

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26506016

研究課題名(和文)根と胚軸における正と負の重力屈性を決定付ける遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms regulating transcriptional activation and repression by gravitropic response in root and cotyledon

研究代表者

梶 雄介 (Kakei, Yusuke)

横浜市立大学・木原生物学研究所・特任助教

研究者番号：50636727

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)：茎や根のオーキシン不等分布とその後の偏差成長によって逆向きに重力屈性がおこる。この研究ではオーキシン濃度を検出するバイオマーカータンパク質を作成し、濃度変化と重力屈性の関わりをリアルタイムに調べる試みをした。マーカー発現植物はオーキシン欠乏異常を示し、解析できなかった。次にオーキシン濃度変化とその影響の関係を遺伝子発現変化から調べた。オーキシン合成酵素YUCCAの阻害剤BBo、PPBoを開発して外生オーキシンとともに添加し広い範囲でオーキシン濃度を变化させた。オーキシン濃度変化後の発現応答について解析サーバーAtCASTを開発して変異体などと比較し、組織別のオーキシン応答を分類した。

研究成果の概要(英文)：Plant gravitropism is regulated by polar transport of auxin to the same direction as gravity. The subsequent molecular mechanism of the differential growth still remains to be elucidated. An auxin biomarker protein containing modified TIR1, DII region of Aux/IAA and FRET regions was developed to compare auxin concentration in shoot and root gravitropism. However, overexpression of the biomarker did not work well because of cell death. Next, we analyzed transcriptional changes caused by wide range of auxin concentrations. Inhibitors of auxin biosynthesis BBo and PPBo that target auxin synthase YUCCA were developed to decrease auxin concentration effectively. Arabidopsis and Mung bean were treated by gravity stimuli, several kinds of auxin and inhibitors. Interestingly, transcriptional auxin-responses after gravity stimuli were observed at non-bending tissue in addition to bending tissues. This result showed that auxin concentration is not the only regulator of differential growth.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：重力屈性 オーキシン シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

重力感受は内皮細胞、内鞘細胞やコルメラ細胞に存在するアミロプラストが重力方向に沈降することによっておこなわれる。その後、オーキシンが重力方向へ極性輸送され、茎や根の両側のオーキシンの不等分布とそれによって引き起こされる偏差成長によって屈曲がおこるとされる。シロイヌナズナの根においてはオーキシン輸送体 PIN1、PIN2、PIN3、PIN4、PIN7 などが協調的にオーキシンを重力側の伸長領域へ極性輸送するという分子機構が明らかとなっている。PIN3 によるオーキシンの極性輸送は、胚軸の重力屈性にも一部機能していると考えられている。この仕組みでは重力を感知しオーキシンの極性輸送をする細胞と、オーキシンにตอบสนองして偏差成長する細胞が異なり、根では特にその距離が長い。このような細胞間の協調的な制御を行うためにオーキシン輸送や量は厳密に制御されていると考えられる。植物体内のオーキシン輸送の様子は外生の放射性オーキシンを投与することによって明らかにされてきた。植物によるオーキシンの感受は細胞内で TIR1 と Aux/IAA を介するメカニズムが知られており、シグナル下流のオーキシン応答性の遺伝子発現を制御している。この遺伝子発現制御を利用してオーキシン分布を検出するツールとして DR5 が開発され、広く使われている。しかし、従来使われてきた DR5 はオーキシン濃度を感知できるレンジは組織あたり 0.3-9 μ M と狭く (**Plant Hormones Vol. 72, pp 38**)、刺激後の反応も遅い。最近報告された DII-VENUS は Aux/IAA タンパク質の一部を利用している。現在のところ DII-VENUS は根端のオーキシン濃度の検出に用途が限られている。また、反応は早いが高感度は DR5 と同程度で定量性が低い。したがって、どちらも広範囲でリアルタイムなモニタリングには向いておらず、植物全体の細胞レベルでのオーキシン濃度分布とその重力応答による変動は未解明である。

2. 研究の目的

重力応答は植物の正常な生育に欠かせない重要な環境応答の一つである。重力屈性は葉を地上部に、根を地下部に配置する植物の形態形成の基盤となっている。これまでに、根や茎の横断方向におけるオーキシンの偏差分布が重力屈性を制御することが分かっていたが、いつ、どの細胞層で、どの程度オーキシンの偏差分布が生じるか植物全体で調べた報告はなく、根と茎がどのようなオーキシン濃度の違い、分子機構の違いで重力に対して反対向きにตอบสนองするのか分かっていない。本研究ではオーキシンと直接結合することで蛍光色に変化する人工タンパク質を開発することにより、オーキシン濃度変動をリアルタイムにモニタリングする。また近年開発されている各種オーキシン阻害剤を用

いて一過的、局所的にオーキシン濃度を変化させ、その応答を解明する。本研究により、重力屈性時の細胞レベルでのホルモン濃度と屈性に関わる遺伝子発現制御機構との関係性を明らかにする。

3. 研究の方法

DR5 では、オーキシン感知の分子メカニズムからレポーターの発現がなされるまでに、多くの転写因子や転写制御が関わる。これらの影響により DR5 はオーキシン濃度を直接は反映しない。DII-VENUS は蛍光タンパク質であり、オーキシンを介してオーキシン受容体 TIR1 と結合することにより分解される。この分解の割合をオーキシン濃度として検出する。そのため DII-VENUS は蛍光タンパク質の発現量と TIR1 の存在量、分解速度などに影響される。新しく開発する新規オーキシンバイオセンサーではこれらの影響を受けずにオーキシン濃度を反映できるシステムを目指した。本研究ではオーキシンと直接結合することによって構造が変化するタンパク質を作製することで植物体内のオーキシン濃度を FRET 効果により直接的にモニタリングする。この FRET では青黄の光強度の比でおおよその濃度がわかる。

FRET を応用したセンサータンパク質には、最も結合能の強い TIR1 と IAA7 の組み合わせをまずは用いた。

新規バイオセンサーを均一に発現させなければ正確な定量は出来ない。本研究ではシロイヌナズナにおいて恒常的で均一な高発現が確認されているユビキチン 10 プロモーターを使った。

Aux/IAA はの 4 つのドメインからなり、オーキシン存在下で TIR1 と結合するのに必要なドメインは DII である。DI はタンパク質の安定性と核移行に関わる。新規バイオセンサーには DI、DII の部分を使った。また DII 領域が「内在性の TIR1」と結合するとセンサータンパク質がユビキチン化され分解される。新規バイオセンサーでは、TIR と DII を融合タンパク質として導入することで、DII 領域がバイオセンサー内の TIR1 部分と優先的に結合するように設計した。DII を介した分解は、オーキシン存在下で DII と結合した TIR1 が SCF 複合体とも結合し、SCF 複合体によりユビキチン化された Aux/IAA タンパク質が、プロテアソームへ運ばれることによって起こる。バイオセンサーの TIR 部分から結合ドメインのアミノ酸を置換 (W37A) することで SCF 複合体への結合能をなくし、オーキシン濃度に応じた分解はおこらないように設計した。

外生のオーキシンを添加すると花茎や胚軸は伸長し、逆に根は短くなる。この原因とされているオーキシンへの感受性が胚軸と根で違うという説が正しいのかを検証し、そのメカニズムを細胞レベルで調べる。

本研究では、根と胚軸へオーキシン (IAA)

やオーキシン阻害剤を添加し、オーキシンバイオマーカーで確認することによって胚軸や根の伸長領域の細胞内のオーキシンレベルを調節する。細胞内オーキシン濃度が、「胚軸で伸長が起こる濃度」、「根で伸長が起こる濃度」、「伸長が起こらない高濃度」、「伸長が起こらない低濃度」などになるようにいくつか設定し、それらの細胞群から RNA を抽出する。マイクロアレイ解析により、遺伝子発現の変化とオーキシン濃度の間に相関関係がある遺伝子を抽出、胚軸と根でオーキシン濃度と応答の強度にどのような相関関係の差があるかどうかを解析する。その後、発現に差が見られる遺伝子プロモーターの構造から発現制御機構の差を研究する。

4. 研究成果

開発したオーキシンバイオマーカータンパク質をタマネギの表皮細胞に一過的に発現させ、外生 IAA を添加したところ FRET 効果が観察された。しかし、植物や大腸菌において過剰発現したところ、細胞が枯死、死滅した。このことからオーキシン内生量やオーキシン感受性に影響を与えずにバイオマーカーを発現させることは非常に難しいと判断し、オーキシンバイオマーカーを発現した植物を作製することは断念した。

オーキシン応答性遺伝子発現を Affimetrix 社の最新のマイクロアレイチップ Arabidopsis gene 1.1 ST を用いて処理時間ごとに網羅的に調べなおした。このデータを含めたシロイヌナズナの遺伝子発現解析データベース AtCAST を発表した(雑誌論文 1)。AtCAST は任意の DNA マイクロアレイ実験に類似した実験結果を既存データの中から検索する機能を持つデータ解析ツールである。遺伝子発現変化の傾向を特徴付ける遺伝子群を自動的に抽出、マイクロアレイ実験の発現プロファイル間の類似性を計算し、有方向性ネットワークで表示する。AtCAST を用いることで変異体の原因遺伝子によって引き起こされる遺伝子発現変動が何の影響と類似し、どのような特徴があるかを解析できる。この AtCAST を用いてオーキシン処理と反対の遺伝子発現応答を引き起こす既知の実験条件を抽出することができた。オーキシン関連変異体 *nph4-1*, *slr-1*, *iaa17-6*, *arf19-1*, *arf2-6*, *sav3-2* はオーキシン作用と負の相関を示し同一のクラスターに含まれる。このクラスターに含まれる実験で共通して発現が変動した遺伝子はオーキシン濃度低下で引き起こされる分子機構に関わっていると推測された。

オーキシン合成の最終ステップを担う酵素 YUCCA を阻害する新型のオーキシン合成阻害剤 BBo、PPBo を開発し、発表した(雑誌論文 2)。

新型オーキシン合成阻害剤 PPBo やこれまでに報告されているオーキシン合成、シグナリング、輸送の阻害剤処理をしたシロイヌナ

ズナのトランスクリプトームを用意し、共通した変動、異なる変動についてクラスター解析した。AtCAST により判明していたオーキシン関連変異体の遺伝子発現変化を統合し、時間、組織および濃度別にオーキシンへの応答を区別した。

花茎における重力屈性のインジケータとして使えるオーキシン応答性遺伝子 *Aux/IAA2*, *Aux/IAA5* の発現をシロイヌナズナの重力刺激後の花茎で観察したところ、屈性を示す部位での遺伝子発現変動に加えて、屈性を示さない部位(より基部側)でも重力方向で *Aux/IAA5* の発現が高くなるなどオーキシン応答が起こっていた。「オーキシン濃度が支配的に正と負の重力屈性を引き起こす」という仮説を検証する課題として研究が始まったが、オーキシン濃度だけでは重力屈性を説明できないことが明らかとなった。そこで、地上部の負とゼロ(屈曲しない)の重力屈性の違いを引き起こすメカニズムについて更に研究を行った。負の重力屈性が起こる部位は地上部の伸長領域であり、オーキシン濃度勾配が生じても重力屈性がゼロである部位は地上部のより基部側の伸長領域であった。オーキシン濃度に加えて伸長領域と非伸長領域を決定するメカニズムが地上部の負とゼロの重力屈性の違いを引き起こしていると考えられた。

<引用文献>

Litwack, G. (2005) Plant Hormones, Gulf Professional Publishing.

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 3 件)

1. Takei Y., Nakamura A., Yamamoto M., Ishida Y., Yamazaki C., Sato A., Narukawa-Nara M., Soeno K., Shimada Y. (2017) Biochemical and Chemical Biology Study of Rice OsTAR1 Revealed that Tryptophan Aminotransferase is Involved in Auxin Biosynthesis: Identification of a Potent OsTAR1 Inhibitor, Pyruvamine2031. *Plant & Cell Physiology*, 58 (3): 598-606. doi:10.1093/pcp/pcx007. 査読有り
2. Takei Y., Yamazaki C., Suzuki M., Nakamura A., Sato A., Ishida Y., Kikuchi R., Higashi S., Kokudo Y., Ishii T., Soeno K., Shimada Y. (2015) Small molecule auxin inhibitors that target YUCCA are powerful tools for studying auxin function. *The Plant Journal*, 84(4):827-37. doi:10.1111/tpj.13032 査読有り
3. Takei Y. & Shimada Y. (2015) AtCAST3.0 Update: A Web-Based Tool for Analysis of Transcriptome Data by

Searching Similarities in Gene Expression Profiles. *Plant Cell Physiology* 56, e7. doi: 10.1093/pcp/pcu174. 査読有り

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Takei, Y., Ishida, Y., Shimada, Y. Transcriptional changes in response to auxin inhibitors, 2016 IPGSA Meeting, 2016/6/21-30, Toronto (Canada)

他 9 件

〔その他〕

ホームページ等

AtGenExpressJPN・AtCAST

<http://atpbsmd.yokohama-cu.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

箕 雄介 (Yusuke Takei)

横浜市立大学・木原生物学研究所・特任助

教

研究者番号：5063672