

平成22年 6月 18日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20770034

研究課題名 (和文) 高等植物におけるオーキシン極性輸送機構の解析

研究課題名 (英文) Research of polar auxin transport in higher plants

研究代表者

古谷 将彦 (FURUTANI MASAHIKO)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：10432593

研究成果の概要 (和文)：本研究は、オーキシン極性輸送における *MACCHI-BOU 4* (*MAB4*) 遺伝子群の機能を明らかにした。*MAB4* の相同遺伝子 *MAB4/ENP-LIKE* (*MEL*) がさまざまな器官および組織で発現し、*MAB4* 遺伝子および *MEL* 遺伝子間で冗長的にオーキシン極性輸送を制御していることが分かった。*MAB4* および *MEL* タンパク質はオーキシン極性輸送方向側の細胞膜に局在し、オーキシン排出キャリアーの細胞膜からの内部移行を阻害していることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：This research demonstrates the function of *MAB4* subfamily gene in polar auxin transport. *MAB4* and *MEL* genes, which are expressed in various tissues and organs, regulate polar auxin transport redundantly. These proteins are localized in the same side of plasma membrane as auxin efflux carriers. *MAB4* subfamily genes regulate the localization of auxin efflux carrier by inhibiting of its endocytosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物

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：植物ホルモン・生長生理・全能性

1. 研究開始当初の背景

植物ホルモンであるオーキシンは生合成された部位から極性輸送と呼ばれる輸送システムにより方向性をもって輸送され、器官および組織内にオーキシンの不等分布が形成される。そのオーキシン不等分布は胚発生時の軸形成、葉や花や根といった器官の形成、維管束組織のパターニング、光および重力屈

性反応などさまざまな生理現象において非常に重要な役割を果たす。オーキシンの極性輸送はオーキシンの排出キャリアーである PIN-FORMED (PIN) タンパク質が細胞膜上に極性を持って局在化し、その極性が細胞間で揃うことによって可能になると考えられている。その PIN の極性を持った局在化を制御する分子機構はほとんど明らかになっていな

い。それまでに、研究代表者らが PIN タンパク質の局在を制御する因子として *MAB4* 遺伝子を単離しており、その機能欠失変異体において PIN1 タンパク質の局在が異常になることを明らかにしてはいたが、どのように *MAB4* 遺伝子が PIN1 タンパク質の局在を制御しているのか、その詳細な分子機能は分かっていた。

2. 研究の目的

そこで、本研究は *MAB4* 遺伝子の分子機能を詳細に解析し、PIN タンパク質の局在制御機構の解明、ひいてはオーキシンの極性輸送機構の解明を目的とした。ただし、*MAB4* 遺伝子は PIN1 タンパク質の局在を部分的に制御するとどまり、*mab4* 変異体の表現型は比較的軽度であることから、シロイヌナズナのゲノム中には *MAB4* 遺伝子と機能重複的に機能する因子の可能性が考えられた。そこで、本研究は *MAB4* 遺伝子と高い相同性を示す *MEL* 遺伝子群にも着目し、その機能解析を行うこととした。

3. 研究の方法

MAB4 遺伝子群の機能解析を行うにあたり、以下の2つの研究を遂行した。

(1) *MAB4* 遺伝子群の機能重複性

MAB4 遺伝子と高い相同性を示す *MEL* 遺伝子の発現解析を行う。それぞれの遺伝子上流配列（プロモーター）およそ 3 kbp をレポーター遺伝子に連結し、それを植物体に形質転換しレポーターアッセイを行う。また、*MAB4* および *MEL* タンパク質の細胞内局在を調べるために、それぞれのプロモーターに cDNA と GFP の融合遺伝子をつなぎ植物体に導入し、GFP シグナルを観察する。つぎに、*MEL* 遺伝子の機能を解析するため、機能欠失変異体をストックセンターより入手し、多重変異体を作製し、その表現型を詳細に観察する。多重変異体背景で PIN タンパク質の局在解析を詳細に行う。

(2) 薬理学的手法を用いた *MAB4* 遺伝子群の機能解析

野生型植物において、これまでに、PIN タンパク質が細胞膜からエンドソームへと細部移行し、一部は再び細胞膜へとリサイクリングされる。残りは液泡へと輸送され、そこで分解されることが分かっている。そこで、研究(1)において作製した多重変異体において PIN タンパク質の輸送経路に異常が生じているのか調べる。解析にあたり、PIN タンパク質の輸送経路にも効果を発揮することが明らかにされている小胞輸送阻害剤を用いる。

4. 研究成果

(1) *MAB4* 遺伝子群の機能重複性

MAB4 および *MEL* 遺伝子のプロモーター活性を調べた結果、それぞれの遺伝子のプロモーター活性はさまざまな組織でさまざまな発生過程で検出された。*MAB4* 遺伝子群はそれぞれ特異的なプロモーター活性を示しつつも、一部重複した活性パターンを示した。この結果は、*MAB4* 遺伝子群がそれぞれ特異的な組織および発生過程で機能しつつも、一部重複的な機能を有していることを示唆している。つぎに、*MAB4* および *MEL* タンパク質の細胞内局在を解析した結果、いずれのタンパク質も細胞膜近傍に局在することが分かった。しかも、細胞膜上で極性をもって局在化していた。その極性はこれまでに報告されている PIN タンパク質の極性と完全に一致するものであった（図1）。このことから、*MAB4* および *MEL* タンパク質が PIN 依存的なオーキシン極性輸送に関与することが示唆された。

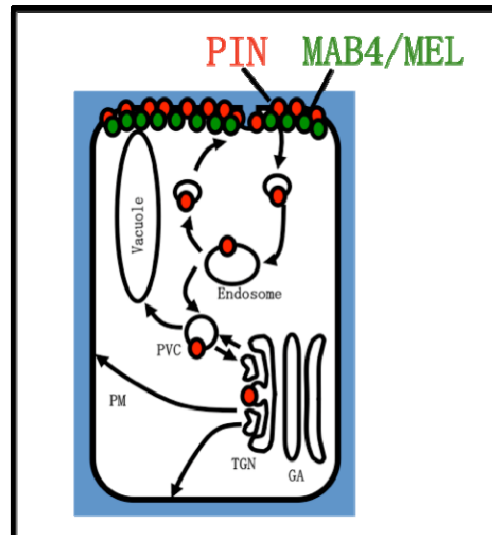


図1：PIN および *MAB4*/*MEL* タンパク質の細胞内局在様式の模式図

つぎに、*MAB4* 遺伝子群の機能欠失変異体間で多重変異体を作製したところ、*mab4 mel1 mel2* 三重変異体において、*pin1* 変異体同様、葉や花の形成に重篤な異常を示しピン状の花茎を生じた。また、*mel1 mel2 mel3 mel4* 四重変異体を作製したところ、根の重力屈性に重篤な異常を示し、*pin2* 変異体同様の表現型を示すことが明らかとなった。以上のことから、*MAB4*、*MEL1* および *MEL2* 遺伝子が器官形成過程において機能重複的に機能し、*MEL1*、*MEL2*、*MEL3* および *MEL4* 遺伝子が根の重力屈性において冗長的に機能することが示された。つぎに、これらの変異体背景における PIN タンパク質の局在解析を行ったところ、*mab4 mel1 mel2* 三重変異体では PIN1 タンパク質の

細胞膜上での局在量および極性が著しく低下していることが明らかになった。また、*mel1 mel2 mel3 mel4* 四重変異体においても、同様の傾向が見られ、PIN2 タンパク質の極性および細胞膜上での存在量の著しい低下が観察された (図 2)。これらのことから、*MAB4* 遺伝子群は PIN タンパク質の局在制御を通して器官形成や根の重力屈性過程におけるオーキシン極性輸送に関与していることが分かった。

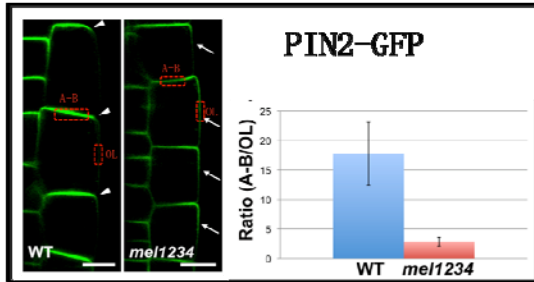


図 2 : *mel1 mel2 mel3 mel4* 四重変異体における PIN2-GFP の局在異常。細胞膜上の GFP シグナル強度の比較 (頂端面 VS 側方面)。

(2) 薬理学的手法を用いた *MAB4* 遺伝子群の機能解析

MAB4 遺伝子群の多重機能欠失変異体において、PIN1 および PIN2 タンパク質の輸送経路を薬理学的手法により解析した。まず、エンドソームから液胞への輸送および細胞膜へのリサイクリングを阻害する brefeldin A (BFA) を使用した。野生型の植物体において、PIN タンパク質の局在は BFA 投与によって BFA コンパートメントに移行する。一方、*mel1 mel2 mel3 mel4* 四重変異体においても、PIN タンパク質は野生型同様 BFA コンパートメントに局在した。さらに、BFA を洗い流すと、PIN タンパク質は正常に細胞膜へとリサイクリングされた。さらに、エンドソームから液胞への輸送を阻害する wortmannin を投与した場合も、*mel1 mel2 mel3 mel4* 四重変異体では野生型同様の PIN タンパク質の局在の阻害剤応答が確認された。以上のことから、*mel1 mel2 mel3 mel4* 四重変異体において PIN タンパク質は野生型同様、エンドソームから液胞への輸送および細胞膜へのリサイクリングが正常に機能していることが示された。つぎに、細胞膜からエンドソームへの内部移行を阻害する A23 を投与した。野生型に投与すると、PIN タンパク質は細胞膜からの内部移行が阻害され細胞膜上に局在しつづける。しかし、*mel1 mel2 mel3 mel4* 四重変異体に A23 を投与した場合、PIN タンパク質は細胞膜からエンドソームへと内部移行し、野生型と異なる応答を見せた (図 3 A, B)。また、膜タンパク質の内部移行を阻害する他の薬剤

を投与した場合も、野生型に比べて *mel1 mel2 mel3 mel4* 四重変異体は阻害剤の効果が現れにくかった。このことは、*mel1 mel2 mel3 mel4* 四重変異体において、PIN タンパク質のエンドサイトーシスが野生型に比べてより促進されていることを示している。*mel1 mel2 mel3 mel4* 四重変異体のこれらの異常が PIN タンパク質に特異的であるかを調べるため、細胞膜全面に局在する LTI6a というタンパク質について、同様の薬理的解析を行ったところ、すべての薬剤に対して *mel1 mel2 mel3 mel4* 四重変異体は野生型同様の効果を示した (図 3 C, D)。以上のことから、*MAB4* および MEL タンパク質には PIN タンパク質特異的に細胞膜からの内部移行を阻害する機能があることが示唆された (図 4)。

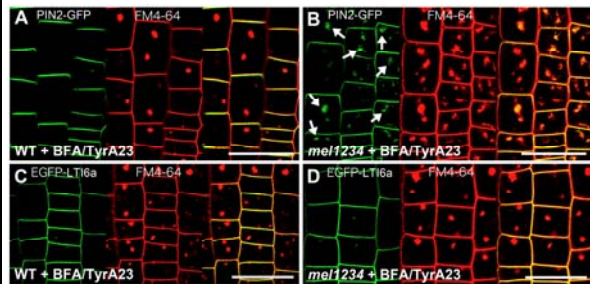


図 3 : *mel1 mel2 mel3 mel4* 四重変異体における PIN2-GFP および EGFP-LTI6a の内部移行。

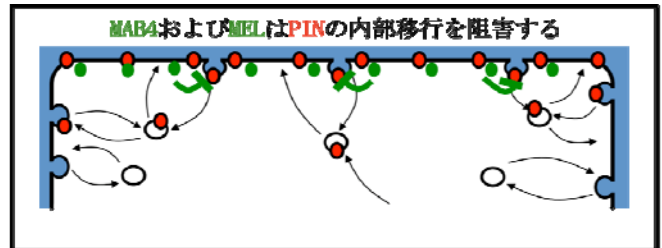


図 4 : *MAB4* および MEL タンパク質の機能モデル

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 1 件)

1) Ander, S., Nielsen, M., Keicher, J., Stierhof, Y.D., Furutani, M., Tasaka, M., Skriver, K. and Jürgens, G. 「Membrane association of the *Arabidopsis* ARF exchange factor GNOM involves interaction of conserved domains.」『*Plant Cell*』 20, 142-151, 2008, 査読有

〔学会発表〕(計8件)

1) 古谷将彦、吉田周平、阪本展仁、田坂昌生「NPH3様タンパク質MAB4およびMELはPINタンパク質の局在を制御する」『第51回日本植物生理学会年会』2010年3月、熊本

2) Furutani, M., Yoshida, S., and Tasaka, M. 「The *MAB4/ENP* family genes involved in auxin-regulated morphology」『Society of Developmental Biology 68th』, July 2009, San Francisco, CA, USA

3) Furutani, M., Yoshida, S., and Tasaka, M. 「The *MAB4/ENP* family genes involved in auxin-regulated morphology」『20th International Conference on Arabidopsis Research』, June 2009, Edinburgh, UK

4) Furutani, M., Yoshida, S., and Tasaka, M. 「The *MAB4/ENP* family genes involved in auxin-regulated morphology」『Auxins and Cytokinins in Plant Development』, June 2009, Praha, Czech Republic

5) 古谷将彦、田坂昌生「オーキシンを介した器官形成機構」『第50回日本植物生理学会年会』2009年3月、名古屋

6) Furutani, M. and Tasaka, M. 「Functional analyses of Arabidopsis *MAB4/ENP* involved in polar auxin transport」『AUXIN2008』, Oct 2008, Marrakech, Morocco

7) Furutani, M. and Tasaka, M. 「Functional analyses of Arabidopsis *MAB4/ENP* involved in polar auxin transport」『19th

International Conference on Arabidopsis Research』, July 2008, Montreal, Canada

8) Furutani, M. and Tasaka, M. 「Functional analyses of Arabidopsis *MAB4/ENP* involved in polar auxin transport」『International Congress of Genetics』, July 2008, Berlin, Germany

〔その他〕

ホームページ等

http://bsw3.aist-nara.ac.jp/keihatsu/Tasaka_Lab/TOP.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古谷 将彦 (FURUTANI MASAHIKO)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教
研究者番号：10432593

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：