

機関番号：14501
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009 ～ 2010
 課題番号：21770045
 研究課題名(和文) 側根形成過程におけるオーキシン誘導性 LBD/ASL ファミリーの機能解析
 研究課題名(英文) Functional analysis of the auxin-inducible LBD/ASL family in the lateral root formation
 研究代表者
 郷 達明 (TATSUAKI GOH)
 神戸大学 大学院理学研究科 学術研究員
 研究者番号：80511419

研究成果の概要(和文)：

シロイヌナズナの側根形成は原生木部に接した特定の内鞘細胞の非対称分裂によって開始される。本研究では、根においてオーキシンにより誘導される 5 つの *LBD/ASL* 遺伝子群が側根形成において重複した機能をもつことを示した。また、オーキシン誘導性 *LBD/ASL* 遺伝子群は、特定の内鞘細胞における遺伝子発現制御を介して、側根創始細胞における細胞分裂の非対称性の確立に必要であり、その後の側根形成開始に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

In *Arabidopsis thaliana*, lateral root (LR) formation is initiated from asymmetric cell divisions (ACDs) of the xylem pole pericycle cells (XPPs) of the parent roots. We show that auxin-inducible LBD16/ASL18 was specifically expressed in a small number of XPP cells before the first ACD and functions redundantly with the other related LBD/ASL proteins in LR formation. Furthermore, the localized activity of auxin-inducible LBD/ASL proteins links to the establishment of asymmetry in the LR founder cells necessary for LR initiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：植物分子遺伝学，植物細胞生物学，植物発生学

科研費の分科・細目：植物分子生物・生理学

キーワード：シロイヌナズナ，オーキシン，転写制御，*LBD/ASL* 遺伝子群，側根形成

1. 研究開始当初の背景

シロイヌナズナの側根は原生木部に接し

た内鞘細胞のうち、側根の founder cell (創始細胞)となる隣り合った 2 つの細胞が非対称に

分裂して、形成が開始される。これまでの研究から、この側根形成開始には、オーキシン応答リプレッサータンパク質 Aux / IAA (Auxin/Indole-3-Acetic Acid)とオーキシン応答転写因子(Auxin Response Factor, ARF)を介したオーキシンによる転写制御が深く関与していることが明らかになっている (Fukaki et al., 2007, *Int. Rev. Cytol.*)。特に、SOLITARY-ROOT (SLR)/IAA14-ARF7-ARF19による転写カスケードは側根形成開始に必須であり、ARF7, ARF19の直接の下流では転写調節因子 LBD (Lateral Organ Boundaries-domain) / ASL (Asymmetric Leaves2-like) ファミリーに属する LBD16/ASL18, LBD29/ASL16 が転写活性化されることが示された(Okushima et al., 2007, *Plant Cell*). LBD16, LBD29 遺伝子は側根原基において発現し、両者の過剰発現によって、*arf7arf19* 二重変異体の側根形成能が回復する。また、LBD16 は核局在タンパク質であり、人工転写抑制ドメイン(SRDX)を付加した LBD16 の過剰発現体 (35S::LBD16-SRDX)において、側根形成が顕著に阻害される。以上のことから、LBD16, LBD29 は転写制御因子として、側根形成において機能することが強く示唆された (Okushima et al., 2007, *Plant Cell*).

しかし、LBD16 の単独欠損変異体は側根形成に関して、顕著な表現型を示さないことから、LBD/ASL 遺伝子群の機能重複の可能性が示唆されていた (Okushima et al., 2007, *Plant Cell*). また、LBD16 によって制御される発生過程や LBD16 の役割については、未解明のままである。したがって、オーキシン応答を介した側根形成制御機構を理解するためには、LBD16 を含むオーキシン誘導性 LBD/ASL 遺伝子群の機能解析が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

シロイヌナズナの根において、オーキシンにより発現誘導される LBD/ASL 遺伝子群 (LBD16/ASL18, LBD17/ASL15, LBD18/ASL20, LBD29/ASL16, LBD33/ASL24)について、機能重複性を解析するとともに、側根形成における具体的な機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

① 側根形成における LBD16-GFP の発現パターンの解析

LBD16-GFP 融合タンパク質を自身のプロモーターを含むゲノム配列の制御下で発現させる系統 (*genomeLBD16-GFP*)を作成し、根における LBD16 タンパク質の局在と蓄積を明らかにする。

② 根で発現するオーキシン誘導性 LBD/ASL 遺伝子群の機能解析

根で発現し、オーキシンにより誘導される LBD/ASL 遺伝子群のうち、欠損変異体が入手可能な 3 遺伝子(LBD16, LBD18, LBD33)について、多重変異体を作成する。また、人工転写抑制ドメイン(SRDX)を付加した LBD16 を自身のゲノム領域の制御下で発現させる系統(*genomeLBD16-SRDX*)を作成する。これらの系統をもちいて、側根形成への影響やオーキシンに対する感受性を解析する。

③ 側根形成開始における LBD16 の役割の解析

genomeLBD16-SRDX 植物におけるオーキシン応答レポーター(*DR5-GUS*)の発現を観察し、側根形成開始時の局所的なオーキシン応答への影響を観察する。また、重力刺激による側根形成誘導系を確立し、*genomeLBD16-GFP*

を使用して、側根形成開始における細胞核の挙動および非対称細胞分裂を経時的に観察する。また、*genomeLBD16-SRDX* 発現植物において、核局在シグナル(Nuclear Localization Signal: NLS)を付加した GFP (NLS-GFP)を *LBD16* プロモーター制御下で発現させて、上記と同様の観察を行い、野生型と比較する。

4. 研究成果

① 側根形成における *LBD16-GFP* の発現パターンの解析

LBD16 のゲノム領域制御下で *LBD16-GFP* を発現させて、側根形成部位を詳細に観察したところ、*LBD16* は非対称分裂よりも早い段階から特定の内鞘細胞において発現を開始し、側根形成開始の制御に関与することを見出した。

② 根で発現するオーキシン誘導性 *LBD/ASL* 遺伝子群の機能解析

LBD16 の単独欠損変異体は、顕著な表現型を示さなかった (Okushima et al., 2007, *Plant Cell*). そこで、欠損変異体が入手可能な *LBD18*, *LBD33* との多重変異体を作成したところ、三重変異体では主根伸長にはほとんど影響がなかったが、側根密度が顕著に減少した。このことから、*LBD16* を含むオーキシン誘導性 *LBD/ASL* 遺伝子群は側根形成において重複した機能をもつことが示された。

さらに、*LBD16* のゲノム領域制御下で、強力な人工転写抑制ドメインである *SRDX* を付加した *LBD16* を発現させた系統を作成した (*genomeLBD16-SRDX*)。この *genomeLBD16-SRDX* は、*LBD16* の発現部位において、機能重複する *LBD/ASL* メンバーを阻害すると考えられる。*genomeLBD16-SRDX* 発現植物では、側根形成にともなう内鞘細胞の非対称分裂は観察

されず、側根形成が抑制された(図 1)。さらに、オーキシン処理によって、主根伸長は野生型と同様に阻害されたが、側根形成の促進は起こらなかった。以上の結果より、5 つのオーキシン誘導性 *LBD/ASL* 遺伝子群は、側根形成に特異的に関与することが示された。



図 1 *genomeLBD16-SRDX* 発現植物の表現型。野生型 (Col:左)では側根が多数形成されているのに対して、*LBD16-SRDX* 発現植物(右)では、主根伸長には影響がなく、側根形成のみが特異的に抑制された。播種後 14 日目。

③ 側根形成開始における *LBD16* の役割の解析

上記の解析より、オーキシン誘導性 *LBD/ASL* 遺伝子群が側根形成開始に関与している可能性が強く示唆された。側根形成開始時には内鞘細胞にオーキシンが集積され、強いオーキシン応答が観察される。側根を形成しない *genomeLBD16-SRDX* 植物において、オーキシン応答レポーターである *DR5-GUS* の発現を観察したところ、強いオーキシン応答を示す内鞘細胞が数多く観察されたにもかかわらず、それらの内鞘細胞では側根形成開始に伴う非対称分裂が誘導されなかった。このことから、オーキシン誘導性 *LBD/ASL* 遺伝子群の機能抑制は、側根形成開始時の特定の内鞘細胞における強いオーキシン応答には影響しないことが示唆され

た。また、LBD16 は局所的なオーキシン応答後、細胞極性の形成や非対称分裂の制御に関与することが示唆された。

そこで次に、核の移動および非対称分裂への影響を観察するために、重力刺激に応じた側根形成誘導系によって、側根形成開始過程を経時的に観察した。野生型において、LBD16-GFP は側根形成開始前から特定の内鞘細胞のみで発現を開始し、さらに、その内鞘細胞において、核の移動から非対称分裂へと続く一連の側根形成開始イベントを観察した。一方、*genome*LBD16-SRDX 植物体において、*pLBD16::NLS-GFP* を発現させて観察を行ったところ、特定の内鞘細胞で *LBD16* プロモーターの活性が上昇していた。しかし、その内鞘細胞において、核の移動は起こらず、等分裂のみが誘導され、側根形成は停止した。

以上の実験結果から、LBD16 を含むオーキシン誘導性 LBD/ASL メンバーは、特定の内鞘細胞における転写制御を介して、側根形成開始における細胞分裂の非対称性の確立に必要であり、その後の側根形成開始に重要

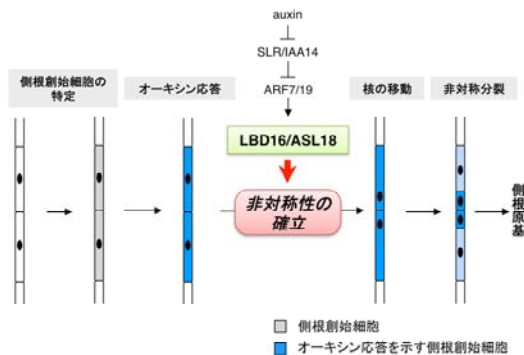


図2 側根形成開始における LBD16/ASL18 の役割

であることを明らかにした(図2)。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Uejima T, Ihara K, Goh T, Ito E, Sunada M,

Ueda T, Nakano A, Wakatsuki S (2010) GDP-bound and nucleotide-free intermediates of the guanine nucleotide exchange in the Rab5-Vps9 system.

J Biol Chem. 285:36689-36697 査読有

- ② Hamaji K, Nagira M, Yoshida K, Ohnishi M, Oda Y, Uemura T, Goh T, Sato MH, Morita MT, Tasaka M, Hasezawa S, Nakano A, Hara-Nishimura I, Maeshima M, Fukaki H, Mimura T (2009) Dynamic aspects of ion accumulation by vesicle traffic under salt stress in Arabidopsis.

Plant Cell Physiol., 50:2023-2033 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 郷達明, 三村徹郎, 深城英弘, オーキシン誘導性LBD/ASLメンバーによる側根の形成開始の制御機構, 第52回日本植物生理学会年会, 口頭発表 (2011年3月22日, 仙台)
- ② Tatsuaki Goh, Hidehiro Fukaki, “The roles of LBD/ASLs for LR initiation”, European Lateral Root Workshop, 口頭発表 (2011年1月12日, イギリス, ノッティンガム)
- ③ Tatsuaki Goh, Tetsuro Mimura, Hidehiro Fukaki, “Auxin-inducible LBD/ASL proteins regulate Arabidopsis lateral root initiation through activating the first asymmetric cell divisions of protoxylem pericycle”, 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会合同大会, 口頭およびポスター発表 (2010年12月8日, 神戸)
- ④ Tatsuaki Goh, Hidehiro Fukaki, “Auxin-inducible LBD/ASL members regulate lateral root formation”, Plant Science Communications 2010, ポスター発表 (2010年10月16日, 岡崎)
- ⑤ Tatsuaki Goh, Tetsuro Mimura, Hidehiro Fukaki, “Auxin-inducible LBD/ASL

members regulate lateral root formation”, 21st
International Conference on Arabidopsis
Research, ポスター発表 (2010年6月7
日, 横浜)

- ⑥ **郷達明**, 三村徹郎, 深城英弘, オーキシ
ン誘導性LBD/ASLメンバーは側根の形成
開始に関与する, 第51回日本植物生理学
学会年会, 口頭発表 (2010年3月21日,
熊本)

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

http://www.research.kobe-u.ac.jp/fsci-fukaki/fukaki/fukaki_laboratory.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

郷 達明 (GOH TATSUAKI)

神戸大学・大学院理学研究科・学術研究員

研究者番号: 80511419

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

深城 英弘 (FUKAKI HIDEHIRO)

神戸大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号: 80324979