

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657027

研究課題名(和文) オーキシンの不均等分配を介さない光屈性の分子機構の解明

研究課題名(英文) Study of molecular mechanisms underlying phototropic responses independent of auxin lateral distribution

研究代表者

芳賀 健 (Haga, Ken)

新潟大学・自然科学研究科・研究員

研究者番号：50382031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：植物は光環境に応答して、茎などは光の方向に、根は光から離れるようにして成長する。これらの反応は光屈性と呼ばれ、古くから研究されてきた。植物体内に含まれる植物ホルモンの一つであるオーキシンは成長を促進する作用を持つが、光によってオーキシン分布が変化することで屈曲が誘導されると考えられてきた。本研究は、根の光屈性について解析を行うことで、これまで支持されてきたオーキシンの分布調節を介したメカニズムとは異なる機構が存在することを浮き彫りにした。光によって、オーキシン分布を介さずにオーキシン反応に関する制御因子が直接調節される可能性が示唆され、新たなモデル構築に貢献できる研究成果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Plants are growing to or away from light direction to adapt to their light environments. The responses, so-called phototropism, have been well-studied for a long time. Auxin, one of plant hormones, is known to stimulate plant growth and thought to be involved in phototropism by changing its endogenous distribution in responses to light irradiation. The present study analyzed phototropic responses of Arabidopsis seedling roots, and demonstrated existence of molecular mechanisms underlying phototropic responses independent of auxin asymmetrical lateral distribution. Our investigations strongly suggested that light stimulation directly controls regulatory components involved in auxin-mediated responses, such as auxin receptors and/or auxin responsive transcription factors. The present results contribute to establishment of a new model responsible for phototropic responses.

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：光屈性 コロドニー・ウエント説 オーキシン PIN シロイヌナズナ 根

1. 研究開始当初の背景

(1) モデル植物シロイヌナズナを用いた分子遺伝学的解析は、光屈性・重力屈性刺激によってオーキシン不均等勾配が軸器官に形成されること、オーキシン勾配形成及び重力屈性にはオーキシン輸送体の機能が重要であること、オーキシン活性化転写因子が偏差成長誘導に働くことを明らかにし、コロドニー・ウエント説を強く支持している。ただし、光屈性におけるオーキシン輸送体機能の重要性については遺伝学的証明に至っていないのが現状である。

(2) 我々研究グループは光屈性の分子機構の解析により以下の結果を得た。第一に、オーキシン輸送阻害剤を用いた薬理学的研究によって、オーキシン輸送は重力屈性に重要であっても光屈性には重要でないことを明らかにした (Nagashima et al. [2008] *Plant Cell Physiol.* 49, 1250-1255; Tsuda et al. [2011] *J. Biol. Chem.* 286, 2354-2364)。第二に、シロイヌナズナ突然変異体を用いた分子遺伝学的解析において、オーキシン輸送体は光屈性には重要な働きをしないことが示唆された (Haga and Sakai [2012] *Plant Physiol.* 160: 763-776)。第三に、根の光屈性におけるオーキシン不均等勾配は予想とは全く正反対の分布パターンを示した。これは光屈性に伴う新たな重力刺激に応答した二次的なオーキシン不均等分布であると考えられた。以上の研究結果より、光屈性にはオーキシン不均等分布に依存しない分子機構が存在するという結論に至った。そこで、このメカニズムを明らかにすべく本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究はシロイヌナズナの根の光屈性に焦点を絞り、光屈性における、1) オーキシン極性輸送、2) オーキシン活性化転写因子、3) その他の分子機構、の関与を研究期間内に明らかにし、オーキシン不均等分布に依存しない偏差成長機構の詳細を解明する。

3. 研究の方法

(1) 分子遺伝学的解析。シロイヌナズナ (Columbia) を寒天培地に播種し、4 で 3 日間培養した後、赤色光を照射することによって発芽を誘導し、暗黒下で二日間培養した芽生えを材料に用いた。光屈性は、青色光を片側から $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強さで照射することによって誘導した。屈曲角度の測定は、Haga and Sakai ([2012] *Plant Physiol.* 160: 763-776) と同じ方法で行った。

本研究には、オーキシン輸送体 PIN-Formed (PIN) の突然変異体 (Haga and Sakai [2012] *Plant Physiol.* 160: 763-776)、AGCVIII カイネースの突然変異体 (Haga and Sakai, submitted; Willige et al. [2013] *Plant Cell* 25: 1674-1688)、オーキシンシグナル伝達に係わる AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) 転写

因子群の突然変異体 (*arf1-3*, *arf2-1*, *arf6-1*, *arf7* *arf19*, *arf8-1*)、ARF 転写因子の負の制御因子である AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE (Aux/IAA) ファミリーの突然変異体 (*axr1-3*, *axr2-1*, *axr5-1*, *msg2-1*)、オーキシン受容体である TRANSPORT INHIBITOR RESISTANT / AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEIN (TIR/AFB) の突然変異体 (*tir1* *afb2*, *afb4* *afb5*) を用いた。突然変異体は全て Columbia 背景のものを用いた。

(2) オーキシンレポーター遺伝子を用いた解析。オーキシンレポーター遺伝子である *DR5-GFP* および *DII-VENUS* を導入した野生型シロイヌナズナ (Columbia) を用いて、青色光照射後の蛍光シグナルの変化を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察・定量した。観察及び定量方法は、Haga and Sakai ([2012] *Plant Physiol.* 160: 763-776) と同じ方法で行った。

4. 研究成果

(1) 青色光によるオーキシン分布の変化。コロドニー・ウエント説に従うと、根の光屈性の場合、青色光照射によって照射側よりも影側に多く内生オーキシンが蓄積することが予想された。しかし、*DR5-GFP* オーキシンレポーター遺伝子を用いた解析では、予想とは異なり照射側でオーキシン量が多く蓄積することが示された (図 1)。

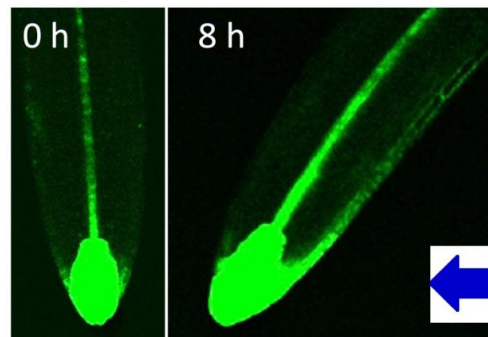


図1. *DR5-GFP*オーキシンレポーター遺伝子を用いたオーキシン量の測定。青色光照射後8時間目の根の写真。矢印は青色光照射方向を示す(Haga and Sakai, unpublished)。

別なオーキシンレポーター遺伝子 (*DII-VENUS*) を用いて、青色光照射後、経時的に蛍光シグナルを定量すると、やはり照射側にオーキシンが蓄積することを示すパターンが得られた。したがって、これまで考えられてきた仮説では根の光屈性は説明できず、新たなメカニズムが関与すると考えられた。また、今回観測された青色光によるオーキシン分布の変化は、青色光によって誘導された光屈性によって生じた重力刺激によって二次的に生まれたものである可能性が高い。

(2) 根の光屈性におけるオーキシン輸送阻害剤の影響。これまで光屈性におけるオーキシン分布調節には、オーキシン輸送体である PIN タンパクが主要な役割を担っていると考えられている。根の光屈性におけるオーキシン輸送の関与を調べるために、オーキシン輸送阻害剤である NAPHTHYL PHTHARAMIC ACID (NPA) の影響を調べた(図2)。すると、予想に反して NPA によって光屈性が阻害されることはなく、逆に NPA の濃度が高くなるほどよく曲がるようになった。この結果は、根の光屈性にはオーキシン輸送はあまり関係しないということを示している。

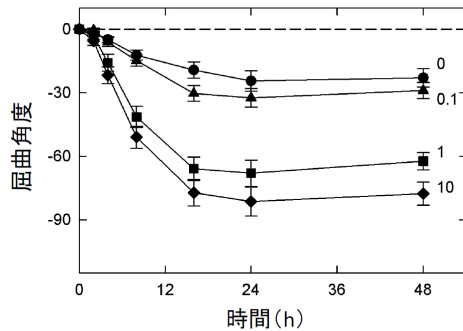


図2. オーキシン輸送阻害剤NPAの影響。NPA処理には、0, 0.1, 1, 10 μMの濃度を使用した(Haga and Sakai, unpublished)。

(3) オーキシン輸送体 PIN タンパクの関与。主要なオーキシン輸送体である PIN ファミリーは、地上部の光屈性において、オーキシン勾配を生み出すために重要な役割を担っていると考えられている (Friml et al. [2003] Nature 415: 806-809; Ding et al. [2011] Nat. Cell Biol. 13: 447-452)。根の光屈性における PIN タンパクの働きを調べるために、シロイヌナズナに存在する 8 つの PIN の突然変異体の根の光屈性を解析した(図3)。しかし、どの変異体でも著しく光屈性が弱まることはなかった。

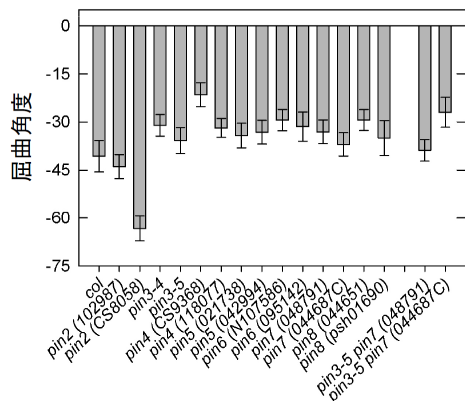


図3. オーキシン輸送体PINの突然変異体の根の光屈性。青色光照射後24時間目の屈曲角度を示す(Haga and Sakai, unpublished)。

また、地上部の光屈性においてオーキシン勾配を誘導するために主要な働きを担う PIN3 や、PIN3 に最も高いホモロジーを示す

PIN7 の二重変異体について解析してみても、ほとんど野生型と同様な反応を示した(図3)。これらの結果も、根の光屈性において PIN オーキシン輸送体は重要な働きをしていないことを示している。一方、*pin2* 突然変異体では根の光屈性が強まっていたが、これは重力応答が *pin2* 変異体で弱まっているので、間接的に光屈性の反応が強まっていると考えられた。

(4) オーキシン輸送体 PIN の調節因子の関与。地上部における光屈性において、PIN タンパクは青色光に反応して局在を変化させることが報告されている(Ding et al. [2011] Nat. Cell Biol. 13: 447-452)。この局在変化には、PINOID (PID) と呼ばれる植物特異的な AGCVIII カイネースに属する遺伝子群が関与すると考えられており、PIN のリン酸化状態をコントロールすることで、PIN の局在を制御し、青色光による PID の発現制御が関与すると考えられている。また、PIN のオーキシン輸送活性を制御する AGCVIII カイネースとして D6 PROTEIN KINASE (D6PK) が報告されており (Zourelidou et al. [2009] Development 136: 627-636)、ごく最近の報告によると、D6PK ファミリーが地上部の光屈性において重要な働きを担っていることが明らかにされた (Willige et al. [2013] Plant Cell 25: 1674-1688)。そこで、これらの AGCVIII カイネースが根の光屈性に関与するかどうか調べるために、*pid* 四重変異体や *d6pk* 二重、三重変異体を用いて解析した。その結果、どの突然変異体でも根の光屈性が弱まることはなかった。したがって、根の光屈性においては、AGCVIII カイネースによる PIN のリン酸化を介した PIN の局在やオーキシン輸送活性のコントロールは重要ではないと考えられる。興味深いことに、PID を過剰発現させた場合、根の光屈性が著しく阻害された。このことは、PID が根の光屈性において負の制御因子として働く可能性を示唆している。PID が PIN 以外のターゲットをリン酸化することによって、根における光屈性のシグナル伝達に関与しているのかもしれない。

(5) オーキシンシグナル伝達因子の関与。これまでの解析により、地上部の光屈性とは異なり、根の光屈性にはオーキシン輸送体を介したオーキシン勾配を必要としない可能性が示唆された。一つの可能性として、根の光屈性の場合、青色光によって直接オーキシンシグナル伝達に係わる因子や受容体が制御されることによって、偏差成長が誘導され屈曲するのかもしれない。その可能性を検証するために、オーキシンシグナル伝達に係わる ARF 転写因子の突然変異体の根の光屈性を調べた。その結果、*arf2-1*, *arf6-1*, *arf8-1* 突然変異体および *arf7 arf19* 二重変異体において、光屈性の反応が弱まっていた。阻害の

程度は大きくなかったが、機能重複性が関係している可能性が考えられる。今後これらの多重変異体を作り解析する必要はあるが、今回の結果によって、オーキシシンシグナル伝達に係わる転写因子が青色光によって直接制御される可能性が示唆された。

次に、オーキシシンシグナル伝達に係わる ARF 転写因子を負に制御する Aux/IAA ファミリーの関与を調べた。これらの変異体は全てドミナントネガティブタイプの変異体であり、地上部の光屈性では著しく反応が阻害されることが報告されている (Tatematsu et al. [2004] 16: 379-393)。根の光屈性の場合、用いたどの変異体においても反応が阻害されることはなく、逆に *axr2-1* 変異体や *axr5-1* 変異体では逆に反応が強まっていた。これらの変異体では地上部の光屈性は著しく阻害されており (Yang et al. [2004] Plant J. 40: 772-782)、偏差成長に必要な ARF7 や ARF19 の発現が抑えられるために正常な屈性反応を示さないと考えられている。しかし、この解釈では今回の結果は説明できない。分解されずに残っている Aux/IAA タンパクが根の光屈性にも働く制御因子を積極的に分解するため、あるいは光屈性に正に働く制御因子を安定化などにより蓄積することによって、根の光屈性を増強しているのかもしれない。

(6) オーキシシン受容体の関与。根の光屈性にオーキシシン受容体である TIR/AFB ファミリーが関与するか調べるために、*tir1 afb2* 二重変異体および *afb4 afb5* 二重変異体の光屈性を解析した。どちらの二重変異体でも根の光屈性が部分的に阻害されており、*afb4 afb5* 二重変異体では野生型に比べ半分以下の反応しか示さなかった。この結果は、根の光屈性に TIR/AFB オーキシシン受容体が関与することを示しており、青色光によってこれらのオーキシシン受容体の活性が直接制御されることにより、その下流の転写因子である ARF ファミリーが調節されるのかもしれない。今後これらの四重変異体を作成して解析する必要があると同時に、今回の研究で浮かび上がった新たな制御機構のメカニズムの妥当性に関して検討する必要がある。

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 7件)

Yamamoto, K., Suzuki, T., Aihara, Y., Haga, K., Sakai, T., and Nagatani, A. (2014) The phototropic response is locally regulated within the topmost light-responsive region of the *Arabidopsis thaliana* seedling. *Plant and Cell Physiology*, 55(3): 497-506. doi: 10.1093/pcp/pct184. 査読有。
Riemann, M., Haga, K., Shimizu, T., Okada,

K., Ando, S., Mochizuki, S., Nishizawa, Y., Yamanouchi, U., Nick, P., Yano, M., Minami, E., Takano, M., Yamane, H., and Iino, M. (2013) Identification of rice *Allene Oxide Cyclase* mutants and the function of jasmonate for defence against *Magnaporthe oryzae*. *The Plant Journal*, 74: 226-238. doi: 10.1111/tpj.12115. 査読有。

Haga, K., and Sakai, T. (2013) Differential roles of auxin efflux carrier PIN proteins in hypocotyl phototropism of etiolated *Arabidopsis* seedlings depend on the direction of light stimulus. *Plant Signaling & Behavior*, e22556. doi: http://dx.doi.org/10.4161/psb.22556. 査読有。

酒井達也, 芳賀 健 (2012) 光屈性におけるオーキシシン輸送制御. *植物の生長調節* 47: 85-92.

http://ci.nii.ac.jp/naid/110009580313. 査読無。

Haga, K., and Sakai, T. (2012) PIN auxin efflux carriers are necessary for pulse-induced but not continuous light-induced phototropism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 160: 763-776. doi: http://dx.doi.org/10.1104/pp.112.202432. 査読有。

Sakai, T., and Haga, K. (2012) Molecular genetic analysis of phototropism in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 53: 1517-1534. doi:10.1093/pcp/pcs111. 査読有。
Sakai, T., Mochizuki, S., Haga, K., Uehara, Y., Suzuki, A., Harada, A., Wada, T., Ishiguro, S., and Okada, K. (2012) The WAVY GROWTH 3 E3 ligase family controls the gravitropic response in *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal*, 70: 303-314. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04870.x 査読有。

[学会発表](計 9件)

芳賀 健, 酒井達也 (2014) シロイヌナズナ胚軸の一次光屈性および二次光屈性におけるD6プロテインカイネースの役割. **第55回日本植物生理学会年会・富山.3月18日**

木村太郎, 芳賀 健, 林 謙一郎, Yunde Zhao, 竹林裕美子, 笠原博幸, 酒井達也 (2014) シロイヌナズナの根の光屈性におけるオーキシシンの機能と作用機序の解析. **第55回日本植物生理学会年会・富山.3月18日**

Haga, K., and Sakai, T. (2013) Involvement of RPT2 in phytochrome-mediated regulation of *Arabidopsis* hypocotyl phototropism. *International Symposium on Plant Photobiology 2013, Edinburgh*. 6月3日

芳賀 健, 酒井達也 (2013) シロイヌナズナ胚軸の一次光屈性および二次光屈性におけるオーキシシン排出輸送体PINの役割. **第54回日本植物生理学会年会・岡山.3月21日**

Sakai, T., and Haga, K. (2013) Phototropism and auxin transport. **第54回日本植物生理学会年会 . 岡山 . 3月21日**

Michael Riemann、芳賀 健、清水 崇史、岡田 憲典、安藤 杉尋、望月 進、西澤 洋子、山内 歌子、Peter Nick、矢野 昌裕、南 栄一、高野 誠、山根 久和、飯野 盛利 (2013) イネのアレンオキシドサイクラゼ変異体の単離と、いもち病菌抵抗性におけるジャスモン酸類の役割。 **第54回日本植物生理学会年会 . 岡山 . 3月23日**

Haga, K., and Sakai, T. (2012) PIN auxin efflux carriers are necessary for pulse-induced but not continuous-light-induced phototropism in Arabidopsis. *AUXIN2012, Hawaii*. **12月9日**

Haga, K., and Sakai, T. (2012) PIN-mediated hypocotyl phototropism in Arabidopsis. *The 1st International Symposium on Plant Environmental Sensing, Nara*. **3月19日**

芳賀 健、酒井達也 (2012) オーキシン排出輸送体PINを介したシロイヌナズナ胚軸の光屈性。 **第53回日本植物生理学会年会 . 京都 . 3月16日**

6 . 研究組織

(1)研究代表者

芳賀 健 (HAGA, Ken)
新潟大学・自然科学研究科・研究員
研究者番号 : 5 0 3 8 2 0 3 1

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

酒井 達也 (SAKAI, Tatsuya)
新潟大学・自然科学系・准教授
研究者番号 : 1 0 3 6 0 5 5 4