

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580140

研究課題名(和文)植物の栄養繁殖におけるオーキシン機能メカニズムの解析

研究課題名(英文)Roles of auxin in the vegetative propagation of land plants

研究代表者

石崎 公庸(Ishizaki, Kimitsune)

神戸大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00452293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：栄養繁殖は、交配を必要とせず栄養器官の一部が個体として再生する無性生殖の1様式である。本研究では、単純な発生制御メカニズムを持ち栄養繁殖の仕組みを有する苔類ゼニゴケをモデルとし、栄養繁殖プロセスにおけるオーキシン機能メカニズムを解析した。その結果、基部陸上植物ゼニゴケが、被子植物で明らかにされているオーキシンのシグナル伝達機構をもつことを明らかになった。さらに栄養繁殖プロセスで、オーキシン生合成および応答が顕著に増大し、無性芽の発生のみならず休眠においても重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Vegetative propagation is a form of asexual reproduction in plants, in which new individuals with functional meristems arise without fertilization and develop directly from vegetative tissues, such as leaves, stems, and roots. The liverwort, *Marchantia polymorpha* produces gemmae on their gametophytes as a means of vegetative propagation. Each gemma is originated from a single epidermal cell at the bottom of the gemma-cup, developed into a mature gemma with two meristems at symmetrical position. In this study, we focused on auxin in the process of vegetative propagation. We demonstrated that machineries of auxin signaling and biosynthesis in *M. polymorpha* was more or less the same as that in angiosperms. The auxin biosynthesis and responses was significantly up-regulated in the base of gemma-cup. Molecular genetic studies indicated the critical role of auxin in the both development and dormancy of gemma in *M. polymorpha*.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：オーキシン 栄養繁殖 進化 コケ植物 形態形成 陸上植物

1. 研究開始当初の背景

植物には種子や胚を経由せず栄養器官から親個体のクローン個体を発生する栄養繁殖という繁殖様式を有するものが多い。栄養繁殖では、栄養器官(根・茎・葉)の一部である分化した細胞から、新たな個体を形成する分裂組織が作られる。例えば、肥大化した塊茎の一部から芽を形成するジャガイモや、葉の付け根に球状となった芽(ムカゴ)が形成されるヤマイモなどの例が挙げられる。栄養繁殖は交配を経由しないので、移動する能力を持たない植物にとって、交配が困難な環境下でも遺伝的に同一(クローン)な個体を安定かつ迅速に繁殖できる点で有利であり、また農業や園芸の分野でも重要な繁殖様式である。

最新の分子系統解析では、陸上植物の中で最も単純な体制をもつコケ植物(苔類、蘚類、ツノゴケ類)の中でも、苔類を最初に分岐した陸上植物とする説が支持されている。苔類のモデルであるゼニゴケは、アグロバクテリウムを介した高頻度の形質転換系や相同組換えに基づくジーンターゲットング技術など、近年分子遺伝学のリソースが急速に整備されてきた。

ゼニゴケは、交配による有性生殖の他に、栄養成長の本体である葉状体上に杯状体という器官を形成し、その中に数十個もの無性芽という栄養繁殖器官を形成することで、栄養繁殖する。無性芽は、杯状体の底部における表皮細胞の1細胞が無性芽始原細胞となり不均等分裂を行うことから、その発生が始まる。無性芽始原細胞から形成された頂端細胞はさらに分裂を繰り返し、両端にメリステムを持つ無性芽となる。杯状体1つあたり数十個の無性芽が形成され、雨や物理的な刺激で周囲に散布される。ゼニゴケは、この無性芽による栄養繁殖システムにより厳しい環境下であっても群落としては巧みに維持され、かつ旺盛な繁殖能力をもつ。

・無性芽の発生とオーキシン

オーキシンは、植物の発生と成長を制御する主要な植物ホルモンである。オーキシン信号伝達の分子機構については、オーキシン受容体 TIR1/AFB がオーキシンを介して転写抑制因子 AUX/IAA と結合し、AUX/IAA をユビキチン化して分解を促進することで転写調節因子 ARF の機能を制御するモデルが示されている。ゼニゴケ全ゲノム配列解析プロジェクトの進展により、ゼニゴケは極めて冗長性の低い基本的なオーキシンの制御系を持つことが明らかになった。予備的な検討の結果、ゼニゴケの形態形成におけるオーキシンの機能を解析する過程で、i) 杯状体の基底部分で高レベルのオーキシン応答が確認されること。ii) 線照射により単離したオーキシン低感受性変異体の多くで、無性芽の発生に異常が確認されることを見出した。さらに近年 20 これらのことから、杯状体基底部分におけるオーキシンの蓄積と、それに伴うオー

キシシグナル伝達系の活性化が無性芽発生プロセスの鍵となることが示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究では、栄養繁殖プロセスにおけるオーキシンの機能メカニズムに焦点を絞り、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

特に基部植物におけるオーキシンを介した転写制御機構について解析し、無性芽発生プロセスにおけるオーキシンを介した転写制御の役割に焦点を当てた。またオーキシン生合成経路に関係するゼニゴケ遺伝子を同定し、その発現パターンや機能についても情報を得た。以上を統合して、様々な観点からゼニゴケにおける栄養繁殖プロセスにおけるオーキシン制御の仕組みと機能について解析した。

3. 研究の方法

基部陸上植物ゼニゴケの栄養繁殖器官-無性芽の発生プロセスにおけるオーキシン制御系の役割と機能メカニズムについて、分子遺伝学の手法を駆使して解析した。

ゼニゴケにおけるオーキシンのシグナル伝達系についての配列情報および機能情報を、分子遺伝学および生化学的な実験結果と併せた考察。

AUX/IAA のオゾンログである *MpIAA* の機能改変型を発現する形質転換体の作出と解析。

レポーター遺伝子を用いた *MpARF1* の発現パターン解析および機能欠失型変異体 *Mparf1* の表現型解析。

被子植物において主要なオーキシン生合成経路であるインドールピルビン酸 (IPA) 経路に関わる遺伝子の探索と機能解析。

～④の解析から栄養繁殖プロセスにおけるオーキシン機能モデルを考察する。

4. 研究成果

2015年1月の時点におけるゼニゴケゲノムデータベースをもちいて、オーキシン受容体 TIR1/AFB、転写抑制因子 AUX/IAA、転写調節因子 ARF をコードするゼニゴケ遺伝子を探索した。その結果、ゼニゴケは 1 分子種の TIR1(MpTIR1)、AUX/IAA(MpIAA)、と 3 種の ARF(MpARF1, MpARF2, MpARF3)しか持たないシンプルなシグナル伝達系をもつことが明らかとなった。

さらに BY-2 細胞の一過的発現系をもちいて、MpARF1 が転写活性化因子、MpARF2 は転写抑制因子であることが示唆された。酵母 2 ハイブリッド法および BiFC 法をもちいて MpIAA が MpIAA 自身とホモダイマーを形成し、全ての MpARFs とヘテロダイマーを形成することが明らかとなった。このことから、ゼニゴケにおいても AUX/IAA-ARF 相互作用を介したオーキシン依存的な転写制御機構が保存されていることが示唆された。

また MpTIR1 と MpIAA がオーキシン信号伝達における共受容体として機能するか調べるため、MpTIR1-3xFLAG 発現株と精製 MpIAA タンパク質を用いたプルダウンアッセイを行った。その結果、MpTIR1 がオーキシン依存的に MpIAA と相互作用することが明らかになった。また MpIAA の推定分解調節領域であるドメイン II に変異を入れると、オーキシンの有無に関わらず MpTIR1 との相互作用は見られなかった。

以上を総合すると基部陸上植物ゼニゴケにおいても TIR1/AFB と AUX/IAA の相互作用、そして AUX/IAA と ARF の相互作用を介したオーキシン信号伝達機構が保存されていることが示唆された。

AUX/IAA の安定性を高め、オーキシンへの感受性を低下させる塩基置換を導入した *MpIAA-mDII* 遺伝子をデキサメタゾン(DEX)処理依存的に機能させる発現コンストラクト *MpIAA-mDII-GR* をゼニゴケに導入した。作出された *MpIAA-mDII-GR* 株は、DEX 処理依存的にオーキシン低感受性となった。

杯状体および無性芽発生プロセスで、*MpIAA-mDII-GR* 株に DEX 処理を行ったところ、杯状体形成および無性芽発生に、顕著な異常が確認された。これらの結果より、オーキシンを介した転写制御が、ゼニゴケの栄養繁殖器官の発生制御に重要な役割をもつことが明らかとなった。

相同組換えによるジーンターゲティング法により *MpARF1* の機能欠損株、*Mparf1-KO* を作出したところ、オーキシン低感受性を示し、葉状体、無性芽の形状に異常が確認された。*MpARF1* の C 末端に GUS もしくは Citrine を融合した遺伝子を *Mparf1-KO* に導入した個体は、表現型の相補が見られ、杯状体底部および発生初期の無性芽で顕著な発現が確認された。さらに *Mparf1-KO* の無性芽についてより詳細な観察を行ったところ、メリステム内の頂端細胞や粘液細胞が定まっていない、メリステムの位置や細胞の並びの規則性が崩れている、無性芽と杯状体をつなぐ柄細胞の数が野生型よりも多い、といった表現型が見られた。*Mparf1-KO* 変異体では、無性芽の発生初期段階で細胞間で同調的に起こる杯状体底面と垂直な面での細胞分裂が非同調的に起こり、縦分裂面が柄細胞でも形成された。

以上より、*MpARF1* は無性芽発生における細胞分裂パターン形成に関与している可能性が示唆された。

被子植物においてオーキシン生合成の主要な経路と考えられている IPA 経路について、その第一段階である *Tryptophan Amino Transferase of Arabidopsis1(TAA1)* および *YUCCA* の相同遺伝子を、ゼニゴケゲノムデータベースをもちいて探索した。その結果、ゼニゴケのゲノムには、1 分子種(常染色体コ

ピー、Y 染色体には 特異的な反復配列として数十コピー以上の相同配列がある。ただし Y 染色体のコピーはヘテロクロマチン領域にありほとんど機能的ではないことが示唆されている)の *TAA1*、2 分子種の *YUCCA* 遺伝子がコードされていることが明らかとなった。

レポーター遺伝子を用いた解析から、*TAA1* および *YUCCA* とともにメリステムと杯状体の底部で顕著なプロモーター活性を検出した。

TAA1 の機能欠損株を作出したところ、葉状体の成長および器官発生が顕著に抑制された表現型を示した。これらの結果より、オーキシンはゼニゴケ葉状体の成長および器官発生に重要な役割をもつことが明らかとなった。

さらに *TAA1* および *YUCCA* の発現抑制系統では、機能欠損株よりは弱い表現型が観察された。杯状体と無性芽について詳細に観察したところ、杯状体内部で無性芽の発芽が確認された。この結果より、オーキシンは、杯状体内部において無性芽の休眠を促進する働きをもつことが示唆された。

以上の結果より、基部陸上植物ゼニゴケにおいても基本的なオーキシン生合成および信号伝達の仕組みが保存されていること。そしてオーキシンが杯状体底部からの無性芽発生の初期における分裂パターンの制御に重要な役割をもつことが明らかとなった。またオーキシンは、杯状体内部における無性芽の休眠にも関わることが示唆された。

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 17 件)

Elkund, M.D., Ishizaki, K., Flores-Sandoval, E., Kikuchi, S., Takebayashi, Y., Tsukamoto, S., Hirakawa, S., Nonomura, M., Kato, H., Kouno, M., Bhalerao, R.P., Lagercrantz, U., Kasahara, H., Kohchi, T. and Bowman, J.L. Auxin produced by the indole-pyruvic acid pathway regulates development and gemmae dormancy in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell*, in press.

Kato, H., Ishizaki, K., Kouno, M., Shirakawa, M., Bowman, J.L. Nishihama, R. and Kohchi, T. Auxin-mediated transcriptional system with a minimal set of components is critical for morphogenesis through the life cycle in *Marchantia polymorpha*. *PLOS Genet.* in press.

Komatsu, A., Terai, M., Ishizaki, K., Suetsugu, N., Tsuboi, H., Nishihama, R., Yamato, K.T., Wada, M. and Kohchi, T. Phototropin encoded by a single-copy gene mediates chloroplast photorelocation movements in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Physiol.* 166: 411-427. (2014)

Kubota, A., Kita, S., Ishizaki, K., Nishihama,

R., Yamato, K.T. and Kohchi, T. Co-option of a photoperiodic growth phase transition system during land plant evolution. *Nature Communications* 5: 3668. (2014)

石崎公庸、河内孝之、E3 リガーゼが関与する植物の細胞間隙形成、生化学 第 86 巻 第 4 号 : 508-512 (2014)

*Ishizaki, K., *Mizutani, M., Shimamura, M., Masuda, A., Nishihama R. and Kohchi, T. Essential role of the E3 ubiquitin ligase NOPPERABO1 in schizogenous intercellular space formation in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell* 25: 4075-4084. (2013)

*Equal Contribution

Ishizaki, K., Johzuka-Hisatomi, Y., Ishida, S., Iida, S. and Kohchi, T. Homologous recombination-mediated gene targeting in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Scientific Reports* 3: 1532. (2013)

*Kubota, A., *Ishizaki, K., Hosaka, M. and Kohchi, T. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of the liverwort *Marchantia polymorpha* using regenerating thalli. *Biosci. Biotech. Biochem.* 77: 167-172. (2013)

*Equal Contribution

石崎公庸、河内孝之、基部陸上植物の光応答戦略-フィトクロムを介した光形態形成の分子機構、植物科学の最前線第 4 巻 : 37-44 (2013)

*Ishizaki, K., *Nonomura, M., Kato, H., Yamato, K.T. and Kohchi, T. Visualization of auxin-mediated transcriptional activation using a common auxin-responsive reporter system in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *J. Plant Res.* 125: 826-34 (2012).

*Equal Contribution

[学会発表](計 10 件)

Ishizaki K. Vegetative propagation: development of asexual progenies from vegetative tissue, 第 56 回日本植物生理学会年会、2015 年 3 月 16~18 日、東京・東京農業大学

石崎公庸、ゼニゴケから見えてきた栄養繁殖と腋芽発生の共通制御メカニズム、日本植物学会第 78 回大会、2014 年 9 月 12~14 日、東京・明治大学

石崎公庸、コケ植物配偶体における器官発生の分子遺伝学、イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ 2014、2014 年 7 月 11~12 日、東京大学弥生講堂一条ホール

石崎公庸、コケ植物における無性芽の発生と休眠、第 55 回日本植物生理学会年会、2014 年 3 月 18 日、富山・富山大学

河内孝之、加藤大貴、西浜竜一、大和勝幸、石崎公庸、ゼニゴケ研究地平への投射-オーキシン信号伝達を例に、第 55 回日本植物生理学会年会、2014 年 3 月 19 日、富山・富山大学

加藤大貴、神埜勝、白川一、石崎公庸、

西浜竜一、河内孝之、転写因子の相互作用によるゼニゴケのオーキシン信号伝達ネットワーク、第 55 回日本植物生理学会年会、2014 年 3 月 20 日、富山・富山大学

石崎公庸、加藤大貴、河内孝之、ゼニゴケから探るオーキシン応答の基本メカニズムとその進化、第 54 回日本植物生理学会年会、2013 年 3 月 21~23 日、岡山・岡山大学

Ishizaki K., Mizutani M, Masuda A, Shimamura M, Nishihama R and Kohchi T. Forward genetics for gametophyte development in *Marchantia polymorpha*. International Marchantia Workshop 2012, 2012 年 11 月 25~17 日、熊本・ホテルグリーンピア南阿蘇

桐田啓如、武田真由子、石崎公庸、河内孝之、ゼニゴケの ALTERED MERISTEM PROGRAM1(AMP1)変異体はオーキシン低感受性を示す、日本植物学会第 76 回大会、2012 年 9 月 15~17 日、姫路・兵庫県立大学

石崎公庸、河内孝之、ゼニゴケで探るコケ植物の光応答と発生制御、日本植物学会第 76 回大会、2012 年 9 月 15~17 日、姫路・兵庫県立大学

[図書](計 0 件)

[その他]

神戸大学大学院理学研究科-石崎研究室 HP
<http://www.research.kobe-u.ac.jp/fsci-i-shizaki/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石崎公庸 (ISHIZAKI KIMITSUNE)
神戸大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号 : 00452293

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

河内孝之 (KOHCHI TAKAYUKI)
京都大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号 : 40202056

西浜竜一 (NISHIHAMA RYUICHI)
京都大学・大学院生命科学研究科・講師
研究者番号 : 70283455

大和勝幸 (YAMATO T. KATSUYUKI)
近畿大学・生物理工学部・准教授
研究者番号 : 50293915