JC, Lee SY, Lim CO, Cho MJ** (2001) A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF-1, enhances cold tolerance in transgenic plants. *Plant J* **25**: 247-259
- Klug A, Schwabe JW** (1995) Protein motifs 5. Zinc fingers. *FASEB J* **9**: 597-604
- Knauss S, Rohrmeier T, Lehle L** (2003) The auxin-induced maize gene ZmSAUR2 encodes a short-lived nuclear protein expressed in elongating tissues. *J Biol Chem* **278**: 23936-23943
- Kubo K, Sakamoto A, Kobayashi A, Rybka Z, Kanno Y, Nakagawa H, Takatsuji H** (1998) Cys2/His2 zinc-finger protein family of petunia: evolution and general mechanism of target-sequence recognition. *Nucleic Acids Res* **26**: 608-615
- Lee H, Guo Y, Ohta M, Xiong L, Stevenson B, Zhu JK** (2002) LOS2, a genetic locus required for cold-responsive gene transcription encodes a bi-functional enolase. *EMBO J* **21**: 2692-2702
- Lippuner V, Cyert MS, Gasser CS** (1996) Two classes of plant cDNA clones differentially complement yeast calcineurin mutants and increase salt tolerance of wild-type yeast. *J Biol Chem* **271**: 12859-12866
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**: 1391-1406
- Maruyama K, Sakuma Y, Kasuga M, Ito Y, Seki M, Goda H, Shimada Y, Yoshida S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2004) Identification of cold-inducible

- downstream genes of the Arabidopsis DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *Plant J* **38**: 982-993
- Mcclure BA, Guilfoyle T** (1987) Characterization of a Class of Small Auxin-Inducible Soybean Polyadenylated Rnas. *Plant Molecular Biology* **9**: 611-623
- Meissner R, Michael AJ** (1997) Isolation and characterisation of a diverse family of Arabidopsis two and three-fingered C2H2 zinc finger protein genes and cDNAs. *Plant Molecular Biology* **33**: 615-624
- Michael AJ, Hofer JM, Ellis TH** (1996) Isolation by PCR of a cDNA clone from pea petals with similarity to petunia and wheat zinc finger proteins. *Plant Molecular Biology* **30**: 1051-1058
- Miller J, McLachlan AD, Klug A** (1985) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J* **4**: 1609-1614
- Mito T, Seki M, Shinozaki K, Ohme-Takagi M, Matsui K** (2011) Generation of chimeric repressors that confer salt tolerance in Arabidopsis and rice. *Plant Biotechnol J* **9**: 736-746
- Mittler R, Kim Y, Song L, Coutu J, Coutu A, Ciftci-Yilmaz S, Lee H, Stevenson B, Zhu JK** (2006) Gain- and loss-of-function mutations in *Zat10* enhance the tolerance of plants to abiotic stress. *FEBS Lett* **580**: 6537-6542
- Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K** (2009) Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses. *Plant Physiology* **149**: 88-95
- Nakashima K, Fujita Y, Kanamori N, Katagiri T, Umezawa T, Kidokoro S, Maruyama K, Yoshida T, Ishiyama K, Kobayashi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2009) Three Arabidopsis SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant Cell Physiol* **50**: 1345-1363

- Nemhauser JL, Hong F, Chory J** (2006) Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell* **126**: 467-475
- Ohta M, Matsui K, Hiratsu K, Shinshi H, Ohme-Takagi M** (2001) Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell* **13**: 1959-1968
- Pabo CO, Peisach E, Grant RA** (2001) Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biochem* **70**: 313-340
- Paponov IA, Paponov M, Teale W, Menges M, Chakrabortee S, Murray JA, Palme K** (2008) Comprehensive transcriptome analysis of auxin responses in Arabidopsis. *Mol Plant* **1**: 321-337
- Pauwels L, Barbero GF, Geerinck J, Tilleman S, Grunewald W, Perez AC, Chico JM, Bossche RV, Sewell J, Gil E, Garcia-Casado G, Witters E, Inze D, Long JA, De Jaeger G, Solano R, Goossens A** (2010) NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* **464**: 788-791
- Pavletich NP, Pabo CO** (1991) Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* **252**: 809-817
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MA** (2007) Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends Plant Sci* **12**: 98-105
- Qin F, Sakuma Y, Tran LS, Maruyama K, Kidokoro S, Fujita Y, Fujita M, Umezawa T, Sawano Y, Miyazono K, Tanokura M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2008) Arabidopsis DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. *Plant Cell* **20**: 1693-1707
- Redman JC, Haas BJ, Tanimoto G, Town CD** (2004) Development and evaluation of an Arabidopsis whole genome Affymetrix probe array. *Plant J* **38**: 545-561

- Rizhsky L, Davletova S, Liang H, Mittler R** (2004) The zinc finger protein Zat12 is required for cytosolic ascorbate peroxidase 1 expression during oxidative stress in Arabidopsis. *J Biol Chem* **279**: 11736-11743
- Sakamoto A, Minami M, Huh GH, Iwabuchi M** (1993) The putative zinc-finger protein WZF1 interacts with a cis-acting element of wheat histone genes. *Eur J Biochem* **217**: 1049-1056
- Sakamoto H, Araki T, Meshi T, Iwabuchi M** (2000) Expression of a subset of the Arabidopsis Cys(2)/His(2)-type zinc-finger protein gene family under water stress. *Gene* **248**: 23-32
- Sakamoto H, Maruyama K, Sakuma Y, Meshi T, Iwabuchi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2004) Arabidopsis Cys2/His2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions. *Plant Physiol* **136**: 2734-2746
- Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Qin F, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2006) Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell* **18**: 1292-1309
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K** (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J* **31**: 279-292
- Sessions A, Burke E, Presting G, Aux G, McElver J, Patton D, Dietrich B, Ho P, Bacwaden J, Ko C, Clarke JD, Cotton D, Bullis D, Snell J, Miguel T, Hutchison D, Kimmerly B, Mitzel T, Katagiri F, Glazebrook J, Law M, Goff SA** (2002) A high-throughput Arabidopsis reverse genetics system. *Plant Cell* **14**: 2985-2994

- Song CP, Agarwal M, Ohta M, Guo Y, Halfter U, Wang P, Zhu JK** (2005) Role of an Arabidopsis AP2/EREBP-type transcriptional repressor in abscisic acid and drought stress responses. *Plant Cell* **17**: 2384-2396
- Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF** (1997) Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 1035-1040
- Sugano S, Kaminaka H, Rybka Z, Catala R, Salinas J, Matsui K, Ohme-Takagi M, Takatsuji H** (2003) Stress-responsive zinc finger gene ZPT2-3 plays a role in drought tolerance in petunia. *Plant J* **36**: 830-841
- Szemenyei H, Hannon M, Long JA** (2008) TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during Arabidopsis embryogenesis. *Science* **319**: 1384-1386
- Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **29**: 417-426
- Takahashi S, Seki M, Ishida J, Satou M, Sakurai T, Narusaka M, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Akiyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2004) Monitoring the expression profiles of genes induced by hyperosmotic, high salinity, and oxidative stress and abscisic acid treatment in Arabidopsis cell culture using a full-length cDNA microarray. *Plant Mol Biol* **56**: 29-55
- Takatsuji H, Mori M, Benfey PN, Ren L, Chua NH** (1992) Characterization of a zinc finger DNA-binding protein expressed specifically in Petunia petals and seedlings. *EMBO J* **11**: 241-249
- Takatsuji H, Nakamura N, Katsumoto Y** (1994) A new family of zinc finger proteins in

- petunia: structure, DNA sequence recognition, and floral organ-specific expression. *Plant Cell* **6**: 947-958
- Takatsuji H** (1999) Zinc-finger proteins: the classical zinc finger emerges in contemporary plant science. *Plant Mol Biol* **39**: 1073-1078
- Tao Y, Ferrer JL, Ljung K, Pojer F, Hong FX, Long JA, Li L, Moreno JE, Bowman ME, Ivans LJ, Cheng YF, Lim J, Zhao YD, Ballare CL, Sandberg G, Noel JP, Chory J** (2008) Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* **133**: 164-176
- Tezara W, Mitchell VJ, Driscoll SD, Lawlor DW** (1999) Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature* **401**: 914-917
- Thomashow MF** (1999) PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 571-599
- Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle TJ** (2004) Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *Plant Cell* **16**: 533-543
- Tromas A, Perrot-Rechenmann C** (2010) Recent progress in auxin biology. *C R Biol* **333**: 297-306
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2000) Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 11632-11637
- van Der Krol AR, van Poecke RM, Vorst OF, Voogt C, van Leeuwen W, Borst-Vrensen TW, Takatsuji H, van Der Plas LH** (1999) Developmental and wound-, cold-, desiccation-, ultraviolet-B-stress-induced modulations in the expression of the petunia zinc finger transcription factor gene ZPT2-2. *Plant Physiology* **121**: 1153-1162
- Vinocur B, Altman A** (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr Opin Biotechnol* **16**: 123-132

- Vogel JT, Zarka DG, Van Buskirk HA, Fowler SG, Thomashow MF** (2005) Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of Arabidopsis. *Plant J* **41**: 195-211
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 781-803
- Yang Z, Tian L, Latoszek-Green M, Brown D, Wu K** (2005) Arabidopsis ERF4 is a transcriptional repressor capable of modulating ethylene and abscisic acid responses. *Plant Molecular Biology* **58**: 585-596
- Yoo SD, Cho YH, Sheen J** (2007) Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols* **2**: 1565-1572
- Yoshida T, Fujita Y, Sayama H, Kidokoro S, Maruyama K, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2010) AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant J* **61**: 672-685
- Zhu JK** (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 247-273
- Zolla G, Heimer YM, Barak S** (2010) Mild salinity stimulates a stress-induced morphogenic response in Arabidopsis thaliana roots. *J Exp Bot* **61**: 211-224

謝辞

本研究の推進にあたり、多大なるご指導と充実した研究環境を与えてくださいました、東京大学大学院植物分子生理学研究室の篠崎和子教授に謹んで感謝の意を表します。本研究にあたり、ご支援くださいました植物分子生理学研究室の刑部祐里子博士、溝井順哉博士、城所聡博士、および学生の方々にも感謝いたします。特に、本研究の遂行にあたり、技術的なご指導ならびにご助言を賜りました城所聡博士に深く感謝いたします。

また、本研究を行うにあたり、技術的なご指導ならびに有益なご討論を賜りました中国科学院植物研究所植物分子生理学院重点实验室の秦峰教授、理化学研究所のLam-Son Phan Tran博士に心より感謝いたします。

また、マイクロアレイ解析や博士論文の作成において貴重なご指導やご助言を賜りました国際農林水産業研究センターの圓山恭之進博士に深く感謝いたします。

最後に、本研究を行うにあたり種々の実験や研究所での活動において多大なご協力をいただきました、国際農林水産業研究センターの研究員、実験技術補佐員、秘書の方々、理化学研究所の機能開発研究チームの方々に心より感謝いたします。

平成 23 年 10 月