



オーキシンを介した側根形成制御機構の解析

上原, 健生

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2009-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4524

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004524>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	上原 健生
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学 位 記 番 号	博い第 4524 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

オーキシンを介した側根形成制御機構の解析

審 査 委 員

主 査 教 授 三村 徹郎

教 授 深見 泰夫

教 授 鶴見 誠二

准教授 深城 英弘

奈良先端科学技術大学院大学教授 田坂 昌生

植物の根系は、水分や栄養分の吸収や植物体の支持を担う重要な器官である。植物種によって根系の形態は多様であるが、その発生制御機構には共通した部分が多いと考えられる。根系構築において重要なイベントの1つが側根形成である。側根は、胚発生時に一度分化した主根の組織が、再び分裂することにより新たに形成される二次的な根である。多くの植物種において、側根形成の開始は内鞘細胞の規則正しい分裂によって開始されることが分かっているが、その分裂を制御する分子メカニズムにはまだ不明な点が多い。

側根形成を制御する重要な因子の1つに植物ホルモンの1種のオーキシンがある。いくつかの植物種において、外部から与えたオーキシンは内鞘細胞の分裂を促進して側根形成を引き起こし、逆にオーキシン輸送阻害剤は側根形成を抑制する。また、オーキシンの生合成や輸送等に異常を示す多くのシロイヌナズナ変異体では側根数の減少がみられ、側根形成におけるオーキシンの重要性が示唆される。

オーキシンは多くの初期オーキシン応答性遺伝子の発現を制御しているが、これらの発現制御の多くは転写因子ファミリーであるAux/IAAおよびARFにより仲介される。ARFはオーキシン応答性遺伝子のプロモーター領域に存在するオーキシン応答エレメントに直接結合し、その発現を誘導もしくは抑制する。一方、Aux/IAAはARFと直接相互作用し、ARFの転写制御活性を抑制する。

Aux/IAAタンパク質はファミリーにおいて保存された4つのドメインをもつ。ドメインIはARFの転写活性の抑制に働き、ドメインIIIおよびIVはARFとの相互作用に関与する。ドメインIIはこのタンパク質の安定を決めており、ドメインIIにアミノ酸置換をもつ多くのシロイヌナズナ変異体はAux/IAAの安定化によりオーキシン応答が乱れ、発生に異常がみられる。このような変異体の1つである*slr*変異体は、Aux/IAAのメンバーであるIAA14のドメインIIにミスセンス変異をもち、側根の欠損、根毛数の低下、重力屈性異常等の多面的な表現型を示す。

ARF7とARF19の二重変異体である*arf7 arf19*は、側根形成における表現型が*slr*と類似している。また、ARF7やARF19タンパク質とIAA14タンパク質は酵母two-hybrid法において相互作用がみられる。これらのことから、植物体内においてARF7やARF19が側根形成を正に制御しており、一方のIAA14はARF7やARF19と直接相互作用してこれらの機能を抑制することにより側根形成を負に制御していると考えられる。しかし、IAA14以外のAux/IAAのメンバーがどのように側根形成制御に関与するかは明らかにされていない。

シロイヌナズナの側根形成制御において、ARFとAux/IAAによるオーキシンスIGNAL伝達の直下で機能する因子として、LBD16/ASL18およびLBD29/ASL16が同定されている。

LBD/ASL遺伝子群は植物特異的なファミリーを形成しており、いくつかの植物種において特に側生器官の発生の制御に関与することが指摘されている。地上部の発生制御においてはLBD/ASLの下流では複数のホメオボックス遺伝子が機能していることが明らかになっているが、根の発生制御におけるLBD/ASLタンパク質群の下流遺伝子はほとんど明らかになっていない。

以上のことを背景に、本研究では2つのアプローチにより側根形成制御メカニズムのさらなる理解を目指した。

まず、側根形成において機能する新たな因子を同定するため、側根形成に異常があるシロイヌナズナの優性変異体*crane-1*および*crane-2*を単離し、主に分子遺伝学的手法を用いて解析した(2章)。*crane*変異体では側根数が顕著に減少しており、オーキシン誘導性の側根形成能も低下している。このことは、*crane*変異体においてオーキシン感受性が低下していることを示している。また、*crane*変異体は、明所における胚軸の徒長、本葉の下偏成長、稔性の低下など、地上部にも多面的な表現型をもつ。これらの*crane*変異体の表現型は、Aux/IAA転写抑制因子ファミリーのメンバーであるIAA18タンパク質の機能獲得型変異によって引き起こされていた。*IAA18*プロモーター::*GUS*の発現は根においては側根形成の初期のステージにおいてみられた。酵母two-hybrid法により、IAA18はARF7およびARF19と相互作用することが明らかになった。これらの結果から、CRANE/IAA18はシロイヌナズナの側根形成に関与しており、ARF7およびARF19の活性を負に制御する因子であることが示された。

もう1つのアプローチとして、マイクロアレイによるLBD16/ASL18の下流遺伝子の同定を試みた(3章)。LBD16/ASL18およびLBD29/ASL16タンパク質は、核に局在し、キメラリプレッサーを融合したLBD16/ASL18の発現によりオーキシン応答性の遺伝子発現や側根形成が抑制されることから、転写活性化因子として機能していることが示唆されている。しかしながら、側根形成制御における分子機能や転写制御のターゲットなどは明らかになっていない。本研究では、LBD16/ASL18の下流で側根形成に機能する遺伝子の同定を目的に、マイクロアレイ解析によりLBD16/ASL18の機能誘導によって発現が上昇する遺伝子を探索した。本研究のマイクロアレイ解析の結果および、以前に報告されているマイクロアレイ解析の結果や公共のデータベースの情報を元に、LBD16/ASL18下流候補遺伝子を11に絞り込んだ。これらの候補遺伝子には、*ARF*や*GH3*、*AHK*等の植物ホルモンのシグナル伝達や代謝に関与することが知られているものに加え、リパーゼやペルオキシダーゼ等の酵素も含

(氏名： 上原健生 NO. 3)

まれていた。候補遺伝子の組織レベルでの発現解析の結果、いくつかの遺伝子については側根原基特異的な発現が観察されており、これらの遺伝子が側根形成において機能している可能性がある。

これら 2 つのアプローチにより、シロイヌナズナの側根形成制御に関わる新たな因子が複数同定できた。今後は、本研究で同定した因子を含め、側根形成制御に関与する因子の間の相互作用について詳細に解析する必要がある。

(別紙 1)

論文審査の結果の要旨

氏名	上原 健生		
論文 題目	オーキシンを介した側根形成制御機構の解析		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教 授	三村 徹郎
	副 査	教 授	深見 泰夫
	副 査	教 授	鶴見 誠二
	副 査	准教授	深城 英弘
	副 査	奈良先端科学技術大学院大学・教授	田坂 昌生
要 旨			
本論文は植物の根系構築の基礎となる根の発生機構、特に植物ホルモンであるオーキシンを介した側根形成制御機構に関する解析についてまとめられている。論文は大きく4つの部分 (I. 序論、II. 側根形成を制御する<i>CRANE/IAA18</i>遺伝子の解析、III. 側根形成で機能するLBD16/ASL18下流遺伝子の同定および解析、IV. 総論) からなる。 I章では、植物のオーキシン応答と側根形成に関連するこれまでの研究経過について以下のように概説している。 植物の根系は、水分や栄養分の吸収や植物体の支持を担う重要な器官である。植物種によって根系の形態は多様であるが、その発生制御機構には共通した部分が多いと考えられる。根系構築において重要なイベントの1つが側根形成である。多くの植物種において、側根形成の開始は主根や既存の根の内鞘細胞の規則正しい分裂によって開始されることが分かっているが、その分裂を制御する分子メカニズムにはまだ不明な点が多い。 側根形成を制御する重要な因子の1つに植物ホルモンの1種のオーキシンがある。いくつかの植物種において、外部から与えたオーキシンは内鞘細胞の分裂を促進して側根形成を引き起こし、逆にオーキシン輸送阻害剤は側根形成を抑制する。また、オーキシンの生合成や輸送等に異常を示す多くのシロイヌナズナ変異体では側根数の減少がみられ、側根形成におけるオーキシンの重要性が示唆される。 オーキシンは多くの初期オーキシン応答性遺伝子の発現を制御しているが、これらの発現制御の多くは転写因子ファミリーであるAux/IAAおよびARFにより仲介される。ARFはオーキシン応答性遺伝子のプロモーター領域に存在するオーキシン応答エレメントに直接結合し、その発現を誘導もしくは抑制する。一方、Aux/IAAはARFと直接相互作用し、ARFの転写制御活性を抑制する。 Aux/IAAタンパク質はファミリーにおいて保存された4つのドメインをもつ。ドメインIはARFの転写活性の抑制に働き、ドメインIIIおよびIVはARFとの相互作用に関与する。ドメインIIはこのタンパク質の安定性を決めており、ドメインIIにアミノ酸置換をもつ多くのシロイヌナズナ変異体はAux/IAAの安定化によりオーキシン応答が乱れ、発生に異常がみられる。このような変異体の1つである<i>slr</i>変異体は、Aux/IAAのメンバーであるIAA14のドメインIIにアミノ酸置換が生じたことにより、側根の欠損、根毛数の低下、重力屈性異常等の多面的な表現型を示す。それに対して、ARF7とARF19の二重変異体である<i>arf7 arf19</i>は、側根形成における表現型が<i>slr</i>と類似している。また、ARF7やARF19タンパク質とIAA14タンパク質は酵母two-hybrid法において相互作用がみられる。これらのことから、植物体内においてARF7やARF19が側根形成を正に制御しており、一方のIAA14はARF7やARF19と直接相互作用してこれらの機能を抑制することにより側根形成を負に制御していると考えられる。しかし、IAA14以外のAux/IAAのメンバーがどのように側根形成制御に関与するかは明らかにされていない。 また、シロイヌナズナの側根形成制御において、ARF と Aux/IAA によるオーキシンスIGNAL伝達の直下で機能する因子として、LBD16/ASL18 および LBD29/ASL16 が同定されている。LBD/ASL 遺伝子群は植物特異的なファミリーを形成しており、いくつかの植物種において特に側生器官の発生の制御に関与することが指摘されている。地上部の発生制御においては LBD/ASL の下流では複数のホメ			

氏名	上原 健生
オボックス遺伝子が機能していることが明らかになっているが、根の発生制御におけるLBD/ASLタンパク質群の下流遺伝子はほとんど明らかになっていない。 そこで、以上のことを背景に、本論文では側根形成制御機構のさらなる解明を目的として行った2つの研究についてII章とIII章に記した。 II章では、側根形成において機能する新たな因子を同定するため、側根形成に異常があるシロイヌナズナの優性変異体<i>crane-1</i>および<i>crane-2</i>を単離し、主に分子遺伝学的な手法を用い解析した。<i>crane</i>変異体では側根数が顕著に減少しており、オーキシン誘導性の側根形成能も低下していた。このことは、<i>crane</i>変異体においてオーキシン感受性が低下していることを示す。また、<i>crane</i>変異体は、明所における胚軸の徒長、本葉の下偏成長、稔性の低下など、地上部にも多面的な表現型をもつ。これらの<i>crane</i>変異体の表現型は、Aux/IAA転写抑制因子ファミリーのメンバーであるIAA18タンパク質の機能獲得型変異によって引き起こされていた。<i>IAA18</i>プロモーター::<i>GUS</i>の発現は根においては側根形成の初期のステージにおいてみられた。酵母two-hybrid法により、IAA18はARF7およびARF19と相互作用することが明らかになった。これらの結果から、CRANE/IAA18はシロイヌナズナの側根形成に関与しており、ARF7およびARF19の活性を負に制御する因子であることが示された。そして、これらの解析結果をもとに新たなARF-Aux/IAAシグナル伝達系による側根形成制御のモデルを提唱した。 続いてIII章では、側根形成で機能するLBD16/ASL18下流遺伝子の同定および解析を行った。ARFやAux/IAAの下流で側根形成制御において機能する因子として同定されたLBD16/ASL18やLBD29/ASL16タンパク質は、核に局在し、キメラリプレッサーを融合したLBD16/ASL18タンパク質の発現によりオーキシン応答性の遺伝子発現や側根形成が抑制されることから、転写活性化因子として機能していることが示唆されている。しかしながら、側根形成制御における分子機能や転写制御のターゲットなどは明らかになっていなかった。そこで、LBD16/ASL18の下流で側根形成を制御している因子を同定するため、マイクロアレイを用いLBD16/ASL18の機能誘導による発現が誘導される遺伝子を抽出し、それらの解析を行った。まず、得られたマイクロアレイ解析の結果および、以前に報告されているARF7の機能誘導によって発現上昇する遺伝子リストや、<i>slr</i>変異の影響を受ける遺伝子リスト、および公共のデータベースの情報を元に、LBD16/ASL18下流候補遺伝子を11に絞り込んだ。これらの候補遺伝子には、<i>ARF</i>や<i>GH3</i>、<i>AHK</i>等の植物ホルモンのシグナル伝達や代謝に関与することが知られているものに加え、リパーゼやペルオキシダーゼ等の酵素、さらには機能未知のタンパク質も複数含まれていた。候補遺伝子について側根形成変異体における発現のオーキシン誘導性や、候補遺伝子の組織レベルでの発現解析の結果、LLPLモチーフと名付けたモチーフをもつ機能未知タンパク質をコードするAt2g39370遺伝子については側根原基特異的な発現が観察され、この遺伝子が側根形成において機能している可能性が強く示唆された。 最後にIV章では、II章、III章の解析結果から考えられるオーキシンを介した側根形成制御機構について議論されている。 本論文のII章で記載した解析は、シロイヌナズナに29あるAux/IAAファミリーのメンバーのうち、機能未知であったIAA18の植物発生における役割、特にオーキシンを介した側根形成における役割を明らかにした点で学術的に重要性が高い。また、III章の解析は、シロイヌナズナに23あるARFメンバーのうち、器官形成（側根形成）で機能するARF（ARF7/19）の下流因子（LBD16/ASL18）のさらに下流遺伝子を同定したことにより、ARFを介したオーキシンによる形態形成の分子カスケードに関して新しい知見をもたらした。 本研究は、シロイヌナズナのオーキシンを介した側根形成制御機構に関わる新たな因子を研究したものであり、植物の側根形成機構について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者の上原健生は、博士（理学）の学位を得る資格あると認める。	