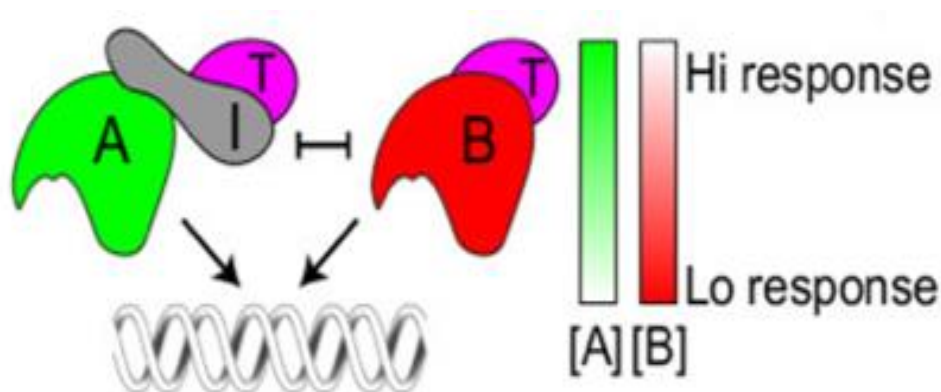


## 植物ホルモン・オーキシン応答機構の原理を解明

### 概要

神戸大学の加藤大貴助手（元 京都大学生命科学研究科博士課程学生・Wageningen 大学博士研究員）、京都大学生命科学研究科の鈴木秀政研究員、吉竹良洋特定助教、灰庭瑛実氏（元 生命科学研究科修士課程学生）、西浜竜一准教授、河内孝之教授は、Wageningen 大学・Dolf Weijers 教授、ALBA シンクロトロン・Roeland Boer 博士、神戸大学・石崎公庸教授らの研究グループと共同で、植物ホルモンの1種であり、植物の発生・成長・環境応答の多くを制御するオーキシン<sup>※1</sup>に対する応答機構の基本原則を明らかにしました。従来のモデル植物では高度な遺伝子重複のためその解明は容易ではありませんでしたが、陸上植物に共通かつ最小のオーキシン応答機構をもつ基部陸上植物ゼニゴケ<sup>※2</sup>を用いることで、オーキシン依存的に遺伝子発現を活性化する因子と、競合的に働く抑制因子によって感度が調整されるという仕組みがオーキシン応答の根底にあることを見出しました。また、これらの因子の分布パターンの違いにより、オーキシン応答性の異なる発生ゾーンが作られることが示唆されました。今後この成果をベースに、より複雑なオーキシン応答機構をもつ農作物などにおける仕組みを解析することで、植物の成長や形態を効率的に制御する技術につながると期待されます。

この研究成果は、2020年5月15日（英国時間、日本時間：5月16日）に国際学術誌「Nature Plants」のオンライン版に掲載されました。



イメージ図

転写活性化型 A-ARF (A)と転写抑制型 B-ARF (B)は、同じ標的遺伝子への結合において競合する。(A)が結合した場合、低オーキシン条件では(A)は Aux/IAA (I)を介して転写抑制因子 TPL (T)を標的遺伝子領域へ誘引し、転写を抑制する。高オーキシン条件になると(I)は分解され(A)が転写を活性化する。(B)が結合した場合、オーキシン非依存的に(T)を誘引して転写を抑制する。このように、(A), (B)両タンパク質の蓄積比がオーキシン応答性を決定する。

## ポイント

- ✓ 既存のモデル植物の中で最も単純なオーキシン応答機構をもつコケ植物ゼニゴケを用いて3種類 (A, B, C) の ARF タンパク質の機能の違いを解析した
- ✓ A-ARF が B-ARF と標的遺伝子を共有する一方で、C-ARF とは共有しないことを発見した
- ✓ 転写を活性化させる A-ARF とは対照的に B-ARF, C-ARF は転写を抑制することを示した
- ✓ B-ARF、C-ARF がオーキシン非依存的に機能する可能性を示した
- ✓ A-ARF の C 末端領域の機能としてこれまで知られていたオーキシン応答性以外に、A-ARF 同士で結合する多量体化能が重要であることを発見した
- ✓ 以上の結果からオーキシン応答における3種類の ARF タンパク質の機能についての最小モデルを提唱した

## 研究の背景

植物ホルモンの1種であるオーキシンは細胞の分裂・分化・伸長を介して、根や葉などの器官発生、光・重力・水分の方向に応じた伸長、果実の成熟など、植物の発生と成長のほぼ全てに関与する重要な因子です。そのため除草剤や挿し木の発根促進、果実の品質管理など農業的にも広く利用されています。オーキシンは植物の細胞内において受容され、AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) と呼ばれる一群のタンパク質が標的遺伝子の転写を活性化することで様々な応答を引き起こすことが知られています。

これまでの研究の多くはシロイヌナズナ<sup>※3</sup>という被子植物をモデルに行われてきました。被子植物のオーキシン応答機構は非常に複雑化しており、例えばシロイヌナズナでは23種類の ARF タンパク質が存在しています。ARF タンパク質は系統的に3クラス (A, B, C) に分類されることがわかっていますが、被子植物のような複雑なモデルではそれぞれのグループ内でも機能の特殊化が起きていると考えられ、単独の遺伝子の機能を調べただけでは背景にある共通原理を理解することはできません。そこで本研究では陸上植物進化の基部に位置するコケ植物ゼニゴケに着目して研究を行いました。ゼニゴケは A, B, C それぞれ1種類ずつのみで構成された、陸上植物に共通かつ最小のオーキシン応答機構をもっており (図1)、そのためオーキシン応答機構が複雑化する前の祖先的な状態に近いと考えられています。

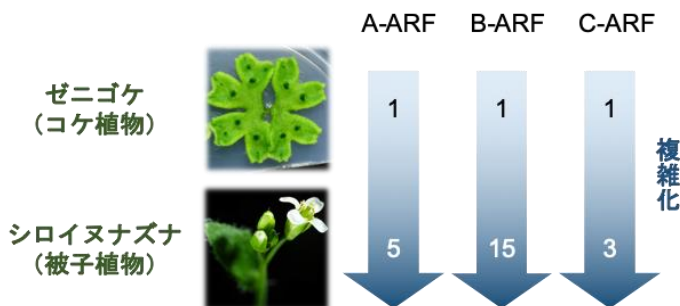


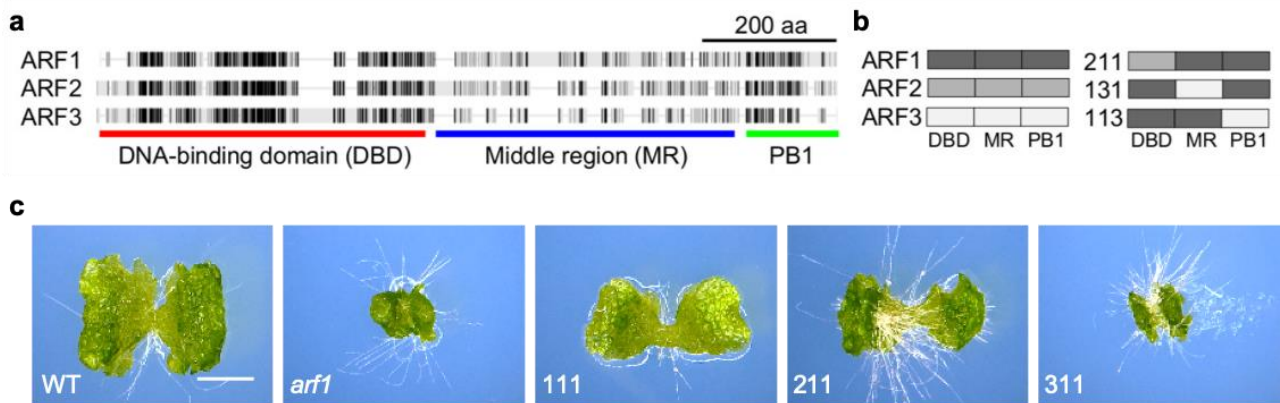
図1 オーキシン応答機構の複雑化  
数字はシロイヌナズナ、ゼニゴケにおける A-ARF、B-ARF、C-ARF の遺伝子数を示す

## 研究の内容

これまでの研究からゼニゴケのオーキシン応答において、A-ARF に分類される ARF1 が主要な転写活性化因子として働くことがわかっていました。本研究ではまず B-ARF (ARF2)、C-ARF (ARF3) が ARF1 と機能的に重複するかどうかを調べるため、arf1 変異体に ARF2、ARF3 を導入するプロモータースワップ実験を行いました。その結果 ARF2、ARF3 は arf1 変異体を相補することができず、異なるタ

ンパク質機能をもつことが明らかになりました。

ARF タンパク質は DNA 結合領域 (DBD)、中間領域 (MR)、相互作用領域 (PB1) の 3 つに分けることができます (図 2 a)。ゼニゴケ ARF タンパク質の機能の違いが何に由来するのかを調べるため、ARF1 タンパク質の一部を ARF2、ARF3 と入れ替えたキメラタンパク質を *arf1* 変異体に導入するドメインスワップ実験を行いました (図 2 b)。その結果 ARF2 由来の DBD をもつ ARF211 では *arf1* 変異体がある程度相補できたのに対し、ARF3 由来の ARF311 では相補することができませんでした (図 2 c)。このことは DBD の機能において ARF1 と ARF2 は近い性質をもつ一方で、ARF3 は異なる機能をもつことを示唆しています。この仮説は、*arf1*、*arf3* 変異体を用いたトランスクリプトーム解析や、DBD の結晶構造解析の結果からも支持されました。



**図2 ドメインスワップ実験**

(a)ゼニゴケARFタンパク質の構造。黒い領域は相同性が高いことを示す。(b)ドメインスワップ実験の模式図。(c)DBDを入れ替えた場合の結果。スケールバー：2 mm。

MR は ARF タンパク質が転写活性化因子として働くか、逆に抑制因子として働くかを定める制御領域であると考えられています。ドメインスワップ実験の結果、転写活性化因子として働く ARF1 とは対照的に、ARF2、ARF3 の MR は転写抑制能をもつことが示唆されました。ARF タンパク質同士でアミノ酸配列を比べた時、MR にはほとんど保存性がありません (図 2a)。本研究チームは様々な植物種の ARF をクラスごとに比べることで、3 つのアミノ酸を中心とする短い配列がクラス毎に保存されていることを見出しました。さらに遺伝学・生化学的な解析からこの配列が ARF2、ARF3 の転写抑制能に重要であることを明らかにするとともに、TPL という転写抑制因子と結合することを明らかにしました。

PB1 はオーキシン依存的に分解される Aux/IAA という抑制因子と結合することで、ARF タンパク質にオーキシン応答性を与えています。また PB1 は自分自身とも結合する多量体化能もあることが知られていましたが、その生物学的な意義は明確ではありませんでした。そこでドメインスワップ実験において、全く異なるタンパク質由来の多量体形成ドメインを PB1 の代わりに融合する実験も加えました。その結果、ARF2、ARF3 タンパク質の機能はオーキシンに依存しないこと、ARF1 の機能にとって自分自身と結合する多量体化能が必要であり、この能力が ARF3 には欠けていることを明らかにしました。

ARF3 はオーキシン応答に重要な ARF1 とは異なる標的を制御し、その機能がオーキシンに依存しないという上の結果から、本研究チームは少なくともゼニゴケにおいて C-ARF (ARF3) はオーキシン応答と直接の関係はないと結論づけました。そして A-ARF と B-ARF は標的遺伝子への結合において競合しており、A-ARF がオーキシン依存的に転写を活性化するのに対し、B-ARF がオーキシンとは独立して転写を抑制することで細胞のオーキシン応答性を調節しているというモデルを提唱しました (図 3a)。

このモデルを検証するため、まず ARF1、ARF2 の過剰発現株を作成してオーキシン応答性を調べるとともに、生化学的手法により ARF1 と ARF2 が同じ標的 DNA に対して同程度の結合力を持つことを明らかにしました。さらに蛍光タンパク質を ARF1、ARF2 に融合することで、それぞれのタンパク質の蓄積パターンが細胞によって異なるということを明らかにしました (図 3b)。このことから、競合的に働く A-ARF と B-ARF の蓄積レベルに応じてオーキシン応答性が規定され、それに依存して発生ゾーンが形成されることが示唆されました。

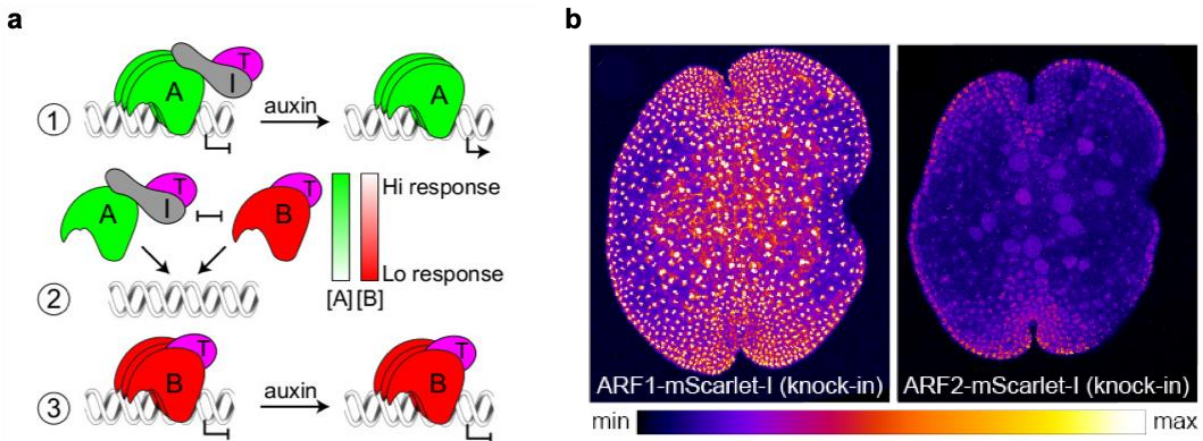


図3 ゼニゴケにおけるオーキシン応答モデル

(a) オーキシン応答の最小モデル。①低オーキシン条件の時はA-ARF (A)がAux/IAA (I)とTPL (T)を標的遺伝子領域へ誘引し転写を抑制する。高オーキシン条件になると(I)は分解され(A)が転写を活性化する。②(A)とB-ARF (B)は同じ標的遺伝子への結合において競合し、両タンパク質の蓄積比がオーキシン応答性を決定する。③(B)はオーキシン非依存的に(T)を誘引して転写を抑制する。(b) ARF1もしくはARF2に蛍光タンパク質 (mScarlet-I) を融合したタンパク質を発現するゼニゴケの無性芽。蛍光の強度に沿って擬似的に色づけしてある。

## 今後の展開

オーキシンは植物の成長と発生のほぼ全てに関わる重要なホルモンであり、農業・園芸にも広く活用されています。今後は私たちが明らかにしたシンプルなオーキシン応答モデルを基礎に、より複雑な植物種におけるオーキシン応答機構を解明することで、植物の成長や形態をより効率的にコントロールする技術へとつながると期待されます。

## 用語解説

※1 オーキシン：植物ホルモンの一つ。主な天然オーキシンは、インドール-3-酢酸。植物の胚発生、根・葉・花などの器官形成、果実の発達、光や重力に対する屈性反応など、植物の成長・発生・環境応答を調節する。

※2 ゼニゴケ：コケ植物タイ類に属する (学名 *Marchantia polymorpha*)。2017年に全ゲノム配列が解読され、実験室での培養や遺伝子改変が容易などの理由から、新たなモデル植物として注目される。

※3 シロイヌナズナ：被子植物アブラナ科の一年草 (学名 *Arabidopsis thaliana*)。2000年に全ゲノム配列が解読され、モデル植物として植物研究の材料に広く使われている。

## 謝辞

本研究は京都大学、神戸大学、Wageningen 大学、ALBA シンクロトロン研究者が、以下の研究助成を受けて行われました。

- MEXT 科研費・新学術領域研究 (No. 25113009, 15K21758, 17H06472, 18H04836, 19H05675)
- JSPS 科研費 (No. 18J12698, 19K16166, 19K23751)
- 京都大学 SPIRITS 「知の越境」融合チーム研究プログラム 2017
- EMBO Long-term Fellowship (No. ALTF 415-2016)
- Netherlands Organization for Scientific Research VICI grant (No. 865.14.001)
- Ministry of Economy and Competitiveness of the Spanish Government (No. BIO2016-77883-C2-2-P, FIS2015-72574-EXP) (AEI/FEDER,EU)
- Netherlands Organization for Scientific Research ALW-open grant (No. ALWOP.402)

## 論文情報

---

### ・タイトル

“Design principles of a minimal auxin response system”

DOI : <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0662-y>

### ・著者

Hiroataka Kato<sup>1,5</sup>, Sumanth K. Mutte<sup>1,\*</sup>, Hidemasa Suzuki<sup>2,\*</sup>, Isidro Crespo<sup>3,\*</sup>, Shubhajit Das<sup>1\*</sup>, Tatyana Radoeva<sup>1\*</sup>, Mattia Fontana<sup>1,4\*</sup>, Yoshihiro Yoshitake<sup>2</sup>, Emi Hainiwa<sup>2</sup>, Willy van den Berg<sup>1</sup>, Simon Lindhoud<sup>1</sup>, Kimitsune Ishizaki<sup>5</sup>, Johannes Hohlbein<sup>4</sup>, Jan Willem Borst<sup>1</sup>, D. Roeland Boer<sup>3</sup>, Ryuichi Nishihama<sup>2</sup>, Takayuki Kohchi<sup>2</sup> and Dolf Weijers<sup>1#</sup>

1 Wageningen 大学 Laboratory of Biochemistry

2 京都大学大学院生命科学研究科

3 ALBA シンクロトロン

4 Wageningen 大学 Laboratory of Biophysics

5 神戸大学大学院理学研究科

\* Equal contribution

# Corresponding author

### ・掲載誌

Nature Plants