

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：10101

研究種目：特定領域研究

研究期間：平成19年度～平成24年度

課題番号：19060008

研究課題名（和文） 植物ホルモンであるオーキシンによる統御系

研究課題名（英文） Regulation system of a plant hormone, auxin

研究代表者

山本 興太郎 (YAMAMOTO KOTARO)

研究者番号：80142008

研究成果の概要（和文）：植物の茎の伸長や屈曲を引き起こすオーキシンの分子機構をシロイヌナズナで研究した。その結果、オーキシンによって発現する *MSG2* 遺伝子が、伸長や屈曲が起こりすぎないように抑制的に働くことを明らかにした。一方、屈曲に働く新規遺伝子 *LAZY1* を単離した。屈曲では屈曲に特異的に働くオーキシン輸送体が存在することが知られているが、*LAZY1* はそれらとは別経路で屈曲を調節していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We studied molecular mechanisms of auxin-induced elongation and bending of stem organs in Arabidopsis with respect to an *Aux/IAA* gene, *MSG2*, and found that *MSG2* repressed elongation and bending after expression, forming feed-back loop of transcriptional regulation. We also identified a novel gene, *LAZY1*, that regulated bending response. *LAZY1* acted through a pathway that did not regulate activities of PIN3, 4 or 7, which had been thought to be major auxin transporters involved in bending response.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	20,100,000	0	20,100,000
2008年度	20,100,000	0	20,100,000
2009年度	20,100,000	0	20,100,000
2010年度	20,100,000	0	20,100,000
2011年度	20,100,000	0	20,100,000
2012年度	20,100,000	0	20,100,000
総計	120,600,000	0	120,600,000

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・生理科学

キーワード：オーキシン、遺伝子発現、イメージング、シグナル伝達、植物

1. 研究開始当初の背景

植物器官間の統御情報因子として最も古くから知られているのは、器官間で極性輸送される植物ホルモン、オーキシンである。植物の形態は、胚や頂端分裂組織で起こる器官形成とそこで形成された器官がその後起こす成長反応によって決定されるが、オーキシンはその両者に深く関わっている。本研究で

は主にその内の後者の過程に関わるオーキシン統御系を、オーキシン受容体直下で働く *Aux/IAA-ARF* モジュールが時空間的に調節される仕組みに着目して解明することを目的とした。

2. 研究の目的

(1) *Aux/IAA* タンパク質はオーキシン受容体

(AFB) と共にオーキシンを受容するオーキシン共受容体で、TPL タンパク質と結合してオーキシン応答因子 (ARF) 活性を抑制する。オーキシンと AFB と Aux/IAA、三者の結合特異性が様々なオーキシン応答の特異性を決定する最大の要因だと考えられている (Calderon-Villalobos et al., 2012)。そこで、Aux/IAA の一つ、一過的な伸長成長制御に働くと考えられている MSG2/IAA19 に着目して、この遺伝子の機能を明らかにすることを目標にした。そのために、同遺伝子の突然変異体の表現型を調べるとともに、その発現パターンを調べた。

(2) オーキシンの統御系を解明するには、MSG2 発現調節機構を明らかにすることが重要なので、同発現が異常になった突然変異体を単離し、発現調節機構に関わる新規因子を同定しようとした。

3. 研究の方法

(1) 植物の伸長成長や偏差成長と遺伝子発現パターンを同時に測定するために、高感度 CCD カメラを装着した横置き型モノズーム顕微鏡を作成した (図 1)。また、遺伝子発現をリアルタイムで観察できるように、各種ルシフェラーゼ (Luc) に融合させた MSG2 遺伝子を導入したシロイヌナズナ形質転換体を作成した。特に、高輝度で寿命の短い ELuc-PEST を MSG2 プロモーターで駆動したレポーター遺伝子 ($pMSG2::ELuc-PEST$) が有用だった。



図 1 横置き型 EMCCD カメラ付き顕微鏡

(2) MSG2 発現が異常になった突然変異体を単離するために、 $pMSG2-GFP$ を導入した形質転換体を変異原処理し、GFP シグナルが異常になった変異体を分析した。新規因子に相互作用する因子を網羅的に同定するために、質量分析器を用いた結合タンパク質分析も行った。

4. 研究成果

(1) MSG2 の機能研究 : MSG2 機能を調べるために、MSG2/IAA19 によく似た遺伝子 IAA5 と IAA6 との三重変異体 (*iaaT*) の表現型を、上

述の顕微鏡 (図 1) を用いて精密に測定した。MSG2 タンパク質が安定化して起こる機能獲得型変異体 *msg2* では、胚軸の屈地性が遅くなるが、*iaaT* ではやや早くなった。胚軸の成長速度を測定すると、成長速度は概日リズムを持って変化し、その速度と上述の Luc レポーターを用いて測定した MSG2 発現は比例していた。この概日リズムは *msg2* 変異体でも同様に観察された。

花茎の屈地性を測定すると、胚軸同様、*msg2* では屈地性速度が遅くなるが、*iaaT* ではやや早くなった。花茎では茎頂の旋回運動 (circumnutation) が顕著に起こるが、アミロプラストからの屈地性シグナルが無いと旋回運動も起こらないことが分かっている (Hatakeda et al., 2003)。シロイヌナズナでは、花茎の旋回運動も概日リズムを持っていた。*msg2* や、MSG2 が抑制していると考えられる ARF7/NPH4 の機能欠損変異体は、旋回運動を失っていた。*iaaT* では旋回運動が概日リズムを失って起こり続けた。茎の屈地性には、茎の成長軸と直交する方向 (横方向) にオーキシンの濃度勾配を形成させることが必須であるが、それはオーキシン輸送体の内、PIN3 と 4 と 7 によって形成されると考えられている (Rakusova et al., 2011)。そこで、この 3 個の輸送体の 3 重変異体 (*pin3 pin4 pin7 = pinT*) を作成して調べたところ、*pinT* はまったく旋回運動を起こさなかった。以上の結果は、花茎の屈地性と旋回運動は機構を共有していて、MSG2 は両方で応答が起こりすぎないように働いていることを示している。これらの結果は、Aux/IAA がオーキシンのフィードバック機構を形成しているとする従来の説 (Benjamins & Scheres, 2008) を支持するものとなった。

(2) LAZY1 の機能研究 : MSG2 発現を調節している因子を明らかにするために、その発現が低下したり、発現パターンが変化した突然変異体のスクリーニングを行った。その結果、数種の変異株を得て、マッピングにより原因遺伝子の同定を行ったが、その内の一つはイネ LAZY1 のオーソログの機能欠損変異であった。シロイヌナズナ *lazy1* 変異体は Yoshihara ら (2013) によって最近報告されているが、その異常は側枝にもっとも強く現れ、側枝は明所で水平方向に成長する成長様式を示す (図 2A)。この表現型は光依存的で、暗所では異常が軽減された。LAZY1 タンパク質をタバコで強制発現させると、細胞膜に局在が観察された (図 2E)。オーキシン応答性の MSG2 遺伝子は側枝では下側に偏差的に発現するが、*lazy1* 変異体ではその偏差性が軽減されて、茎の周囲に、より均一に発現していたので (図 2B, C)、同変異体では横方向のオーキシン濃度勾配が形成されにくくなっていると考えられた。そこで、横方向の濃度勾配形

成に主に関わっているはずのオーキシン輸送体遺伝子の三重変異体 *pinT* と *lazy1* との4重変異体の表現型を調べたところ、それは両者の相加的な異常を示したので、LAZY1 の下流で濃度勾配形成に機能しているのは PINT ではないこと、つまり、PINT 以外にオーキシン横方向濃度勾配形成に関わる因子が存在するはずであることが分かった (図3下)。



図2 *lazy1* 変異体とオーキシン

花茎の屈地性では、重力方向の変化は平衡石として働く内皮細胞の中のアミロプラストの動きとして感知され、その情報が処理されてオーキシンの横方向濃度勾配として出現する (図3下)。前述の知見は、LAZY1 がその情報処理過程に関わる因子であることを示しているが、この過程に関わる因子としてもう一つ、既に分かっているのが ARG1 である (Sedbrook et al., 1999)。そこで、両者の二重変異体を作成して両者の遺伝学的関係を調べたところ、相乗的な相互作用を示した (図3左上)。PINT は ARG1 の下流で機能していることが分かっているので、花茎屈地性の重力感知機構として、図3(下)のような結果が現在もっとも妥当なモデルとして考えられる。

PINT が LAZY1 の下流では働いていないことが分かったので、LAZY1 の下流でオーキシン作用に働いている因子を同定するために、過剰発現させることによって *lazy1* を抑圧する変異の単離を試みた。その結果、二つの過剰発現変異系統、*ds11* (図3右上) と *ds12* を単離した。*ds11* では、転写調節因子 *ASL5* が過剰発現していた。その標的遺伝子をマイ

クロアレー解析によって調べたところ、二次細胞壁合成に関わるセルロース合成系やリグニン合成系酵素遺伝子が過剰発現していて、*lazy1 ds11* 二重変異体では、二次細胞壁が肥厚していることが分かった。セルロース合成酵素遺伝子はシロイヌナズナに多数存在し、その遺伝学的解析は困難なので、セルロース合成阻害剤イソキサベンを調べたところ、同阻害剤の投与によって花茎の屈地性は大きく阻害された。以上の結果から、花茎の屈地性を引き起こしている横方向のオーキシン濃度勾配形成は、従来考えられていた PINT 以外の何らかの因子によっても大きく調節されていて、その過程は二次細胞壁合成と密接に関わっていることが分かった (図3下)。LAZY1 が細胞膜付近に局在すること (図2E) を考えると、細胞膜と細胞壁の相互作用がオーキシン濃度勾配形成に必須で、その過程に LAZY1 が関与していることが想像される。以上、明らかになった花茎屈地性機構は従来の説とは大きく異なるものである。屈地性機構も、従来考えられていた以上に重複していて、さまざまな調節機構によって堅固な応答性を実現しているのだと考えられる。

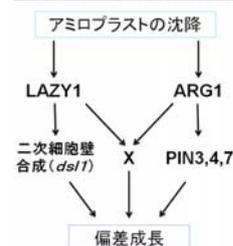
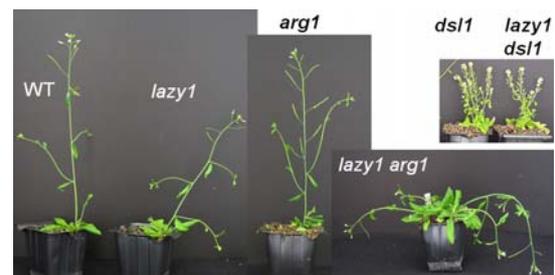


図3 *lazy1* と *arg1* と *ds11* の相互作用から示唆される花茎の屈地性機構モデル

花茎の屈地性異常変異体は、その多くが平衡石であるアミロプラストに関わるもので、オーキシン応答に関わる変異体は数が少ない。そこで、花茎の屈地性が異常でありながら今までよく調べられていない *axr2/iaa7* 突然変異体の研究をおこなった (Sato et al., 2014)。その結果、*axr2* 花茎ではオーキシン・シグナルが低下していることと、屈光性も異常で、花茎は負の屈光性を示すことを明らかにした。すなわち、オーキシン・シグナルが低下すると屈地性は起こらなくなるが、屈光性は正から負の屈光性に転換する。また、屈

地性では PINT の関与が相対的に大きい、屈光性にはあまり働いていないことと、PIN とは別のオーキシン輸送体 PGP の二重変異体 (*pgp1 pgp19*) も茎頂を切除すると負の屈光性を示すことが分かった。これらの結果は屈性の多様性を示している、LAZY1 の結果も含めて、偏差成長機構の複雑さを示している。

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 9 件)

- ① Sato, A., Sasaki, S., Matsuzaki, J., Yamamoto, K. T. (2014) Light-dependent gravitropism and negative phototropism of inflorescence stems in a dominant Aux/IAA mutant of *Arabidopsis thaliana*, *axr2*. *J. Plant Res.* 127, in press. 査読有り
- ② Kami, C., Allenbach, L., Zourelidou, M., Ljung, K., Schütz, F., Isono, E., Watahiki, M. K., Yamamoto, K. T., Schwechheimer, C., Fankhauser, C. (2013) Reduced phototropism in pks mutants may be due to altered auxin-regulated gene expression or reduced lateral auxin transport. *Plant J.* 77, 393-403. 査読有り
- ③ Zhou, Y.P., Duan, J., Fujibe, T., Yamamoto, K.T., Tian, C.-E. (2012) *AtIQM1*, a novel calmodulin-binding protein, is involved in stomatal movement in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 79, 333-346. 査読有り
- ④ 山本興太郎 (2012) 植物の屈光性・オーキシンの作用. *バイオメカニズム学会誌* 35, 237-244. 査読無し
- ⑤ Tabata, R., Ikezaki, M., Fujibe, T., Aida, M., Tian, C.-e., Ueno, Y., Yamamoto, K. T., Machida, Y., Nakamura, K., Ishiguro, S. (2010) *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR6 and 8 regulate jasmonic acid biosynthesis and floral organ development via repression of class 1 KNOX genes. *Plant Cell Physiol.* 51, 164-175. 査読有り
- ⑥ Zhou, Y., Chen, Y., Yamamoto, K. T., Duan, J., Tian, C.-e. (2010) Sequence and expression analysis of the *Arabidopsis* IQM family. *Acta Physiol. Plant.* 32, 191-198. 査読有り
- ⑦ Shimizu, H., Tanabata, T., Xie, X., Inagaki, N., Takano, M., Shinomura, T., Yamamoto, K. T. (2009) Phytochrome-mediated growth inhibition of seminal roots in rice seedlings. *Physiol. Plant.* 137, 289-297. 査読有り
- ⑧ Tashiro, S., Tian, C.-e., Watahiki, M. K.,

Yamamoto, K. T. (2009) Changes in growth kinetics of stamen filaments cause inefficient pollination in *massugu2*, an auxin insensitive, dominant mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 137, 175-187. 査読有り

- ⑨ Sato, A., Yamamoto, K. T. (2008) Overexpression of the noncanonical Aux/IAA genes causes auxin-related aberrant phenotypes in *Arabidopsis*. *Physiol. Plant.* 133, 397-405. 査読有り

[学会発表] (計 5 4 件)

- ① 佐々木秋、山本興太郎 : シロイヌナズナ花茎の重力屈性変異 *atlazy1* の新たな抑圧変異体 *dsl2* の解析、第 5 5 回日本植物生理学会年会、2014 年 3 月 18—20 日、富山
- ② 高橋明佳、綿引雅昭、山本興太郎 : オーキシン耐性を示す優性突然変異体 *msg2* の抑圧変異に関する研究、第 5 4 回日本植物生理学会年会、2013 年 3 月 21—23 日、岡山
- ③ 佐藤敦子、佐々木秋、山本興太郎 : シロイヌナズナのオーキシン耐性優性突然変異体 *axr2* の花茎の屈性について、第 5 4 回日本植物生理学会年会、2013 年 3 月 21—23 日、岡山、岡山
- ④ 山本興太郎 : シロイヌナズナの *MSG2/IAA19* とその関連遺伝子、*IAA5*、*IAA6* の機能欠損突然変異体の屈性について、2013 年 3 月 21—23 日、岡山、岡山
- ⑤ 佐々木秋、佐藤敦子、綿引雅昭、門屋亨介、笠原康裕、山本興太郎 : *ASL5* の過剰発現はシロイヌナズナ花茎の重力屈性変異 *atlazy1* を抑圧する、第 5 4 回日本植物生理学会年会、2013 年 3 月 21—23 日、岡山
- ⑥ 武藤秀樹、山本興太郎、金城政孝 : 多様なオーキシン作用の仕組みを解明するためのオーキシン信号伝達因子ファミリー内の定量的相互作用解析、第 3 5 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11—14 日、福岡
- ⑦ Sasaki, S., Sato, A., Watahiki, M.K., Yamamoto, K.T. : Genetic and molecular interaction analyses of the gravity signal transduction pathways in *Arabidopsis* inflorescence. 77th Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. -- The Biology of Plants, May 30 - June 4, 2012, Cold Spring Harbor, USA
- ⑧ 岡本崇、山本興太郎、綿引雅昭 : オーキシン応答カイネチクスで明らかになった *msg2-1* の傾斜屈性の存在、第 5 3 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 16—1

8日、京都

- ⑨山本興太朗、清水久代、松崎潤、岡本崇、佐藤壮一郎、綿引雅昭：MSG2/IAA19-ルシフェラーゼ融合タンパク質をレポーターに用いたシロイヌナズナ胚軸伸長と屈性応答の研究、第53回日本植物生理学会年会、2012年3月16—18日、京都
- ⑩佐々木秋、佐藤敦子、綿引雅昭、山本興太朗：LAZY1とARG1を介するシロイヌナズナ花茎の重力シグナル伝達系の解析、第53回日本植物生理学会年会、2012年3月16—18日、京都
- ⑪佐藤敦子、綿引雅昭、山本興太朗：シロイヌナズナ花茎屈地性異常変異 sgr2 における弱い新規アレルの単離と解析、第53回日本植物生理学会年会、2012年3月16—18日、京都
- ⑫Watahiki, M.K.: Live-imaging of auxin signal transduction and morphogenesis. 第53回日本植物生理学会年会、2012年3月16—18日、京都
- ⑬Sasaki, S., Sato, A., Watahiki, M. K., Yamamoto, K. T.: LAZY1 and ARG1 define two genetic pathways of gravitropism in inflorescence. Intl. Conference on Arabidopsis Research 2011, June 22-26, 2011, Madison, USA
- ⑭松崎潤、山本興太朗：RD29A と根端のトランスクリプトームの hy5 と野生型の比較および変異体の解析から見出された遺伝子群がシロイヌナズナ側根の伸長方向を制御する、第52回日本植物生理学会年会、2011年3月20—22日、仙台
- ⑮Muto, H., Yamamoto, K. T., Kinjo, M.: Comparative evaluation of affinities for protein-protein interactions in signaling pathway of a plant hormone, auxin. 第48回生物物理学会年会、2010年9月20—22日、仙台
- ⑯Matsuzaki, J., Jikumaru, Y., Watahiki, M.K., Kamiya, Y., Yamamoto, K.T.: Physiological and molecular-genetic study of plagiogravitropism in lateral roots of Arabidopsis. Intl. Conference on Arabidopsis Research 2010, June 15-19, 2010, Yokohama.
- ⑰綿引雅昭、山本興太朗：発光レポーターを使った可視化技術で見るオーキシン応答、第50回日本植物生理学会年会、2009年3月21—24日、名古屋
- ⑱清水久代、佐藤壮一郎、綿引雅昭、山本興太朗：ルシフェラーゼ融合タンパク質を用いたシロイヌナズナ MSG2/IAA19 タンパク質レベルの調節の研究、日本植物学会第72回大会、2008年9月25—27日、高知
- ⑲綿引雅昭、山本興太朗：生物発光を用いた

オーキシン応答の可視化、第49回日本植物生理学会年会、2008年3月20—22日、札幌

〔図書〕(計3件)

- ①町田泰則、岡田清孝、山本興太朗監修 (2014) 高校生物解説書、講談社サイエンスティフィク、107ページ
- ②綿引雅昭、山本興太朗 (2010) オーキシン応答の可視化. 柿本辰男等編「植物のシグナル伝達—分子と応答」、共立出版、238ページ、p. 210-215.
- ③Muto, H., Kinjo, M., Yamamoto, K.T. (2008) Fluorescence cross-correlation spectroscopy of plant proteins. In: Methods in Molecular Biology, vol. 479, Plant Signal Transduction -- Methods and Protocols (Pfanschmidt, T., ed.), Humana Press, 357ページ、p.203-215

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 興太朗 (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

綿引 雅昭 (WATAHIKI MASAACKI)
北海道大学・大学院理学研究院・准教授
研究者番号：70396282

(3) 連携研究者

田中 歩 (TANAKA AYUMI)
北海道大学・低温科学研究所・教授
研究者番号：10197402
(H23-H24)