

論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻

平成 27 年度博士課程 進学

ナイヤネート ジャルンサンティ タナカ

指導教員 浅見 忠男

論文題目 Study on mechanisms of action of a compound
regulating both auxin and brassinosteroid signal transductions

(オーキシン・ブラシノステロイド信号伝達同時制御剤の作用解析)

1. 背景及び目的

植物の生理現象の多くは、体内で合成される植物ホルモンの相互作用により制御されている。オーキシンとブラシノステロイドは、胚軸や根の生長、胚形成、環境応答の制御等において共通の作用を持つ。近年の研究から、両ホルモンの生合成や信号伝達、遺伝子発現に至る各過程で互いに影響し合う、いわゆるクロストークの存在が広く知られている。両ホルモンともその生合成・信号受容・情報伝達の各過程に関わる因子が特定され、分子レベルでのクロストークの実態解明を可能にする研究基盤が整備されつつある。修士論文研究では、オーキシン-ブラシノステロイド間で共通する作用の発現に未同定制御因子の存在を想定し、その解明に有用な分子ツール取得のため、化合物ライブラリーから両ホルモン同時制御剤を探索した。すなわち、シロイヌナズナでブラシノステロイドの関与が大きい暗所胚軸伸長応答系(①)と、オーキシンの関与が大きい胚軸重力応答系(②)を用いて化合物評価を行い、最終的に①・②両系に対し阻害作用を示す化合物 NJ15 を選抜した^[1]。そこで、博士論文研究では想定する両ホルモン共通の信号伝達経路解明に向け、以下の解析を展開した。

2. NJ15 低感受性変異体における網羅的遺伝子発現解析

評価系①・②を再度利用して、シロイヌナズナ完全長 cDNA 過剰発現変異体プール 20,496 種から、NJ15 低感受性を示す変異体選抜を実施した。結果、再現よく NJ15 低感受性を示す 5 種を選抜した。これら NJ15 低感受性変異体においては qRT-PCR を用いて T-DNA 上のそれぞれの遺伝子の過剰発現状態を確認した。NJ15 低感受性およびその安定性を評価し、うち 3 種(*f127*、*f207*、*f342*)の解析を優先した。因みに *f127* は機能未知タンパク質をコードする遺伝子(*At4g11100*)を、*f207* は糖輸送体をコードする遺伝子(*At3g19930*)を、そして、*f342* はアルカロイド strictosidine 合成酵素様タンパク質をコードする遺伝子(*At3g51430*)をそれぞれ過剰に発現していた。

これら選抜 3 種の NJ15 低感受性付与機構を探るべく、端緒として次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った。3 種変異体の他、比較対照として野性型 (Col) を加え、それぞれの NJ15 処理区と mock 処理区を予定して計 8 区を 3 連で解析した。結果、有意な発現変動を認めた遺伝子群は、Col における NJ15 処理-mock 処理間で 339 個、mock 処理における *f127*-Col 間で 5,700 個、*f207*-Col 間で 1,466 個、*f342*-Col 間で 836 個となった。すなわち、*f127* は他の 2 種と比べて、Col との間で最も発現変動が大きいと判明した。KEGG pathview を用いて GO term 単位で発現変動遺伝子 (DEG) を描画したところ、選抜 3 種はいずれも、Col と比べて脂肪酸、クチクラ、フェニルプロパノイドの各生合成遺伝子群や、糖関連遺伝子群の発現変動が顕著であった。この結果より、3 種の NJ15 低感受性が、脂肪酸、クチクラ、フェニルプロパノイド、糖など生体の重要な構成成分の量的変化と連動する可能性が示され、NJ15 の作用点もその周辺にあると予想した。

3. クチクラ形成過程に対する NJ15 の作用解析

NJ15 低感受性変異体 *f127* が機能未知タンパク質をコードする遺伝子 (*At4g11100*) の過剰発現状態であるのに対して、作出した *At4g11100* 過剰発現変異体は NJ15 低感受性を示さなかった。TAIL-PCR 法を用いて T-DNA 挿入位置の決定と、近傍遺伝子群の発現状況を調べた結果、*f127* では *DCR* (*Defective in Cuticular Ridges*) 遺伝子 (*At5g23940*) の発現低下に伴う機能欠損が NJ15 低感受性の要因と判断した。また、既報の *dcr* 欠損変異体 *dcr-2* を取り寄せて解析した結果、*f127* と同様に NJ15 低感受性を確認した。

シロイヌナズナの表面を覆うクチクラ層は通常クチクラワックスとクチンポリマーで形成される。クチクラ層は水の透過を防ぐ機能を持つが、クチクラ層の形成異常によってクチクラ層における水分の透過量が多くなり、すなわち、クチクラ層の透過性が上昇する。*dcr* 欠損に伴いクチクラ層形成に異常が生じると考えられ、*dcr-2* に関する既報ではクチクラ層の透過性を評価する α -トルイジンブルー (TB) 染色テストによって異常染色が報告されている。そこで、*f127* の TB 染色を行い、*dcr-2* 同様に異常染色を確認した。上記網羅的な遺伝子発現解析からクチクラ関連以外に、脂肪酸合成関連遺伝子群の発現変動も見出したことを受け、クチクラワックス合成原料である脂肪酸 ($C_{22} \sim C_{26}$) に着目し、その特異的生合成阻害剤 cafenstrole (Caf) と NJ15 の植物投与効果を精査した。結果、Caf は NJ15 の暗所胚軸伸長応答系及び胚軸重力応答系の両阻害活性を弱めた^[2]。また、NJ15 や Caf 単独投与あるいは Caf-NJ15 共投与した *f127* と Col の暗所芽生えを用いて脂肪酸組成分析を行った。結果、Col においては両化合物とも長鎖脂肪酸 ($C_{16} \sim C_{18}$) の増加を認めたが、Caf 単独投与時は超長鎖脂肪酸 ($C_{22} \sim C_{26}$) の減少傾向を認めた。この結果から NJ15 は Caf と異なる様式で、脂肪酸生合成過程に影響を与えることが示された。一方、*f127* では、Col と比べて全脂肪酸量が増

加するものの、NJ15 投与に伴う脂肪酸量の増加は認められなかった^[2]。以上の脂肪酸組成分析により、シロイヌナズナのカチクラ層のうち、NJ15 投与がクチンポリマー形成過程のみに影響を与えることが示唆された。なお、NJ15 のクチクラに与える影響をより微細に解析するべく、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて観察を試みたが、明瞭な構造変化は見出せなかった。

ここまで解析を展開した結果、(1) TB でよく染まる *f127* のクチクラ異常、あるいは、Caf 投与に伴う Col のクチクラ異常に対して、NJ15 単独処理により回復傾向が明確には認められない、(2) クチクラポリマーの単位成分であるクチンモノマーの分析から、NJ15 投与の有無における有意な成分変動が認められない、(3) TEM を用いて NJ15 投与に伴うクチクラ層の形状変化が認められないことが判明した。これらの結果は、着目した選抜変異体の示す NJ15 低感受性について、クチクラ異常と関連性があるものの、クチクラ形成の過程に直接 NJ15 が作用していない可能性を示唆しているとも考えられた。

4. クチクラ周辺構造に対する NJ15 の作用解析

既報によれば、クチクラ異常が観察される変異体では TB 異常染色によって示されるクチクラ層の透過性上昇に加え、多様な形態的变化が現れる。この点について、クチクラの層が細胞壁のさらに外側に形成されるため、クチクラの異常は細胞壁の弾性や構造にも変化を生じさせると考えた。そこで、クチクラと隣接する細胞壁成分に NJ15 が作用し、その結果として隣接のクチクラに異常を生じさせるとの仮説を立て、その実証を進めた。

細胞壁成分シクログルカン合成能を欠く多重変異体 *xxt1 xxt2* を取り寄せ、TB 染色を行ったところ、*f127* ほど濃くはないが染色され、軽度のクチクラ異常を確認した。加えて、軽度の NJ15 低感受性も確認した。従って、NJ15 低感受性とクチクラ層の透過性との間に一定の相関があることに加え、細胞壁成分の変化によっても、NJ15 低感受性付与の可能性が示された。細胞壁成分の変化に伴う NJ15 感受性変化を検証するために、セルロース合成阻害剤 isoxaben (IXB)、ペクチンメチルエステラーゼ阻害剤 epigallocatechin gallate (EGCG) を用いて、*f127* および Col に対する NJ15 との共投与を行った。結果、IXB は Col に対して NJ15 の重力応答阻害活性を弱める傾向を示した。他方、EGCG は Col に対して NJ15 の重力応答阻害活性の低下作用を示さないものの、*f127* の NJ15 低感受性を消失させる効果を確認した。TB 染色を行い、EGCG 処理に伴う *f127* の TB 染色強度は下がり、クチクラ層の透過性の低下が確認された。これにより、細胞壁成分の変化が NJ15 低感受性・クチクラ層の透過性に影響することが判明した。

細胞壁関連の変異体にはデンプン蓄積の報告例があり、加えてデンプン粒が植物の重力感知に関わる事は広く知られている。そこで、デンプン蓄積とクチクラ層の透過性 (NJ15 低感受性) との相関について調べた。選抜株および Col に対してルゴール染色を行った結果、

*f127*では Col と比べて胚軸上部により多くデンプンの蓄積が認められた。また、Col では NJ15 単独処理によりルゴール染色強度が低下し、デンプンが減少したが、*f127*に対してはその効果を確認できなかった。さらに、*f127*において EGCG 処理によりデンプンが減少し、NJ15 との共処理でデンプンは完全に消失した。この結果より、*f127*の NJ15 低感受性付与には、細胞壁成分の変化とデンプン蓄積量の変化を伴うことが示された。一方、細胞壁の変異体におけるデンプン蓄積の報告例から、デンプン粒の蓄積機構に関連して Sucrose/H⁺シンポートや H⁺-ATPase の活性化の関与が示唆された。そこで、*f127*においても H⁺-ATPase 活性化が NJ15 低感受性に関与する可能性を検証した。H⁺-ATPase の活性評価時に用いられる胚軸切片応答系で評価した結果、*f127*の胚軸切片が WT の胚軸切片よりもよく伸長した。また、胚軸切片応答系で H⁺-ATPase の活性化状態を維持する化合物として知られる fusaric acid (Fc) を投与した結果、*f127*では Col より Fc の切片伸長の促進効果が弱かったため、*f127*では H⁺-ATPase が活性化状態にあると示唆された。無傷 Col において Fc と NJ15 を共投与させた場合、Fc は NJ15 の阻害活性を変化させなかった他、デンプン粒蓄積を誘導しなかった。これにより、*f127*の NJ15 低感受性はクチクラ異常および細胞壁の酸性化、両方によって起きると考えられる。

5. 総括と展望

植物の各細胞において外部と接する最外層クチクラが細胞内へ情報を伝える機構には未知の部分が多く残されている。NJ15 の作用解析を通じ、クチクラ形成過程、細胞壁成分の変化によるデンプン蓄積、エネルギー代謝などがオーキシン・ブラシノステロイド共通の生理作用である細胞伸長や重力応答の調節とリンクすることが示唆された。NJ15 がその調節機構に関わる可能性があり、網羅的発現解析から関連性を見出した糖やフェニルプロパノイドの関与も今後追究する必要がある。本研究の進展が特に環境応答における細胞伸長の新奇制御因子同定に繋がることを期待する。