

博士(地球環境科学) 佐藤敦子

学位論文題名

Molecular genetic studies on the noncanonical *Aux/IAA* genes of *Arabidopsis* by means of overexpression strategy

(過剰発現法を用いたシロイヌナズナ非典型的 *Aux/IAA* 遺伝子の分子遺伝学的研究)

学位論文内容の要旨

*Aux/IAA*遺伝子族はオーキシンを投与することによって発現が素早く上昇する遺伝子群で、オーキシンの一次反応を担っているのではないかと古くから考えられてきた。本年、オーキシン受容体TIR1にオーキシンと共に結合することが分かり(Tan et al., 2007)、オーキシン信号伝達系で受容体直下で働く因子であることが確定した。*Aux/IAA*タンパク質には保存されている4つのドメイン、ドメインIからIVがある。ドメインIは転写調節因子の抑制ドメインである。ドメインIIIとIVはオーキシン応答因子(ARF)も共通して持っていて、このドメインを通じて*Aux/IAA*はARFに結合することができる。通常、*Aux/IAA*はARFに結合してARFの転写調節能を抑制している。オーキシン受容体TIR1はユビキチンリガーゼSCF複合体のFボックス・タンパク質で、基質結合部位を提供している。TIR1の基質結合部位はオーキシン(1-インドール酢酸)にも結合することができ、オーキシンに結合すると*Aux/IAA*タンパク質のドメインIIに対する親和性が増加する。その結果、高濃度のオーキシン存在下では*Aux/IAA*タンパク質はプロテアソームで積極的に分解され、*Aux/IAA*レベルが低下する。ARFの転写調節能が回復して、さまざまな下流の遺伝子発現調節が起り、オーキシン応答が起こると考えられている。一方、*Aux/IAA*自身もオーキシン誘導性なので、しばらくすると*Aux/IAA*レベルが元に戻り、オーキシン応答は停止する。このフィードバック調節がオーキシンの一過的応答現象の分子的原因と考えられる。*Aux/IAA*遺伝子が原因となる優性突然変異体が、シロイヌナズナの29個の*Aux/IAA*の内、9個について報告されているが、そのすべてがドメインIIのアミノ酸置換によって起こっている。ドメインIIにアミノ酸置換が起こると、TIR1に結合できなくなり*Aux/IAA*が分解されなくなって蓄積されることにより生じる優性突然変異だと考えられる。

典型的*Aux/IAA*タンパク質にはドメインIからIVが存在するが、シロイヌナズナの29個の*Aux/IAA*の中にはドメインIIだけがない非典型的*Aux/IAA*が4個存在する。またもう一つの*Aux/IAA*は、ドメインIIに優性突然変異に似たアミノ酸配列を持っている(IAA31)。本研究では、この中でIAA20に構造が似ている3個のタンパク質IAA20とIAA30とIAA31(IAA20サブファミリー)に着目した。IAA20と30はドメインIIを持っていないのに対し、IAA31は優性突然変異型ドメインIIを持っているので、その機能を互いに比較するのに適しているからである。これら非典型的*Aux/IAA*の生理的機能を推測するために、これら遺伝子をカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターを利用して過剰発現させ、どのような表現型異常が生ずるか観察した。また対照として、典型的*Aux/IAA*であるIAA19/MSG2の過剰発現体も作成してその表現型を比較した。

IAA20の過剰発現体(IAA20 OX)は半矮性で、芽生えの胚軸も短く、その成長方向は胚軸も根も完全に乱れてい

て、屈地性がともに異常であることが示唆された。花茎はしだれていって、屈地性異常を示唆したほか、稔性も低下していた。種子の発芽率も低下していた。主根の成長は発芽後すぐに停止してしまうが、それは根端分裂組織(RAM)が分裂能を失って分化してしまうこと(RAMの崩壊)による。しかし同時に、主根から側根が生じ、側根が阻害されながらも成長するので、植物は半矮性ながら生育する。子葉の葉脈形成も異常で、最も異常な場合、中央葉脈すら完全にできなかつた。

*IAA30* OXは野生型とほぼ同じ大きさだった。芽生え胚軸の成長方向はやや異常で、根の成長方向は*IAA20* OX同様完全に異常だった。*IAA30* OXも*IAA20* OX同様、根の成長異常が起こるが、その程度は*IAA20* OXよりやや軽い。子葉の葉脈形成は比較的正常で、この3種のOXの中で一番異常が軽かつた。

*IAA31* OXは*IAA20* OXほどではないが野生型より小さく、最も異常な#2系統では主茎の成長が早期に停止してしまう異常が起こつた。芽生え胚軸の長さは野生型と同じで、胚軸の成長方向はやや異常だったが、根の成長方向は相当程度異常だった。*IAA31* OXも根の成長阻害が起こるが、その程度はかなり軽く、主根のRAMの崩壊が起ららない個体もあつた。子葉の葉脈形成はかなり異常で、中央葉脈がやっと形成される程度に止まつた。

これら遺伝子の発現をRT-PCRで調べたところ、*IAA20*の発現がロゼット葉と茎で低かつた他は、いずれの遺伝子もだいたいどの組織でも発現していたが、*IAA31*は特に果実で発現が高かつた。*IAA20*と30はオーキシン投与後30分後には発現増加が観察されオーキシン誘導性であったが、*IAA31*はオーキシン誘導性ではなかつた。

以上をまとめると、これら3個の遺伝子のOXはおおよそ類似した表現型異常を示したが、*IAA20* OXの異常が最も強く、その次が*IAA30*で、*IAA31* OXの異常が最も軽かつた。野生型のAux/IAA遺伝子は、その産物がプロテアソームによって積極的に分解されるため、35Sプロモーターで過剰発現させても表現型異常はほとんど生じないと考えられている。そこで、*IAA19* OXの表現型を調べたところ、やや植物体が小さくなる系統が生じたことと側根形成能が低下した他は、表現型異常は見られず、従来の見解を支持する結果となつた。以上の結果は、*IAA20*サブファミータンパク質はドメインIIを失つていたり、そのアミノ酸配列が独特なことから、過剰発現させると表現型異常が出現しやすいことを示唆している。

*IAA20*サブファミー遺伝子のOXでは主根のRAMが崩壊するという表現型が見られたが、これは $plt1$   $plt2$ 二重突然変異体の表現型とよく似ている。*PLT*は $ARF5/MP$ と $ARF7/NPH4$ の下流で働く遺伝子で、RAMの確立と維持に働いている(Aida et al., 2004)。35SプロモーターはRAMで活性があることと、*IAA20*と30は $PLT$ や $ARF5$ や $ARF7$ 同様、根端の静止中心と根冠のコルメラに特異的に発現する遺伝子であることを考えると(Nawy et al., 2005)、*IAA20*と30は根端分裂組織の確立と維持に $ARF5$ と7の活性を調節することによって機能していると考えられる。

ドメインIIを持たない*IAA20*と30はオーキシン依存的な分解を受けないと考えられるので、他の典型的Aux/IAAよりレベルの変動が少ないと想像できるが、一方でこれらタンパク質はオーキシンの一次反応を担うことはできない。本研究の成果は、典型的Aux/IAAと非典型Aux/IAAがどのように協調してRAMの発生と維持に関わっているのかを詳細に明らかにする道を開いたと言えよう。

# 学位論文審査の要旨

主査 准教授 山崎健一

副査 教授 森川正章

副査 教授 大原雅

副査 教授 山本興太朗(大学院理学研究院)

## 学位論文題名

### Molecular genetic studies on the noncanonical *Aux/IAA* genes of *Arabidopsis* by means of overexpression strategy

(過剰発現法を用いたシロイヌナズナ非典型的 *Aux/IAA* 遺伝子の分子遺伝学的研究)

*Aux/IAA* 遺伝子族はオーキシンの一次反応を担っている遺伝子で、シロイヌナズナには29個存在する。典型的 *Aux/IAA* タンパク質にはドメインIからIVが存在するが、オーキシン受容体結合部位であるドメインIIを欠いている非典型的 *Aux/IAA* も存在する。また、IAA31のように、ドメインIIに優性突然変異に似たアミノ酸配列を持っている *Aux/IAA* も存在する。本研究では、シロイヌナズナ *Aux/IAA* の中でドメインIIを持たない IAA20 と IAA30、そして前述の IAA31 に着目し、これら互いにアミノ酸配列がよく似ている *IAA20* サブファミリー遺伝子をカリフラワーモザイクウィルス 35S プロモーターを用いて過剰発現させた形質転換体を作成した。そして、この過剰発現体でどのような表現型異常が生ずるか観察することによって、非典型的 *Aux/IAA* の生理的機能を推測することを試みた。また対照として、典型的 *Aux/IAA* である *IAA19/MSG20* の過剰発現体も作成してその表現型を比較した。

*IAA20* の過剰発現体 (*IAA20 OX*) は半矮性で、芽生えの胚軸も短く、その成長方向は胚軸も根も完全に乱れていて、屈地性がともに異常であることが示唆された。花茎はしだれていって、屈地性異常を示唆したほか、稔性も低下していた。種子の発芽率も低下していた。主根の成長は発芽後すぐに停止してしまうが、それは根端分裂組織が分裂能を失って分化してしまうこと(根端分裂組織の崩壊)による。しかし同時に、主根から側根が生じ、側根が阻害されながらも成長するので、植物は半矮性ながら生育する。子葉の葉脈形成も異常で、最も異常な場合、中央葉脈すら完全にできなかった。

*IAA30 OX* と *IAA31 OX* も *IAA20 OX* と類似した表現型異常を示したが、*IAA20 OX* ほど異常は強くなかった。野生型の *Aux/IAA* 遺伝子は、その産物がプロテアソームによって積極的に分解されるため、35S プロモーターで過剰発現させても表現型異常はほとんど生じないと考えられている。実際 *IAA19 OX* では、やや植物体が小さくなり側根形成能が低下した系

統が少数生じた他は、表現型異常は見られず、従来の見解を支持する結果となった。以上の結果は、*IAA20*サブファミリータンパク質はドメインIIを失っていたり、そのアミノ酸配列が独特なことから、過剰発現させると表現型異常が出現しやすいことを示唆している。

これら遺伝子の発現を定量的RT-PCRで調べたところ、いずれの遺伝子も調べたすべての組織で発現していたが、*IAA20*は黄化芽生えで、*IAA30*は根で発現が高かった。また、*IAA31*は果実で発現が特に高かった。*IAA20*と*IAA30*はオーキシン添加後1時間以内に発現が誘導されるオーキシン早期誘導性であったが、*IAA31*はオーキシンに応答しなかった。

*IAA20*サブファミリー遺伝子のOXでは主根の根端分裂組織が崩壊するという表現型が見られたが、これは $plt1$   $plt2$ 二重突然変異体の表現型とよく似ている。*PLT*は $ARF5/MP$ と $ARF7/NPH4$ の下流で働く遺伝子で、根端分裂組織の確立と維持に働いている (Aida et al., 2004)。35Sプロモーターは根端分裂組織で活性があることと、*IAA20*と*IAA30*は $PLT$ や $ARF5$ や $ARF7$ 同様、根端分裂組織に特異的に発現する遺伝子であることを考えると (Nawy et al., 2005)、*IAA20*と*IAA30*は根端分裂組織の確立と維持に $ARF5$ と $ARF7$ の活性を調節することによって機能していると考えられる。

ドメインIIを持たない*IAA20*と*IAA30*はオーキシン依存的な分解を受けないと考えられるので、他の典型的Aux/IAAよりレベルの変動が少ないと想像できるが、一方でこれらタンパク質はドメインIIを欠失しているので、オーキシンの一次反応を担うことはできない。本研究の成果は、典型的Aux/IAAと非典型的Aux/IAAがどのように協調して根端分裂組織の発生と維持に関わっているのかを詳細に明らかにする道を開いたと言えよう。根端分裂組織の発生と維持は、植物の環境適応に重大な意義を持つ根系構築の基礎となる現象であるので、本研究の成果は環境科学に大きく貢献すると評価できる。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。