

## シロイヌナズナを用いたオーキシンの形態形成における機能解析

### Functional analysis of Auxin in Morphogenesis of Arabidopsis

研究代表者 東京都立大学大学院理学研究科生物科学専攻 助手 澤 進一郎  
Tokyo Metropolitan Univ. Dept. of Biological Science, Shinichiro Sawa

It is well known that Auxin should regulate the plant morphogenesis, whereas, its detailed mechanisms is still unclear. Here we show the method how to analyze the auxin function in morphogenesis. We use GAL4-UAS system to analyze it, and we produced the UAS-GFP, UAS-IAAH transgenic plants. We further performed enhancer trap screening using GAL4-VP16 construct. We produced 121 transgenic lines, and we can analyze the auxin function in plant morphogenesis using these lines.

#### 1、研究目的

オーキシンを加えた培地でカルスを誘導させた後、オーキシンのない培地に移し替えると somatic embryogenesis を起こすことから、胚発生のごく初期にオーキシンは軸の決定や胚発生の誘導などに影響を与えていることが想像される。生理学的な解析から、通導組織の分化や細胞分裂の制御などにオーキシンが関与することは知られているが、オーキシンが分子レベルで植物の形態形成にどのような影響を与えているかといった解析はまだ始まったばかりである。

そこで本研究では、オーキシンが形態形成にどのような影響を与えるかを明らかにするためにアグロバクテリアのオーキシン合成酵素である IAAH 遺伝子を用いてエンハンサートラップ探索を行う。様々な発生段階で異所的にオーキシンを生産させることで、各発生段階の各細胞がどのようにオーキシんに反応し、どのような形態の変化を示すかを観察することで、各発生段階において、オーキシンが形態形成にどのように関わっているのかを推測できると考えている。オーキシンを過剰に投与すると植物細胞はカルス化したり、死滅したりするが、

IAAH 遺伝子は基質を投与したときにのみオーキシンを合成するのでオーキシンによる致命的な影響を抑えることができる。植物体外から塗布する等の方法でオーキシンを局所的に与える解析は今までも行われているが、細胞レベルでオーキシンを投与できない、オーキシンを塗布しても細胞の種類、状態により浸透状態が異なる、等の難点により、未だにオーキシンがどのように形態形成に関わっているかが解明されていない。現在までに *in vivo* で局所的にオーキシンを合成させた例はなく、本探索によって、オーキシンの形態形成における機能の一端が明らかにできると考えている。

#### 2、研究経過

##### 2、1、方法

##### GFP の観察

オリンパス BX50 蛍光倒立顕微鏡にて観察を行った。胚は固定後透明化液によって透明化した後、押しつぶし法によってスライドガラス状で鞘から出し、観察した。

##### 形質転換体の作成

ポット上で育てた植物でアグロバクテリウムを介する直接感染法に従った。小ポツ

トに植物を播種し、24時間明条件で一ヶ月生育させた植物を使用した。アグロバクテリウムの培養液 2 ml を集菌して infiltration 培地 [ 1/2 Murashige & Skoog salt base 2.3g/l, B5 Vitamin 0.112g/l, sucrose 50g/l, Mes-KOH 0.5g/l, PH5.7, 0.044mM Benzylaminopurine, 0.02% Silwet L-77 ] 1 ml に懸濁して植物の花芽に塗布した。

#### 遺伝学的掛け合わせ

花発生段階において、花粉が成熟していない段階で雄しべを除去した花を雌親とし、2-3日後雌しべが成熟し、柱頭毛が充分発達したところに雄親の成熟した花粉を受粉させた。

## 2, 2, 結果及び考察

### IAAH 過剰発現株の作成

オーキシンを部位特異的に合成させるために用いる IAAH 遺伝子のクローニング、及び過剰発現形質転換体の作成を行った。遺伝子は PCR によって増幅し、シーケンスにより突然変異がないことを確かめ、35S プロモーターの下流につないだ物を植物に形質転換した (図 1)。

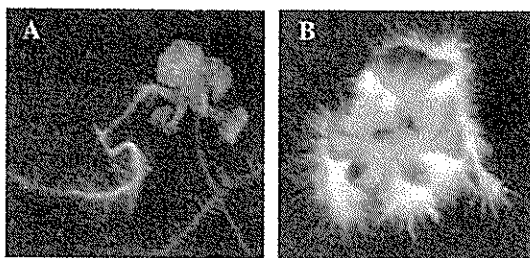


Figure 1. Phenotype of 35S::IAAH transgenic plants. A; without NAM B; including 100uM NAM.

過剰発現株は基質である NAM を加えたときのみ根の形成が活発になった (Fig. 1 A, B)。この表現型はオーキシンを加えたときに出る典型的な表現型で、IAAH が生体内で機能し、基質を加えたときのみオーキ

シンが合成されることを意味している。このことから、IAAH が部位特異的にオーキシンを合成させる遺伝子として機能することが確認できた。

### UAS::GFP, UAS::IAAH 形質転換体の作成

本研究では、生体内で部位特異的、発生時期特異的にオーキシンを合成させることを目的としているので、GAL4-UAS の系を用いた。最終的にどの組織、どの発生段階で IAAH が発現しているかどうかを確認するために、誘導性の UAS プロモーターの下流にレポーター遺伝子である GFP をつなげたコンストラクトと、UAS::IAAH を同時に形質転換した。このコンストラクトにより、GAL4 が発現した組織、細胞のみでオーキシスが合成されることが期待できる。

### GAL4-VP16 遺伝子を用いたエンハンサートラップスクリーニング

GAL4-VP16 のコンストラクトは Haseloff らによりシロイヌナズナで機能することが分かっている物を使用した。このコンストラクトを pZP211 植物形質転換用コンストラクトに導入し、さらに、薬剤耐性遺伝子として bar 遺伝子を導入した。Bar 遺伝子により、除草剤の BASTA に耐性になり、ポットで選択できるため容易に大量の形質転換体が得られることになる。我々はこの方法により、前節で作成した UAS::GFP, UAS::IAAH 形質転換体にさらに形質転換し、212 ラインの形質転換体を得た。

212 ラインの内、50 ラインでは芽生え、及び胚での発現は認められなかった。のこりの 162 ラインの内、全体的に光る物が 38 ライン、残りの 124 ラインについては部位特異的な発現が見られた (Figure 2)。

根端部で発現する物が 124 ラインの内

4 2 ラインと大多数を占めた。Fig.2A は根端部の分裂組織での GFP の発色を示している。Fig.2B では根端部のコルテックス及び静止中心、コルテックスとエンドダームスの始原細胞での発色が確認された。この2つのラインを用いて、オーキシンを合成させると分裂組織でのオーキシシンレベルを調節できるのでオーキシシンの濃度依存的にどのような伸長速度を維持しているのか、コルテックスやエンドダームスの分化にはオーキシシンがどのような影響を与えているのか等が明らかになると考えられる。また、静止中心でのオーキシシン量を同時に

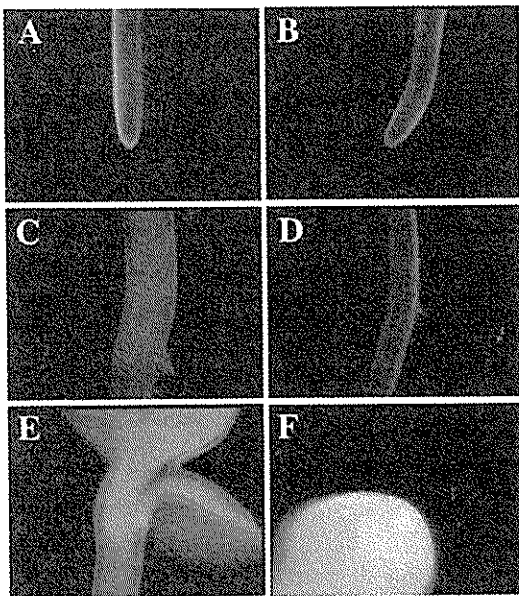


Figure 2. GFP expression pattern of enhancer trap lines using GAL4-VP16 and UAS-GFP, UAS-IAAH lines. A; line No. 12A5 has an expression at the root tip. B; line No. 35B9 has an expression of cortex of root. C; line No. 21C2 has an expression at cortex of hypocotyl. D; line No. 1D32 has an expression at vascular tissue of root. E; line No. 11A4 has an expression at restricted cortex cells at the base of an cotyledone. F; line No. 2A1 has an expression at the tip of cotyledone.

調節できることからコルメラ細胞など根の他の細胞のオーキシシンの影響を観察することも可能になると考えられる。

Fig.C では背軸のコルテックス細胞での GFP の発色を示しているが、このラインでは分裂組織での発色は確認できなかった。このことから、このラインを用いて、オーキシシンを合成させると背軸のコルテックスの分化後、オーキシシンが重力屈性や光屈性、さらなる二次肥大化、葉緑体の分化等どのように影響を与えているのかが明らかになると考えられる。

Fig.2D では根の維管束系でのみ発現が観察された。このラインにおいても分裂組織での発現は確認できなかったので根の維管束の分化後の側根形成や重力屈性、光屈性などのオーキシシンの作用解明が期待できる。特に、側根形成は維管束系の傍らであるエンドダームスから分化してくることが知られている。側根形成に関してはオーキシシンがその促進に関わっていることが示唆されているが、維管束からのオーキシシンの供給が必要であるか、自立的にエンドダームスがオーキシシンの合成に関与しているのかも争点になっている。このラインを用いて、維管束系でオーキシシン量を増やしたときの側根形成能を解析することでこの問題が明らかになる可能性が考えられる。現在の所、細胞レベルでの観察はまだ難しいので、より詳細な解析のできる顕微鏡を用いて側根形成における問題を解決したいと考えている。

Fig.2E, Fig.2F では、特定の細胞において GFP の発色が見られた。これらの細胞は特別に分化した細胞とは認識されていなかった。が、今回このような発現パターンを示すエンハンサーがあることが分かったことから、その細胞がどのような機能を持っているのかにも興味を持たれる。このライン

はエンハンサートラップラインになっているので、このような発現を示す遺伝子が欠損している可能性も考えられる。この突然変異は挿入変異である可能性も高いので原因遺伝子のクローニングを行い、どのような遺伝子が細胞特異的な発現を必要としているのか調べる必要があると考えられる。また、この細胞を組織レベルで詳細に観察し、特殊化していないかを確認すると共に、レーザーアブレーションによって、その細胞を破壊しその機能の解明にもせまってみたいと考えている。さらに、これらのラインでは発現部位でオーキシンを合成できるため、この特殊化した細胞でのオーキシンの機能解析もできると考えられる。

#### まとめ

形態形成におけるオーキシンの機能解析のために本研究ではその材料として IAAH 遺伝子がオーキシン合成遺伝子として機能し、基質を入れたときのみ表現型をしめることが確認された。また、部位特異的にオーキシン合成を行い、その領域を GFP によってモニターするために UAS::GFP, UAS::IAAH 形質転換体を作成した。また、その形質転換体に対して、GAL4-VP16 を用いてエンハンサートラップスクリーニングを行い、121ラインの形質転換体を得た。これらに基質である NAM を加えることでオーキシンの機能解析ができると考えている。

#### 3, 研究成果

本研究により、GAL4-UAS の系を用いてオーキシンの機能解析を行うことが現実的となってきた。さらに、エンハンサーラインを大量に作出することで、今までわからなかった特殊化した組織、細胞の発見をすることが明らかとなった。

#### 4, 今後の課題と発展

本研究で得られた 212 の形質転換体では、GFP の発現が観察できなかったラインも多数含まれた。今後、GFP の観察の感度を上げる努力をすると共に、形質転換体のさらなる作出が求められる。そのためには、第1に好感度の CCD カメラを用いなければならない。第2の課題として、形質転換体作出のためのスペースである。

技術的な問題としては、今後オーキシンの合成を部位特異的に行うために基質である NAM を加えていくのだが、その基質が均一に全ての細胞に与えるためにどのような手段を執るべきかを今後検討する必要があると考えられる。

今後、基質の与え方を検討した後、組織特異的にオーキシンを合成させ、その機能の解明を行うことで、形態形成におけるオーキシンの全体的な作用機構が明らかになると考えている。

#### 5, 発表論文リスト

1, Tanaka, R., Koshino, Y., Sawa, S., Ishiguro, S., Okada, K., Tanaka, A. (2001) Overexpression of chlorophyllide a oxygenase (CAO) enlarges the antenna size of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* (In Press)

2, Functional analysis of Auxin using GAL4-UAS system of *Arabidopsis thaliana*. S. Sawa, Y. Mori, A. Sakamoto, T. Koshiba. (投稿準備中)

3, Trp dependent mm31 mutant show enhanced lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. Y. Mori, S. Sawa, T. Koshiba. (投稿準備中)