

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440134

研究課題名(和文) 光屈性におけるオーキシン転写制御因子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of auxin transcriptional regulators in the phototropic responses

研究代表者

酒井 達也 (Sakai, Tatsuya)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：10360554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物ホルモン・オーキシンの不均等勾配に依存せずに誘導される根の光屈性誘導機構について、オーキシン転写制御因子の機能及びその制御機構について解析した。その結果、転写因子ARF7、転写制御因子 IAA19、及びオーキシン受容体 TIR1 について、根の光屈性への関与を明らかにした。しかしながら、それらの因子の発現量や細胞内局在などについて、光屈性誘導に働く青色光受容体フォトトロピンのシグナル伝達経路下流で調節される可能性は低いことを示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Function of Auxin transcriptional regulators were analyzed in the root phototropic response, which is induced independently of asymmetric auxin distribution. Auxin transcriptional factor ARF7, transcriptional regulator IAA19 and auxin receptor TIR1 were involved in the phototropic response of roots. However, our results suggested that their function are not controlled by the phototropin signaling pathways.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：植物 光環境応答 光屈性 フォットロピン オーキシン 転写制御

1. 研究開始当初の背景

植物の光屈性反応は、光環境刺激にตอบสนองして成長方向を変化させる、環境適応のための個体統御能力である。茎や胚軸を屈曲させて地上部を光源方向に向けるのは光合成に必要な光を十分に受けるため、発芽後に光を避けて重力方向の大地へと根を伸長させるのは乾燥を避け水分や栄養を根から吸収するためと考えられる。高等植物の光屈性は、光刺激の方向性や強さの差という物理的な情報を植物ホルモン・オーキシンという化学物質の濃度勾配に変換し、細胞壁の伸展性を变化させて器官の偏差成長を誘導する反応と考えられている。根においてオーキシンは細胞伸長抑制効果を示し、少なくとも重力屈性誘導に働くことが明らかになっている。光屈性を誘導する青色光の受容体としてフォトロピン (phot) が同定されている。phot は細胞膜内側に局在して、転写制御以外の情報処理によって光屈性誘導のシグナル伝達を行うと考えられている。

我々研究グループは最近、シロイヌナズナ芽生えの光屈性におけるオーキシン不均等勾配形成の役割を解析し、以下の結果を得た。胚軸の光屈性において、パルス光照射によって誘導される一次光屈性には確かにオーキシン輸送体 PIN ファミリーを介したオーキシン不均等分布形成が関与するが、一方で連続光照射による二次光屈性には PIN に依存しない未知の経路が関与した⁴⁾。一方、オーキシン生合成・輸送関連の突然変異体及び阻害剤を用いて根の光屈性を解析すると、重力屈性と比較してオーキシン生合成・輸送活性調節を必要とせず、オーキシン不均等分布形成も観察されなかった (図 1)。他研究グループが最近オーキシン輸送体 PIN2 の根の

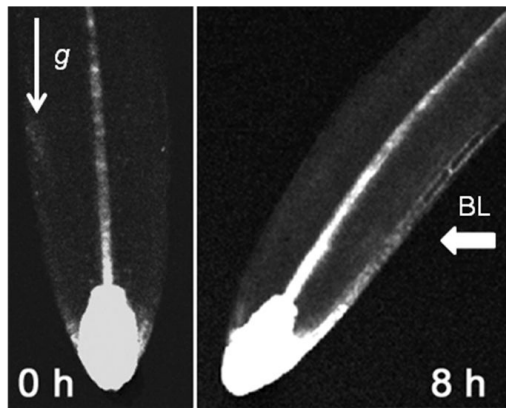


図 1. 根の光屈性におけるオーキシン分布。シロイヌナズナ野生型 (Col) に *DR5rev::GFP* を導入し、GFP 蛍光を観察した。左側は青色光を照射する前の写真。右側は青色光 ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) を 8 時間照射した写真。白色が GFP 蛍光を示す。光照射による陰側のオーキシン蓄積は観察されず、光屈性によって生じた二次的な重力屈性刺激による重力刺激側 (光照射側) でのオーキシン蓄積が観察される。

光屈性への関与を報告したが (Wan et al. [2012] *Plant Cell* 24, 551-565)、再検証が必要と思われた。これらの結果は光屈性にはオーキシン濃度勾配形成依存的な機構と非依存的な機構がそれぞれ存在することを示唆した。

オーキシンは SCF 三量体型ユビキチン E3 リガーゼの F-box サブユニット TIR1/AFB ファミリータンパク質に結合すると、転写因子 ARF ファミリーの転写活性調節を制御する Aux/IAA タンパク質の結合とユビキチン化を誘導する (図 2)。フリーになった ARF 転写因子はホモダイマーもしくは他の ARF や MYB 転写因子とヘテロダイマーを形成し、遺伝子発現制御を行っている¹⁵⁾。光屈性においては、ARF7 がエキスパンシンなど細胞伸長促進に働く遺伝子の誘導を行い、偏差成長が起こると考えられている。

我々はオーキシン受容体及び転写制御因子についてそれぞれの突然変異体を用いて光屈性における機能を解析した。オーキシン受容体様タンパク質 AFB4 は胚軸においては光及び重力屈性両方に重要であるが根では光屈性にのみ必要だった (未発表)。AFB4 はオーキシンではなく、ブラシノステロイドやジベレリンといった他の植物ホルモンにตอบสนองした胚軸伸長に関与するなど、他のオーキシン受容体とは異なる機能を示すことから、大変興味深い結果と思われた。NPH4/ARF7 は屈性応答全般に関与することが再確認されたが、その表現型は中間的で、機能重複して働く他の ARF 転写因子の存在が示唆された。オーキシンによるタンパク質分解がおきない *IAA19* 優性突然変異体 *msg2-1* は胚軸の光屈性及び重力屈性に異常を示すが、一方で根の光屈性は野生型同様の表現型を示した (未発表)。

これらの結果は、転写因子 ARF を介した遺伝子発現制御が光屈性に重要な機能を果たしており、その機能はオーキシン濃度勾配ばかりでなく光によるオーキシン感受性の変化を介した、もしくはオーキシンを介さないシグナル伝達経路によっても調節されている、という仮説を生んだ。このような考察に基づき、オーキシン受容体及び転写制御因子の光屈性における機能及び機能調節機構の詳細な理解が光屈性応答解明に必要と考え、本研究を立案するに至った。

2. 研究の目的

本研究はシロイヌナズナ芽生え胚軸及び根の光屈性における、1) オーキシン受容体 TIR1/AFB、2) ARF 転写因子、3) Aux/IAA 転写制御因子、の機能及び機能調節機構を研究期間内に明らかにし、光屈性誘導機構の新しいモデルを構築することを目的に解析を行った。

3. 研究の方法

オーキシン濃度勾配依存的 / 非依存的遺伝子発現調節を介した光屈性誘導機構の解明を目的に、(1) TIR1/AFB オーキシン受容体、ARF 転写因子、Aux/IAA 転写制御因子の網羅的な機能解析を行う。それぞれの遺伝子の機能が欠失した突然変異体を収集し、その表現型を観察することによって、胚軸一次光屈性、二次光屈性、根光屈性における機能を解明することにした。(2) 光屈性に関与することが明らかになった因子については、phot 光受容体シグナル伝達経路による機能制御の有無を明らかにすることにした。具体的には、それぞれの遺伝子に YFP レポーター遺伝子を融合したコンストラクトを遺伝子導入した形質転換体を作成し、その発現制御や細胞内局在、タンパク質の分子量の変化等が光によってフォトトロピン依存的に変化する可能性を検証した。(3) 光屈性誘導に働く phot1 シグナリング活性化に依存した遺伝子発現調節の可能性、及び、そこでオーキシン関連因子の転写制御機構への関与の有無を検討した。これまで phot による遺伝子発現調節の明確な証拠は得られていないが、その原因として他の光受容体の遺伝子発現調節が phot の調節をマスクし、検出を阻害している可能性が考えられた。そこで申請者らは暗所でも phot1 シグナル伝達経路を特異的に活性化できる形質転換体を本研究課題以前に開発した。具体的には恒常的活性型 phot1^{1608E} を化学物質エストラジオールによって転写誘導できる pMDC7-PHOT1^{1608E} コンストラクトを遺伝子導入した形質転換体を作成した。本形質転換体黄化芽生えを用いて恒常的活性型 phot1 発現誘導に依存した転写調節の網羅的解析を RNA-seq 法により行った。

4. 研究成果

(1) 突然変異体を用いて根の光屈性誘導機構に関与するオーキシシンシグナル伝達因子の解析を行った。TIR1/AFB ファミリーの網羅的解析では、TIR1 が根の光屈性に正に働くことが明らかになった。一方、研究当初関与することが示唆されていた AFB4 は、複数のアレル突然変異体を用いた検証においては、その関与を支持する結果を得ることができなかった。ARF 転写因子については、我々の実験条件では arf7、arf19 シングル突然変異体では明瞭な異常は観察されないものの、arf7 arf19 二重変異体では若干異常が検出され、ARF7 ARF19 の機能重複による根の光屈性への関与が示唆された。Aux/IAA 遺伝子の優性突然変異体、及び優性変異遺伝子形質転換体を用いた網羅的解析も行ったが、明確な異常を引き起こす遺伝子は発見できなかった。

以上の突然変異体を用いた遺伝学的解析は、根の光屈性にはオーキシン不均等勾配が形成されないにも関わらず、オーキシン受容

体 TIR1 及びその下流で働く転写因子 ARF7 及び ARF19 が根の光屈性に正に働くことを明らかにした。一方で、その他のオーキシン受容体や ARF 転写因子、Aux/IAA 遺伝子については機能重複の可能性は否定できないものの、重要な働きを示す遺伝子は存在しないことが示唆された。また tir1 や arf7 arf19 突然変異体の根の光屈性反応はわずかな減少しかみられないことから、これらの因子による遺伝子発現制御以外にも根の光屈性に働く分子機構が存在することが示唆された。(2) TIR1、ARF7、ARF19 について、YFP 融合タンパク質を自分自身のプロモーターを用いて発現する形質転換体を作成し、それぞれの発現を観察した。タンパク質発現量、タンパク質分子量、細胞内局在について青色光照射の有無により変化が現れるか観察したが、その変化は検出されなかった。TIR1 もしくは ARF7、ARF19 の機能調節がフォトトロピンシグナル伝達経路によって直接制御されているかどうかは、今後更なる解析を必要とすると考えられた。

(3) エストラジオール処理後 4 時間後には無処理コントロールサンプルと比較して 1.8 倍以上の差を持って転写産物量の差異を示す 30 個の遺伝子を発見した。検出された遺伝子発現量の差が本当に正しいか検証するために、各遺伝子の発現量比を定量的 qRT-PCR 解析によって比較した。これまで代表的な遺伝子 15 個ほど検証したが、どれも RNA-seq 解析同様の結果を示し、実施した RNA-seq 解析の有効性が確認できた (図 2)。

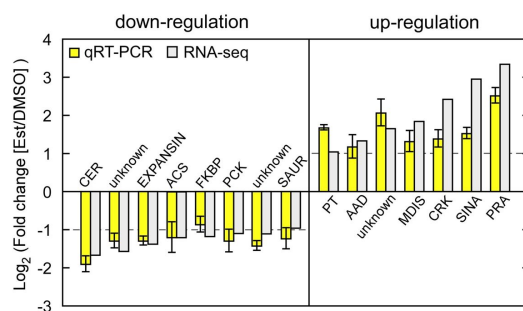


図 2 . pMDC7-PHOT1^{1608E} コンストラクトを遺伝子導入した形質転換体において、エストラジオール処理有無による遺伝子発現量変化が現れる遺伝子。RNA-seq 法 (灰色) 及び定量的 RT-PCR 法 (黄色) どちらにおいても 2 倍程度もしくはそれ異常の差を示す (横軸は log₂)。これらの遺伝子はベクターコントロール株においては、エストラジオール処理に応答した遺伝子発現量の変動を示さないことを確認している。

以上の結果は、フォトトロピンが一部の遺伝子の発現を調節する可能性を示唆することを強く示唆した。これらの遺伝子の中には、エクспанシンや植物ホルモン生合成等に関与するものが含まれることから、根の光屈性へ貢献している可能性も示唆された。これ

らの遺伝子が根の光屈性に関与するかどうか、今後のプロモーター解析や突然変異体の表現型観察によって明らかにしている予定である。プロモーターに共通のシス配列を検索したが、すべての遺伝子で ARF 転写因子が結合するコンセンサス配列を検出できるということもなかった。フォトトロピンの活性化が ARF7 ARF19 転写因子の機能を大きく変化させ、根の光屈性誘導を行うという可能性は小さいように思われた。

これらの結果をまとめた論文投稿を平成 29 年度中に行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Ken Haga, Tomoko Tsuchida-Mayama, Mizuki Yamada and Tatsuya Sakai (2015) Arabidopsis ROOT PHOTOTROPISM2 contributes to the adaptation to High-Intensity Light in Phototropic Responses. Plant Cell 27, 1098-1112. Doi. org/10.1105/tpc.15.00178. 査読有。

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Taro Kimura, Ken Haga, Yasuhi Shimizu-Mitao, Yumiko Takebayashi, Ken-Ichiro Hayashi, Yunde Zhao, Tatsuo Kakimoto, Hiroyuki Kasahara, Tatsuya Sakai. (2016 年 9 月 28 日) Functional analysis of auxin biosynthesis, transport and signaling in root phototropism of Arabidopsis thaliana. 新潟大学・刈羽村先端農業バイオ研究センター国際シンポジウム、新潟。

2. 木村太郎、芳賀健、志水(三田尾)悌、竹林裕美子、林謙一郎、Yunde Zhao、柿本辰男、笠原博幸、酒井達也(2016 年 9 月 6 日) シロイヌナズナの根の光屈性におけるオーキシン輸送、生合成、シグナル伝達の機能解析。生物資源ゲノム解析拠点シンポジウム。日本農業大学、東京。

3. 木村太郎、芳賀健、志水(三田尾)悌、竹林裕美子、林謙一郎、Yunde Zhao、柿本辰男、笠原博幸、酒井達也(2016 年 3 月 19 日) シロイヌナズナの根の光屈性におけるオーキシン輸送・生合成・シグナル伝達の機能解析。日本植物生理学会。岩手大学、盛岡。

4. 木村太郎、芳賀健、志水(三田尾)悌、竹林裕美子、林謙一郎、Yunde Zhao、柿本辰男、笠原博幸、酒井達也(2015 年 9 月 7 日) シロイヌナズナの根の光屈性におけるオーキシン輸送・生合成・シグナル伝達の機能解析。日本植物学会。朱鷺メッセ、新潟。

5. Taro Kimura, Ken Haga, Yasuhi Shimizu-Mitao, Yumiko Takebayashi, Ken-Ichiro Hayashi, Yunde Zhao, Tatsuo Kakimoto, Hiroyuki Kasahara, Tatsuya Sakai. (2015 年 3 月 13 日) Analysis of function of auxin and its action mechanism in Arabidopsis root phototropism. 産業技

術研究所、東京。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

〔その他〕

・植物の光感受性変換機構の発見

<http://www.niigata-u.ac.jp/wp-content/uploads/2016/03/270415.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 達也 (SAKAI, Tatsuya)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号: 10360554

(2) 研究協力者

木村 太郎 (KIMURA, Taro)

新潟大学大学院・自然科学研究科・博士後

期課程