

■ 植物の形態形成分子機構の研究 — 突然変異体を用いた新展開 —

植物形態形成研究グループ ■大野 豊, 大浦 千春, 内宮 博文■

Molecular Mechanism for Plant Morphogenesis — A New Development with Mutants —

Yutaka OONO, Chiharu OOURA and Hirofumi UCHIMIYA

Research Group for Plant Morphogenesis

In plant morphogenesis, the plant hormone auxin regulates many significant developmental and cellular processes by altering patterns of gene expression. To understand how auxin acts at the cellular and molecular level, a novel screen to identify mutants that exhibited altered auxin-regulated gene expression has been performed by means of transgenic plants expressing β -glucuronidase(GUS) gene regulated via the auxin responsive promoter. Two mutants, *age1* and *age2*, were isolated and characterized. *age1* showed enhanced sensitivity to auxin, with strong GUS expression localized in the root elongation zone in the presence of 10^{-8} M IAA (indole acetic acid). In contrast, *age2* exhibited ectopic GUS expression associated with the root vascular tissue, even in the absence of IAA. Morphological and molecular analyses indicated that the *age1* and *age2* alleles are involved in the regulation of gene expression in response to auxin.

1. はじめに —形と遺伝子について—

植物の形態を構築するための設計図は、個々の細胞中に DNA として保持されており、そこには数万から数十万個の遺伝子が存在する。その情報量は膨大なものであり、形づくりにあたっては、多数の遺伝子が調和を保ちながら発現しなくてはならない。こうした調節を司る物質として古くから知られているのが、植物ホルモンである。植物を形づくる秩序を解明するためには、まず植物ホルモンの作用メカニズムを知る事が大切である。その中でもオーキシンは、最もよく知られたホルモンの一つである。すなわち、オーキシンは、細胞分裂、細胞伸長、細胞分化を制御し、個体レベルでは、頂芽優勢、光屈性、重力屈性、果実形成、

葉の肥大、茎の伸長、上偏生長、維管束分化、側根形成など植物の生育上のあらゆる局面に影響を及ぼす(図1)。

本研究では2つの異なる研究手法に注目した。すなわち、オーキシン処理により短時間で発現が引き起こされる遺伝子の単離、ならびに、オーキシン変異体の分離である。

2. 植物ホルモン感受性遺伝子への新しいアプローチ

オーキシンによる遺伝子発現誘導は、オーキシンの作用の最も初期に引き起こされる現象である。このオーキシンによる遺伝子発現誘導をランドマークとし、

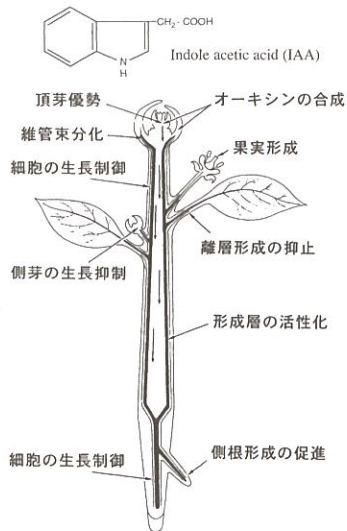


図1 オーキシン（インドール酢酸）の構造とオーキシンの主な作用（Mohrand Schopfer, 1995：一部改変）。

遺伝子発現誘導の様式と誘導される遺伝子の機能を蛋白質レベルで調べることで、オーキシンの受容機構と作用機構解明への足掛かりを得ることができる¹⁾。一方、変異体の分離は、植物の生育に対する可視的な変化をシロイヌナズナの実験系に持ち込むことにより、その作用に関わる遺伝子を直接研究対象とする事を可能とする。シロイヌナズナは、ゲノムサイズが小さいということで、世界中の研究者によりモデル

植物として集中的に研究され、全ゲノム DNA の配列が決定されつつあるアブラナ科の植物である。シロイヌナズナを用いることにより、これまでに様々な突然変異体が分離され、またその変異の原因遺伝子の単離に成功している。そこで、我々は、オーキシン作用時の最も初期におこる遺伝子発現誘導を指標として、シロイヌナズナ突然変異体をスクリーニングをすることにより、オーキシン初期応答の機構に関わる変異体を分離することができるのではないかと考えた。

3. オーキシン遺伝子発現ミュータントの発見

初期応答遺伝子の発現をモニターするために、エンドウより単離された PS-IAA 4/5 遺伝子のプロモーター（発現調節領域）のうち、オーキシン応答に関わる DNA 断片を切り出し、その下流にレポーター遺伝子として GUS (β -glucuronidase) 遺伝子をつなげた融合遺伝子を作成し、この遺伝子を植物（シロイヌナズナ）に導入した。得られた遺伝子組み換え植物を 10^{-7} M 以上のオーキシンで処理した後、 β -glucuronidase の基質を加えると、主に根の伸長帯でオーキシン特異的に β -glucuronidase の発現による青色の沈着がみられた（図2, 3）。そこでこの形質転換体を変異原で処理した後、育成し種子を取り、この種子12万個を、オ

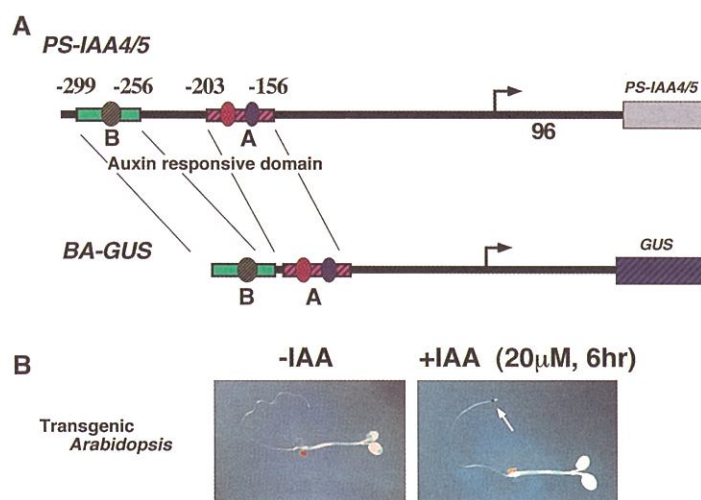


図2 A：PS-IAA 4/5 遺伝子の発現調節領域の構造。PS-IAA 4/5 遺伝子にはオーキシンに応答する2つのドメインが存在する。両領域を直結し GUS 遺伝子の upstream につなげたもの (BA-GUS) をレポーター遺伝子として使用した。矢印は転写開始点、数字は転写開始点からの距離を示す。B：レポーター遺伝子が導入されたアラビドプシス（シロイヌナズナ）における GUS 遺伝子の発現。オーキシン (IAA) を加えインキュベートすると、根端が青く染まる（矢印）。

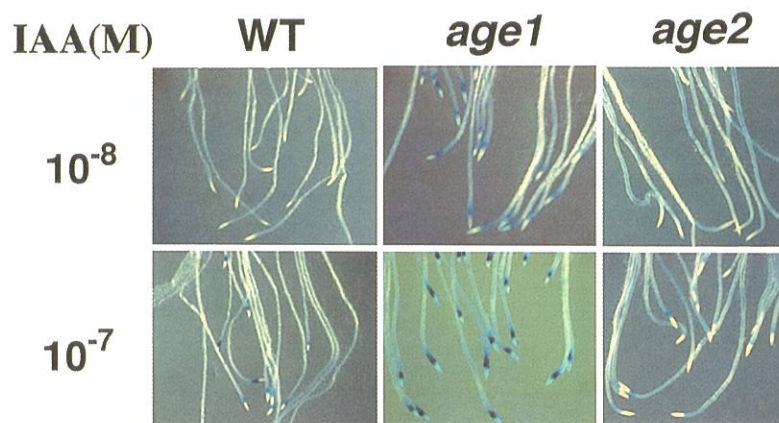


図3 *age*突然変異体のオーキシンに対する応答。野生型(WT)では、根端におけるGUSの発現誘導は 10^{-7} M以上の濃度のオーキシン(IAA)を必要とするが、*age1*変異体では、 10^{-8} MのオーキシンでGUSの発現誘導が引き起こされる。一方*age2*変異体では、根端におけるGUSの発現誘導は野生型と変わらないが、維管束組織で外部から与えたオーキシンに依存しないGUSの発現がみられる。

オーキシンを与えたときのGUSの発現をモニターしながらのスクリーニングに供すことにより、オーキシンに対して感受性の変化した突然変異体を分離することができた。このうちの2系統については、変異遺伝子がそれぞれ1番と5番の染色体にマップされ*age1*、*age2* (altered auxin gene expression) と名付けられた。*age1*は伸長帯のGUSの発現が1/10の濃度のIAA (10^{-8} M)でも誘導される変異体で、*age2*は根の維管束部にオーキシン処理をせずとも恒常的にGUSの発現がみられる変異体であった(図3)。両変異体とも、草丈の低下など、オーキシンに関係すると思われる形態的特徴がみられた。RNAの発現解析から、*age1*、*age2*は、外性オーキシンによって誘導される遺伝子発現に変化を及ぼしていることが明らかになった。

現在*age1*の原因遺伝子を単離するためにポジショナルクローニングが進行中であり、ゴールがまじかに迫っている。

4. 環境科学への応用の可能性

*age*突然変異体およびAGE遺伝子の単離、解析により、オーキシンの受容、情報伝達、遺伝子発現調節に関わる因子が明らかにされつつある。オーキシン初期作用機構の詳細が明らかにされることは、農業や環境科学においても、オーキシン利用の促進や生理活

性物質の新しい評価法の開発に繋がるものとして期待される。

オーキシンは多面的な生理活性を持つため、これまで農業分野において、けっして利用しやすい植物ホルモンではなかった。しかし、その作用機構を明らかにし、情報伝達に関わる因子を同定することによって、その因子を特異的に不活化したり活性を変化させたりすることが可能になると思われる。さらに、オーキシンの多様な生理活性のうち、特定の作用を特定の組織のみで作用させる技術の開発が可能となるであろう。

ある物質がオーキシン活性を持つかどうかは、その物質の構造から推定するのは不可能であり、オートムギ伸長試験や側芽生長阻害実験等の古典的な生物検定法に頼らざるを得ない。オーキシン初期作用の機構が明らかになれば、未知物質のオーキシン活性の有無を生化学的に簡便に検定できる。

近年、人工的につくられ環境中に放出された動物ホルモン様物質が内分泌攪乱物質として大きな問題になっている。しかし環境中には人間の活動により、植物に対してもその生長制御を攪乱する物質が放出されており、将来重大な問題となる可能性もありうる。未知の環境物質の植物に対する生理活性を迅速に調べる技術として、こうした手法が大いに役立つだろう。

5. まとめ

オーキシンは古くから知られている物質であり、その作用機作の解明のために、これまで多くの研究がなされてきた。その中でも最近大きな成果をもたらしたアプローチとして2つの方法が挙げられる。一つはオーキシン処理により短時間で発現してくる遺伝子の単離であり、もうひとつはシロイヌナズナを利用したオーキシン応答変異体の単離である。これらの手法によりオーキシンの作用に係わるいくつかの遺伝子が単離され、断片的ながらもオーキシンの作用メカニズムが、分子生物学的レベルで語られるようになってきた。しかし、研究が進むにつれて、オーキシンによってひきおこされる形態変化を指標とした変異体の分離では、分離されてくる変異体の種類に限界があることが明らかとなり、新しい変異体のスクリーニング方法の開発が待ち望まれていた。

本研究では、上記2種のアプローチを組み合わせた新しい方法により、これまでに分離されることのなかった、新しいタイプの突然変異体を分離することに成功した。一方、原因遺伝子を単離することで、オーキシンの初期応答メカニズムの解明に大きな進展がもたらされるものと思われる。

本研究の一部は、植物学分野の代表誌である *Plant Cell* 誌に発表された。さらに、オーキシン研究の権威である Richard Hooley 博士により詳細に解説され、また第16回国際植物生長物質会議では、*Rising Sun Award* を受賞するなど、高い評価を得ることができた^{3, 4)}。

一方、植物ホルモンは細胞の増殖系に影響を与えるものと思われる。また、最終的形態の形成は細胞伸長の極性により決定される。前者に関しては、アメリカ

アカデミー紀要誌、後者に関しては *Genes & Development* 誌に関連論文を発表した^{5, 6)}。

尚、本研究では、アポトーシスと形態形成に関する研究も行っているが(川合真紀, 小林恭彦 担当)、その進展状況については、つぎの機会に報告したい⁷⁾。

6. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご協力をいただいた米カリフォルニア大学 A. Theologis 博士に感謝します。また研究グループの発足運営にご助力くださった渡辺宏環境資源利用研究部長をはじめ、同研究部および基礎研究推進室の皆様がこの場を借りて御礼申し上げます。最後に、グループリーダーの所属する東京大学分子細胞生物学研究所細胞機能分野の諸氏にも謝辞を述べたい。

参考文献

- 1) S. Able and A. Theologis, *Plant Physiol*, 111 (1996)9.
- 2) N. Ballas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 (1995)3483.
- 3) Y. Oono et al., *Plant Cell*, 10(1998)1649.
- 4) R. Hooley, *Plant Cell*, 10(1998)1581.
- 5) M. Umeda et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 (1998)5021.
- 6) G-T. Kim et al., *Genes and Development* 12 (1998)2381.
- 7) M. Kawai et al. *Planta* 204(1998)277.