

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19329

研究課題名(和文) オーキシン不均等勾配非依存的な光屈性誘導機構の分子遺伝学的解析

研究課題名(英文) Molecular genetic analysis on the asymmetric auxin distribution-independent phototropism

研究代表者

酒井 達也 (Sakai, Tatsuya)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：10360554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物の光屈性はオーキシン不均等勾配依存的な応答と非依存的な応答に分かれて行われる。我々は全く未知なオーキシン不均等勾配非依存的な光屈性誘導機構の分子機構を探索し、本研究によってそこで働くことが示唆される PP2C 遺伝子ファミリーを発見した。本遺伝子がコードするタンパク質が光照射によって転写制御やタンパク質リン酸化修飾を受ける可能性を見出した。また芽生え内において多数のタンパク質のリン酸化修飾調節に働くことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光屈性はオーキシン不均等勾配によって生じることは、高校の生物教科書でも記された一般的理解である。本研究によってオーキシン不均等勾配に依存しない光屈性誘導機構を明らかにできれば、教科書を書き換える発見となる。また新しい偏差成長の仕組みを明らかにすることによって、光屈性誘導に働くフォトトロピン光受容体機能や、新しい細胞伸長調節の仕組みを明らかにできるといった点で、学術的意義のある研究である。本研究期間内では論文発表にまでは至らなかったが、これに関与することが示唆された PP2C 遺伝子機能の詳細を明らかにすることは、今後の植物生理学研究にとって重要と考えられる。

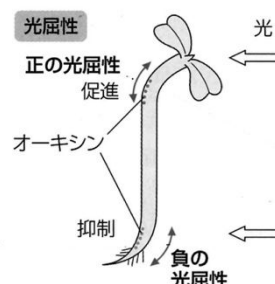
研究成果の概要(英文)：Etiolated hypocotyls of Arabidopsis seedlings show the phototropic responses in the asymmetric auxin distribution-dependent and -independent manners. We have identified the PP2C gene subfamily, which is probably involved in the asymmetric auxin distribution-independent phototropism. One of them is regulated by light irradiation transcriptionally, and another is phosphorylated in a phototropin-dependent manner. Our phosphoproteome analysis suggests that they function in the phosphorylation modification of many proteins in the etiolated seedlings.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：オーキシン 光屈性 PP2C リン酸化修飾

1. 研究開始当初の背景

植物の芽生えは発芽後、効率よく光合成を行うために地上部を光源方向に向かって成長させ、根は発芽後の乾燥を避け水分や栄養を吸収するために光源方向を避けるように大地方向に向かって成長させる、いわゆる光屈性を示す(図1)。光屈性は植物の環境適応のための個体統御能力の一つであり、芽生えの確立期の生存に決定的な性質である。被子植物の光屈性は器官の光照射側と陰側の光刺激の差を植物ホルモン・オーキシンの濃度勾配に変換し、光照射側と陰側の細胞伸長さ(偏差成長)を誘導する反応と考えられている。環境刺激に応答したオーキシン不均等勾配形成機構は、重力屈性において理解が進んでいる。細胞膜局在のオーキシン輸送体が環境刺激に応答してその細胞内局在や輸送活性の変化を起こし、横方向のオーキシン極性輸送によって不均等勾配を形成し、オーキシンによる細胞伸長作用の差を生みだして、器官の屈曲を誘導すると考えられている。光屈性も重力屈性同様、オーキシン不均等勾配の結果生じる偏差成長反応だと推測されているが(図1) 実際には未だその詳細な理解は得られていない。



オーキシンは光の当たらない側で濃度が高くなるが、部位によって作用が異なる。

図1.光屈性とオーキシン不均等分布。高校「生物」東京書籍より引用。

申請者研究グループはこれまでの研究から、光屈性が確かにオーキシン輸送体を介したオーキシン不均等勾配形成によって生じることを示す一方で、オーキシン不均等勾配形成に依存しない未知の偏差成長機構も働いていることを明らかにした(Nagashima et al. [2008] Plant Cell Physiol.; Tsuda et al. [2011] J. Biol. Chem.; Haga and Sakai [2012] Plant Physiol., Haga et al. [2014] Plant Physiol.; Kimura et al. [2018] Plant Cell Physiol., 当時論文投稿中)。光屈性はフォトトロピンと呼ばれる青色光受容体によって誘導される。フォトトロピンは単細胞緑藻植物から既に存在する光受容体であり、細胞自立的な働きをする。これが進化の過程でオーキシン細胞間輸送調節という間接的な細胞非自立的な機能を獲得し、オーキシンにモルフォゲンとしての機能を与え、植物の多細胞化を生んだと考えられている。フォトトロピンによる光屈性誘導は、オーキシンを介した細胞非自立的な偏差成長制御に加え、それ以前から進化の過程で存在した細胞自立的・オーキシン非依存的な細胞伸長制御機構によっても生じている可能性を我々の研究結果は示唆した。すなわち、オーキシン不均等勾配非依存的な光屈性誘導機構の解明は、植物の環境刺激に応答した成長パターン調節の仕組みを明らかにするばかりでなく、植物がオーキシン不均等勾配形成能力を獲得し多細胞化への道を開いた進化の歴史を明らかにすることが期待された。

2. 研究の目的

そこで我々は、オーキシン不均等勾配に依存しない未知の光屈性誘導機構を明らかにすることを目的に、以下の実験を行うことにした。オーキシン不均等勾配形成が異常な *pin3 pin7* 二重変異体は、パルス光照射による光屈性反応は著しい異常を示すが、連続光照射による光屈性は正常である。この突然変異体種子に変異原処理を施し、連続光照射下でも光屈性反応が著しく弱くなったエンハンサー突然変異体を選抜し解析した。表現型の再現性が確認できた多数の変異体のうち、既知の光屈性関連遺伝子に変異が見つからないエンハンサー変異体 6 株を単離することに成功した。このうちの 1 株については解析を先行して進め、新奇 *PP2C* 遺伝子が光屈性に関与することを示唆する大変興味深い結果を得た(未発表)。これらの突然変異体の原因遺伝子をさらに同定し解析を進め、オーキシン不均等勾配に依存しない光屈性誘導機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

オーキシン輸送体 PIN3 及び PIN7 はシロイヌナズナ芽生え胚軸及び根のオーキシン横輸送に働き、その二重変異体は重力屈性及びパルス光照射誘導の胚軸光屈性に異常を示す。一方、連続光照射の光屈性については胚軸・根どちらも共に正常である。申請者らは *pin3 pin7* 二重変異体に変異原処理を行い、連続光照射誘導の光屈性が異常になったエンハンサー突然変異体を選抜した。主な選抜株について全ゲノム塩基配列決定を行い、PHOT1、RPT2、NPH3、NPH4、PHYA、MSG2 等の既知の光屈性関連遺伝子に変異を持たない 6 株の突然変異体選抜に成功した(未発表)。

そこで本研究課題ではこれらの新奇突然変異体の分子遺伝学的解析によって、研究目的であるオーキシン不均等勾配非依存的な光屈性誘導機構の解明を行った。第一に各株の原因遺伝子を同定することにした。ポジショナルクローニングによる染色体位置決定と全ゲノム塩基配列決定によってリストアップされている塩基変異情報を考慮することによって、候補となる原因

遺伝子を特定することにした。候補遺伝子を突然変異体に遺伝子導入して相補性を確認することで、原因遺伝子を特定する。シロイヌナズナは遺伝子破壊株リソースが存在し、ほとんどの遺伝子についてその破壊株をバイオリソースセンターより入手可能である。候補となる原因遺伝子破壊株を収集し、オーキシン極性輸送阻害剤 NPA を低濃度含む培地上での光屈性を観察し、シングル突然変異体でも連続光照射誘導の光屈性が異常になるか観察する。すでにこれらの方法によって、1 つの株については原因遺伝子をほぼ特定する作業を終え、原因遺伝子が新奇 PP2C タンパク質脱リン酸化酵素をコードすることを明らかにした(未発表)。その他の 5 株について、ポジショナルクローニング作業及び遺伝子破壊株収集・表現型観察を進める。第二に、特定した原因遺伝子の機能解析を行う。遺伝子発現パターン、コードするタンパク質の細胞内局在、光による発現・細胞内局在パターンの変化の有無、働くシグナル伝達経路の上下関係、光屈性誘導に働く青色光受容体フォトトロピンによる機能調節の有無、他関連遺伝子突然変異体との多重変異体表現型観察、コードするタンパク質の生化学的機能の解析等を行う。これらの解析によって、オーキシン不均等勾配非依存的な光屈性誘導機構の遺伝学的モデルを構築する。

4. 研究成果

(1) 新奇 PP2C の光屈性における機能解析

単離した *pp2c* 突然変異体芽生えの表現型観察を行った。胚軸の一次、二次正光屈性、根の光屈性は弱くなる一方、重力屈性、成長速度には異常が観察されなかった。同定した PP2C 遺伝子には相同遺伝子が存在したため、その遺伝子が異常になった突然変異体を収集し、同様に光屈性応答を観察した。その結果、相同遺伝子の単一の欠失変異では異常が観察されないものの、2 重変異体になると、著しい胚軸屈曲異常が観察された。また二重変異体にオーキシンレポーター遺伝子 *DR5::GFP* を導入し、オーキシン応答パターンを調べたところ、光屈性がおきないにも関わらず、青色光照射によりオーキシン不均等勾配そのものは形成されていることが確認された。これらの結果は当初の期待通り、単離した PP2C 遺伝子はその相同遺伝子とともに機能重複してオーキシン不均等勾配形成非依存的な光屈性応答、もしくは光屈性特異的な偏差成長制御に関与することが示唆された。

PP2C 遺伝子、PP2C 相同遺伝子について、青色光、フォトトロピンシグナリングによる発現調節の可能性を検討した。PP2C は光による発現量や細胞内局在の調節は観察されず、芽生え全体で細胞膜に局在を示した。PP2C については抗体を作成し、タンパク質レベルでの発現変化も観察したが、転写産物同様、特に光による発現量調節やタンパク質修飾による分子量変化は観察されなかった。一方、PP2C 相同遺伝子は、光による転写制御を受け、発現上昇することが qRT-PCR 解析によって確認された。また PP2C 同様、細胞膜に局在することが観察された。PP2C 相同遺伝子がコードするタンパク質についても抗体作成を試みたが、研究期間内には成功は見られなかった。

PP2C がオーキシン不均等勾配形成非依存的に偏差成長を誘導するとしたら、その遺伝子発現制御にも特徴的なパターンが観察される可能性があった。そこで *pp2c* 二重変異体と野生型における光屈性誘導時の遺伝子発現の網羅的解析を RNA-seq 法によって検討した。その結果、PP2C によるオーキシン制御遺伝子や偏差成長に関連した遺伝子発現に特に異常は観察されず、PP2C が特異な遺伝子発現調節によって偏差成長を調節している可能性は認められなかった。

PP2C はタンパク質脱リン酸化酵素をコードするため、そのタンパク質リン酸化修飾の関与について、リン酸化プロテオーム解析を行った。Phot 突然変異体における光屈性応答時のリン酸化修飾パターン異常と比較することによって、光屈性時の PP2C 依存的なリン酸化修飾がおきる候補タンパク質をリスト化した。興味深いことに、リン酸化プロテオーム解析において、PP2C タンパク質が phot 依存的なリン酸化修飾調節をうける可能性が示唆された。

表現型観察では PP2C が光屈性ばかりでなく、黄化芽生えフック形成にも関与することが示唆された。薬剤を用いた解析ではエチレンを介したフック形成、遺伝学的解析ではオーキシン輸送調節に働く PINOID タンパク質キナーゼと関係することが示された。

以上の結果は未だすべて未発表データのため、その詳細なデータはここでは割愛する。PP2C の機能が phot シグナリングによるリン酸化修飾や光照射による転写制御によっておきるのか、また PP2C によるリン酸化修飾のうち光屈性応答に関与するものが同定できるか、が今後の解析の焦点になる。PP2C がどのようにオーキシン不均等勾配に依存しない偏差成長に関与しているのか、大変興味深く、未だ論文発表に至らないものの、挑戦的研究(萌芽)として重要な発見につながることを期待される。

(2) その他の突然変異体解析

当初計画していた *pp2c* 突然変異体と一緒に単離していた 6 つの突然変異体については、Ler 野生型と交配し、原因遺伝子座特定を試みた。しかし生育が悪く交配が進まない株、交配した F2 世代芽生えの光屈性表現型が曖昧な株、など、それ以上の解析を進めるのが困難だった。(1) の研究を先行させる必要もあり、それ以上の解析を本研究期間では進めなかった。

根の光屈性はオーキシンに依存しないことが明らかになったが、根の光屈性が異常になった

突然変異体の選抜はこれまで十分に行われておらず、新奇突然変異体の単離が可能である可能性があった。そこで2019年度より新たに根の光屈性異常突然変異体の選抜を行い、複数の候補株を選抜した。これらの候補株の全ゲノム情報を取得し、多くの候補株の原因遺伝子が既存の光屈性関連遺伝子だったものの、1株(#27)は新規突然変異体候補株として残った。戻し交配等を進め、原因遺伝子特定のためのマッピング作業を準備中である。

(3) 学会発表

川浦圭太、吉岡真美、芳賀健、酒井達也(2019)シロイヌナズナにおけるPIN非依存的な光屈性誘導機構の分子遺伝学的解析。日本植物生理学会、名古屋。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川浦圭太、吉岡真美、芳賀健、酒井達也
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるPIN非依存的な光屈性誘導機構の分子遺伝学的解析
3. 学会等名 日本職物生理学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	木村 太郎 (Kimura Taro)		
研究協力者	川浦 圭太 (Kawaura Keita)		
連携研究者	芳賀 健 (Haga Ken) (50382031)	日本工業大学・工学部・准教授 (32407)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------