

オーキシンによる植物細胞の制御機構の解析

Analysis of regulation of plant cells by auxin

研究代表者 東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻・助教授 高橋 陽介
Assoc. Prof., Department of Biological Sciences, Graduate School of Science,
University of Tokyo
Yohsuke Takahashi

共同研究者 東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻・教授 長田 敏行
Prof., Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, University of
Tokyo
Toshiyuki Nagata

Phytohormones play critical roles in the coordination of plant and development. Among classical plant hormones, auxins control more fundamental and diverse aspects of plant physiology and development. Determinating the mechanisms of action of auxins will make a major contribution to our understanding of plant science. One way to elucidate the mode of action of auxins is to clone auxin-regulated genes and to identify the functions of their products. A study of the hormonal activation of transcription of these genes should resolve the signal-transduction systems involved in this process. We have isolated auxin-induced genes from tobacco mesophyll protoplasts and tobacco cultured cell line of BY-2, and studied about the molecular mechanism of hormonal activation of transcription with these genes and about the function of their products.

研究目的

地球上において光エネルギーを化合物に転換することで全生命体を支える植物は、自らは移動できない存在である故に、養分、光、水などの欠乏といった様々の外部環境の変化にさらされている。これに対応するため植物はしばしば発生のプログラムを変更し驚くほど柔軟に形態を変化させるが、それは植物細胞の持つ分化の可塑性に依る。植物細胞の分化、分化転換には植物ホルモンが中心的な役割を果たしているが、動物の多様な情報伝達物質に比べ古典的植物ホ

ルモンは5種類とその数が少ない。その代りそれぞれが実に様々な生理活性を持つことから、植物ホルモンの作用の背景には何らかの未知なメカニズムが働いていると考えられてきた。なかでも植物ホルモンとして最初に発見されたオーキシンは細胞分裂、形態形成等にもっとも広範な作用を示す物質であり、オーキシンの作用機構の解明は植物科学における最重要課題の一つと言える。最近、オーキシンはその生理作用を発現する際、遺伝子発現のプログラムにも大きな影響を直接与えることが明らかになり

つつある。オーキシンで発現が誘導される遺伝子の転写制御の解析はオーキシンのシグナル伝達経路の解明に結びつき、遺伝子産物の機能の解析は将来オーキシン生理作用の分子機構の解明につながると思われる。

我々はタバコ葉肉細胞プロトプラストおよびタバコ培養細胞 BY-2 からオーキシンで発現が制御される遺伝子をクローン化した。本研究では BY-2 からクローン化した *arcA* に関しては主にその遺伝子産物の機能について、タバコ葉肉細胞プロトプラストからクローン化した *parA*, *parB*, *parC* に関しては主に遺伝子発現の制御機構について解析する事を目的とした。

研究経過と研究成果

1) BY-2 からクローン化された *arcA* 産物の解析

培養細胞 BY-2 は植物細胞としては他に類のない増殖速度を有しており、生化学的解析に好適である。2,4-D 飢餓により細胞分裂を停止した BY-2 に 2,4-D を再添加すると、12 時間後には約 20%の細胞が分裂する。この実験系から 2,4-D により発現が誘導される遺伝子 *arcA* の cDNA をクローン化した。*arcA* の mRNA の蓄積は 2,4-D の添加後 1 時間以内に認められるが、オーキシン以外の植物ホルモン、CdCl₂ や熱ショックの影響を受けない。構造解析の結果 *arcA* は三量体型 GTP 結合タンパク質の β サブユニット ($G\beta$) ファミリーに属することが明らかになった。 $G\beta$ ファミリーは CDC4 や光形態形成に関与する COP1 等の様々な生体制御因子で構成され、WD-40 repeat と呼ばれる 40 アミノ酸を単位とする分子内繰り返し構造を有する。 $G\beta$ ファミリーのなかでも *arcA* は *Cblp*, *CI2.3*, *RACK1* 等と共にサブファミリーを形成している。これらの

遺伝子産物間では、高等植物から哺乳動物に至る広範な種間にわたって約 70 %の アミノ酸が同一という極めて高い相同性が保持されている。したがってこれらの遺伝子産物は生命にとって基本的な機能を有していると推測される。*arcA* の機能解析は植物固有の課題として重要であると同時に真核生物一般の課題としても重要と考えられた。このうちラットの RACK1 は活性化された C キナーゼと結合することが報告されている (Ron *et al.*, 1994)。出芽酵母の全ゲノム構造の決定に伴い酵母にも、*arcA* と 46%の アミノ酸が同一な遺伝子が存在することが解った。我々は遺伝子破壊により、酵母の *arcA* は通常の増殖には必須ではない事を明らかにした。外部環境変化へ適応する際の情報伝達などに関与しているのであろう。

$G\beta$ ファミリーに属する蛋白質は複合体を形成し機能する場合が多く、WD-40 repeat 構造はタンパク質間の相互作用のモチーフと考えられている。例えば $G\beta$ ファミリーの TUP1 は SSN6 というタンパク質と結合して転写の抑制因子として機能する。そこで two-hybrid 法で *arcA* 産物と特異的に結合するタンパク質の探索を行った。そのうちの一つは哺乳類の K⁺チャンネルの β サブユニットと高い相同性を示した。膜電位依存性 K⁺チャンネルはチャンネル孔を形成する α サブユニットとこれを細胞質側から制御する β サブユニットにより構成されている。今回クローン化したタバコの β サブユニット様タンパク質には C キナーゼによりリン酸化される可能性のある配列が 10 箇所存在していた。ただし植物では C キナーゼの存在は示唆されているものの、未だに同定されていない。K⁺チャンネルの β サブユニット様タンパク質と *arcA* 産物の相互作用の生物学的意義は現在のところ明らかではないが、これまでの知見を

総合すると *arcA* 産物を介して C キナーゼが K⁺ チャンネルの β サブユニットをリン酸化し、K⁺ チャンネルの開閉を制御する可能性が考えられる。

2) タバコ葉肉細胞プロトプラストからクローン化された *par* 遺伝子群の転写制御に関する解析

タバコ葉肉細胞プロトプラストは適切な条件下でオーキシンとサイトカイニンを加えて培養すると静止状態を脱して、ほぼ同調的に細胞分裂を開始する。我々は葉肉細胞プロトプラストが静止状態から S 期に移行する過程でオーキシンにより発現が誘導される遺伝子 *parA*, *parB*, *parC* の cDNA をクローン化し解析した。これらの遺伝子の mRNA はオーキシンを加えてから約 10-20 分後に検出されるが、他の植物ホルモンは効果がない。*parA* が CdCl₂ で誘導される点を除けば *parA*, *parB*, *parC* の遺伝子発現のパターンはよく似ている。

parB の遺伝子産物はグルタチオン S-トランスフェラーゼの活性を有し、シロイヌナズナの膜画分に存在するオーキシン結合タンパク質と約 58% のアミノ酸が同一である。*parB* の産物も IAA と結合することが示されているが、その生物学的な意義は現在のところ不明である。*parB* はタバコ個体では茎頂、根端、側根の原基で特異的に発現しており分裂や分化に関与していることが予想された。我々は *parB* のオーキシンに関するシス配列を形質転換タバコを使って解析し、*parB* の 5' 上流域 -210 ~ -162 までの 49 bp (ARE I) と -374 ~ -279 までの 96 bp (ARE II) の二つの領域が、生理的濃度のオーキシンに独立に応答して最小プロモーターを活性化できることを示した。また点突然変異を導入した実験などから、*parB* のオーキシンによる転写の活性化は 6 bp 程度の

単一のモチーフにより制御されているのではなく、ある程度離れて存在する複数のモチーフの協調作用によることが示された。

転写の制御にはシス配列に特異的に結合するタンパク質、さらにはその DNA 結合タンパク質と他の転写因子との相互作用が重要である。one-hybrid 法により *parB* の ARE I と II に結合するタンパク質の cDNA を探索した。ARE II に結合するタンパク質の cDNA クローンの一つは DNA 結合タンパク質のモチーフである塩基性領域-ロイシンジッパー (bZIP) 構造を持っていた。bZIP 構造以外の領域では他のタンパク質と顕著な相同性は認められなかったが、N 末側にアスパラギン酸が密集している領域が、C 末側にグルタミンが密集している領域が存在した。おそらく転写の活性化に関与していると推定される。今回クローン化した ARE II に結合する bZIP 型の転写因子が単独でオーキシンによる転写誘導を制御しているのか、あるいは他の転写因子との相互作用が必要であるのかは今後の課題である。

parC のオーキシン応答は -226 から -54 までの領域で制御されていることを示した。この領域内にはオーキシン応答に関与していると思われる配列が二つ存在していた。CaMV35S の *as-1* に類似した配列とエンドウのオーキシン誘導遺伝子 *PS-IAA4/5* に存在する TGTCCCAT と類似の配列である。この 2 つのモチーフに点突然変異を導入して解析したところ *as-1* 類似の配列 (*pas-c*) は *parC* のオーキシン応答に必須であったが、TGTCCCAT 類似の配列は必要ないことが明らかになった。また *as-1* 類似の配列 *pas-c* は単独ではオーキシン応答には十分でなく、他のシス因子も必要であることが明らかになった。*parA* の場合も *as-1* に類似した配列 (*pas-a*) がオーキシン応答に必須であった

が、やはり単独では十分でなかった。ゲルシフト法による解析から、*pas-a* に結合するのは CaMV35S の *as-1* に結合する ASF-1 であることが明らかになった。*pas-c* には ASF-1 は結合せず、他のトランス因子 CSF-1 が結合した。点突然変異の導入によりオーキシンに対する応答性を失った *mtpas-a*、*mtpas-c* は ASF-1、CSF-1 と結合しないので、これらの核タンパク質は *parA* と *parC* のオーキシン応答に関与していると考えられる。*pas-a* は CdCl₂ に単独で応答する事が示されたので *parA* と *parC* の CdCl₂ に対する反応の差は *pas-a*/ASF-1 と *pas-c*/CSF-1 の機能の違いに起因すると考えられる。また前述の *parB* の ARE I に結合する核タンパク質は ASF-1 とも CSF-1 とも異なっていた。

今後の課題と発展

同じタバコ葉肉細胞プロトプラストからクローン化された *parA*、*parB*、*parC* のオーキシンに関する転写調節のメカニズムは当初は同一であろうと予測されたが、それらの制御はそれぞれ異なったシス・トランス因子によることが明らかになった。この結果は植物に対するオーキシンの広範な生理作用が複合的な遺伝子発現の制御機構に起因することを予測させるものである。また他のグループの研究によるとタバコで機能するシス因子はニンジンの培養細胞では機能しないことから、種特異性や組織特異性にも十分に配慮する必要があると考えられる。これらの結果からオーキシンに関するシス配列は複数種類存在し、しかも複数の因子の相互作用により機能していることがわかる。そしてオーキシンの受容から遺伝子活性化に至る情報伝達経路はおそらく一本筋のものではなく、他のホルモン、ストレス刺激等の情報伝達系と相互作用したり、組織特異的あるいは発生段階特異的な制御を

受ける複雑なものであることが想像される。今後は、本研究で明らかになったシス・トランス因子がどのような因子と相互作用するかを解析し、オーキシンの多面的な機能発現の分子機構を明らかにしたいと考えている。

また本研究でクローン化された ARE II に結合する bZIP 型転写因子は植物の形態形成に極めて重要な役割を果たしている事が明らかになった。今後の解析に興味を持たれる。

発表論文リスト

Yanagi, I., Saitoh, T., Ishida, S., Takahashi, Y. and Nagata, T. Isolation and analysis of a cytokinin up-regulated gene from tobacco mesophyll protoplasts. *Plant Cell Physiol.* (1998) in press

Sakai, T., Takahashi, Y. and Nagata, T. (1998) The identification of DNA binding factors for *as-1*-like sequences in auxin-responsive regions of *parA*, *parB* and *parC*. *Plant Cell Physiol.* **39**, 731-739

Kusaba, M., Takahashi, Y. and Nagata, T. (1996) A multiple-stimuli-responsive, *as-1*-related element of *parA* gene confers responsiveness to cadmium but not copper. *Plant Physiol.* **111** 1161-1167

Sakai, T., Takahashi, Y. and Nagata, T. (1996) Promoter analysis of the auxin-induced gene, *parC*, of tobacco mesophyll protoplasts. *Plant Cell Physiol.* **37** 906-913

Ishida, S., Takahashi, Y. and Nagata, T. (1996) The mode of expression and promoter analysis of auxin-regulated *arcA* gene. *Plant Cell Physiol.* **37** 439-448