



Title	オーキシンの信号伝達
Author(s)	山本, 興太郎; 武藤, 秀樹
Citation	植物の生長調節, 38(1), 23-35
Issue Date	2003-05-30
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/16891">https://hdl.handle.net/2115/16891</a>
Type	journal article
File Information	y38-1.pdf



## はじめに

オーキシンは、早い反応を引き起こすことが特徴である。たとえば、茎の伸長促進はオーキシンを投与してから10分後ぐらいから観察され、その後も引き続きオーキシンを与え続けないと伸長促進は維持できない。この事実は、オーキシン信号伝達に関わる因子の代謝回転が速いことを示唆している。オーキシン作用の分子機構に関して、最近10年間に明らかになった最も重要な事項は、タンパク質分解の調節がオーキシン信号伝達系の中心であったということである。また、オーキシンの極性輸送も細胞内小胞輸送機構によってきわめて迅速に輸送極性を変化させることができるようになってきていることが明らかになりつつある。本稿では、この二つの点を中心に最近のオーキシン作用機構研究の成果を紹介する。

## 1. 受容体

オーキシンの受容体を同定する試みの一環として、オーキシン結合タンパク質の研究がおこなわれ、種々のタンパク質がオーキシんに結合することがわかっている。その中で、80年代半ばに下村と Klämbt らが独立にトウモロコシで発見した ABP1 (Auxin Binding Protein 1) だけが、オーキシニンに対する結合特異性と結合定数から判断して、オーキシン受容体の資格を備えている。ABP1 は160個程度のアミノ酸残基からなるタンパク質で、最近 X 線構造解析によって、その構造が詳しく明らかになった (Woo et al. 2002)。ABP1 は、βバレル構造をなす本体から N 末端側と C 末端側に短いポリペプチド鎖が突き出ている構造をとっていて、タンパク質のクピン(cupin)スーパーファミリー (Dunwell et al. 2001) に属している。クピン・ファミリーはすべての生物界に分布していて、さまざまな機能をはたすタンパク質を含んでおり、酵素として働くものもあれば、そうでないものもある。ABP1 自身は陸上植物と緑藻以外には存在しない。クピン族タンパク質は構造的に安定であることが特徴で、発芽時に誘導されるジャーミン(germin)、種子貯蔵タンパク質であるグロブリンやレグミンもこの仲間である。ABP1 のβバレル(樽)構造の場合、樽の中の空間に亜鉛か銅イオン(II)が1個あって、それに3個の His 残基の窒素原子と Glu 残基の2個の酸素原子と水の酸素原子が配位している。この内の Glu 残基の1個の酸素原子と水の酸素原子をオーキシンのカルボキシル基の2個の酸素原子が置き換えて、オーキシンが ABP1 に結合する。ABP1 が受容体ならば、オーキシニンに結合すると構造変化がおこって、それがオーキシン信号の起源となるはずである。そこで、1-NAA に結合した ABP1 の構造も調べられているが、少なくともβバレル構造の部分は NAA が結合してもほとんど変化しない。ただし、βバレル構造から突き出ている N と C 末端側の短いポリペプチドは自由度が高く、NAA との結合による構造変化の可能性が残っている。ABP1 は、2個のサブユニットからできているホモダイマーで、サブユニットあたり1個の糖鎖がついている。C 末端には小胞体の滞留シグナルがあって、ABP1 の大部分は小胞体内腔に存在するが、一部原形質膜にも検出される。

では、ABP1 はオーキシンの受容体だろうか。プロトプラストにオーキシンを投与したときに一番早く観察されるのは原形質膜の過分極で、その後プロトプラストの膨潤がおこる。プロトプラストを ABP1 分子全体や C 末端ポリペプチドに対する抗体で同時に処理すると、オーキシンを投与してもオーキシン応答が起こらない。上述の His 残基を含む領域に対する抗体や C 末端ポリペプチドをプロトプラストに投与すると、それだけでオーキシン投与に似た応答がおこる。以上の結果は、ABP1 が原形質膜の表面でオーキシン応答の受容体として働いていることを示している (Steffens et al. 2001)。

シロイヌナズナ・ゲノムには ABP1 遺伝子は1個しかない。ABP1 遺伝子破壊株は胚発生が異常で、胚性致死となる (Chen et al. 2001)。胚の細胞は、初期球状胚を過ぎる頃から、中央部の細胞が伸長成長をおこなうようになり、球状を脱して左右対称的な形の胚を形成する。この過程で、遺伝子破壊株の細胞は伸長成長をおこなうことができず、胚は球状のまま細胞分裂を繰り返すことになり、最終的に死んでしまう。タバコの BY2

培養細胞にアンチセンスの *ABP1* 遺伝子を導入すると、細胞増殖速度が低下する。BY2 細胞はオーキシンによって伸長成長を示すが、アンチセンス形質転換体は伸長成長をおこさない。以上の結果から、*ABP1* はオーキシンによる細胞伸長と細胞分裂反応を引き起こしていると考えられた。プロトプラストの実験系の結果ともあわせて考えると、*ABP1* はこれらの実験系ではオーキシンの受容体として働いているように見える。問題なのは、植物の成長過程でみられるすべてのオーキシン応答の受容体かどうかという点で、この点についてはさらに検討が必要であろう。

## 2. 極性輸送

他の植物ホルモンにないオーキシンの大きな特徴が極性輸送である。オーキシンの極性輸送は、オーキシンの信号伝達とは同次元の現象ではないが、器官レベルでオーキシン応答を考える場合は、極性輸送の調節によって応答が変化することも数多いので、本稿で扱うことにする。オーキシンは若い葉で合成されると、シュートの基部に向かって輸送される。根に達したオーキシンは、今度は根の先端に向かって輸送される。輸送を担うのは主に維管束組織の柔細胞である。根の中心柱を通して根の先端に達したオーキシンは90度方向を変えて表皮や皮層細胞に達し、そこでさらに方向を上方に変えて根の伸長領域に達する。

### 2. 1. 取り込み担体 *AUX1* と排出担体 *PIN*

オーキシンの輸送体は、シロイヌナズナのオーキシン関連突然変異体の研究によって明らかになった。*aux1* は高濃度のオーキシンを加えた培地で生育させても成長がそれほど阻害されない突然変異体（オーキシン耐性変異体）で、根の屈地性が異常である。*AUX1* 遺伝子はアミノ酸の取り込み担体であるアミノ酸パーミアーゼに似たタンパク質をコードしていて、これがTrpの誘導体であるオーキシンの取り込み担体であった。*AUX1* は、オーキシンをH<sup>+</sup>と共輸送するので、オーキシンの取り込みはエネルギー依存性である。*pin1*は、シロイヌナズナの花茎の先端がピンの先のような形になって花をつけない変異体であり、オーキシンの極性輸送が花茎で低下している。*PIN*タンパク質は原形質膜で受動輸送を担うタンパク質で、すべての生物界に存在する排出担体と似ていることから、オーキシンの排出担体であることがわかった。*PIN*は遺伝子族を形成していて、シロイヌナズナ・ゲノムには8個存在する。この内、4個の機能がよく研究されていて、それぞれの遺伝子は独特の遺伝子発現の組織特異性や遺伝子産物の細胞内分布をもっていることがわかった。

*PIN1*は、植物の地上部では維管束の柔細胞に発現していて、遺伝子産物は成長軸の方向に細長い直方体の形をしている柔細胞の基部側の原形質膜に局在している。根では、前形成層の細胞と内皮細胞の頂端側の原形質膜に局在している。したがって、シュートの頂端から根端に至るオーキシンの全身にわたる極性輸送の極性は主に *PIN1* の細胞内局在性によって維持されていると考えられる。*PIN2* は、根端の表皮や皮層細胞の基部側の原形質膜に局在しているので、根の先端に達したオーキシンが根の表面部分を通して伸長領域に達する根端の局所的なオーキシン輸送の極性を担っていると考えられる。実際、*PIN2* の遺伝子破壊株は根の屈地性が異常となる。*PIN3* は、胚軸や花茎では内皮に、根では内鞘と根冠細胞に発現している (Friml et al. 2002)。遺伝子産物は内皮や内鞘細胞では、おもに器官の内側を向いた側面の原形質膜に局在していて、胚軸では基部側、根では頂端側の原形質膜にも一部局在している。根冠細胞では、原形質膜のすべての面に均一に分布しているが、重力刺激が加わると2分以内に分布が変化して、重力方向の面の原形質膜に局在するようになり、この局在は刺激開始後少なくとも1時間は維持される。

*PIN4* の局在性は、根のパターン形成との関連で詳しく調べられている (Friml et al. 2002)。シロイヌナズナの根端は、静止中心に隣接してそれぞれの細胞層の始原細胞が存在し、それらが規則正しく分裂して、秩序立った細胞層を形成することがわかっている (森上, 2000)。*PIN4* は、静止中心、それに隣接する始原細胞群とその娘細胞に分布している。コルメラ細胞では原形質膜に一様に分布しているが、コルメラ以外の始原細胞とその娘細胞では根端側の原形質膜に局在していて、オーキシンをコルメラ始原細胞に向けて流しこもうとしているようにみえる。この知見とよく一致して、オーキシンに特異的に応答する人工プロモーター *DR5* を用いてオーキシン濃度を推定すると、根端ではコルメラの始原細胞とそのすぐ下に位置するコルメラ第1層で

オーキシンの濃度が最も高い。根をオーキシン極性輸送の阻害剤であるナフチルフザラミン酸 (NPA) 処理すると、濃度の極大は基部側に移動して、静止中心と前形成層の始原細胞群となる。*PIN4* の遺伝子破壊株 *pin4* のオーキシン分布は野生型を NPA 処理したものと似たパターンになる。*pin4* の根のパターン形成を調べると、コルメラ始原細胞は野生型では 1 層だが、*pin4* では数層に増えていて、コルメラ全体も過剰に増殖する。また、静止中心は野生型では一層 4 細胞に限られるが、*pin4* では周囲の始原細胞とその娘細胞までもが静止中心の性格を持つようになるほか、内皮層形成も異常になる。これらの根のパターン形成異常は、胚発生の初期、球状胚のときから観察され、将来静止中心とコルメラ始原細胞になる細胞の分裂パターンが異常である。胚発生の過程でオーキシン濃度を推定すると、野生型胚では胚の基部の一部の細胞だけにオーキシンのシグナルが観察されるのに対し、*pin4* では胚全体に強いオーキシンのシグナルが観察される。*PIN4* と *PIN1* の発現部位は一部重なっていて、前形成層の始原細胞とその娘細胞のところでは *PIN1* と *4* が両方発現している。しかし、*pin1* ではまったく根のパターン形成異常は認められない。以上の結果から、*PIN4* の働きでコルメラ始原細胞に極大を持つオーキシンの濃度勾配が根に成立し、それが根の正常なパターン形成を引き起こしていると考えられる。

一方、オーキシンの取り込み担体である *AUX1* も遺伝子族を形成していて、類似遺伝子はシロイヌナズナに 4 個あるが、*AUX1* 以外の遺伝子の機能は研究されていない。*AUX1* は、茎頂と根端に発現していて、根端では根冠の側周部やコルメラ第 2 層目の細胞、伸長領域の表皮細胞、原生篩部細胞、前形成層の始原細胞に強く発現している。これら細胞では *PIN* とは異なり、原形質膜上均一に分布しているようだが、根の原生篩部細胞では基部側の原形質膜上に局在していて、基部側の隣の原生篩部細胞の頂端側に局在する *PIN1* と顔を合わせる形になっており、表皮細胞では基部側と頂端側の両方の原形質膜上に局在している。すなわち、*AUX1* は基本的には細胞内で極性を持たずに分布しているが、一部の細胞では極性輸送効率を上げるために、*PIN* 同様、原形質膜の特定の側面に局在していると考えられる (Swarup et al. 2001)。*aux1* 変異体は根の屈地性異常以外に大きな異常は示さないことも考えにいと、以上の研究から得られる結論は、オーキシンの極性輸送の極性を第一に決めているのは排出担体の細胞内局在性であって、この局在性の調節がオーキシン輸送の極性を決定しているということである。

このように、オーキシンの取り込み担体である *AUX1* の極性輸送における重要性は排出担体に比べると低いようだが、細胞の極性の決定にまったく関与していないわけではないらしい。シロイヌナズナの根の表皮からは根毛が突出するが、野生型では根毛は必ず表皮細胞の基部側で突出するので、表皮細胞には極性が成立していることがわかる。ところが *aux1* 変異体では根毛は野生型より根端側で突出する。根にブレフェルジン A を投与しても、根毛がより根端側から突出するようになるが、この極性変化には *AUX1* が必要で、*aux1* 変異体ではブレフェルジン A の効果が起こりにくい。これらの結果は、*AUX1* も細胞の極性の成立に関与することがあることを示している (Grebe et al. 2002)。

## 2. 2. 担体の細胞内局在調節機構

以上の議論にしたがえば、*PIN* の細胞内局在性は最終的には植物個体の極性を決定することにつながるのだから、この調節機構を明らかにすることは植物科学の最重要課題と言わなければならない。では、この問題は現在どの程度明らかになっているのだろうか。まず、*PIN1* の極性を持った細胞内分布が胚発生のどの過程で成立するのか調べられている (Steinmann et al. 1999)。*PIN1* は、16 細胞期の胚では細胞同士が接するすべての面の原形質膜に均一に分布する。*PIN1* の分布に極性が最初に現れるのは、球状胚の中期である。このとき、胚の下部の一番内側にある 4 個の細胞の基部側の原形質膜に *PIN1* は局在するようになる。ここは、原根層 (hypophysis) 由来で将来根端になる細胞に接する部分である。発生がさらに進んで心臓型胚期では、原形成層細胞で基部側の原形質膜に局在し、子葉原基の表皮細胞では逆に、頂端側の原形質膜に局在する。この極性の成立が、シロイヌナズナの胚形成異常突然変異体である *gnom* (*gn*) で調べられた。*gn* は胚の頂端-基部軸形成が異常で、軸にそって細胞が整列できず、根が形成されない。このような異常は、胚を高濃度のオーキシンやオーキシンの極性輸送阻害剤とともに培養したときに現れるので、*GN* はオーキシンの作用やその極性輸送に関係しているのではないかと考えられていた。*gn* 胚では、個々の細胞を見ると *PIN1* は局在しているが、その

方向性が細胞ごとにばらばらで、胚の成長軸にそった協調的な局在性が見られない。GN は、細胞内小胞輸送に関わる低分子量 GTP 結合タンパク質 (ADP リボシル化因子 (ARF)) のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) なので、PIN1 の細胞内局在には小胞輸送が関与していることがここではじめてわかった。

低分子量 GTP 結合タンパク質は、GTP アーゼ活性化タンパク質の作用で、結合している GTP が GDP に変換して不活性型となる。その GDP を細胞質に存在する GTP と交換するのが GEF で、GEF が働くと GTP 結合タンパク質は加水分解前の活性型の状態に戻る。GTP 結合タンパク質は、GTP と GDP のどちらに結合しているかによって立体構造が可逆的に変化するので、分子スイッチとして機能する。

近年、細胞の種々の機能が細胞内小胞輸送によって実現されていることがわかってきた。動物の上皮細胞では、原形質膜上の種々の受容体はリガンドと結合した後エンドサイトーシスによってエンドソームと呼ばれる膜小胞に取り込まれる (図 1)。リガンドはエンドソームの中で受容体から解離して、たいていリソソームに輸送されるが、自由になった受容体のなかには回収されてもとの原形質膜上に運ばれ、再利用されるものがある。この場合、受容体タンパク質は原形質膜とエンドソーム区画の間を高速で回転することになる。膜系から輸送小胞が形成される際には、将来小胞が出芽する場所に、活性型の GTP 結合タンパク質の作用で被覆タンパク質が呼びこまれて、小胞が形成される。ブレフェルジン A は GEF による ARF の GDP-GTP 交換反応を阻害することで輸送小胞の形成を阻害する。GN が属する ARF-GEF のサブファミリーは、動物や酵母では小胞体 (ER) からゴルジ体を経て原形質膜に至る分泌経路の小胞輸送に関わっていると考えられている。しかし、シロイヌナズナでは GN は分泌経路には働いておらず、エンドソームによる原形質膜からのタンパク質の回収に働いていた (Geldner et al. 2003)。実際、*gn* の表現型は分泌経路異常突然変異体とは似ておらず、分泌経路が活発に働く花粉管の伸長や細胞質分裂といった現象は正常であった。

ブレフェルジン A は、オーキシンの細胞からの排出を極性輸送阻害剤のように阻害する。実際、低濃度のブレフェルジン A を投与すると、極性輸送阻害剤同様、芽ばえの成長や屈地性、側根形成が阻害される。上述のように PIN1 は原形質膜に非対称的に局在しているが、ブレフェルジン A を投与すると原形質膜に均一に分布するようになると同時に、エンドソームが集合してできたように見える、核のそばにある 2 個の大きな細胞内区画にも分布するようになる (Geldner et al., 2001)。この過程は翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドによって影響を受けず、しかも可逆的で、ブレフェルジン A を除くともとの細胞内分布にもどる。この現象は、PIN1 はエンドソームと原形質膜の間を高速で回転していて、ブレフェルジン A はエンドソームから原形質膜への輸送過程を阻害したと考えると説明がつく (図 1)。PIN1 の細胞内分布に対するブレフェルジン A の効果は、アクチン・フィラメントを壊しておくとも起こらなくなるが、微小管の破壊には影響されないので、PIN1 のエンドソーム・原形質膜間回転にはアクチン・フィラメントが関与していると考えられる (Grebe et al. 2002)。先に PIN3 の細胞内分布は重力刺激の方向に応じてすばやく変化することを述べた。PIN3 の輸送小胞は、重力の方向が変化すると、エンドサイトーシスがおこった面とは別の面の原形質膜に融合して (トランスサイトーシス)、原形質膜上の分布を変化させるのだろう (図 1)。このような刺激に対する速い応答は、エンドソームー原形質膜回転のような動的機構なくして実現できないにちがいない。

極性輸送阻害剤 TIBA を事前に投与しておく、ブレフェルジン A による PIN1 の細胞内区画化がおこらない。またブレフェルジン A を一度処理してから除く過程で TIBA を投与すると、PIN1 は細胞内区画に留まり続け、PIN1 の原形質膜への再分布がおこらない。すなわち、TIBA は PIN1 の原形質膜からの回収と原形質膜への再分配の両方を阻害する。PIN1 同様、原形質膜上で速い代謝回転を示す原形質膜 ATP アーゼに対しても、

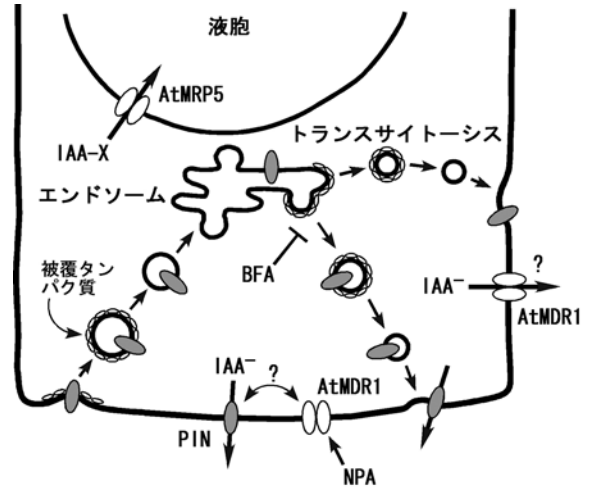


図 1. PIN タンパク質の細胞内局在性を調節している細胞内小胞輸送とオーキシン排出に関わる ABC 輸送体の機能の想像図。重力刺激の方向が変化すると、トランスサイトーシスがおこるのかもしれない。小胞輸送の阻害剤ブレフェルジン A (BFA) の作用点も図示した。

TIBA は同様な効果を示した。また、TIBA 以外の極性輸送阻害剤も、PIN1 や ATP アーゼの細胞内局在性に対して TIBA と同様の作用を示したので、オーキシン極性輸送阻害剤の分子的作用は、実は細胞内小胞輸送の阻害であると考えられる (Geldner et al., 2001)。

ブレフェルジン A による細胞内区画化は AUX1 でも観察されるので、AUX1 の原形質膜上の分布にも PIN1 と同様な機構が働いていると考えられるが、ブレフェルジン A 処理後の AUX1 は PIN1 の場合とは異なり、細胞質に均一に分布するようになるので、AUX1 と PIN1 の局在機構はまったく同じではないらしい (Grebe et al. 2002)。GN サブファミリーに属する ARF-GEF は、シロイヌナズナには 8 種類ある。GN の機能は上述のようにブレフェルジン A によって阻害されるが、アミノ酸配列の違いによって 8 種類の内の 3 種の機能はブレフェルジン A によって阻害されない。このブレフェルジン A に対する感受性の違いを利用して、原形質膜に極性を持って局在している他のタンパク質、PIN2 や AUX1、原形質膜 ATP アーゼが PIN1 と同じエンドソーム経路で輸送されているかどうか調べられている (Geldner et al. 2003)。その結果、いずれのタンパク質についても一部は同じ経路で輸送されているものの、一部は異なる小胞輸送経路で輸送されていることがわかった。GN は、PIN1 の局在性に特異的に働く GEF のようである。

以上の研究によって、オーキシンの極性輸送の極性を決めているのは、担体の細胞内局在性であることが明らかになったが、この局在性を最終的に決めているのはエンドソーム由来の小胞がどのような機構で標的の原形質膜部分に融合するののかということである。この局面は現在活発に研究されているので、この機構は遠からず明らかになるに違いない (Ueda and Nakano 2002)。

シロイヌナズナに NPA を投与すると根の成長が阻害される。この阻害を起しにくくなっているのが *tir* (transport-inhibitor resistant) 3 突然変異体である。また、暗所で栽培した芽生えは野生型ではクロロフィル a/b 結合タンパク質遺伝子 (*CAB*) を発現していないものだが、それを暗所で発現してしまうのが *doc* (dark overexpression of *CAB*) 1 変異体である。ただし、*doc1* は光形態形成を暗所でおこしてしまうシロイヌナズナの劣性突然変異 (恒常的光形態形成突然変異) 群 *cop/det/fus* とは異なり、暗所での形態は正常である。*TIR3* と *DOC1* は同一の遺伝子座で、BIG タンパク質をコードしていた (Gil et al. 2001)。*big/doc1/tir3* 変異体ではオーキシンの極性輸送能が低下しているので、NPA を投与してもオーキシンがそれほど根に蓄積せず、その結果成長阻害が起こりにくくなる。オーキシンを過剰生産する突然変異体 *yucca* と *big* の 2 重変異体では、暗所での *CAB* の発現が野生型のレベルまで抑制される。すなわち、オーキシンは暗所で光形態形成関係の遺伝子発現を抑制する効果を持っている。また、PIN1 の細胞内局在性は野生型では NPA 投与によって影響を受けないが、*big* では細胞内区画化がおこる。以上の結果は、BIG タンパク質がオーキシンの極性輸送に関与していることを示している。BIG に類似したタンパク質 Calossin はショウジョウバエでは神経伝達物質の分泌に働いていることを考えると、BIG はオーキシン担体の小胞輸送に関わる因子と想像される。

### 2. 3. ABC 輸送体

オーキシンの排出担体は PIN ファミリーだけではなく、ABC (ATP-binding cassette) タンパク質も関与していることが最近明らかになった (Luschnig 2002)。ABC タンパク質は、すべての生物界に存在する多様なタンパク質群で、ATP 依存的にさまざまな物質、典型的には疎水性物質を膜を横切って輸送する (Sánchez-Fernández et al. 2001)。このタンパク質群のサブファミリーの一つは細菌や動物細胞では多剤耐性に関与しているので、MDR (multi-drug resistance) タンパク質と呼ばれる。MDR と少し異なる構造を持つ別のサブファミリーが MRP (multidrug resistance-associated protein) で、典型的にはグルタチオン S 包合体 (conjugate) を輸送する。また、これらは糖タンパク質であることから PGP (P-glycoprotein) と呼ばれることもある。シロイヌナズナ・ゲノムには ABC タンパク質遺伝子は 129 個あるが、そのうちの一つ、*AtPGP1* の過剰発現体を明所で栽培すると胚軸が長くなり、アンチセンス発現体で胚軸が逆に短くなったことから、ABC 輸送体が植物の成長に関与していることが明らかになった (Sidler et al. 1998)。

*AtPGP1* は原形質膜に局在しているが、それに最もよく似たタンパク質である *AtMDR1* の機能が Noh ら (2001) によって調べられた。*AtMDR1* は茎頂や若い葉で強く発現していて、オーキシンによって誘導される。

その遺伝子破壊株は頂芽優勢の減少や子葉の上偏成長を示し、花茎のオーキシンの極性輸送も大きく減少している。Nohら(2001)の研究では、Sidlerら(1998)の報告に反して *AtPGP1* の破壊株は表現型異常を示さなかったが、*AtMDR1* と *AtPGP1* の2重破壊株は *AtMDR1* 破壊株より強い異常を示し、花茎が多数立つ半矮性の植物になった。*AtMDR1* 破壊の効果は NPA の効果に似ている。NPA は原形質膜上で排出担体の周囲に存在するタンパク質に特異的に結合して極性輸送を阻害することがわかっている。そこで、酵母で *AtMDR1* を発現させて調べてみると、発現させた酵母でオーキシンの排出が促進されるようなことは観察されなかったが、NPA が *AtMDR1* に特異的に結合することがわかった。また、シロイヌナズナのミクロソーム画分に対する NPA の結合は *AtMDR1* 破壊株で低下しており、NPA アフィニティ・クロマトグラフィを用いて野生型の原形質膜画分から NPA 結合タンパク質を精製してみると、*AtMDR1* と *AtPGP1*、*AtPGP2* が得られた。以上の結果から、*AtMDR1* がオーキシンの極性輸送に関与していることは明らかだが(図1)、*AtMDR1* 自身がオーキシンの担体として機能しているかどうかはよくわからない。もし *AtMDR1* が担体だとすると、輸送しているのは電離していないオーキシンであろう。茎頂付近のオーキシン合成部位ではオーキシン濃度が高くなる結果、電離していないオーキシンも細胞内に相当量存在するのかもしれない。しかし動物細胞では、ABC 輸送体がイオン・チャンネルと隣接して存在していて、その受動輸送能を調節している例がある。この例は今まで考えられていた NPA 結合タンパク質の作用機構とよくあうので、そうだとすると *AtMDR1* 自身は担体として働いていない可能性も捨てきれない。

*AtMRP5* はあらゆる組織に発現しているが、維管束と表皮細胞、とくに孔辺細胞に強く発現している(Gaedeke et al. 2001)。その遺伝子破壊株では、根のオーキシン濃度が約2倍増加し、その伸長が阻害されて、側根形成が促進される。その遺伝子産物は負電荷を持った包合体の輸送活性を示す。同じサブファミリーに属する *AtMRP1* から3は包合体を液胞に輸送する活性を示し、ヒトの *MRP1* はグルタミン酸包合体を輸送するので、*AtMRP5* は IAA-アスパラギン酸や IAA-グルタミン酸包合体の液胞への輸送体と予想される。遺伝子破壊株では液胞への輸送が阻害されて、サイトゾルのオーキシン濃度が上昇しているのだろう。ただし、この場合も *AtMRP5* は他のイオン・チャンネルの活性を調節し、その二次的効果として異常な表現型が観察されている可能性を否定できない。

### 3. オーキシンの信号伝達系

#### 3. 1. タンパク質分解系

オーキシン応答にタンパク質分解系が関わっていることが初めて示唆されたのは、シロイヌナズナのオーキシン非感受性突然変異体の原因遺伝子 *AXR1* が、ユビキチン活性化酵素 E1 に似たタンパク質をコードしていることがわかったことによる(Leyser et al. 1993)。*axr1* は多面的な欠損を示す突然変異体で、背丈がやや低く、やや雄性不稔で葉が波うっている(図2B)。その胚軸は屈光性が弱く、暗所で胚軸の先端に形成されるフックを形成することができない。根は野生型より成長が促進されていて、側根形成と屈地性は抑制されている。根と胚軸の成長はオーキシン耐性で、花茎の木部形成も抑制されている。これらの表現型はすべて、オーキシンに対する感受性が低下した結果だと考えられる。

#### 3. 1. 1. ユビキチン修飾系

ユビキチンは、すべての真核生物でよく保存されている76個のアミノ酸残基からなるタンパク質で、タンパク質分解の標識として働き、ユビキチン化されたタンパク質はプロテアソームで分解される。標的タンパク質は3段階の化学反応によってユビキチン化される(図3)。まず、ユビキチン活性化酵素E1が、ATP依存的に自己ユビキチン化され、次にユビキチン転移酵素E2にユビキチンが転移し、最終的にユビキチンリガーゼE3が、E2から標的タンパク質にユビキチンを転移する。E3として働くタンパク質複合体には数種類あるが、その一つは発見当初哺乳類でSkpとCullinとFボックス・タンパク質から構成されていたので、SCF複合体と呼ぶ。また、シロイヌナズナのSkp1のことをASKと呼ぶ。Fボックスはタンパク質間相互作用をおこなうドメインで、Fボックス・タンパク質はこの部分でSkp1に結合する。Fボックスを含むタンパク質をFボックス・タン

パク質と呼び、シロイヌナズナには多数存在する(後述)。Fボックス・タンパク質は、Fボックス以外のドメインで標的タンパク質に結合し、アダプターとして働くので、ユビキチン化の特異性はFボックス・タンパク質によって決定される。オーキシン極性輸送阻害剤であるTIBAは、シロイヌナズナの根の成長を阻害するが、TIBAに耐性の突然変異体*tir1*の原因遺伝子はFボックス・タンパク質をコードしている。TIR1はSCF複合体を形成している(Ruegger et al. 1998)。TIR1をFボックス・タンパク質として機能するSCF複合体をSCF<sup>TIR1</sup>と記述する。TIR1やASK1の遺伝子破壊株は、オーキシン非感受性でもあることから、SCF複合体の活性がオーキシン信号伝達に欠かせないことが明らかになった。

### 3. 1. 2. COP9シグナロソーム

ユビキチン化されたタンパク質をATP依存的に分解する巨大な分子装置である26Sプロテアソームが、植物の信号伝達に重要であることが広く認識されたのは、恒常的光形態形成突然変異群*cop/det/fus*の一部がプロテアソームを構成するタンパク質に似ているタンパク質をコードしていることがわかってからである(Wei et al. 1994)。細胞では液胞でおこっている非選択的なタンパク質分解とともに選択的蛋白質分解もおこっていて、後者を担っているのがプロテアソームであり、細胞質にも核にも存在する。プロテアソームは、タンパク質をATP依存的に分解する20Sの円筒状の本体の両側を19Sの調節粒子がふたをしたような形状になっている。19S調節粒子は基部とふたに分かれていて、標的タンパク質の選別にはふたの機能が重要であると考えられている。COP9やCOP8、COP11、FUS5は他のタンパク質とともに、COP9シグナロソームと呼ぶ複合体を作っていて、これがプロテアソームのふたに似ていたのである。COP9シグナロソームはシロイヌナズナで最初に発見され、その後他の生物種でも存在が確認された。基本的には真核生物に普遍的に存在していると考えられるが、その正確な機能はまだよくわからない。プロテアソームのふたとして働いていて、COP9プロテアソームとも言うべきプロテアソームの中の一つの亜種を構成しているのかもしれないし、また単独で存在していて、何らかの調節機能をはたしている可能性もある。現段階ではどちらのモデルがより妥当か判断することができない(Schwechheimer and Deng 2001)。

### 3. 1. 3. ユビキチン様タンパク質 Rub

ユビキチンは古くから知られているタンパク質だが、最近になって、ユビキチンに似た別種のタンパク質があって、これもまた真核生物に普遍的に存在することが分かった。そのタンパク質は、生物種によってさまざまな名前と呼ばれているが(酵母ではNedd8)、シロイヌナズナではRub(ubiquitin-related)と呼ぶ。Rubもユビキチンと



図2. シロイヌナズナのオーキシン感受性突然変異体。A: 野生型(コロンビア)。B: *axr1-12* (Leyser et al. 1993)。C: *axr3/iaa17*。D: *slr/iaa14*。axr3ほどではないが頂芽優勢が促進されている(Fukaki et al. 2002)。E: *axr2/iaa7*。花茎の屈地性が弱く、枝垂れている(Nagpal et al. 2000)。いずれの変異体も直径5.5 cmのポットに植えてある。

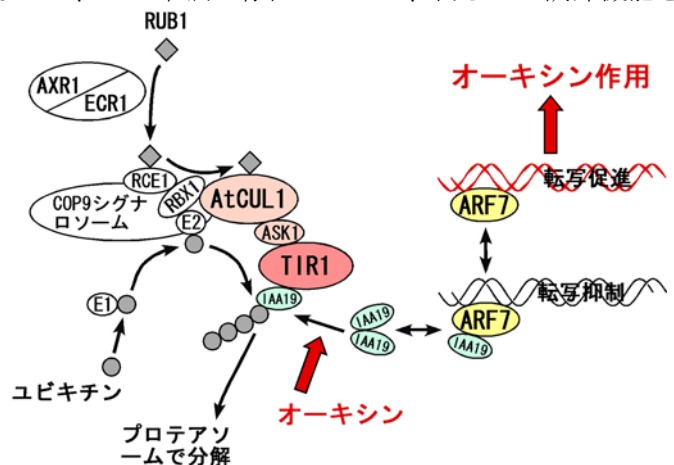


図3. オーキシン応答とタンパク質分解系。

相似の反応系を通して標的タンパク質を修飾し、標的タンパク質の機能を調節する。ユビキチン化の機能がタンパク質分解の調節であることは確立しているが、Rub化に一般化できる機能があるのかどうかはよくわかっておらず、タンパク質のさまざまな機能が調節されている例がある。前述の*AXR1*はRubの活性化酵素E1のサブユニットをコードしていたのである (del Pozo et al. 1998)。AXR1から始まる反応系によって、RubはE3リガーゼのCullinを修飾し、その結果E3リガーゼが活性化されることがわかった (del Pozo et al. 2002)。AXR1が破壊されると、オーキシシンが投与されてもE3リガーゼ活性が上がらず、標的タンパク質が十分分解されないためオーキシシン反応が起こらなくなる。次に詳しく述べるように、E3リガーゼであるSCF複合体にはCOP9シグナロソームが結合している。そこで、*axr1*の光形態形成反応を調べたところ、*axr1*は弱くはあるが暗所で光形態形成反応を示し、恒常的光形態形成突然変異でもあることがわかった。つまり、光形態形成が正常におこるためにも、十分なSCF<sup>TIR1</sup>活性が必要なのである。

SCF複合体の構成をもっと詳しく説明しよう。同複合体の核となっているのはCullinとRBX1である。この二つのタンパク質が核になって、さまざまなタンパク質を呼び込み、複合体が形成される。RBX1 (RINGボックス・タンパク質)は小さなタンパク質で、ジンクフィンガーの一種であるRINGフィンガー・ドメインを持ち、それをとおしてさまざまなタンパク質と結合することができる。前述のように、ユビキチンE3リガーゼには、SCF複合体とは異なるタイプのものもあるが、いずれのタイプのE3リガーゼもRBXを含んでいて、RBXをとおしてユビキチンE2転移酵素 (別名Cdc34)と結合している。さらに、RBX1はそれ自身RubのE3リガーゼでもあって、RubのE2転移酵素RCE1とも結合しており、CullinのRub化に必須の因子である。*RBX1*のアンチセンス体、過剰発現体は、ともに多面的な形態異常を示す。アンチセンス体は致死のものが多くてよく調べられていないが、過剰発現体は*axr1*と似た異常を示し、その異常の程度は*axr1*より強かった。また、SCF<sup>TIR1</sup>の標的タンパク質 (後述のAux/IAAタンパク質)の分解が阻害されていた。暗所で栽培した過剰発現体は、恒常的光形態形成突然変異の表現型を一部ではあるが示した。*axr1*との二重突然変異体は異常の弱い*axr1*の表現型を示したことから、過剰発現体の異常は、RBX1の過剰な蓄積がSCF複合体形成を損なわせておこったりしたのではなく、過剰なRub化によると結論できる (Gray et al. 2002)。

SCF複合体ではCOP9シグナロソームもCullinとRBX1に結合していることがシロイヌナズナや酵母、ヒトで明らかになった。アンチセンス法でCOP9シグナロソームのレベルが抑制された形質転換体を作ると、それも*axr1*とよく似た表現型を示し、恒常的光形態形成反応も示した。また、同転換体でもSCF<sup>TIR1</sup>の標的タンパク質の分解が阻害されていた。野生型のCullinはRub化されていないものの方が多いが、同転換体ではほとんどのCullinがRub化されていたので、COP9シグナロソームは脱Rub化活性を持っていると考えられる。以上の結果から、COP9シグナロソームはCullinのRub化の程度を調節しており、CullinのRub化の程度によってSCF複合体の構成タンパク質間の相互作用が変化して、複合体のE3ユビキチン化活性が変化するのだと考えられる (Schwechheimer et al. 2001)。

### 3. 2. Aux/IAA タンパク質とオーキシシン応答転写調節因子 ARF

#### 3. 2. 1. Aux/IAA タンパク質

次に問題になるのは、ではSCF<sup>TIR1</sup>によるユビキチン化の標的タンパク質は何かということであるが、それがAux/IAAタンパク質である。Aux/IAA遺伝子は茎切片にオーキシシンを投与したときに急速にmRNAが蓄積する遺伝子 (オーキシシン早期誘導性遺伝子)として同定されたもので、オーキシシン投与数分後には発現の増加が観察される。シクロヘキシミドを投与しても発現は増加し、オーキシシンとシクロヘキシミドを同時に投与するとスーパーインダクションがかかる。このことから、Aux/IAA遺伝子の発現は通常なんらかの抑制因子によって抑制されていて、オーキシシンによってその抑制が解除されること、この抑制因子は代謝回転が速いため、シクロヘキシミドによって新規タンパク質合成が阻害されると、それだけでAux/IAA遺伝子発現がおこることが想定されていた。現在、この知見を振り返ってみれば、この抑制因子こそがAux/IAAタンパク質で、Aux/IAA遺伝子自身によるネガティブ・フィードバック機構によって同遺伝子の極めて速い発現調節が可能になっているのだと解釈できる。Aux/IAA遺伝子はファミリーを形成しているが、すべての遺伝子がオーキシシンに速く反応

するわけではなく、オーキシンに反応しないものもあれば、ゆっくりと反応するものもある。

*Aux/IAA* タンパク質は、アミノ酸残基数 160 個程度のタンパク質で、核局在性シグナルを持つ。同タンパク質はシロイヌナズナ・ゲノムには 29 個あり、アミノ酸配列を比べると、4 個の保存されたドメイン、ドメイン I から IV があることがわかる。C 末端側のドメイン III と IV はタンパク質間相互作用ドメインで、そこをとおして *Aux/IAA* タンパク質はホモダイマーを形成する。一方、オーキシン非感受性突然変異には優性であるものがいくつかあるが、それらの変異が *Aux/IAA* タンパク質のドメイン II の 1 アミノ酸置換でおこることから、ドメイン II の機能が明らかになった。シロイヌナズナの *axr3* 優性突然変異体は野生型の半分ぐらいの背丈で、頂芽優勢が強く、根の成長の障害、側根形成の促進、根の屈地性異常が観察される (図 2 C)。この原因遺伝子は *Aux/IAA17* (以下、*IAA17* と省略) で、21 アミノ酸残基からなるドメイン II の中で最もよく保存されている GWPPV の 2 番目の Pro が Leu に変異していた (Rouse et al. 1998)。これを初めとして都合 7 個の *Aux/IAA* 遺伝子について、GWPPV の領域に変異を起こした優性変異が得られている (Liscum and Reed 2002)。

この 7 個の優性突然変異体ではさまざまなオーキシン応答が異常になっているが、*axr2/iaa7* のように異常の程度が大きいものから (図 2 E)、*slr/iaa14* (図 2 D) や *msg2/iaa19* のようにそれほど異常でないものまでさまざまなものがある。また、*shy2/iaa3* (Tian and Reed 1999) や *axr2/iaa7*、*axr3/iaa17* は、弱いながらも恒常的光形態形成を示す (Nagpal et al. 2000)。

レポーターであるルシフェラーゼ (LUC) と *Aux/IAA* タンパク質を融合させたタンパク質を発現させて調べると、*Aux/IAA* を融合させることによって融合タンパク質量が数十分の一に減少することから、同タンパク質がタンパク質の安定性を調節するシグナルを持っていることがわかる (Worley et al. 2000)。LUC 自体は安定なタンパク質で、3 時間たってもほとんどタンパク質レベルは減少しないが、それにエンドウの *IAA6* を融合させると半減期 8 分で減少するようになる。その *IAA6* に *Aux/IAA* 遺伝子の優性突然変異でおこっているアミノ酸置換を導入すると半減期は 4 時間に増加した。

融合させる *Aux/IAA* タンパク質を削っていった、どの部分はその調節機能を持っているか調べると、ドメイン II のなかでさらによく保存されていて、GWPPV を含んだ 13 アミノ酸残基の部分に行きついた。この結果から、ドメイン II の 13 アミノ酸部分がタンパク質の安定性を減少させるシス因子として働いていることと、*Aux/IAA* 優性突然変異は *Aux/IAA* タンパク質の細胞内蓄積が原因であることがわかった。タンパク質の安定性を減少させるのに 13 アミノ酸の中の GWPPV 配列が必須だが、その周りの残基の部分も GWPPV が機能するのに必要である。また、*Aux/IAA* タンパク質全体を融合させた方が 13 アミノ酸やドメイン II だけを融合させたときよりも不安定化の効果が大きいことから、ドメイン II 以外の部分も安定性に関係しているらしい。*Aux/IAA* タンパク質の融合による LUC の分解促進はプロテアソーム阻害剤によって阻害されるので、*Aux/IAA* はプロテアソームによって分解されると考えられている (Ramos et al. 2001)。ドメイン I の機能はわかっていないが、*Aux/IAA* 優性突然変異の抑制突然変異のなかにドメイン I が変異しているものがあるので (Rouse et al. 1998)、これも *Aux/IAA* の機能に必要なドメインであるようだ。

### 3. 2. 2. オーキシン応答転写調節因子 ARF

*GH3* 遺伝子は、オーキシン早期応答性遺伝子として同定された遺伝子である (後述) (Hagen and Guilfoyle 2002)。同遺伝子はオーキシン応答性がはっきりしているので、そのプロモーター解析が詳細におこなわれ、その結果オーキシン応答性シス因子 TGTCTC が同定された。このシス因子に結合するタンパク質として同定されたのがオーキシン応答転写調節因子 ARF (auxin-response factor) である (Ulmasov et al., 1997) (前出の ADP リボシル化因子とまったく異なることに注意)。ARF は、ほぼ同時に、酵母の 2 ハイブリッド系を用いたスクリーニングで、*Aux/IAA* タンパク質のドメイン III と IV に結合するタンパク質としても同定された (Kim et al. 1997)。実際、ARF には C 末端にドメイン III と IV があるのだった。またほぼ同時に、*ARF3* と 5 の機能欠損突然変異体がオーキシン応答欠損突然変異体であることがわかり (Sessions et al. 1997, Hardtke and Berleth, 1998)、ここにオーキシン応答機構に関する仮説がたちまち出現することになった。すなわち、

Aux/IAA タンパク質はドメイン III と IV をとおして ARF とヘテロダイマーを作ることで ARF の転写調節活性を阻害する。Aux/IAA のレベルが下がると、Aux/IAA に結合した ARF が減少するので、ARF の転写調節能が回復し下流の遺伝子発現が調節され、オーキシン応答がおこる。Aux/IAA 遺伝子の転写も ARF によって促進されるので、Aux/IAA レベルも上昇し、再び ARF の機能が抑制される。ARF はシロイヌナズナでは 23 個の遺伝子からなる遺伝子族を構成しているので、23 個の ARF と 29 個の Aux/IAA タンパク質との相互作用が多様なオーキシン作用を実現していると考えられるのである。モデルはすぐさま頭に浮かぶが、ではどの程度このモデルが実際に確かめられているのか検証してみよう。

### 3. 2. 3. Aux/IAA タンパク質と ARF の相互作用

さまざまな転写調節因子の研究から、転写調節因子は DNA 結合ドメインや活性化ドメイン、タンパク質間相互作用ドメインなどからなるモジュール構造をとっていて、それぞれの構成ドメインが独立に機能することがわかっている。ARF は 700 個ぐらいのアミノ酸残基からなるタンパク質で、Aux/IAA タンパク質同様、C 末端側にドメイン III と IV (III+IV) を持っている。N 末端には DNA 結合ドメイン (DBD) があって、DNA 結合ドメインとドメイン III と IV の間に中間領域 (MR) を持つ。DBD の核となる配列は、アブシジン酸信号伝達系の転写調節因子 ABI3/VP1 の DBD と弱い相同性がある。MR はそのアミノ酸配列によって活性化または抑制ドメインとして機能する。プロトプラストでの一過的発現系を用いた研究によれば、ARF 5、6、7、8 の MR のように Gln に富んでいる MR は活性化ドメインとして働き、ARF 1、2、3、4、9 の MR のように Gln に富んでいないものは抑制ドメインとして働く。その結果、前者の ARF は転写活性化能をもち、後者の ARF は転写抑制能を持つことになる。ARF の DBD はそれだけで DNA に結合する能力を持っていて、MR やドメイン III+IV は DNA 結合には影響しない。そして、ARF の DNA 結合能自体はオーキシンによって変化しない。ARF の MR を酵母の転写調節因子 Gal4 の DBD に融合させて、その転写調節能力を調べると、MR のアミノ酸配列にしたがって、転写を促進または抑制する能力を示す。しかし、この場合もオーキシンはその転写調節能に影響しなかった。ただし、Gal4 の DBD に活性化ドメインの機能を持つ MR とドメイン III+IV を融合させると、その転写促進程度は MR だけを融合させたときより減少し、そこにオーキシンを投与すると MR だけを融合させた場合と同じレベルまで増加する。すなわち、ドメイン III+IV があると、プロトプラストに内在している Aux/IAA タンパク質と相互作用するので、Gal4 DBD-MR が本来持っている転写促進能が抑制され、そこにオーキシンが作用すると Aux/IAA レベルが減少するのでその抑制が解除されたと考えられる。その証拠に Gal4 DBD-MR・ドメイン III+IV とともに IAA17 を共発現させると転写促進能は強く抑制され、共発現させる IAA17 のドメイン II に優性突然変異を導入して IAA17 の安定性を増加させると、転写促進能は完全に消失してしまう (Tiwari et al. 2003)。

このように、IAA17 は ARF 機能を抑制するが、その抑制の機構として二通りの機構が考えられる。一つは、IAA17 が ARF の転写抑制因子として働く場合で、もう一つは、IAA17 が ARF と結合することで自由な ARF の濃度が減少し、その結果プロモーターに結合する ARF の数が減って ARF の機能が阻害される場合である。もし後者の機構が原因だとすると、IAA17 が ARF の促進因子となることはありえない。そこで、ヘルペス・ウィルスの転写促進因子である VP16 タンパク質の活性化ドメインと IAA17 の融合タンパク質を作り、Gal4 DBD-MR・ドメイン III+IV の転写調節活性に対する効果を調べた。ただし、そのときに IAA17 の方に少し細工をしておく。前述のように、IAA17 の優性突然変異 *axr3* の抑制突然変異が同定されている。その抑制変異では、ドメイン II の突然変異に加えてドメイン I でアミノ酸置換がおこっていて、このことからドメイン I の変異は機能欠損突然変異であることがわかる。したがって、もし IAA17 が転写の抑制因子であるとする、ドメイン I 突然変異を導入した IAA17 はその抑制機能を失っているはずである。そこで、VP16 の活性化ドメインと融合させる IAA17 にドメイン I と II の変異を導入しておくのである。このようにして作った融合タンパク質を Gal4 DBD-MR・ドメイン III+IV と共発現させると、転写は大きく活性化された。実際、このときの活性化の程度は、Gal4 DBD に直接 VP16 の活性化ドメインを融合させたときの活性化と同程度だった。この実験結果から、Aux/IAA タンパク質は転写の抑制因子であることが結論できた (Tiwari et al. 2003)。

以上の結果は、ARF の機能にとってドメイン III+IV が必須であることを示している。しかし、23個の ARF 遺伝子の中で、ARF3 と 17 にはドメイン III+IV がない。特に ARF3 は後述のようにオーキシン生理反応に関与していることが明確な遺伝子であることを考えると、ドメイン III+IV を介さないオーキシン応答機構もあるのかもしれない。

### 3. 2. 4. オーキシンの一次反応

今まで、オーキシンを投与すると Aux/IAA タンパク質のレベルが減少すると言ってきた。Aux/IAA 遺伝子はオーキシン早期誘導性遺伝子ではなかったのかと不審に思われたであろう。ARF は転写を活性化するものと抑制するものがあるので、オーキシン投与によって Aux/IAA レベルは増加するとしても、減少するとしても、どちらでも上述のモデルは成立する。Aux/IAA タンパク質によってフィードバック制御がかかるということが重要で、Aux/IAA 自体はどちらの挙動をとってもかまわない。モデル上はそうだが、では実際に細胞内ではどうなっているかということが、Aux/IAA タンパク質を融合した LUC レポータータンパク質を使って調べられた。シロイヌナズナの形質転換体で、この融合タンパク質の遺伝子をオーキシンに応答しないプロモーターで発現させて、遺伝子産物の分解速度を測定する。前述の通り、LUC 自体は安定なタンパク質だが、IAA1 を融合させると半減期 10.2 分で分解されるようになる。芽ばえを 5  $\mu$ M 2,4-D で処理すると半減期がさらに 5.2 分に減少した。オーキシン投与 2 分後には 40% もの LUC 活性が減少してしまう。この反応の速さは、オーキシンによる Aux/IAA 遺伝子 mRNA の増加速度より速い (Zenser et al. 2001)。以上の結果は、Aux/IAA タンパク質の分解の促進がオーキシンの一次作用であることを示している (図 3)。オーキシンが投与されると転写調節抑制因子である Aux/IAA タンパク質のレベルが減少するので、二次的作用として Aux/IAA 遺伝子の転写が促進されるのである。この転写促進によって Aux/IAA レベルは元のレベルに回復し、再び同遺伝子の転写は抑制されることになる。以上が Aux/IAA タンパク質レベルの調節の原則だが、Aux/IAA 遺伝子の mRNA とタンパク質レベルの変化は必ずしも一致せず、実際はタンパク質分解以外のいろいろな転写後調節が働いているようである。

IAA17 と IAA7 は SCF<sup>TIR1</sup> によってユビキチン化され、プロテアソームで分解される。このとき、オーキシンを投与すると SCF<sup>TIR1</sup> に結合する Aux/IAA タンパク質量が増加するので、オーキシンによってユビキチン化が促進され Aux/IAA 分解が促進されるのだとわかる (Gray et al. 2001)。では、なぜオーキシンを投与すると Aux/IAA の SCF 複合体への親和性が増加するのだろうか。オーキシンの受容からこの点に至る過程が現在のオーキシン信号伝達系研究の焦点である。タンパク質のユビキチン化はさまざまに調節されている。現在明らかになっている SCF 複合体の標的タンパク質はすべてリン酸化されている。また、ドメイン II の保存されている 13 アミノ酸残基にはリン酸化される残基が 2 個ある。そこで、これら残基をリン酸化されない残基に置換してタンパク質の分解速度を調べてみたが、アミノ酸置換によって分解速度は変化しなかった (Ramos et al. 2001)。リン酸化にかぎらず、広くタンパク質の修飾による調節機構が Aux/IAA タンパク質分解にもあるのかどうか調べる必要があるであろう。

### 3. 3. Aux/IAA-ARF 調節系の実際

次は、Aux/IAA-ARF フィードバック・モデルが実際のオーキシン生理反応に適用できるのかどうか検討しなければならない。そのためには、ARF 遺伝子の機能がわかっていることが先決だが、23個の ARF の内、機能がわかっているのは 4 つしかない。

#### 3. 3. 1. IAA12 と ARF5 による軸形成調節

ARF5 の機能欠損突然変異が胚形成突然変異 *MONOPTEROS (MP)* である (Hardtke and Berleth 1998)。mp は胚発生の初期から異常で、正常な原根層 (hypophysis) ができず、心臓型胚のときには前形成層を形成できない。その結果、子葉と茎頂分裂組織はできるものの、胚軸と根端分裂組織が形成できないので、通常は芽ばえで死んでしまうが、子葉から不定根ができると異常ながらも栄養成長をすることができるようになる。

その場合、欠損は主に維管束形成に現れ、不連続で未発達な維管束ができる。葉では中央部にしか葉脈ができず、一次葉脈はできるものの、二次葉脈はほとんどできない。このほか、二枚の子葉が融合したり、花茎の先端がピン状になったり、葉の形成される位置が異常になったりする表現型を示す。

*mp* に似た胚形成突然変異で優性なのが *bodenlos (bdl)* である。*bdl* の欠損は *mp* よりやや弱く、不完全な胚軸はできるが、根はできない。オーキシン非感受性でもあって、不定根形成により成長できた場合は、*axr1* のようにたくさん花茎を作る。*bdl* は、*IAA12* のドメイン II の優性突然変異であったので、蓄積した *bdl* タンパク質が MP の機能を阻害して胚形成異常を引き起こしているのではないかと考えられる。そこで、BDL/IAA12 タンパク質と MP/ARF5 タンパク質のドメイン III+IV が結合できるかどうか酵母の 2 ハイブリッド系を用いて調べたところ、両タンパク質が酵母の核内で結合していることがわかった。また、両タンパク質の発現パターンを胚形成過程で比較してみると、両タンパク質はともに胚発生の初期にはほとんどの細胞で発現していること、心臓型胚ではともに原形成層に発現していることがわかった。二つの遺伝子の突然変異の表現型が似ており、遺伝子産物の組織内局在性が一致するとともに、それらは物理的にも結合しうることがわかったので、上述のモデルは妥当であると考えられる (Hamann et al. 2002)。

### 3. 3. 2. IAA19 と ARF7 による偏差成長調節

筆者らはオーキシンによる屈曲反応の分子機構を明らかにしようとして、シロイヌナズナの胚軸の片側にオーキシンを塗っても屈曲しない突然変異体のスクリーニングをおこなった。その結果、劣性の突然変異 *nph4/msg1* と優性の突然変異 *msg2* を単離した。両突然変異体は、胚軸の屈地性と屈光性が弱くなっていて、暗所で胚軸の先端に形成されるフックを作ることができない。オーキシン感受性を高濃度のオーキシン投与による成長阻害で調べてみると、胚軸の感受性は低下しているが、根の感受性は正常であった。また、*mp-bdl* 系とはことになって、*msg2* の方が *nph4* より強い異常を示す。オーキシン非感受性突然変異体の異常は多面的であることが多いが、*nph4* と *msg2* の特徴は表現型異常がほぼ地上部器官の偏差成長反応に特異的なことである。*nph4* の原因遺伝子は *ARF7* で (Harper et al. 2000)、*msg2* は *IAA19* のドメイン II の突然変異であった (Tatematsu et al. 2003)。

この二つの変異体の特異的な表現型異常は、*IAA19* が *ARF7* に特異的に結合するからではないかと考えて、*ARF5*、7、8 のドメイン III+IV と *IAA1*、6、13、19 との間の結合を酵母の 2 ハイブリッド系で調べたが、いずれの組み合わせも同程度の強さの結合を示し、タンパク質間の結合にはとくに特異性はないことがわかった。同様な結論は *IAA17* と *ARF1* や 5 との相互作用でも得られており、この二つのタンパク質族間には特に結合しやすい組み合わせはないのかもしれない。また、ドメイン II の優性突然変異はこのタンパク質間相互作用に影響しないこともわかっている (Ouellet et al. 2001)。筆者らは、大腸菌で発現させた *ARF7* と *IAA19* を用いて、両タンパク質が試験管内で結合することも確認している。*IAA19* の発現はオーキシン誘導性だが、*nph4* 変異体ではその誘導性は 60% 失われていた。すなわち、*IAA19* の転写調節は多くの部分が *NPH4* によって行われているのである。

以上の結果は、*NPH4* と *IAA19* がネガティブ・フィードバックを作ってオーキシン反応を調節していることを示している。つまり、普通の状態では *IAA19* が結合して *ARF7* の転写活性化能を抑制している。そこでオーキシン濃度が上がると *IAA19* が分解されて抑制が解消し、*ARF7* が下流の遺伝子の転写を開始して、屈曲反応がおこる。*IAA19* の転写も *ARF7* によって促進されるので *IAA19* の mRNA レベルが上昇し、同タンパク質レベルも増加する。その結果、再び *ARF7* による転写が抑制され、屈曲反応が停止する。このフィードバック制御は、屈曲のような一過的な反応にもっとも適しているようにみえる。

### 3. 3. 3. その他の ARF の機能——ARF3 と 8

*ARF3* の機能欠損型突然変異が *ettin (ett)* で、花の雌ずいの形態形成が異常になる (Session et al. 1997)。雌ずいでは、頂端部に柱頭と花柱、それから基部に向かって子房、基部組織の順に組織ができるが、*ett* では頂端の柱頭と花柱の領域と基部の領域が広がり、中間の子房の領域が狭くなる。*ett* の強い変異体では、子房が完

全になくなってしまふ。この表現型は、雌ずいをオーキシンの極性輸送阻害剤である NPA で処理しても現れるので、雌ずいでは頂端から基部に向かって形成されているオーキシンの濃度勾配にそって各組織の領域が決定されていると考えられる。この中で *ETT* は高濃度のオーキシンに対する応答（柱頭と花柱の領域形成）を制限して、中間の濃度のオーキシン応答である子房の領域形成を促進する働きをしているので、*ETT* の機能欠損によって上述のような表現型が生ずるのだと考えられる。NPA 処理するとオーキシンの濃度勾配が急になるので、オーキシン濃度の中間領域が縮小し、その結果 *ett* と似た表現型になるのだろう（Nemhauser et al. 2000）。上述のように *ETT* はドメイン III と IV を持っていない。このような ARF がどのようにオーキシんに応答するのかという点は、まったくわかっていない。

このように、雌ずいの組織形成は頂端—基部方向のオーキシンの濃度勾配に依存して形成されているようにみえる。樹木では、木部形成がオーキシンの放射方向の濃度勾配に依存している（Tuominen et al. 1997）。根のパターン形成は、前述のようにオーキシンの濃度勾配に依存している。これらの現象では、オーキシンの濃度勾配が細胞の分化に位置情報として働いているようにみえるので、オーキシンはモルフォゲンであると考えることができる。

*ARF8* 遺伝子破壊株の芽ばえは明所で野生型より胚軸が長くなり、*arf8* が光非感受性突然変異であることがわかった（Tian et al. 2003）。*arf8* のオーキシンに対する感受性は、オーキシンによる胚軸や根の成長障害で判断すると正常である。しかし、胚軸の屈光性はやや弱くなっているため、胚軸のオーキシン感受性も少し低下しているのかもしれない。*ARF8* の遺伝子発現は明所の胚軸で強く、暗所ではほとんど発現していない。また、茎頂と根端の分裂組織では明暗に関わらず発現している。*ARF* 遺伝子は普通、構成的に発現していると考えられているが、イネの *ARF1* はオーキシン誘導性である（Waller et al. 2002）。光条件に依存して発現が変化する例は、*ARF8* 以外報告がない。上述の Aux/IAA-ARF フィードバック・モデルにしたがえば、*ARF* の機能欠損変異体の表現型は対になる Aux/IAA 遺伝子の優性突然変異体の表現型と似ているはずである。光感受性が異常な Aux/IAA 優性変異体としては、前述のように *shy2/iaa3* や *axr2/iaa7* のように弱い恒常的光形態形成の表現型、すなわち光高感受性を示すものしか知られていない。これは *arf8* の光非感受性とは逆の方向の表現型である。まだ調べられていない Aux/IAA 遺伝子の中に *ARF8* と対になるべき遺伝子があるのかもしれないし、またすべての *ARF* 遺伝子にフィードバックモデルが適用できないのかもしれない。

#### 4. おわりに

本稿では、オーキシンの極性輸送と信号伝達系に関わる遺伝子群について解説してきたが、ここで述べてきた枠にはまらない遺伝子でオーキシン応答に関与すると報告された遺伝子を表 1 にまとめた。これら遺伝子と本稿で詳しく解説した遺伝子群との関係もごく近い将来明らかになるだろう。

本稿では、オーキシンの信号伝達にタンパク質分解系が重要であることを述べたが、タンパク質分解系による調節は、オーキシンばかりでなく植物の信号伝達に広く用いられている調節様式であることがわかってきたのが、最近の植物の信号伝達研究の成果といえよう。図 4 は、オーキシンによる調節機構をジベレリンと光形態形成の調節機構と比較したものである。いずれの信号伝達系でも転写調節因子である ARF や HY5 が下流の遺伝子発現を調節して生理反応がおこる。そしていずれの系でも、その転写調節因子を負に調節する因子が存在する。植物ホルモンや光受容体はその負の因子を抑制することで、生理反応を引き起こす。その抑制法としてタンパク質分解が関与しているのである。オーキシンやジベレリンでは、ホルモンが投



図 4. 植物に見られる信号伝達系の共通性。

表 1. 真核生物ゲノム中の FCS 複合体を構成するタンパク質遺伝子の数

	F ボックスタンパク質*	Skp タンパク質*	全遺伝子**
酵母	14	1	6,241
ショウジョウバエ	24	6	13,601
線虫	337	21	18,424
ヒト	>38	8	36,000?
シロイヌナズナ	694	19	25,498

\*Gagne et al. (2002)

\*\*Rubin et al. (2000)

与されると負の調節因子Aux/IAAやGAIの分解が促進されて、Aux/IAAの機能を抑制する。光形態形成での抑制因子群COPは、それら自体がタンパク質分解系の構成因子である。なかでも、COP1はRINGフィンガー・ドメインを持つタンパク質でユビキチンE3リガーゼとして働き、HY5を分解させる。光受容体が光を吸収すると、暗所では核に局在していたCOP1は核から細胞質へと局在性を変化させ、その結果HY5が分解されなくなる。このように、タンパク質分解系の関与の仕方は異なるものの、いずれの伝達系でもタンパク質分解系が必須の構成因子として働いている。ジベレリンの場合は、SLR1を分解するE3リガーゼが同定され(SCFGID<sup>2</sup>)、ジベレリン投与によるSLR1のリン酸化がSLR1の分解の引き金になることが明らかにされている(Sasaki et al. 2003)。また、植物ホルモンの間には相互作用があるものがあるが、この相互作用も信号伝達系にタンパク質分解系を共通に持つことが原因かもしれない。たとえば、オーキシン非感受性突然変異*axr1*は、ジャスモン酸に対しても非感受性である。同じく*tir1*はエチレン非感受性でもある。

最後に、ゲノム構造が明らかになった真核生物について、Fボックス・タンパク質遺伝子の数を比べてみよう(表1)。同遺伝子の数は生物種によって大きく異なり、シロイヌナズナと線虫、特にシロイヌナズナには他種に比べて極めて多くの遺伝子が存在する。このことは、高等植物がタンパク質分解系に依存した調節機構を多用していることを示唆しているにちがいない。植物の多様なタンパク質分解系を研究することによって、分子機械としての植物の特徴が明らかになるだろうと期待できる。

## 文献

- 森上敦(2000) 根の形成「植物の形を決める分子機構」岡田清孝、町田泰則、松岡信編, pp.94-102, 秀潤社, 東京.
- Casson, SA, Chilley, PM, Topping, JF, Evans, IM, Souter, MA and Lindsey, K (2002) *Plant Cell* 14, 1705-1721.
- Chen, J-G, Ullah, H, Young, JC, Sussman, MR and Jones, A (2001) *Genes Dev.* 15, 902-911.
- Christensen, SK, Dagenais, N, Chory, J and Weigel, D (2000) *Cell* 100, 469-478.
- del Pozo, JC, Dharmasiri, S, Hellmann, H, Walker, L, Gray, WM and Estelle, M (2002) *Plant Cell* 14, 421-433.
- del Pozo, JC, Timpte, C, Tan, S, Callis, J and Estelle, M (1998) *Science* 280: 1760-1763.
- Dunwell, JM, Culham, A, Carter, CE, Sosa-Aguirre, CR and Goodenough, PW (2001) *Trends Biochem. Sci.* 26, 740-746.
- Friml, J, Benková, E, Blilou, I, Wisniewska, J, Hamann, T, Ljung, K, Woody, S, Sandberg, G, Scheres, B, Jürgens, G and Palme, K (2002) *Cell* 108, 661-673.
- Friml, J, Wiśniewska, J, Benková, E, Mendgen, K and Palme, K (2002) *Nature* 415, 806-809.
- Fukaki, H, Tameda, S, Masuda, H and Tasaka, M (2002). *Plant J.* 29, 153-168.
- Gaedeke, N, Klein, M, Kolukisaoglu, U, Forestier, C, Müller, A, Ansorge, M, Becker, D, Mamnun, Y, Kuchler, K, Schulz, B, Mueller-Roeber, B and Martinoia, E (2001) *EMBO J.* 20, 1875-1887.
- Gagne, JM, Downes, BP, Shiu, SH, Durski, AM and Vierstra, RD (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 11519-24.
- Geldner, N, Anders, N, Wolters, H, Keicher, J, Kornberger, W, Muller, P, Delbarre, A, Ueda, T, Nakano, A and Jürgens, G (2003) *Cell* 112, 219-230.
- Geldner, N, Friml, J, Stierhof, Y-D, Jürgens, G and Palme, K (2001) *Nature* 413, 425-428.
- Gil, P, Dewey, E, Friml, J, Zhao, Y, Snowden, KC, Putterill, J, Palme, K, Estelle, M and Chory, J (2001) *Genes Dev.* 15, 1985-1997.
- Gray, WM, Hellmann, H, Dharmasiri, S and Estelle, M (2002) *Plant Cell* 14, 2137-2144.

- Gray, WM, Kepinski, S, Rouse, D, Leyser, O and Estelle, M (2001) *Nature* 414, 271-276.
- Grebe, M, Friml, J, Swarup, R, Ljung, K, Sandberg, G, Terlou, M, Palme, K, Bennett, MJ and Scheres, B (2002) *Cur. Biol.* 12, 329-334.
- Hagen, G and Guilfoyle, T (2002) *Plant Mol. Biol.* 49, 373-385.
- Hamann, T, Benkova, E, Bäurle, I, Kientz, M and Jürgens, G (2002). *Genes Dev.* 16, 1610-1615.
- Hardtke, CS and Berleth, T (1998) *EMBO J.* 17, 1405-1411.
- Harper, RM, Stowe-Evans, EL, Luesse, DR, Muto, H, Tatematsu, K, Watahiki, MK, Yamamoto, K and Liscum, E (2000) *Plant Cell* 12, 1-16.
- Hellmann, H and Estelle, M (2002). *Science* 297, 793-797.
- Kim, J, Harter, K and Theologis, A (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 11786-11791.
- Leyser, HMO, Lincoln, C, Timpte, C, Lammer, D, Turner, J and Estelle, M (1993) *Nature* 364, 161-164.
- Liscum, L and Reed, JW (2002) *Plant Mol. Biol.* 49, 387-400.
- Lu, C and Fedoroff, N (2000) *Plant Cell* 12, 2351-2365.
- Luschnig, C (2002) *Trends Plant Sci.* 7, 329-332.
- Morelli, G and Ruberti, I (2002) *Trends Plant Sci.* 7, 399-404.
- Murphy, A, Peer, WA and Taiz, L (2000) *Planta* 211, 315-324.
- Nagpal, P, Walker, L, Young, J, Sonawala, A, Timpte, C, Estelle, M and Reed, JW (2000) *Plant Physiol.* 123, 563-573
- Nemhauser, JL, Feldman, LF and Zambryski, PC (2000). *Development* 127, 3877-3888.
- Noh, B, Mruphy, AS and Spalding, EP (2001) *Plant Cell* 13, 244-2454.
- Ouellet, F, Overvoorde, PJ and Theologis, A (2001) *Plant Cell* 13, 829-841.
- Ramos, JA, Zenser, N, Leyser, O and Callis, J (2001) *Plant Cell* 12, 2349-2360.
- Rashotte, AM, DeLong, A and Muday, GK (2001) *Plant Cell* 13, 1683-1697.
- Rouse, D, Mackay, P, Stirnberg, P, Estelle, M and Leyser, O (1998) *Science* 279, 1371-1373.
- Rubin, GM et al. (2000) *Science* 287, 2204-2215.
- Ruegger, M, Dewey, E, Gray, WM, Hobbie, L, Turner, J and Estelle, M (1998) *Genes Dev.* 12, 198-207.
- Sánchez-Fernández, R, Davies, TGE, Coleman, JOD and Rea, PA (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 30231-30244.
- Sasaki, A, Itoh, H, Gomi, K, Ueguchi-Tanaka, M, Ishiyama, K, Kobayashi, M, Jeong, D-H, An, G, Kitano, H, Ashikari, M and Matsuoka, M (2003) *Science* 299, 1896-1898.
- Schwechheimer, C and Deng, X-W (2001) *Trends Cell Biol.* 11, 420-426.
- Schwechheimer, C, Serino, G, Callis, J, Crosby, WL, Lyapina, S, Deshaies, RJ, Gray, WM, Estelle, M and Deng, X-W (2001) *Science* 292, 1379-1385.
- Sessions, A, Nemhauser, JL, McColl, A, Roe, JL, Feldmann, KA and Zambryski, PC (1997) *Development* 124, 4481-4491.
- Sidler, M, Hassa, P, Hasan, S, Ringli, C and Dudler, R (1998) *Plant Cell* 10, 1623-1636.
- Souter, M, Topping, J, Pullen, M, Friml, J, Palme, K, Hackett, R, Grierson, D and Lindsey, K (2002) *Plant Cell* 14, 1017-1031.
- Steffens, B, Feckler, C, Palme, K, Christian, M, Bötger, M and Lüthen, H (2001) *Plant J.* 27, 591-599.
- Steinmann, T, Geldner, N, Grebe, M, Mangold, S, Jackson, CL, Paris, S, Gälweiler, L, Palme, K and Jürgens, G (1999) *Science* 286, 316-318.
- Swarup, R, Friml, J, Marchant, A, Ljung, K, Sandberg, G, Palme, K and Bennett, M (2001) *Genes Dev.* 15, 2648-2653.
- Tatematsu, K, Kumagai, S, Muto, H, Sato, A, Watahiki, MK, Harper, RM, Liscum, E, and Yamamoto, KT (2004) *Plant Cell* 16, 379-393.

- Tian, C-e, Muto, H, Higuchi, K, Matamura, T, Tatematsu, K, Koshiba, T, and Yamamoto, KT (2004) *Plant J.* 40, 333-343
- Tian, Q and Reed, JW (1999) *Development* 126, 711-721.
- Tiwari, SB, Hagen, G and Guilfoyle, T (2003) *Plant Cell* 15, 533-543.
- Tuominen, H, Puech, L, Fink, S and Sundberg, B (1997) *Plant Physiol.* 115, 577-585.
- Ueda, T and Nakano, A (2002) *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 513-517.
- Ulmasov, T, Hagen, G and Guilfoyle, TJ (1997) *Science* 276, 1865-1868.
- Waller, F, Furuya, M and Nick, P (2002) *Plant Mol. Biol.* 50, 415-425.
- Wei, N, Chamovitz, DA and Deng, X-W (1994) *Cell* 78, 117-124.
- Woo, E-J, Marshall, J, Baulny, J, Chen, J-G, Venis, M, Napier, RM and Pickersgill, RW (2002) *EMBO J.* 21, 2877-2885.
- Worley, CK, Zenser, N, Ramos, J, Rouse, D, Leyser, O, Theologis, T and Callis, J (2000) *Plant J.* 21, 553-562.
- Xie, Q, Frugis, G, Colgan, D and Chua, N-H (2000) *Genes Dev.* 14, 3024-3036.