

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06685

研究課題名(和文) オーキシン共受容体の特異的相互作用を実現するタンパク質改変と酸成長誘導機構の解明

研究課題名(英文) Modification of auxin receptors and mechanism of acid growth

研究代表者

高橋 宏二 (Takahashi, Koji)

名古屋大学・理学研究科・助教

研究者番号：40283379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物の生活環全般にわたり形態形成や成長調節、環境応答など多様な生理作用を誘導する植物ホルモン・オーキシンの細胞内シグナル伝達を人為的にコントロールすることを目的に、オーキシン受容体TIR1/AFBのオーキシン結合部位と共受容体Aux/IAAのデグロン配列の改変を行い、新規のオーキシン研究ツールを開発した。また、オーキシンの代表的な生理作用である細胞伸長誘導(酸成長)のメカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オーキシンのシグナル伝達機構は比較的単純な因子で構成されているがそれぞれの構成因子は大きなタンパク質ファミリーを形成しているため、あるオーキシン作用がどのような因子の組み合わせで駆動されるのか詳細な機構を解析することは、従来の遺伝学的な解析では困難であった。本研究成果はその突破口を開く可能性を持っており、またさらに研究を進展させることで新たな研究ツールの開発につながると考えている。また、140年前のC.ダーウィンによる研究が端緒となったオーキシン酸成長のメカニズム解明をさらに進展させることができ、社会に与える影響も大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：To artificially control the intracellular signal transduction of the phytohormone auxin, which mediates various physiological actions such as morphogenesis, growth regulation, and environmental response throughout the life cycle of plants, I have developed novel auxin research tools by modifying auxin receptor TIR1/AFB and the degron sequences of co-receptor Aux/IAA. In addition, I have clarified the mechanism of auxin-induced plant cell elongation (acid growth), which is a representative physiological action of auxin.

研究分野：植物生理学

キーワード：オーキシン 酸成長 プロトンポンプ

1. 研究開始当初の背景

植物ホルモンのひとつであるオーキシンは、胚軸や子葉鞘など植物の伸長生長誘導を始めとして、自身の形態形成や成長を調節し植物体内外の環境変化に対する応答を仲介する。遺伝子発現調節を介するオーキシンのシグナル伝達は、ユビキチン-プロテアソーム経路が中心的な役割を果たしており、オーキシンシグナル伝達に特異的な主要因子としては F-box タンパク質であるオーキシン受容体 TIR1/AFB と転写リプレッサー Aux/IAA および転写因子 ARF という比較的単純で短い経路である。しかしながら、シロイヌナズナにおいて TIR1/AFB が 6 遺伝子、Aux/IAA が 29 遺伝子、ARF が 23 遺伝子も存在しており、これらの因子の多様な組み合わせがオーキシン応答の多様性に対応しうると考えられる。ところが、それぞれの因子の機能が冗長的であるため、個別のオーキシン応答の詳細なメカニズムを調べるにはシグナル因子の機能欠損型変異体（多重変異体）や過剰発現体を用いた場合、その影響が広範に現れるため従来の遺伝学的な手法では解析が困難である。この問題を克服するため研究代表者は、bump-and-hole アプローチにより野生型植物に影響を与えないオーキシン類似化合物（人工オーキシン cvxIAA）とその人工オーキシンに特異的に相互作用する改変型 TIR1 (ccvTIR1) を創出し、改変型 TIR1 を発現する植物体（組織、細胞）においてのみ人工オーキシンを添加することでオーキシンシグナル伝達を駆動することに成功していた。

ところでオーキシンの多彩な生理作用の中には、根の伸長阻害や胚軸の伸長生長などオーキシン添加後 1 分以内もしくは十数分という短い時間で誘導される現象もみられ、遺伝子発現調節を介さないオーキシン作用の存在も古くから示唆されている。しかしながら、現在までに非転写オーキシンシグナル伝達系は受容体を含めその分子機構は明らかとなっていない。受容体の第一候補は Auxin Binding Protein 1 (ABP1) であると長らく想定されていたが、2015 年に確立された ABP1 の機能欠損変異体には特徴的な表現型への影響が認められなかったことから、受容体は ABP1 ではなく未発見のタンパク質である可能性も考えられた。そのような混沌とした状況下で、研究代表者は上記の「cvxIAA-ccvTIR1 ペア」システムを用いて、オーキシン誘導性胚軸伸長の初期過程や根の伸長抑制という応答性の早いオーキシン作用も TIR1 が仲介することを証明することに成功した。特に根の伸長抑制は応答が非常に早いことや翻訳阻害剤に影響されないことから遺伝子発現調節を介さない経路であることが強く示唆されており、TIR1 が駆動する非転写オーキシンシグナル経路が存在する可能性が示唆された。Canonical なオーキシンシグナル伝達では TIR1 がオーキシン依存的に転写リプレッサー Aux/IAA と相互作用して分解誘導するが、非転写経路では TIR1 が Aux/IAA 以外の調節タンパク質と相互作用してシグナルが伝達されることも推察される。一方、ABP1 のオーキシンシグナル伝達における役割についても未確定であった。

2. 研究の目的

本研究では、オーキシンに対する応答性が速い現象であるオーキシン誘導性胚軸伸長の初期過程（いわゆる酸成長）の機構解明を通して、「canonical なオーキシンシグナル伝達機構の詳細解明のための革新的な研究ツールの開発」と「新奇オーキシンシグナル伝達機構、とくに遺伝子発現調節を介さないオーキシンシグナル伝達機構の解明」を目指した。さらに、このツールやその他の研究手法を駆使して本研究では「酸成長」のメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

TIR1 はオーキシン存在下で Aux/IAA のデグロン配列と相互作用することが明らかとなっているので、まず、Aux/IAA のデグロン配列およびその近傍のアミノ酸に変異を与えることにより、野生型 TIR1 と相互作用しない改変型 Aux/IAA を選抜する。続いて、オーキシン存在下で改変型 Aux/IAA との相互作用を回復するようなアミノ酸置換を TIR1 に与え改変型 TIR1 を作成する。なお、改変型 TIR1 は野生型 Aux/IAA とは相互作用しないことが重要である。アミノ酸変異を与える部位は TIR1 と Aux/IAA との結晶構造に基づいて合理的に推定することができるが、最適なアミノ酸変異の組み合わせを見いだすには試行錯誤が必要である。「改変型 TIR1 と改変型 Aux/IAA のペア」の設計に基づいて、29 個の Aux/IAA についてそれぞれの改変型フォームを構築し、改変型 TIR1 と改変型 Aux/IAA を共発現する組換えシロイヌナズナを作成して酸成長が誘導される TIR1-Aux/IAA ペアを見つけ出す。Aux/IAA が酸成長誘導に関与することが示され

ば、遺伝子発現調節を介した経路を経て酸成長が誘導されることを実験的に証明できる。一方で、内生の Aux/IAA と相互作用しない改変型 TIR1 のみを導入した植物体で酸成長が誘導された場合、酸成長は非転写オーキシシグナル伝達機構を介して誘導される可能性が高くなる。この場合、Aux/IAA 以外の調節タンパク質が改変型 TIR1 と相互作用することが期待されるため、改変型 TIR1 と相互作用するタンパク質の同定を行い、新奇オーキシシグナル伝達機構の解明に繋げる。この他に、遺伝学および生理生化学的手法を用いて細胞膜 H⁺-ATPase の活性調節を介した酸成長誘導のメカニズムを解析する。

4. 研究成果

TIR1/AFB および Aux/IAA ファミリータンパク質のうち、TIR1 と IAA7 をモデルとして改変タンパク質を作出することにした。まず、IAA7 のデグロン配列である AKAQVVGWPPVRNYRKN を含む DII ドメインと glutathione S-transferase (GST)との融合タンパク質 (GST-IAA7^{DII}) を大腸菌発現系で、また FLAG タグを C 末端に付加した TIR1 タンパク質 (TIR1-FLAG) をコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系で作製した。これら両タンパク質を用いて in-vitro プルダウンアッセイを行ったところ、オーキシシン(indole-3-acetic acid; IAA)依存的に GST-IAA7^{DII} と TIR1-FLAG が相互作用することが確認できた。このアッセイ系を用いて、GST-IAA7^{DII} のデグロン配列のアミノ酸に様々な変異を導入した改変型 GST-IAA7^{DII} と野生型 TIR1-FLAG とのオーキシシン依存的相互作用を検討して、相互作用を示さなくなる変異箇所と変異アミノ酸を同定した。なお、変異を導入するアミノ酸は、TIR1 と IAA7 の結晶構造結果に基づいて合理的に推定したものである。さらに、野生型 TIR1 と相互作用しなくなった改変型 IAA7^{DII} とオーキシシン依存的に相互作用できるようになる TIR1 のアミノ酸変異を結晶構造結果に基づいて推定し、実際に変異を導入した改変型 TIR1-FLAG を作製して、改変型 GST-IAA7^{DII} と相互作用するかどうか in vitro プルダウンアッセイにより検討した。さまざまな変異を導入した改変型 GST-IAA7^{DII} と改変型 TIR1-FLAG の組み合わせを検討した結果、野生型 IAA7 には相互作用しない改変型 TIR1 と、野生型 TIR1 に相互作用せず改変型 TIR1 にのみ相互作用する改変型 IAA7 を創出することに成功した。引き続き、改変型 IAA7 と同部位のアミノ酸変異を IAA3 および IAA17 に導入した改変型 GST-IAA3^{DII}、改変型 GST-IAA17^{DII} を作出して改変型 TIR1-FLAG との相互作用を調べたところ、IAA7 と同様の結果を得た。これらのことから、本研究で同定したアミノ酸変異の組み合わせは、改変型 TIR1 と改変型 Aux/IAA の人為的な相互作用を実現できるものと推察された。酸成長誘導とオーキシシン依存性遺伝子発現との関連性を検討するため、改変型 TIR1 および改変型 IAA7 を導入した組換え植物を作成し、オーキシシン依存性伸長成長(酸成長)を調べたところ、現時点では予備的な結果ではあるものの細胞膜 H⁺-ATPase 活性化や胚軸伸長誘導においては少なくとも一部は遺伝子発現を介した経路で制御されていることが確認された。様々な条件における胚軸伸長制御の結果を取りまとめたのに投稿論文としてまとめる予定である。

オーキシシン誘導性酸成長における細胞膜 H⁺-ATPase 活性調節機構の解明に関しては、おおきく 2 つのテーマで取り組み、まずは細胞膜 H⁺-ATPase の活性化に関わるリン酸化部位としてこれまで注目していた C 末端から 2 番目のアミノ酸(スレオニン)とは異なるリン酸化サイトの重要性を検討した。このリン酸化サイトのアラニン置換体や擬似リン酸化体をもつ組換えシロイヌナズナを作成し、細胞膜 H⁺-ATPase が関与する生理現象への影響を調べたところ、このリン酸化サイトのリン酸化により細胞膜 H⁺-ATPase が活性化されうること示唆する結果を得た。さらにはこの部位の脱リン酸に関わる酵素も同定した。これらの結果をまとめた論文を現在、投稿中である。この成果に加え、細胞膜 H⁺-ATPase の活性化に関わる C 末端から 2 番目のアミノ酸(スレオニン)のリン酸化に関わるプロテインキナーゼ TMK1 や機能未知であった ABP1 のオーキシシグナル伝達への関与について国際共同研究によって明らかとした(発表論文 1,2,3)。

本研究によって、オーキシシン受容から細胞膜 H⁺-ATPase のリン酸化調節を担うプロテインキナーゼ TMK1 やプロテインホスファターゼ PP2C-D の活性制御へと至るシグナル伝達機構の全貌解明につながる成果が得られたと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Li Lanxin, Verstraeten Inge, Roosjen Mark, Takahashi Koji, Rodriguez Lesia, Merrin Jack, Chen Jian, Shabala Lana, Smet Wouter, Ren Hong, Vanneste Steffen, Shabala Sergey, De Rybel Bert, Weijers Dolf, Kinoshita Toshinori, Gray William M., Friml Jiri	4. 巻 599
2. 論文標題 Cell surface and intracellular auxin signalling for H ⁺ fluxes in root growth	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 273 ~ 277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-021-04037-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Lin Wenwei, Zhou Xiang, Tang Wenxin, Takahashi Koji, Pan Xue, Dai Jiawei, Ren Hong, Zhu Xiaoyue, Pan Songqin, Zheng Haiyan, Gray William M., Xu Tongda, Kinoshita Toshinori, Yang Zhenbiao	4. 巻 599
2. 論文標題 TMK-based cell-surface auxin signalling activates cell-wall acidification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 278 ~ 282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-021-03976-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 J. Friml, M. Gallej, Z. Gelova A. Johnson, E. Mazur, A. Monzer, L. Rodriguez, M. Roosjen, I. Verstraeten, B. Zivanovic M. Zou, L. Fiedler, C. Giannini, P. Grones, W. Kaufmann, A. Kuhn, M. Narasimhan, M. Randuch, N. Rydza, Koji Takahashi, S. Tan, A. Teplova, Toshinori Kinoshita, D. Weijers, H. Rakusova	4. 巻 609
2. 論文標題 ABP1-TMK auxin perception mediates ultrafast global phosphorylation and auxin canalization.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 575 ~ 581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-022-05187-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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	木下 俊則 (Kinoshita Toshinori)		
研究協力者	萩原 伸也 (Hagihara Shinya)		
研究協力者	打田 直行 (Uchida Naoyuki)		

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
---------	---------