

令和元年9月3日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07111

研究課題名(和文) トウモロコシ幼葉鞘の先端特異的な青色光受容とIAA合成・輸送制御機構の解明

研究課題名(英文) Studies on tip specific blue light perception and IAA biosynthesis/transport in maize coleoptiles

研究代表者

小柴 共一 (KOSHIBA, Tomokazu)

首都大学東京・理学研究科・客員教授

研究者番号：80117704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の遂行により、(1)青色光受容に働く特異的細胞は、IAA合成細胞と同じ幼葉鞘先端の表皮細胞であること、(2)根の光依存重力屈性には根冠のスタトリスの細胞内にあるデンプン粒の重力による細胞内移動が根の屈性に必須であり、この移動に光の照射が必要であること(3)Zmphot1の弱青色光によるSer291およびSer376のリン酸化がMS解析によって明らかになり一次正光屈性へのこれらのリン酸化が必須であること、(4)JA誘導性のイネの根のJA誘導性RSOsPR10遺伝子の発現誘導への複数の植物ホルモンによる制御機構について新たな知見が得られた。以上の結果の大部分は国際的な論文に発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の光屈性の分子レベルの機構に関して新たな知見を得ることができた。一部は、まだ論文投稿中の内容があるが、当初の目標を十分に達成した。今後の世界的な研究の進展に大きく貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：We have obtained several results as follows.

(1) Blue light specific site (cells) in maize coleoptiles are suggested to be outer cell layers of coleoptile regions, which are indicated IAA synthesis regions as previous studies. (2) Movement of starch grains in the root tip cells are suggested to be regulate light irradiation, and necessary in light-dependent root gravitropism. (3) Ser291 in Zmphot1 was identified as a low-fluence blue light-induced phosphorylation site that is crucial for the first positive phototropism. (4) RSOsPR10 expression in rice root tips are regulated by cross-talk of plant hormones, such as jasmonate, salicylic acid and maybe IAA. Main results of these studies have been published in international journals.

研究分野：生化学

キーワード：植物生理学 植物ホルモン 植物環境応答 幼葉鞘の光屈曲 根の光・重量応答 根系分化・成長

1. 研究開始当初の背景

植物ホルモンオーキシシン (IAA) は、植物の発生、分化、環境応答など多くの現象に重要な役割を果たす。申請者らはこれまで、トウモロコシ幼葉鞘の先端での IAA 生合成に注目し、重力や光屈曲との関係性を含め研究を進めてきた。特に最近、青色光受容と IAA 合成が幼葉鞘先端部 0-2 mm で行われることが分かってきた。このため、先端という極めて限られた領域内で青色光受容が直接 IAA 生合成とその輸送に影響を与える可能性がある。本計画では、青色光受容体 *Zmphot1* と先端特異的に発現・分布する *ZmNPH3* (*Zmphot1* と相互作用)、*ZmPGP19* (IAA 輸送タンパク質) および、*ZmYUC2* (IAA 生合成鍵酵素) に注目し、組織・細胞内の分布、リン酸化状態、相互作用等の解析、特に IAA 生合成・輸送の制御までの流れについて詳細な検討を加える。また、根の負の光屈曲との比較研究も、連携研究者と海外研究協力者の協力を得て進める。

植物の光による屈曲の初期反応は、青色光受容体型キナーゼである *phot1* による青色光受容である。これまで、モデル植物であるシロイヌナズナでの遺伝学的な手法を中心に *phot1* による青色光受容や、関連因子として *NPH3*、*PKS*、*RPT2* などの関与、IAA の輸送体である *PIN3*、*PGP19* の細胞内分布の変化などが報告されている。しかし、シロイヌナズナ芽生えは植物体が小さいことから組織・細胞レベルでの解析が非常に困難であり、青色光受容部位や IAA 合成部位、IAA 偏差分布形成機構の詳細について、未だ未解明である。これに対して、単子葉植物、特にトウモロコシの幼葉鞘は大きく、比較的単純な組織構造をしている。そのため、IAA の定量による分布変化や特異抗体による目的タンパク質の組織・細胞レベルの分布を直接観察できる。加えて、リン酸化などのタンパク質修飾の違いを光照射側、陰側など部位ごとに分けて解析することも可能である。上記の利点を生かした申請者らのこれまでの研究から、トウモロコシ幼葉鞘では、

Trp を前駆体とする IAA 生合成が先端 0-2 mm 領域で行われており、生合成の鍵酵素である *ZmYUC* 遺伝子の一部がこの領域に特異的に多く発現している、青色光の受容は先端 0-3 mm で行われ、横からの青色光照射に対して照射後 20 分以内に先端部で IAA 偏差分布が形成される、

受容体である *ZmPHOT1* は幼葉鞘全体に比較的広範囲に分布するのに対して、*ZmNPH3*、*ZmPGP19* の発現は先端 0-2 mm に特異性が高い、ことを明らかにしてきた。以上より、トウモロコシ幼葉鞘における光屈曲は、*Zmphot1* で受容された青色光刺激の情報が先端特異的に発現する *ZmNPH3* および *ZmPGP19* に伝わり、IAA の短時間での偏差分布形成が IAA 生合成部位である同じ先端で起こることが示されている。*Atphot1* はシロイヌナズナ幼苗の表皮細胞に多く分布していることが報告されているが、トウモロコシ幼葉鞘でも *Zmphot1* 表皮細胞に分布すること、さらに IAA の合成が行われるのも先端部の同じ表皮細胞であることが免疫組織化学的な観察から示唆されている。以上の背景と研究蓄積から本課題を設定した。

2. 研究の目的

本計画では、トウモロコシ幼葉鞘を材料として、まず *Zmphot1* と *ZmYUC2* の免疫組織化学での詳細な観察を組織・細胞レベルで進める。同時に *Zmphot1* に相互作用する関連タンパク質の組織分布を明確にする。また、申請者らの研究や、海外のグループの研究でも弱い青色光 (LBL) では *phot1* のリン酸化は報告されていない。こうしたことから LBL 照射では照射側のごく一部の *phot1* がリン酸化する、または *phot1* のリン酸化シグナルは瞬時に伝達され、すぐに脱リン酸化される可能性などが考えられる。青色光受容と IAA 生合成の関連を明らかにするためにも、より詳細な LBL 照射後の *Zmphot1* のリン酸化状態の解析と、*ZmNPH3*、*ZmPGP19* などとの相互作用やそれらの機能に関する解析を中心に進める。

(1) Zmphot1 による青色光受容に働く細胞（群）の特定：Zmphot1 および、ZmNPH3、ZmPGP19 タンパク質に対する抗体を用いて、先端領域の組織・細胞レベルでの分布とそれらの共局在の有無を調べる。また、mRNA の発現部位も観察する。

(2) IAA 合成細胞の特定と ZmYUC2 や細胞内 IAA 分子の観察を進める。IAA 合成細胞（群）が特定できた場合、その細胞内での IAA 分子の存在状態について免疫電顕を用いて観察する。

(3) LBL 照射後の Zmphot1 のリン酸化状態を MS 解析により調べる。同時に、同じ画分に検出される相互作用因子を ZmNPH3、ZmPGP19 については抗体を用いて、それ以外の因子 (PSK などが候補) については MS 解析により同定する。

(4) 根の負の光屈曲：連携研究者や海外協力者との共同研究として行う。トウモロコシやシロイヌナズナの根の光忌避反応について、幼葉鞘で得られている知見と比較検討し、phot1 の関与や IAA 偏差分布形成、ROS 形成との関係などを調べる。

3. 研究の方法

(1) Zmphot1、ZmNPH3、ZmPGP19 の組織・細胞レベルの分布解明：免疫組織化学染色および in situ hybridization により幼葉鞘組織・細胞内分布を明らかにする。また、レポーターを繋いだ遺伝子をボンバードメント法で導入し細胞内局在を観察する。

(2) ZmYUC2 や細胞内 IAA 分子の観察：ZmYUC2 の先端組織内での分布を(1)と同様の方法で明らかにする。抗 IAA 抗体を用いた免疫電顕により IAA 分子の細胞内局在を観察する。

(3) Zmphot1 のリン酸化解析および相互作用因子の探索：抗 phot1 抗体、または遺伝子導入後タグ抗体により Zmphot1 をプルダウンする。その画分を LC-MS/MS で解析しリン酸化部位を特定する。

(4) 連携研究者や海外協力者との共同研究として、根の光依存性重力屈性の機構解析を進める。

4. 研究成果

15-16 年度は、主に目的(1), (2), (4)に関する研究が先行し、主な成果は論文としてまとめた。青色光受容に働く特異的細胞（群）は、IAA 合成細胞と同じ幼葉鞘先端の表皮細胞である可能性が、明らかになった。また、根の光依存重力屈性に関しては根冠のストラリスの細胞内にあるデンプン粒の重力による細胞内移動が根の屈性に必須であるが、この移動に光の照射が必要である可能性が明らかになってきた。この課題については、現在でも共同研究者らにより研究が継続されている。16-18 年度は、(3)を中心に進めた。研究成果は、主に学会発表としてまとめられるとともに、論文は現在投稿中にある。主な成果は以下となる。phot1 の Ser291 および Ser376 のリン酸化状態が一次正光屈性を誘導する弱青色光照射によって上昇することがわかり、またこれらのリン酸化は幼葉鞘の照射側の方が非照射側よりも高いことが示された。さらに、この弱青色光によって誘導される Zmphot1 のリン酸化の一次正光屈性への関与を明らかにするために、シロイヌナズナ *phot1phot2* 欠損体に野生型の *ZmPHOT1* 遺伝子、リン酸化部位を Ala に置換した *ZmPHOT1* 遺伝子をそれぞれ導入した形質転換植物体を作成した結果、弱青色光によって誘導される Zmphot1 のリン酸化は一次正光屈性に必須なリン酸化サイトであることが明らかになった。この結果は、これまで不明だった弱青色光による植物の一次正屈性の phot1 を介した光屈性の分子機構を明らかにする上で優れた成果である。

また、JA 誘導性のイネの根の成長制御に関する JA 誘導性 RSOsPR10 遺伝子の発現誘導は根における IAA の作用との相互作用が考えられるため、このテーマについても研究成

果が得られた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Yamamoto, T., Yoshida, Y., Nakajima, K., Tominaga, M., Gyohda, A., Suzuki, H., Okamoto, T., Nishimura, T., Yokotani, N., Minami, E., Nishizawa, Y., Miyamoto, K., Yamane, H., Okada, K., Koshiba, T. (2018) Expression of *RSOsPR10* in rice roots is antagonistically regulated by jasmonate/ethylene and salicylate via activator OsERF87 and the repressor OsWRKY76, respectively. *Plant Direct*. [DOI: 10.1002/pld3.49]

Tsugafune, S.^a, Mashiguchi, K.^b, Fukui, K.^a, Takebayashi, Y.^c, Nishimura, T.^d, Sakai, T.^e, Shimada, Y.^f, Kasahara, H.^{c,g}, Koshiba, T.^h, Hayashi, K.-I.^a (2017) Yucasin DF, a potent and persistent inhibitor of auxin biosynthesis in plants. *Scientific Rep.*7:13992 [DOI: 10.1038/s41598-017-14332-w]

Kanno, Y., Oikawa, T., Chiba, Y., Ishimaru, Y., Shimizu, T., Sano, N., Koshiba, T., Kamiya, Y., Ueda, M., Seo, M. (2016) AtSWEET13 and AtSWEET14 regulate gibberellin-mediated physiological processes. *Nat Commun*, 13245. [DOI: 10.1038/ncomms13245]

Takeuchi, K., Hasegawa, H., Gyohda, A., Komatsu, S., Okamoto, T., Okada, K., Terakawa, T., Koshiba, T. (2016) Overexpression of *RSOsPR10*, a root-specific rice PR10 gene, confers tolerance against drought stress in rice and drought and salt stresses in bentgrass. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 127:35–46. [DOI:10.1007/s11240-016-1027-0]

Suzuki, H., Yokawa, K., Nakano, S., Yoshida, Y., Fabrissin, I., Okamoto, T., Baluška, F., Koshiba, T. (2016) Root cap-dependent gravitropic U-turn of maize root requires light-induced auxin biosynthesis via the YUC pathway in the root apex. *Journal of Experimental Botany*, 67: 4581-4591. [DOI: 10.1093/jxb/erw232]

Shimamura, S., Nishimura, T., Koshiba, T., Yamamoto, R., Hiraga, S., Nakamura T., Komatsu, S. (2016) Effects of anti-auxins on secondary aerenchyma formation in flooded soybean hypocotyls. *Plant Product. Sci.*, 19; 154–160. [doi.org/10.1080/1343943X.2015.1128101]

Shimizu, T., Miyakawa, S., Esaki, T., Mizuno, H., Masujima, T., Koshiba, T., Seo, M. (2015) Live single cell plant hormone analysis by video-mass spectrometry. *Plant Cell Physiol.*, 56: 1287-1296. [doi:10.1093/pcp/pcv042]

〔学会発表〕(計 8 件)

Suzuki, H., Koshiba, T., Fujita, C., Yamauchi, Y., Kimura, T., Isobe, T., Sakai, T., Taoka, M., Okamoto T. (2018) Zmphot1 functions according to the extent of its fluence-dependent phosphorylation. 第 59 回日本植物生理学会年会 (3 月、札幌)

鈴木洋弥、藤田千春、木村太郎、酒井達也、磯辺俊明、岡本龍史、小柴共一 (2017) 「トウモロコシ幼葉鞘の光屈性における Zmphot1 の光量依存的なリン酸化の解析」第 58 回日本植物生理学会年会 (3 月、鹿児島)

Shimizu, T., Masujima, T., Koshiba, T., Seo, M. (2017) Current situation of quantitative single cell plant hormone analysis by mass spectrometry. 第 58 回日本植物生理学会年会シンポジウム (3 月、鹿児島)

鈴木洋弥、磯辺俊明、藤田千春、田岡万悟、岡本龍史、小柴共一 (2016) 「トウモロコシ幼葉鞘における Zmphot1 のリン酸化状態への青色光の影響」第 57 回日本植物生理学会年会 (3 月、盛岡)

Yokawa, K., Suzuki, H., Nakano, S., Yoshida, Y., Okamoto, T., Baluska, F., Koshiba, T. (2016) Light switches on the gravi-sensitivity of maize roots by inducing de novo IAA biosynthesis in root apex. 第 57 回日本植物生理学会年会 (3 月、盛岡)

Koshiba, T. (2015) Overexpression of *RSOsPR10* improves drought and salt tolerance in bentgrass and rice. 7th International Symposium on Frontiers in Agricultural Proteome Research, Sep 22-25, Goesan-gun, Korea. [Invited]

Suzuki H., Kanegae T., Okamoto T., Koshiba T. (2015) Subcellular localization and interaction of Zmphot1 and ZmNPH3-like proteins. ICAR2015 July 2-6, Paris.

Suzuki, H., Yokawa K., Okamoto T., Baluška, F., Koshiba, T. (2015) Light and root cap-dependent gravitropism of maize root requires auxin biosynthesis. *Plant Signal Behav* 2015, June 26-30, Paris.

〔図書〕(計 1 件)

Nishimura, T. Koshiba, T. (2018) Immunolocalization of IAA using an anti-IAA-C antibody raised against carboxyl-linked IAA. In “Signaling and Communication in Plants. Polar Auxin Transport”, Eds, Rujin Chen and Frantisek Baluška, Springer, p.221-238.

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

（なし）

(2) 研究協力者

連携研究者：岡本 龍史 （OKAMOTO, takashi）

陽川 憲 （YOKAWA, ken）

研究協力者：鈴木 洋弥 （SUZUKI, hiromi）

海外研究協力者：BALUSKA, Frantisek

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。