

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19370013

研究課題名（和文）植物側生器官の傾斜屈性の生理学的、分子遺伝学的研究

研究課題名（英文）Physiological and molecular genetic study on plagiotropism of plant lateral organs

研究代表者

山本 興太郎（YAMAMOTO KOTARO）

北海道大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号：80142008

研究成果の概要：傾斜屈性を示すシロイヌナズナ突然変異体 *hy5* の側根を用いて、傾斜屈性が生ずる機構を調べた。その結果、側根では成長とともに根端のオーキシン濃度が低下し、それによって成長方向が傾斜方向から下方へ転換するが、*hy5* ではオーキシン濃度の低下が遅れる結果、野生型より長い間、傾斜屈性が維持されるとみられる。また、*hy5* 側根傾斜屈性を抑制する遺伝子座の位置を 5 番染色体の下腕、14 遺伝子を含む領域にまで絞り込んだ。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2008 年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
年度			
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：植物生理学

科研費の分科・細目：基礎生物学、植物分子生物・生理学

キーワード：傾斜屈性、植物の側生器官、屈地性、横地性

1. 研究開始当初の背景

傾斜屈性とは、茎や根が重力方向から一定角度（重力屈性設定角、GSA; Digby and Firn, 1995）を保って成長する現象をいう。普通、主茎や主根は屈地性を示して重力の正方向や負方向に成長するが（GSA ≈ 0）、側枝や側根は傾斜屈性を示すことが多い。その意味では、傾斜屈性の方が正や負の重力屈性より普遍的な現象といえるかもしれない。近年、正や負の屈地性の仕組みは相当解明され、平衡石（アミロプラスト）の動きを検知する仕組み以外の分子機構については、主要な構成因子はほぼ出そろった感があるが、傾斜屈性の仕組み

は全くといっていいほど分かっていない。

2. 研究の目的

近年、屈性一般の分子機構がかなり分かってきたので、傾斜屈性の分子機構に取り組む環境が整ってきたように見える。また、シロイヌナズナ *hy5* 突然変異体（Koorneef et al., 1980）は bZIP 型転写因子 HY5 の機能欠損型変異体であるが（Oyama et al., 1997）、その根系は野生型に比べて横に広く広がり（図 1）、側根は傾斜屈性を示しているのではないかと疑われてきた。そこで、本研究では *hy5* を材料として、2 年間で、（1）*hy5* 側根の成長方



野生型 *hy5*

図1 垂直に立てた培地に播種後10日目のシロイヌナズナ野生型(Col)と *hy5* 突然変異体の根系。

向制御分子機構を明らかにし、(2)同時に、側根が傾斜屈性を示さなくなった *hy5* の抑制突然変異を単離・同定することを目指した。

3. 研究の方法

シロイヌナズナの側根は、発生後しばらく傾斜した方向に伸長し、その後重力方向に伸長する。まず、側根および主根の伸長方向が、重力方向に屈曲して制御されている、すなわち傾斜重力屈性であるかどうか解析した。

傾斜重力屈性を定量的に記述するため、根端の方向と屈曲応答の関係を、根端で重力を感受する組織であるコルメラ細胞の極性と結び付けて説明する数理モデルを作成し、傾斜重力屈性を実現する細胞スケールの重力感受機構を考察した。

突然変異体 *hy5* の側根では、側根の伸長方向が傾斜方向から下方へ転換するのが野生型と比較して遅れており、より長く伸長するまで重力方向へ伸長しない(図1)。この特性に傾斜重力屈性が関係しているかどうかを検討するため、様々な長さの側根について、回転させた後の伸長方向の経時変化を測定し、先に作成した数理モデルを用いて解析した。

次に、*hy5* を用いて側根の伸長方向を制御する分子機構を解析した。まず、オーキシンのシグナル伝達を主に担っている Aux/IAA タンパク質の寄与を、オーキシンの拮抗阻害剤である BH-IAA (Hayashi et al., 2008) を投

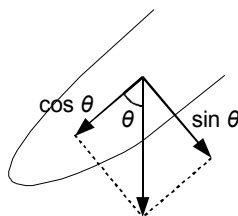


図2 根端組織の極性と重力方向の成分の関係。

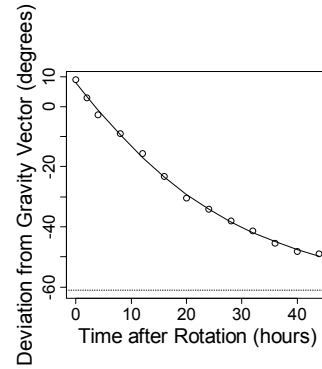


図3 野生型の側根の傾斜重力屈性応答へ式1の数理モデルを当てはめた例。点線は $t \rightarrow \infty$ の極限における根端の伸長方向、すなわち GSA。この例のように、重力方向を通過して傾斜した GSA へ屈曲する応答がしばしば観察されるが、これも再現できる。

与して側根の伸長方向を定量することで、検討した。さらに、根端におけるオーキシンの濃度がこの現象に関わっている可能性を検討するため、オーキシン応答性の *MSG2/IAA19* プロモーターの *GUS* 融合遺伝子を導入した個体を用い、プロモーター活性と根の長さおよび根端の伸長方向との関係を検討した。

また、側根の伸長方向を制御する遺伝子を特定するため、側根の伸長方向が野生型と同様に回復した *hy5* の抑制突然変異体を探索した。そのために、*hy5-215* (Col 背景, Oyama et al., 1997) を EMS で変異原処理し、 M_2 種子を垂直に立てた培地上で栽培して根系の形状を観察し、抑制変異系統を単離した。

4. 研究成果

(1) 傾斜重力屈性は、根端の側方方向および軸方向の重力成分のシグナルのバランスにより実現されていることが示唆された

垂直に立てた培地に播種して8日目のシロイヌナズナの根系を90度回転させ、フラットベッドスキャナを用いて根系の画像を2時間おきに40時間、経時的に記録し、根端の伸長方向を定量した。

式1に示す微分方程式のように、根端の側方方向 (lateral direction) の重力成分 (θ を根端と重力方向とのずれとして、 $\sin \theta$) と、軸方向 (axial direction) の重力成分 ($\cos \theta$) の和の形で根端の伸長方向の変化速度を表現した (図2)。

$$\frac{d\theta}{dt} = a \sin \theta + b \cos \theta \quad (\text{式 1})$$

この式を数値積分し、実データにあてはまるように定数 (a, b) を最適化することで、回転後の根端の伸長方向の経時変化を表現する

ことができた (式 1; a, b は定数; 図 3)。

(2) *hy5* の主根および側根の伸長方向には、傾斜重力屈性が関わっている

上記の数値モデル(式 1)を *hy5* および野生型の側根および主根根端の伸長方向の経時変化に適用し、GSA を推定した。*hy5* の主根および野生型と *hy5* の短い側根は重力方向に対して傾斜した方向へ屈曲した(図 4)。*hy5* の短い側根での傾斜した伸長方向に、傾斜重力屈性が関わっていることが示唆された。

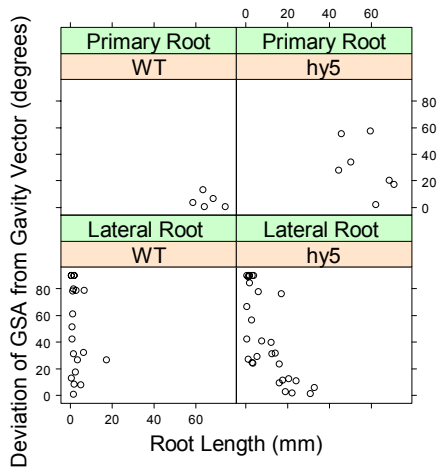


図 4 90度回転後の根端の伸長方向の経時変化から、式 1 の数値モデルを用いて推定した GSA。

(3) Aux/IAA タンパク質が蓄積すると、側根の傾斜した伸長方向が下方に転換する

オーキシン関連因子に着目して側根の伸長方向を制御する分子機構を探った。Aux/IAA タンパク質ファミリーはオーキシン・シグナル伝達を担う転写制御因子である。オーキシンが存在すると Aux/IAA はオーキシンを介して SCF^{TIR1} 複合体で基質を認識する TIR1 に結合し、ユビキチン化されて 26S プロテアソームで分解される。BH-IAA は Aux/IAA と TIR1 の結合の拮抗阻害剤であり (Hayashi et al., 2008) 組織に投与すると Aux/IAA の蓄積をもたらす。

BH-IAA を加えた培地を垂直に立てて *hy5* を播種後 8 日間生育させたところ、5 mm の長さでの側根の伸長方向が有意に下方に偏った(図 5)。Aux/IAA タンパク質が蓄積することで、発生後傾斜した方向へ伸長していた側根の下方への伸長への転換が早まったと考えられる。

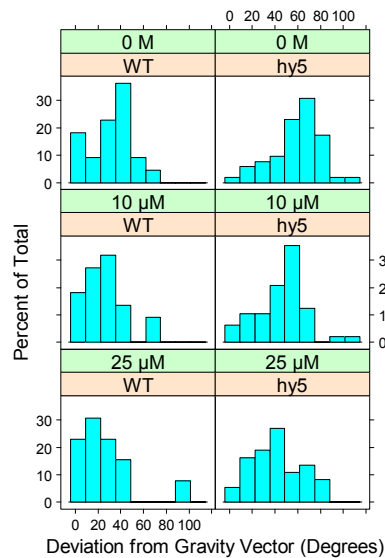


図 5 BH-IAA を含む培地で播種後 8 日間生育させたシロイヌナズナ側根の、長さ 5 mm の時点での伸長方向。各パネル上段は BH-IAA の濃度。*hy5* の 0 M と 10 μ M、25 μ M の各濃度について、処理を固定効果、個体数を変量効果とした分散分析により有意差が検出された。

(4) 根端のオーキシン濃度が側根の伸長とともに低下することが伸長方向の転換に関係することが示唆された

Aux/IAA タンパク質が側根の根端ではたらく、蓄積することで伸長方向が下方へ変化するとすれば、オーキシン濃度が側根の成長とともに低下している可能性がある。根端におけるオーキシン濃度を推定するため、オーキシン応答性の *MSG2/IAA19* プロモーターの *GUS* 融合遺伝子を導入した個体を用い、根端におけるプロモーター活性の有無を検討した。垂直に立てた培地に播種後 8 日目の根系を *GUS* 染色して、根端の伸長領域における染色の有無を観察し、根の長さおよび根端の伸長方向との関係を検討した。

野生型では長い根で染色が見られなかったが、*hy5* では野生型に比べ長い根でも染色が残っていた(図 6)。従って、根の成長とともに根端におけるオーキシン濃度が低下するが、*hy5* ではその低下が遅れていると推測され、根端におけるオーキシン濃度が低下すると傾斜した方向から下方へ伸長方向が転換するのではないかと考えられる(図 7)。

(5) *hy5* の抑制突然変異原因遺伝子のひとつは、劣性で 5 番染色体下腕に位置する

側根の伸長方向を制御する遺伝子を明ら

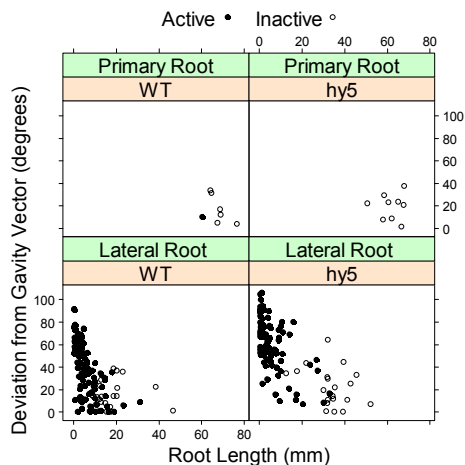


図 6 根の長さおよび伸長方向と、根端の伸長領域における *MSG2/IAA19* プロモーター活性の関係。黒丸が活性、白丸が活性がないことを示す。活性の有無を目的変数、遺伝型、根の長さ、伸長方向を予測変数として、個体を変量効果とした一般線型モデルにおいて、変数の数と当てはまりのよさのバランスを評価する AIC (Akaike Information Criterion) により、伸長方向と根の長さを含むモデルが最適なモデルとして選択された。ただし、伸長方向の寄与は小さかった。

かにするため、傾斜方向から下方への伸長方向の転換が早まった *hy5* の抑制突然変異体を EMS で変異原処理した集団で探索し、数系統の抑制変異体を得た。現在、これらの系統のマッピングおよび原因遺伝子の特定を進めている。そのうちの 1 系統 (図 8) は劣性変異で、その遺伝子座を 5 番染色体下腕の 14 遺伝子の領域まで絞り込むことができた。

文献

- Digby and Firm (1995) *Plant Cell Environ* 18, 1434.
 Hayashi et al. (2008) *PNAS* 105, 5632.
 Koornneef et al. (1980) *Z Pflanzenphysiol* 100, 147
 Oyama et al. (1997) *Genes Dev* 11, 2983

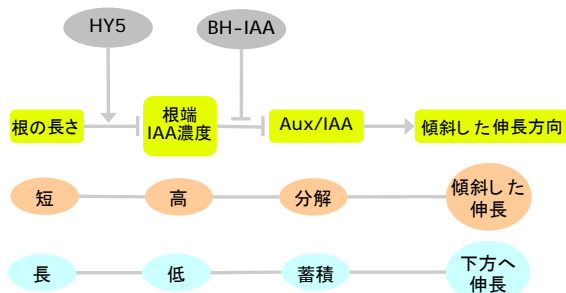


図 7 本研究で示唆された、側根の伸長方向とオーキシン・シグナリングの関係。



図 8 *hy5* の抑制突然変異体の例。垂直に立てた培地に播種後 9 日目。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 7 件)

- ①Matsuzaki, J., Watahiki, M. K., Yamamoto, K. T.: Contribution of a mechanism sensing apical-basal component of gravity and Aux/IAA signaling to plagiotropism of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology* 2009, Annual meeting of American Society of Plant Biologists, July 18-22, 2009, Honolulu
- ②軸丸裕介、松崎潤、花田篤志、杉山真樹、笠原博幸、瀬尾光範、山口信次郎、山本興太郎、神谷勇治：オーキシン定量技術—理研ホルモーム研究の紹介—、第 50 回日本植物生理学会年会、2009 年 3 月 21-24 日、名古屋
- ③松崎潤、綿引雅昭、軸丸裕介、神谷勇治、山本興太郎：根の伸長方向に着目したシロイヌナズナ根系パターン形成の分子機構の解析、定量生物学の会第 1 回年会、2009 年 1 月 11-12 日、東京
- ④松崎潤、綿引雅昭、山本興太郎：シロイヌナズナ側根の傾斜屈性を制御する遺伝子の同定およびオーキシン関連因子の解析、日本植物学会第 72 回大会、2008 年 9 月 25-27 日、高知
- ⑤Matsuzaki, J., Watahiki, M. K., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., Yamamoto, K. T.: Genetic and physiological studies on plagiotropism of lateral roots in *Arabidopsis*. 55th NIBB Conference "Frontiers of Plant Science in the 21st Century", Sep. 13-15, 2008, Okazaki
- ⑥Matsuzaki, J., Watahiki, M. K., Yamamoto, K. T.: A statistical analysis of relationship between root growth traits and expression of an auxin-responsive gene to unravel molecular mechanism of plagiotropism of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*. The 9th International Conference on Systems Biology, Aug. 22-28, 2008, Göteborg
- ⑦松崎潤、綿引雅昭、山本興太郎：シロイヌナズナ側根の傾斜重力屈性の生理学的および分子遺伝学的解析、第 49 回日本植

物生理学会年会、2008年3月20
22日、札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 興太郎 (YAMAMOTO KOTARO)
北海道大学・大学院理学研究院・教授
研究者番号：80142008

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

なし。