

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22370018

研究課題名(和文)核-細胞質間輸送系を介したオーキシン応答の制御機構

研究課題名(英文)Regulatory mechanisms of the auxin response mediated by nuclear-cytoplasmic transport systems

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,700,000円、(間接経費) 3,210,000円

研究成果の概要(和文)：オーキシンは植物の成長発生にとって重要な植物ホルモンの一つである。オーキシン応答は、その生体内分布の調節と遺伝子発現制御に基づくとされているが、その機構の全貌は不明である。これまでシロイヌナズナの側根欠失変異体を用いた遺伝学的解析から、側根形成のオーキシン応答に核-細胞質間輸送系で働くHASTY/exportin-5タンパク質が関わるが見出された。本研究は、核-細胞質間輸送系を介したオーキシン応答の制御機構を明らかにすることを目的として、HASTYや関連因子の解析を行ない、側根形成におけるオーキシン応答制御に特定のマイクロRNAの生合成や核-細胞質間輸送系が深く関わることを強く示唆した。

研究成果の概要(英文)：Auxin is one of the important hormones for growth and development in plants. In general, auxin-mediated growth and developmental processes are regulated by auxin synthesis, auxin transport and auxin-dependent gene expression. However, the mechanisms of auxin responses still remain unknown. Genetic analyses using Arabidopsis thaliana mutants defective in lateral root formation have shown that HASTY/exportin-5, a component of the nuclear pore complex, is involved in auxin-mediated lateral root formation. In this project, we found that both biosynthesis of microRNAs and nuclear-cytoplasmic transport are necessary for the regulation of SLR/IAA14-ARF7/19 module-dependent auxin response in lateral root formation.

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：植物ホルモン 遺伝子発現 核-細胞質間輸送 シロイヌナズナ マイクロRNA 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、植物のさまざまな成長・発生段階で重要な役割を果たす。これまでシロイヌナズナにおける分子遺伝学的研究から、オーキシン応答に関わる多くの因子が発見された。それらは、(1) オーキシン受容体 TIR1/AFBs を含む SCF^{TIR1/AFBs} 複合体によるタンパク質の分解系、(2) SCF^{TIR1/AFBs} 複合体により分解制御を受けることで、オーキシン応答性遺伝子の発現を調節する Aux/IAAs リプレッサータンパク質およびオーキシン応答転写因子 AUXIN RESPONSE FACTORS (ARFs)、(3) オーキシンの生体内分布を制御するオーキシン極性輸送体タンパク質 (AUX1, PINs)、などである。これらの研究から一般的なオーキシン応答として、輸送体タンパク質の働きにより細胞内のオーキシン濃度が上昇すると、ARF の活性抑制に働く Aux/IAA タンパク質が、SCF^{TIR1/AFBs} 複合体を介して分解され、その結果、ARF の転写活性化能により、オーキシン応答性遺伝子群の発現が誘導される、というモデルが広く受け入れられていた (Vanneste & Friml 2009, *Cell*)。研究代表者らは側根形成の分子機構を明らかにする過程で、上記 (2) の因子に対応する Aux/IAA タンパク質 IAA14 の機能獲得変異体 *solitary-root (slr)* とオーキシン応答転写調節因子 ARF7, ARF19 の機能欠損変異体 (*arf7 arf19*) で側根形成能が顕著に阻害されることを見出し、側根形成開始にはオーキシンシグナルによる SOLITARY-ROOT (SLR) /IAA14 の分解を介した ARF7, 19 の活性化による標的遺伝子 (*LBD16/ASL18, LBD29/ASL16* など) の発現制御が重要であることを明らかにした (図 1、2) (Fukaki *et al.* 2002, *Plant J.*; Fukaki *et al.* 2005, *Plant J.*; Okushima *et al.* 2007, *Plant Cell*)。

この実験系は、一般的なオーキシン応答モデルで側根形成をよく説明できることから、植物発生を支えるオーキシン応答の良いモデル系の一つと考えられる。

そこで研究代表者らは、このオーキシン応答モデルに関わる新規因子を同定するため、*slr* 変異体のサプレッサー変異体 *suppressor of slr 1 (ssl1)* を単離した。*ssl1* は単一劣性変異によって、*slr* 変異体の側根欠失表現型を部分的に回復させる (図 3)。マップベースクローニングの結果、*ssl1* 変異体において、核膜孔複合体因子として核-細胞質間輸送に関わる HASTY (HST) /exportin-5 にミスセンス変異を確認した。既知の *hst* 変異体アリルも *slr* の側根表現型を部分的に回復させたことから、*ssl1* の原因遺伝子が HST であることが示された。申請者らによるこの発見と、HST/exportin-5 が遺伝子発現制御に関わるマイクロ RNA (miRNA) の蓄積に必要である

知見 (Park *et al.* 2005, *PNAS*) から、側根形成におけるオーキシン応答に、低分子 RNA を標的とする核-細胞質間輸送系に関わる可能性が新たに強く示唆された。

2. 研究の目的

本研究は核-細胞質間輸送系を介したオーキシン応答の制御機構を明らかにすることを目的として、シロイヌナズナの側根形成におけるオーキシン応答をモデルとして、HST/exportin-5 および低分子 RNA の機能に焦点を当てた分子遺伝学的・細胞生物学的研究を行う。そして、これらの研究を基軸として、核-細胞質間輸送系を介した新たなオーキシン応答モデルを提唱することを目指す。

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、図 1 に示すオーキシン応答における HST の機能解析、HST の標的と考えられる低分子 RNA 因子の同定、およびオーキシン応答における他の核膜孔複合体因子および低分子 RNA 関連因子の機能解析などを行なった。方法の詳細は、研究成果に合わせて記載した。

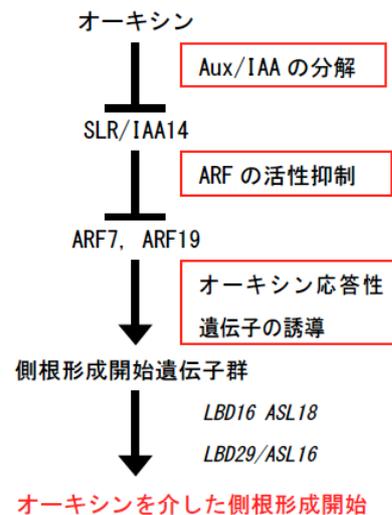


図 1. シロイヌナズナ側根形成開始におけるオーキシン応答

4. 研究成果

(1) *slr* 変異体の側根欠失表現型を抑圧する *ssl1/hst* 変異体の解析 (図 2)

ssl1 slr 二重変異体の側根形成が既知のオーキシンを介した側根形成開始モデル、特に ARF7, ARF19 を介したオーキシン応答に依存しているかどうかを調べるために、*ssl1 slr* において ARF7, ARF19 を欠損させた *ssl1 slr nph4-1 arf19-1 (ssl1 slr arf7 arf19)* 四重変異体を作出したところ、*ssl1 slr arf7 arf19* 四重変異体で側根や不定根は全く形成されなかった。この結果から、*ssl1 slr* で見られる側根

形成能の部分的回復は ARF7、ARF19 の機能に依存していることが明らかになった。



図 2. シロイヌナズナ野生型、*slr* 変異体、*slr ssl1/hst* 二重変異体。 *slr ssl1/hst* 二重変異体では側根と不定根が形成されることから、SSL1/HST は *slr* の側根表現型 (ARF7, 19 の活性抑制) に必要である。

(2) *slr* 変異体の側根欠失表現型におけるマイクロ RNA 合成関連因子の機能

これまでの解析から、*HST* 遺伝子の欠損変異体では、複数種のマイクロ RNA の蓄積が低下することが報告されている。そこで、*ssl1/hst* 変異による *slr* の側根形成能回復がマイクロ RNA の生合成・蓄積に依存するかどうかを調べるために、別のマイクロ RNA 生合成関連遺伝子である、*DICER-LIKE1* (*DCL1*)、*HYPONASTIC LEAVES1* (*HYL1*)、*SERATE* (*SE*) の変異体と *slr* との二重変異体を作成し、根系の表現型を解析した。その結果、マイクロ RNA 合成に関わる *DCL1*、*HYL1*、*SE* などの変異によっても *slr* 変異体 (*slr/+*ヘテロ接合体) の側根欠失表現型が部分的に抑圧されることが判明した。これらの結果から、*DCL1*、*HYL1*、*SE*、および *HST* を介して合成・蓄積されたマイクロ RNA が、*SLR/IAA14* による *ARF7/19* の活性抑制に必要なことが遺伝的に示された。

(3) *slr* および *ssl1/hst slr* 変異体を用いたマイクロアレイ解析

野生型、*slr* 変異体、*ssl1 slr* 二重変異体、および *ssl1/hst slr* 単独変異体の根から抽出した mRNA を用いてマイクロアレイ解析を行い、*ssl1/hst* 変異によって発現量が変動するマイクロ RNA や、それらの標的遺伝子を複数同定した。特に、*ssl1/hst* 変異によって発現量が変動するマイクロ RNA のうち、*miR319* とその標的遺伝子である TCP 転写因子ファミリーのメンバー (*TCP2, 4, 24*) が、*ssl1/hst* 変異による *slr*

変異体の側根欠失表現型の抑圧に関与する可能性が示唆された。

(4) *slr* 変異体の側根欠失表現型における HST 以外の核膜孔複合体因子の役割

(2) の解析から、*DCL1*、*HYL1*、*SE* を介して合成され、*HST* を介して核から細胞質に輸送・蓄積されたマイクロ RNA が、*SLR/IAA14* による *ARF7/19* の活性抑制に必要なことが遺伝的に明らかとなった。そこで、*slr* 変異体の側根欠失表現型に対する、*HST* 以外の核膜孔複合体因子の役割について検討した。核膜孔複合体因子 *AtTPR* の変異を *slr* 変異体に導入したところ、*slr* 変異体 (*slr/+*ヘテロ接合体) の表現型が部分的に抑圧された。この結果から、核膜孔複合体を構成する *AtTPR* も、*SLR/IAA14* による *ARF7/19* の活性抑制に必要なことが明らかとなった。

(5) 研究のまとめと今後の展望

本研究により側根形成におけるオーキシン応答に、低分子 RNA を標的とする核-細胞質間輸送系が関与することが遺伝的に示された (図 3)。また、*HST* を介して核から細胞質に輸送・蓄積されるマイクロ RNA として、*miR319* とその標的遺伝子である TCP 転写因子ファミリーが側根形成を制御するオーキシン応答に関与する可能性が示唆された。これまで側根形成における *TCP* 遺伝子群の関与はほとんど研究されていなかったことから、今後、これらの遺伝子群についてさらなる研究が必要であろう。

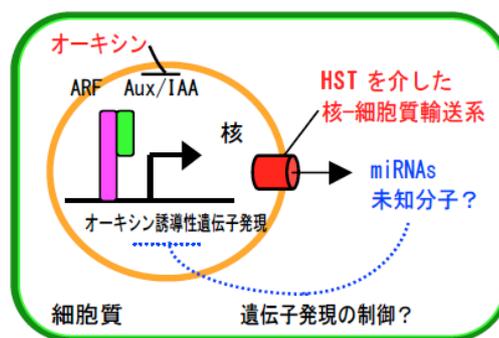


図 3. HST を介した核-細胞質間輸送によるオーキシン応答の制御モデル (植物細胞を模式的に示す)

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 8 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. (査読有)
Plant Cell Physiol. 54, 406-417.
- 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)

[学会発表] (計 17 件)

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 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 (仙台、2011 年 3 月 20-22 日) (口頭発表)
- 7) 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空間特異的なオーキシン応答の制御. 第 52 回日本植物生理学会年会 (仙台、2011 年 3 月 20-22 日) (口頭発表)
- 8) 徳永綾子, 郷達明, 三村徹郎, 田坂昌生, 深城英弘. シロイヌナズナ側根欠失変異体 *slr* のサプレッサー変異体 *ssl1/hasty* の解析. 第 52 回日本植物生理学会年会 (仙台、2011 年 3 月 20-22 日) (口頭発表)
- 9) 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. 第 52 回日本植物生理学会年会 (仙台、2011 年 3 月 20-22 日) (口頭発表)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 徳永綾子, 郷達明, 三村徹郎, 田坂昌生, 深城英弘. シロイヌナズナ側根欠失変異体 *slr* のサプレッサー変異体 *ssl1/hasty* の解析. 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)
- 14) 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)
- 15) 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)

〔図書〕 (計 3 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)

〔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>

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