

研究

オーキシンとイネの根の形態形成-GASR1遺伝子・タンパク質の解析

池田 亮・山口淳二

名古屋大学生物分子応答研究センター E-mail: jiyama@agr.nagoya-u.ac.jp

作物の草型の改良は農業上の重要命題である。イネの草型育種は従来からの懸案事項とされ続けているが、特に地下部組織である根の形態形成に関する研究は立ち後れているのが現状である。しかし最近シロイヌナズナの分子遺伝学的研究を中心として、この分野の研究は大きな進歩を遂げはじめている。根は構造が比較的単純であること、分化した細胞の種類が少ないこと等の理由から、植物の器官分化のモデル系としても注目され始めている。植物ホルモンは植物の形態形成の重要なシグナル物質であるが、根の突然変異体を用いて細胞分化の決定と植物ホルモンとの関係が少しずつ明らかになってきている(総説; Scheres 1997)。植物ホルモンの1種類、オーキシンは根の形態形成に中心的な役割を果たしているが(Celenza et al. 1995), その輸送体遺伝子のクローニングを中心に画期的な進歩がなされてきている(Luschung et al. 1998; Muller et al. 1998)。

本稿では、イネの根の形態形成の制御機構とオーキシンの役割を解明する目的から、GASR1遺伝子・タンパク質に着目した研究について報告したい。

GAST遺伝子族

Shiら(1992)はトマトより最初のGAST遺伝子(GAST1)を単離した。これはジベレリンによって規制される転写産物で、ジベレリン欠損型の矮性トマトであるgib1のシュートにジベレリンを添加すると、その転写産物量が20倍に増加する。またTaylorとScheuring(1994)は、同じトマトにおいてこのGAST1と高い相同性を示すRSI-1(Root System Inducible-1)を単離している。これは人工オーキシンである α -naphthalene acetic acid (NAA)の添加により根で特異的に発現するもので、側根の原基形成への関与が示唆されている。

シロイヌナズナではGASA1, GASA2, GASA3およびGASA4が報告され(Herzog et al, 1995), このcDNA群のうちGASA1およびGASA4がジベレリンの添加による発現の促進が認められている。これらGAST1遺伝子族翻訳産物は、1) 約100個のアミノ酸残基からなり、2) シグナルペプチドと推定されるN末端領域が存在し、3) 12個のシステイン残基が完全に保存されている、という共通の特徴がある。しかしその生理的機能は未解明のままである。

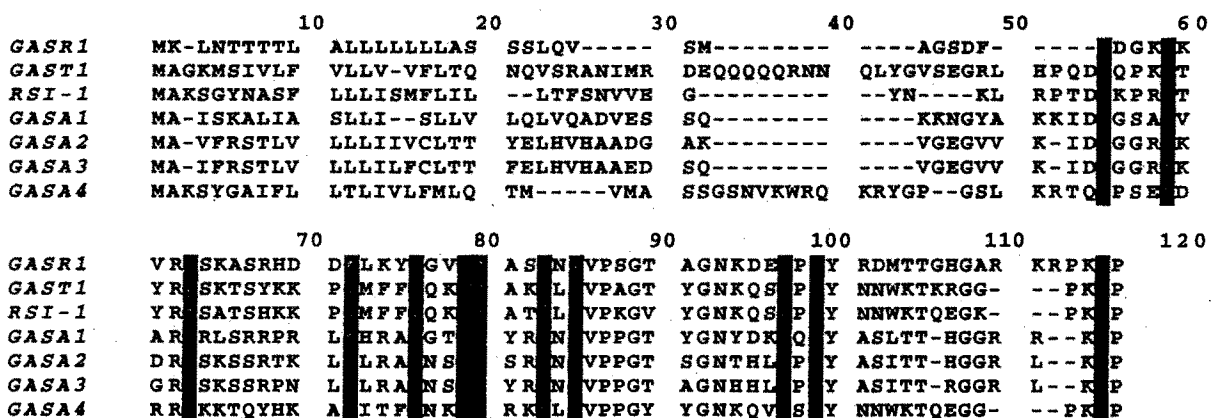


Fig. 1. Alignment of predicted peptide sequences encoded by related cDNAs. GASR1 (this study) from rice; GAST1 and RSI-1 from tomato; GASA1-4 from Arabidopsis thaliana. Conserved cysteine residues are boxed. Relationships among various predicted GAST-related proteins as inferred from the conservative C-terminal domain.

イネのGAST遺伝子族, GASR1

イネにおいてGAST様遺伝子がクローニングされ、イネ (rice) のRをとってGASR1と命名された。GASR1 cDNAのORFは279 bpで、93個のアミノ酸をコードしていた (Fig. 1)。推定されるアミノ酸からは、N末端のシグナルペプチドと考えられる約20残基の存在、12個のシステイン残基の保存性等のGAST遺伝子族が示す全ての特徴が保持されていた。シグナルペプチド様配列が存在したことから、この翻訳産物は分泌性タンパク質と考えられた。さらに、保存性の高いシステイン残基が何らかの重要な生理機能に関わっているものと考えられた。

GASR1遺伝子の組織局在性

GASR1タンパク質の組織局在性および発現時期を検討するため、GASR1タンパク質の抗体を用いた免疫化学的解析を行った。GASR1タンパク質に対する特異抗体はこのcDNA翻訳産物を大腸菌で発現させ、精製後それをウサギに免疫することによって得た。材料はイネを生殖生長期及び幼苗期 (発芽後8日) の2つのステージに分別した。生殖生長期から葉身、葉鞘、伸長中と伸長後の節間、開花前と開花後の穎花、登熟種子および根を収穫し、また幼苗期からは植物体を茎葉部 (シュート) および根に分類してそれぞれからタンパク質を抽出し、GASR1抗体を用いてウェスタンブロットティングを行った (Fig.2)。その結果、生殖生長期ではいずれの組織においてもGASR1タンパク質は検出されなかったが、幼苗期の根においてのみ特異的なバンドが検出された。従って、GASR1タンパク質はSDS-PAGE上で約13 kDaの分子サイズであることが明らかとなった。さらに根を先端部、基部および中間部に分類し同様の局在性を検討したところ、全ての部分で同程度のシグナルが検出された。このことからGASR1タンパク質は根全体に存在していると考えられた。

GASR1タンパク質は根において特異的に発現するものと思われるが、生殖生長期の根にはその発現が認められなかった。生殖生長期の根はおもに地上部の保持と水分吸収のみにしか機能していないものと思われるが、幼苗期では活発な伸長および発根成長が行われている。このような根の発育段階での発現の差異により、GASR1は根の生育になんらかの関わりを持つものと予想された。

オーキシンによるGASR1タンパク質分子サイズの変動

多くのGAST遺伝子族のクローンがジベレリンやオーキシンによる発現制御を受けることから、GASR1タンパク質でも植物ホルモンによる発現制御が予想された。GASR1タンパク質が発現する幼苗期の根において、ジベレリン(GA₃)、オーキシンとしてNAAおよびオーキシンの極性移動阻害剤である2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) を各濃度(0.1 μM, 1 μM, 10 μM)で水耕液に添加し、3日間処理を施した後、GASR1タンパク質をウェスタンブロットティングで観察した (Fig.2)。

ジベレリン処理区においては約13 kDaのバンドのみが観察されたのに対し (lanes 2-4)、NAA処理区においては、13 kDaのバンドの他に約40 kDaにも別のシグナルが認められた (lanes 5-7)。さらにNAAの処理濃度が高くなるにつれて、13 kDaタンパク質のシグナルが次第に弱くなり、それと同時に40kDaタンパク質のシグナルが強くなる傾向が観察された。これらの結果から、GASR1タンパク質はオーキシンによりSDS-PAGE上において高分子側にシフトすることが明らかとなった (Fig.2)。またTIBA処理区では13 kDaタンパク質のシグナルのみが検出されたが、TIBAの濃度が高くなるにつれてこのタンパク質が蓄積する傾向が認められた (lanes 8-10)。これらの結果からGASR1タンパク質の高分子側へのシフトはオーキシンの内生量と密接な関係を持つと推察された。そこでオーキシンとTIBAを同時添加した時のGASR1タンパク質について検討を行った (Fig. 3)。NAA単独処理で認められる約40 kDaへの高分子化 (lane 2) であるが、TIBAとの同時存在下においては、その高分子化の抑制が認められた (lane 3)。この高分子化の分子機構は未だ解明されていないけれども、オーキシンとの関係等との関連から興味深い問題となっている。

オーキシンによる根の伸長抑制とGASR1抗体によるその解除

GASR1タンパク質が分泌型タンパク質と予想されたことから、このタンパク質が根から分泌される可能性が予想された。そこでNAAを添加した水耕液中のイネの根にGASR1抗体の同時添加を試みた (Fig. 3, lane 4)。その結果、NAA単独処理で認められる40 kDa への高分子化 (lane 2) は、GASR1抗体の同時存在下では阻害もしくは抑制された (lane 4)。このことは、NAA存在下におけるTIBAの効果と類似していた (lane 3)。しかしGASR1抗体そのものがTIBAと同様に抗オーキシン剤としての機能を持つとは考え難い。驚くべきことに、この抗体の作用は、イネの根の形態形成にも深く関わっていることが明らかとなった。まず、オーキシンによる根の形態について検討した (Fig. 4)。NAA処理区の種子根では無処理区の種子根に対し、縦方向の伸長阻害がみとめられ、また側根および冠根の発生抑制が認められた (panel 2)。しかし、NAAとGASR1抗体の同時処理区では種子根の伸長、側根および冠根がともに正常に回復し、NAAが添加されているにもかかわらず、無処理区と極めて近い形態を呈した (panel 3)。対照として用いた非免疫抗体はこのような作用を示さなかった (panel 4)。これらの結果は、GASR1抗体の添加によってオーキシンによる根の生育阻害が解除されたものと推察された。上記のGASR1抗体の作用は、このタンパク質の生理効果を失効させた結果と考えられる。従って、GASR1タンパク質自体がオーキシンを媒介とする根の形態形成に関与している可能性が示唆された。

またGASR1タンパク質の機能を考察すると、根の伸長および発根をとまなう生育に関連した一つのモデル (Fig. 5) が考えられる。通常GASR1タンパク質は分子量13kDaで存在するが、過剰なオーキシンの存在によって40kDに高分子化が起こり、この現象は根の生育の阻害と関連する。また高分子化したGASR1タンパク質はGASR1抗体の添加によって複合体が形成されてその機能が失活し、根の生育阻害も解除されるものと考えられる。

今回報告したGASR1遺伝子・タンパク質の分子構造・機能には不明の点が数多くの残さ

れている。その後の研究から、イネにおいても多重遺伝子族を形成していることが既に明らかとなっており、それらの体系的な機能に関する解析が必要となっている。さらに、オーキシンによる高分子シフトの分子機構の解明およびこのタンパク質の根の形態形成への関与についての研究が急務となっている。GASR1は、GAST遺伝子族の中でもその局在性・オーキシンによる制御等の関連からRSI-1に類似の性質を持つと考えられる。

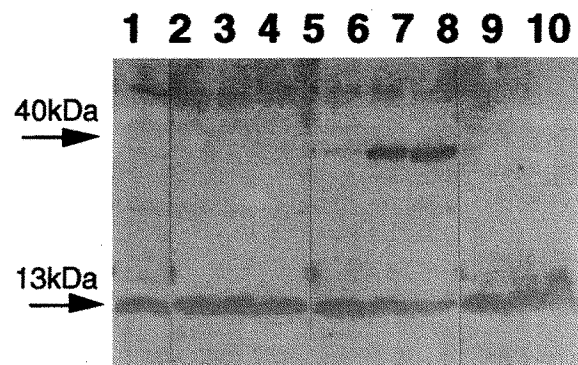


Fig. 2. Immunoblot of protein extracts from roots of rice seedlings using GASR1 antibody. Roots were treated with phytohormones for 3 days. Lane 1, no treatment; lanes 2-4, GA3; lanes 5-7, NAA; lanes 8-10, TIBA. Treatment at the concentration of 0.1 μ M (lanes 2, 5, 8), 1 μ M (lanes 3, 6, 9), 10 μ M (lanes 4, 7, 10)

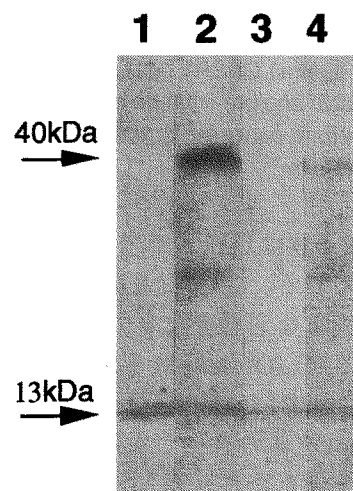


Fig. 3. Effect of TIBA and GASR1 antibody on molecular size shift of GASR1 in rice roots after NAA treatment. Root were treated without (lanes 1) or with 1 μ M NAA for 3 days (lanes 2, 3, 4) in the presence of 10 μ M of TIBA (lane 3), 10 μ l/ml antibody against GASR1 (lane 4).

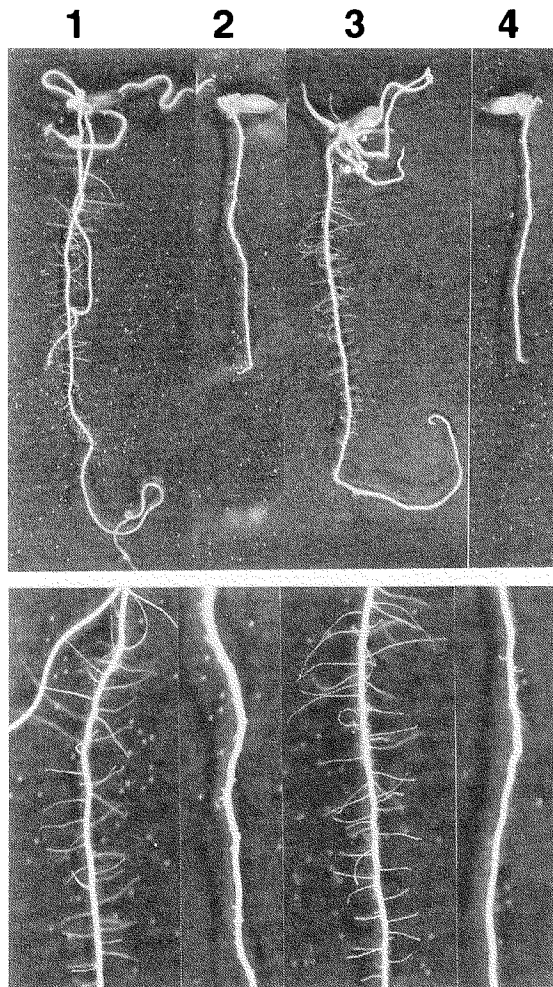
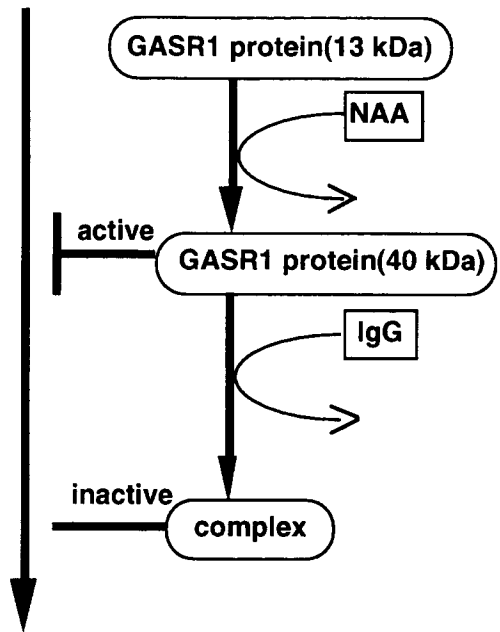


Fig. 4. Effect of GASR1 antibody on the morphology of rice roots after NAA treatment.

A: Anatomy of roots of eight day-old seedlings of rice treated without (No treatment; panel 1) or with 1 μ M NAA for 3 days (+NAA; panel 2), in the presence of 10 μ M/ml antibody against GASR1 (+NAA, +GASR1 antibody; panel 3) and pre-immune antibody (+NAA, +preimmune serum; panel 4). B: Magnified figures for lateral root formation.

GAST遺伝子族は現在までのところ植物でのみ報告されている。GASTI遺伝子のアンチセンス植物は大きな形態変化を引き起こさないとされているが (Olszewski 私信), このことについてもGASR1での確認が必要であろう。また, GASR1抗体の添加が根の伸長および発根に影響を及ぼしたことから, 抗体のようなある種のタンパク質が生長調節物質として作用する可能性を示している。このような抗体の添加による植物の生長制御の例は殆ど報告されていないことから, 応用的にも注目されている。

root growth



root elongation & lateral root formation

Fig. 5. Model for the function of GASR1 protein.

References

- Celenza, J.L., P.L. Grisafi and G.R. Fink, 1995, A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Develop.*, **9**: 2131-2142.
- Herzog, M., A.-M. Dorne and F. Grellet, 1995. GASA, a gibberellin-regulated gene family from *Arabidopsis thaliana* related to the tomato GAST1 gene. *Plant Mol. Biol.* **257**: 743-752.
- Luschung, C., R.A. Gaxiola, P. Grisafi and G.R. Fink, 1998, EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* **12**: 2175-2187.
- Muller, A., C. Guan, L. Galweiler, P. Tanzler, P. Marchant, E. Wisman and K. Palme, 1998, *AtPIN2* defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J.* **17**: 6903-6911.
- Scheres B, 1997, *Curr. Op. Genet. Dev.* **7**: 501-506.
- Shi, L., R.T. Gast, M. Gopalraj and N.E. Olszewski, 1992. Characterization of a shoot-specific, GA₃- and ABA-regulated gene from tomato. *Plant J.* **2**: 153-159.
- Taylor, B.H. and C.F. Scheuring, 1994. A molecular marker for lateral root initiation: The *RSI-1* gene of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) is activated in early lateral root primordia. *Mol Gen Genet* **243**: 148-157.