

オーキシン輸送体の局在制御因子が関わる発生制御

松浦 友紀¹・田中 博和²

¹大阪大学 大学院理学研究科 生物科学専攻
〒560-0043 大阪府豊中市待兼山町 1-1

²明治大学 大学院農学研究科 生命科学専攻
〒214-8571 神奈川県川崎市多摩区東三田 1-1-1

Developmental regulation of auxin transporter by membrane trafficking factors

Yuki Matsuura¹, Hirokazu Tanaka²

¹Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Osaka University
1-1 Machikaneyama-cho, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan

²Department of Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Meiji University
1-1-1 Higashimita, Tama, Kawasaki, Kanagawa 214-8571, Japan

Key words: *Arabidopsis thaliana*, auxin, PIN

DOI: 10.24480/bsj-review.11b7.00189

1. はじめに

オーキシンは方向性を持って輸送される植物ホルモンであり、植物の発生と成長の様々な場面において重要な役割を担っている。オーキシンの適切な勾配と蓄積によって胚は形成され、地上部は光に向かって育ち、根は伸長し側根が形成される。オーキシンは受動的に細胞に取り込まれるだけでなく、細胞膜に分布するオーキシン輸送体によって、細胞膜を介した細胞への取り込みと、細胞外への排出が制御されている。これらの輸送体の多くは細胞膜において偏った分布を示し、特に、PIN ファミリーのオーキシン排出輸送体の分布は植物個体内のオーキシンの極性輸送の方向性と一致することなどから、排出依存的なオーキシン輸送系の働きは組織や個体レベルでのオーキシンの流れを規定する主要な要因であると考えられている。本総説では、PIN ファミリーのオーキシン輸送体の局在を制御する因子の機能と発生制御機構についての最近の知見を紹介する。

2. シロイヌナズナのオーキシン輸送体

オーキシンの極性輸送を分子レベルで説明する仮説としては、オーキシンを細胞から排出する輸送体が偏って局在するという、いわゆる化学浸透説が 1970 年代から提唱されていた。その後、分子遺伝学的研究の発展に伴い、国内外の研究グループによりオーキシンの極性輸送や応答に異常を示す変異体の研究が精力的に進められ、細胞膜に局在するオーキシン輸送体として PIN-FORMED (PIN) ファミリーのタンパク質や、AUXIN1/LIKE AUX1 (AUX/LAX) ファミリーのタンパク質が同定された。実際に、PIN タンパク質にはオーキシン排出活性が

あることが、タバコ BY-2 細胞や、HeLa 細胞を用いた実験系で実証されている (Petrasek *et al.* 2006)。一方、AUX/LAX ファミリータンパク質はオーキシン取り込み活性を持つことが、異種細胞を用いた実験系により実証されている (Yang *et al.* 2006, Swarup *et al.* 2008, Swarup & Peret 2012)。これらに加えて、ABC トランスポータータンパク質も細胞膜に局在し、オーキシンの輸送活性を持つことが報告されている (Geisler *et al.* 2017)。

3. PIN タンパク質の発生における役割

PIN タンパク質は種々の組織で発現し、多くの細胞の細胞膜において偏った分布を示す (Tanaka *et al.* 2006, Grunewald & Friml 2010)。花茎や根の中心柱におけるオーキシンの基部側 (根の先端側) への輸送や、根の表皮における頂端側 (地上部側) への輸送の方向性は PIN ファミリーのオーキシン排出タンパク質の局在様式と矛盾がなく (Benkova *et al.* 2003), PIN タンパク質の機能欠損変異によりオーキシンの極性輸送が減衰すること、さらに遺伝子工学的手法や薬理学的手法により PIN タンパク質の局在を攪乱すると、それによってオーキシンの分布が乱れることが明らかになっており (Wisniewska *et al.* 2006, Kleine-Vehn *et al.* 2008, Huang *et al.* 2010), PIN タンパク質の局在はシロイヌナズナにおけるオーキシンの極性輸送に中心的な役割を担っていると考えられている。

シロイヌナズナにおいて、細胞膜に局在しオーキシンの輸送に関与している PIN タンパク質は PIN1, 2, 3, 4, 7 である (Grunewald & Friml, 2010)。根では、PIN1 は根端分裂組織付近の中心柱に主に発現し、細胞の基部側の細胞膜に局在している。PIN2 は根端分裂組織付近の表皮、皮層そして側方根冠に発現し、表皮と側方根冠においては頂端側の細胞膜に局在している。PIN3, PIN4, PIN7 は根の先端近くの中心柱とコルメラ細胞で発現しており、複数のメンバーが部分的に重なるように発現している。PIN 遺伝子の単独機能欠損変異体は根の発生には強い異常を示さないが、*pin7* 変異体では胚発生の初期段階において原根層の細胞分裂パターンに異常を示し、*pin4* 変異体は根端分裂組織のパターンに異常を示すことが報告されている (Friml *et al.* 2002, Friml *et al.* 2003)。また、*pin2* 変異体や *pin3* 変異体は重力屈性に異常を示し (Müller *et al.* 1998, Friml *et al.* 2003), 発現部位の特異性や極性局在の特徴の違いにより、発生と成長の過程で独自の機能を担うと考えられる。一方、*pin1 pin2* 二重変異体では根端の分裂領域が小さくなり、根の成長が抑制され、*pin1 pin3 pin4 pin7* などの多重変異体ではさらに異常が強まり子葉や根の形成が阻害されることから、PIN タンパク質が冗長的に機能することが明らかにされている (Friml *et al.* 2003, Blilou *et al.* 2005, Vieten *et al.* 2005)。

地上部では、PIN1 は分裂組織と維管束組織、そして表皮の一部に極性を持って広く発現し、器官形成に主要な役割を担っている (Benkova *et al.* 2003)。PIN2, PIN3, PIN4 は葉原基での発現が検出されており、*pin1 pin4* 二重変異体は子葉や本葉の形成に強い異常を示すことが報告されている (Guenot *et al.* 2012)。

4. PIN タンパク質の細胞内輸送

定常状態では PIN1 タンパク質は主に細胞膜に分布しているが、小胞輸送の阻害剤である brefeldin A (BFA) を用いると 1 時間程度の短時間の処理により、ほとんどの PIN1 タンパク質

が細胞内に蓄積することがわかっている。この局在変化は可逆的であり、タンパク質合成阻害剤の存在下でも同様の変化が見られることから、PIN1 タンパク質は恒常的、かつ高速にエンドサイトーシスとリサイクリングによって輸送されていると考えられる (Geldner *et al.* 2001)。当初はこの細胞内輸送の意義については不明であったが、PIN の膜交通経路に参与する様々な膜交通因子が同定されており (図 1)、PIN タンパク質の細胞内輸送の特定の経路の意義を解析することが可能になってきている。

4-1. ARF GEF の BFA 感受性について

PIN タンパク質のエキソサイトーシス経路の膜の出芽に関わる因子として、低分子量 G タンパク質 ARF とその活性化因子である ARF GEF が同定されている。PIN タンパク質が恒常的にエキソサイトーシスとエンドサイトーシスにより輸送されていることを最初に示した Geldner らの実験 (Geldner *et al.* 2001) に用いられた阻害剤である BFA は、カビが生産する代謝物であり、低分子 G タンパク質 ARF と、Sec7 ドメインを持つグアニンヌクレオチド交換因子 (ARF GEF) の一部を標的として、真核生物の小胞輸送を阻害することが知られている (Gillingham & Munro, 2007)。

シロイヌナズナゲノムには、Sec7 ドメインを持つ ARF GEF として、GBF 型の ARF GEF (GNOM, GNL1, GNL2) と BIG 型の ARF GEF (BIG1-BIG5) がコードされている。GNOM の機能欠損変異体では、胚形成過程においてパターン形成が強く阻害され (Steinmann *et al.* 1999)、弱いアレルでは根の成長や側根形成の異常、重力屈性の異常が報告されている (Geldner *et al.* 2004, Okumura *et al.* 2013)。BFA 存在下でシロイヌナズナを生育させると、根の中心柱における PIN タンパク質の基部側への局在は阻害され、主根の成長阻害や重力屈性の異常が認められる (Geldner *et al.* 2003)。興味深いことに、GNOM の Sec7 ドメインは BFA に感受性の ARF GEF と共通のアミノ酸配列を持ち、特定のアミノ酸に変異を導入した変異型 GNOM (M696L) を発現する系統は、PIN1 の局在や根の成長に関する BFA 感受性が低下することが示されており、GNOM は BFA の主要な標的の一つであると考えられている (Geldner *et al.* 2003, Kleine-Vehn *et al.* 2008)。

アミノ酸配列からは、ARF GEF の一部 (GNL1, BIG3) は BFA に耐性をもつと予想されている (Geldner *et al.* 2003)。実際に、*gnl1* 変異体は植物体の生育が BFA に高感受性となり、アミノ酸置換により BFA 感受性に改変した GNL1 では *gnl1* 変異体の BFA 高感受性の表現型が回復しない (Richter *et al.* 2007)。GNOM と GNL1 はどちらも GBF1 型の ARF GEF であり、二重変異体は配偶体致死となることから、重複した機能を持つと考えられている (Richter *et al.* 2007, Teh *et al.* 2007)。また、GNOM と GNL1 はどちらも主にゴルジ体に局在し、BFA による機能阻害を受けるとトランスゴルジ網への分布が増加するという複雑な挙動を示すことが報告されている (Richter *et al.* 2007, Teh *et al.* 2007, Naramoto *et al.* 2014, 図 1)。

一方、BIG 型の ARF GEF では、BIG1-BIG4 は配列上の類似性が高く、BIG3 と BIG4 はトランスゴルジ網/初期エンドソーム (TGN/EE) に局在する (Richter *et al.* 2014)。また、多重変異体の解析から BIG1-BIG4 は冗長的に機能することが示されている (Richter *et al.* 2014)。これらの中では BIG3 のみが BFA 耐性であり、*big3* 単独変異体の根の生育は BFA に高感受性

を示す (Richter *et al.* 2014)。BIG5/BEN1 も TGN/EE に局在するが、その Sec7 ドメインはアミノ酸配列上は BFA 耐性の ARF GEF と BFA 感受性の ARF GEF の両方の特徴を持ち (Geldner *et al.* 2003), BIG5/BEN1 に M731L 変異を導入した解析の結果から、BIG5/BEN1 が BFA 感受性の ARF GEF であることが示唆されている (Xue *et al.* 2019, 図 1)。

4-2. PIN タンパク質の細胞内輸送を制御する因子

上述のような分子的背景により、BFA は複数の ARF GEF を同時に阻害することになる。野生型シロイヌナズナを BFA で処理することによって分泌経路や液胞輸送経路などの複数の膜交通経路が阻害され、TGN と小胞が凝集した BFA コンパートメントと呼ばれる構造が細胞の中に作られ、PIN1 を含む多くの膜タンパク質がこの区画に蓄積する。筆者らは、シロイヌナズナの根の中心柱において PIN1-GFP を BFA コンパートメントに蓄積しにくい変異体を順遺伝学的に単離し、*bfa-visualized endocytosis defective (ben)* 変異体と名付けた (Tanaka *et al.* 2009)。これらの変異体の解析の結果、*ben2* 変異体は TGN/EE に局在する Sec1/Munc18 タンパク質 VPS45 にアミノ酸置換 (D129N) を生じる変異を持っていた (Tanaka *et al.* 2013)。Sec1/Munc18 タンパク質は SNARE タンパク質の制御因子であると考えられており、BEN2/VPS45 も SYP4 SNARE タンパク質と結合することが明らかになっている。*ben2* 変異体では PIN1 や PIN2 が BFA コンパートメントに蓄積しにくいことから、TGN/EE への膜融合に異常が生じている可能性が考えられる。*ben1* 変異体と *ben3* 変異体は *BIG5* と *BIG2* にそれぞれ変異を持ち、これらの遺伝子の機能欠損により PIN1 が BFA コンパートメントに蓄積しにくくなると考えられた (Tanaka *et al.* 2009, Kitakura *et al.* 2017)。興味深いことに、*ben3* 変異体に *big3* 変異を導入した二重変異体では BFA による PIN1 の細胞内蓄積が見られるようになることから、BFA 耐性の ARF GEF (*BIG3*) と BFA 感受性の ARF GEF (*BEN3/BIG2*) のバランスにより BFA コンパートメントへの PIN1 の蓄積の度合いが制御されていることが示唆される (Kitakura *et al.* 2017)。*BIG* 型 ARF GEF は機能的冗長性が高く、BFA 処理と BFA 耐性因子の変異体を組み合わせた研究による、細胞生物学的な解析も進められている。その様なアプローチにより、*big3* 変異体では BFA 処理時に PIN1 および PIN2 の細胞膜への輸送が強く阻害されることが見出され、*BIG3* はこれらのタンパク質の分泌経路に関わると考えられている (Richter *et al.* 2014, Glanc

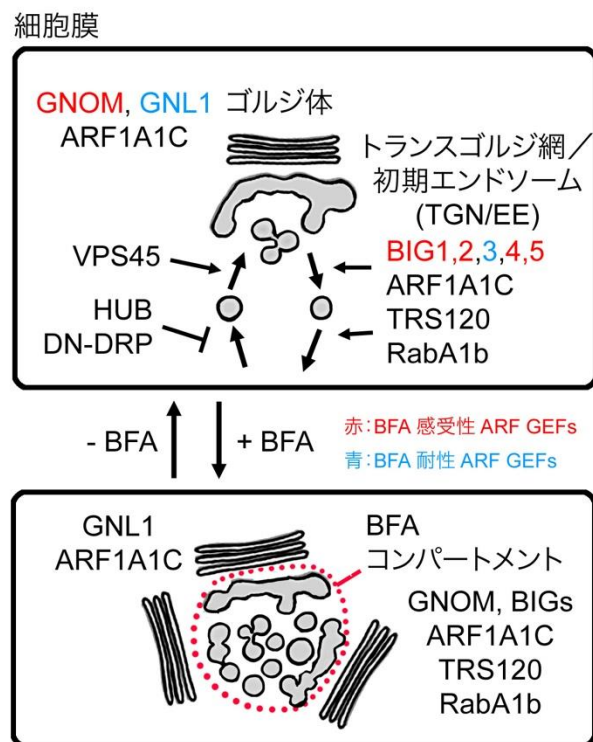


図 1. PIN タンパク質の細胞膜とエンドソームの間の輸送を制御する膜交通因子

et al. 2018)。

一方、PIN1-GFP を過剰に BFA コンパートメントに蓄積する変異体として単離された優性変異体 *bex1* には ARF ファミリーの低分子 G タンパク質 ARF1A1C に、アミノ酸置換(L34F)を引き起こす変異が生じていた (Tanaka *et al.* 2014)。ARF1A1C は TGN/EE とゴルジ体に局在し、GNOM, GNL1, BIG5 などの種々の ARF GEF と共局在することも示されており、PIN タンパク質の細胞膜局在の制御に関与する ARF であることが示唆される (Tanaka *et al.* 2014)。また、BEX1/ARF1A1C の優性変異型タンパク質の発現などにより ARF の機能が阻害された場合には、PIN1 タンパク質の細胞膜局在が減少し、それに伴いオーキシン応答のパターンが乱れ、胚のパターン形成やその後の成長に異常が生じることから、ARF1A1C は、機能的にもオーキシン依存的な発生制御に必須の役割を担っていると考えられる (Tanaka *et al.* 2014)。*bex1* 変異体と類似の優性の表現型を示す *bex5* 変異体では、Rab ファミリーの G タンパク質 RabA1b の GTP 結合部位にアミノ酸置換 (S156F) を引き起こす変異が生じていた (Feraru *et al.* 2012)。RabA1b の機能欠損変異体では強い表現型は見られなかったことから、RabA1b は他の RabA ファミリーのメンバーと冗長的に PIN タンパク質のエキソサイトーシスに関与すると考えられている。VAN4/TRS120 は TGN/EE に局在する Rab GEF のサブユニットである。VAN4 の変異体では PIN の局在に影響はないが、細胞内に PIN の蓄積が生じるため、PIN のエキソサイトーシスに関与していると示唆される。特に地上部と根の細胞分裂領域と葉の維管束細胞に強く発現しており、変異体では葉脈の形成を含む地上部と根の発生に異常をきたす (Naramoto *et al.*, 2014)。

シロイヌナズナの膜交通因子には機能的冗長性が高い場合が多く、それぞれの単独変異体では大きな発生の異常は示さないが、PIN タンパク質の膜交通に関わる因子との多重変異体にすることによって、根の成長が著しく阻害されることや、個体が矮小化することが報告されている (Tanaka *et al.* 2013, Tanaka *et al.* 2014, Richter *et al.* 2014, Kitakura *et al.* 2017, Xue *et al.* 2019)。多くの場合、変異体の発生異常がどのような積荷タンパク質に輸送の異常によるものなのかは十分に理解されておらず、今後明らかにすべき課題であろう。

4-3. 細胞膜近傍での PIN タンパク質の輸送制御

PIN タンパク質のエンドサイトーシスに関わる因子を特定するために、真核生物のエンドサイトーシスの主要な経路の逆遺伝学的解析が行われた。クラスリンは重鎖と軽鎖が複合体となり、トリスケリオン構造を形成し、さらにそれらが高次複合体を形成することによりカゴ状構造を作ることで小胞出芽の際の膜構造の変化を引き起こす働きがあると考えられている。また、ダイナミンは自己集合して螺旋状の構造をとる分子であり、小胞の出芽の際に、膜の切断に働くと考えられている。クラスリン依存的エンドサイトーシスとダイナミン依存的エンドサイトーシスを阻害するために、クラスリン重鎖の一部 (HUB) やクラスリン脱コートタンパク質、ドミナントネガティブ型ダイナミン (DRP1AK47A) を過剰発現させる実験が行われ、それにより植物細胞においてエンドサイトーシスが阻害されることが示されている (Kitakura *et al.* 2011, Yoshinari *et al.* 2016)。さらに、エンドサイトーシスを阻害した植物の根端では、中心柱における PIN1 タンパク質や表皮における PIN2 タンパク質の極性局在が

攪乱された (Kitakura *et al.* 2011, Glanc *et al.* 2018)。また、クラスリン重鎖の変異体においては PIN1 の局在に弱い異常が認められ (Kitakura *et al.* 2011)、ダイナミンの変異体では細胞質分裂後に細胞板に PIN2 タンパク質が残り続けることが観察されており (Mravec *et al.* 2011)、エンドサイトーシスは PIN タンパク質の極性局在に必要であると考えられる。

RHO of plants (ROP) ファミリーの G タンパク質とその相互作用因子も PIN タンパク質の細胞膜近傍における局在制御に関わることが示唆されている。ICR1/RIP1 は活性型 ROP と複合体を形成する ROP エフェクターであり、主に細胞膜に分布する (Hazak *et al.* 2010)。*icr1* 変異体は胚発生におけるパターン形成や、芽生えの形態に異常を示し、PIN の変異体と部分的に類似した表現型を示す。ROP と ICR1/RIP1 は細胞膜上に局在している。ICR1 の変異体では根の中心柱における PIN1 の極性局在の乱れや、皮層における PIN2 の極性局在異常が報告されている。また、*icr1* 変異体では BFA 処理により PIN2-GFP は BFA コンパートメントに蓄積するが、BFA 除去後にも細胞内の蓄積が残りやすいなどの異常が報告されている (Hazak *et al.* 2010)。一方、ROP GEF SPK1, ROP6, ROP エフェクター RIC1 の変異体においては BFA 処理後に PIN2 が BFA compartment に蓄積しやすいことが報告されており、ROP 依存的な経路が PIN2 の細胞内輸送に関わっていると考えられる (Lin *et al.* 2012)。さらに、光変換型蛍光タンパク質 EosFP を用いて、*spk1* 変異体においては PIN2-EosFP が細胞膜から消失しやすくなっていることが示されており、SPK1 は PIN2 のエンドサイトーシスを抑制する働きがあると推測されている (Lin *et al.* 2012)。

5. PIN タンパク質の極性局在の制御

PIN タンパク質は、細胞の種類やアミノ酸配列、修飾の違いにより、異なる様式で極性局在を示す (Tanaka *et al.* 2006, Grunewald & Friml 2010, Zwiewka *et al.* 2019)。PIN タンパク質が頂端側と基部側のどちらに局在するのかについては、リン酸化修飾の影響が強く、AGC キナーゼである PINOID, WAG1, WAG2 にリン酸化された PIN タンパク質は頂端側に局在し、これらのリン酸化酵素の変異体では地上部の表皮における PIN1 や、根の表皮における PIN2 など、本来は頂端側に局在する PIN タンパク質の局在が基部側にシフトすることが報告されている (Friml *et al.* 2004, Huang *et al.* 2010, Dhonukshe *et al.* 2010, Glanc *et al.* 2018)。また、興味深いことに、根の維管束中心柱で基部側に局在する PIN1 は、BFA により細胞膜局在が阻害されやすい傾向があり、表皮細胞で頂端側に局在する PIN2 タンパク質は BFA により局在が変化しにくいいため、PIN を頂端側と基部側に

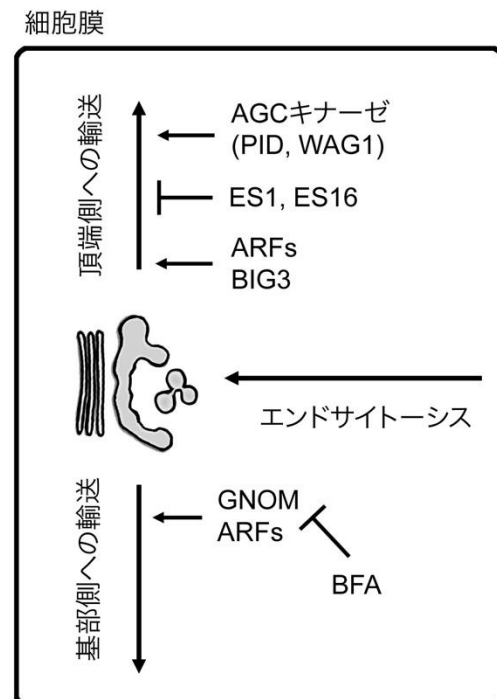


図2. PIN タンパク質の頂端側と基部側への局在に関わる輸送経路と制御因子

輸送する経路にはBFAに対する感受性の異なる輸送経路が働いているというモデルが提唱されている (Kleine-Vehn *et al.* 2008, 2009, 図2)。

gnom 変異体では胚の維管束前形成層や根の維管束中心柱においてPIN1が頂端側に分布し、それに伴い原根層や根端部でのオーキシンの蓄積が見られなくなることから、GNOMはPIN1の基部側への輸送と、それによるオーキシン依存的発生制御に中心的な役割を担うと考えられる (Kleine-Vehn *et al.* 2008, 図2)。GNOMはGBF型のARF GEFの中でも独自の機能を持っているらしく、GNOMプロモーターで*GNLI*を発現させても*gnom*変異体の発生異常は回復しない (Richter *et al.* 2007)。BFA処理時にはGNOMはBFAコンパートメントに蓄積し、リサイクリングに働くことから、GNOMはリサイクリングエンドソームに局在すると信じられてきたが、その後の研究によるとGNOMは主にゴルジ体に局在することが明らかになっている (Naramoto *et al.* 2014)。エンドサイトーシストレーサーを用いた実験では、細胞内に取り込まれた膜成分はTGN/EEに迅速に到達するが、ゴルジ体への輸送は確認されないため、細胞膜へのリサイクリングにゴルジ体が関わっているかどうかは不明である。そのため、GNOMはPIN1のリサイクリングには間接的に関わっているという可能性も指摘されており (Naramoto *et al.* 2014)、今後、GNOMにより制御される小胞輸送因子の働きが解明されることで、PIN1を基部側に輸送するリサイクリング経路の詳細が明らかになると期待される。

一方、頂端側にPINタンパク質を局在させるための膜交通因子については、十分に理解が進んでいない。根の表皮細胞において、PIN2は頂端型に局在させる経路はGNOMに依存せず、BFAにも耐性を示す。PIN2の局在を強く阻害する化合物が探索され、*endosidin1* (ES1) やES16などの化合物が頂端側への輸送経路を特異的に阻害することから、頂端側への輸送経路には特異的な膜交通因子が関与すると考えられる (Robert *et al.* 2008, Li *et al.* 2017)。ES1の標的は同定されていないが、ES1処理によるPIN2タンパク質の細胞内での蓄積はBEN2/VPS45に依存的であり、*ben1*変異体において顕著になることがわかっている (Tanaka *et al.* 2013)。また、ES16はRabA1やBIG型ARF GEFを介する経路を阻害する可能性が指摘されている (Li *et al.* 2017)。最近の研究により、PIN2の頂端側への局在に関わる位置情報についての知見を得るために、レーザーによる破壊実験が行われた。その結果、周囲と隔離された表皮細胞においても、PIN2は頂端側に輸送されたことから、表皮細胞には固有の細胞極性があり、それに従ってPIN2の配置が決定されると考えられる (Glanc *et al.* 2018)。細胞質分裂時には、PIN2は細胞板に蓄積し、その後、頂端側に主な局在部位が変化する。その過程においては、新規に合成されたPIN2タンパク質が頂端側に輸送されること、さらにその輸送はAGCキナーゼによるリン酸化やBIG3 ARF GEFに依存していることが示されている。興味深いことに、根の表皮細胞などにおいてPIN2と酷似した局在様式を示し、PIN2の輸送に関わることが示されているNPH様タンパク質MEL1 (Furutani *et al.* 2011)は、BFA処理によりBFAコンパートメントには移動せず、細胞質分裂の過程においても細胞板にもほとんど局在せずに、頂端側の細胞膜付近に局在する様子が観察されている (Furutani *et al.* 2011, Glanc *et al.* 2018)。この様なタンパク質が目印となり、その近傍においてPINタンパク質のエンドサイトーシスやエキソサイトーシスが局所的に制御されている可能性が高く、今後の解析が待たれる。

6. おわりに

上記のように、オーキシン輸送体の局在には低分子量 G タンパク質やそれを活性化する GEF などが大きく関わってくることを紹介した。これらは輸送体を目的地に運ぶ膜交通に機能している。様々な膜交通因子の解析の結果より、PIN タンパク質の極性局在にはエンドサイトーシスとエキソサイトーシスがどちらも重要な役割を果たしていることが示唆される。本稿では紹介しきれなかったが、重力屈性や光屈性の過程においても、様々な膜輸送因子やリン酸化酵素などが機能していることが徐々に明らかになってきている。しかし、オーキシン輸送体の局在を制御する分子機構は複雑であり、制御系の詳細についての理解はまだ十分ではない。今後、極性局在の分子機構が明らかになることによって、植物の発生と生長に重要な役割を果たすオーキシンの作用機序についてさらなる知見が得られることが期待される。

7. 謝辞

本稿で述べた著者たちのグループの研究は、科学研究費補助金（課題番号：23012026, 16H04806）、ヒューマンフロンティアサイエンスプログラム (HFSP CDA) による支援を受けて行われた。

8. 引用文献

- Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G., & Friml, J. 2003. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*. 115(5):591-602.
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K., & Scheres, B. 2005. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature*. 433(7021):39-44.
- Dhonukshe, P., Huang, F., Galvan-Ampudia, C.S., Mähönen, A.P., Kleine-Vehn, J., Xu, J., Quint, A., Prasad, K., Friml, J., Scheres, B., & Offringa, R. 2010. Plasma membrane-bound AGC3 kinases phosphorylate PIN auxin carriers at TPRXS(N/S) motifs to direct apical PIN recycling. *Development*. 137(19):3245-55.
- Feraru, E., Feraru, M.I., Asaoka, R., Paciorek, T., De Rycke, R., Tanaka, H., Nakano, A., & Friml, J. 2012. BEX5/RabA1b regulates trans-Golgi network-to-plasma membrane protein trafficking in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 24(7):3074-86.
- Friml, J., Benková, E., Blilou, I., Wisniewska, J., Hamann, T., Ljung, K., Woody, S., Sandberg, G., Scheres, B., Jürgens, G., & Palme, K. 2002. AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell*. 108(5):661-73.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R., & Jürgens, G. 2003. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature*. 426(6963):147-53.
- Friml, J., Yang, X., Michniewicz, M., Weijers, D., Quint, A., Tietz, O., Benjamins, R., Ouwerkerk, P.B., Ljung, K., Sandberg, G., Hooykaas, P.J., Palme, K., & Offringa, R. 2004. A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science*. 306(5697):862-5.

- Furutani, M., Sakamoto, N., Yoshida, S., Kajiwara, T., Robert, H.S., Friml, J., & Tasaka, M. 2011. Polar-localized NPH3-like proteins regulate polarity and endocytosis of PIN-FORMED auxin efflux carriers. *Development*. 138(10):2069-78.
- Geisler, M., Aryal, B., di Donato, M., & Hao, P. 2017. A Critical View on ABC Transporters and Their Interacting Partners in Auxin Transport. *Plant Cell Physiol*. 58(10):1601-1614.
- Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Muller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano, A., & Jürgens, G. 2003. The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell*. 112(2):219-30.
- Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y.D., Jürgens, G., & Palme, K. 2001. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*. 413(6854):425-8.
- Geldner, N., Richter, S., Vieten, A., Marquardt, S., Torres-Ruiz, R.A., Mayer, U., & Jürgens, G. 2004. Partial loss-of-function alleles reveal a role for GNOM in auxin transport-related, post-embryonic development of Arabidopsis. *Development*. 131(2):389-400.
- Gillingham, A.K., & Munro, S. 2007. The small G proteins of the Arf family and their regulators. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 23:579-611.
- Glanc, M., Fendrych, M., & Friml, J. 2018. Mechanistic framework for cell-intrinsic re-establishment of PIN2 polarity after cell division. *Nat Plants*. 4(12):1082-1088.
- Grunewald, W., & Friml, J. 2010. The march of the PINs: developmental plasticity by dynamic polar targeting in plant cells. *EMBO J*. 29(16): 2700–2714.
- Guenot, B., Bayer, E., Kierzkowski, D., Smith, R.S., Mandel, T., Žádníková, P., Benková, E., & Kuhlemeier, C. 2012. Pin1-independent leaf initiation in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 159(4):1501-10.
- Hazak, O., Bloch, D., Poraty, L., Sternberg, H., Zhang, J., Friml, J., & Yalovsky, S. 2010. A rho scaffold integrates the secretory system with feedback mechanisms in regulation of auxin distribution. *PLoS Biol*. 8(1):e1000282
- Huang, F., Zago, M.K., Abas, L., van Marion, A., Galván-Ampudia, C.S., & Offringa, R. 2010. Phosphorylation of conserved PIN motifs directs Arabidopsis PIN1 polarity and auxin transport. *Plant Cell*. 22(4):1129-42.
- Jia, D.J., Cao, X., Wang, W., Tan, X.Y., Zhang, X.Q., Chen, L.Q., & Ye, D. 2009. GNOM-LIKE 2, encoding an adenosine diphosphate-ribosylation factor-guanine nucleotide exchange factor protein homologous to GNOM and GNL1, is essential for pollen germination in Arabidopsis. *J Integr Plant Biol*. 51(8):762-73.
- Kitakura, S., Adamowski, M., Matsuura, Y., Santuari, L., Kouno, H., Arima, K., Hardtke, C.S., Friml, J., Kakimoto, T., & Tanaka, H. 2017. BEN3/BIG2 ARF GEF is Involved in Brefeldin A-Sensitive Trafficking at the trans-Golgi Network/Early Endosome in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol*. 58(10):1801-1811.
- Kitakura, S., Vanneste, S., Robert, S., Löffke, C., Teichmann, T., Tanaka, H., & Friml, J. 2011. Clathrin mediates endocytosis and polar distribution of PIN auxin transporters in Arabidopsis. *Plant Cell*. 23(5):1920-31.

- Kleine-Vehn, J., Dhonukshe, P., Sauer, M., Brewer, P.B., Wiśniewska, J., Paciorek, T., Benková, E., & Friml, J. 2008. ARF GEF-dependent transcytosis and polar delivery of PIN auxin carriers in Arabidopsis. *Curr Biol.* 18(7):526-31.
- Lin, D., Nagawa, S., Chen, J., Cao, L., Chen, X., Xu, T., Li, H., Dhonukshe, P., Yamamuro, C., Friml, J., Scheres, B., Fu, Y., & Yang, Z. 2012. A ROP GTPase-dependent auxin signaling pathway regulates the subcellular distribution of PIN2 in Arabidopsis roots. *Curr Biol.* 22(14):1319-25.
- Li, R., Rodriguez-Furlan, C., Wang, J., van de Ven, W., Gao, T., Raikhel, N.V., & Hicks, G.R. 2017. Different Endomembrane Trafficking Pathways Establish Apical and Basal Polarities. *Plant Cell.* 29(1):90-108.
- Petrásek, J., Mravec, J., Bouchard, R., Blakeslee, J.J., Abas, M., Seifertová, D., Wisniewska, J., Tadele, Z., Kubes, M., Covanová, M., Dhonukshe, P., Skupa, P., Benková, E., Perry, L., Krecek, P., Lee, O.R., Fink, G.R., Geisler, M., Murphy, A.S., Luschnig, C., Zazimalová, E., & Friml, J. 2006. PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science.* 312(5775):914-8.
- Mravec, J., Petrásek, J., Li, N., Boeren, S., Karlova, R., Kitakura, S., Pařezová, M., Naramoto, S., Nodzyński, T., Dhonukshe, P., Bednarek, S.Y., Zažímalová, E., de Vries, S., & Friml, J. 2011. Cell plate restricted association of DRP1A and PIN proteins is required for cell polarity establishment in Arabidopsis. *Curr Biol.* 21(12):1055-60.
- Müller, A., Guan, C., Gälweiler, L., Tänzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E., & Palme, K. 1998. AtPIN2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control. *EMBO J.* 17(23):6903-11.
- Naramoto, S., Nodzyński, T., Dainobu, T., Takatsuka, H., Okada, T., Friml, J., & Fukuda, H. 2014. VAN4 encodes a putative TRS120 that is required for normal cell growth and vein development in Arabidopsis. 2014. *Plant Cell Physiol.* 55(4):750-63.
- Okumura, K., Goh, T., Toyokura, K., Kasahara, H., Takebayashi, Y., Mimura, T., Kamiya, Y., & Fukaki, H. 2013. GNOM/FEWER ROOTS is required for the establishment of an auxin response maximum for arabidopsis lateral root initiation. *Plant Cell Physiol.* 54(3):406-17.
- Richter, S., Geldner, N., Schrader, J., Wolters, H., Stierhof, Y.D., Rios, G., Konecz, C., Robinson, D.G., & Jürgens, G. 2007. Functional diversification of closely related ARF-GEFs in protein secretion and recycling. *Nature.* 448(7152):488-92.
- Richter, S., Kientz, M., Brumm, S., Nielsen, M.E., Park, M., Gavidia, R., Krause, C., Voss, U., Beckmann, H., Mayer, U., Stierhof, Y.D., & Jürgens, G. 2014. Delivery of endocytosed proteins to the cell-division plane requires change of pathway from recycling to secretion. *Elife.* 3:e02131.
- Robert, S., Chary, N., Drakakaki, G., Li, S., Yang, Z., Raikhel, N.V., & Hicks, G.R. 2008 Endosidin1 defines a compartment involved in endocytosis of the brassinosteroid receptor BRI1 and the auxin transporters PIN2 and AUX1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105: 8464-8469.
- Steinmann, T., Geldner, N., Grebe, M., Mangold, S., Jackson, C.L., Paris, S., Gälweiler, L., Palme, K., & Jürgens, G. 1999. Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science.* 286(5438):316-8.
- Swarup, K., Benková, E., Swarup, R., Casimiro, I., Péret, B., Yang, Y., Parry, G., Nielsen, E., De Smet,

- I., Vanneste, S., Levesque, M.P., Carrier, D., James, N., Calvo, V., Ljung, K., Kramer, E., Roberts, R., Graham, N., Marillonnet, S., Patel, K., Jones, J.D., Taylor, C.G., Schachtman, D.P., May, S., Sandberg, G., Benfey, P., Friml, J., Kerr, I., Beeckman, T., Laplaze, L., & Bennett, M.J. 2008. The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat Cell Biol.* 10(8):946-54.
- Swarup, R., & Péret, B. 2012. AUX/LAX family of auxin influx carriers-an overview. *Front Plant Sci.* 3:225.
- Tanaka, H., Dhonukshe, P., Brewer, P.B., & Friml, J. 2006. Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cell Mol Life Sci.* 63(23):2738-54.
- Tanaka, H., Kitakura, S., Rakusová, H., Uemura, T., Feraru, M.I., De Rycke, R., Robert, S., Kakimoto, T., & Friml, J. 2013. Cell polarity and patterning by PIN trafficking through early endosomal compartments in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 9(5):e1003540.
- Tanaka, H., Kitakura, S., De Rycke, R., De Groot, R., & Friml, J. 2009. Fluorescence imaging-based screen identifies ARF GEF component of early endosomal trafficking. *Curr Biol.* 19(5):391-7.
- Tanaka, H., Nodzyński, T., Kitakura, S., Feraru, M.I., Sasabe, M., Ishikawa, T., Kleine-Vehn, J., Kakimoto, T., & Friml, J. 2014. BEX1/ARF1A1C is required for BFA-sensitive recycling of PIN auxin transporters and auxin-mediated development in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 55(4):737-49.
- The, O.K., & Moore, I. 2007. An ARF-GEF acting at the Golgi and in selective endocytosis in polarized plant cells. *Nature.* 448(7152):493-6.
- Vieten, A., Vanneste, S., Wisniewska, J., Benková, E., Benjamins, R., Beeckman, T., Luschnig, C., & Friml, J. 2005. Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development.* 132(20):4521-31.
- Wisniewska, J., Xu, J., Seifertová, D., Brewer, P.B., Ruzicka, K., Blilou, I., Rouquié, D., Benková, E., Scheres, B., & Friml, J. 2006. Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science.* 312(5775):883.
- Xue, S., Zou, J., Liu, Y., Wang, M., Zhang, C., & Le, J. 2019. Involvement of BIG5 and BIG3 in BR11 Trafficking Reveals Diverse Functions of BIG-subfamily ARF-GEFs in Plant Growth and Gravitropism. *Int J Mol Sci.* 20(9). pii: E2339.
- Yang, Y., Hammes, U.Z., Taylor, C.G., Schachtman, D.P., & Nielsen, E. 2006. High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. *Curr Biol.* 16(11):1123-7.
- Yoshinari, A., Fujimoto, M., Ueda, T., Inada, N., Naito, S., & Takano, J. 2016. DRP1-Dependent Endocytosis is Essential for Polar Localization and Boron-Induced Degradation of the Borate Transporter BOR1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 57(9):1985-2000.
- Zwiewka, M., Bilanovičová, V., Seifu, Y., & Nodzyński, T. 2019. The Nuts and Bolts of PIN Auxin Efflux Carriers. *Frontiers in Plant Science* 10:985.