

博士論文(要約)

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)

ナイヤネート ジャルンサンティ タナカ

目次

図表目次

略語表

第一章：本研究の背景と目的

1-1 細胞伸長を制御するオーキシン及びブラシノステロイド	1
1-1-1 オーキシン応答の細胞伸長:酸成長(acid growth)の機構	
1-1-2 ブラシノステロイドによる細胞伸長の促進機構	
1-2 重力応答を制御するオーキシン及びブラシノステロイド	5
1-2-1 重力応答の機構	
1-2-2 重力応答に関わるオーキシン及びブラシノステロイドの知見	
1-3 オーキシン及びブラシノステロイドの生合成経路および 信号伝達経路に関するクロストーク	8
1-4 本研究の目的	9

第二章：NJ15 低感受性変異体の選抜及び網羅的な発現解析

2-1 諸言	10
2-2 NJ15 低感受性変異株の探索および解析	13
2-2-1 NJ15 低感受性変異株の探索方法	
2-2-2 NJ15 低感受性変異体の既存制御剤に対する応答	
2-3 NJ15 低感受性変異体を用いた網羅的遺伝子発現解析	22
2-3-1 NJ15 低感受性変異体の遺伝子発現変動	
2-4 実験の部	32

第三章：クチクラ異常に起因する NJ15 低感受性

3-1 諸言	37
3-1-1 クチクラの構造とその形成過程	
3-1-2 クチクラ層の生理機能	
3-2 変異体 <i>fl27</i> の NJ15 低感受性をもたらす原因の究明	44
3-3 クチクラ異常と NJ15 低感受性の関連性の検証	48
3-4 クチクラ異常及び NJ15 投与に伴う脂肪酸組成変化	53

3-4-1	暗所芽生え個体の脂肪酸組成に対する NJ15/Caf 投与効果	
3-4-2	候補変異体 <i>f342</i> の NJ15 低感受性の原因遺伝子の特定	
3-4-3	暗所芽生え個体のクチンモノマー組成に対する NJ15 投与効果	
3-5	透過型電子顕微鏡を用いたクチクラ層の形態観察	61
3-6	実験の部	65

第四章：クチクラ層近傍に着目した NJ15 作用解析

4-1	諸言	73
4-1-1	クチクラ層と隣接する細胞壁	
4-1-2	細胞壁構成成分の制御と細胞伸長	
4-1-3	細胞壁構成成分とクチクラ層構成成分の関連性	
4-2	細胞壁異常が NJ15 作用に及ぼす影響	78
4-2-1	ヘミセルロース合成異常が NJ15 作用に及ぼす影響	
4-2-2	セルロース合成異常が NJ15 作用に及ぼす影響	
4-2-3	ペクチン脱メチル化の異常が NJ15 作用に及ぼす影響	
4-3	胚軸におけるデンプン粒の蓄積と NJ15 低感受性との関連性	86
4-3-1	NJ15 低感受性変異体 <i>f127</i> 胚軸におけるデンプン粒の異常蓄積	
4-3-2	デンプン粒の蓄積に対する H ⁺ -ATPase 関与の可能性	
4-4	総合考察	96
4-5	実験の部	100
	参考文献	102
	本論文の要旨	
	謝辞	

図表目次

図 1-1	オーキシン及びブラシのステロイドによる細胞伸長の促進機構	3
図 1-2	シロイヌナズナの重力感知及び応答機構	6
図 2-1	暗所におけるシロイヌナズナ幼植物体の生長に与える NJ15 の投与効果	11
図 2-2	シロイヌナズナ野生型株に対する NJ15 の効果	14
図 2-3	NJ15 低感受性変異体の選抜方法	15
図 2-4	候補低感受性変異体に対する NJ15 の阻害効果	16
図 2-5	NJ15 低感受性変異体のそれぞれの候補遺伝子発現量	17
図 2-6	NJ15 低感受性変異体の Ax/BR 及び既存阻害剤に対する感受性	19
図 2-7	NJ15 低感受性変異体の Ax/BR 及び既存阻害剤に対する感受性(2)	20
図 2-8	暗所で生育した NJ15 低感受性変異体の各ホルモン内生量	21
図 2-9	NJ15 低感受性変異株の網羅的発現解析の概要	24
図 2-10	WT に対する NJ15 処理および WT に対する各低感受性変異体における発 現変動する遺伝子(DEGs)の数	25
図 2-11	NJ15 低感受性変異体共通 DEGs の Gene Ontology(GO)	26
図 2-12	NJ15 低感受性変異体で発現変動が大きい経路 ① クチン・ワックス合成経路	27
図 2-13	NJ15 低感受性変異体で発現変動が大きい経路 ② デンプン・糖代謝経路	28,29
図 2-14	NJ15 低感受性変異体で発現変動が大きい経路 ③ フェニルプロパノイド生合成経路	30,31
図 3-1	クチクラの構造と構成分子	38
図 3-2	クチクラの生合成及び輸送	39
図 3-3	クチクラ生合成の制御因子およびクチクラ層の生理機能	41
図 3-4	<i>f127</i> の標的遺伝子過剰発現体の作製及び NJ15 低感受性の検証	45
図 3-5	TAIL-PCR 法による <i>f127</i> の T-DNA 挿入位置の特定	46
図 3-6	既存 <i>dcr</i> 変異体の NJ15 低感受性の検証	47
図 3-7	<i>f127</i> 及び <i>dcr</i> 変異体はクチクラ異常を示す	49
図 3-8	超長鎖脂肪酸阻害剤 Cafenstrole の共投与による	

NJ15 阻害効果の回復①	50
図 3-9 超長鎖脂肪酸阻害剤 Cafenstrole の共投与による NJ15 阻害効果の回復② TB 染色	51
図 3-10 NJ15 及び Caf の投与がシロイヌナズナ的全脂肪酸量に与える効果	54
図 3-11 クチクラ生合成経路における NJ15 作用周辺の予想図	55
図 3-12 クチクラ異常を示す <i>f342</i> の NJ15 低感受性は T-DNA 挿入による <i>CYP77A4</i> の発現低下	57
図 3-13 クチクラの生合成に関わる NJ15 低感受性変異体 (<i>f127</i> , <i>f342</i>)の原因遺伝子	58
図 3-14 暗所芽生えシロイヌナズナのクチンモノマー組成に与える NJ15 効果	59
図 3-15 NJ15 低感受性変異体 <i>f127</i> , <i>f342</i> の全脂肪酸量 およびクチンモノマーの定量	60
図 3-16 透過型電子顕微鏡(TEM)観察による NJ15 のクチクラ層への影響の検証	63
図 3-17 クチクラ生合成経路における NJ15 作用周辺の予想図	64
図 4-1 細胞壁の構造および構成成分	74
図 4-2 Pectin methylesterase(PME)の機能および BR 信号伝達経路への関与	77
図 4-3 キシログルカン(XyG)欠損が NJ15 の作用に与える影響	79
図 4-4 セルロース合成阻害剤 IXB が NJ15 の阻害活性に与える影響	80
図 4-5 セルロース合成阻害剤 IXB による脂肪酸組成の変化	82
図 4-6 セルロース合成阻害剤 IXB および NJ15 による細胞表面の変化	83
図 4-7 ペクチン脱メチル阻害剤 EGCG が NJ15 の阻害活性に与える影響	85
図 4-8 細胞壁異常変異体 <i>shaven3 shaven3-like1</i> (<i>shv3 svl1</i>) のデンプン蓄積機構	87
図 4-9 クチクラ異常体および XyG 欠損体におけるデンプン粒の蓄積	88
図 4-10 WT および <i>f127</i> のデンプン蓄積に対する NJ15 の影響	89
図 4-11 NJ15 と EGCG の共処理によるクチクラ異常変異体の デンプン蓄積の減少	91
図 4-12 NJ15 阻害効果に対する糖の影響	92
図 4-13 H ⁺ -ATPase 活性剤 Fusicoccin(Fc)が NJ15 阻害活性に与える影	93
図 4-14 WT 及び <i>f127</i> の胚軸切片を用いた H ⁺ -ATPase 活性評価	95
図 4-15 NJ15 低感受性が引き起こされる機構の予想図	98

【略語表】

ABA	Abscisic acid
AGP	Arabinogalactan protein
BHT	2,6-Di- <i>t</i> -butyl-4-methylphenol
BL	Brassinolide
BR	brassinosteroid
Brz	Brassinazole
Caf	Cafenstrole
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleoside 5' triphosphates
Col	Columbia ecotype
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DNase	deoxyribonuclease
DW	distilled water
DW	Dry weight
<i>E.Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGCG	Epigallocatechin gallate
EXP	Expansin
FDR	False discovery rate
FOX	Full-length cDNA OverExpressing
FW	Fresh weight
Glc	Glucose
GUS	beta-glucuronidase
GC/MS	Gas Chromatography – Mass spectrometry
HG	Homogalacturonan
IAA	indole-3-acetic acid
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactoside
IXB	Isoxaben
JA	Jasmonic acid
MeOH	Methanol
mRNA	messenger ribonucleic acid
MS	Murashige&Stoog
NPA	1- <i>N</i> -Naphthylphthalamic acid

NGS	Next generation sequencing
PCR	polymerase chain reaction
PEO-IAA	α -(P <u>h</u> enyl <u>E</u> thyl-2- <u>O</u> xo)-IAA
PME	Pectin methylesterase
RNA	ribonucleic acid
RNase	ribonuclease
rpm	revolution per minute
sDW	sterilized distilled water
Suc	Sucrose
TB	Toluidine blue
TEM	Transmission Electron Microscopy
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
UBQ	ubiquitin
VLCFA	Very-long-chain fatty acid
WT	wild type
XTH	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase
XyG	Xyloglucan

第1章 背景及び本研究の目的

1-1 細胞伸長を制御するオーキシシンとブラシノステロイド

植物ホルモンであるオーキシシン(以下 Ax と略称する)とブラシノステロイド(以下 BR と略称する)に関して、様々な植物の生長過程において共に細胞の伸長や分裂を制御することが古くから知られている。これらホルモンの共投与により観察される植物の応答から、BR と Ax はそれぞれの生合成・信号伝達過程において互いに作用し合う一方で、BR は Ax の輸送過程に対して作用する。これらの結果としての相加的応答から両ホルモン間のクロストークの存在が具体的に示されるようになった(Tien et al., 2018)。

本博士論文研究を展開するにあたり、Ax と BR に共通する作用として、シロイヌナズナの細胞伸長及び重力応答の制御に焦点を当てた。最初に細胞伸長の機構、及び現在までに知られている両ホルモンの作用について述べる。

1-1-1 Ax 応答の細胞伸長: 酸成長(acid growth)の機構

植物の細胞は細胞壁で囲まれて高い膨張力を維持している。植物器官の伸長はまず細胞壁を緩め、この膨張力を駆動力として細胞が伸びる。細胞伸長促進の機構は様々な植物の胚軸切片を用いて古くから研究されてきた。その中で、Ax は細胞膜に局在するプロトンポンプを活性化し、細胞膜外(アポプラスト)の空間の pH を下げ、結果的に細胞壁が緩んで細胞が伸長する、いわゆる「酸成長」説が約 50 年前に提唱され(Hager et al., 1971)、近年になってさらに詳しい機構が明らかになった(Arsuffi and Braybrook, 2018)。

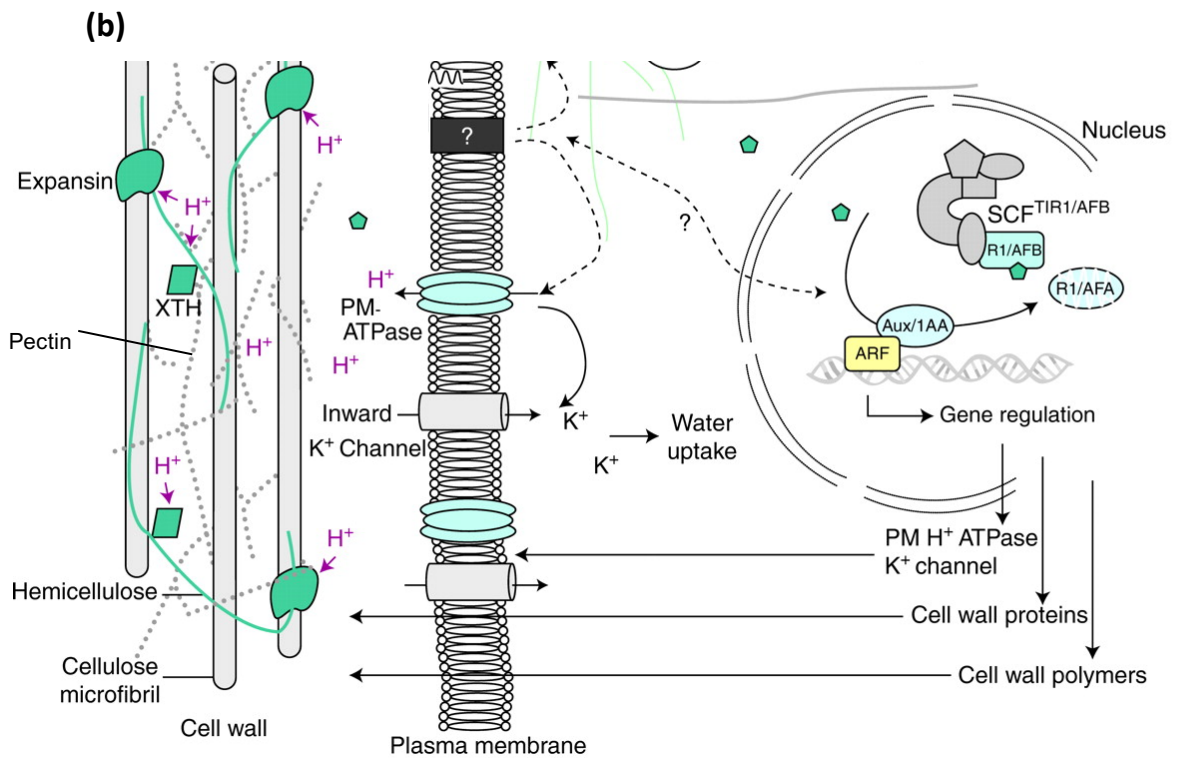
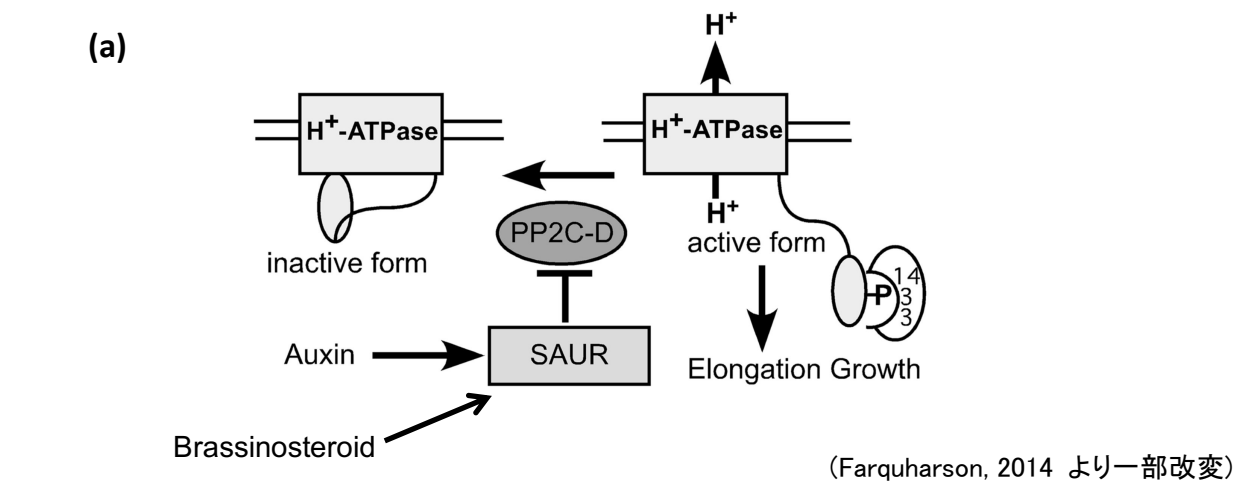
細胞内で Ax が受容されてから細胞膜局在性プロトンポンプが活性化されるまでの機構は Ax 応答性遺伝子を介した応答であり、すなわち、核内に存在する転写因子 AUXIN RESPONSE FACTORS (ARFs) と、それらの機能抑制に関わる因子 AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID (AUX/IAA) を介して行われる(Fendrych et al., 2016)。ARFs は転写因子として直接 DNA に対する結合能を有し、その種類により正・負いずれの方向にも制御し得る。他方、AUX/IAA は Ax 濃度が低い時は ARFs とヘテロ二量体を形成して、Ax 応答性遺伝子の転写を抑制する(Szemenyei et al., 2008)。これに対して、Ax 濃度が高くなると、F-box タンパク質 Transport Inhibitor Response1/Auxin F-Box signaling protein (TIR1/AFB) に Ax が結合して、TIR1/AFB と AUX/IAA との複合体形成を促進する。AUX/IAA との複合体を形成した TIR1/AFB は、F-box タンパク質として AUX/IAA のユビキチン化を促し、プロテアソームが関与するタンパク質分解過程に AUX/IAA を送り込むことでそれまで抑制されていた ARFs の機能を回復させる。その結果、Ax 応答性遺伝子の転写が活性化される(Hayashi, 2012)。タンパク質の分解を受けない AUX/IAA 変異体 *auxin resistant/indole-3-acetic acid inducible (axr3/iaa1)* や *short hypocotyl /indole-3-acetic acid inducible (shy2/iaa3)* は細胞伸長がうまくできないことから、細胞伸長にはこれら AUX/IAA の分解が必要である(Mockaitis and

Estelle, 2008)。

TIR1/AFB-AUX/IAA を介した Ax によるアポプラストの酸性化誘導では SMALL AUXIN UP-RNA (SAUR) タンパク質ファミリーが重要な役割を持つことが 2014 年に報告された(Spartz et al., 2014)。SAURs 遺伝子は Ax 早期応答性遺伝子であり、SAURs は細胞膜(PM)上のプロトンポンプ H^+ -ATPase の C 末端側にあるトレオニン(Thr₉₄₇)残基のリン酸化を促進して H^+ -ATPase を活性化する。すなわち SAURs は脱リン酸化酵素 D-clade type2C protein phosphatases(PP2C) を抑制し、そのリン酸化部位に 14-3-3 タンパク質が結合することによって PM H^+ -ATPase のリン酸化状態が維持されてプロトンポンプが活性化される(Takahashi et al., 2012; Spartz et al., 2014)(図 1-1(a))。

PM H^+ -ATPase の活性化によってたくさんのプロトンがアポプラストに流出し、アポプラストが酸性に傾く他、細胞膜の過分極が起きる。酸性になった状態の細胞壁は Expansins(EXPs) タンパク質や複数の酵素などによって固く連結していた様々なセルロースやヘミセルロースの結合が分解され、細胞壁が緩む(Cosgrove, 2000)。また、細胞膜の過分極によって、細胞膜上のカリウムイオンチャネルが活性化し、カリウムイオンが細胞質に流入する。細胞質のカリウム濃度が上がることで、水分が細胞内に入り、細胞内の膨張力が増して、結果的に細胞膜を押し上げて細胞が伸長する(Philippart et al., 2004)。一方、細胞壁の変化によって細胞膜のカルシウムチャネルが活性化され、細胞質内にカルシウムイオンが流入し、アポプラストの pH が上がり、一連の細胞伸長が止まる(Marja and Robert, 2018)(図 1-1(b))。

Ax は PM H^+ -ATPase のリン酸化促進以外に、細胞壁に關与するタンパク質の遺伝子発現を誘導することが知られている(Marja and Robert, 2018)。細胞伸長によって胚軸が伸びる、いわゆる「モヤシ」形態を示す暗所芽生えシロイヌナズナを用いた遺伝子発現解析により、数多くの Ax 応答性発現遺伝子が同定された。特に、細胞壁を緩める EXPs、XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASEs (XTHs)、ARABINOGALACTAN PROTEINs(AGPs)、そして PECTIN METHYLESTERASEs(PME)などの遺伝子発現が上昇し、これらのタンパク質は Ax 応答の細胞伸長への関与が示唆された(Pelletier et al., 2010)。



(Catherine Perrot-Rechenmann, 2010 より一部改変)

図 1-1 オーキシン (Ax) 及びブラシのステロイド (BR)による
細胞伸長の促進機構

1-1-2 BRによる細胞伸長の促進機構

植物内で機能するステロイド系化合物であるブラシノステロイド(BR)は、Axと同様に細胞伸長の調節に重要であり、BR生合成酵素の欠損変異体 *deetiolated2* (*det2*)は暗所において胚軸の細胞伸長の抑制を示し、加えて脱黄化形態などの明所下で生育させたかのような形態形成を示す(Li et al., 1996)。

BRの信号伝達機構は細胞膜に局在する Leucine-rich repeat (LRR) 受容体型キナーゼに属する受容体 BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 (BRI1) の細胞膜外側の領域に BR が結合し、それに伴って細胞内のキナーゼ領域が活性化され、BRI1 とヘテロ二量体を形成していた BRI1 KINASE INHIBITOR (BK1) が解離する。活性化した BRI1 はリン酸基転移酵素である BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1 (BAK1) と新たな複合体を形成する。この BRI1-BAK1 複合体はリン酸化酵素 BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2 (BIN2) と相互作用し、結果として BIN2 の信号伝達抑制機能を弱めて、BRI1-EMS-SUPPRESSOR1(BES1) および BRASSINAZOLE-RESISTANT 1 (BZR1) のリン酸化過程を阻害する。リン酸化修飾制御を受けにくくなった BES1 と BZR1 は細胞質から核へ移行し、核内において脱リン酸化酵素 BRI1-SUPPRESSOR1(BSU1)の関与も受けて、いずれも転写因子として機能し、BR 関連の遺伝子発現を活性化する(Belkhadir et al., 2015)。

BRによる細胞伸長の促進は Ax と同様に PM H⁺-ATPase の活性化を介することが報告されている(Caesar et al., 2011; Witthöft et al., 2011; Minami et al., 2019)。2011 年に Witthöft らは、PM H⁺-ATPase の C 末端側 Thr を Ala に置換した「リン酸化されない改変 AHA1 (シロイヌナズナの主な PM H⁺-ATPase タンパク質)」を用いた場合でも、Brassinolide (BL; 活性型 BR) の投与による PM H⁺-ATPase の活性化が見られたことから、BLによる活性化はリン酸化を介さずに、BRI1 が直接 AHA1 を活性化すると報告した。しかし、2019 年 Minami らによると、AHA1 のリン酸化状態を測定したことにより、BL の PM H⁺-ATPase 活性化はリン酸化を介した機構であり、加えて BRI1-BIN2 の信号伝達および SAUR の PP2C 抑制機能が関与していると指摘した。いずれにしても、BR および Ax による細胞伸長の促進は、PM H⁺-ATPase の活性化を介して起きることが明白な状況となっている(図 1-1 (a))。

一方、BRは細胞膜 PM H⁺-ATPase の活性化以外にも、BIN2 によるセルロース合成酵素 cellulose synthase A1 (CESA1) のリン酸化を抑制し、CESA1 の活性を正に制御しているとの報告がある(Sánchez-Rodríguez et al., 2017)。また、BRの転写因子 BZR1 は、細胞骨格での Microtubule の脱安定化タンパク質 Microtubule Destabilizing Protein (MDP40)を誘導するとの報告もあり、細胞壁のセルロース生合成だけでなく、その配向を決める Microtubule の動きも調節していることが示された(Wang et al., 2012)。

1-2 重力応答を制御する Ax および BR

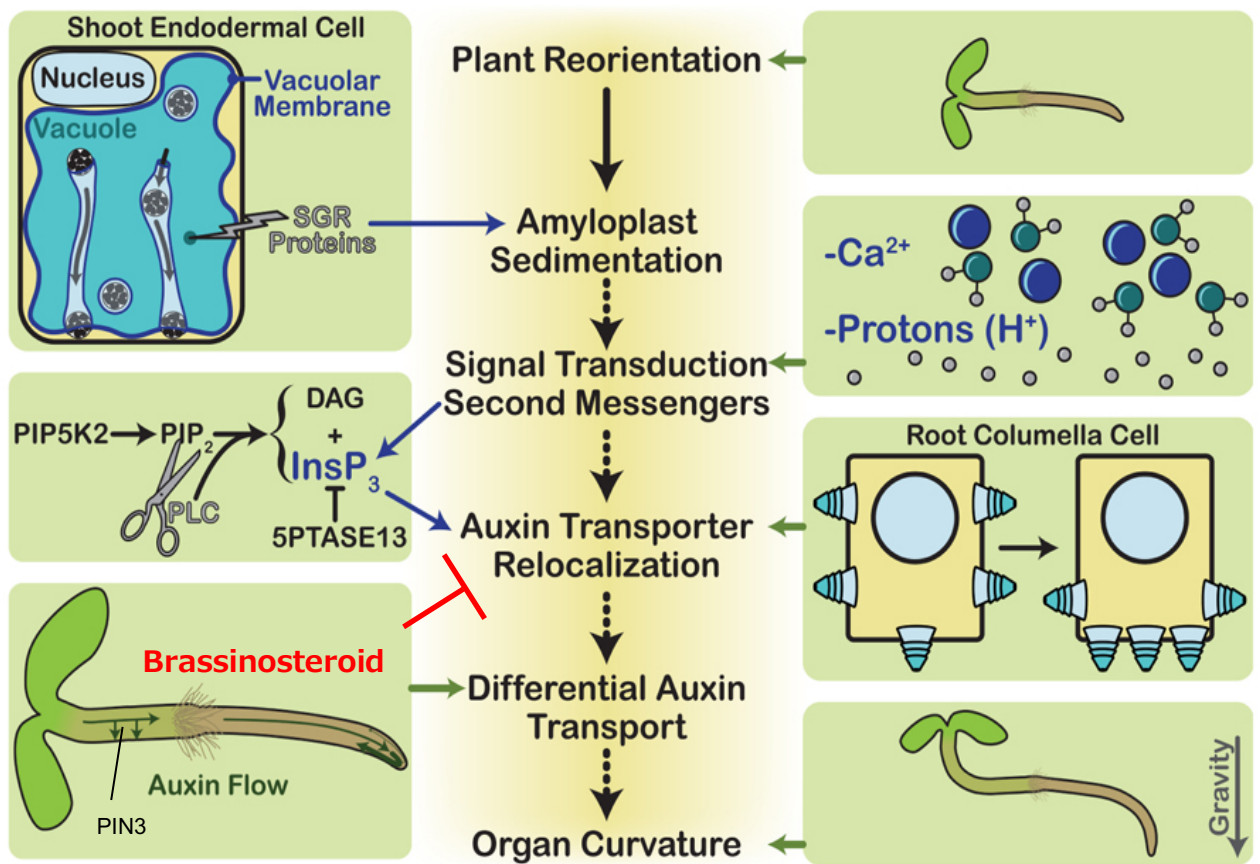
1-2-1 重力応答の機構

植物では重力を感知する細胞として平衡細胞(Statocytes)と呼ばれるものがある。平衡細胞のプラステドではデンプンが蓄積し、これをアミロプラストと呼ぶ。アミロプラストが重力の方向に沈殿することにより植物細胞が重力を感知していることは百十数年前に発表され、高等植物の重力感知機構として広く知られた(Haberlandt, 1900)。一方で、地上部と地下部の重力の感知器官と機構は異なっている事が近年の研究によって明らかになっている(Žádníková et al., 2015)。ここでは、本論文内容に関係する胚軸の重力応答についてのみ述べる。

胚軸においてアミロプラストは内皮細胞にあり、平衡細胞として機能する事は複数の変異体の解析から明らかにされている。例として、内皮細胞でアミロプラストが見られない変異体 *Arabidopsis endodermal-amyloplastless (eal1)* では胚軸は重力応答しない(Fujihiro, 2000)。また、正常な内皮細胞の形成に重要な GRAS ファミリー転写因子である SCARECROW(SCR)/SHOOT GRAVITROPISM1 の変異体 *sgr1* は胚軸において重力への応答異常が見られる(Fukaki et al., 1996; Takasa et al., 1999)。これら内皮細胞の形成異常が伴う変異体は、胚軸や花茎が重力応答を示さないものの、根は正常に重力応答を示すことから、地上部の重力感知は内皮細胞、根の重力感知は根冠のコルメラ細胞であると考えられた。

一方、アミロプラスト内に蓄積するデンプンの量も重力応答に影響する。デンプン生合成の異常によって、デンプンの蓄積が少ない *Arabidopsis phosphoglucomutase (pgm)* 変異体は胚軸と根の双方とも重力応答が異常になる(Caspar and Pickard, 1989)。また、内皮細胞にデンプンが多く蓄積する *starch excess (sex1)* 変異体は、野生型と比べて胚軸でのみ重力に対する応答が速くなることが知られている(Vitha et al., 2007)。このことから、デンプンの量はアミロプラストの沈殿を調節する働きを持ち、アミロプラストでのデンプン量は重力応答に重要であることが示された。

デンプン量の他に、胚軸の内皮細胞においてアミロプラストの動きを調節する要因として、液胞とアクチン繊維が挙げられる。液胞および液胞膜について、膜間輸送や液胞形成に関わるタンパク質をコードする遺伝子の各変異体 *sgr2*, *sgr3*, *sgr4/zig* および *sgr8* は、胚軸と花茎で重力応答が異常になるとの報告がある(Kato et al., 2002; Hashiguchi et al., 2013)。胚軸の平衡細胞には大きな液胞があり、アミロプラストは液胞膜と液胞膜の間(Transvacuolar strand)に取り囲まれるため、液胞の動きはアミロプラストの重力方向への沈殿を促進する(Saito et al., 2005)。それに対して、アクチン繊維は地上部の平衡細胞内で Transvacuolar strand によってアミロプラストと相互作用して、アミロプラストの重力方向への沈殿を攪乱する(Hashiguchi et al., 2013)。それにより、地上部の平衡細胞の液胞はアミロプラスト沈殿による重力応答を正に、アクチン繊維は負に制御していることが明らかとなっている(図 1-2)。



(Strohmer et al., 2012 より一部改変)

図 1-2 シロイヌナズナの重力感知及び応答機構

1-2-2 重力応答に関わる Ax 及び BR の知見

植物が重力方向を感知し、非対称に細胞層が伸長することにより屈曲し、結果として重力に応答する現象には Ax の輸送と濃度勾配が関与することが古くから知られる。特に、胚軸の重力応答においては Ax 極性輸送体 PIN3 が重要な役割を持つ (Rakusová et al., 2011; Rakusová et al., 2016)。重力方向を感知すると、PIN3 は胚軸の重力方向側の内皮細胞に集まるように局在し、Ax の濃度が重力方向側の細胞で高くなり、細胞の伸長が促進され、結果的に胚軸が屈曲する (Rakusová et al., 2011)。また、重力方向側に集まった PIN3 を反対側の細胞膜に再配置させることによって Ax の濃度勾配を無くし、過重力応答を防ぐフィードバック制御機構も存在することが明らかとなっている (Rakusová et al., 2016)。

Ax の濃度勾配に伴う非対称的な細胞伸長と胚軸の屈曲は、細胞伸長機構と同様に Ax 受容体 TIR1/AFB-ARF および Aux-IAA の分解を介している。胚軸の重力応答が低下する複数の AUX-IAA および ARF 関連の変異体が知られており、例えば *MASSUGU2(MSG2)/IAA19* 遺伝子に関する変異体は、野生型と比べ生育は正常であるものの、胚軸の重力応答のみ低下する (Tatematsu et al., 2004)。*SOLITARY ROOT(SLR)/IAA14* に関する変異体は、胚軸および根で重力応答が低下するほか、Ax による PINs の発現誘導が認められない (Fukaki et al., 2002; Vieten et al., 2005)。また、*arf7 arf19* 二重変異体では、*iaa14* 変異体と同じく胚軸および根で重力応答が低下し、根での PIN1 および PIN2 の細胞膜への再配置が減少する (Sauer et al., 2006)。このように、Aux-IAA/ARF 変異体解析の結果から、Aux-IAA/ARF 依存的な一部の重力応答の制御は、PINs などの Ax 輸送体を介して起きることが示唆されている。

一方、BR の重力応答への制御についてもいくつか報告がある (Vandenbussche et al., 2011; Gupta et al., 2012)。暗所芽生えのシロイヌナズに BR を投与すると、胚軸が湾曲し、正常な重力応答ができなくなる。また、野生型やデンプンが蓄積しない *pgm* 変異体に BR 生合成阻害剤 brassinazole (Brz) を与えた場合、重力応答するシロイヌナズナ個体の割合が増える (Vandenbussche et al., 2011)。スクロース濃度が高くなるにつれ、BR の重力応答阻害が弱まることも報告されており、同報告から BR は重力感知するアミロプラストに直接影響するのではなく、細胞壁の機械的な性質に影響を与え、屈曲する際に正常な細胞伸長を阻害していると考えられている (Vandenbussche et al., 2011)。また、Gupta らの報告から、暗所芽生えのシロイヌナズを用いた結果により、BR による胚軸の重力応答阻害は Ax の正常な信号伝達および輸送を介して起きると示された。加えて、グルコースは BR による様々な遺伝子の発現誘導を調節し、BR による Microtubule 構築への関与も示唆された (Gupta et al., 2012)。以上の報告から、BR の重力応答制御は、Ax 信号伝達と輸送を介するほか、屈曲する際の細胞伸長に関わる細胞壁を調節している (図 1-2)。

1-3 Ax および BR の生合成経路および信号伝達経路に関するクロストーク

現在までAx-BR間のクロストークについては信号伝達経路の上流、つまり比較的受容体に近い経路上の相互作用の存在が明らかにされている。ここでは幾つかの報告を紹介しておく。

AxがBR内生量を調節する例として、BRの生合成過程における律速酵素とされる *DWF4* 遺伝子の発現のAx信号伝達による制御がある(Chung et al., 2011; Yoshimitsu et al., 2011)。*DWF4* 発現は活性型BRであるBLの投与に伴うフィードバック制御により低下するが、BR生合成阻害剤 brassinazole (Brz) の投与により発現量が上昇する。この報告では、活性型AxであるIAAの投与によっても *DWF4* の発現上昇が確認される。Ax受容体に関する機能欠損型多重変異体や受容体特異的な阻害剤を用いることにより、このIAAに対する発現応答が認められなくなることからAxの信号伝達の関与が明らかとなった。これに呼応して、IAA・BL・Brzを用いたマイクロアレイ解析の結果からも、IAAによりその発現が誘導される遺伝子群の一部は、BR欠損状態では発現誘導されなくなることから、Axによって植物に生じる作用の一部はBRの信号伝達を介して引き起こされていることが示唆された(Chung et al., 2011)。

一方、Ax-BR間の信号伝達過程における直接的なクロストークの例もある。すなわち、BR信号伝達過程に深くかかわるリン酸化酵素 BIN2 は、転写因子 BZR1/BIL1・BES1 をリン酸化することでBR信号伝達を抑制することに加え、転写因子 ARF2 もBIN2によるリン酸化を受ける。ARF2の機能欠損は、Axによって引き起こされる細胞伸長を増大させることから、ARF2はAxの信号伝達を負に制御すると考えられる(Schruff et al., 2006)。BIN2のよってリン酸化されたARF2はDNAと結合できなくなり、Ax関連遺伝子の発現応答が活性化される(Vert et al., 2008)。従って、BRがその受容体 BRI1 に結合することで生じるBIN2の不活性化は、BRの信号伝達を活性化することに加えてARF2をも活性化し、それによってAx関連遺伝子の発現が調節されると理解できる。また、BRにより活性化される転写因子 BZR1/BIL1 と、それが結合する遺伝子配列との chromatin-immunoprecipitation microarray 解析の結果から、BIL1が標的とする遺伝子の発現調節領域の中にAx応答性配列 AuxRE (ARFsが認識して結合する配列)も存在しており、1つの遺伝子発現に対してBIL1とARFがともに制御する可能性を示唆している(Sun et al., 2010)。

1-4 本研究の目的

これまで述べたように、Ax および BR の細胞伸長への作用は共通の機構であるプロトンポンプ活性化を介する可能性があり (Minami et al., 2019)、重力応答については相反する作用を示すものの、Ax 輸送体である PINs や細胞壁の変化を通して作用を及ぼすことが明らかとなった。植物ホルモンの信号伝達経路を全体的に見た場合、このような作用機構は信号伝達経路の終端部に近いと考えられる。前項で紹介したように、最近の知見から Ax・BR 両ホルモンは、それぞれの生合成過程や信号伝達過程、関連遺伝子の発現に至るまでの各過程において互いに影響し合っている。しかし、両ホルモンの作用発現に向かう信号伝達経路の末端制御様式についてはまだ十分に知見が蓄積された状況になく、未解明な領域が多く残されている。本研究では、Ax・BR 間で共通する細胞伸長および重力応答への生理作用に着目して、そこで機能する未同定の共通制御因子が存在すると想定した。具体的には、修士論文研究で得られた Ax・BR の同時制御剤 NJ15 を用いて、当該制御剤に対する低感受性変異体の探索および低感受性の原因について解析を行い、Ax・BR 共通の生理作用である細胞伸長および重力応答を調節する新たな制御因子の化学的な解明を目指して研究を展開した。第 2 章では、Ax・BR の制御剤 NJ15 の低感受性変異体の探索およびその変異体を用いた網羅的な遺伝子発現解析を行い、低感受性の原因について情報を収集した。第 3 章では、クチクラ層の異常が化合物低感受性の原因であると特定し、クチクラ層に対する NJ15 の作用を検証した。そして、最終の第 4 章では、クチクラ層の異常による細胞壁への影響を調べた結果について述べ、NJ15 の標的経路について考察した。

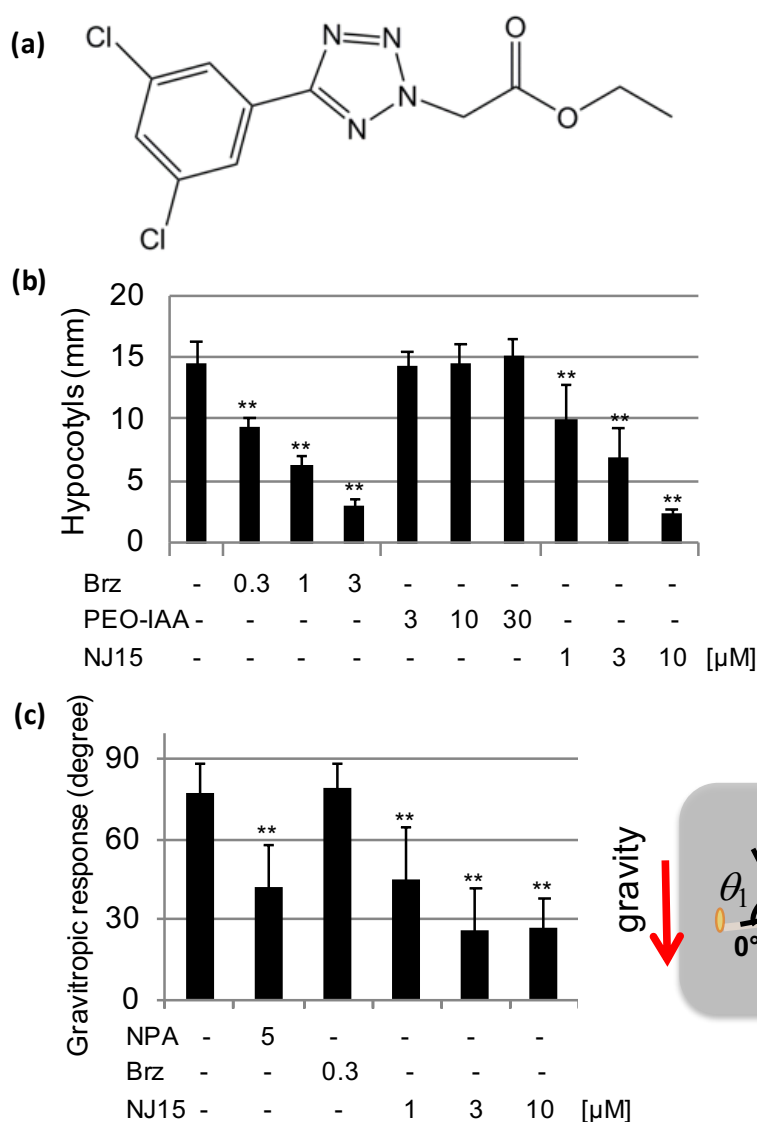
第2章 NJ15 低感受性変異体の選抜 及び網羅的な発現解析

2-1 諸言

序論で触れたとおり、Ax と BR は共に細胞伸長や重力応答など、環境の変化に対する植物の制御において共通性の高い作用を有する。そのような作用の発現機構として、Ax や BR 信号伝達経路下流の過程において、例えば同一の遺伝子発現誘導などの作用に向けて、極めて限定的に両植物ホルモンの作用発現経路を共有する可能性を想定した。その経路を特異的に制御する化合物を発見、または創製できれば、その化合物を用いた制御を基点として具体的にはまだほとんど知られていない新経路の解析と、周辺で機能する制御因子の特定が可能になると考えた。修士論文研究においては Ax 及び BR によるアズキ上胚軸切片の伸長を阻害する化合物のスクリーニングを行った後、シロイヌナズナを用いて生育阻害活性の評価を行った。野生型株シロイヌナズナ Columbia (以下 WT)においては、暗所での胚軸伸長の促進 [①] 及び重力応答 [②] に注目し、いずれのホルモン作用も阻害する化合物を選抜した。最終的に NJ15 (Ethyl-2-[5-(3,5-dichlorophenyl)-1,2,3,4-tetrazole-2-yl]acetate) と称する化合物を得た (Jaroensanti et al., 2014) (図 2-1(a))。

(図 2-1(b))に示すとおり、[①]の評価系において BR 生合成阻害剤 brassinazole(Brz)が濃度依存的に暗所芽生えの胚軸伸長を阻害するのに対して、Ax 受容体阻害剤 PEO-IAA[α -(Phenyl Ethyl -2-Oxo)-IAA]は胚軸伸長に阻害活性を示さなかった。序論でも触れたように、暗所での胚軸の成長が胚軸細胞の数が増えるよりも主に細胞の伸長によって胚軸が伸びる点をふまえ、この評価系においては BR による細胞伸長の制御が大きく寄与すると考えられる。NJ15 は暗所芽生えに対して Brz と同様に、濃度依存的な胚軸の伸長阻害活性を示したことから、BR による細胞伸長を NJ15 が阻害することを実験的に示した。一方、[②]の評価系(図 2-1(c))において、無処理では胚軸がその前の向きから、重力方向に対して反対になるように屈曲するが、Ax 輸送体阻害 NPA(1-N-Naphthylphthalamic acid)を加えた場合はこの屈曲性応答が阻害された。先述の Brz はこの系に対しては阻害活性を示さなかったが、NJ15 を処理した場合、1 μ M から胚軸の重力応答が阻害された。この結果から、NJ15 は胚軸の重力応答屈性に対する阻害活性を示し、Ax の輸送もしくはその信号伝達を阻害すると考えた。

Ax や BR が共に制御する、いわゆる未同定の新経路およびその周辺に関わる制御因子解明のため、胚軸伸長そして重力応答のいずれにも阻害活性を示した NJ15 が作用を及ぼす経路を特定すべく、本博士論文研究においては初めに NJ15 低感受性変異体の探索を計画した。低感受性変異体の探索対象として、理研バイオリソースセンターが提供するシロイヌナズナ完全長 cDNA を WT に導入した FOX (Full-length cDNA Over-expressing gene) ラインを用いた。完全長 cDNA の強制発現に伴う表現型変化を指標にスクリーニングを展開し、NJ15 低感受性を見出すことができれば、他の遺伝子欠失型変異体



(Jaroensanti et al. 2014)

図2-1 暗所におけるシロイヌナズナ幼植物体の生長に与えるNJ15の投与効果

(a) NJ15の構造式

(b) シロイヌナズナ野生型株をいずれも2日低温処理後、4時間明所下で発芽刺激を与え、明示した化合物を添加した培地上で暗所下7日間育成した際の胚軸長。n = 20、エラーバーは標準偏差を示す。

(c) 上と同様な条件を用いて、縦置きで暗所下6日生育させた後、培地プレート 90° 回転させて、さらに1日暗所で生育させた際の胚軸の反重力応答の角度。回転前の胚軸の向きから胚軸が曲がった角度を示す。n = 20、エラーバーは標準偏差を示す。

** : $p < 0.01$; Student's t -test.

Brz: brassinazole; PEO-IAA: α -(Phenyl Ethyl -2-Oxo)-IAA;

NPA: 1-N-Naphthylphthalamic acid

プールを対象とする場合と比較して、T-DNA 上のプライマーを用いた PCR 反応によってその原因遺伝子の特定が容易であろうと考えた。また、NJ15 低感受性変異体を探索する上で、同一個体を用いて Ax および BR に対する NJ15 阻害活性を評価できる点から、上述の評価系[①]と[②]の併用を採用した。

探索によって得られた複数の NJ15 低感受性を示す候補ラインを対象に、低感受性の原因遺伝子産物が NJ15 の作用とどのように関与するかを解析するため、次世代シーケンス(NGS)による遺伝子発現の網羅的解析(RNA-seq)の実施を計画した。これにより、複数の NJ15 低感受性変異体における共通の変動遺伝子群、またはそれらを含む代謝・生合成経路の推測、そして NJ15 の作用経路の特定を期待した。以降、NJ15 低感受性変異体の選抜、得られた候補変異体の詳細および網羅的な遺伝子発現解析の結果について詳述する。

2-2 NJ15 低感受性変異株の探索および解析

2-2-1 NJ15 低感受性変異株の探索方法

暗所条件下で植物を生育させる場合、発芽した後は重力方向とは逆向きに、平置きした培地に対して直立した胚軸伸長が生じる。この環境条件で、NJ15を含む培地にてWTを生育させた場合、NJ15の濃度依存的に胚軸の伸長が阻害されるほか、重力応答も阻害され、胚軸が培地に横たわる形態をとる(図 2-2(d))。NJ15 低感受性変異体の探索系構築のため、最初にWTを用いて平置き培地への最適なNJ15添加濃度の決定を行った。なお、NJ15は根の伸長に阻害活性を示さない(図 2-2(b))。図 2-2(a,c)で示すように、低濃度条件ではWTの胚軸伸長には阻害が認められたが、重力応答の阻害は十分には認められなかった。そこで、NJ15添加濃度を10 μ Mまで上げた条件を調べたところ、大半の個体に重力応答阻害が生じたため、NJ15 低感受性変異体の探索には10 μ MのNJ15添加条件を採用した。以下、各ラインの種子が複数の実験に使える数を確保できている条件で実験を行った。

NJ15 低感受性を示す変異体が存在する場合は、上記条件下で胚軸伸長の阻害状況に緩和が認められ、かつ、重力応答に関しても回復傾向が期待された(図 2-2(d))。偽陽性排除のため、NJ15 添加条件の平置き培地に直立して育つ候補個体を見出した場合は、これらを取り出して、NJ15を含む新しい培地に移植して、縦置き状態の培地にて暗所下2日間、当該植物を生育させ本当に重力応答に回復基調が認められるか精査する2段階方式を採った(図 2-3(a))。

シロイヌナズナ完全長 cDNA 過剰発現変異体 (FOX) 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、複数の候補株を得た。これら候補の FOX 変異体を生育し、自家受粉した次世代の種子を取り、その後代種子を用いて再び NJ15 感受性を調べた(図 2-3(b))(図 2-4)。その結果、4 種の変異体に関しては再現よく NJ15 低感受性を示した。FOX 変異体は完全長 cDNA を強制発現させたものであるため、4 ラインにおける導入 cDNA を PCR 反応により同定後、各ラインでの当該 cDNA の発現状況を調べた。その結果、4 ライン中 3 ライン (*f127*, *f207*, *f342* と名付けた変異体)において、それぞれの導入 cDNA を鋳型に発現した mRNA の過剰発現状況を確認した(図 2-5(a,b,c))。なお、3 ラインに関する導入遺伝子情報を図 2-5(d)に示す。*f127* は *At1g11100*、*f207* は *At3g19930*、*f342* は *At3g51430* の完全長 cDNA が過剰に発現しており、このうちの *At1g11100* および *At3g51430* はいずれも機能不明なタンパク質をコードするもので、*At3g19930* はグルコース輸送体の一つ sugar transport protein4 をコードすることが判明した。

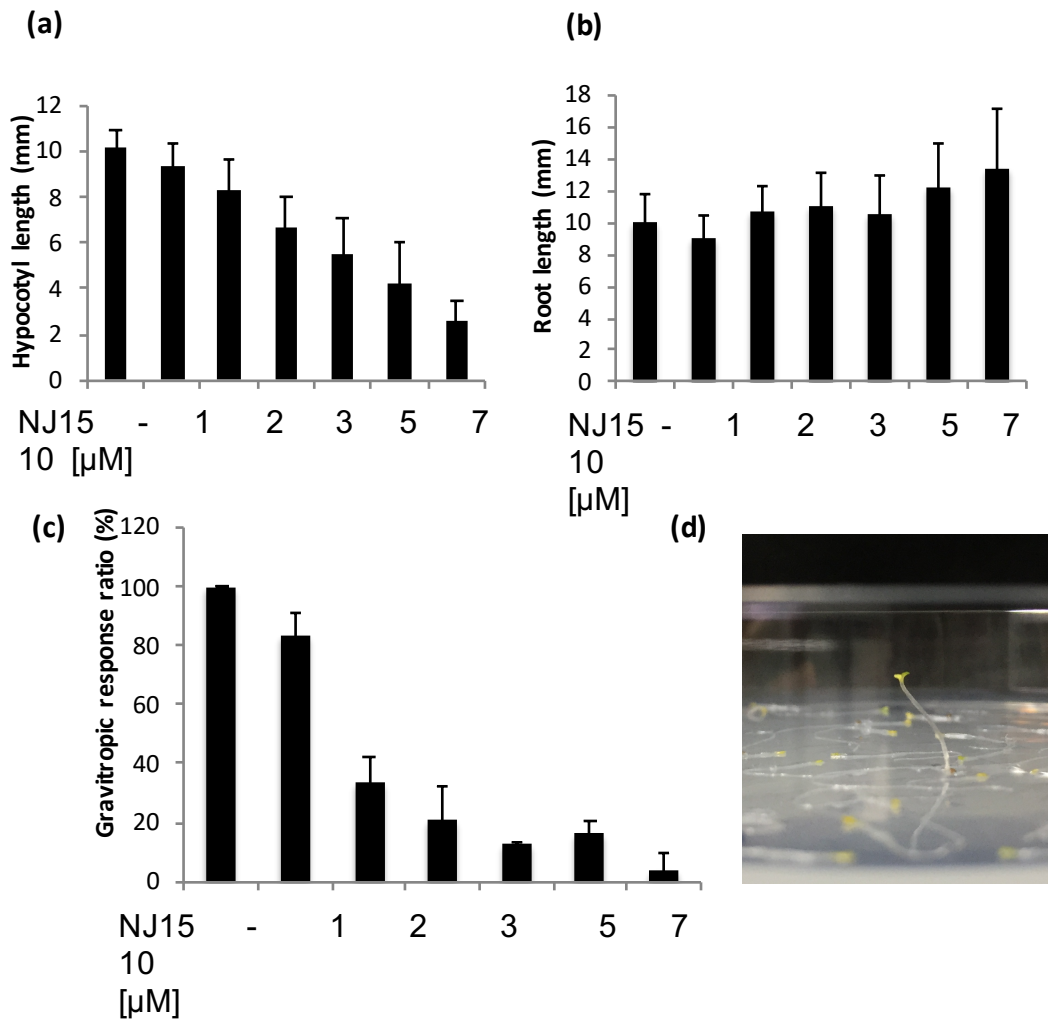


図2-2 シロイヌナズナ野生型株に対するNJ15 の効果

- (a) シロイヌナズナ野生型株をいずれも2日低温処理後、4時間明所下で発芽刺激を与え、明示した化合物を添加した培地上、平置きで暗所下4日間育成した際の胚軸長。n = 35、エラーバーは標準偏差を示す。
- (b) (a)の条件で生育させたの植物の主根長。n = 35、エラーバーは標準偏差を示す。
- (c) (a)の条件で生育させた際に、培地に直立して伸長した植物体の割合。エラーバーは標準偏差を示す。
- (d) 野生型株を10 μMのNJ15を含む培地で平置きにして暗所下4日間生育させた様子。低感受性変異体は写真中央の個体のように直立して伸長する。

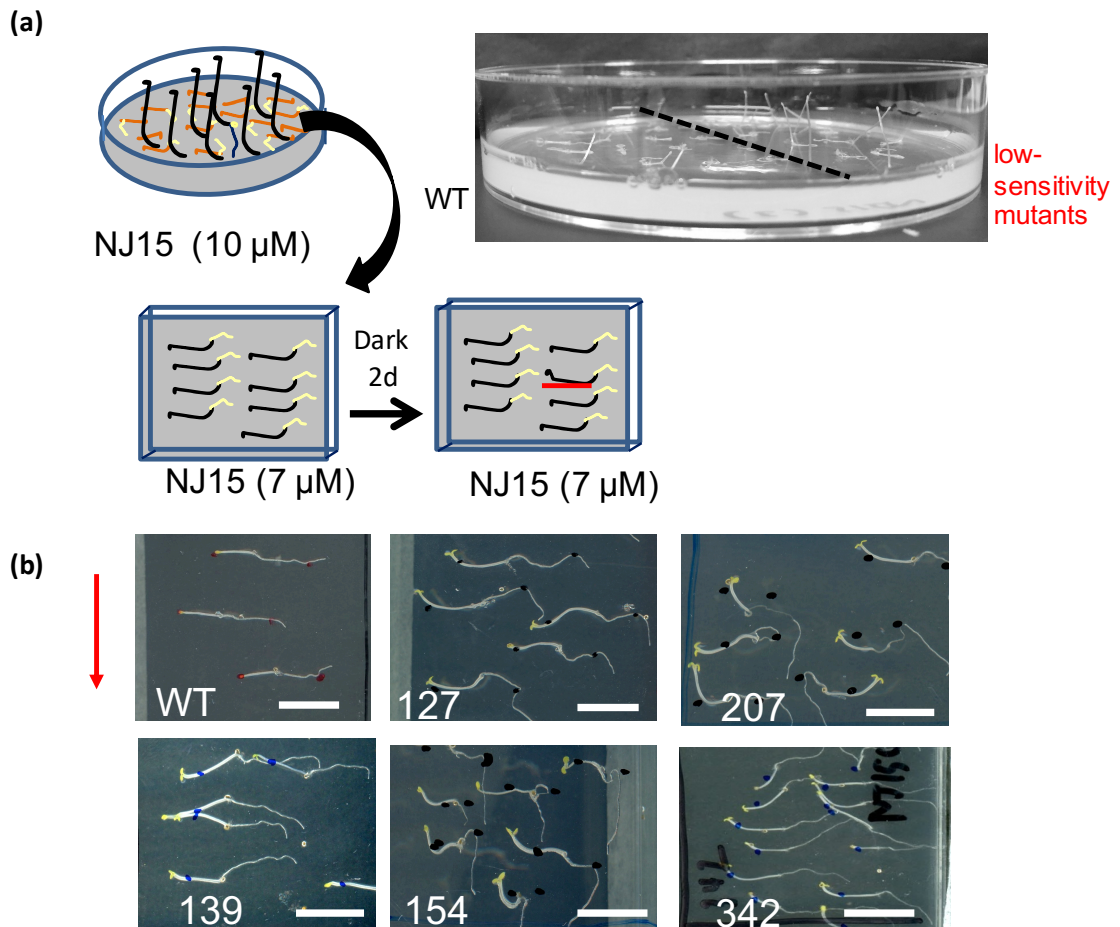


図2-3 NJ15 低感受性変異体の選抜方法

- (a) NJ15 (10 μ M) を含む培地に cDNA過剰発言変異体(FOX)プールから約 50 粒種子を滅菌して撒き、3日低温処理後に4時間明所下で発芽刺激を与え、その後平置きで暗所下4日生育させた。NJ15の重力応答阻害に対する感受性を確認するために、平置き of 培地から立ち上がった個体を、NJ15 (7 μ M) を含む培地に、胚軸が培地と接するように植え替え、立て置きでさらに暗所下2日間生育させた。
- (b) 立て置きで2日間生育させた野生型および候補の低感受性変異体の写真を示す。野生型では胚軸の伸長が阻害されて重力応答が見られなかったのに対して、候補の低感受性変異体は胚軸が伸長して重力応答を示した。赤矢印は重力方向を示す。

Bar = 1 cm。

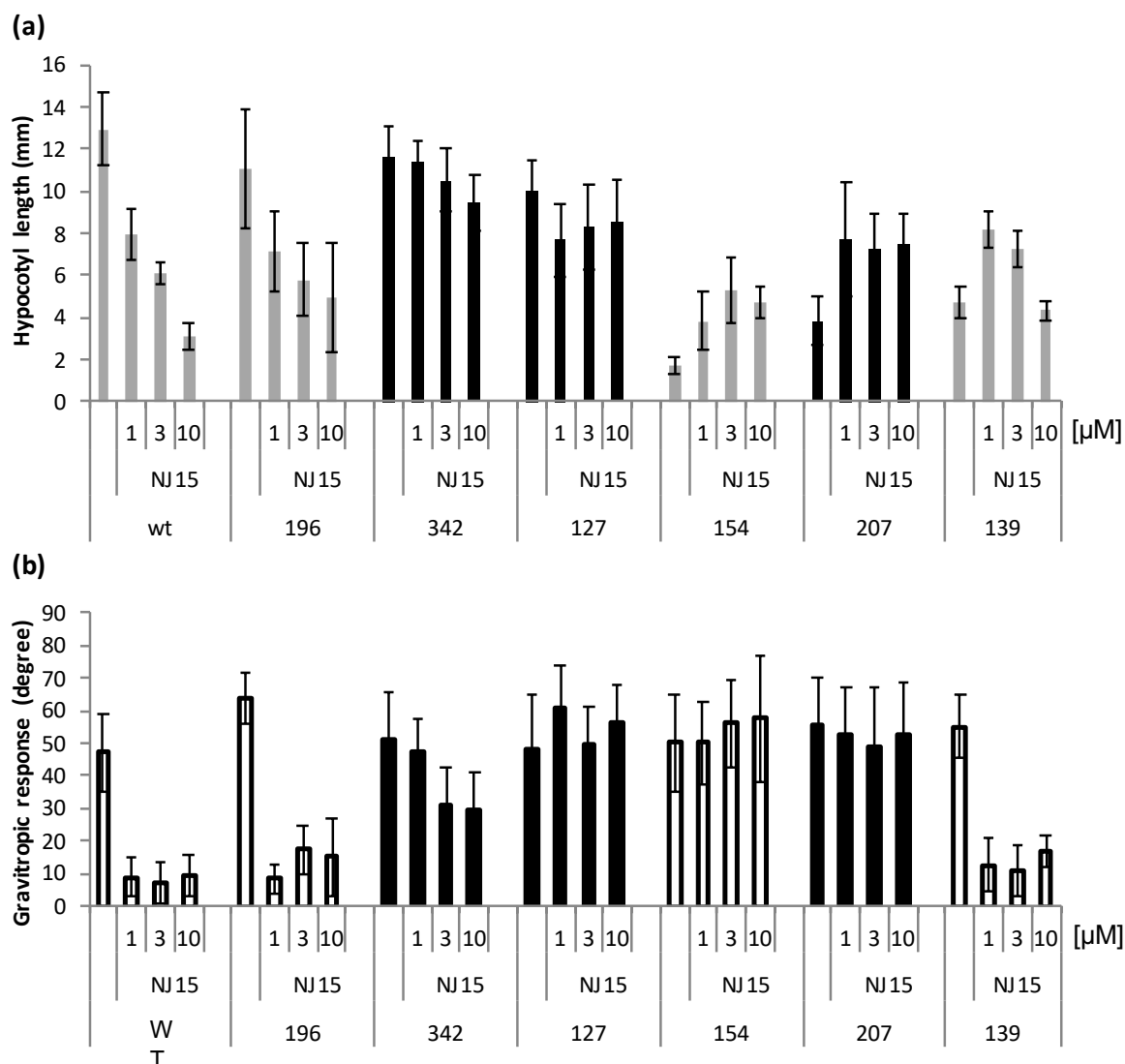


図2-4 候補低感受性変異体に対する NJ15 の阻害効果

(a) スクリーニングで得た候補変異体を生育させて自家受粉した次世代の種子をとった。それぞれの次世代種子を滅菌して NJ15 (1, 3, 10 μ M) を含む培地に撒き、3日低温処理後に4時間明所下で発芽刺激を与え、その後縦置きで暗所下5日生育させた際の胚軸長。n = 10-12、エラーバーは標準偏差を示す。

(b) 上と同様な条件を用いて、縦置きで暗所下5日生育させた後、培地プレートを90°回転させて、さらに1日暗所で生育させた際の胚軸の反重力応答の角度。回転前の胚軸の向きから胚軸が曲がった角度を示す。n = 10-12、エラーバーは標準偏差を示す。

「本 2-2-2 項の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。
5 年以内に出版予定。」

「本 2-2-2 項の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。
5 年以内に出版予定。」

「本 2-2-2 項の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。
5 年以内に出版予定。」

「本 2-2-2 項の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。
5 年以内に出版予定。」

「本 2-2-2 項の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。
5 年以内に出版予定。」

2-3 NJ15 低感受性変異体を用いた網羅的遺伝子発現解析

2-3-1 NJ15 低感受性変異体の遺伝子発現変動

NJ15 低感受性 3 ラインにおいて、NJ15 への低感受性が共通な機構に拠る可能性を考えた。この場合、先の植物ホルモン内生量の変動を調べた際に観察された結果と同様にライン間で体内物質の変動状況に共通傾向が認められることが期待されるとともに、物質の生合成酵素や代謝酵素、及びそれらをコードする遺伝子群についても似た発現変動の傾向が生じていることが期待される。そこで、3 ラインの NJ15 低感受性付与に至った機構を探るべく、その端緒として次世代シーケンサを用いた網羅的な遺伝子発現解析を実施した。

暗所条件下で 4 日間、1%スクロース含有 1/2MS 培地上で、プレート縦置きして WT 及び *f127*、*f207*、*f342* を生育させた。4 日目に暗所にて最終濃度 10 μ M になるように NJ15 水溶液または対照区 (mock) として当量の DMSO/水を噴霧し、プレートを 90° 回転させ、3 時間重力刺激を与えた植物体を採集して RNA を抽出した。3 ライン及び WT それぞれの NJ15 処理区と mock 処理区、合わせて 8 区を 3 連で、RNA-seq による発現解析に供した。得られた発現データは正規化を行い、RPKM(Reads Per Kilobase of transcript per Million mapped reads) 値を計算して統計処理を行なった(図 2-9)。遺伝子ごとの Benjamin-Hochberg false discovery rates (FDR) を計算し、 $FDR \leq 0.05$ を絞り込み条件に用いて、WT 対各低感受性ライン間 (B: [WT]mock/[*f342*]mock; C: [WT]mock/[*f207*]mock; D: [WT]mock/[*f127*]mock) 計 3 区、及び WT の mock 処理対 NJ15 処理(A: [WT]mock/[WT]NJ15)間で、発現変動遺伝子(Differential Expressed Genes; DEGs)を特定した。それぞれの比較区の DEGs 数を図 2-10 に示す。A 区 339 個、B 区 836 個、C 区 1466 個、そして D 区は 5700 個の DEGs があり、*f127* は他の 2 ラインと比べて WT 間との発現変動が最も大きいことが判明した。また、4 区共通の DEGs は 82 個あり(図 2-10 内 ABCD)、これらの遺伝子は NJ15 応答性遺伝子で、かつ WT とは異なる 3 ライン共通の発現変動遺伝子群と解釈できる。これら 82 個の遺伝子群をさらに Gene Ontology (GO) 解析に供した。その結果、環境刺激に応答する遺伝子群の他、二次代謝産物の生合成及び細胞成長に伴う細胞壁の修飾関連遺伝子が多く出現した(図 2-11(a))。一方、WT と異なる 3 ライン共通の発現変動遺伝子群で、かつ NJ15 には応答しないものとして 486 個あった(図 2-10 内 BCD)。これについても先の 82 個と同様に GO 解析に供した結果、二次代謝物の生合成や分解に関わる酵素遺伝子が多く出現し、特に、色素合成・代謝関連遺伝子群が目立っていた(図 2-11(b))。

A 区～D 区をそれぞれ、KEGG pathview を用いて GO term 単位で DEGs を可視化したところ、3 ラインいずれも WT と比べて、クチクラ構成成分であるクチン及びワックスの生合成経路、デンプン・糖代謝、そしてフェニルプロパノイド生合成経路に関する遺伝子群の発現変動が顕著であった(図 2-12～図 2-14)。これらの解析結果より、3 種の NJ15 低感受性変異体は、脂肪酸、クチクラ、フェニルプロパノイドや糖など、シロイヌナズナの表層構造の形成にいずれも重要と考えられる構成成分に変化が生じていることが判明した。また、NJ15 低感受性変異体においてはこれらの成分の量にも変化が生じている可能性が示さ

れた。以上の結果から、NJ15 低感受性変異体の感受性変動に至っている原因、及び NJ15 の作用点がおそらく細胞表層の周辺にあると予想した。次章ではその観点に基づき、解析を進めた。

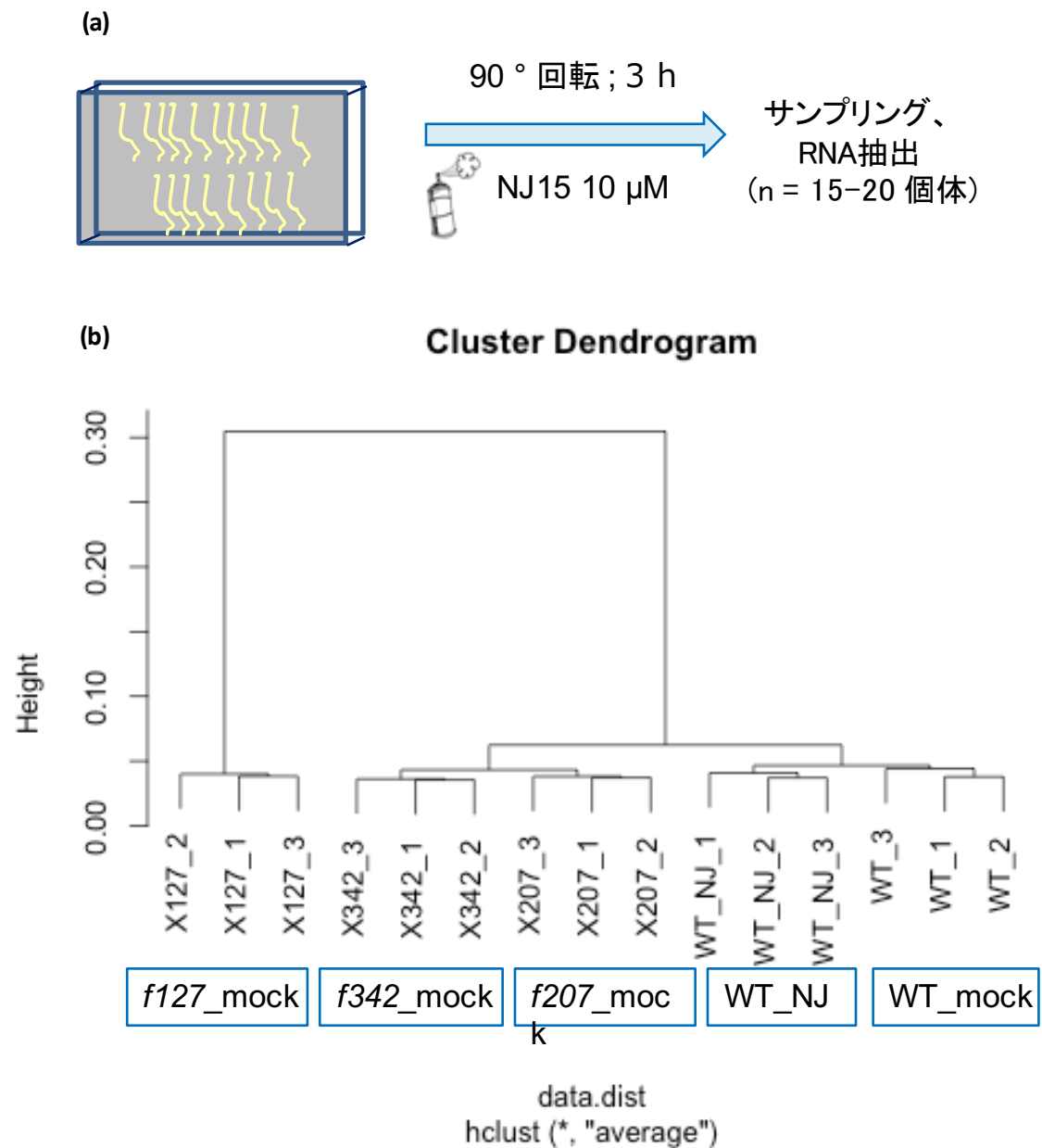


図2-9 NJ15低感受性変異株の網羅的発現解析の概要

- (a) RNA-seq解析に用いたWT、各NJ15 低感受性変異体の化合物処理およびサンプル調製方法。シロイヌナズナ野生型株、各低感受性変異体をいずれも2日低温処理後、3時間明所下で発芽刺激を与え、縦置きに暗所下4日生育させた。4日目に暗所にて培地全体に対して最終濃度10 μ M になるように NJ15水溶液を噴霧し、プレートを90° 回転させ、3時間重力刺激を与えた植物体を採集した。
- (b) 階層クラスタリングによるWT 及び各NJ15 低感受性変異体サンプルの類似度を示す。

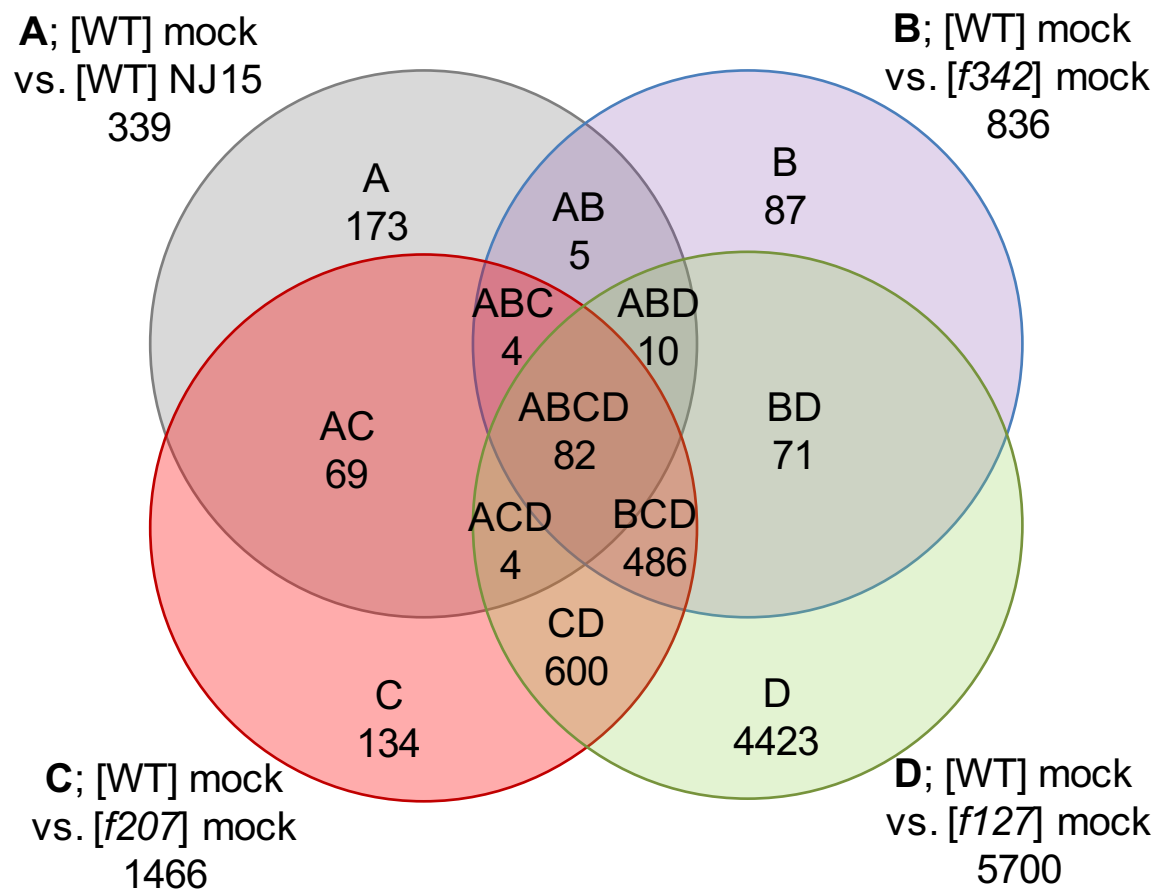
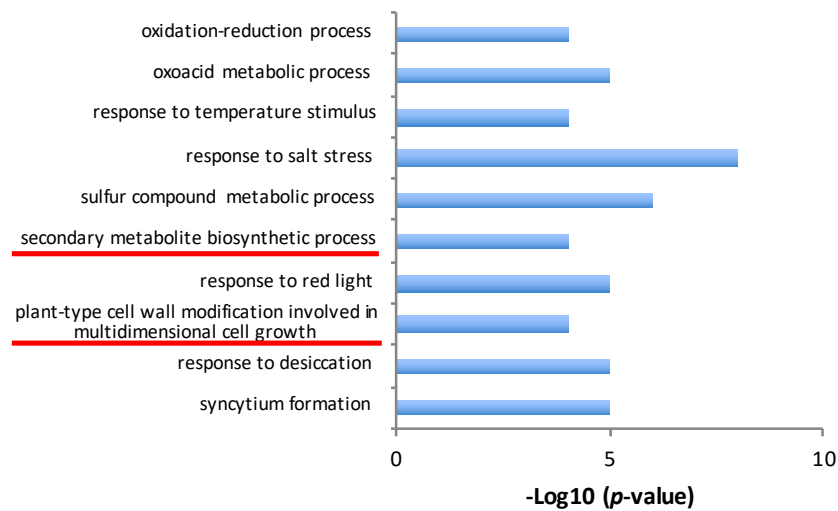


図2-10 WTに対するNJ15処理およびWTに対する各低感受性変異体における発現変動する遺伝子(DEGs)の数 (FDR \leq 0.05)

(a) NJ15 応答性あり (図2-10 中; ABCD)



(b) NJ15 応答性なし (図2-10 中; BCD)

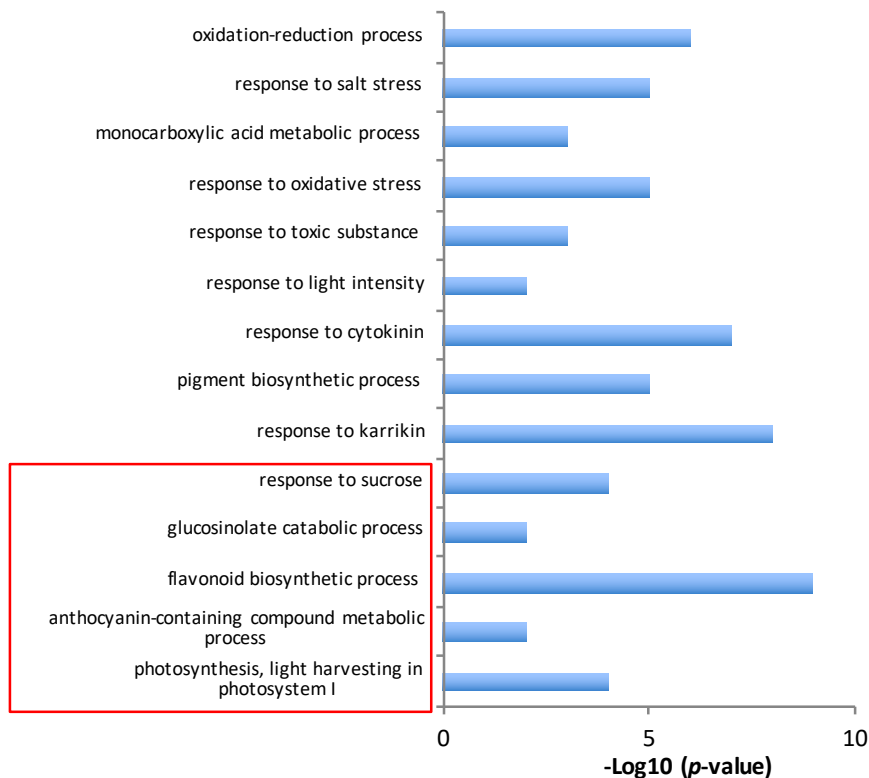


図2-11 NJ15低感受性変異体共通DEGsのGene Ontology(GO)

(a) WTにNJ15処理した際に発現変動が見られた遺伝子と、各低感受性変異体においてWTに対して優位に発現変動が見られた遺伝子との間で共通する82個の遺伝子についてGO解析を行った結果、環境ストレス応答遺伝子のほか、二次代謝物合成経路や細胞壁の合成・修飾酵素遺伝子が多く出現していた。

(b) WTにNJ15処理した際に変動が見られないが、各低感受性変異体においてWTに対して優位に発現変動が見られた共通の遺伝子 486個について、二次代謝物の生合成や分解酵素遺伝子が多く出現していた。

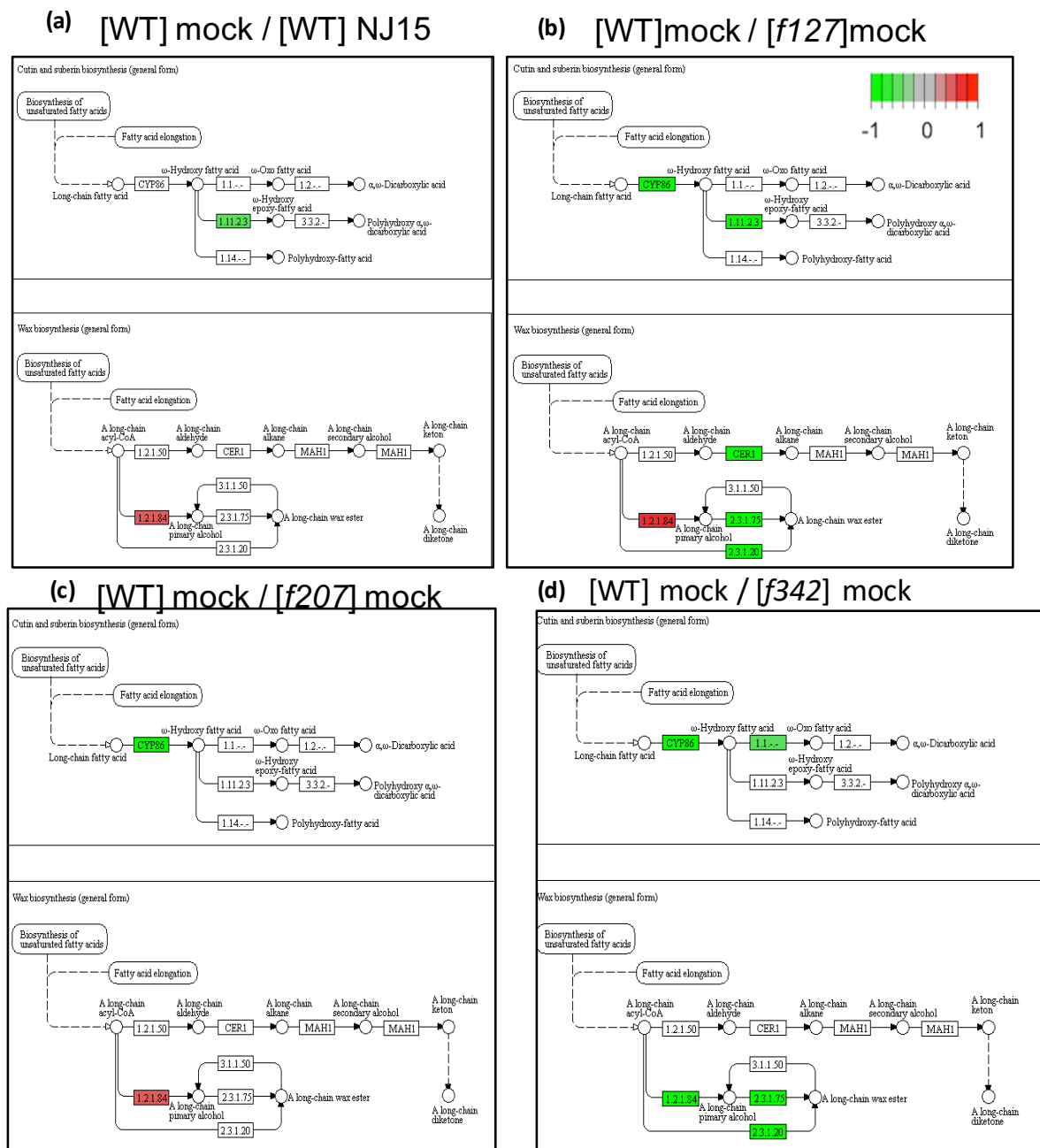


図2-12 NJ15低感受性変異体で発現変動が大きい経路 ①
クチン・ワックス合成経路

KEGG pathviewを用いてクチン及びワックス生合成経路におけるDEGsを描画した。図中で色づけされたボックスは発現変動が見られた遺伝子がコードする酵素であり、色はFold change (Log₂)を示した。緑色は、WTと比べて変異体で発現が上昇、赤色は発現が減少するものである。

(a) [WT] mock / [WT] NJ15

(b) [WT] mock / [f127] mock

(c) [WT] mock / [f207] mock

(d) [WT] mock / [f342] mock

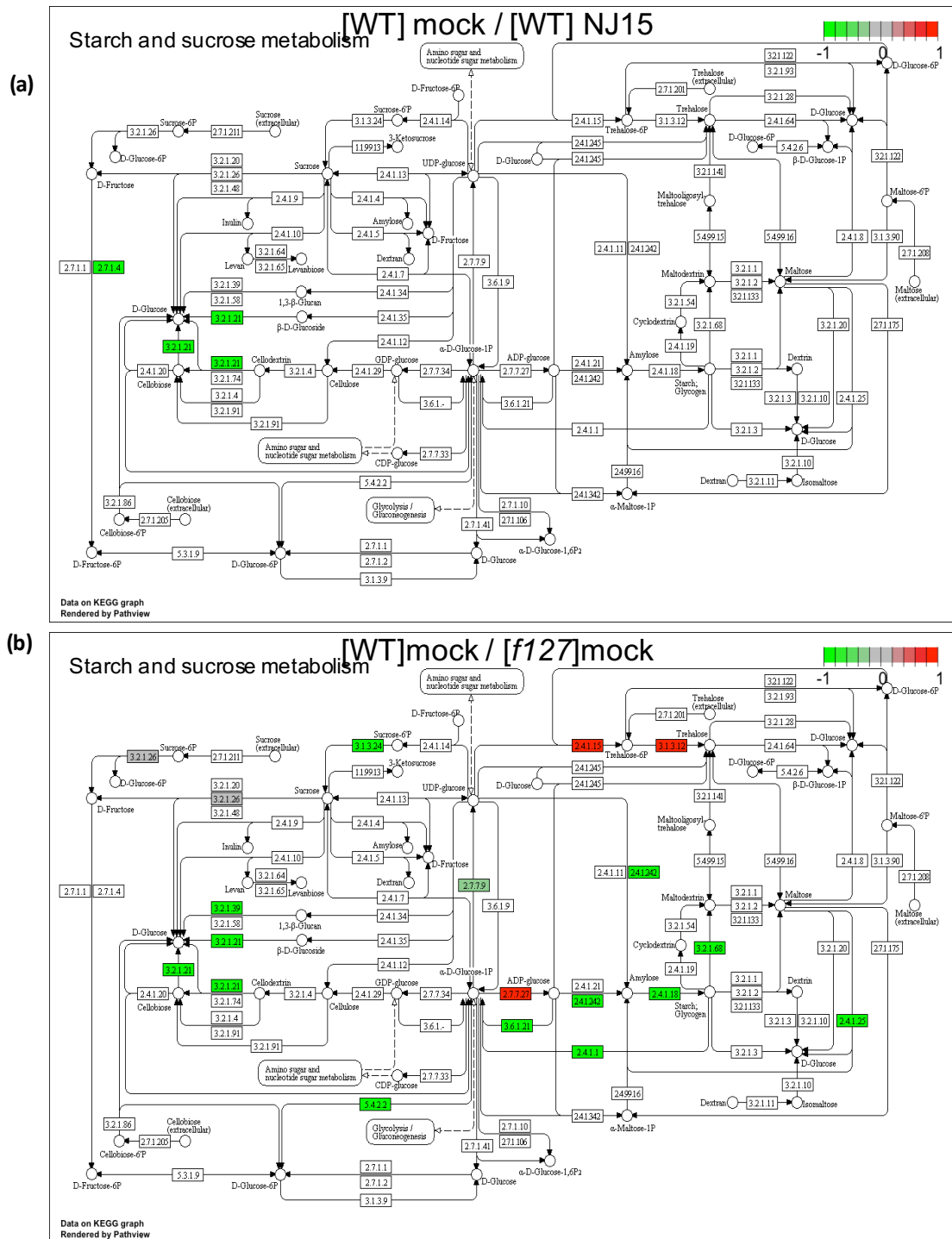
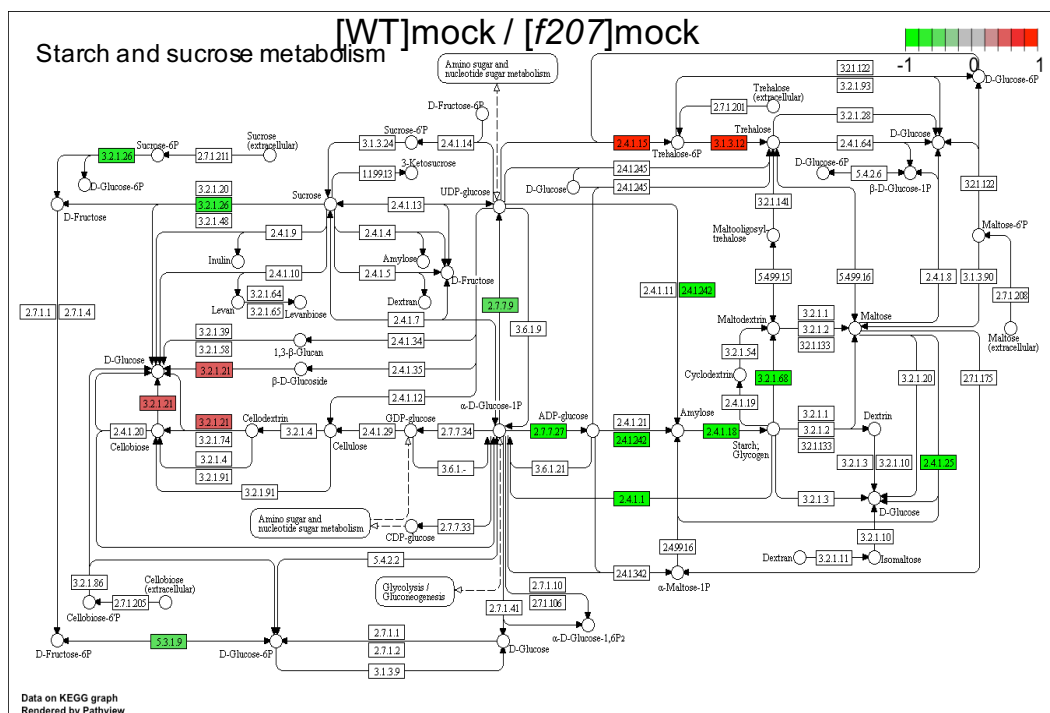


図 2-13 NJ15低感受性変異体で発現変動が大きい経路 ②
デンプン・糖代謝経路

KEGG pathviewを用いてデンプン・糖代謝経路におけるDEGsを描画した。図中で色づけされたボックスは発現変動が見られた遺伝子がコードする酵素であり、色はFold change (Log_2)を示した。緑色は、WTと比べて変異体で発現が上昇、赤色は発現が減少するものである。

- (a) [WT] mock / [WT] NJ15 (b) [WT] mock / [f127] mock
(c) [WT] mock / [f207] mock (d) [WT] mock / [f342] mock

(c)



(d)

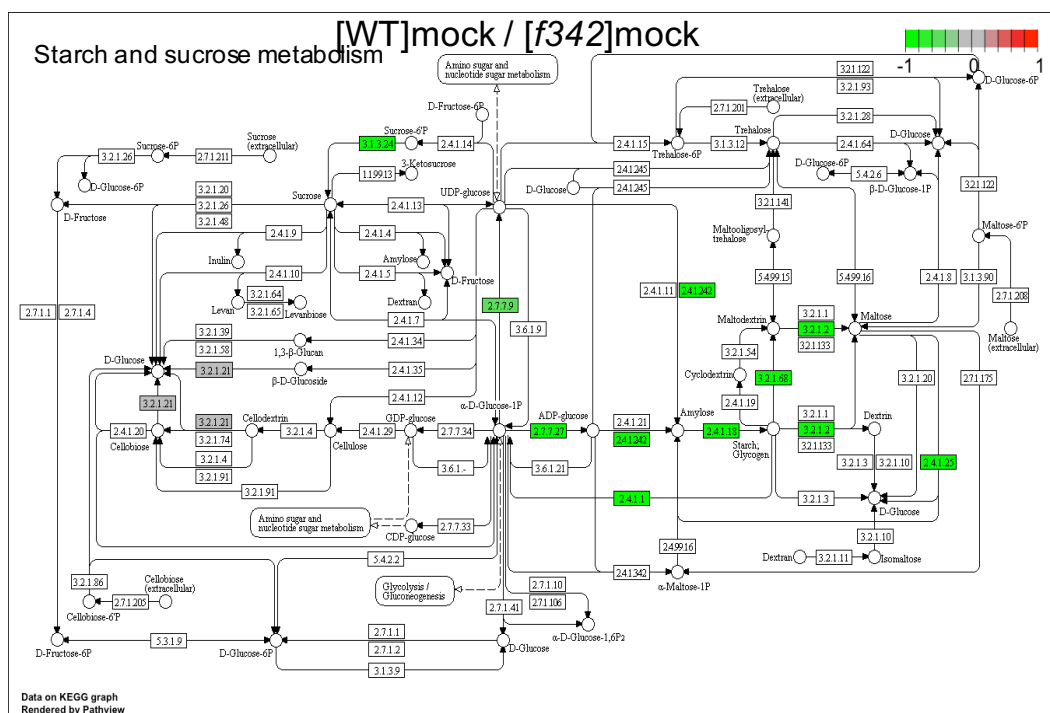


図2-13 NJ15低感受性変異体で発現変動が大きい経路 ②
デンプン・糖代謝経路（続き）

KEGG pathviewを用いてデンプン・糖代謝経路におけるDEGsを描画した。図中で色づけされたボックスは発現変動が見られた遺伝子がコードする酵素であり、色はFold change (Log_2)を示した。緑色は、WTと比べて変異体で発現が上昇、赤色は発現が減少するものである。

(a) [WT] mock / [WT] NJ15

(b) [WT] mock / [f127] mock

(c) [WT] mock / [f207] mock

(d) [WT] mock / [f342] mock

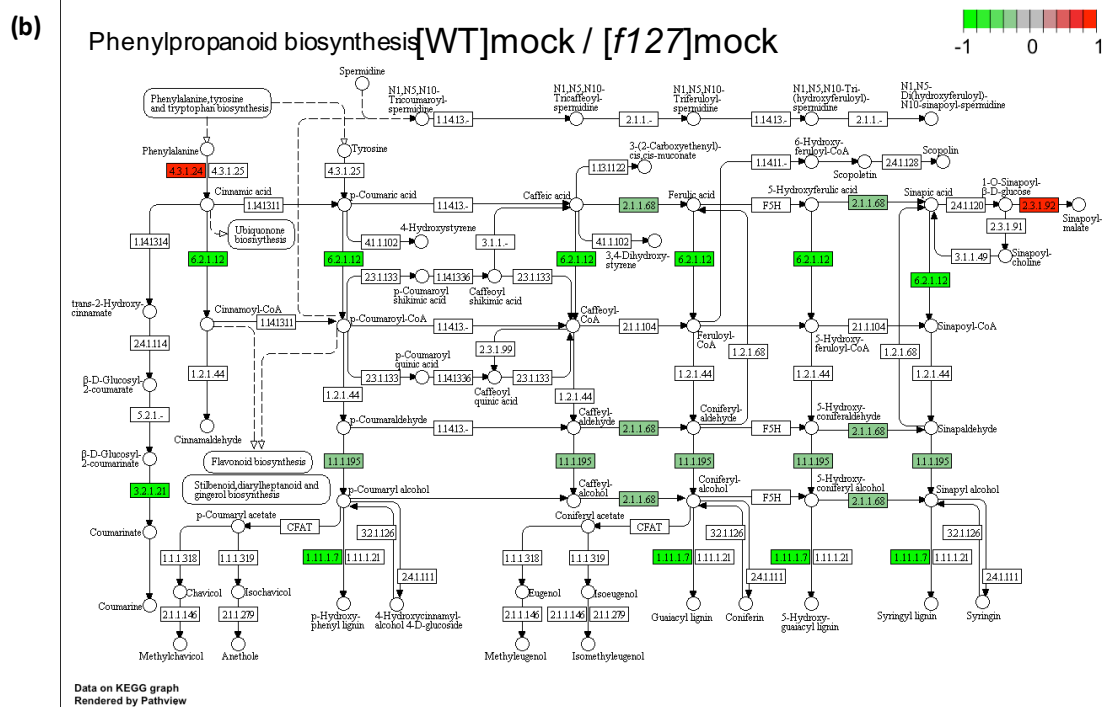
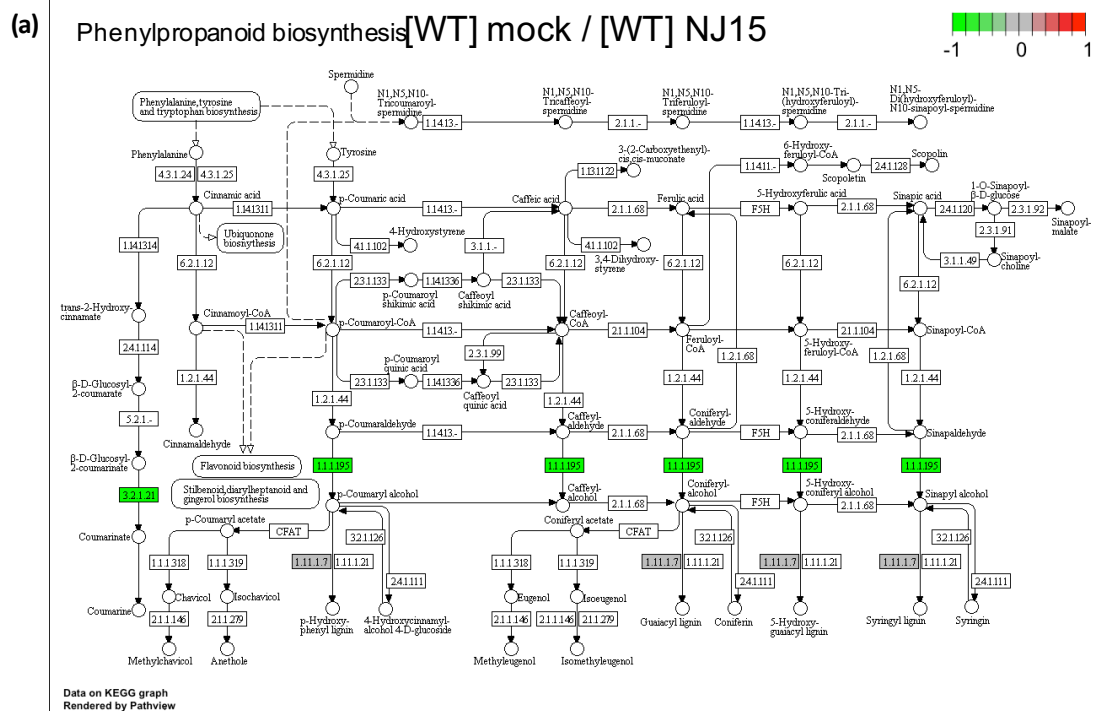


図2-14 NJ15低感受性変異体で発現変動が大きい経路 ③
フェニルプロパノイド生合成経路

KEGG pathviewを用いてフェニルプロパノイド生合成経路におけるDEGsを描画した。図中で色づけされたボックスは発現変動が見られた遺伝子がコードする酵素であり、色はFold change (Log_2)を示した。緑色は、WTと比べて変異体で発現が上昇、赤色は発現が減少するものである。

(a) [WT] mock / [WT] NJ15

(b) [WT] mock / [f127] mock

(c) [WT] mock / [f20] mock

(d) [WT] mock / [f342] mock

2-4 実験の部

2-2-1 NJ15 低感受性変異株の探索方法

【化合物】

N-(1-naphthyl) phthalamic acid (NPA; Tokyo Chemical Industry Co.,Ltd. Tokyo, Japan), brassinazole (Brz), cafenstrole (FUJIFILM Wako Pure Chemicals Ltd., Osaka, Japan) は上記の入手先より購入した。

Ethyl 2-[5-(3,5-dichlorophenyl)-1,2,3,4-tetrazole-2-yl] acetate (NJ15) は NAMIKI SHOJI Co.,Ltd. Tokyo, Japan から購入したほか、研究室で合成した。全ての化合物は dimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解して実験に用いた。

(1) NJ15 のシロイヌナズナにおける生長阻害の評価

【シロイヌナズナの育成】

丸シャーレ(Kanto)にオートクレーブした1/2MS 培地およびDMSOに溶かしたNJ15を入れて固化させたのち、滅菌したシロイヌナズナ種子を植えた。サージカルテープでシャーレを密封して、暗所 4℃で 3 日間低温処理を行った後、連続光下(18.2~46.5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{sec}$)のバイオトロン(22℃、湿度 25%)で 4 時間静置して発芽を刺激した後、暗所 22℃条件下で生育した。

【シロイヌナズナ種子の滅菌】

シロイヌナズナ種子は 1.5 mL 容マイクロチューブに取り、70%(v/v)エタノールに 30 分間浸した後、滅菌濾紙の上に種子を広げて乾燥させた。

【育成用培地;1/2MS の調製】

Murashige & Skoog Salt Mixture(日本製薬) 2.3 g

スクロース 15 g

1000X ビタミンストック 1 mL

(100mL の DW にニコチン酸 50 mg、ピリドキシン塩酸塩 50 mg、チアミン塩酸塩 20 mg、グリシン 200 mg、ビオチン 5 mg、葉酸 50 mg を溶解したもの)

1 N NaOH 水溶液を用いて pH 5.7 に合わせた後、DW で 1L にメスアップし、植物用寒天を 8 g を加えてオートクレーブした。

(2) NJ15 低感受性変異株の探索

【NJ15 低感受性変異株の探索】

FOX (Full-length cDNA Over-eXpressing gene) 種子は理研バイオリソースセンターよりご提供いただいた。

414 個の種子プール(異なる cDNA が挿入された 50 種の種子を混ぜて 1 つのプールとし、1 プールから 400

個の種子を分けて頂いた)を NJ15 低感受性変異株の探索に用いた。プールに含まれている種子はホモライン及びヘテロラインが混ざった状態である。本来は Hygromycin (Hyg)耐性遺伝子を保持するが、変異体によっては Hyg 耐性遺伝子がサイレンシング状態にある。

変異体の探索には1プール当たり50粒種子を取り出し、2-2-1項の種子の滅菌方法に従って種子を滅菌し、10 μ M NJ15を含む1/2MS育成培地に蒔いた。暗所4°Cで3日間低温処理を行った後、連続光下のバイオトロンでプレートを4時間静置した後、暗所22°C条件下でプレートを平置きして4日間生育させた。明所にて、重力応答が見られた植物個体を、7 μ M NJ15を含む1/2MS育成培地の2号角シャーレ(EIKEN)に移し替え、暗所下でプレートを縦置きにてさらに24時間生育させた。その後、胚軸伸長と重力応答が確認できた個体をさらに化合物を含まない1/2MS育成培地に移し変えて、連続光下のバイオトロンで生育させて、次世代の種子を確保した。これらの候補低感受性変異株の次世代種子(In-house T₂)を用いて、NJ15のシロイヌナズナにおける生長阻害の評価方法に従って、NJ15低感受性を再確認した。低感受性を再確認できたFOX変異体株の種子をHygによって個体を選抜し、In-house T₂からホモラインのIn-house T₃を獲得した。

【NJ15 低感受性変異株の導入された cDNA 遺伝子の特定】

複数株の NJ15 低感受性変異体 In-house T₂ から Genomic DNA Extraction Kit Mini (Plant) (RBC Bioscience, New Taipei City, Taiwan)を用いてゲノム DNA を抽出した。それぞれの変異体株に導入された cDNA 遺伝子の特定は FOX primer_F: (5' - GGAAGTTCATTTATTCGAGAC -3')及び FOX primer_R: (5' -GGCAACAGGA TTCAATCTTAAG -3')を用いて PCR 反応を行なった後、塩基配列を解析して特定した。なお、PCR 反応の条件は TaKaRa ExTaq® (TAKARA BIO, Japan)のプロトコールに従って実施した。

【シロイヌナズナ胚軸の長さ及び重力応答角度の測定】

胚軸の長さの測定は、シャーレの裏側からスキャナーで画像を取得した。その後画像解析ソフト ImageJ (フリーソフト)を用いて、画像より測定を行った。

2-2-2 NJ15 低感受性変異体の既存制御剤に対する応答

(1) NJ15 低感受性変異株の既存阻害剤に対する感受性の評価

ホルモン IAA、BL 及び BR 生合成阻害剤 Brz の場合、2-2-1 項の種子の滅菌方法に従って種子を滅菌し、明記した濃度の化合物を含む 1/2MS 育成培地に蒔いた。暗所 4°C で 3 日間低温処理を行った後、連続光下のバイオトロンでプレートを 4 時間静置した後、暗所 22°C 条件下でプレートを平置きして 4 日間生育させた。

Ax 受容体阻害剤 Auxinole の場合のみ、2 号角シャーレ(EIKEN)にオートクレーブ済みの 1/2MS 培地および DMSO に溶かした各種薬剤を入れ、滅菌したシロイヌナズナ種子を植えた。サージカルテープでシャーレを密封して、暗所 4°C で 2 日間低温処理を行った後、弱光下(1.5 μ mol/m²・sec)のバイオトロン(22°C、湿度 25%)で

静置した。胚軸伸長の測定実験では7日間シロイヌナズナを育成した。なお、シロイヌナズナ種の滅菌や1/2MSの調製は2-2-1と同様に行った。

(2) NJ15 低感受性変異株のホルモン内生量の測定

【LC/MS/MS 分析用前処理】

シロイヌナズナ野生型株と各低感受性変異体株をいずれも種子を滅菌して、2-1-1 項同様の 1/2MS 育成培地に種子を撒いた後、2 日低温処理した。低温処理からトロンに取り出し、4 時間連続光下のバイオトロンで発芽刺激を与えた後、暗所下 5 日間育成させて植物体を回収した。植物体を抽出液(80%メタノール + 5%ギ酸)とステンレスビーズ存在下、1,500 rpm、30 sec を 3 セットで破碎した(Bi Medical Science、Shake-Master NEO)。サンプルを 4℃、200 rpm で一晩撹拌した。抽出液を遠心(4,000 rpm、2 min、4℃ × 3 回)して回収し、遠心エバポレーター(IWAKI、VEC-310)で濃縮した。粗抽出液を MCX 及び MAX カラム(60mg, 3cc, Waters)で精製した。カラムはメタノールで初期化し、MCX は 5.8 mM ギ酸水溶液で平衡化して、5.8 mM ギ酸水溶液に溶解したサンプルをカラムに乗せ、5.8 mM ギ酸水溶液で洗浄した。MCX のカラムで溶出した液体を遠心エバポレーターで濃縮させ、メタノールに溶解した。続けて 25 mM NH₄HCO₃ 水溶液で平衡化した MAX カラムに。NH₄HCO₃ 水溶液に溶解したサンプルをカラムに乗せ、アセトニトリルで洗浄した。アセトニトリル + 200 mM ギ酸で溶出したサンプルを遠心エバポレーターで濃縮した。

LC/MS/MS 分析

乾固したサンプルをメタノール 50 µL に溶かしたものを LC/MS/MS サンプルとし、そのうち 20 µL を分析に使用した。分析条件を以下に記す。

LC/MS/MS 型式: TQ Xevo (Waters)

カラム: ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 µm (Waters)

カラム温度: 40℃; 流速: 0.2 mL/min

移動相[溶媒 A(0.1%ギ酸水溶液), 溶媒 B(0.1%ギ酸メタノール)] 0 min, 溶媒 A 80% 溶媒 B 20% → 2 min, 溶媒 A 40% 溶媒 B 60% → 9~14 min, 溶媒 A 0% 溶媒 B 100% → 14.1~17.5 min, 溶媒 A 80% 溶媒 B 20%; キャピラリー電圧: 2.00 keV; デゾルベーション温度: 400℃;

Cone ガス流量: 50 L/h; デゾルベーションガス流量: 550 L/h

データ解析: Waters MassLynx V4.1 SCN714。

MRM 条件

以下の MRM に沿って、イオンを検出した。

	Parent ion (m/z)	Daughter ion (m/z)	Dwell(s)	Cone(V)	Collision(V)
13C0-IAA	176.17	130.12	0.07	20	16
13C6-IAA	182.16	136.12	0.07	18	20

D ₀ -SA	137	93	0.142	24	24
D ₄ -SA	141	97	0.142	24	24
D ₀ -JA	209.23	59.04	0.142	28	14
D ₅ -JA	213.3	61.05	0.142	28	14
¹³ C ₀ -ABA	263.2	153.03	0.142	22	14
¹³ C ₂ -ABA	265.2	153.05	0.142	24	12

2-3 NJ15 低感受性変異株の網羅的な遺伝子発現解析

(1) NJ15 低感受性変異株の育成及びサンプル調整

シロイヌナズナ野生型株と各低感受性変異体株をいずれも種子を滅菌して、2 号角シャーレ(EIKEN)に滅菌した 2-1-1 項同様の 1/2MS 育成培地を作製して種子を蒔いた後、2 日低温処理した。低温処理からトロンに取り出し、4 時間連続光下のバイオトロンで発芽刺激を与えた後、暗所下 4 日間育成させた。続いて暗所下で、最終濃度 10 μ M NJ15 及びコントロールとして同量の DMSO 水溶液を植物体に噴霧し、角シャーレを 90° 回転させて 3 時間静置した。3 時間後に暗所下で植物体を回収して、液体窒素で凍らせた。約 50 個体のシロイヌナズナを 1 サンプルとし、試験区ごとに 3 サンプルを調整した。RNA 抽出は RBC Bioscience 社の Total RNA Extraction Kit Mini(Plant) を用いて行った。あらかじめ液体窒素で冷却したサンプルをジルコニアビーズの入ったチューブに入れて Shake Master Neo (Bio Medical Science 社)を用いて粉末状に破碎した。これに RB buffer 500 μ L と 2-メルカプトエタノール 5 μ L を加え混合し、室温で 5 分以上インキュベートした。フィルターカラムに溶液を入れ 13000 rpm で 2 分遠心、上清液を分取した。上清液の半量のエタノールを加え転倒混和し、溶液を RB カラムに入れ 13000 rpm で 2 分遠心してカラムに結合させた。その後 W1 buffer を 400 μ L 加え廃液を捨て Wash buffer を 600 μ L 加え 13000 rpm で 1 分遠心、廃液を捨てることでカラムを洗浄し、カラムを乾燥させるために 13000 rpm で 3 分間遠心した。乾燥したカラムに RNase-free Water を 50 μ L 加え、3 分間室温で静置した後、13000 rpm で 1 分遠心し、RNA 抽出液を得た。

(2) NJ15 低感受性変異株を対象とした RNA-seq の実施】

RNA-seq 解析に供する Total RNA は Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, USA)を用いて、純度を評価した。サンプルごとに 2 μ g の Total RNA を用いて、それぞれのライブラリーを TruSeq RNA and TruSeq DNA Sample Prep kits (Illumina, USA)を使用して製品プロトコール通りに作製した。作製したライブラリーの品質を Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, USA)で確認した後、Illumina HiSeqTM 2000 Sequencer (paired-end sequencing, 100 bp)にてシーケンスを実施した。発現変動遺伝子の解析は R package EdgeR version 3.18.1 (Robinson et al., 2010)を用いた。Benjamin-Hochberg false discovery rates (FDR)は遺伝子ごとで計算し、WT 対各低感受性ライン間 (B: [WT]mock/[f342]mock; C: [WT]mock/[f207]mock; D: [WT]mock/[f127]mock)計 3 区、及び WT の

mock 処理対 NJ15 処理(A: [WT]mock/[WT]NJ15)の DEGs を検出した。各生合成・代謝経路の DEGs の可視化は TAIR データベースより得られた Gene Ontology (GO) annotation に基づいて R package goProfiles を用いて行なった。

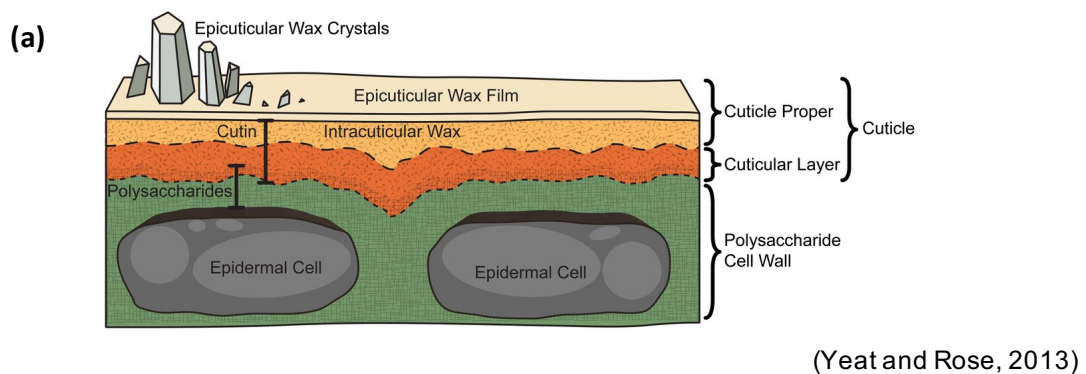
第3章 クチクラ異常に起因する NJ15 低感受性

3-1 諸言

3-1-1 クチクラの構造とその形成過程

植物は約 4 億 5 千万年前から陸上で生育するようになり、その進化に大きく貢献したものとして細胞壁表層を覆う疎水性の膜、すなわち Cuticle(クチクラ層)の発達がある。クチクラ層は植物体からの水分蒸散を防ぎ、ほとんどの陸上植物の地上部表層に存在する。クチクラの主要成分は、クチンと呼ばれる薄い網状で不溶性の、水酸化超長鎖脂肪酸ポリマーである。また、脂溶性クチクラワックスと混在し、細胞表層最外部に局在するワックスは Epicuticular wax film と称され、クチンポリマーと混ざり局在するワックスは Intracuticular wax と呼ばれて区別されている(図 3-1(a))。クチクラ層は構成成分の違いにより 2 つに区分され、ワックスがより多く混在する外側の層を Cuticle proper、逆に比率としてワックスが少なく、細胞壁に接して多糖類と混在する部分を Cuticular layer とそれぞれ呼ばれている。細胞壁に近い部分では細胞壁成分のペクチンが多く、クチンポリマーを細胞表面に固定する役割を持つと考えられている(Fich et al., 2016)。

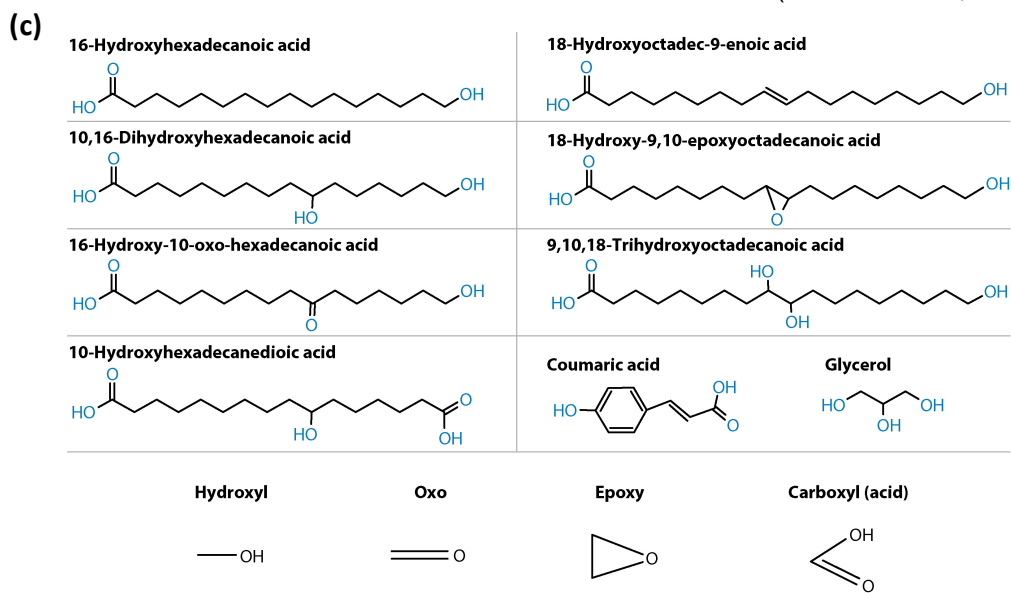
クチクラワックスは、炭素数 24 個 (C24) 以上の炭素鎖を持つ超長鎖脂肪酸のエステル結合、及び超長鎖脂肪酸から生合成されるアルコール体や、ケトン体などから構成されている(Yeat and Rose, 2013)(図 3-1(b))。一方、クチンポリマーは水酸化や、あるいは酸化を受けた C16 または C18 の長鎖脂肪酸単体類であるクチンモノマー(図 3-1(c))が、エステル結合により重合して構成されている。植物種や器官に拠り、クチクラを構成するクチンモノマーの成分は異なることが知られている。例えば本論文において解析対象としているシロイヌナズナにおいて、葉および茎に存在するクチンモノマーの約 7 割が α -dicarboxyl acid か ω -dicarboxyl acid であるのに対し、花では約 5 割が 10,16-dihydroxyl acid、3 割が α -dicarboxyl acid または ω -dicarboxyl acid との報告がある(Li-Beisson et al., 2010)。このように植物種や器官ごとに、どのような要因がクチンモノマーの構成成分を決定しているかについては詳細が分かっていない。他方、クチンポリマーを構成する多くの種類から成るクチンモノマーの役割は明らかになっており(Fich et al., 2016)、例えば末端水酸基(ω -OH)を持つクチンモノマーは、直線のポリマーを作ることに寄与し、炭素鎖中に水酸基を持つクチンモノマーは樹状ポリマーの構成に寄与する。また、ジカルボン酸を分子内に持つクチンモノマーは、ポリマー間のクロスリンクを形成する役割を持つと考えられている。クチンポリマーの構造については未解明な部分が多いが、シロイヌナズナを用いた遺伝学的な研究からクチンモノマーの生合成、輸送、重合化については明らかになりつつある(図 3-2)。ここでは以降に述べる本論文に関係する生合成にのみ触れる。クチンモノマーの生合成は、プラスチック由来の C16 脂肪酸や C18 脂肪酸を出発原料として小胞体で行われる。初発段階は、Long-chain



(b)

Class of acyl lipid cuticular wax	Generic structure
Fatty acid	
Aldehyde	
Primary alcohol	
Secondary alcohol	
Alkane	
Ketone	
Wax ester	

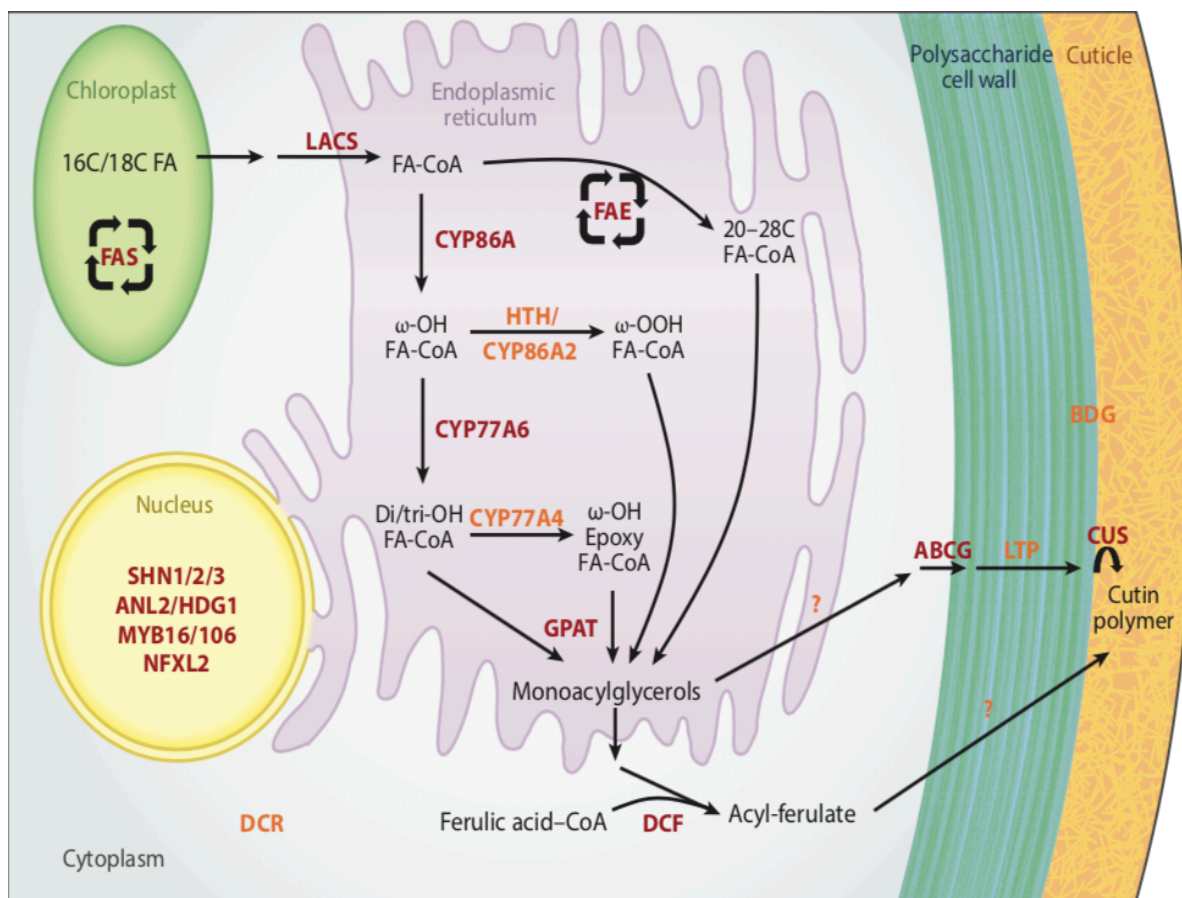
(Yeat and Rose, 2013)



(Fish et al., 2016)

図3-1 クチクラの構造と構成分子

- (a) クチクラ層を含む植物の表面構造図
 (b) 一般的なクチクラワックス分子と構造
 (c) 一般的なクチンモノマー分子と構造



(Fish et al., 2016)

図3-2 クチクラの生合成及び輸送

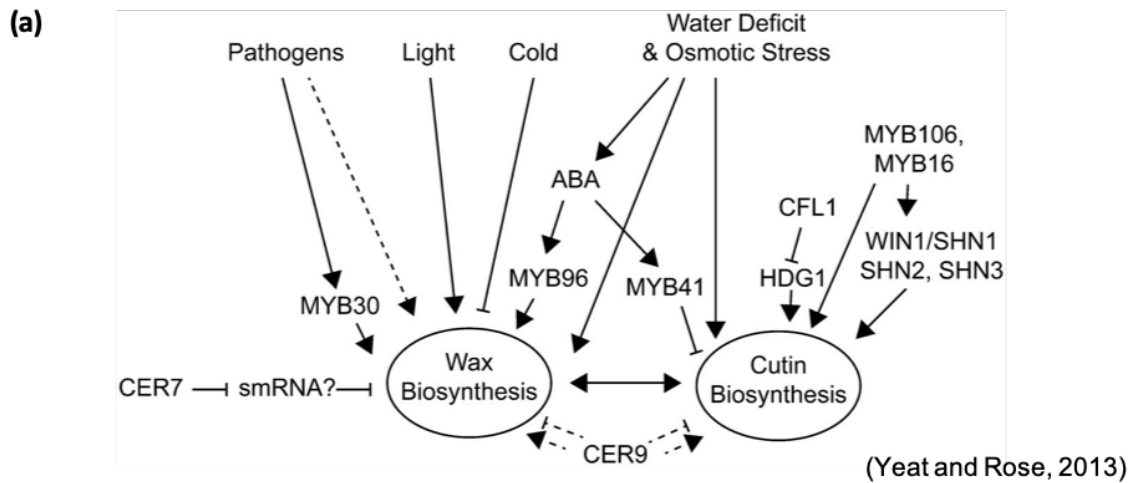
クチンモノマーの生合成はプラスチド由来のC16、C18脂肪酸を出発物として小胞体で行われる。最初はLong-chain acyl-CoA synthase (LACS)酵素による脂肪酸とCoAのエステル反応と考えられている。CoAが付いた脂肪酸は複数のCytochrome P450 酵素による酸化反応を受ける。特に、脂肪酸末端(ω -位)の水酸化やカルボニル化はCYP86Aファミリー、その後の炭素鎖内(midchain)の水酸基はCYP77Aファミリーがそれぞれ関与している。末端に水酸化が付いた脂肪酸はさらに酸化を受けてジカルボン酸型の脂肪酸になる(ω -OOH FA-CoA)。一方、脂肪酸midchainの水酸化はCYP77A6酵素、脂肪酸midchainのエポキシ化はCYP77A4が触媒する。水酸化などの修飾を受けた脂肪酸は最終的にGlycerol-3-phosphate transferase(GPAT)によってグリセロール3-リン酸と反応してモノアシルグリセロールとなる。

クチンモノマーの輸送はABCトランスポーターABCG11、ABCG13、ABCG32 などが関与する他、重合化にはBODYGUARD (BDG) 及びDEFECTIVE IN CUTICULAR RIDGES(DCR) が関わっていることが示唆されている。

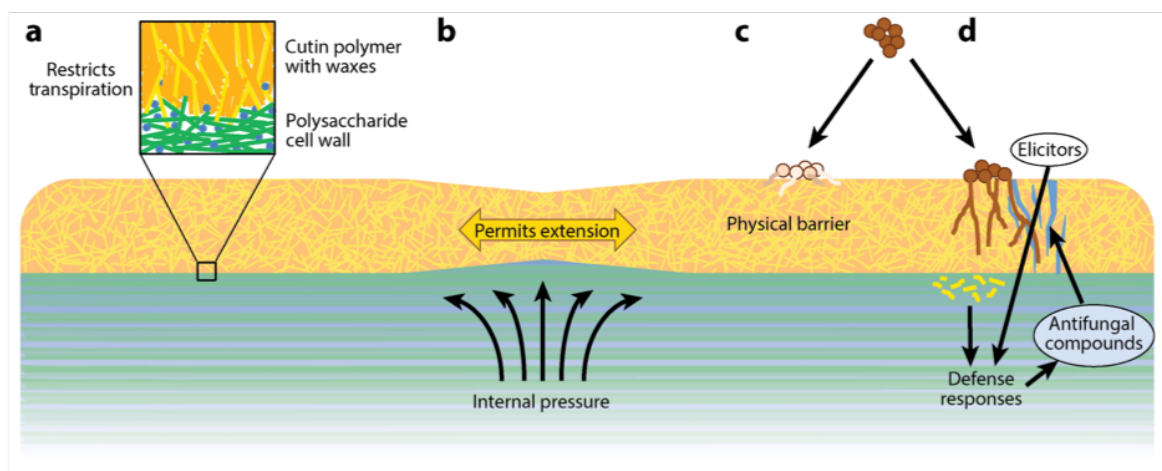
acyl-CoA synthase (LACS) 酵素による脂肪酸と CoA とのエステル反応と考えられている。シロイヌナズナは 9 個の *LACS* 遺伝子を持ち、クチンとワックスの生合成に関与するのは *LACS1* と *LACS2* で、互いの機能は一部重複している (Lü et al., 2009)。その後、脂肪酸 CoA エステルは複数の Cytochrome P450 酵素により酸化を受ける。特に、脂肪酸末端部への ω -水酸化反応やカルボニル化反応は CYP86A ファミリーが、炭素鎖内 (midchain) の水酸化反応は CYP77A ファミリーが関与するとの報告がある (Li-Beisson et al., 2009)。CYP86A ファミリーに関する 2 種の変異体 *cyp86a2*、*cyp86a8* ではクチクラ層の異常が観察されており、他方、変異体 *cyp86a4* ではクチクラ異常は観察されないものの、クチンモノマーの組成変化、及び ω -OH C16 の減少変化が報告されている。末端に水酸化が導入された脂肪酸は、さらに酸化を受けてジカルボン酸型の脂肪酸になるが、これには CYP82A2 及び HOTHED タンパク質らの関与が示唆されている (Kurdyukov et al., 2006)。脂肪酸 midchain の水酸化反応には CYP77A6 酵素が働き (Li-Beisson et al., 2009)、*in vitro* 試験ながら CYP77A4 が脂肪酸 midchain のエポキシ化反応を行うとの報告もある (Sauveplane et al., 2009)。水酸化等の修飾を受けた脂肪酸は、最終的に Glycerol-3-phosphate transferase (GPAT) によりグリセロール 3-リン酸と反応してモノアシルグリセロールとなる (Li et al., 2007)。シロイヌナズナでは GPAT4、GPAT8 が重複した機能を持ち、葉及び茎でのクチン生合成に関与している (Li-Beisson et al., 2009)。

クチンポリマーは細胞壁の外側で形成されるため、クチンモノマーの輸送と細胞壁外側での重合が必要だが、これに関する報告は少ない。シロイヌナズナではモノアシルグリセロールクチンが 3 つの ABC トランスポーター (ABCG11、ABCG13、ABCG32) により細胞外に運ばれるとの報告がある (Bird et al., 2007; Panikashvili et al., 2011; Bessire et al., 2011)。他方、クチンモノマーの重合反応に関わる酵素は、最初にトマトのクチン変異体 *Cutin deficient1 (cd1)* で発見され (Yeats et al., 2012)、GDSL-motif リパーゼ/エステラーゼのスーパーファミリーに属することが判明しているが、シロイヌナズナに関しては同様の機能を持つ酵素が見つからない。それとは異なり、シロイヌナズナでは 2 つの酵素 BODYGUARD (BDG) 及び DEFECTIVE IN CUTICULAR RIDGES (DCR) が、クチンポリマーの重合反応に関与することが示唆されている (Kurdyukov et al., 2006; Panikashvili et al., 2009)。しかし、これらの酵素の局在部位や関連変異体に関するクチンモノマー量の解析などは十分とは言えず、検証が待たれる状況にある。

ところで、クチンやワックスの生合成過程に対する制御として、MYB ファミリー転写因子など複数の転写因子の関与が報告されている (Yeat and Rose, 2013) (図 3-3(a))。ただし、これら多くの転写因子は、直接クチクラ成分の生合成過程を調節しているのか、そうではなくて別の遺伝子の発現制御を担うもので、間接的にクチクラ成分の生合成過程を調節するものであるかは結論が待たれる。そうした状況の中で、シロイヌナズナにおいては APETALA2 (AP2) 転写因子ファミリーに属する WIN1/SHN1 が唯一、クチン生合成遺伝子のプロモーター領域に直接結合するとの報告



(b)



(Fish et al., 2016)

図3-3 クチクラ生合成の制御因子およびクチクラ層の生理機能

(a) 環境ストレス応答に伴うクチクラ生合成を制御する転写因子。

(b) クチクラ層の生理機能は植物体表面の水分蒸発を防ぎ、細胞成長や器官形成の正常化、病原菌の侵入を防ぐほか、遊離したクチンモノマーは病害抵抗性の誘導シグナル分子として働くなどが挙げられる。

がある(Kannangara et al., 2007)。そのほかに、無生物ストレス応答抑制因子 NFX1-LIKE2 (NFXL2) に変異を持つシロイヌナズナ *nfx/2* 変異体においてはいずれも前出の *WIN1/SHN1* 遺伝子や *BDG* 遺伝子の発現が誘導されるなど、ストレスに応答してクチクラ生合成過程が促進される点が報告されている(Lisso et al., 2012)。

3-1-2 クチクラ層の生理機能

クチクラ層が植物個体に果たす重要な役割として、第一に挙げられる点は植物表面の水分蒸散を防ぐことである(図 3-3(b))。このクチクラ層の疎水機能にはクチンモノマーの量が重要なのではなく、クチンモノマーが正しくクチンポリマー構造をとることが重要とされる。これはクチンポリマーがワックス層の足場、そして表層の連続性を維持する機能を果たすと考えられているからである(Fich et al., 2016)。このため、クチクラ層に異常を持つ変異体は、表面の水分蒸発が多くなり乾燥ストレスに弱い。加えて、外側からの水分透過性も向上する。この性質を利用して、クチクラ層観察の際にクチクラ異常を簡便に検出する手法として、クチクラ層の水分透過性を調べる Toluidine Blue(TB) 染色が知られる(Tanaka et al., 2004)。クチクラ層に異常がある場合、外部から水分が植物中へ入りやすくなるため、TB が流入し、組織が赤紫色に染まる。

第二点のクチクラ層の役割は、植物の器官形成である。細胞壁とは異なる表層構造と理解されることが多いが、実際は細胞壁と物理的に接し相互作用しており、細胞壁と重複した生理機能を持つ。クチクラ層は細胞表面最外層に位置し、細胞が膨張する際は最も力が強くかかる。そのため、クチクラ層は細胞の伸縮に対応しやすくするため剛性・伸縮性・可塑性の維持が欠かせない。また、クチクラ層の成分のうち、特にクチンポリマーは器官形成の際に器官同士の不必要な癒着を防ぐ役割を持ち、それを裏付けるように多くのクチン異常変異体において、器官癒着異常が観察されている(Li-Beisson et al., 2009)。

また、第三点として、クチクラ層は植物の自己防御にも大きく関わることが知られている。例えば、果実のクチクラ層が病原体の侵入を物理的に防ぐことは想像に難くない。他方、多くの研究からシロイヌナズナのクチン変異体の多くが WT と比較して一部の病害菌や糸状菌 *B. cinerea* により高い抵抗性を持つ傾向が示されている。これについては、クチン異常に伴い透過性が向上し、菌体からの攻撃の防御機構発現の端緒となる成分が植物表層により届きやすく変化したためと理解されている。あるいは、クチン異常に伴いクチクラ層の成分が遊離し易く、通常よりも早期にその変化を感知できることが病害抵抗性向上の原因という考え方も提示されている(Ziv et al., 2018)。

以上 3 点触れたとおり、クチクラ層は植物の成長および環境応答に重要な機能を持つ。クチクラ成分の生合成誘導は生物的・無生物的なストレス応答機構に含まれるとして、植物ホルモンの ABA や JA がその調節に関わるとの報告がある(Ziv et al., 2018)。一方、クチクラ異常変異体は多様

な形態的变化を示すことから (Kurdyukov et al., 2006; Panikashvili et al., 2009)、クチクラ層の生合成や形成に対して、未解明なホルモン制御機構が存在することも想定される。前章において NJ15 低感受性変異体の解析を進める中で、3 種の変異体いずれもがクチクラ形成過程の成分変動を生じている可能性を提示した。本章では、NJ15 の作用標的がクチクラ層である可能性の検証、また、シロイヌナズナの細胞伸長および重力応答にクチクラ層がどのように関与するか検証すべく、各変異体が NJ15 低感受性を引き起こす原因の解明や、クチクラ形成過程に対する NJ15 の投与効果を解析した。以下、詳述する。

3-2 変異体 *f127* の NJ15 低感受性をもたらす原因の究明

前章で選抜した NJ15 低感受性変異体について、それぞれ意図的に導入された強制発現遺伝子の NJ15 低感受性への関与を確認するため、新たに該当遺伝子の過剰発現体を作製した。そのうち、*f127*に関する強制発現対象の遺伝子 *At4g11100* 過剰発現変異体 (*f127-0X* ; T₃) については独立した複数ラインを取得した。これら *f127-0X* 変異体はいずれも WT と比較して、*At4g11100* が 5~10 倍程度に多く発現していることを把握した(図 3-4(a))。ところが、それらの NJ15 感受性を調べたところ、いずれのラインとも NJ15 の胚軸伸長阻害効果や重力応答阻害効果に対して低感受性を示さなかった(図 3-4(b, c))。これらの結果より、*At4g11100* の過剰発現は、NJ15 低感受性の原因ではないと判断した。

ところで、FOX 株は *CaMV 35S* プロモーター発現下に特定の遺伝子を繋げた T-DNA の挿入により作製された強制発現株である。上記のとおり、*f127*において強制発現された遺伝子を過剰発現させても NJ15 低感受性を再現できなかったことから、T-DNA 挿入に伴う遺伝子破損の可能性を考えた。すなわち、TAIL-PCR 法を用いて *f127*における T-DNA 挿入位置の特定を試みた。その結果、*At5g23940* の第 2 エキソンへの挿入であることが判明した(図 3-5(a および b))。加えて、*f127* における *At5g23940* の発現状況を調べたところ、WT と比較して当該遺伝子の発現量は 10%程度まで低下していることが判明した(図 3-5(d))。*At5g23940* は前出(3-1-1 項参照)の DCR をコードしており、DCR がクチン生合成に関与することにもすでに触れた(Panikashvili et al., 2009)。DCR の遺伝子発現低下が NJ15 低感受性と関連するか検証をさらに進めるため、既存の DCR 変異体 *dcr-2* (Panikashvili et al., 2009) を取り寄せ、NJ15 感受性を検証した。その結果、*dcr-2* は *f127* と同様に、NJ15 の胚軸伸長阻害活性および重力応答阻害活性に対する低感受性を示した(図 3-6)。以上の結果から、*f127* の NJ15 低感受性は当初想定した *At4g11100* の過剰発現に起因するものではなく、T-DNA 挿入に伴う *dcr* 遺伝子の破壊であることが示された。

この DCR はクチン生合成経路においてクチンモノマーの重合に関わるとの報告がある(Rani et al., 2010)。DCR の欠損に伴いクチクラ層は形成不全となり、結果としてクチクラ層の水分透過性が上がるほか、器官の癒着や植物の矮化が確認されている(Panikashvili et al., 2009)。次項では、*dcr-2* を比較の対象に据えて、*f127* との類似性についてクチクラの異常性、NJ15 阻害活性に与える影響について検証した結果を述べる。

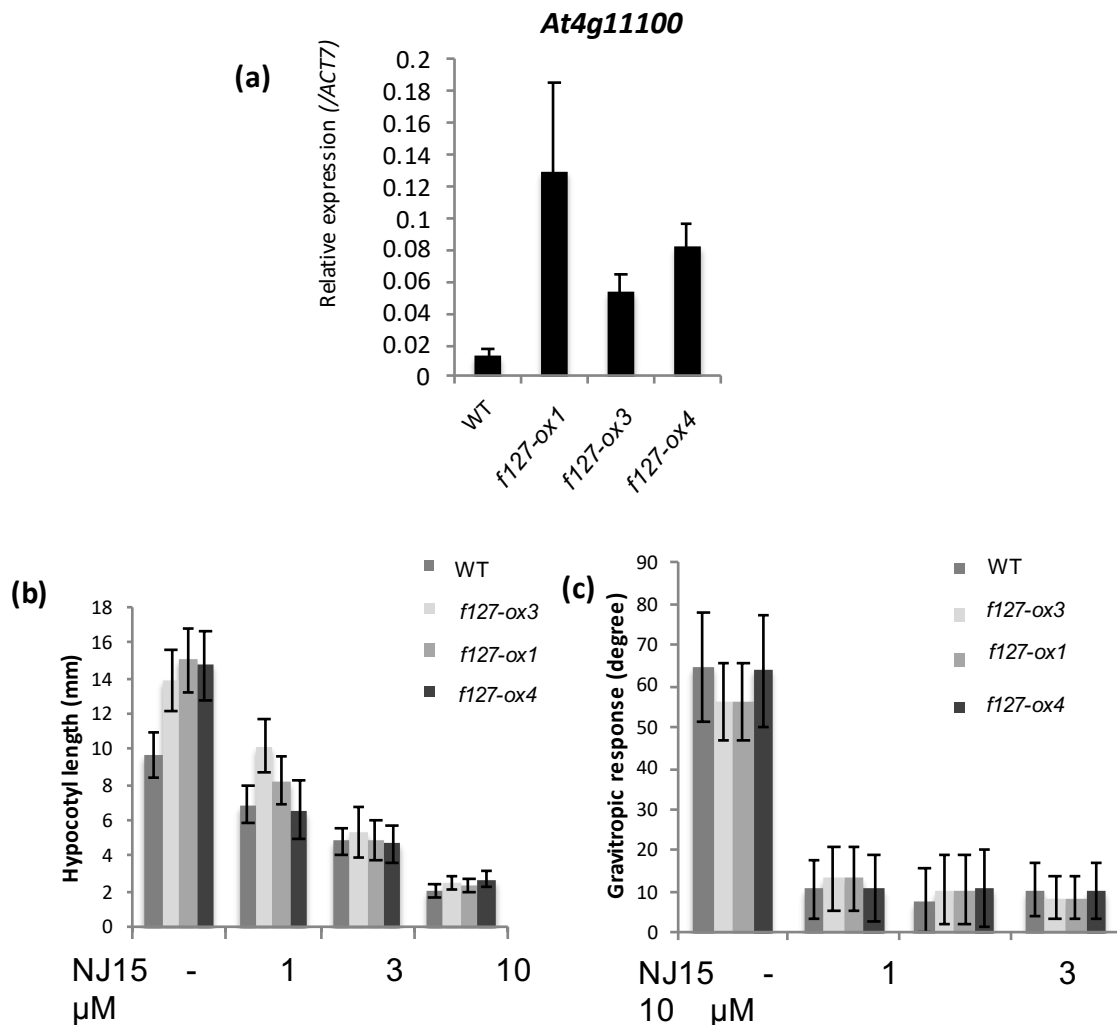


図3-4 *f127* の標的遺伝子過剰発現体の作製及び NJ15 低感受性の検証

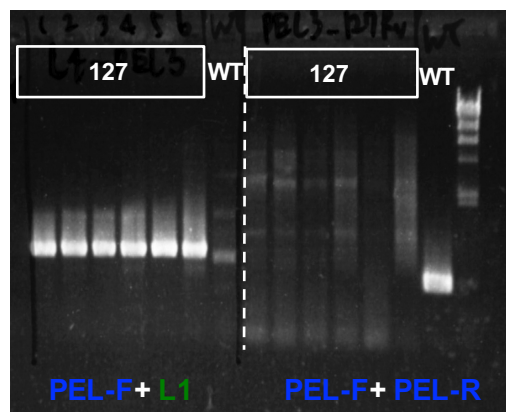
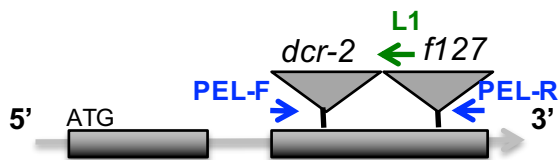
NJ15に低感受性を示したFOXラインである*f127*は *At4g11100*過剰発現株である。新たに*At4g11100*の過剰発現体を作製し、NJ15低感受性への関与を検証した。作製した*At4g11100*の過剰発現体はNJ15へ低感受性を示さないことが判明した。

(a) 作製した各*At4g11100*の過剰発現体の遺伝子発現状況。n = 3、エラーバーは標準偏差を示す。

(b) 各*At4g11100*の過剰発現体種子を滅菌して NJ15 (1, 3, 10 μM) を含む培地に蒔き、3日低温処理後に4時間明所下で発芽刺激を与え、その後縦置きで暗所下5日生育させた際の胚軸長。n = 20、エラーバーは標準偏差を示す。

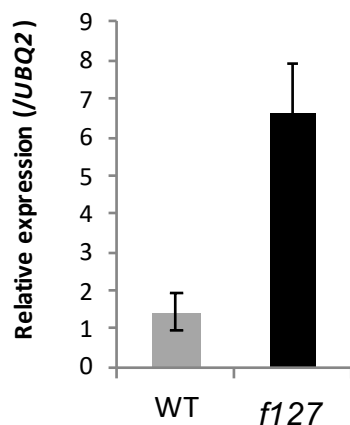
(c) 上と同様な条件を用いて、縦置きで暗所下5日生育させた後、培地プレートを90°回転させて、さらに1日暗所で生育させた際の胚軸の反重力応答の角度。n = 20、エラーバーは標準偏差を示す。

(a) Defective in Cuticular Ridges (DCR) (b) (At5g23940)



(c)

At4g11100



(d)

DCR

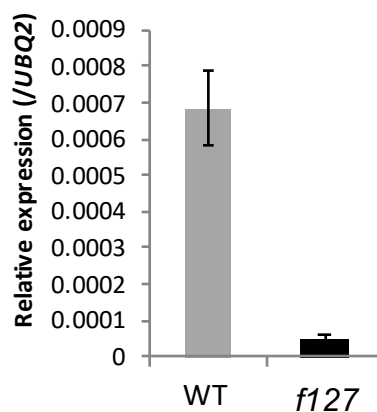


図3-5 TAIL-PCR法による *f127* のT-DNA挿入位置の特定

- (a) TAIL-PCR法により*f127*での T-DNA挿入位置は*At5g23940*の第2 エキソンと特定した。T-DNA挿入位置、既存変異体*dcr-2*のT-DNA挿入位置および使用したプライマーを示す。
- (b) (a)で示したプライマーを用いて*f127*のT-DNA挿入を確認した際の電気泳動写真。
- (c) WTと比べ、*f127*では *At4g11100*が過剰発現されている。
- (d) WTと比べ、*f127*では *At5g23940*(*DCR*) の発現が低下している。

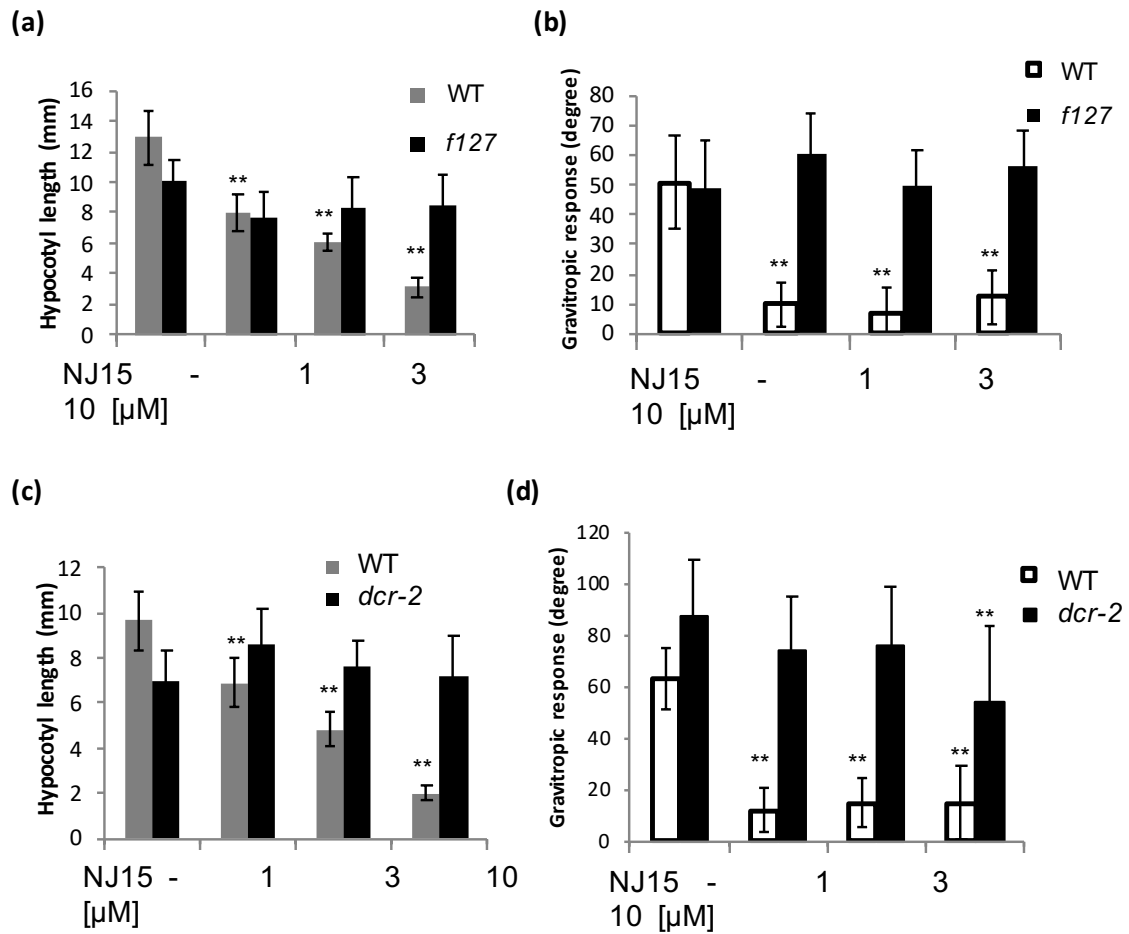


図3-6 既存 *dcr* 変異体の NJ15 低感受性の検証

各種子を滅菌して NJ15 (1, 3, 10 μM) を含む培地に蒔き、3日低温処理後に4時間明所下で発芽刺激を与え、その後縦置きで暗所下5日生育させた際の胚軸長(a), (c) およびさらに1日暗所で生育させた際の胚軸の反重力応答の角度重力(b), (d)を測定した。

*f127*と同様に既存の *dcr-2* 変異体もNJ15低感受性を示した。

n = 20、エラーバーは標準偏差を示す。**: $p < 0.01$; Student's *t*-test。

3-3 クチクラ異常と NJ15 低感受性の関連性の検証

前項で述べたとおり、*f127* の NJ15 低感受性は *dcr* 遺伝子の発現低下が原因と判明した。クチクラ層の異常を伴う *dcr-2* に、*f127* と同様の NJ15 低感受性を認めたことから、クチクラ層の異常が NJ15 低感受性を引き起こしている可能性が示唆された。そこで、*dcr-2* で確認されたクチクラ層異常が *f127* で生じている可能性と、NJ15 投与がクチクラ層形成過程に与える影響、の 2 点を調べる目的で、NJ15 投与が TB 染色結果に与える影響について精査した。NJ15 投与区 (10 μ M) または mock 投与区 (DMSO) を設定し、各シロイヌナズナを暗所下で 4 日生育させたものを染色に供した。その結果、(図 3-7(a)) に示すとおり mock 投与区の WT については、胚軸上部の狭い範囲で染色が認められたのに対し、同じ mock 投与区で生育させた *f127* および *dcr-2* は、胚軸全体が染色された。これにより、*f127* は *dcr-2* と同様にクチクラ層に異常が生じている可能性が示された。NJ15 処理区では、WT 胚軸の伸長に著しい阻害が認められるものの、胚軸における染色は認められなかった。すなわち、NJ15 は WT に対してクチクラ層の異常を生じさせるものではないと考えられる。他方、*f127* 及び *dcr-2* は NJ15 投与による胚軸の伸長阻害が認められず、依然として染色される状況に大きな変化は認められなかった(図 3-7(b))。よって、クチクラ層に異常を持つ変異体は NJ15 低感受性を示す傾向を確認したものの、NJ15 が容易に目視で確認できるようなクチクラ層の変化を生じさせたりはしていないことが明らかとなった。

クチクラ層の異常が NJ15 低感受性を常に引き起こすものであるか、さらに情報を集めるため、WT のクチクラ層形成を薬剤を用いて外部投与により阻害した場合でも *f127* や *dcr-2* と同様に NJ15 低感受性を示すか検証した。本章の緒言で述べたように、クチクラ層はクチクラワックスとクチンモノマーで構成される。クチクラワックスには超長鎖脂肪酸、およびそのアルコール体などのエステル結合で構成され、超長鎖脂肪酸の生合成が阻害された場合はクチクラワックスができないためにクチクラ層に異常を来す。超長鎖脂肪酸の生合成阻害剤として Cafenstrole (Caf) が知られており (Trenkamp et al., 2004) (図 3-8(a))、Caf を WT に投与した場合、300 nM で暗所芽生えの胚軸伸長に阻害が認められた(図 3-8(b))。他方、WT 胚軸の重力応答には Caf は影響を与えなかった(図 3-8(c))。この投与条件を用いて TB 染色を行ったところ、胚軸は染色された(図 3-9(e))。続いて Caf と NJ15 の共処理を行った。低濃度 Caf (30 nM) 投与区において NJ15 による胚軸伸長阻害活性が依然認められたが、クチクラ層の異常を認めた 300 nM Caf と NJ15 の共処理区では NJ15 による胚軸伸長阻害活性が有意に弱まった(図 3-8(b))。重力応答についても胚軸と同様に、300 nM Caf と NJ15 の共処理により NJ15 の重力応答阻害活性は弱まった(図 3-8(c))。これに対して、*f127* の Caf 単独処理では WT ほど Caf による胚軸伸長阻害は認められず、WT と同様に重力応答も阻害されなかった。NJ15、Caf 単独処理・共処理を行った WT・*f127* 芽生えを用いて TB

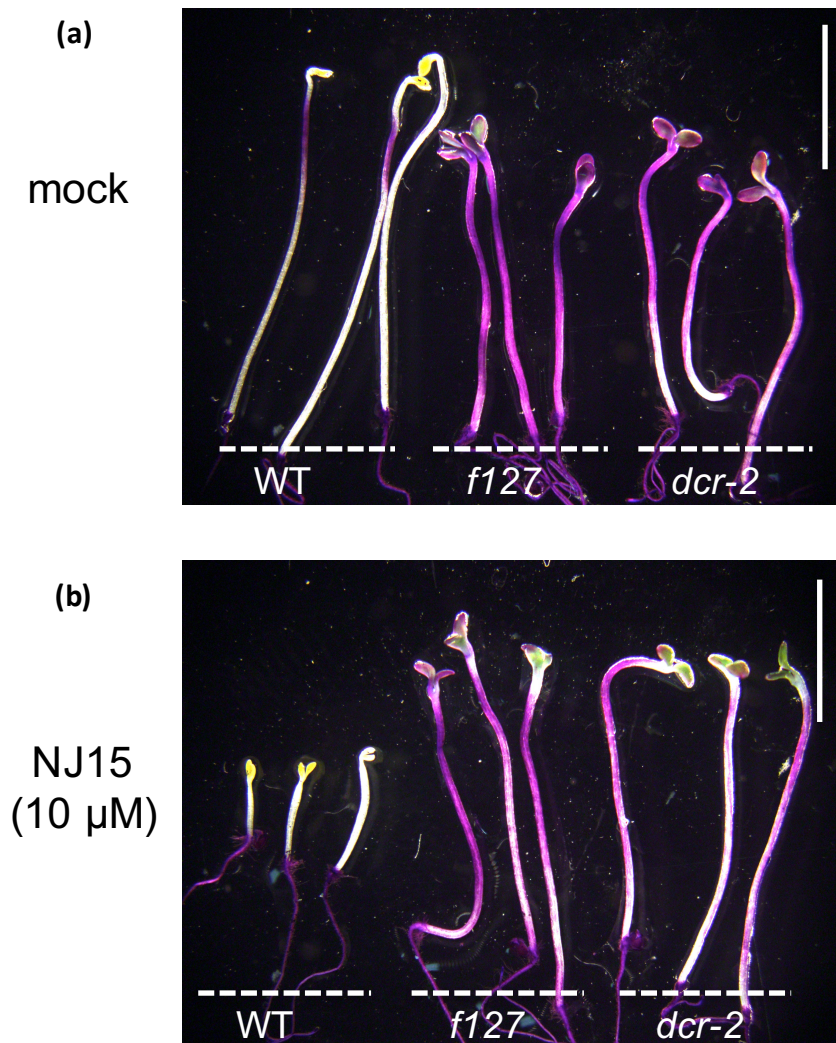
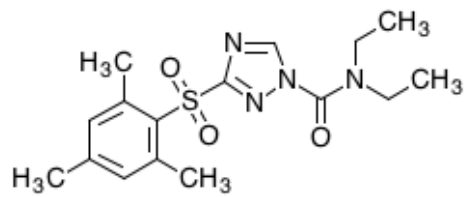


図3-7 *f127* 及び *dcr* 変異体はクチクラ異常を示す

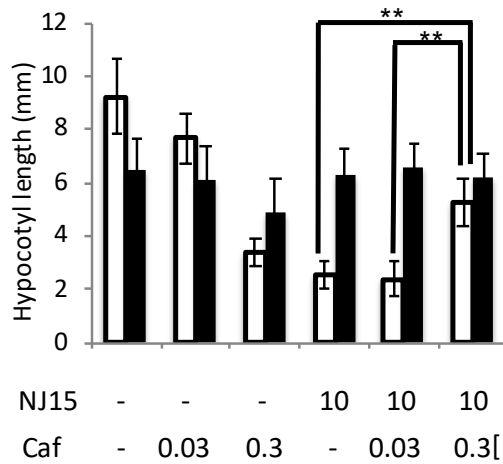
各種子を滅菌して NJ15 (10 μ M) あるいは同量のDMSOを含む培地に蒔き、3日低温処理後に4時間明所下で発芽刺激を与え、その後縦置きで暗所下5日生育させた。クチクラ層の水分透過性を検出するために、植物体を 0.03% TB水溶液に5分浸し、蒸留水で2回洗った後に観察した。Bar = 5 mm。

- (a) 無処理区(DMSO)で生育させた植物体。WTでは胚軸の一部がTBによって赤紫色に染まった。一方、*f127*及び*dcr-2*は胚軸全体でTBに染まった。
- (b) NJ15 処理区で生育させた植物体。WTは胚軸伸長が阻害されてTBによる染色が見られなかった。一方、*f127*及び*dcr-2*は無処理区と同様に胚軸全体でTBに染まった。

(a)



(b)



(c)

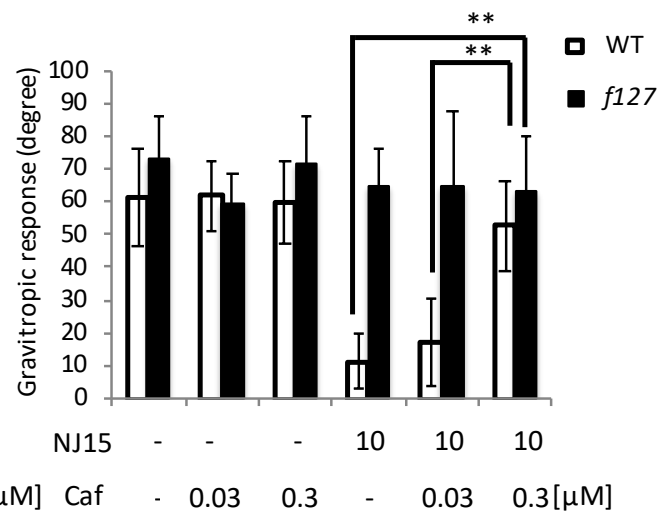


図3-8 超長鎖脂肪酸阻害剤Cafenstroleの共投与によるNJ15阻害効果の回復①

(a) 超長鎖脂肪酸合成阻害剤 Cafenstrole (Caf) の構造式

(b) シロイヌナズナWT及び*f127*をいずれも2日低温処理後、4時間明所下で発芽刺激を与え、明示した化合物を添加した培地上で暗所下4日間育成した際の胚軸長。

(c) 上と同様な条件を用いて、縦置きで暗所下4日生育させた後、培地プレートを90°回転させて、さらに1日暗所で生育させた際の胚軸の反重力応答の角度。 $n = 20$ 、エラーバーは標準偏差を示す。

** : $p < 0.01$; Student's *t*-test.

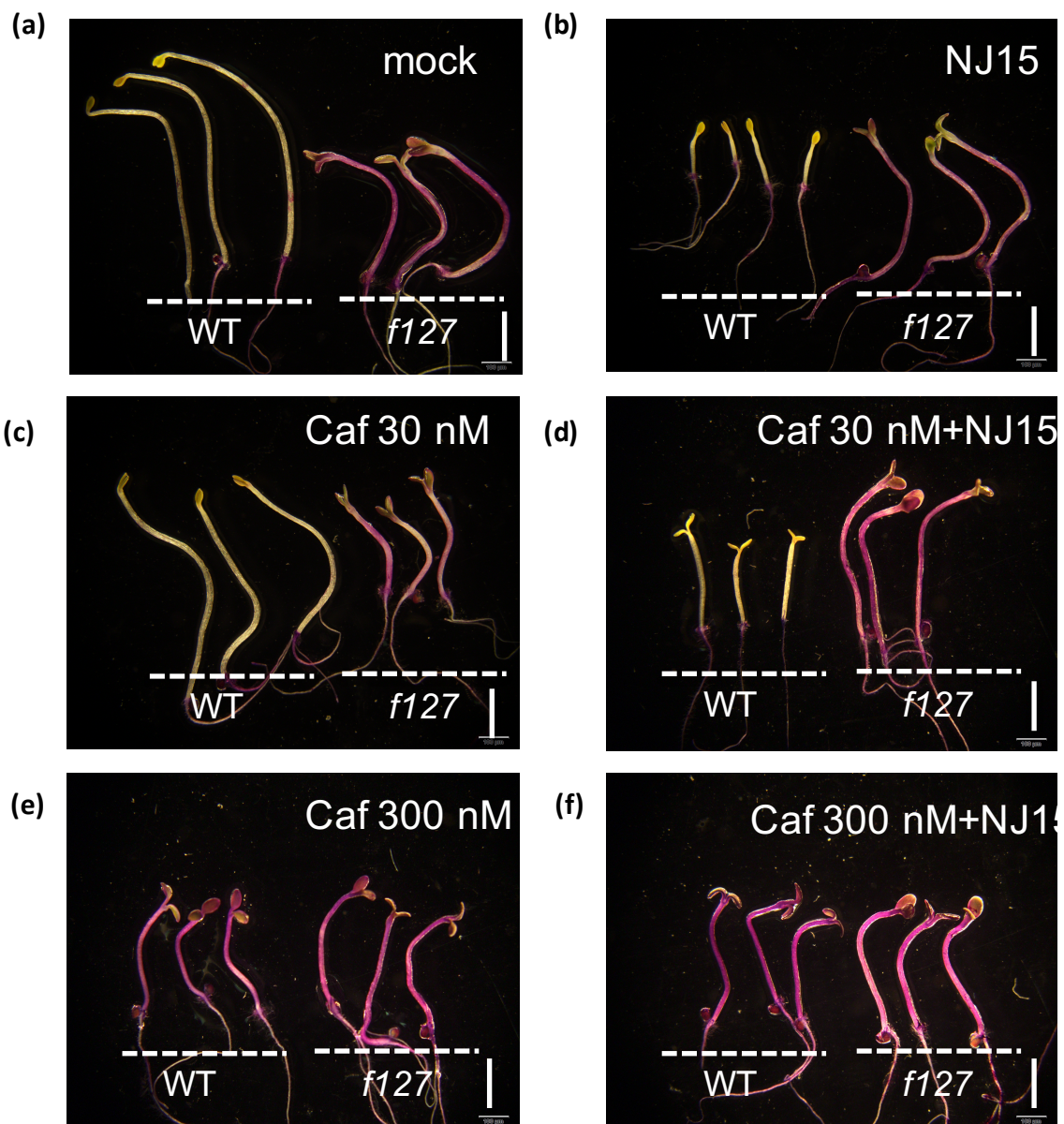


図3-9 超長鎖脂肪酸阻害剤Cafenstroleの共投与によるNJ15
阻害効果の回復② TB染色

(a) 無処理区; (b) NJ15 単独処理区; (c), (e) Caf 単独処理区 ;
(d), (f) Caf とNJ15共処理区

WTの場合、Caf 処理によって超長鎖脂肪酸生合成が阻害されてクチクラワックスが異常になり、f127と同様に TBに染まるようになった。Bar : 1 mm。

染色を行った結果を図 3-9 に示す。300 nM Caf 単独処理により WT 胚軸が染色されることはすでに触れたが、Caf と NJ15 共処理区でも依然として染色された(図 3-9(e-f))。 *f127* については、Caf 及び NJ15 の処理の有無に関わらず染色された(図 3-9(a-f))。以上の結果から、Caf 処理に伴いクチクラ層に異常を来した WT では、NJ15 の胚軸伸長阻害活性・重力応答阻害活性が弱まる傾向があることが判明した。これはすなわち、クチクラ層の異常が NJ15 低感受性を引き起こすことが示されている。また、クチクラ異常を持つ *f127* は Caf 感受性も低下しているほか、WT では Caf と NJ15 共処理により NJ15 あるいは Caf 各単独処理よりも胚軸の伸長阻害状況が低減したことから、NJ15 は Caf の作用が及ぼす経路に作用する可能性も浮上した。

3-4 クチクラ異常及び NJ15 投与に伴う脂肪酸組成変化

3-4-1 暗所芽生え個体の脂肪酸組成に対する NJ15/Caf 投与効果

Caf が引き起こすクチクラ層異常に伴い、NJ15 の持つ胚軸伸長阻害活性および重力応答阻害活性が弱まることから、Caf の標的タンパク質及び経路に NJ15 が作用している可能性を検証する。そのため、二つの化合物が同一標的に対し拮抗的に作用する可能性を考え、はじめに NJ15 および Caf 投与の全脂肪酸組成に与える影響を調べた。その理由として、Caf が超長鎖脂肪酸の生合成阻害剤であることはすでに知られており、NJ15 が超長鎖脂肪酸の生合成に影響を与えるのであれば超長鎖脂肪酸を含む脂肪酸の組成変化において Caf 投与時と反対の変化を与えているのではないかという考えに基づくものである。

クチンやワックスの原料として炭素鎖 16~26 個の脂肪酸 (C16~C26) を対象に、当該化合物の処理・対照処理を行った暗所芽生え植物体から脂肪酸の抽出を行い、GC-MS を用いて分析した。その結果を図 3-10 に示す。これによると WT では、NJ15 および Caf 単独処理により長鎖脂肪酸 (C16~C18) 量が増加した (図 3-10 (a-f))。しかし、単独処理と比べて長鎖脂肪酸量は NJ15-Caf 共処理により大きな変化が認められなかった。一方、WT における超長鎖脂肪酸 (C24、C26) 量は、Caf 単独処理により減少した (図 3-10 (h-i))。これは既報通り Caf が超長鎖脂肪酸の生合成を阻害した結果と考えられる。対して、NJ15 単独処理で超長鎖脂肪酸量には変化が認められなかったが、NJ15-Caf 共処理では Caf 単独処理よりも超長鎖脂肪酸量の減少が抑えられる傾向が確認された。この結果から、NJ15 は超長鎖脂肪酸生合成に直接影響を与えておらず、Caf とは異なる作用を持つと判断した。

WT と同様な条件で *dcr* 変異体である *f127* についても全脂肪酸組成の分析を行った。その結果、対照処理において WT よりも *f127* では C16~C26 すべての脂肪酸量が多く検出された。また、*f127* の Caf 単独処理区では、WT と同様に長鎖脂肪酸 (C16~C18) 量の増加傾向を確認し、超長鎖脂肪酸 (C24、C26) 量が Caf 処理で減少した (図 3-10 ; 黒棒グラフ)。 *f127* に NJ15 を単独処理した場合は対照処理と比べて全ての脂肪酸の量的変化が認められなかった。Caf 単独処理の効果が依然として *f127* でも認められたことから、*dcr* 変異による脂肪酸量の変化は Caf の作用部位よりも上流、または異なる経路にも影響を及ぼしていることが示唆された。また、Caf と異なって WT への NJ15 処理したことによって超長鎖脂肪酸の量が減少しなかったことから、超長鎖脂肪酸の生合成経路ではなく、DCR が存在する経路上に NJ15 の標的が存在すると考えられる (図 3-11)。

3-4-2 候補変異体 *f342* の NJ15 低感受性の原因遺伝子の特定

3-4-1 項の結果により、DCR が働く経路上に NJ15 の標的が存在する可能性が示唆されたが、もう一つの NJ15 低感受性変異体である *f342* の解析によってもその可能性が示唆された。これま

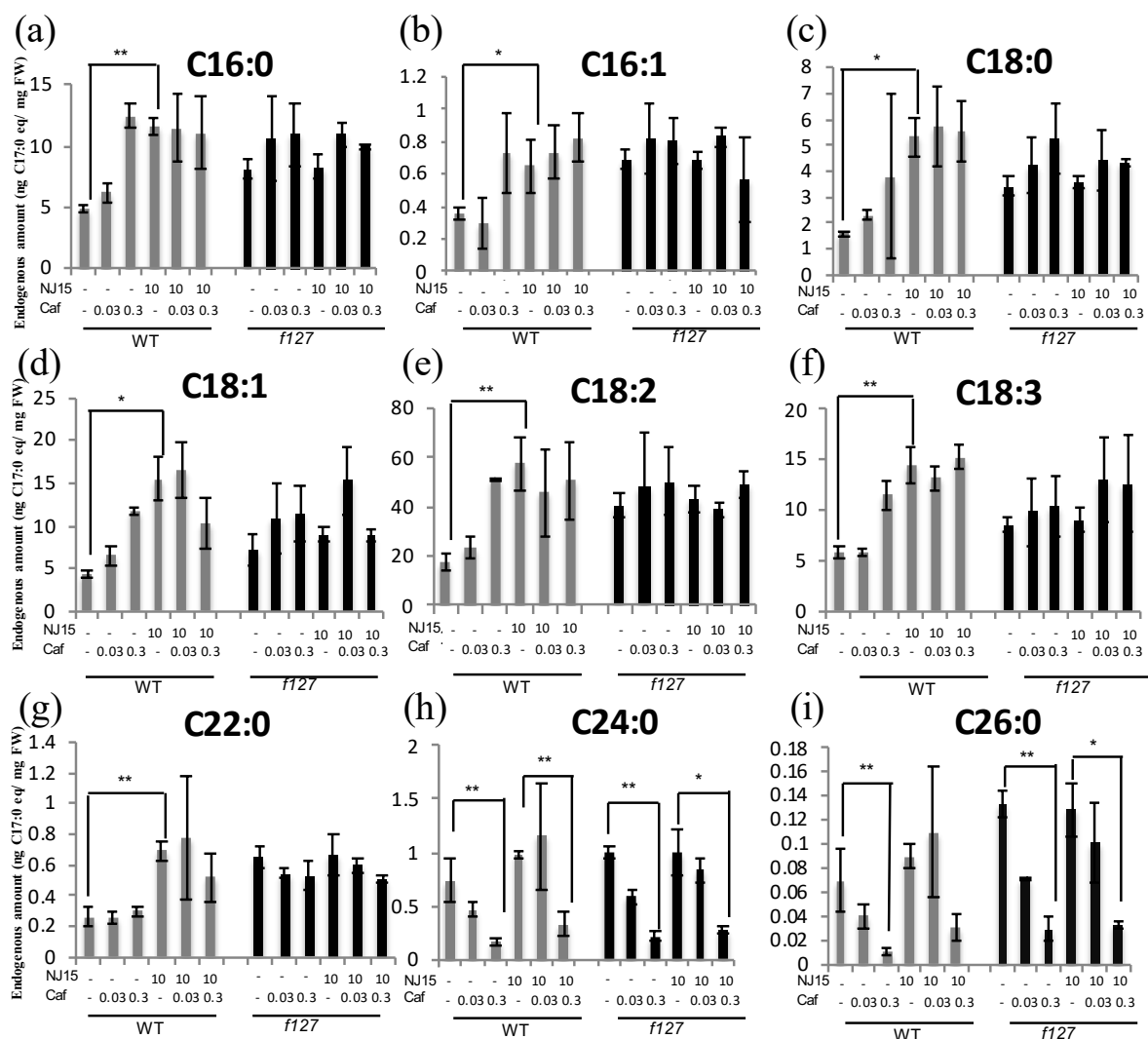


図3-10 NJ15及びCafの投与がシロイヌナズナの全脂肪酸量に与える効果

WT及び*f127*をいずれも2日低温処理後、4時間明所下で発芽刺激を与え、明示した化合物を添加した培地上で暗所下4日間生育させて採集した。1サンプル当たり約150個体を集め、全脂肪酸抽出およびGC-MSによる分析に供した。n = 3。エラーバーは標準偏差を示す。* : $0.01 < p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; Student's *t*-test。

(a) Palmitic acid (C16:0), (b) palmitoleic acid (C16:1), (c) stearic acid (C18:0), (d) oleic acid (C18:1), (e) linoleic acid (C18:2), (f) alpha-linolenic acid (C18:3), (g) behenic acid (C22:0), (h) lignoceric acid (C24:0), and (i) cerotic acid (C26:0).

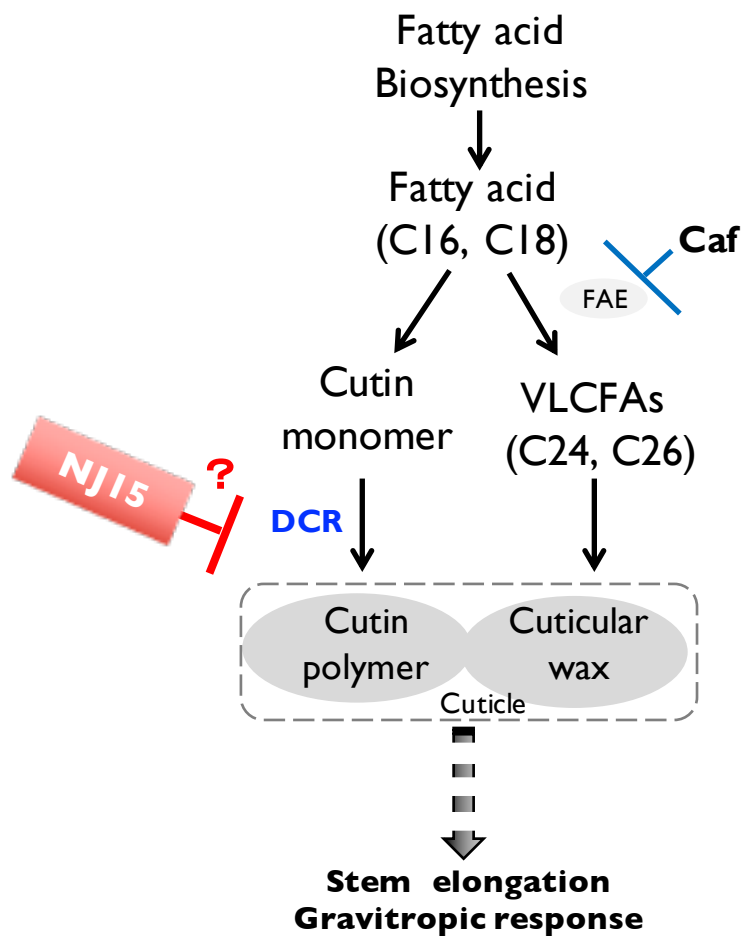


図3-11 クチクラ生合成経路における NJ15 作用周辺の予想図

で展開してきた *f127* の解析と並行して、同じく NJ15 低感受性を示すことで選抜した変異体 *f342* についても強制発現遺伝子 *At3g51430* に関する過剰発現体を作製した。ところが、結果を省くが、*f127* の場合と同様に *At3g51430* 過剰発現体は NJ15 低感受性を示さなかった。そこで TAIL-PCR 法を用いて、*f342* における T-DNA 挿入位置を特定したところ、図 3-12 (b) に示すように *At5g04660* プロモーター領域への挿入と判明した。*At5g04660* は CYP77A4 酵素 (図 3-2 参照) をコードしており、qRT-PCR で確認の結果、*f342* における *CYP77A4* の発現量低下を把握した (図 3-12 (c))。既存の *cyp77a4* 変異体を入手して NJ15 に対する感受性を調べたところ、*f342* と同様に NJ15 の胚軸伸長阻害活性および重力応答阻害活性に対する低感受性を確認した (図 3-12 (d-e))。CYP77A4 はクチンモノマーの生合成に関与しており、脂肪酸 midchain のエポキシ化を担うと報告されている (Sauveplane et al., 2009)。そのため *f342* においても *f127* と同様にクチクラ層の異常が予想されたため TB 染色に供したところ、予想どおりその胚軸は染色された (図 3-12 (a))。また、*f342* の全脂肪酸量を測定したところ、*f127* と同様に WT と比較して長鎖脂肪酸や超長鎖脂肪酸の量が増加していた (図 3-15 (a))。3-1-1 項で述べた通り、既報によると CYP77A4 は小胞体に局在し、クチンモノマーのエポキシ化に関わっており (Sauveplane et al., 2009)、一方、DCR は細胞質に局在してクチンポリマーの重合反応に関与する (Panikashvili et al., 2009)。これまで紹介した CYP77A4 (= *f324* の T-DNA 挿入位置) と DCR (= *f127* の T-DNA 挿入位) のクチン生合成経路上で予想される位置関係について図 3-13 にまとめた。これらの結果から、*f127* 変異体の解析結果も統合して NJ15 低感受性にクチン生合成に関する量的あるいは質的な変動が関与していることが強く示唆された。

「本 3-4-3 項の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。
5 年以内に出版予定。」

「本論文第 4 章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。
5 年以内に出版予定。」

参考文献

第 1 章

- Arsuffi G, Braybrook SA. Acid growth: an ongoing trip. *J Exp Bot.* 2018; 69(2):137–146.
- Hager A, Menzel H, Krauss A. Versuche und Hypothese zur Primarwirkung des Auxin beim Streckungswachstum. *Planta*. 1971; 100:47–75.
- Hayashi K. The interaction and integration of auxin signaling components. *Plant Cell Physiol.* 2012; 53: 965–975.
- Tian H, Lv B, Ding T, Bai M, Ding Z. Auxin–BR Interaction Regulates Plant Growth and Development. *Front Plant Sci.* 2018; 8:2256.
- Szemenyei H, Hannon M, Long JA. TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during Arabidopsis embryogenesis. *Science.* 2008; 319:1384–1386.
- Fendrych M, Leung J, Friml J. TIR1/AFB–Aux/IAA auxin perception mediates rapid cell wall acidification and growth of Arabidopsis hypocotyls. *Elife.* 2016; 5. pii: e19048.
- Spartz AK, Ren H, Park MY, Grandt KN, Lee SH, Murphy AS, Sussman MR, Overvoorde PJ, Gray WM. SAUR Inhibition of PP2C–D Phosphatases Activates Plasma Membrane H⁺–ATPases to promote Cell Expansion in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2014; 26(5):2129–2142.
- Takahashi K, Hayashi K, Kinoshita T. Auxin activates the plasma membrane H⁺–ATPase by phosphorylation during hypocotyl elongation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2012; 159(2):632–41.
- Cosgrove, D.J. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature.* 2000; 407: 321–326.
- Philippart K, Ivashikina N, Ache P, Christian M, Lüthen H, Palme K, Hedrich R. Auxin activates KAT1 and KAT2, two K⁺–channel genes expressed in seedlings of Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 2004 ;37(6):815–27.
- Majda M, Robert S. The Role of Auxin in Cell Wall Expansion. *Int J Mol Sci.* 2018 ;19(4). pii: E951.
- Mockaitis K, Estelle M. Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2008; 24:55–80.
- Pelletier S, Van Orden J, Wolf S, Vissenberg K, Delacourt J, Ndong YA, Pelloux J, Bischoff V, Urbain A, Mouille G, Lemonnier G, Renou JP, Höfte H. A role for pectin de–methylesterification in a developmentally regulated growth acceleration in dark–grown Arabidopsis hypocotyls. *New Phytol.* 2010; 188(3):726–39.
- Li J, Nagpal P, Vitart V, McMorris TC, Chory J. A role for brassinosteroids in light–dependent development of Arabidopsis. *Science.* 1996; 272: 398–401.
- Belkhadir Y and Jaillais Y. The molecular circuitry of brassinosteroid signaling. *New Phytol.* 2015; 206(2):522–40.
- Caesar K, Elgass K, Chen Z, Huppenberger P, Witthöft J, Schleifenbaum F, Blatt MR, Oecking C, Harter K. A fast brassinolide–regulated response pathway in the plasma membrane of Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 2011; 66(3):528–40.
- Witthöft J, Caesar K, Elgass K, Huppenberger P, Kilian J, Schleifenbaum F, Oecking C, Harter K. The activation of the

- Arabidopsis P-ATPase 1 by the brassinosteroid receptor BRI1 is independent of threonine 948 phosphorylation. *Plant Signal Behav.* 2011; 6(7):1063–6.
- Minami A, Takahashi K, Inoue SI, Tada Y, Kinoshita T. Brassinosteroid Induces Phosphorylation of the Plasma Membrane H⁺-ATPase during Hypocotyl Elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 2019; 60(5):935–944.
- Sánchez-Rodríguez C, Ketelaar K, Schneider R, Villalobos JA, Somerville CR, Persson S, Wallace IS. BRASSINOSTEROID INSENSITIVE2 negatively regulates cellulose synthesis in *Arabidopsis* by phosphorylating cellulose synthase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017; 114(13):3533–3538.
- Wang X, Zhang J, Yuan M, Ehrhardt DW, Wang Z, Mao T. Arabidopsis microtubule destabilizing protein40 is involved in brassinosteroid regulation of hypocotyl elongation. *Plant Cell.* 2012; 24(10):4012–25
- Chung Y, Maharjan PM, Lee O, Fujioka S, Jang S, Kim B, Takatsuto S, Tsujimoto M, Kim H, Cho S, Park T, Cho H, Hwang I, Choe S. Auxin stimulates DWARF4 expression and brassinosteroid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* 2011; 66: 564–578.
- Yoshimitsu Y, Tanaka K, Fukuda W, Asami T, Yoshida S, Hayashi K, Kamiya Y, Jikumaru Y, Shigeta T, Nakamura Y, Matsuo T, Okamoto S. Transcription of DWARF4 plays a crucial role in auxin-regulated root elongation. *PLoS One.* 2011; 6:e23851.
- Vert G, Walcher CL, Chory J, Nemhauser JL. Integration of auxin and brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:9829–9834.
- Schruff MC, Spielman M, Tiwari S, Adams S, Fenby N, Scott RJ. The AUXIN RESPONSE FACTOR 2 gene of *Arabidopsis* links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. *Development.* 2006; 133:251–261
- Sun Y, Fan XY, Cao DM, Tang W, He K, Zhu JY, He JX, Bai MY, Zhu S, Oh E, Patil S, Kim TW, Ji H, Wong WH, Rhee SY, Wang ZY. Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in *Arabidopsis*. *Dev Cell.* 2010; 19: 765–777
- Haberlandt G. Ueber die Perception des geotropischen Reizes. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 1900;18, 261–272.
- Žádníková P, Smet D, Zhu Q, Van Der Straeten D, Benková. Strategies of seedlings to overcome their sessile nature: auxin in mobility control. *Front Plant Sci.* 2015; 6:218.
- Fujihiro K, Kurata T, Watahiki MK, Karahara I, Yamamoto KT. An agravitropic mutant of *Arabidopsis*, endodermal-amyoplast less 1, that lacks amyoplasts in hypocotyl endodermal cell layer. *Plant Cell Physiol.* 2000;41(11):1193–9.
- Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M. SGR1, SGR2, SGR3: novel genetic loci involved in shoot gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 1996;110(3):945–55.
- Tasaka M, Kato T, Fukaki H. The endodermis and shoot gravitropism. *Trends Plant Sci.* 1999 ;4(3):103–7.
- Caspar T, Pickard BG. Gravitropism in a starchless mutant of *Arabidopsis* : Implications for the starch–statolith theory of gravity sensing. *Planta.* 1989;177(2):185–97.

- Vitha S, Yang M, Sack FD, Kiss JZ. Gravitropism in the starch excess mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Am J Bot*. 2007;94(4):590–8.
- Saito C, Morita MT, Kato T, Tasaka M. Amyloplasts and vacuolar membrane dynamics in the living graviperceptive cell of the *Arabidopsis* inflorescence stem. *Plant Cell*. 2005;17(2):548–58.
- Kato T, Morita MT, Fukaki H, Yamauchi Y, Uehara M, Niihama M, Tasaka M. GR2, a phospholipase-like protein, and ZIG/SGR4, a SNARE, are involved in the shoot gravitropism of *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2002;14(1):33–46.
- Hashiguchi Y, Tasaka M, Morita MT. Mechanism of higher plant gravity sensing. *Am J Bot*. 2013 ;100(1):91–100.
- Rakusová H, Gallego-Bartolomé J, Vanstraelen M, Robert HS, Alabadi D, Blázquez MA, Benková E, Friml J. Polarization of PIN3-dependent auxin transport for hypocotyl gravitropic response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 2011;67(5):817–26.
- Rakusová H, Abbas M, Han H, Song S, Robert HS, Friml J. Termination of Shoot Gravitropic Responses by Auxin Feedback on PIN3 Polarity. *Curr Biol*. 2016;26(22):3026–3032.
- Tatematsu K, Kumagai S, Muto H, Sato A, Watahiki MK, Harper RM, Liscum E, Yamamoto KT. MASSUGU2 encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. 2004; 16(2):379–93.
- Fukaki H, Tameda S, Masuda H, Tasaka M. Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of *Arabidopsis*. *Plant J*. 2002; 29(2):153–68.
- Vieten A, Vanneste S, Wisniewska J, Benková E, Benjamins R, Beeckman T, Luschnig C, Friml J. Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development*. 2005;132(20):4521–31.
- Sauer M, Balla J, Luschnig C, Wisniewska J, Reinöhl V, Friml J, Benková E. Canalization of auxin flow by Aux/IAA-ARF-dependent feedback regulation of PIN polarity. *Genes Dev*. 2006;20(20):2902–11.
- Gupta A, Singh M, Jones AM, Laxmi A. Hypocotyl directional growth in *Arabidopsis*: a complex trait. *Plant Physiol*. 2012;159(4):1463–76.
- Vandenbussche F, Suslov D, De Grauwe L, Leroux O, Vissenberg K, Van der Straeten D. The role of brassinosteroids in shoot gravitropism. *Plant Physiol*. 2011;156(3):1331–6.

第 2 章

- Jaroensanti N, Yoon JM, Nakai Y, Shirai I, Otani M, Park SH, Hayashi K, Nakajima M, Asami T. Does the brassinosteroid signal pathway in photomorphogenesis overlap with the gravitropic response caused by auxin? *Biosci Biotechnol Biochem*. 2014;78(11):1839–49.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene

expression data. *Bioinformatics*. 2010; 26:139–40.

第 3 章

Bessire M, Borel S, Fabre G, Carraça L, Efremova N, Yephremov A, Cao Y, Jetter

Bird D, Beisson F, Brigham A, Shin J, Greer S, Jetter R, Kunst L, Wu X, Yephremov A, Samuels L. Characterization of Arabidopsis ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion. *Plant J*. 2007 ;52(3):485–98.

Fich EA, Segerson NA, Rose JK. The Plant Polyester Cutin: Biosynthesis, Structure, and Biological Roles. *Annu Rev Plant Biol*. 2016; 67:207–33.

Kannangara R, Branigan C, Liu Y, Penfield T, Rao V, Mouille G, Höfte H, Pauly M, Riechmann JL, Broun P. The transcription factor WIN1/SHN1 regulates Cutin biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*. 2007;19(4):1278–94.

Kurdyukov S, Faust A, Nawrath C, Bär S, Voisin D, Efremova N, Franke R, Schreiber L, Saedler H, Métraux JP, Yephremov A. The epidermis-specific extracellular BODYGUARD controls cuticle development and morphogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2006;18(2):321–39.

Kurdyukov S, Faust A, Trenkamp S, Bär S, Franke R, Efremova N, Tietjen K, Schreiber L, Saedler H, Yephremov A. Genetic and biochemical evidence for involvement of HOTHEAD in the biosynthesis of long-chain alpha-,omega-dicarboxylic fatty acids and formation of extracellular matrix. *Planta*. 2006;224(2):315–29.

Li Y, Beisson F, Koo AJ, Molina I, Pollard M, Ohlrogge J. Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(46):18339–44.

Li-Beisson Y, Pollard M, Sauveplane V, Pinot F, Ohlrogge J, Beisson F. Nanoridges that characterize the surface morphology of flowers require the synthesis of cutin polyester. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(51):22008–13.

Li-Beisson Y, Shorrosh B, Beisson F, Andersson MX, Arondel V, Bates PD, Baud S, Bird D, Debono A, Durrett TP, Franke RB, Graham IA, Katayama K, Kelly AA, Larson T, Markham JE, Miquel M, Molina I, Nishida I, Rowland O, Samuels L, Schmid KM, Wada H, Welti R, Xu C, Zallot R, Ohlrogge J. Acyl-lipid metabolism. *Arabidopsis Book*. 2010; 8:e0133.

Lisso J, Schröder F, Schippers JH, Müssig C. NFXL2 modifies cuticle properties in Arabidopsis. *Plant Signal Behav*. 2012;7(5):551–5.

Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, et al. Efficient isolation and mapping of Arabidopsis thaliana T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J*. 1995; 8:457–63.

Lü S, Song T, Kosma DK, Parsons EP, Rowland O, Jenks MA. Arabidopsis CER8 encodes LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 1 (LACS1) that has overlapping functions with LACS2 in plant wax and cutin synthesis. *Plant J*. 2009; 59(4):553–64.

- Lü S, Zhao H, Des Marais DL, Parsons EP, Wen X, Xu X, Bangarusamy DK, Wang G, Panikashvili D, Shi JX, Schreiber L, Aharoni A. The Arabidopsis ABCG13 transporter is required for flower cuticle secretion and patterning of the petal epidermis. *New Phytol.* 2011;190(1):113–24.
- Panikashvili D, Shi JX, Schreiber L, Aharoni A. The Arabidopsis DCR encoding a soluble BAHD acyltransferase is required for cutin polyester formation and seed hydration properties. *Plant Physiol.* 2009;151(4):1773–89.
- R, Jacquat AC, Métraux JP, Nawrath C. A member of the PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE family of ATP binding cassette transporters is required for the formation of a functional cuticle in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2011;23(5):1958–70.
- Rani SH, Krishna TH, Saha S, Negi AS, Rajasekharan R. *J Biol Chem.* 2010; 285(49):38337–47.
- Rowland O, Juenger T, Bressan RA, Jenks MA. Arabidopsis ECERIFERUM9 involvement in cuticle formation and maintenance of plant water status. *Plant Physiol.* 2012;159(3):930–44.
- Sauveplane V, Kandel S, Kastner PE, Ehling J, Compagnon V, Werck-Reichhart D, Pinot F. Arabidopsis thaliana CYP77A4 is the first cytochrome P450 able to catalyze the epoxidation of free fatty acids in plants. *FEBS J.* 2009;276(3):719–35.
- Tanaka T, Tanaka H, Machida C, Watanabe M, Machida Y. A new method for rapid visualization of defects in leaf cuticle reveals five intrinsic patterns of surface defects in Arabidopsis. *Plant J.* 2004;37(1):139–46.
- Trenkamp S, Martin W, Tietjen K. Specific and differential inhibition of very-long-chain fatty acid elongases from Arabidopsis thaliana by different herbicides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101:11903–8.
- Yeats TH, Martin LB, Viart HM, Isaacson T, He Y, Zhao L, Matas AJ, Buda GJ, Domozych DS, Clausen MH, Rose JK. The identification of cutin synthase: formation of the plant polyester cutin. *Nat Chem Biol.* 2012;8(7):609–11.
- Yeats TH, Rose JK. The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiol.* 2013;163(1):5–20.
- Ziv C, Zhao Z, Gao YG, Xia Y. Multifunctional Roles of Plant Cuticle During Plant–Pathogen Interactions. *Front Plant Sci.* 2018;9:1088.

第 4 章

- Bashline L, Lei L, Li S, Gu Y. Cell wall, cytoskeleton, and cell expansion in higher plants. *Mol Plant.* 2014 ;7(4):586–600.
- Hama T, Seki K, Ishibashi A, Miyazaki A, Kouchi A, Watanabe N, Shimoaka T, Hasegawa T. Probing the Molecular Structure and Orientation of the Leaf Surface of Brassica oleracea L. by Polarization Modulation-Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy. *Plant and Cell Physiology.* 2019, pcz063
- Jacq A, Pernot C, Martinez Y, Domergue F, Payré B, Jamet E, Burlat V, Pacquit VB. The Arabidopsis Lipid Transfer Protein 2 (AtLTP2) Is Involved in Cuticle–Cell Wall Interface Integrity and in Etiolated Hypocotyl Permeability. *Front Plant Sci.* 2017;8:263.
- Li Y, Smith C, Corke F, Zheng L, Merali Z, Ryden P, Derbyshire P, Waldron K, Bevan MW. Signaling from an altered cell wall

- to the nucleus mediates sugar-responsive growth and development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. 2007;19(8):2500–15.
- Li-Beisson Y, Shorrosh B, Beisson F. Acyl-lipid metabolism. *Arabidopsis Book*. 2010;8:e0133.
- Müller K, Levesque-Tremblay G, Fernandes A, Wormit A, Bartels S, Usadel B, Kermode A. Overexpression of a pectin methylesterase inhibitor in *Arabidopsis thaliana* leads to altered growth morphology of the stem and defective organ separation. *Plant Signal Behav*. 2013;8(12):e26464.
- Park YB, Cosgrove DJ. Changes in cell wall biomechanical properties in the xyloglucan-deficient xxt1/xxt2 mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2012;158(1):465–75.
- Pelletier S, Van Orden J, Wolf S, Vissenberg K, Delacourt J, Ndong YA, Pelloux J, Bischoff V, Urbain A, Mouille G, Lemonnier G, Renou JP, Höfte H. A role for pectin de-methylesterification in a developmentally regulated growth acceleration in dark-grown *Arabidopsis* hypocotyls. *New Phytol*. 2010;188(3):726–39.
- Refrégier G, Pelletier S, Jaillard D, Höfte H. Interaction between wall deposition and cell elongation in dark-grown hypocotyl cells in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2004;135(2):959–68.
- Willats WG, McCartney L, Mackie W, Knox JP. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol*. 2001;47(1–2):9–27.
- Wolf S, Mravec J, Greiner S, Mouille G, Höfte H. Plant cell wall homeostasis is mediated by brassinosteroid feedback signaling. *Curr Biol*. 2012;22(18):1732–7.
- Wolf S, van der Does D, Ladwig F, Sticht C, Kolbeck A, Schürholz AK, Augustin S, Keinath N, Rausch T, Greiner S, Schumacher K, Harter K, Zipfel C, Höfte H. A receptor-like protein mediates the response to pectin modification by activating brassinosteroid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(42):15261–6.
- Wormit A and Usadel B. The Multifaceted Role of Pectin Methylesterase Inhibitors (PMEIs). *Int J Mol Sci*. 2018;19(10).
- Yeats TH, Somerville CR. A dual mechanism of cellulose deficiency in *shv3svl1*. *Plant Signal Behav*. 2016;11(9):e1218108.
- Yeats TH, Sorek H, Wemmer DE, Somerville CR. Cellulose Deficiency Is Enhanced on Hyper Accumulation of Sucrose by a H⁺-Coupled Sucrose Symporter. *Plant Physiol*. 2016;171(1):110–24.