

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440140

研究課題名(和文) オーキシン誘導性伸長生長におけるオーキシン受容と新規シグナル伝達機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of auxin perception and novel signal transduction in plant elongation growth

研究代表者

高橋 宏二 (TAKAHASHI, KOJI)

名古屋大学・理学研究科・助教

研究者番号：40283379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究は、植物組織の伸長生長過程における植物ホルモンオーキシンによる細胞膜プロトンポンプ(H⁺-ATPase)リン酸化の調節機構を明らかにすることを目標として実施した。本機構におけるオーキシン受容体候補のひとつであったABP1は変異体を用いた解析により直接的な関与がないことが示唆された。ケミカルスクリーニングや変異体スクリーニングを行った結果、オーキシン誘導性H⁺-ATPaseリン酸化を著しく低下する変異体候補を数株単離することができた。H⁺-ATPaseリン酸化へのブラシノステロイド作用の検討も行い、オーキシン作用とのクロストークの一端を見出した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project is to clarify the regulatory mechanism of plasma membrane proton pump (H⁺-ATPase) phosphorylation in response to phytohormone auxin during the elongation growth of plant tissues. It was suggested that Auxin-Binding Protein1 (ABP1), which was one of the auxin receptor candidates in this mechanism, has no direct involvement by the analysis using ABP1 knockout mutant, abp1-TD1 and abp1-C1. As results of chemical screening and mutant screening, several mutant candidates that markedly reduced the auxin-induced H⁺-ATPase phosphorylation could be isolated. We are going to examine the isolated mutants. In addition, we also investigated the effect of brassinosteroids on phosphorylation of H⁺-ATPase and found some of the crosstalk with auxin action.

研究分野：植物生理学

キーワード：オーキシン 細胞膜プロトンポンプ 伸長生長

1. 研究開始当初の背景

オーキシンはダーウィンの光屈性に関する研究(1880年)を嚆矢として最も古くから研究されている植物ホルモンであり、植物の生活環のほとんどすべての局面で重要な役割を果たしている。オーキシン研究の長い歴史の中で蓄積された知見と近年の分子遺伝学的解析などによって主要な生合成経路や極性輸送機構、オーキシン分子の受容とシグナル伝達機構についてその詳細が明らかになってきた。現在では、オーキシンはE3ユビキチンリガーゼ複合体SCF^{TIR1/AFBs}の構成タンパク質のひとつであるTIR1/AFBsに受容され、共受容体として作用する転写リプレッサータンパク質AUX/IAAをユビキチンプロテアソーム経路で分解することによりARF転写因子が活性化してオーキシン応答性遺伝子の発現を制御すると考えられている。

一方、すべてのオーキシン作用がこのような転写制御を介するシグナル伝達機構で説明できるわけではないとも考えられている。過去の生理・生化学的解析による知見からAuxin Binding Protein 1 (ABP1)が転写制御を介さないオーキシン受容体の有力候補であると推察されている。ABP1は約30年前にオーキシンに特異的に結合するタンパク質として同定され、その後、オーキシン誘導性の細胞体積増大や細胞膜を介したイオン輸送に関与することを示唆する生理学的解析結果が報告されている。しかしながら、分子遺伝学的な解析が困難であること(当時、ABP1の機能喪失変異体は胚性致死であると考えられていた)やABP1機能を生化学的に検証する実験基盤が整っていなかったこともあり、ABP1のオーキシン受容体としての機能は明確になっていない。

2. 研究の目的

オーキシンの代表的な作用である植物組織の伸長誘導の過程において、本研究代表者らはオーキシンが細胞膜プロトンポンプ(H⁺-ATPase)のC末端から2番目のスレオニンのリン酸化レベルを10分以内に上昇させて活性化すること、また、TIR1/AFBsの二重変異体*tir1-1afb2-3*や低分子化合物(TIR1アンタゴニスト、プロテアソーム阻害剤など)を用いた解析からオーキシンによる細胞膜H⁺-ATPaseのリン酸化は既知のオーキシン受容体であるTIR1/AFBsの関与なしに起きる可能性があることを報告した(Takahashi et al, Plant Physiol 2012)。これらの結果は植物細胞伸長を説明する「酸成長説」の根幹を理解するうえで重要であることに加え、未知のオーキシンシグナル伝達機構を明らかにする実験基盤となることを示している。本研究ではこれらの研究を発展させ、オーキシン酸成長のメカニズム解明と転写制御を介さないオーキシン作用の新たな分子機構の発見を目的とした。

3. 研究の方法

本研究の研究開始当初、下記のテーマに基づいて研究の展開を企図した。(1)オーキシンによるH⁺-ATPaseリン酸化のシグナル伝達機構を明らかにすることを目標に、TIR1/AFBsを含む既知のオーキシンシグナル伝達因子の関与を極力排除した変異体スクリーニングを展開して、オーキシンによる細胞膜H⁺-ATPaseのリン酸化制御に異常をきたしている変異体を単離し、原因遺伝子の同定を目指す。(2)また、オーキシン結合活性を改変した変異ABP1を用いて細胞膜H⁺-ATPaseリン酸化へのABP1の関与の有無を分子生物学的・生化学的に明確にして、転写制御を介さない新規のオーキシンシグナル伝達機構を明らかにする。

研究を実施する過程でオーキシンによる細胞伸長制御と細胞膜H⁺-ATPase機能の関連への理解を深めるために(3)ブラシノステロイドによる細胞膜H⁺-ATPaseリン酸化制御とオーキシンとのクロストーク、(4)オーキシン誘導性H⁺-ATPaseリン酸化へのTIR1/AFBs受容体関与の再検討の各テーマも追加した。

(1)オーキシンによって誘導される細胞膜H⁺-ATPaseリン酸化と胚軸伸長を制御するタンパク質因子を探索するため、変異体のスクリーニングを行う。変異源処理を施したシロイヌナズナのM2種子を暗所下で発芽させた黄化芽生えにオーキシン生合成阻害剤を前処理し、胚軸の伸長生長部位の内生オーキシンを枯渇させておく。その後、外部からオーキシンを処理し、オーキシン誘導性胚軸伸長の初期過程に異常を示す変異体植物を選抜する。二次スクリーニングとして選抜個体から採取した種子を播種し、得られた黄化芽生えから胚軸切片を単離してオーキシン誘導性胚軸伸長を詳細に測定する。

(2)ABP1は、機能喪失型変異体が胚性致死であり、また解析に有効な変異体が確立していないため、分子遺伝学的な解析が遅れている。そこで、ABP1の分子遺伝学的な解析ツールを整備することを目的に、まず、組換えABP1を用いて野生型ABP1やオーキシン結合ポケットに変異を入れた変異ABP1のオーキシン結合活性を等温滴定型カロリメーターや分子間相互作用解析装置を用いて測定する。さらに、変異ABP1を導入した植物を用いて胚軸伸長や細胞膜H⁺-ATPaseリン酸化への影響を調べる。

(3)ブラシノステロイドはオーキシンと同様に細胞伸長を制御する植物ホルモンである。そこで、細胞膜H⁺-ATPase機能へのブラシノステロイドの効果を検討するとともに、オーキシン作用とのクロストークを検討する。

(4)オーキシン誘導性H⁺-ATPaseリン酸化へのオーキシン受容体TIR1/AFBsの役割を再検討するため、新しい研究ツールを開発する。

4. 研究成果

(1) オーキシン誘導性胚軸伸長の初期過程を攪乱する変異体スクリーニング

内生オーキシン量を減少させた変異原処理株(約9,000株)の黄化芽生えにオーキシンを投与して胚軸伸長誘導を測定したところ、野生株と比べてオーキシン誘導性胚軸伸長が低下した株が28株得られた。さらに二次スクリーニングとしてオーキシン誘導性H⁺-ATPaseリン酸化に異常を示す変異体候補株を2株選抜した。これらの変異体候補株は、オーキシン誘導性胚軸伸長とH⁺-ATPaseリン酸化が顕著に低下する特徴を示す。現在、これらの変異体の原因遺伝子の特定作業を進めている。原因遺伝子が新規のシグナル伝達因子であるなら、オーキシンシグナル伝達のみならず細胞膜H⁺-ATPaseの活性調節の全容解明につながると期待できる。

(2) オーキシン誘導性H⁺-ATPaseリン酸化へのABP1の関与の検討

ABP1の機能の検討を行うに先立ち、組換えABP1タンパク質の作出と特異抗体の作製を行った。さらに、ABP1のオーキシン結合活性の測定に向けて等温滴定型カロリメータ等の条件検討を行った。

これらの研究を行っている中、ABP1の新しいノックアウト変異体(*abp1-C1*、*abp1-TD1*)を用いた学術論文が報告され(Gao et al., Proc Natl Acad Sci USA 2015)。ABP1はオーキシンシグナル伝達や植物体の成長にはとくに重要な機能は果たしていない可能性が示された。この論文は、ABP1のノックアウトは胚性致死を引き起こすという知見(2001年)と異なることから多くのオーキシン研究者には予期していなかった結果を提示した。本研究代表者は、*abp1-C1*と*abp1-TD1*を取り寄せてオーキシン誘導性胚軸伸長とH⁺-ATPaseリン酸化に対するABP1ノックアウトの影響を調べたところ、野生型と比べて有意な差が認められなかった。これらの結果は、ABP1はオーキシンによる細胞膜H⁺-ATPaseリン酸化に関与していないことを示している。従って、ABP1の機能解析についてはここで解析を停止することとした。

(3) ブラシノステロイドによる細胞膜H⁺-ATPaseリン酸化制御

本研究期間中、リン酸化細胞膜H⁺-ATPaseの脱リン酸を触媒するclade-D protein phosphatase (PP2C-D)の活性をオーキシン応答遺伝子産物であるSAMLL AUXIN UP RNA (SAUR)が抑制するとの報告が出た(Spartz et al., 2014)。ブラシノステロイドはオーキシンと同様に細胞伸長を誘導すること、またSAURの発現誘導も観察されることから、細胞膜H⁺-ATPaseリン酸化を引き起こす可能性があることが期待された。またブラシノステロイド作用はオーキシン作用とのクロスト

クがあることも示唆されている。そこで、細胞膜H⁺-ATPaseへのブラシノステロイドの効果を検討することとした。ブラシノステロイドの生合成阻害剤であるブラシナゾールで前処理したシロイヌナズナ黄化芽生えに、外部からブラシノライド(ブラシノステロイドの一種)を投与したところ、胚軸伸長誘導に先立ち、細胞膜H⁺-ATPaseのリン酸化レベルを上昇させた。ブラシノステロイドのシグナル伝達に関わるブラシノステロイド受容体BR11の変異体ではこれらの現象は見られず、一方、ブラシノステロイドシグナル伝達を正に制御する低分子化合物ピキニン(BIN2の阻害剤)は細胞膜H⁺-ATPaseのリン酸化レベルを上昇させた。これらの結果はブラシノステロイドはBR11-BIN2シグナル伝達を介して細胞膜H⁺-ATPaseのリン酸化レベルを調節することを示唆する。これらの過程でSAURが関与する可能性も高いと推察された。また、ブラシナゾールで前処理した黄化芽生えに外部からオーキシンを処理しても細胞膜H⁺-ATPaseのリン酸化レベルに影響を及ぼさなかったことから、ブラシノステロイドとオーキシンの作用にはクロストークがあることも示唆された。細胞伸長はオーキシン、ブラシノステロイド、ジベレリン、エチレン、アブシシン酸など様々な植物ホルモンにより調節される生理反応であるため、多様な植物ホルモンのクロストーク解析を行う良い研究材料であると期待できる。本研究は、学術論文にまとめて現在投稿中である。

(4) TIR1/AFBの機能解析を行う新しい研究ツールの開発とTIR1/AFB関与の再検討

研究開始当初、オーキシンによる細胞膜H⁺-ATPaseリン酸化制御にはTIR1/AFBオーキシン受容体は関与していないことが示唆されていた。しかしながら、オーキシン応答性遺伝子SAURがオーキシン誘導性H⁺-ATPaseリン酸化制御に関与することが明らかとなり、ABP1の関与が否定されたことからTIR1/AFBの関与を再検討する必要が生じてきた。オーキシンは植物の生命活動に必須であるためTIR1/AFBの多重変異体を用いた解析には限界がある。そこで、分子遺伝学と低分子化合物利用を組み合わせた新規の研究ツールの開発プロジェクトに参画し、非常に興味深いアッセイシステムの開発に成功した。このシステムを用いて、オーキシン誘導性H⁺-ATPaseリン酸化へのTIR1/AFB関与の再検討を試みた。本研究は、投稿準備中である。

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1件)

Shin-ichiro Inoue, Koji Takahashi, Hiromi

Okumura-Noda, Toshinori Kinoshita (2016) Auxin influx carrier AUX1 confers acid resistance for *Arabidopsis* root elongation through the regulation of plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant and Cell Physiology*. 57: 2194-2201. doi: 10.1093/pcp/pcw136(査読あり)

〔学会発表〕(計7件)

高橋宏二、南杏鶴、木下俊則、ブラシノステロイドによるシロイヌナズナの胚軸伸長誘導、第58回日本植物生理学会、2017年3月、鹿児島大学(鹿児島県、鹿児島市)

Kohei Teramoto, Koji Takahashi, Shin-ichiro Inoue, Toshinori Kinoshita, Pharmacological approach to the mechanism of auxin-induced H⁺-ATPase phosphorylation, 第57回日本植物生理学会、2016年3月、岩手大学(岩手県盛岡市)

Hodaka Sugimoto, Yohei Takahashi, Yuki Hayashi, Koji Takahashi, Shin-ichiro Inoue, Mee Yeon Park, William M. Gray, Toshinori Kinoshita, Functional analysis of PP2C-Ds in stomatal movement, 第57回日本植物生理学会、2016年3月、岩手大学(岩手県盛岡市)

Koji Takahashi, Koichi Hori, Kinuka Ohtaka, Hiroyuki Ohta, Toshinori Kinoshita, Plasma membrane H⁺-ATPase in the charophytic alga, *Plant Biology* 2015, July 26-30, 2015, Minneapolis (USA)

Hodaka Sugimoto, Yohei Takahashi, Yuki Hayashi, Koji Takahashi, Shinichiro Inoue, Mee Park, William Gray, Toshinori Kinoshita, Possible involvement of PP2C-D for dephosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Biology* 2015, July 26-30, 2015, Minneapolis (USA)

高橋宏二、堀孝一、大高きぬ香、太田啓之、木下俊則、シャジクモ藻類クレブソルミディウムにおける細胞膜プロトンポンプ、第56回日本植物生理学会、2015年3月、東京農業大学(東京)

菊地淳子、井上晋一郎、曾田翠、高橋宏二、木下俊則、シロイヌナズナの気孔開度変異体 *scs2*、*scs3* の表現型解析、第56回日本植物生理学会、2015年3月、東京農業大学(東京)

〔図書〕(計1件)

Koji Takahashi, Toshinori Kinoshita (2016)

The regulation of plant cell expansion: Auxin-induced turgor-driven cell elongation. *Molecular Cell Biology of the Growth and Differentiation of Plant Cells* 156-173. CRC Press. doi:10.1201/b20316

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 宏二 (TAKAHASHI, Koji)
名古屋大学。大学院理学研究科・助教
研究者番号：40283379

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

木下 俊則 (KINOSHITA, Toshinori)
名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・教授
研究者番号：50271101