

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18日現在

機関番号：14501

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2013

課題番号：19060006

研究課題名（和文）根系構築の基礎となる根端メリステムの発生機構

研究課題名（英文）Developmental mechanisms of root apical meristems that are essential for construction of root system

研究代表者

深城 英弘 (Fukaki, Hidehiro)

神戸大学・理学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：80324979

研究成果の概要（和文）：

植物の根系は土壌から水分・養分を吸収し、地上部を支えるなど、植物個体の生育にとって重要な役割を果たす。本研究は、根（根系）の発達を支える根端メリステムの発生機構の解明を目的として、シロイヌナズナを用いた分子遺伝学的研究を行った。本研究により、植物ホルモンのオーキシンの下流で発現誘導される LBD/ASL と呼ばれるタンパク質群のメンバーが、側根の形成を引き起こす非対称な細胞分裂を制御することを明らかにした。また、側根メリステムの形成・維持に働く新たな遺伝子・タンパク質を複数見出すことに成功した。

研究成果の概要（英文）：

Branching root systems enable the plants to absorb water and nutrients from the soil and to sustain the shoot parts. In this project, to understand the developmental mechanisms of root apical meristems that are essential for construction of root system, we performed molecular genetic analyses using a model plant, *Arabidopsis thaliana*. We found that several auxin-inducible LBD/ASL proteins regulate the establishment of asymmetry in lateral root founder cells. In addition, we found several key genes/proteins that are necessary for the formation and maintenance of lateral root meristems.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	19,200,000	0	19,200,000
2008年度	19,200,000	0	19,200,000
2009年度	19,200,000	0	19,200,000
2010年度	19,200,000	0	19,200,000
2011年度	19,200,000	0	19,200,000
2012年度	19,200,000	0	19,200,000
総計	115,200,000	0	115,200,000

研究分野：生物学

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：発生分化、メリステム、側根形成、植物ホルモン、オーキシン、シロイヌナズナ、分子遺伝学、発現制御

1. 研究開始当初の背景

維管束植物の地下部を構成する根系は、土壌からの水分・無機塩類を吸収、地上部の物理的支持など、植物の生育にとって重要な役割を果たす。一般に根系は発芽後伸長する主根と、根の内部組織から形成される側根、地上部器官から形成される不定根によって構築される。これまで植物ホルモンのオーキシンが、根の形成、特に側根の形成に重要なことが知られてきたが、その分子機構は近年まで詳しくわかっていなかった。研究開始の時点までに研究代表者らは、モデル植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いた分子遺伝学的手法により、側根形成の開始にオーキシンを介した特定の遺伝子発現制御系が必要なことを明らかにしていた。なかでも、側根欠失変異体 *solitary-root (slr)* や側根形成能が顕著に低下した *arf7 arf19* 二重変異体などを用いた研究から、AUXIN RESPONSE FACTOR7 (ARF7)、ARF19、SLR/IAA14 などの転写調節因子を介したオーキシン応答が側根形成開始に重要であること、および、これらの下流遺伝子として、LBD/ASL ファミリーに属する複数の LBD/ASL タンパク質が側根形成開始で機能することなどを明らかにしてきた (Fukaki et al., 2002, *Plant J.*; Fukaki et al., 2005, *Plant J.*; Okushima et al., 2007, *Plant Cell*)。しかし、側根発生におけるオーキシン誘導性 LBD/ASL タンパク質群の役割や、それらを介した分子カスケードは全く不明であった。

また、根系の構築には側根の形成開始の制御だけでなく、主根や側根、不定根の根端メリステムを形成および維持することが重要である。研究開始当初、主根や側根メリステムの形成・維持に関わる因子はいくつか知られているものの、その機構に関する知見は十分でなく、さらなる研究が必要と考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、高等植物の根系構築の基礎となる根端メリステムの発生機構を解明することを大きな目的として、以下の2つの課題に取り組んだ。

(1) ARFs, Aux/IAAs, オーキシン誘導性 LBD/ASL タンパク質などを介した側根形成開始の分子カスケードを明らかにする。

(2) 側根形成開始や側根メリステム形成・維持に異常を示す新奇変異体を用いた発生遺伝学的解析を行い、オーキシンや新奇制御因子を介した側根メリステム形成・維持の機構を明らかにする。

3. 研究の方法

モデル植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を材料として、主に発生遺伝学的・細胞生物学的手法を用いて研究を行った。方法の詳細は、研究成果に合わせて記載した。

4. 研究成果

(1) 側根形成開始の分子カスケードの解析
①側根創始細胞の非対称性の確立における LBD/ASL 遺伝子群の機能解析

側根の形成開始に必要な SLR/IAA14-ARF7-ARF19 オーキシンシグナルモジュールの下流で誘導される LBD16/ASL18 を中心とした LBD/ASL タンパク質群の機能解析を行った。LBD16/ASL18 タンパク質が根の内鞘細胞のうち、側根を生み出す細胞 (側根創始細胞) において、側根形成が開始される時期に特異的に発現することを詳細な観察により示した。さらに、LBD16/ASL18 とその類似タンパク質群の機能を同時に抑制したところ、側根創始細胞において核の移動をとまらぬ非対称性が確立されずに等分裂が1回起こるだけで、その後の側根形成が完全に阻害された。これらの結果から、LBD16/ASL18 タンパク質や類似の LBD/ASL タンパク質群は側根創始細胞の非対称性の確立を制御することで、側根の発生を誘導していることが明らかとなった (図1~3)。

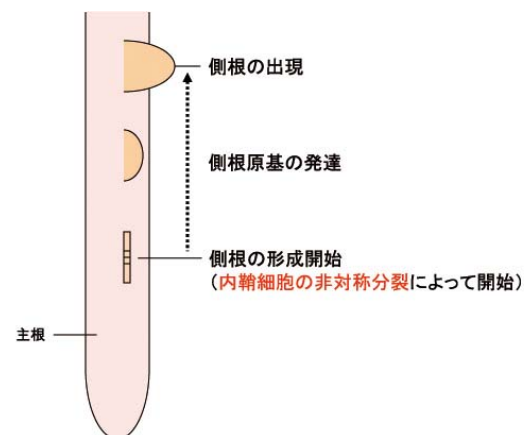


図1. 側根形成の模式図

側根の形成は根の内部組織 (内鞘) の細胞の非対称分裂によって開始する。その後、側根原基の発達、側根メリステムの確立を経て、親根の組織を突き破って外に出現する。この過程は植物ホルモンのオーキシンによって制御されている。



図2. 野生型のシロイヌナズナとLBD16/ASL18および関連するLBD/ASLタンパク質群の働きを抑制したシロイヌナズナ(12日目の芽生え)

野生型では側根が形成されるのに対して、LBD16/ASL18および類似LBD/ASLタンパク質の機能を抑制したシロイヌナズナでは側根形成が起こらない。

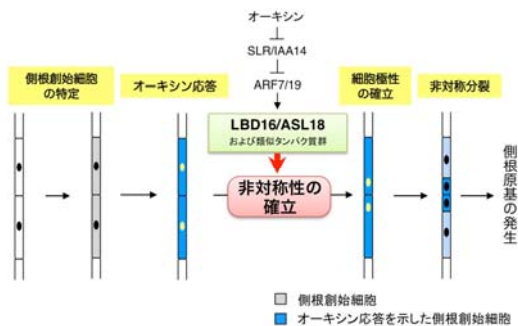


図3. 側根形成開始におけるLBD16/ASL18および関連するLBD/ASLタンパク質の役割

LBD16/ASL18は側根創始細胞においてSLR/IAA14-ARF7-ARF19オーキシシンシグナルモジュールに依存して活性化され、類似のLBD/ASLタンパク質とともに側根創始細胞の非対称性の確立を促進する。その結果、核の移動と非対称分裂が起こり、側根原基の発生が進むと考えられる。

②側根形成におけるLBD16の下流遺伝子の機能解析

LBD16-GR誘導型植物を用いたアレイ解析からLBD16標的遺伝子TOLS1(Target of LBD Sixteen1;機能未知タンパク質)、TOLS2(推定ペプチドホルモン)、およびPUCHI(AP2型転写因子)などを同定した。これらの解析から、側根創始細胞の非対称分裂を促進する経

路と、側根形成隣接部位での側根形成を抑制する経路(側方抑制)の存在が示唆された。

(2)側根メリステム形成・維持機構の解析

①側根形成とシュート発生に関わるオーキシシン応答リプレッサーCRANE/IAA18の解析

側根形成能が低下した優性変異体craneがオーキシシン応答リプレッサーAux/IAAファミリーメンバーのIAA18の機能獲得変異体であることなどを明らかにした。これらの結果から、CRANE/IAA18がSLR/IAA14と共にARF7/19による側根形成を負に制御することを示した。

②側根メリステム維持におけるFBA1の機能解析

主根と側根メリステム維持に異常のある新奇変異体LR-11の解析を行い、原因遺伝子がプラスチド型Fructose 1,6-bisphosphate aldolase(FBA)1であることを明らかにした。FBA1は主に根で発現し、プラスチドに局在する。野生型とfba1変異体の接木実験や、器官特異的プロモーターを用いた相補実験の結果から、根におけるFBA1を介した代謝が根端メリステムの維持に必要なことが明らかとなった。

③側根形成能が顕著に低下するfewer roots(fwr)変異体の解析

側根形成能が顕著に低下する変異体として、小胞輸送を制御するArf-GFF因子をコードするGNOM遺伝子の点変異体アレルfewer roots(fwr)を単離し、解析を行った。既知のgnom変異体アレルの多くが胚性致死または芽生え致死となるのに対して、fwr変異体は稔性があり側根形成特異的な異常を示す。オーキシシン応答レポーターの発現解析から、GNOMは側根形成開始のオーキシシン応答の確立に必要なことが強く示唆された。一方、fwrの側根形成能の低下を回復させるサプレッサー変異体fsp1、fsp2(fwr suppressor, fsp)を単離し、これらの原因遺伝子として、オーキシシン合成や輸送に関連する遺伝子を同定した。

④オーキシシンを介さない側根形成制御および根の放射パターン制御におけるRLFタンパク質の機能解析

側根の形成頻度が低下した劣性変異体reduced lateral root formation(rlf)を単離し、分子遺伝学的解析を行った。rlf変異体の原因遺伝子が、細胞質に存在する機能未知なシトクロムb5様ヘム/ステロイド結合ドメインタ

ンパク質をコードすることなどを明らかにした。また、*rlf* 変異体の根では細胞列数の増加と皮層細胞層の増加が見出し、RLF が根の放射パターンの制御にも関与することが明らかとなった。

⑤ オーキシン応答リプレッサー SHY2/IAA3 を介した側根形成制御の解析

Aux/IAA タンパク質ファミリーに属する SHY2/IAA3 の優性変異体 *shy2-101* では側根原基の形成や側根の出現が抑制される一方、側根形成部位の数が著しく増加していた。*shy2* では内生のオーキシン量が増加していたことから、正常な SHY2/IAA3-ARFs シグナル伝達がオーキシン量の制御に重要であり、それを介して側根形成頻度を調整していると考えられる。これらの結果から、側根形成では複数の Aux/IAA-ARF モジュールが互いに協調しながら、オーキシン応答を適切に調節し、側根形成を制御していることを示した。

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 13 件)

- 1) Okumura, K., Goh, T., Toyokura, K., Kasahara, H., Takabayashi, Y., Mimura, T., Kamiya Y. and Fukaki, H. (2013) GNOM/FEWER ROOTS is required for the establishment of an auxin response maximum for *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell Physiol.* 54, 406-417. (査読有)
- 2) Goh, T., Kasahara H., Mimura, T., Kamiya Y. and Fukaki, H. (2012) Multiple Aux/IAA-ARF modules regulate lateral root formation: the role of *Arabidopsis* SHY2/IAA3-mediated auxin signaling. *Phil. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 367, 1461-1468. (査読有)
- 3) Goh, T., Joi, S., Mimura, T. and Fukaki, H. (2012) The establishment of asymmetry in *Arabidopsis* lateral root founder cells is regulated by LBD16/ASL18 and related LBD/ASL proteins. *Development* 139, 883-893. (査読有)
- 4) Ikeyama, Y., Tasaka, M. and Fukaki, H. (2010) RLF, a cytochrome *b₅* heme/steroid binding protein, controls lateral root formation independently of ARF7/19-mediated auxin signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 62, 862-875. (査読有)
- 5) Overvoorde, P., Fukaki, H. and Beeckman, T. (2010) Auxin control of root development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2(6), a001537. (査読有)
- 6) Fukaki, H. and Tasaka M. (2009) Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Mol. Biol.* 69: 437-449. (査読有)
- 7) Uehara, T., Okushima, Y., Mimura, T., Tasaka, M. and Fukaki, H. (2008) Domain II mutations in CRANE/IAA18 suppress lateral root formation and affect shoot development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 49:1025-1038. (査読有)
- 8) Fukaki, H., Okushima, Y. and Tasaka, M. (2007) Auxin-mediated lateral root formation in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 256, 111-137. (査読有)
- 9) Hirota, A., Kato, T., Fukaki, H., Aida, M. and Tasaka, M. (2007) The auxin-regulated AP2/EREBP gene *PUCHI* is required for morphogenesis in the early lateral root primordium of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 2156-2168. (査読有)

[学会発表] (計 41 件)

- 1) 半田華奈子、豊倉浩一、郷 達明、三村徹郎、深城英弘。シロイヌナズナ根の放射パターン形成に関与する *RLF* 遺伝子の解析。第 54 回日本植物生理学会年会 (岡山、2013 年 3 月 21-23 日) (ポスター発表)
- 2) 池上 聡、奥村謙一、郷 達明、豊倉浩一、三村徹郎、深城英弘。側根形成能が顕著に低下するシロイヌナズナ *fewer roots* 変異体のサプレッサー変異体の単離と解析。第 54 回日本植物生理学会年会 (岡山、2013 年 3 月 21-23 日) (ポスター発表)
- 3) 深城英弘。根系の成長システム解明に向けて—遺伝子制御ネットワーク研究から見えること—。日本植物学会第 76 回大会 (姫路、2012 年 9 月 15-17 日) (シンポジウム講演)
- 4) 森本剛司、前田貴史、郷 達明、中島敬二、三村徹郎、小川健一、深城英弘。根端メリシステムの維持に異常を示すシロイヌナズナ *fbal* 変異体の解析。日本植物学会第 76 回大会 (姫路、2012 年 9 月 15-17 日) (口頭発表)
- 5) Tatsuaki Goh, Hiroyuki Kasahara, Tetsuro Mimura, Yuji Kamiya, Hidehiro Fukaki. The role of SHY2/IAA3-mediated auxin signaling in *Arabidopsis* lateral root formation. 第 53 回日本植物生理学会年会 (京都、2012 年 3 月 16-18 日) (口頭発表)
- 6) Hidehiro Fukaki. “The establishment of asymmetry in *Arabidopsis* lateral root founder cells is regulated by auxin-inducible LBD/ASL proteins” The 3rd Korea-Japan Young Plant Scientist Symposium (POSTECH, Korea, Sep. 26-27, 2011) (シンポジウム講演)

- 7) 深城英弘. シロイヌナズナ根端メリステムの形成・維持の制御機構. 日本植物学会第75回大会 (東京、2011年9月17-19日) (シンポジウム講演)
- 8) 郷達明, 城井駿平, 三村徹郎, 深城英弘. 側根形成開始における細胞分裂の非対称性の制御. 日本植物学会第75回大会 (東京、2011年9月17-19日) (シンポジウム講演)
- 9) Tatsuaki Goh, Tetsuro Mimura, and Hidehiro Fukaki. "Auxin-inducible LBD/ASL proteins regulate Arabidopsis lateral root initiation through activating the first asymmetric cell divisions of protoxylem pericycle." 第32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 (BMB2010) (神戸、2010年12月7-10日) (ポスター及び口頭発表)
- 10) Hidehiro Fukaki. "Auxin and Lateral Root Development: Transcriptional Cascades Regulating Lateral Root Initiation in *Arabidopsis thaliana*." Korean Society of Molecular and Cell Biology, Symposium, October 7-8, 2010 (Seoul, KOREA) (シンポジウム講演)
- 11) 城井駿平, 小野田誠, 郷達明, 三村徹郎, 田坂昌生, 深城英弘. シロイヌナズナ側根形成における時期特異的・空間特異的なオーキシン応答の制御. 日本植物学会第74回大会 (春日井、2010年9月9-11日) (口頭発表)
- 12) 横山碧, 上原健生, 郷達明, 奥島葉子, 三村徹郎, 田坂昌生, 深城英弘. シロイヌナズナ側根形成におけるLBD16/ASL18の下流遺伝子 *LLPL2* の解析. 日本植物学会第74回大会 (春日井、2010年9月9-11日) (ポスター発表)
- 13) Tatsuaki Goh, Tetsuro Mimura, and Hidehiro Fukaki. Auxin-inducible LBD/ASL members regulate lateral root formation. The 21st conference on Arabidopsis research (2010年6月6-10日、Yokohama, Japan) (ポスター発表)
- 14) 奥村謙一, 郷達明, 三村徹郎, 深城英弘. シロイヌナズナ側根形成変異体 *fewer roots (fwr)* の解析. 第51回日本植物生理学会年会 (熊本、2010年3月19-22日) (口頭発表)
- 15) 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回日本植物生理学会年会 (熊本、2010年3月19-22日) (口頭発表)
- 16) 前田貴史, 郷達明, 三村徹郎, 小川

- 健一, 深城英弘. 根端メリステムの維持に異常を示すシロイヌナズナLR11-4変異体の解析. 第51回日本植物生理学会年会 (熊本、2010年3月19-22日) (口頭発表)
- 17) 深城英弘 「側根形成を制御するオーキシンシグナリング」、第50回日本植物生理学会年会シンポジウム「オーキシン研究の新展開」口頭発表 (名古屋、2009年3月21日-24日) (口頭発表)
- 18) 上原健生, 奥島葉子, 三村徹郎, 田坂昌生, 深城英弘. シロイヌナズナ側根形成におけるLBD16/ASL18下流遺伝子の解析. 第50回日本植物生理学会年会 (名古屋、2009年3月21日-24日) (ポスター発表)
- 19) 深城英弘. オーキシンを介した側根発生の分子機構. 日本分子生物学会年会シンポジウム. メリステムによる植物発生のダイナミズム. (神戸、2008年12月9日-12日) (口頭発表)

[図書] (計 4件)

- 1) 深城英弘, 郷達明 (2012) オーキシンを介した側根形成の分子機構. 植物の生長調節 Vol. 47, No. 2, pp. 93-100, 植物化学調節学会 (総ページ数 76)
- 2) 深城英弘 (2011) 維管束植物の根系構築と側根発生の機構「細胞履歴に基づく植物の形態形成」高等研報告書 1004, pp.73-79, 財団法人国際高等研究所 (総ページ数 158)
- 3) 深城英弘 (2010) オーキシン応答における遺伝子発現制御 「植物のシグナル伝達-分子と応答-」 pp.113-118, 共立出版 (総ページ数 240)
- 4) 深城英弘 (2007) 根—隠れた半分—「植物の生存戦略」、朝日選書 721, pp.123-141, 朝日新聞社 (総ページ数 234)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0件)
- 取得状況 (計 0件)

[その他]

- ・所属機関研究者紹介ホームページ
<http://www.edu.kobe-u.ac.jp/fsci-biol/staff/h-fukaki.html>
- ・研究室ホームページ
<http://www.research.kobe-u.ac.jp/fsci-fukaki/fukaki/top.html>
- ・新聞報道など
平成24年1月26日 時事通信「側根の成長、制御する遺伝子」

平成24年1月27日 神戸新聞「側根の成長、仕組み解明」朝刊3面

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

三村 徹郎 (MIMURA TETSURO)
神戸大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：20174120

(4) 研究協力者

郷 達明 (TATSUAKI GOH)
神戸大学・大学院理学研究科・日本学
術振興会特別研究員
研究者番号：80511419

豊倉 浩一 (KOICHI TOYOKURA)
神戸大学・大学院理学研究科・学術研
究員
研究者番号：60722999