

学位論文題名

Molecular genetic and physiological studies on auxin-induced differential growth responses in *Arabidopsis hypocotyls*

(シロイヌナズナ胚軸でのオーキシン依存性偏差成長反応機構の
分子遺伝学的、生理学的研究)

学位論文内容の要旨

植物ホルモンであるオーキシンは植物の様々な成長反応を制御している。現在、それら成長反応は、オーキシン初期応答性因子 ARF と Aux/IAA が関与する反応機構と、RUB1-activating Enzyme のサブユニット・タンパクをコードする *AXR1* 遺伝子座が関与するユビキチンプロテアソーム系によるタンパク分解の2つの機構によって制御されていると考えられている。シロイヌナズナ胚軸での偏差成長反応もオーキシンにより制御されていると考えられているが、オーキシンの関与を含めたその反応分子機構は不明な点が多い。最近、胚軸偏差成長に特異的な劣性突然変異体 *non-phototropism hypocotyl4/massugul1* (*nph4/msg1*; Liscum and Briggs, 1995; Watahiki and Yamamoto, 1997) の原因遺伝子がオーキシン応答性転写因子族遺伝子 *ARF7* であることが明らかになった (Harper et al., 2000)。また、オーキシン耐性劣性突然変異体 *axr1* (Estelle and Somerville, 1987) は多面的なオーキシン生理作用に対して欠損を示し、偏差成長反応も異常である。遺伝学的解析から *NPH4* と *AXR1* は異なる反応経路上で作用していることが明らかになっている (Watahiki et al., 1999)。しかしながら、これら以外にも偏差成長に関わる因子の存在が予想されたので、オーキシン片側塗布による人工的胚軸屈曲反応 (Watahiki and Yamamoto, 1997) を利用して、新規の胚軸屈曲反応欠損突然変異体のスクリーニングを行ったところ、新規の優性突然変異体 *msg2* を単離することができた (Tatematsu, 1998)。

本研究ではまず初めに、*MSG2* 遺伝子座の単離を試みた。染色体歩行法により *MSG2* は3番染色体上の分子マーカー *nga162* の近傍 190-kb の領域に位置することがわかった。その領域に存在する P1 クローン MJK13 上に *Aux/IAA* 遺伝子族の *IAA19* 遺伝子 (Kim et al., 1997) が存在したので、*msg2* の4つのアレルについて *IAA19* の塩基配列を調べた。その結果、いずれのアレルでも *AXR2/IAA7* (Nagpal et al., 2000)、*AXR3/IAA17* (Rouse et al., 1998) や *SHY2/IAA3* (Tian & Reed, 1999) の優性突然変異と同様のアミノ酸置換を引き起こす塩基置換が検出された。以上の結果から、*MSG2* が *IAA19* であることがわかった。*msg2* での *IAA19* の発現を調べたところ、野生型よりも発現量が低下しており、野生型では観察されるオーキシン誘導性も見られなかった。また、*IAA19* はロゼット葉では発現が

見られず、その発現に器官特異性があることが示された。

msg2 地上部の外観は野生型によく似ている。*msg2* の花は成長の初期では不稔だが、齢が進むにつれて正常になるので、全体としては稔性がやや低い。*msg2* の胚軸は IAA 塗布による人工的屈曲反応をまったく示さなかった。*msg2* の胚軸は負の屈地性もまったく示さず、青色光による屈光性は野生型に比べて弱い。*msg2* の黄化芽生えではフック形成も弱い。*msg2* の胚軸は合成オーキシンである 2,4-D に対して耐性を示し、その程度はオーキシン耐性突然変異体 *axr1* や *nph4* よりも強かった。また、*msg2* の根では側根形成が低下していた。以上の結果から、*msg2* が示す表現型は、胚軸での偏差成長反応とオーキシン感受性に特異的という点で、*nph4* に最もよく似ていた。

ARFタンパクと Aux/IAA タンパクが C末端のドメイン (Carboxyl-terminal domain; CTD) を通してヘテロダイマー形成することが既に報告されている(Kim et al., 1997; Ulmasov et al., 1997)。MSG2 と NPH4 がそれぞれ IAA19 と ARF7 をコードしていることから、*msg2* の異常な表現型は優性変異した MSG2/IAA19 遺伝子産物と NPH4/ARF7 がヘテロダイマーを形成し、後者の正常な機能を妨害していることに起因すると予想される。そこでこの仮説を検証するために酵母の two-hybrid 系を用いて ARF7 の CTD と IAA19 の相互作用を調べた。その結果、両者のヘテロダイマー形成はそれぞれのホモダイマー形成よりも起こりやすく、IAA19 の優性突然変異は両者のヘテロダイマー形成能に影響を及ぼさなかった。また、ARF7 CTD と IAA1、IAA6 または IAA13 との、また、IAA19 と ARF5 CTD または ARF8 CTD のヘテロダイマー形成は ARF7 CTD と IAA19 の組み合わせと同程度の結合活性を示し、調べた範囲では ARF CTD と IAA タンパクの間に特異的な組み合わせがないことが明らかになった。Aux/IAA の優性変異により細胞内の同タンパク・レベルが増加することが報告されているので(Worley et al., 2000; C6lon-Carmona et al., 2000)、*msg2* では IAA19 が蓄積して IAA19・ARF7 ヘテロダイマーの割合が増加し、その結果 ARF7 ホモダイマー形成が阻害されて偏差成長異常が起こると考えられる。また、ARF と IAA タンパクのヘテロダイマーの組み合わせに特異性がなかったことを考えると、組み合わせの特異性を決めているのはそれぞれの遺伝子の時間的・空間的発現様式で、胚軸での偏差成長反応時には ARF7 と IAA19 が胚軸で特異的に発現していると予想される。

さらに NPH4、AXR1 と *msg2* の 3 者による偏差成長の制御機構を二重突然変異体を用いて研究した。*msg2* と *nph4* の leaky なアレルである *nph4-102* の二重突然変異体の胚軸は屈地性異常とオーキシン耐性ではより強い異常を示す *msg2* と同程度になり、屈光性とフック形成異常に関しては相加的な効果が見られた。この結果は、前述の *msg2* 突然変異体での偏差成長阻害の分子機構のモデルをほぼ支持するものであった。一方、*msg2 axr1* 二重突然変異体の胚軸は、屈光性とフック形成ではより強い欠損を示す *axr1* と同じ表現型を示し、オーキシン耐性では相加的な効果が見られた。また、屈地性については *axr1* 変異による *msg2* の屈地性欠損の部分的な抑制が見られた。以上の結果から、優性変異した *msg2* は AXR1 と同一の反応経路上で作用していること、*msg2* 胚軸で観察される屈地性の欠損には AXR1 が必要であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 本 興 太 朗
副 査 教 授 田 中 歩
副 査 助 教 授 奥 山 英 登 志
副 査 助 教 授 山 崎 健 一

学 位 論 文 題 名

Molecular genetic and physiological studies on auxin-induced differential growth responses in *Arabidopsis* hypocotyls

(シロイヌナズナ胚軸でのオーキシン依存性偏差成長反応機構の
分子遺伝学的、生理学的研究)

植物ホルモンであるオーキシンは植物の様々な成長反応を制御しているが、その中で屈地性や屈光性などの偏差成長反応は比較的簡単な系で、オーキシンの作用機構を分子的に明らかにするのに適していると考えられる。そこで申請者は、同反応について従来十分行われて来なかった分子遺伝学的研究を行った。すなわち、申請者はオーキシン片側塗布による人工的胚軸屈曲反応 (Watahiki and Yamamoto, 1997) を利用して、新規の胚軸偏差成長反応欠損突然変異体のスクリーニングを行ったところ、修士課程で新規の優性突然変異体 *msg2* を単離することができたので (Tatematsu, 1998)、本論文では同遺伝子座の単離と生理学的性格付けをおこなった。

本研究では、まず初めに *MSG2* 遺伝子座の単離を試みた。染色体歩行法により *MSG2* は 3 番染色体上の分子マーカー *nga162* の近傍 190 kb の領域に位置することがわかった。その領域に存在する P1 クローン MJK13 上に *Aux/IAA* 遺伝子族の *IAA19* 遺伝子 (Kim et al., 1997) が存在したので、*msg2* の 4 つのアレルについて *IAA19* の塩基配列を調べた。その結果、いずれのアレルでも *AXR2/IAA7* (Nagpal et al., 2000)、*AXR3/IAA17* (Rouse et al., 1998) や *SHY2/IAA3* (Tian & Reed, 1999) の優性突然変異と同様のアミノ酸置換を引き起こす塩基置換が検出され、*MSG2* が *IAA19* であることがわかった。*msg2* では *IAA19* の発現は野生型よりも低下しており、野生型で観察されるオーキシン誘導性も見られなかった。

msg2 地上部の外観は野生型によく似ている。*msg2* の胚軸はオーキシン塗布による人工的屈曲反応をまったく示さない。*msg2* の胚軸は負の屈地性も示さず、青色光による屈光性は野生型に比べて弱い。*msg2* の黄化芽生えではフック形成も弱い。*msg2* の胚軸は合成オーキシンである 2,4-D に対して非感受性で、その程度は他のオーキシン非感受性突然変異体よりも強かった。また、*msg2* の根で

は側根形成能が低下していた。オーキシンに対する応答性が異常になった突然変異体は何種類か発見されているが、その中で *msg2* の表現型は、胚軸での偏差成長反応とオーキシン感受性に特異的であるという点で *nph4* に最もよく似ていた。

msg2 に表現型がよく似ている *nph4* の原因遺伝子がオーキシン応答性転写因子 ARF7 であることも申請者らは明らかにしたが (Harper et al., 2000)、ARF タンパクと IAA タンパクが C 末端のドメイン (Carboxyl-terminal domain; CTD) をとってヘテロダイマー形成することが既に報告されているので (Kim et al., 1997; Ulmasov et al., 1997)、*msg2* の異常な表現型は、優性変異した *MSG2/IAA19* 遺伝子産物と *NPH4/ARF7* がヘテロダイマーを形成し、後者の正常な機能を妨害することに起因すると予想される。そこで、この仮説を検証するために酵母の two-hybrid 系を用いて ARF7 の CTD と IAA19 の相互作用を調べた。また、比較対照のために、ARF5 と ARF8 の CTD、IAA1 や IAA6 との相互作用も調べた。その結果、(1) IAA19 と ARF7 CTD とのヘテロダイマー形成はそれぞれのホモダイマー形成よりも起こりやすかったが、(2) IAA19 の優性突然変異自体は両者のヘテロダイマー形成能に影響を及ぼさなかった。また、(3) 調べた範囲の IAA タンパクと ARF CTD の間では相互作用が特に強い特異的な組み合わせはないことがわかった。Aux/IAA の優性変異により細胞内の同タンパク・レベルが増加することが報告されているので (Worley et al., 2000; Colón-Carmona et al., 2000)、*msg2* では IAA19 が蓄積して IAA19・ARF7 ヘテロダイマーの割合が増加し、その結果 ARF7 ホモダイマー形成が阻害されて偏差成長異常が起こると考えられる。

最後に、オーキシンによる偏差成長を支配していることがわかった 3 遺伝子、*NPH4*、*AXR1* と *msg2* の相互作用を二重突然変異体を用いて研究した。*msg2* と *nph4* の leaky なアレルである *nph4-102* の二重突然変異体の表現型は、前述の *msg2* 突然変異体での偏差成長阻害の分子機構のモデルをほぼ支持するものであった。一方、*msg2 axr1* 二重突然変異体の胚軸は、屈光性とフック形成ではより強い欠損を示す *axr1* と同じ表現型を示し、オーキシン耐性では相加的な効果が見られた。また、屈地性については *axr1* 変異による *msg2* の屈地性欠損の部分的な抑制が見られた。以上の結果から、優性変異した *msg2* は *AXR1* と同一反応経路上で作用していること、*msg2* 胚軸で観察される屈地性の欠損には *AXR1* が必要であることが示唆された。

以上の結果は、屈地性や屈光性等の偏差成長はオーキシンが調節している反応であることを明確に示すとともに、その反応の中心を形成しているのは、オーキシン早期誘導性遺伝子タンパク IAA19 とオーキシン応答性転写因子 ARF7 の相互作用であることを示唆しており、同反応を分子レベルで解明する突破口を発見したと評価できる。審査員一同は、この成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や単位取得などもあわせ、申請者が博士 (地球環境科学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。