

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770030
 研究課題名 (和文) シロイヌナズナのオーキシン応答に関わる *LBD/ASL* 遺伝子群の機能解析
 研究課題名 (英文) Functional analysis of the *LBD/ASL* genes that are involved in auxin responses in *Arabidopsis thaliana*
 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

研究成果の概要：

シロイヌナズナの *LBD/ASL* 遺伝子群 (転写因子をコード) に属する *LBD16*, *17*, *29*, *33* は、根の側根形成開始部位で発現し、その発現はオーキシンによって誘導される。多重変異体などを用いた解析から、オーキシンを介した側根形成において3つ以上の *LBD* 遺伝子による重複した機能が重要なことが強く示唆された。また、*LBD16* によって転写が活性化される下流遺伝子を多数同定し、そのうち側根形成開始部位でオーキシンによって誘導される新規遺伝子を見いだした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：植物分子遺伝学、植物生理学、植物発生学

科研費の分科・細目：植物生理・分子→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、分子遺伝学、側根形成

1. 研究開始当初の背景

植物ホルモンのオーキシンは、胚発生・側根形成・屈性反応・頂芽優勢など、植物のさまざまな成長・発生過程を調節する。これまでの研究から、オーキシン応答には、オーキシン応答転写調節因子 ARF (Auxin

Response Factor) と、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) との相互作用を介した遺伝子発現制御が重要なことがわかっている。これまでシロイヌナズナにおける ARF や Aux/IAA ファミリーの変異

体解析から、これらの因子が植物の成長・発生に重要な役割を果たすことが示されてきた。なかでも研究代表者らが解析した側根欠失変異体 *solitary-root* (*slr*) (Aux/IAA タンパク質 IAA14 の機能獲得変異) や、側根形成能が顕著に低下した *ARF7*, *ARF19* の二重変異体 (*arf7arf19*) を用いた研究から、側根形成は、*ARF7*, *ARF19*, *SLR/IAA14* を介したオーキシン応答性遺伝子の発現によって制御されていることが示された (Fukaki *et al.*, 2002, *Plant J.*; Fukaki *et al.*, 2005, *Plant J.*; Vanneste *et al.*, 2005, *Plant Cell*, Fukaki *et al.*, *Plant J.*)。

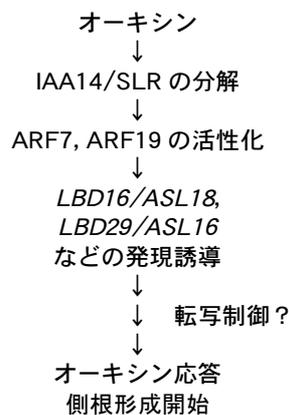


図 1. シロイヌナズナの側根形成におけるオーキシン応答モデル

このような研究背景の中、研究代表者らは近年、上記変異体を用いたマイクロアレイ解析などから、*ARF7*, *ARF19*, *SLR/IAA14* の下流で側根形成に働く標的遺伝子として、*LBD* (*Lateral Organ Boundaries-domain*)/*ASL* (*AS2-Like*)ファミリーに属する *LBD16/ASL18* と *LBD29/ASL16* を同定した (以下 *LBD16*, *LBD29* と表記) (Okushima *et al.*, 2007, *Plant Cell*)。 *LBD16*, *LBD29* は、オーキシンにより根で発現が誘導される遺伝子で、転写因子をコードすると考えられている。また、これらのオーキシンによる発現誘導に *ARF7*,

ARF19 を必要とし、実際、*LBD16*, *LBD29* のプロモーターには *ARF7*, *ARF19* が結合する。そして、これらの *LBD16*, *LBD29* 遺伝子の過剰発現によって *arf7arf19* 二重変異体の根のオーキシン応答性や側根形成能が回復する。これらの結果から、*LBD16*, *LBD29* は *ARF7*, *ARF19* により直接活性化されることによりオーキシン応答や側根形成を制御することを明らかにした (Okushima *et al.*, 2007, *Plant Cell*)。 *LBD16* は核局在タンパク質であり、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ことから、*LBD16* を含む複数の *LBD/ASL* タンパク質が側根形成におけるオーキシン応答で機能することが強く示唆された (Okushima *et al.*, 2007, *Plant Cell*)。また、単子葉類イネでも *LBD29* 相同遺伝子である *CRL1* が、冠根形成などのオーキシン応答に働く (Inukai *et al.*, 2005, *Plant Cell*)。このように近年、高等植物のオーキシン応答における *LBD/ASL* 遺伝子群の重要性が明らかになりつつある。

しかしながら、シロイヌナズナに 40 個以上存在する *LBD/ASL* 遺伝子のうち、*LBD6/AS2* が葉の左右相称性・背腹軸性の決定に関わることが報告されているものの、上記の *LBD16*, *LBD29* をはじめ他のメンバー (根においてオーキシンによって発現が上昇する *LBD17*, *LBD18*, *LBD33*) の役割や、*LBD* タンパク質の分子機能はほとんど明らかにされていなかった。また、*LBD16* のノックアウト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が示唆された。したがって、根の発生過程を制御するオーキシン応答機構の解明には、こうしたオーキシン誘導性 *LBD/ASL* 遺伝子群の機能解析が必要と考えられた。

2. 研究の目的

シロイヌナズナにおいて、オーキシン応答を介した側根形成に関わることが示された LBD16、LBD29 と別のオーキシン誘導性 LBD/ASL 遺伝子 (LBD17, LBD18, LBD33) のうち、国外グループが解析している LBD18/ASL20 (維管束形成に関与) を除く LBD16, 17, 29, 33 について、オーキシン応答における機能を明らかにすることを目的とする。具体的には以下の記す2つの方法で行った。

3. 研究の方法

①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 根で発現する LBD16, 17, 29, 33 遺伝子について、ノックアウト変異体、人工マイクロ RNA を用いた発現抑制システムを作出し、単独および多重変異体におけるオーキシン応答性、オーキシンを介した成長・発生における役割を明らかにする。また、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する系統 (*gLBD16-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。さらに、LBD17 の根における発現パターンをプロモーター-GUS 系統 (*pLBD17::GUS*) を作成して明らかにする。

②LBD16 を介したオーキシン応答の分子カスケードの解析 *arf7 arf19* 二重変異体を示すオーキシン応答・側根形成能の顕著な低下を、デキサメタゾン (DEX) 依存的に回復させる LBD16 過剰発現体 (*35S::LBD16-GR [Glucocorticoid Receptor]/arf7arf19*; 図2) を用いて、オーキシン応答性遺伝子の発現解析や、マイクロアレイ解析による LBD16 の下流因子の探索を行い、LBD16 を介したオーキシン応答の分子カスケードを明らかにする。



図2. LBD16 誘導系植物の側根形成. DEX 非存在下 (左) では側根を形成せず *arf7arf19* 変異体の表現型を示す。DEX 存在下 (右) でのみ側根形成が促進される。

4. 研究成果

①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 根で発現する LBD16, 17, 29, 33 のうち、*lbd16*、*lbd33* 単独変異体および *lbd16 lbd33* 二重変異体では、側根形成を含むオーキシンを介した成長・発生において顕著な表現型がなかった。このことから、LBD17、LBD29 との機能重複が強く示唆された。そこで、*lbd16* および *lbd33* 変異体において、人工マイクロ RNA の過剰発現によって LBD17 または LBD29 の発現抑制システムを作出したが、これらの系統においても顕著な表現型を示す系統は得られなかった。この結果から、少なくとも3つ以上の LBD/ASL 遺伝子の機能重複が強く示唆された。今後、これらの多重変異体や発現抑制システムを交配し、3 遺伝子または4 遺伝子の機能抑制体を作成し、オーキシン応答への影響を調べる必要がある。

次に、オーキシン応答における LBD16 タンパク質の挙動を調べるために、LBD16 の転写制御下で LBD16-GFP 融合タンパク質の発現をモニターする系統 (*gLBD16-GFP*) を作出し、根における発現を観察した。その結果、側根形成開始に関わる特定の細胞群 (内鞘) の核

に LBD16-GFP が蓄積することを確認した (図 3)。

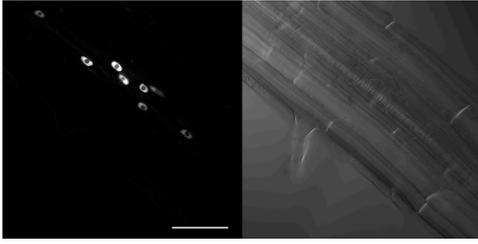


図 3. *gLBD16-GFP* 植物の側根形成部位における LBD16-GFP の発現。(右) 側根形成部位を含む主根の微分干渉顕微鏡像を示す。(左) (右) 写真部分の GFP 蛍光。LBD16-GFP は核に局在する。

また、発現パターンが不明だった *LBD17* のレポーター系統 (*pLBD17::GUS*) を作出し、発現パターンを調べたところ、他の *LBD16*, *29*, *33* と同様に側根形成開始部位で特異的に発現し、その発現はオーキシンによって誘導されることが明らかとなった (図 4)。これらの結果から、*LBD17* が *LBD16*, *29*, *33* とともにオーキシンを介した側根形成開始に関与することが強く示唆された。今後、*LBD17* タンパク質の局在と蓄積についても *LBD16* と同様に調べる必要がある。

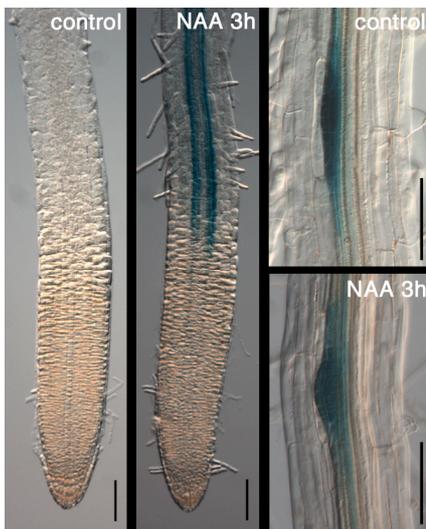


図 4. *pLBD17::GUS* レポーター遺伝子の発現 (左・中央) オーキシン NAA 処理により主根の内鞘組織で *pLBD17::GUS* が活性化する。(右上・右下) *pLBD17::GUS* は側根形成部位で特異的に発現する。

②LBD16 を介したオーキシン応答の分子カスケードの解析 オーキシンによって誘導される LBD16 の下流遺伝子を同定する目的で、オーキシン感受性が低下した *arf7arf19* 二重変異体の表現型をデキサメタゾン (DEX) 依存的に回復させる LBD16 過剰発現体 (*35S::LBD16-GR/arf7arf19*) を用いたマイクロアレイ解析を行った。このときタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを同時に用いることで、LBD16 によって直接転写活性化が起こる標的遺伝子の同定を試みた。その結果、LBD16 によって正に制御され、かつ ARF7 や SLR/IAA14 の下流でオーキシンによって制御される遺伝子を 29 個同定した。このうち ARF7, LBD16, LBD29 との共発現データから絞り込んだ 11 遺伝子について、リアルタイム PCR を用いて発現解析を詳細に調べたところ、これらは *35S::LBD16-GR/arf7arf19* 植物において DEX 処理によって誘導された。さらに、これらの遺伝子の一部についてプロモーター-GUS 系統を作成して発現パターンを調べたところ、*LBD16* と同様に側根形成開始部位で特異的に発現する新規遺伝子 (*AtLLPL2* と命名) が含まれていた。この遺伝子は植物に保存される特有なモチーフ (Leu-Leu-Pro-Leu; LLPL) を持つ機能未知タンパク質をコードしていた。今後は、LBD16 を介したオーキシン応答における *AtLLPL2* の機能を明らかにするとともに、他の LBD16 標的遺伝子の役割を調べる必要がある。

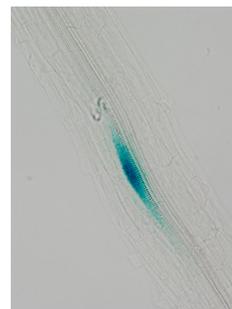


図 5. *pAtLLPL2::GUS* レポーター遺伝子の発現 主根の内鞘組織のうち、側根形成開始部位で特異的に発現する。

本研究によって、シロイヌナズナのオーキシンを介した側根形成において、*LBD16*, *17*, *29*, *33* (転写因子をコード) のうち3つ以上の遺伝子による重複機能が重要なことが示唆された。また、*LBD16* が側根形成開始部位の内鞘細胞の核に特異的に蓄積すること、および*LBD16* によって転写活性化される下流遺伝子が複数存在することが明らかとなった。本研究の結果は、今後、植物におけるオーキシン応答を介した成長・発生、特に側根形成におけるオーキシン応答機構解明の基盤となることが期待される。

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 4 件)

- ① Fukaki, H. and Tasaka M. (2009) Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Mol. Biol.* 69: 437-449. 査読有
- ② 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[Cover]. 査読有
- ③ 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 [Cover]. 査読有
- ④ Yamaguchi, N., Suzuki, M, Fukaki, H., Morita-Terao, M., Tasaka, M. and Komeda,

Y. (2007) CRM1/BIG-mediated auxin action regulates *Arabidopsis* inflorescence development. *Plant Cell Physiol.* 48, 1275-1290. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① 深城英弘 「側根形成を制御するオーキシニングナリング」、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发展」口頭発表(2009年3月21日-24日、名古屋大学・東山キャンパス)
- ② 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 ポスター発表 (2009年3月21日-24日、名古屋大学・東山キャンパス)
- ③ 郷達明、上原健生、三村徹郎、深城英弘 「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」、第50回日本植物生理学会年会 ポスター発表 (2009年3月21日-24日、名古屋大学・東山キャンパス)
- ④ 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」口頭発表(2008年12月9日-12日、神戸・ポートアイランド)
- ⑤ 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で機能する*LBD16/ASL18* の下流遺伝子の解析」、日本分子生物学会年会 ポスター発表 (2008年12月9日-12日、神戸・ポートアイランド)
- ⑥ 深城英弘 (2008) 「高等植物における根の発生機構に関する分子遺伝学的研究」、第49回日本植物生理学会 口頭発表(2008年3月20日-22日、札幌・コンベンション)

ンセンター)

- ⑦ 上原健生, 奥島葉子, 三村徹郎, 田坂昌生, 深城英弘 (2008) 「シロイヌナズナ側根形成で機能する LBD16 の下流遺伝子の探索」、第 49 回日本植物生理学会 ポスター発表 (2008 年 3 月 20 日～22 日 (札幌・コンベンションセンター))

[図書] (計 1 件)

- ① 深城英弘 (2007) 根-隠れた半分-「植物の生存戦略」(「植物の軸と情報」特定領域研究班編)、朝日選書 721、123-141.

[その他]

研究室ホームページ等

<http://www.edu.kobe-u.ac.jp/fsci-biol/staff/h-fukaki.html>

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/fsci-fukaki/fukaki/top.html>

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

なし

研究協力者

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