

シロイヌナズナのDNAマイクロアレイデータを用いた  
植物ホルモン機能に関する研究

2010

佐々木 江理子

## 目次

要旨	i
略号および用語説明	vi
<b>1章 序論</b>	<b>1</b>
<b>2章 植物ホルモン応答の簡易一斉検出法の確立</b>	<b>6</b>
2-1 緒言	6
2-2 方法	7
2-3 結果および考察	8
2-4 まとめ	16
<b>3章 公開マイクロアレイデータ統合のためのネットワーク解析法の確立</b>	<b>19</b>
3-1 緒言	19
3-2 方法	21
3-3 結果および考察	21
3-4 まとめ	44
<b>4章 植物生長調節物質の新規機能の解析</b>	<b>45</b>
4-1 緒言	45
4-2 方法	47
4-3 結果	53
4-4 考察	62
<b>5章 オミクス解析を用いた植物ホルモン関連変異体のプロファイリング</b>	<b>65</b>
5-1 緒言	65
5-2 方法	67
5-3 結果および考察	73
5-4 まとめ	86
<b>6章 総括</b>	<b>88</b>
本論文に関する原著論文	91
引用文献	92
付録	102
謝辞	153

## 要旨

### 1章 序論

植物ホルモンは植物により生産される低分子化合物で、植物が受容した環境変化などの刺激をシグナルとして下流に伝えることにより植物の形態形成や環境応答を精密に制御している。これらのメカニズムを理解することは植物の生体システムの解明に不可欠であり、ホルモンを利用した植物の生長調節は農業分野においても有用性が高い。

植物ホルモンの特徴の一つは、作用の多様性にある。個々のホルモンは、それぞれ固有の機能を持ちながらも、互いに拮抗的あるいは協調的に作用し合い、時期や組織に特異的な作用を及ぼす。このため、ホルモンの調節機能は他のホルモンや因子との相互作用と切り離すことができない。しかしながら、クロストークの研究には技術的な課題も多く残されており、単一ホルモンの機能解析に比べて調べられていない点が多い。近年の研究では、ペプチドホルモンや新規なホルモン物質など、新たな機能性因子の介在も次々と報告されている。このように、植物ホルモンネットワークの全体像は未だ混沌の中にある。精密で複雑な生物の生長制御機構を明らかにする上で、全体を俯瞰するような研究が不可欠であり、ホルモン研究は包括的なアプローチが必要な時期に来ていると考えられる。

生体システムを広域に扱うことを目的とした網羅的な解析として注目を集めるアプローチのひとつがオミクス解析である。シロイヌナズナでは、AtGenExpress Project によりシロイヌナズナの生活環を網羅したマイクロアレイデータが 2004 年に公開され、トランスクリプトームの研究が進んでいる。現在では、AtGenExpress のデータセットを補完するような詳細なデータも公開されており、公開データベースで取得できるデータの量は日々増加し続けている。メタボローム解析においても、組織や生育ステージごとの代謝物プロファイルが収集されるなど、マイクロアレイの実験データを拡張するメタボロームデータの収集も行われており、植物の全体像を描き出す大規模なオミクスデータの解析環境が整いつつある。

本研究では、ホルモンネットワークの全体像をとらえるための効率的なアプローチと

して、シロイヌナズナのおミクスデータを用い、植物ホルモンの相互作用ネットワークや生長、代謝調節機構の予測を試みた。

## 2章 植物ホルモン応答の簡易一斉検出法の確立

植物ホルモンのクロストーク研究では、複数のホルモンの状態を一斉に分析し、相対的な内生量や応答のパターンを調べることが必要となる。しかし、内生量が非常に少なく、時期、組織特異的な局在性をもつ植物ホルモンを複数同時に定量する一斉解析では、高精度のデータが得られない場合も多い。そこで本章では、多様な条件下における複数ホルモンの状態を同一試料から一斉に解析する簡易な手法を構築することにした。基盤技術にはマイクロアレイを用いた。マイクロアレイは、生重量 50  $\mu\text{g}$  以下の試料から全遺伝子の発現レベルが測定できる。シロイヌナズナでは組織や時期特異性、ストレス、ホルモン応答などの遺伝子発現データが幅広く網羅されているため、これらからホルモンの状態を予測することができれば、改めて実験を行うことなく、多くの局面におけるホルモンの変動パターンについての知見を集めることができると考えられる。

はじめに、シロイヌナズナ芽生えに 7 種の植物ホルモン(オーキシン、サイトカイニン、ジベレリン、ブラシノステロイド、アブシジン酸、ジャスモン酸、エチレン)を各々処理した実験データを選び、ホルモン処理により発現レベルが変動する遺伝子群の発現プロファイルを作成した。これらをホルモン応答が活性化している場合のプロファイル(ホルモン応答性プロファイル)と位置づけ、解析ターゲットとするマイクロアレイデータでホルモン応答性プロファイルと相似性のある発現変動が生じているかピアソンの相関係数を用いて調べた。高い正の相関がある場合にはホルモン応答が活性化しており、高い負の値の場合には不活性化していると考えられる。既知のホルモンの応答がみられる 7 実験を用いて、各ホルモンの応答性プロファイルがホルモン応答を検出できるか検証したところ、すべて有意な水準で既知のホルモン応答が検出された。また、モデル解析として複数のストレス処理実験のタイムコースデータの解析を行ったところ、ストレス応答に関わるホルモンを中心に時間依存的な応答パターンが検出され、いずれも実験的に証明されている既知の知見に合致した。

### 3章 公開マイクロアレイデータ統合のためのネットワーク解析法の確立

2章では、ホルモン処理特異的に応答する遺伝子群(モジュールと定義する)のプロファイルを用いてホルモン応答が生じているプロファイルを特定したが、本章では、この方法を応用して、マイクロアレイ実験の発現プロファイル間の生理的なつながりを予測する有方向性ネットワーク解析法を構築した。植物ホルモンはさまざまな局面で機能し、生長を調節することから、構築したネットワークでは各種の植物ホルモン処理が多くのプロファイルをつなぐ中心となることが予想された。

モジュールの選抜は、*p*-value とシグナルレシオ ( $\text{Log}_2(\text{処理区発現値} / \text{対照区発現値})$ ) による統計的な閾値を用いて行った。同じ処理を受けたシロイヌナズナのプロファイルが安定して高い相関を示す閾値を検討し、AtGenExpress、Gene Expression Omnibus (GEO) で公開されている 195 の実験データを用いてネットワーク(リレーションマップ)を構築した。

植物ホルモン処理のプロファイルは、ホルモンの非感受性変異体や阻害剤処理、中間体などとの間に相関を示し、また、異なるホルモン処理プロファイル間やホルモン生合成遺伝子欠損変異体との間で、クロストークを示す相関も検出された。さらに、共同研究として本解析結果を公開するデータベース AtCAST を構築し、研究者らが自らのマイクロアレイデータをアップロードしてサーバー上のデータと比較解析を行うためのツールの開発、公開を行った。

### 4章 植物生長調節物質の新規機能の解析

植物生長調節物質として知られる化合物には、主な作用に加えて複数のターゲットサイトを有するものも多い。これらは特異性が低い反面、ターゲットサイトの特定によりホルモン阻害剤のリード化合物として有用な情報をもたらす可能性がある。本章ではサイトカイニン(CK)を取り上げ、上述の解析系を適用して CK 応答を低下させる化合物を探索し、その機能解析を行った。CK は生合成阻害剤や通常の生育条件下で内生量が減少する変異体が見つかっておらず、生合成阻害剤の開発は CK の機能解明の上でも有用性が高い。

既知のホルモン阻害剤処理のデータセットのプロファイルで CK の応答を調べたとこ

ろ、トリアゾール系化合物で低下している傾向が見られた。中でも、ジベレリン(GA)、ブラシノステロイド(BR)の生合成阻害活性、アブシジン酸(ABA)の代謝阻害活性が知られているウニコナゾール-P 処理で、CK の応答の低下が再現性よく見られた。CK の応答の低下が GA、BR、ABA の内生量の変化によるものかを調べるために各ホルモンの非感受性変異体にウニコナゾール-P を処理し、定量 PCR で CK 応答性遺伝子の発現量を調べたところ、野生型、変異体ともに発現量の大幅な減少が見られた。発現量の減少は CK 処理によって回復した。また、ウニコナゾール-P 処理により、活性型 CK である *t*-Zeatin の内生量が有意に減少することが明らかになった。*t*-Zeatin 生合成経路では、トリアゾール化合物のターゲットとなる P450 酵素 CYP735A が存在する。ウニコナゾール-P の CYP735A に対する阻害活性を酵素活性試験によって測定した結果、濃度依存的な阻害活性が検出された。以上の結果から、ウニコナゾール-P は活性型 CK の生合成阻害活性を有しており、CYP735A がターゲットの一つになっていることが示唆された。

## 5章 オミクス解析による植物ホルモン関連変異体のプロファイリング

植物ホルモンが制御する代謝物と代謝経路を網羅的に明らかにするために、ホルモンの生合成やシグナル伝達の異常が報告されている 28 変異体のトランスクリプトームおよびメタボロームの解析を行った。

発芽 7 日後の芽生えからマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルおよび LC-Q-TOF/MS、GC-TOF/MS、LC-IT-TOF/MS、CE-TOF/MS による代謝物プロファイルを共同研究として取得した。各変異体を野生型と比較解析し、発現量、蓄積量が変動している遺伝子および代謝物を特定した。また、植物ホルモンが制御する代謝物、代謝経路を明らかにするため、ホルモンごとに変異体を分類し、ホルモングループごとに影響を受けている経路を調べた。さらに、本研究で取得した大規模なオミクスデータを用いて遺伝子と代謝物の共発現解析を行い、ホルモン変異体で協調的な蓄積パターンを示す遺伝子と代謝物を調べたところ、植物ホルモン生合成遺伝子、応答性遺伝子は、有機酸や糖などの代謝物の蓄積と相関のある発現パターンを示すことが明らかになった。

## 6章 総括

本研究では、マイクロアレイデータの解析を中心として、植物ホルモンの状態を一斉分析する簡易な手法を確立した。この手法を発展させたリレーションマップからは植物ホルモンを含む多様な遺伝子発現プロファイル間の生理的な相似性が明らかになった。これらの解析結果からはトリアゾール系化合物ウニコナゾール-Pが植物体内でCKの応答を低下させることが予測され、実際にCK生合成阻害活性を有していることが一連の実験で示された。植物ホルモン変異体のオミクスデータの解析からは、植物ホルモンが制御する経路や代謝物が網羅的に明らかになった。

## 略記および用語説明

ABA	abscisic acid アブシジン酸
ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid エチレン前駆体
AGI コード	Arabidopsis Genome Initiative コード シロイヌナズナのゲノム上の位置情報に従って遺伝子に付けられたユニークなコード
ANOVA	Analysis of Variance 分散分析
AP	calyculin alkaline phosphatase
AtGen 実験データ	AtGenexpress project で収集されたシロイヌナズナのマイクロアレイデータ
BL	brassinolide 天然で最も活性が高いブラシノステロイド
BSA	bovine serum albumin
CEL ファイル	Affymetrix 社 GeneChip のプローブレベルの発現データを含むファイル
CE-MS	キャピラリー電気泳動質量分析計
DMSO	Dimethyl sulfoxide 溶媒
FDR	False Discovery Rate 有意と判定された検定(陽性)に対する誤って有意とされた検定(偽陽性)の割合の期待値
FT-IR MS	フーリエ変換イオンサイクロトロン型質量分析計
GA	gibberellin ジベレリン
GC-MS	ガスクロマトグラフィー質量分析計
GEO	Gene Expression Omnibus マイクロアレイデータベース
GO	Gene Ontology
HCA	Hierarchical Clustering Analysis 階層クラスター解析
IAA	indol-3-acetic acid 天然オーキシシン
IAOx	indole-3-acetaldoxime
IPA	indole-3-pyruvic acid
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LC-MS	液体クロマトグラフィー質量分析計
MAQC	Microarray Quality Control
MJ	methyl jasmonate ジャスモン酸メチル
Mock 処理	擬似処理 対照区として使用
NASC Array	Nottingham Arabidopsis Stock Centre マイクロアレイデータベース
NMR	核磁気共鳴法
PCA	Principal Component Analysis 主成分分析



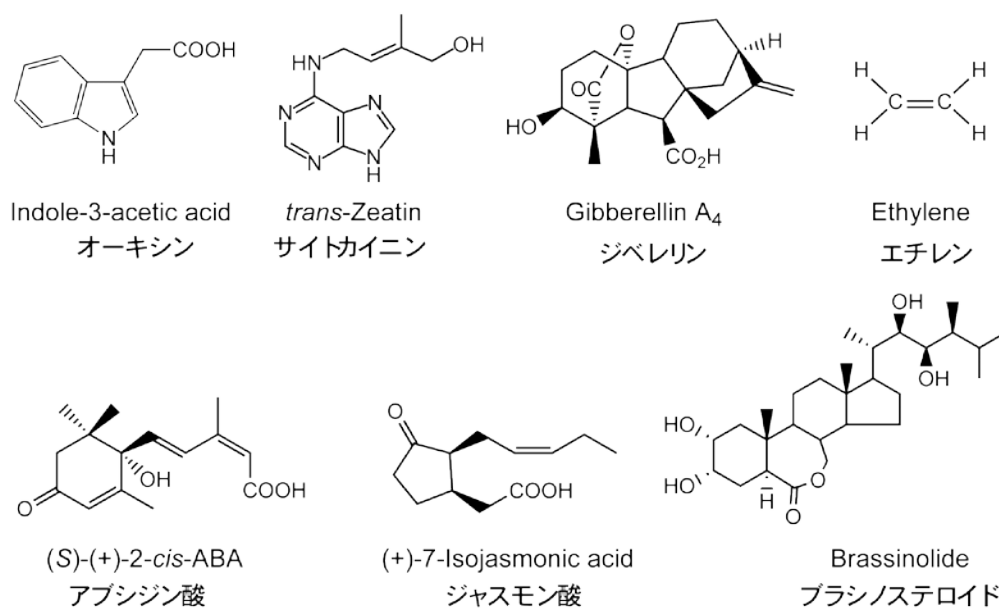
Probe ID	マイクロアレイのプローブセットに関連づけられた固有番号 個々の遺伝子と対応付けられる
SVG フォーマット	Scalable Vector Graphics フォーマット ベクター画像言語によって記載されているため画質を劣化させることなく環境に応じて拡大や縮小表示が可能な画像形式
TAIR	The Arabidopsis Information Resource
<i>t</i> -zeatin	活性型サイトカイニン
遺伝子発現プロファイル	遺伝子と、その値からなり、対照区に対して処理による発現変動を表すデータ群
エッジ	辺、ノードとノードを連結する二項関係。本論文では、遺伝子発現プロファイルの間に類似性があることを表す
ノード	頂点、ネットワークを構成する一つ一つの要素 本論文ではマイクロアレイ実験で得られた遺伝子発現プロファイルを表す

## 記号一覧

$n$	サンプルの数
$r$	ピアソンの積率相関係数
$r^2$	決定係数
SCC	スピアマンの順位相関係数
$sr$	ログシグナルレシオ
$t$	$t$ 統計量
$\bar{x}$	サンプルの算術平均

## 1章 序論

植物ホルモンは、植物により生産され低濃度で植物の生理過程を調節する低分子化合物である。その機能が詳細に調べられている主なものには、オーキシン、サイトカイニン、ジベレリン、エチレン、アブシジン酸、ジャスモン酸、ブラシノステロイドなどが挙げられる(Fig. 1-1)。ホルモンは、植物が受容した環境変化などの刺激をシグナルとして下流に伝えることで、生長・分化の調節や、ストレス耐性の獲得を促す。これらのメカニズムを理解することは植物の生体システムの解明の上で不可欠である。また、「緑の革命」でジベレリン生合成欠損による半矮性作物が利用されたことが知られるように[1]、植物ホルモンの調節を介した植物の生長調節は、農業分野においても有用性が高い。



**Fig. 1-1** 主な植物ホルモンと化学構造式

植物ホルモンの特徴の一つは、その作用の多様性である。例えばジベレリンが種子休眠の打破や花茎の伸長を促すように、それぞれのホルモンは、異なる生育ステージ

や組織にさまざまな作用を及ぼすが、このような植物ホルモンの機能の多様性を説明する生体システムの一つとして、複数のホルモン間での相互作用(クロストーク)を挙げることができる。植物の調節機構の多くには、複数のホルモンが関与しており、これらのバランスによって精密な制御が行われている。クロストークは協調的作用と拮抗的作用に大きく分類される。協調的な作用の例では、ジベレリンとオーキシシン[2]、オーキシシンとブラシノステロイド[3]、エチレンとオーキシシン[4]などが挙げられる。拮抗的作用の例としては、ジベレリンとアブシジン酸[5]、オーキシシンとサイトカイニン[6]などが例としてあげられる。このようなクロストークの例はさまざまな局面において見られ、ホルモンの調節機能は他のホルモン等との相互作用と切り離すことができない。

しかしながらクロストークの研究は単一ホルモンの機能解析に比べて進展が遅れている。植物の生長制御の全体像を解明するためには、全植物ホルモンの同時解析が重要だと認識されているが、全ホルモンの動きを同時にとらえた研究は例が少ない。その背景として、技術的な問題が挙げられる。植物ホルモンは、内生量が極微量であり、組織・時期特異的に局在するために、定量が難しい。化学的な性質の違いも、一斉定量を困難にしている[7]。近年、分析機器が発達したことにより、その感度は飛躍的に向上しているが、同一試料から複数のホルモンを定量する技術は、まだ充分には確立されていない。一方で、細胞内では、組織、時期特異的に感受性を変化させるような調節が行われているが[8]、そのシグナルの受容システムを考慮した解析法もまた課題のひとつとして残されている。さらに生物検定を中心とした、初期に行われたクロストーク研究では、再現性に欠ける面があるなど[J1]、実験結果の再評価が待たれる研究も残されている。従来は単独のホルモンによる調節を受けていると考えられてきた現象に、複数のホルモンが関与しているという報告も相次いでいる。また近年では新たな機能性因子として発見されたペプチドホルモン[9-11]やストリゴラクトン[12, 13]などの新規なホルモン物質もまた、クロストークに関与していることが報告されている[14]。このような一面だけ見ても、植物ホルモンネットワークの全体像は未だ混沌の中にあるといえよう。精密で複雑な生物の生長制御機構の研究を発展させる上で、全体を俯瞰するような研究が不可欠であり、ホルモン研究は包括的なアプローチが必要なステージに至っていると考えられる。

生命システムを広域に扱うことを目的とした網羅的な解析として注目を集めるアプローチのひとつにオミクス解析がある。タンパク質、転写産物、代謝物のそれぞれの細胞

内での一揃いの全集合体をオームと呼ぶが、これらの網羅的解析研究がオミクスである。それぞれプロテオミクス、トランスクリプトミクス、メタボロミクスと称される。

植物のゲノム研究では、モデル植物シロイヌナズナ的全ゲノム塩基配列が他の植物種に先駆け 2000 年に決定された[15]。当初は、配列情報に基づく遺伝子構造の推定や機能予測、他生物との比較が中心であった。しかし DNA マイクロアレイ法[16]により細胞内のほぼすべての遺伝子の発現を一度に定量するという方法が用いられるようになると、動的なゲノム解析が可能となり、マイクロアレイはトランスクリプトミクス研究の中心的な技術となった。シロイヌナズナでは、AtGenExpress Project によりシロイヌナズナの生活環を網羅することを目指したマイクロアレイデータが 2004 年に公開され[17-19]、広く研究に利用されている。現在では、AtGenExpress のデータセットを補完するような細胞種ごとの詳細なトランスクリプトームデータも公開されており、Gene Expression Omnibus (GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) [20, 21]や NASC Array (<http://affymetrix.arabidopsis.info/narrays/experimentbrowse.pl>) [22]などのマイクロアレイデータベースから得ることができるデータの量は日々増加し続けている。

一方で、メタボロミクスは細胞内に含まれる多様な代謝物になるべく多く同定、定量することを目指したノンターゲット分析が DNA マイクロアレイと対比される分析手法となっている。メタボロミクス解析には、代謝物を幅広く網羅して定量できる分析技術が存在しないためガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-MS)、キャピラリー電気泳動質量分析計 (CE-MS)、液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC-MS)、フーリエ変換イオンサイクロトロン型質量分析計 (FT-IR MS)、核磁気共鳴法 (NMR) などの様々な分析機器を使って、それぞれの分析手法が得意とする範囲の化合物群にフォーカスした解析を行う[J2] (Fig. 1-2)。これらによるシロイヌナズナの分析で検出される化合物の数は、LC-Q-TOF/MS では $\geq 1000$  [23]、GC-MS では $\geq 500$  [24]などの報告がある。AtGenExpress Project で集められた組織ごとのマイクロアレイデータと厳密に組織と生育ステージを揃えた代謝物プロファイルも収集されるなど[25]、マイクロアレイの実験データの拡張するメタボロームデータの収集も行われており、植物の細胞内で生じている変化の全体像を描き出す大規模なオミクスデータの解析環境が整いつつある。

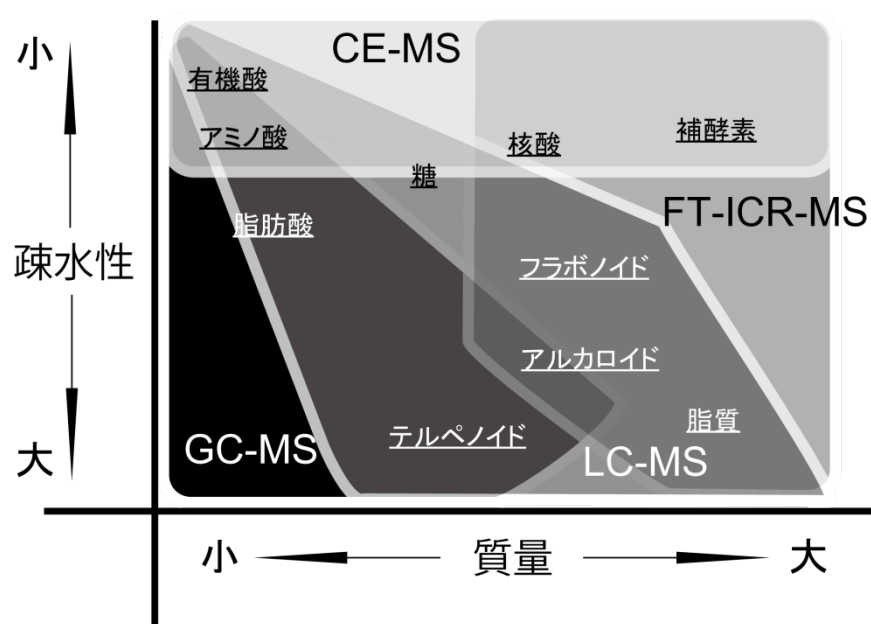


Fig. 1-2 各分析機器が対象とする化合物範囲 (松田ら[J2]より改編)

このような解析手法は、ある条件下での植物の遺伝子発現や代謝プロファイルを明らかにするだけでなく、遺伝子発現と代謝物量などの異なる種類のデータを統合することによって、転写から翻訳、代謝の各状態をつなぐ、生物の制御メカニズムを予測するモデルへと発展させることができると期待されている[26]。近年では、特定の二次代謝産物について、遺伝子発現と蓄積のパターンを比較し、生合成遺伝子を特定した例も報告されている[27, 28]。

しかしながら、オミックスの莫大なデータ量の中から生理的な意味を読み取り、生体内の制御メカニズムを反映したモデルを構築する試みは、まだ試行錯誤の段階にある。オミックス解析で得られる結果は、ある実験条件下における細胞内の状態を映し出すスナップ写真のようなものであり、大量の未精査なデータを生み出す。このため、特定の転写物、代謝物に限定しない発現や蓄積のパターンが得られる代わりに、目的とする転写物や代謝物の定量に比べると個々の測定値の解像度は劣る事が多く、解析技術などに起因する多くのノイズを含んでいる[26]。ノイズの原因には、実験グループや分析機器などに起因する実験環境の違いや、試料として用いた組織や生育ステージの違いも挙げられる。これらは、実験目的とした生理過程のもたらす差を見えにくくする

だけでなく、誤った解析結果を生み出すこともある[29-31]。オミクスデータの利用においては、データの偏りに配慮しながら補正を行い、解析対象にターゲットを絞り、生理的な活性を検出できる解析方法を確立していく必要がある。

本論文では、シロイヌナズナのおミクスデータの解析を中心として、さまざまな条件下での植物ホルモンの変動を包括的にとらえる方法を確立するとともに、ホルモンが介する植物の生長、代謝調節機構を明らかにすることを目的として研究を行った。

まず、主な植物ホルモンの変動を同一試料から予測するために、マイクロアレイ実験データを比較解析し、植物ホルモンの応答を一斉解析する簡易方法の構築を行った(2章)。次いでこの方法を応用して、公開マイクロアレイのデータを大規模に統合し、さまざまな実験により得られた遺伝子発現プロファイルの生理的な相関性を明らかにするネットワーク解析法を構築した。この解析法により、シロイヌナズナのさまざまなプロファイルを収集し、相互の相関性を明らかにするネットワーク(リレーションマップ)を作成した。このリレーションマップから、植物ホルモンに関連する遺伝子発現プロファイルを中心として、プロファイル間のつながりを調べ、オーキシンの生合成欠損変異体 *sav3-2*[32]をモデルとした機能予測解析を行った。また、作成したリレーションマップを公開するオンラインデータベースや新たに取得したマイクロアレイデータをオンライン上でリレーションマップと比較解析を行うツールを構築した(3章)。さらに、2、3章の方法を用いて既知の阻害剤ユニコナゾール-Pの新しい活性を予測し、一連の実験的な手法を用い、この化合物が予測された活性を有するか検証を行った(4章)。最後に、植物ホルモンが代謝変動に与える影響を明らかにするため、植物ホルモンに関係する変異体を収集し、トランスクリプトーム、メタボローム解析を行った((独)理化学研究所メタボローム解析グループとの共同研究)。得られたオミクスデータを用いて各変異体の遺伝子発現および代謝の変動を明らかにした。また、トランスクリプトームデータおよびメタボロームデータを統合して共発現解析を行い、植物ホルモン生合成、応答性遺伝子と協調的に働く代謝物を明らかにした(5章)。これらの研究の詳細を以下に記す。

## 2章 植物ホルモン応答の簡易一斉検出法の確立

### 2-1 緒言

植物ホルモンのクロストーク研究においては、複数のホルモンの応答のパターンや相対的な内生量を包括的に調べる必要がある。植物体内のホルモンの変化の研究には、質量分析器を用いた定量分析や、生合成遺伝子や応答性遺伝子などホルモンの動きを示すマーカー遺伝子の発現量解析などが、従来用いられてきた。定量分析の分野では、同一試料から複数のホルモンの定量を行う一斉分析の研究も高い技術水準で進められているが[7]、ホルモン物質は、化学的な性質が多様な上、非常に微量で組織局在性が高いため、特に内生量の低いジベレリンやブラシノステロイドなどでは、少量の試料からは高精度のデータが得られないこともある[J3]。定量 PCR などを用いて、マーカー遺伝子の発現量の測定によりホルモンの状態を調べる解析法も広く普及しているが、生育ステージや組織によっては、マーカー遺伝子の発現量が低すぎるなどの理由から、適用できないこともある。以上のような理由から、ホルモンの生合成や応答の状態や感受性を一斉に解析する手段は未だ確立されていないといえる。

そこではじめに、多様な条件下における複数ホルモンの応答を同一試料から一斉に解析する簡易な手法の確立を行うことにした。基盤となる技術には、DNA マイクロアレイを用いた。マイクロアレイを使うことにより、生重量 50  $\mu\text{g}$  以下の試料から全遺伝子の発現レベルが測定できる。シロイヌナズナでは組織や生育時期の特異性[17]、ストレス応答[18]、ホルモン応答[19]などの遺伝子発現のデータが幅広く網羅されているため、これらからホルモンの状態を予測することができれば、改めて実験を行うことなく、多様な局面におけるホルモンの働きについての知見を集めることができる。

しかし一方で、マイクロアレイデータはデータ量に比例して実験グループや分析機器などに起因するノイズが大きく、生理的に意味のある変動のみを検出することが難しいという問題点がある。このため、ノイズを除去し、安定して精度の高い解析ができる方法を構築する必要がある。

本章では、マイクロアレイを基盤とし、ホルモン処理を行ったシロイヌナズナの遺伝

子発現データを用いて、植物ホルモン変動の一斉解析を行う方法について述べた後、本法を用いて行ったサンプルデータの解析と、結果について述べる。

## 2-2 方法

### 2-2-1 マイクロアレイデータの収集

マイクロアレイ実験データは、AtGenExpressProject で収集された実験データ(以降、AtGen 実験データと略する)を、(独)理化学研究所 ゲノム機能統合化研究チーム 嶋田幸久博士よりご恵与いただき用いた。本データは、TAIR で公開されているものと同一である。特に記載がない場合には、シロイヌナズナの全遺伝子をカバーする Affymetrix 社 ATH1 GeneChip を使用した実験データを使用した。

### 2-2-2 データのノーマライズ

シグナル値は CEL ファイルから Microarray Suite version5(MAS5)形式で取得し、全プローブセットのシグナル値のメジアン比に変換した。以降、この値を各プローブセットの発現値として扱った。マイクロアレイ上のプローブ ID は、TAIR からダウンロードした affyATH1arrayelement データ(TAIR8 ゲノムアノテーション)を参照して AGI コード、遺伝子名へ変換を行い、各プローブセットの発現値を、遺伝子の発現値として扱った。また、ATH1 に含まれている 22,810 プローブセットの中で、実際のシロイヌナズナの遺伝子としてアノテーションされている 21,180 プローブセットのみを計算に用いた。

すべての計算は、統計解析ソフトウェア R(<http://www.r-project.org>)を用いて行った。

### 2-2-3 発現遺伝子の取得

処理区、対照区の反復実験を通じて、少なくとも一実験で有意なレベルの発現 (Detection  $P$ -value  $< 0.05$ ) が見られた遺伝子を用いて、解析を行った。



## 2-3 結果および考察

### 2-3-1 解析方法

#### 2-3-1-1 手法の概要

解析方法の概要をフローチャートに示す (Fig. 2-1)。はじめに、発芽 7 日後のシロイヌナズナ芽生えに主な植物ホルモン 7 種 (オーキシシン、サイトカイニン、ジベレリン、ブラシノステロイド、アブシジン酸、ジャスモン酸、エチレン) それぞれを処理して経時変化を調べた実験データ [19] (Table 2-1) を選び、ホルモン処理によって対照区に対して発現レベルが変動する遺伝子群の発現プロファイルを作成した。これらをホルモン応答が活性化している場合のプロファイル (ホルモン応答性プロファイル) と位置づけた。次いで、解析ターゲットとするマイクロアレイデータでホルモン応答性プロファイルと相関性のある発現変動が生じているか、ピアソンの積率相関係数 ( $r$ ) を用いて調べた。以下に詳細な手順を述べる。

#### 2-3-1-2 ホルモン応答性プロファイルの作成

各ホルモン処理のデータセットは、mock (0 h)、0.5、1、3 時間処理毎のデータで構成される。処理時間に応じてホルモン応答が大きくなるとみなし、3 時間処理のデータでは、遺伝子のホルモン応答が十分に生じている状態が見られると仮定して、3 時間処理した場合の遺伝子発現値を基にホルモン応答性プロファイルを作成することにした。処理 3 時間後の発現応答は、mock 処理区とのログシグナルレシオ ( $sr$ ) を (1) 式を用いて計算した (処理 3 時間の発現変動プロファイル)。次に、経時変化のデータ (mock、0.5、1、3 時間処理) の 4 点間で分散分析 (ANOVA) を行い、各遺伝子の発現変動の  $p$  値を計算した。この結果により、有意に発現変動し ( $\text{FDR } q\text{-value} < 0.05$ ) [33]、 $sr$  の絶対値が大きい遺伝子とその値を、ホルモン処理 3 時間の遺伝子発現プロファイルから選択した。最終的に選択されたデータをホルモン応答性プロファイルとし、このプロファイルに含まれる遺伝子群をホルモン応答性遺伝子とした (Fig. 2-1A)。 $sr$  による遺伝子群の絞り込みは、プロファイルに含まれる遺伝子の数が 40 以下とならないようにして ( $p = 0.01$ ,  $r = |0.4|$ )、既知のホルモン作用を有するマイクロアレイ実験プロファイルと

の相関に基づいて決定した (Table 2-2, Table S2-1)。相関係数 ( $r$ ) の有意水準は、(2) 式の  $t$  値から求めた。

$$\text{ログシグナルレシオ} \quad sr = \log_2 \left( \frac{\bar{x}}{\bar{y}} \right) \quad (1)$$

処理区発現値の平均 ( $\bar{x}$ )、対照区発現値の平均 ( $\bar{y}$ )

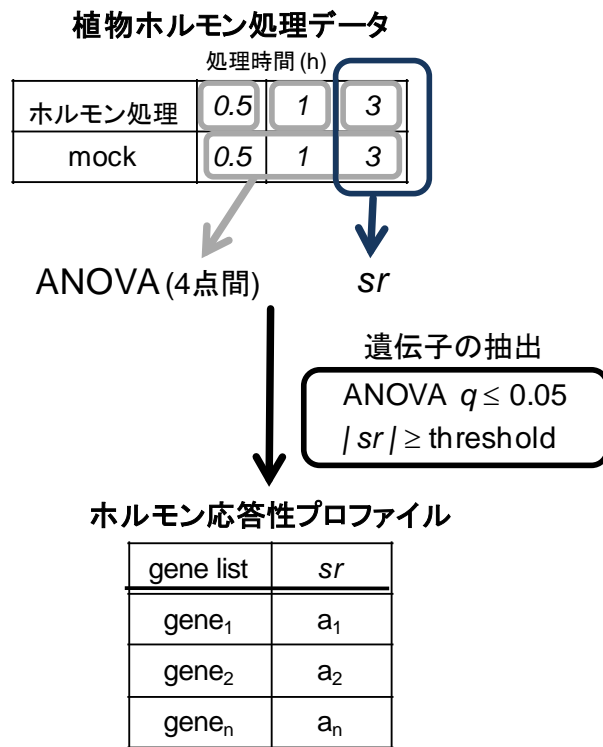
$$t = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (2)$$

帰無仮説  $H_0$ =相関係数 0

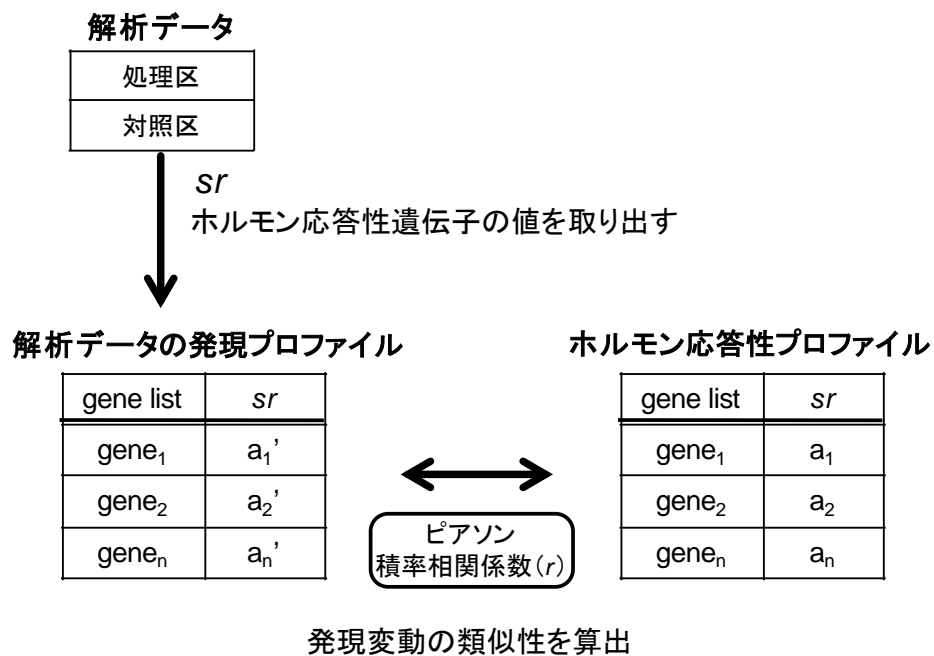
### 2-3-1-3 ホルモン応答の予測

解析対象のデータはすべてシグナル値を  $sr$  に変換した後、ホルモン応答性遺伝子リストに対応する遺伝子の  $sr$  を抜き出し、ホルモン応答性プロファイルとの間の類似性をピアソン積率相関係数 ( $r$ ) によって計算した。 $r$  は+1 から-1 の値をとる。正の高い相関値を示す場合には、解析データのプロファイルにおいてホルモン応答性遺伝子がホルモン処理を行った時と類似した変動をしており、ホルモン応答が活性化されていると推定することができる。逆に負の高い相関値を示す場合にはホルモン応答性遺伝子がホルモン処理時と反対の変動をしており、ホルモン応答が不活性化されていると推定することができる (Fig. 2-1B)。

A



B



**Fig. 2-1** ホルモン応答の解析フロー (A)ホルモン応答性プロファイルの作成、(B)ホルモン応答の予測

**Table 2-1 AtGenExpress 植物ホルモン処理データ一覧**

ホルモン名	処理	Genotype	処理時間	部位
オーキシシン	1 $\mu$ M IAA <sup>a</sup>	Col-0	0.5, 1, 3 h	seedling
サイトカイニン	1 $\mu$ M <i>t</i> -zeatin	Col-0	0.5, 1, 3 h	seedling
アブシジン酸	10 $\mu$ M ABA <sup>b</sup>	Col-0	0.5, 1, 3 h	seedling
ジャスモン酸	10 $\mu$ M MJ <sup>c</sup>	Col-0	0.5, 1, 3 h	seedling
エチレン	10 $\mu$ M ACC <sup>d</sup>	Col-0	0.5, 1, 3 h	seedling
	Col-0 mock	Col-0	0.5, 1, 3 h	seedling
ジベレリン	1 $\mu$ M GA <sub>3</sub> <sup>e</sup>	<i>ga1-5</i>	0.5, 1, 3 h	seedling
	<i>ga1-5</i> mock	<i>ga1-5</i>	0.5, 1, 3 h	seedling
ブラシノステロイド	10 nM BL <sup>f</sup>	<i>det2-1</i>	0.5, 1, 3 h	seedling
	<i>det2-1</i> mock	<i>det2-1</i>	0.5, 1, 3 h	seedling

a: indole-3-acetic acid (IAA), b: abscisic acid (ABA), c: methyl jasmonate (MJ)

d: 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), e: gibberellin A<sub>3</sub> (GA<sub>3</sub>)

f: brassinolide (BL)

**Table 2-2 ホルモン応答性遺伝子発現プロファイルに含まれる遺伝子数**

ホルモン名	遺伝子数	<i>sr</i> <sup>a</sup>	<i>p</i> 値 ( $r= 0.4 $ )
オーキシシン	143	1.25	7.4e-07
サイトカイニン	52	0.25	7.4e-07
アブシジン酸	472	2.25	1.5e-19
ジャスモン酸	758	0.75	1.7e-30
エチレン	41	0.25	0.0095
ジベレリン	49	0	0.004
ブラシノステロイド	41	2.25	0.0095

a: 各ホルモン応答性プロファイルの選択に用いた *sr* の閾値

#### 2-3-1-4 遺伝子発現プロファイルの評価

ホルモン応答性プロファイルの発現変動が、ホルモン応答の変化が既知のマイクロアレイ実験においても再現されているかを調べるために、各ホルモンの作用や応答が報告されている実験のマイクロアレイデータを AtGen 実験データから選び、ホルモン応答性プロファイルとの間で遺伝子発現パターンの比較を行った (Table 2-3)。

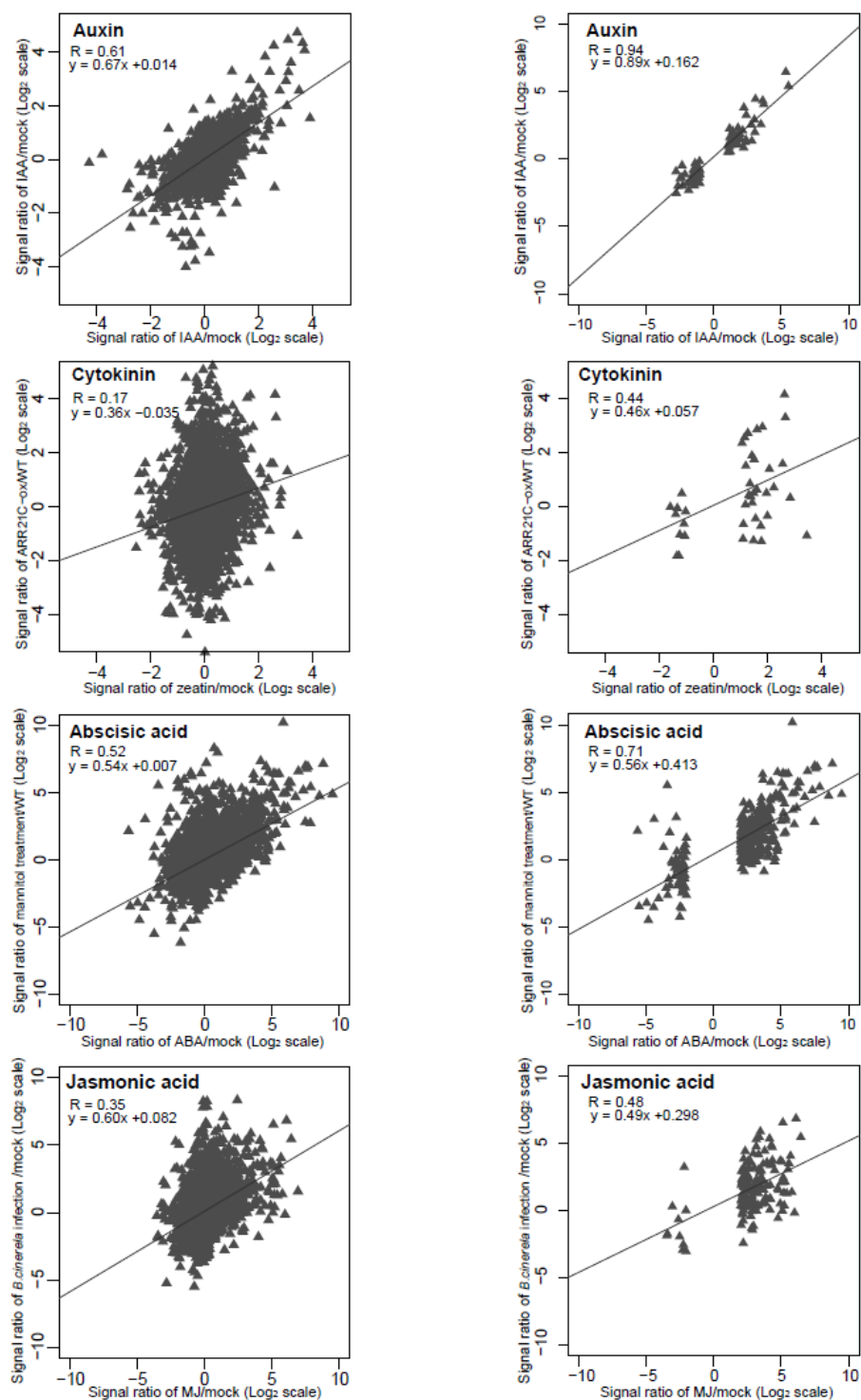
まず、すべての遺伝子の *sr* をそれぞれ 2 つの実験間で比較した結果、ほとんどの組み合わせで相関はなかった (Fig. 2-2, Fig. 2-3)。オーキシシン処理の実験ペアでは、同

研究グループが行った、同処理、同処理時間の実験にも関わらず、相関を示さない遺伝子が多く確認された。これらは、マイクロアレイのプラットフォームの違いや、cDNAの調製、ハイブリダイゼーションなどに起因するノイズが原因の一つとなり、実験間の再現性を低下させたと考えられる。一方で、ホルモン応答性プロファイルに含まれる遺伝子の比較では、すべての実験ペアで0.4を超える有意な相関が得られた。オーキシン処理のペアでは、相関係数が0.94と非常に高い値を示した。また、エチレン、ジベレリン、ブラシノステロイドの実験ペアのように、阻害剤処理を行ったデータとの間にも-0.6~-0.85程度の強い負の相関が示された(Fig. 2-2, Fig. 2-3)。

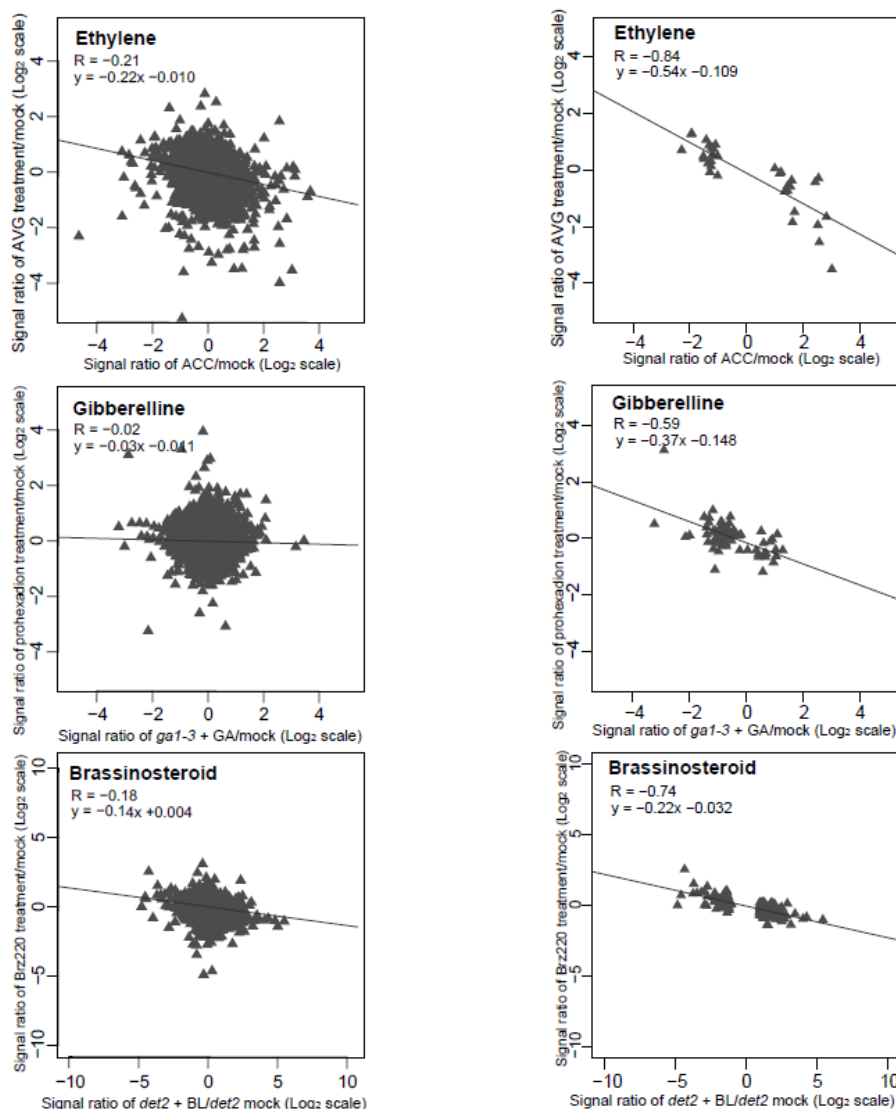
以上の結果から、作成したホルモン応答性遺伝子リストが妥当であり、このプロファイルを用いることで、各実験におけるホルモン応答を抽出して、それぞれのホルモンの応答レベルを評価することができると考えた。

**Table 2-3** ホルモンの関与が知られている実験データ

ホルモン名	実験概要（処理または変異体）	参考文献
オーキシン	IAA 3 h 処理 (Affymetrix 8K Chip)	Sawa <i>et al.</i> , 2002 [34]
サイトカイニン	ARR21C-ox（恒常的サイトカイニン応答）	Kiba <i>et al.</i> , 2005 [35]
アブシジン酸	浸透圧処理	Kilian <i>et al.</i> , 2007 [18]
ジャスモン酸	<i>B. cinerela</i> 接種 48 h	Kilian <i>et al.</i> , 2007 [18]
エチレン	AVG 処理(阻害剤)	Goda <i>et al.</i> , 2008 [19]
ジベレリン	プロヘキサジオン処理（阻害剤）	Goda <i>et al.</i> , 2008 [19]
ブラシノステロイド	ブラシナゾール処理（阻害剤）	Goda <i>et al.</i> , 2008 [19]



**Fig. 2-2** ホルモン処理実験とホルモン作用が既知の実験の遺伝子発現プロファイルの比較(上からオーキシン、サイトカイニン、アブシジン酸、ジャスモン酸) 左列はシロイヌナズナの全遺伝子、右列はホルモン応答性遺伝子の *sr* の比較を行った。X 軸はホルモン応答性プロファイルの *sr* (処理区: ホルモン処理、コントロール: mock 処理)、Y 軸はホルモンの関与が既知の実験の *sr* (Table 2-3)。



**Fig. 2-3** ホルモン処理実験とホルモン作用が既知の実験の遺伝子発現プロファイルの比較(上からエチレン、ジベレリン、ブラシノステロイド) 左列はシロイヌナズナの全遺伝子、右列はホルモン応答性遺伝子の *sr* の比較を行った。X 軸はホルモン応答性プロファイルの *sr* (処理区: ホルモン処理、コントロール: mock 処理)、Y 軸はホルモンの関与が既知の実験の *sr* (Table 2-3)。

### 2-3-2 モデル解析: ストレス処理時のホルモン応答の推定

本アプローチをシロイヌナズナのストレス応答[18]の発現プロファイルに適用し、各ストレス条件下におけるホルモン応答の状態の予測を試みた(Table 2-4)。このデータ

セットには、低温、乾燥、UV-B、塩ストレス、浸透圧ストレス、高温、傷害処理を与えた場合の経時変化のデータが含まれる。この中から、低温、浸透圧、UV-B、傷害処理のデータを選び、解析を行った。

**Table 2-4** モデル解析に用いたストレス処理実験データ[18]の概要

実験名	処理 <sup>a</sup>	サンプリング	age	反復回数
無処理区	無処理	地上部、地下部	13 d	2
低温ストレス処理	4 °C に静置	地上部、地下部	13 d	2
浸透圧ストレス処理	mannitol 300 mM 処理	地上部、地下部	13 d	2
UV-B 照射	処理開始時に、UV-B (1.8 W/m <sup>2</sup> ) を 15 min 照射	地上部、地下部	13 d	2
傷害ストレス処理	処理開始時に、ピンで葉に穴を開けた。(2 本/cm)	地上部、地下部	13 d	2

a: いずれも、0.5, 1, 3, 6, 12, 24 時間の処理時間で遺伝子発現プロファイルが調べられた。

浸透圧処理後すぐにアブシジン酸の応答が活性化される様子が確認された (Fig. 2-4)。アブシジン酸は浸透圧ストレスなどの環境ストレスへの応答において重要な役割を果たす[36]。地下部では地上部より早く応答がみられ、処理 0.5 時間後には応答が始まり、1 時間後にはほぼ平衡状態に達したが、地上部では処理 1 時間後になって応答がみられ、3 時間後に平衡状態に達した。この結果は、根ではじまったアブシジン酸の応答が地上部へと広がっている状態の推移を示唆しており、浸透圧処理として地下部のみを高濃度のマンニトールに浸漬するという Kilian ら[18]の実験方法に一致した。浸透圧ストレス処理と同様に、低温ストレス処理でもアブシジン酸の応答がみられたが、浸透圧ストレスに比べて遅く、処理後 6 時間以降であった。エチレン、ジャスモン酸の応答は傷害処理で活性化されており、これらのホルモンが傷害応答において重要な役割を果たすという報告と一致した[37, 38]。エチレンの強い応答は、浸透圧や UV-B 処理でもみられた。Mackerness ら[39]は、UV-B 処理によりシロイヌナズナのエチレン発生量が時間依存的に増加することを報告しており、解析結果はこれに一致する。

ストレス応答に関係するホルモンがストレス処理と高い正の相関を示す一方で、生長制御に関わるホルモンとの相関は弱い傾向があったが、ジベレリンの応答は浸透圧



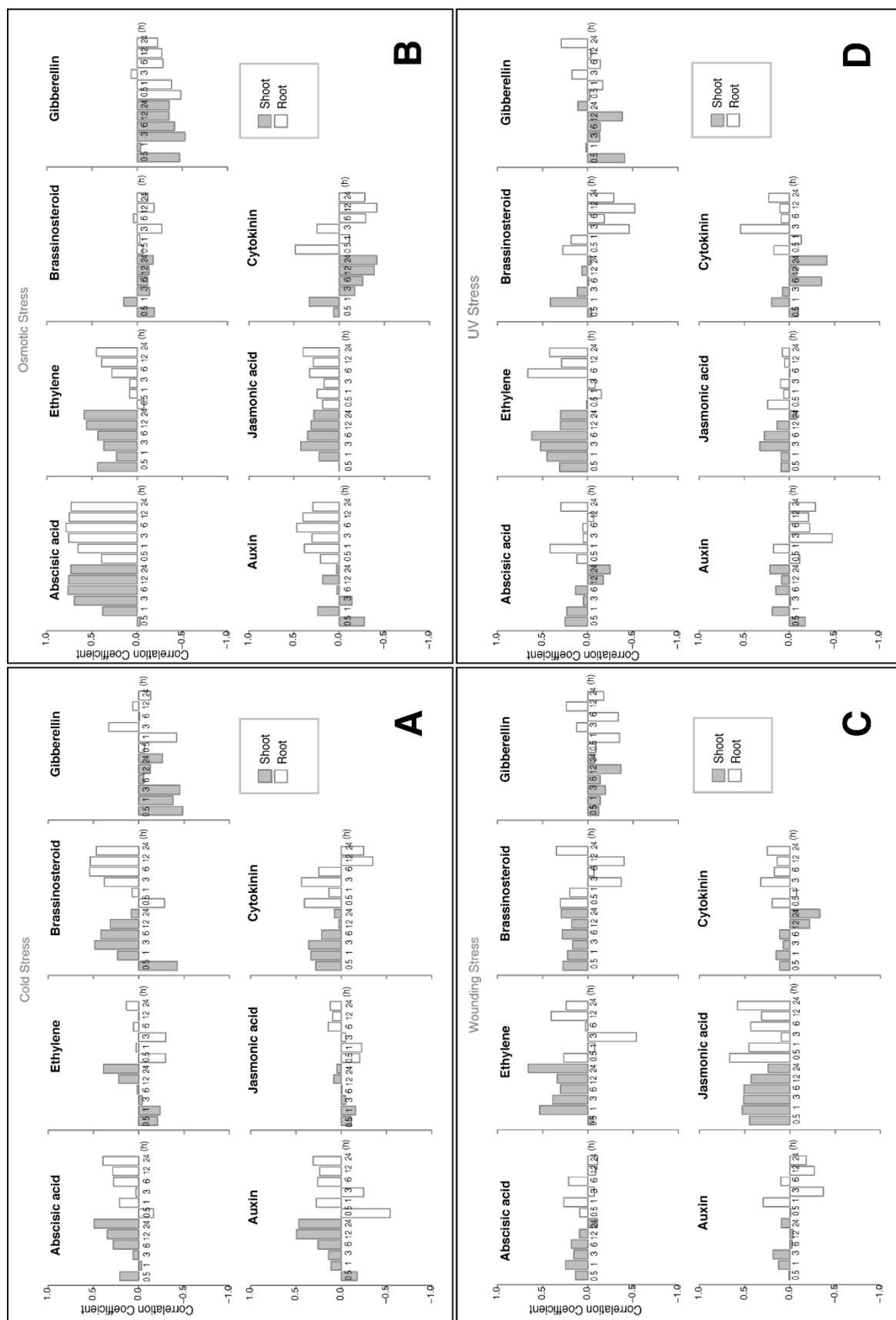
処理、低温処理の初期に不活性化された。ジベレリンの生合成が高浸透圧ストレス下で不活性化されるメカニズムは、Magome ら[40]、低温処理によって活性化が抑制されるメカニズムは Achard ら[41]による報告があり、これらと矛盾しない結果となった。サイトカイニンの応答は低温処理の初期に活性化した (Fig. 2-4)。サイトカイニンが低温ストレスに及ぼす影響に関する報告は殆どない。しかし近年、シロイヌナズナへのサイトカイニン処理やサイトカイニン内生量が増加した変異体 *amp1* で、低温耐性が上昇したという報告があるなど[42]、関与が示唆されている。今後、分子レベルの研究により、これらの関係が明らかにされることが期待される。

以上の結果から、ホルモン応答性遺伝子発現プロファイルを用いたホルモン応答の一斉分析は、既知のホルモンの機能を反映していると結論づけた。

## 2-4 まとめ

本章では、マイクロアレイデータを用いて植物のホルモンへの応答を調べる簡易な一斉検出法を構築した。ホルモン応答性遺伝子に着目して、ホルモン処理を行った実験と解析対象とする実験の遺伝子発現プロファイルの相関性を調べることで、ノイズが除去され、生理的な発現応答の類似性が検出できることが明らかになった。さらに、モデルケースとしてシロイヌナズナのストレス応答の経時変化の解析を行った結果、ストレス応答に関係するホルモンを中心に時間依存的な応答パターンが検出され、いずれも分子レベルで証明されている既知のホルモンの作用に合致した。以上の結果から、本手法はホルモン応答の一斉解析に有効だと考えられる。マイクロアレイデータを用いる利点は、すべての遺伝子の発現量が測定されているというデータの網羅性と保存性である。例えば、近年報告が相次ぐ新規な生理活性物質がどのような場面で作用しているのか調べたい場合、内生量の測定や定量 PCR によるマーカー遺伝子の解析では、改めて実験を行い、定量を行うことになるが、マイクロアレイデータを活用すれば、過去に行われた実験下で、植物がそれらの生理活性物質にどのような応答をしていたのかを調べることができる簡便さがある。さらに、特定のマーカー遺伝子の発現変動を指標にホルモンの応答を調べる場合には、時期や組織によってはマーカー

一遺伝子に十分な発現変動が見られない場合があるなどの問題がある。また、生合成遺伝子や負のレスポンスレギュレーターなど、フィードバック作用などが生ずるために、応答の方向性の判断が難しい場合もある。このような場合でも、ホルモン応答性プロファイルを用いた解析では応答性遺伝子群の発現変動を比較するため、個々の遺伝子の特異性が結果に与える影響が少なく、植物のホルモンに対する応答を安定して解析することができる。一旦、応答を調べたい活性物質毎に雛形となる応答性プロファイルを用意すれば、既に蓄積されている多くの実験条件下で、他のホルモンの応答と合わせて容易に調べることができる。このような理由からも、マイクロアレイデータによるホルモン応答の一斉解析は、技術的に難易度の高いホルモンの一斉定量のような手法を補完する解析法として有用性が高いと考えられる。



**Fig. 2-4** ストレス処理条件下でのホルモン応答の変化  
 A1GenExpress ストレス処理データ[18]のホルモンの状態を解析した。これらの実験データは、0.5-24 時間のストレス処理を行った地上部、地下部のデータから成る。グレイのバーは地上部、白抜きは地下部の結果を示す。次のデータセットについて、ピアソンの積率相関係数を計算した。(A) 低温処理、(B) 浸透圧処理、(C) 傷害処理、(d) UV-B 照射処理。

### 3章 公開マイクロアレイデータ統合のためのネットワーク解析法の確立

#### 3-1 緒言

マイクロアレイデータの比較解析は、遺伝子の変動傾向の一致や違いを明らかにすることができるため、化合物や遺伝子の機能予測に利用できる。例えば、機能未知の化合物処理の遺伝子発現プロファイルが、既知の化合物処理のプロファイルと高い正の相関関係を示す場合、これらの化合物は類似した活性を持つことが予測でき、前者の機能を予測することができる。すでにシロイヌナズナでは多様なマイクロアレイデータが蓄積されているが、これらを統合した大規模な比較解析を行うことによってプロファイル間の関係性が明らかになり、遺伝子の機能や化合物の作用、外部刺激などへの応答メカニズムについて新たな知見が得られると考えられる。

プロファイルの比較解析では、階層クラスター解析 (HCA) [43] や主成分分析 (PCA) [44] などの方法が用いられてきた。これらの解析法は、すべてのプロファイルを同じ遺伝子の組み合わせで比較する手法である。しかしながら、これらの解析手法は、ノイズに弱く、複数の実験環境から集められたマイクロアレイデータのプロファイルの比較解析には適さないことが指摘されてきた[29-31]。遺伝子の発現変動は実験処理によって引き起こされる以外にも、実験環境や生育状態の違いなどによっても起こり、これがノイズとなって処理による発現変動が検出しにくくなる。HCA や PCA では、あるプロファイルではノイズとなる遺伝子が、他のプロファイルではプロファイルを特徴付ける遺伝子であることも少なくないために、個々のプロファイルからノイズとなる値だけを取り除いて解析することができない。このため、実験処理に関係なく研究グループや試料の組織や生育ステージに特徴的なクラスターを検出してしまい、生物的に意味のあるクラスターが得られないこともある。この傾向は、比較解析を行うプロファイルの数が多くなるほど大きくなる。

この問題を解決するために、本研究ではプロファイルの中で処理に応答して特異的な発現変動を示す遺伝子群を用いて、プロファイル間の相関性を調べる手法を検討した。処理に特異的な発現変動を示す遺伝子群の発現パターンを手掛かりにして、化合物処理と病症のプロファイルを結びつけた例には、Connectivity Map [45]がある。

Lamb ら[45]は、文献情報から得た疾患のマーカーとなる遺伝子群と、その発現変動パターンをクエリーとして用い、クエリーに対して負の相関関係を示す化合物のプロファイルを探求することで治療薬の候補化合物を得ている。本研究でも、第 2 章でホルモン応答性遺伝子群のプロファイルを用いて各実験におけるホルモン応答を予測し、その有効性を示した[19]。このマーカー遺伝子群の発現パターンやホルモン応答性プロファイルは、ある生理的条件下において機能する遺伝子群の発現変動プロファイル(モジュールと定義する)であると考えることができる。それぞれの実験におけるモジュールは、各実験下での遺伝子発現変動を特徴づけている。あるプロファイルのモジュールが他のプロファイルでも見られる場合には、これらのプロファイルには類似した生理的な変化が生じていると考えることができる。

しかし、これまでの方法は既知の遺伝子や実験条件に基づいてモジュールを構築しており、マーカーが存在しない未知の変異体や化合物に適用することができない。このため、本研究では統計的な手法によるモジュールの作出を試みた。さらに、モジュールを使って求めたプロファイルの相関関係を可視化するために、有方向性のネットワーク解析を用い、さまざまなマイクロアレイ実験のプロファイルの生理的なつながりを予測する「リレーションマップ」を構築した。

本章では、「リレーションマップ」の構築について述べた後、植物ホルモン処理やホルモン関連変異体のプロファイルを中心として見られたプロファイル間のつながりについて報告する。また、リレーションマップを用いて行ったオーキシンの生合成欠損変異体 *sav3-2*[32]の機能予測解析の結果をまとめる。さらに、リレーションマップの検索、閲覧機能に加え、新たに取得したマイクロアレイデータの統合解析機能を備えたオンラインツール AtCAST について説明する。

## 3-2 方法

### 3-2-1 データの収集

マイクロアレイ実験データは、2 章と同様 AtGen 実験データを用いた。また、マイクロアレイデータベース GEO、NASC Array から化合物処理や変異体、栄養欠損処理の実験データを取得し、加えた。各実験データは、適切な対照区を有している。組織や生育ステージ別の遺伝子発現プロファイルのように対照区を持たない実験シリーズでは、遺伝子ごとに実験シリーズ全体でのメジアンを対照区の発現値として使用した。反復実験の再現性を確認するために回帰分析を行い、 $r^2 \geq 0.7$  を満たすデータペアだけを使用した。詳細な経時変化を調べた実験の多くは、処理時間にあまり差がないプロファイルの間には特徴的な応答の違いが認められなかったことから、リレーションマップを見やすくするために数データ(2 または 3)のみを選んで使用した。最終的に、195 実験(692 枚のマイクロアレイデータ)を以降の解析に使用した。

### 3-2-2 ノーマライズ

ノーマライズには、第 2 章と同様の手法、値を用いた。

### 3-2-3 発現変動した遺伝子の取得

処理区、対照区の反復実験を通じて、少なくとも一実験で有意な(Detection  $P$ -value  $< 0.01$ )発現が見られた遺伝子を用いて、解析を行った。

## 3-3 結果および考察

### 3-3-1 解析方法

#### 3-3-1-1 モジュールの作出

モジュールを構成する遺伝子を決定するための閾値は、同じ処理が与えられたプロファイルの間の相関係数が最も安定して高くなることを指標として調整した。詳細は後述のモジュールの評価の項で述べる。

まず、各実験のモジュールを決定するために、各実験で対照区と比較して有意に発現量が増加する遺伝子を抽出した(Student  $t$ -test  $P < 0.01$ )。抽出した遺伝子群の

発現量は  $sr$  に変換した後、 $sr$  の値に従って降順に並び替え、上位(発現量が上昇) 10 %、下位(発現量が低下) 10 %に含まれる遺伝子群のプロファイルをモジュールとして用いた。

### 3-3-1-2 プロファイルの相関関係の算出

プロファイル間の相関関係は、モジュールに基づき、スピアマンの順位相関(SCC)を用いて求めた。各プロファイルはそれぞれが固有のモジュールを持つため、2 つのプロファイルの間には、各モジュールに基づいて求められた 2 つの相関係数が与えられる。SCC A はプロファイル A から選ばれたモジュール A を使ってプロファイル B との相関関係を計算し、SCC B はプロファイル B から選ばれたモジュール B を使ってプロファイル A との相関関係を計算する。SCC は、実験データ A、B それぞれ対照区対処理区の  $sr$  (式 1)を用いて求めた。

$$\text{ログシグナルレシオ} \quad sr = \log_2 \left( \frac{\bar{x}}{\bar{y}} \right) \quad (1)$$

処理区発現値の平均( $\bar{x}$ )、対照区発現値の平均( $\bar{y}$ )

次に、SCC の値に基づき、相関関係が検出されたプロファイルをネットワークとして結合した(Fig. 3-1)。各ノード(白楕円)は個々の実験のプロファイル、エッジ(黒矢印)はプロファイル間に相関関係があることを示している。エッジは方向性を持っており、ノード「プロファイル A」からノード「プロファイル B」へ向かう矢印は、SCC A に基づいてモジュール A がプロファイル B と相関していることを表す。擬陽性のエラーを増加させることなく、なるべく多くの相関関係を検出するために、ノードをつなぐ閾値には次の 2 種類の値、低相関( $|SCC| \geq 0.5$   $n = 50$ ,  $P < 0.0001$ )と高相関( $SCC \geq 0.7$ ,  $n = 50$ ,  $P < 10^{-20}$ ,  $SCC \leq -0.65$   $n = 50$ ,  $P < 10^{-16}$ )を設けた。生物学的な関係性において、負の相関は正の相関に比べて検出が困難であることから[46]、負の相関の閾値には正の相関よりも緩い閾値を設定した。ノード間の相関は、次のように定義した。(A)比較対照している 2 つのプロファイル間でどちらの SCC も低相関を満たすが、いずれも高相関を満

たさない場合、このプロファイル間の関係は、両方向の低相関と定義した (Fig. 3-1A)。一方、(B) SCC のうちの 1 つだけが高相関を満たす場合、片方向の高相関と定義した (Fig. 3-1B)。(C) 2 つの SCC がいずれも高相関を満たす場合、両方向の高相関と定義した (Fig. 3-1C)。(D) プロファイル間の関係が低相関に加えて片方向の高相関を満たす場合は、低相関を示すエッジに高相関のエッジを重ね、ノード間の関係性が非対称であることを示した (Fig. 3-1D)。

相関の有意水準は、ブートストラップ法 (1000 回) を用いて以下の手順で求めた。まず、収集した 195 実験のプロファイルごとに *sr* を求めた後、プロファイル内で *sr* をランダムに並べ替え、遺伝子との正しい対応を失わせた。次に、*sr* を並び替えたプロファイルごとにランダムに 50 遺伝子を選び、自分自身を除くすべてのプロファイルとの間で SCC を計算し、得られた確率分布から有意水準を求めた。

### 3-3-1-3 モジュールの評価

評価は、同じ処理を施されたプロファイルが、どちらのプロファイルのモジュールを使って SCC を求めた場合も、安定して高い相関関係を示すことを指標とし、次のように行った。

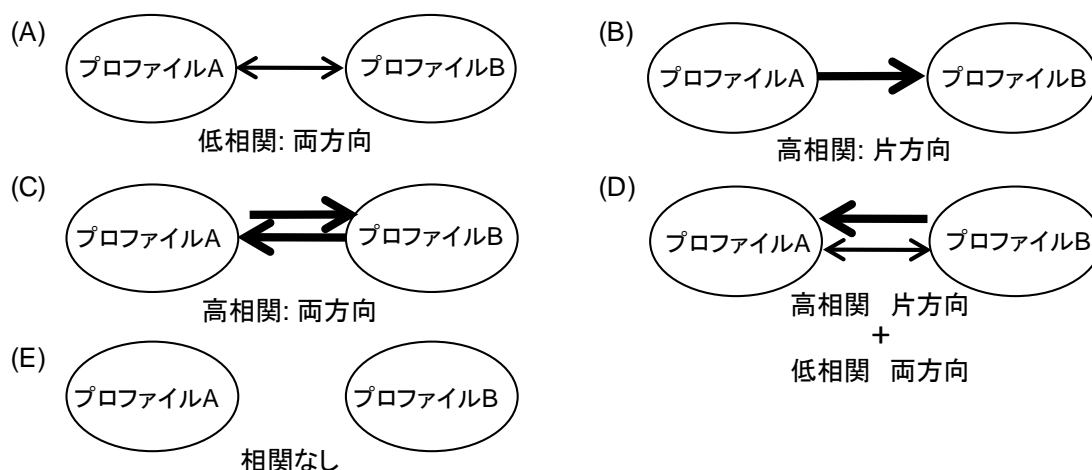
評価用のデータセットとして、異なる研究グループによって独立して行われた 8 処理、16 実験のデータを、マイクロアレイデータベースから集めた (Table 3-1)。この実験データから同処理のものを組にして 8 ペアを作成した。次に、Table 3-2 に示す各閾値でモジュールを決定し、このモジュールを使ってプロファイル間の SCC を求め、閾値ごとに集計した。各閾値は、それぞれペア 8 組×モジュール 2 から得られた 16 の SCC の分布を持つ。この分布を基に閾値の評価を行った (Fig. 3-2A)。

検討を行った閾値の略称は、Table 3-2 の通りである。SCC の集計の結果、「Non-filtering」を除いたモジュールを用いた場合は、例外を除いて、同じ処理を行ったプロファイル間に強い相関関係が検出された。「Non-filtering」は、相関係数のメジアンが 0.29 と最も低い値を示した。「Stringent *P*」と「*q*-value」は、得られた相関係数にばらつきがある他、「*q*-value」では外れ値が負の相関を示し、擬陽性のエラーがみられるなど、安定性に欠ける結果となった。「Stringent *P*」では、同様に外れ値が見られ、この値は有意な相関値ではなかった。一方で、緩やかな *P* 値と *sr* によって決定したモジュールは、ペア内で安定した相関を示した。特に、「Rank<sub>10%</sub>」の下側 4 分位点は 0.75



と高い値を示した。これらの結果は、Microarray Quality Control (MAQC)による研究で、緩やかな  $P$  値と Fold Change によって選択した遺伝子リストが最も信頼性の高いモジュールであったという結果[47]と一致した。

また、それぞれの閾値で決定したモジュールに含まれる遺伝子数の比較を行った (Fig. 3-2B)。 $P < 0.0001$  (at  $SCC = |0.5|$ )を満たす  $n$  の値は 50 であるが、「Stringent  $P$ 」と「 $q$ -value」、「f1.0」は著しく  $n$  の数が少なくなることがあり、すべてのプロファイルのモジュールの決定に使用することは難しいと考えられた。以上の検討結果より、モジュールには「Rank<sub>10%</sub>」が最も適していると結論づけた。



**Fig. 3-1 相関関係に基づくプロファイルの結合** ノード(楕円)は個々の実験の遺伝子発現プロファイル、エッジ(矢印)はプロファイル間に有意な相関があることを示す。太線は高相関、細線は低相関

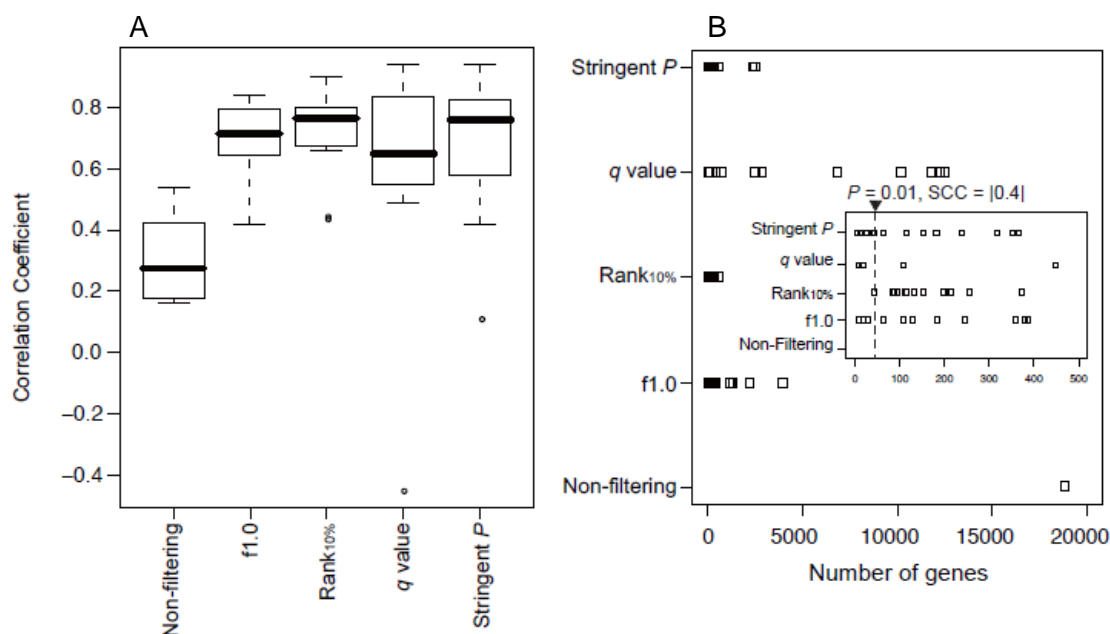
**Table 3-1** モジュールの評価に用いた実験セット

実験 ペア	処理 (処理時間)	組織 (生育ステージ)	オリジナル データ	アクセッション ID
1	Indole-3-acetic acid 1mM (3 h)	whole seedling (10 d)	GEO	GSE11110
	Indole-3-acetic acid 1mM (3 h)	whole seedling (7 d)	TAIR	1007965859
2	NaCl 140mM (1 h)	Root (5 d)	GEO	GSE7642
	NaCl 150 mM (1 h)	Root (18 d)	TAIR	1007966888
3	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> strain DC3000 (24 h)	Leaf	GEO	GSE5520
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> strain DC3000 (24 h)	Leaf (5 week)	TAIR	1008031517
4	Continuous red light (1 h)	whole seedling (4 d)	GEO	GSE3811
	Continuous red light (45 min)	hypocotyl and cotyledons (4 d)	TAIR	1007966126
5	Continuous cold/4 °C (24 h)	Shoot (18 d)	TAIR	1007966553
	Continuous cold/4 °C (24 h)	Shoot (rosette stage)	GEO	GSE6177
6	salicylic acid 10 mM (3 h)	whole seedling (7 d)	TAIR	1008080827
	salicylic acid 10 mM (3 h)	suspension cell culture (4 days post sub-culturing)	GEO	GSE3709
7	<i>t</i> -zeatin 1 mM (1 h)	whole seedling (7 d)	TAIR	1007966040
	<i>t</i> -zeatin 20 mM (1 h)	whole seedling (21 d)	TAIR	1008031453
8	Absciscic Acid 10 mM (3 h)	whole seedling (7 d)	TAIR	1007964750
	Absciscic Acid 1 mM (4 h)	whole seedling (7 d)	GEO	GSE3454

**Table 3-2** モジュールを決定する閾値

略称	閾値		
	<i>P</i> value ( <i>t</i> -test)	<i>sr</i>	
Stringent <i>P</i>	$p < 0.001$	-	
<i>q</i> -value	$q < 0.05$	-	
Rank <sub>10%</sub>	$p < 0.01$	&	上位下位 10%
f1.0	$p < 0.01$	&	$ sr  \geq 1.0$
Non-filtering <sup>a</sup>	-	-	

a: 有意に発現が検出された全遺伝子を使用。



**Fig. 3-2 モジュールを決定する4つの閾値の比較** A: 箱ひげ図はSCCの分布を示す。同じ処理を行った8種類の実験ペア (Table 3-1) を用いて、モジュールを決定する閾値を評価した。閾値の略称は Table 3-2 を参照。箱ひげ図は、メジアン値 (箱中央太線)、上側、下側4分位点 (箱上枠、下枠)、最大値、最小値 (箱上、箱下の水平線)、外れ値 (丸点) を表す。B: 各閾値によって選ばれた遺伝子数。プロットは、遺伝子数の分布を示す。差し込み図は遺伝子数0-500の範囲を拡大したもの。点線は、相関の有意水準 ( $P = 0.001$   $SCC = |0.5|$ ) を示す。

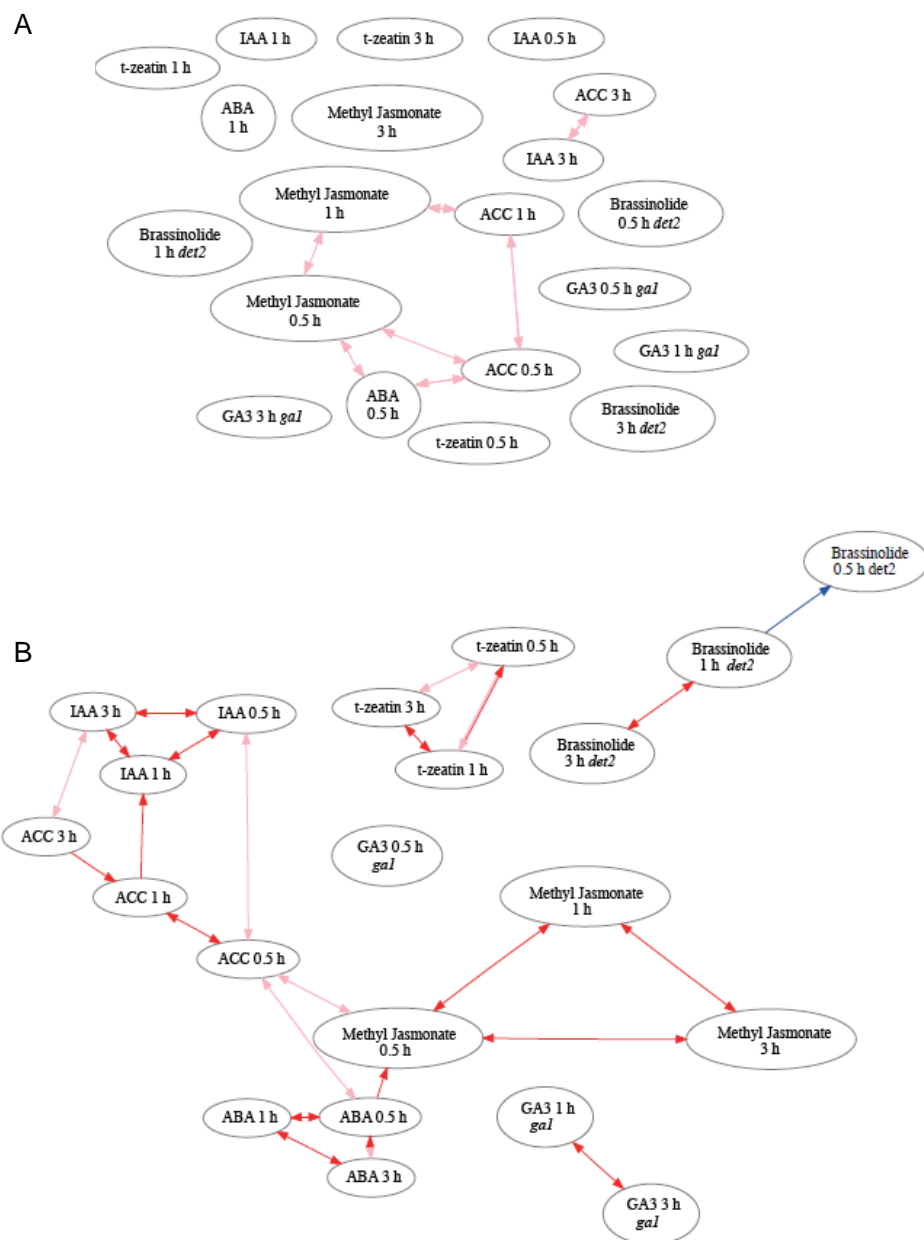
### 3-3-1-4 ネットワークの構築

はじめにモデルとして、AtGen 実験データから植物ホルモン処理シリーズのデータ [19] を用いてネットワークを作成し、評価を行った。データセットについては、第2章で述べた通りである (Table 2-1)。プロファイルの相関関係の検出には、上記の検討に基づいて閾値「Rank<sub>10%</sub>」によって選択したモジュールを用いた場合 (以降、モジュールネットワークと呼ぶ) と、用いなかった場合 (以降、基本相関ネットワークと呼ぶ) の二つのネットワークを構築して比較を行った。基本ネットワークは、ホルモン処理シリーズを構成する36マイクロアレイの中で少なくとも一度は発現した (Detection- $P$  value < 0.01) 15,943 遺伝子を全て用いて SCC を求めた。

基本ネットワークにおいて、「Methyl Jasmonate 0.5 h」、「ABA 0.5 h」、「ACC 0.5 h」の間、「Methyl Jasmonate 1 h」、「ACC 1 h」の間、「IAA 3 h」、「ACC 3 h」の間に正の

双方向の低相関がみられた(「」内は、実験名を示す。Fig. 3-3A)。これらは、異なるホルモン処理ではあるが同じ処理時間のプロファイルが相対的に強い関係性を示す傾向を示した。一方、モジュールネットワークでは、同じホルモン処理のプロファイルが正の高相関を示し、クラスターを形成した。例外的に「Brassinolide 1 h *det2*」と「Brassinolide 0.5 h *det2*」が負の高相関を示した(Fig. 3-3B)。これは、処理 0.5 時間後の時点で、シロイヌナズナのブラシノステロイドに対する応答が非常に弱かったため[19]、ブラシノステロイド応答性遺伝子はブラシノステロイド欠損状態を示してしまった可能性が考えられる(Fig. 3-3B)。

以上に見られるように、これらの結果は、モジュールを用いたネットワークがプロファイルの間にある生物学的な関係性を明らかにするために有効であることを示唆している。また、基本ネットワークに見られた関係性は概日周期やサンプルの生育ステージなどに起因する、実験上で意図しない要因が影響している可能性があると考えられた。



**Fig. 3-3 植物ホルモン実験によるモデルネットワーク** AtGenExpress [19]から36実験セットを用いた。A: SCCは36実験中で少なくとも一度は発現が見られた遺伝子群(15,943遺伝子)の遺伝子発現プロファイルを使って計算した。B, SCCはモジュール(「Rank<sub>10%</sub>」)を使って計算した。データセットについては、2章を参照 (Table 2-1)。ノード(楕円)は各実験の遺伝子発現プロファイル、エッジ(実線)はプロファイル間に相関関係があったことを示す。赤矢印: 正の高相関( $\geq 0.7$ )、青矢印: 負の高相関( $\leq -0.65$ )、ピンク矢印: 双方向の正の低相関( $\geq 0.5$ )、水色矢印: 双方向の負の低相関( $\leq -0.5$ )

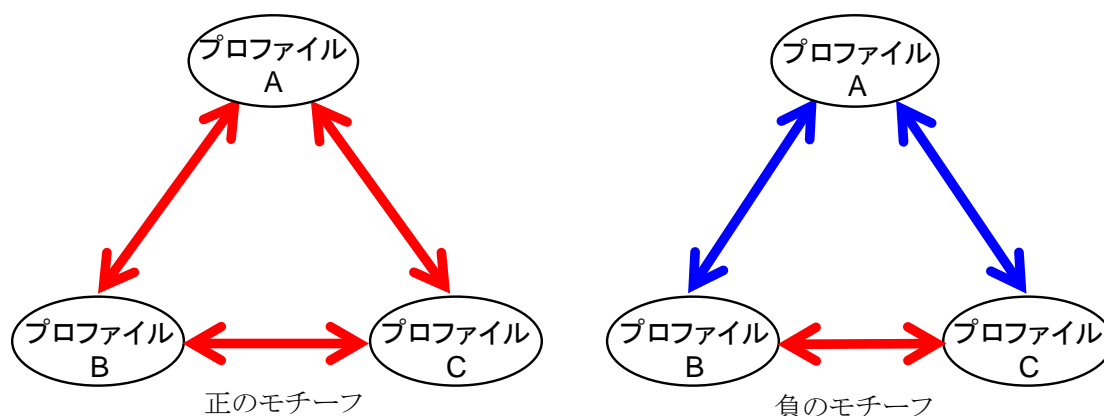
### 3-3-1-5 リレーションマップの概要

モデル解析の結果、モジュールを用いた解析によって、プロファイルが生物学的な関係性に基づく相関関係を表すことが示されたので、次に、Affymetrix 社の ATH1 GeneChip を用いたマイクロアレイ実験を収集し、シロイヌナズナのマイクロアレイ実験プロファイルの大規模なリレーションマップを作成した。これらのデータには、植物ホルモン処理、ストレス応答、化合物処理、組織・生育ステージ特異性、変異体の遺伝子発現プロファイルが含まれている (Table S3-1)。

リレーションマップの概要を述べると、多くのプロファイルは実験を実施した研究グループを超えて相関関係を示し、プロファイル間には生物学的に既知のつながりが見られた。大部分の実験は、最も大きな一つのクラスターに属したが、「Flowering mutants (shoot apex)」(開花変異体 茎頂)、「Imbibed seed」(発芽種子)と「GA treatment」(ジベレリン処理)は、独立したクラスターを形成した (Fig. 3-4)。

また、リレーションマップでは、3 ノードと 3 エッジから成るモチーフが数多く観察された。すべてのノードが正の相関で結ばれた正のモチーフは 3 つのプロファイル A、B、C が強い相関関係にあることを示し、2 本の負のエッジ A-B、A-C と 1 本の正のエッジ B-C で結ばれた負のモチーフは、B と C の間にある相関関係と、A、B 間、A、C 間の負の相関関係を互いに裏付けている (Fig. 3-5)。





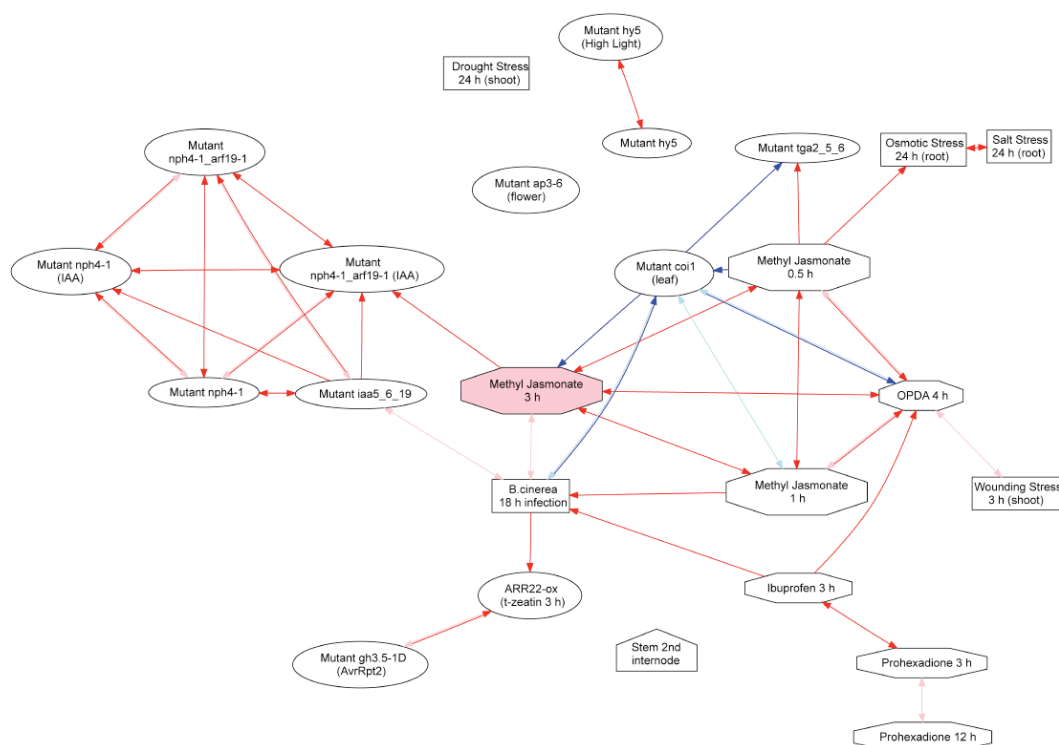
**Fig. 3-5 ネットワークを構成する最小クラスター** 3ノード(楕円)と3エッジ(矢印)から成るモチーフは、プロフィール間の相関関係を互いに支持し合う。すべて正の相関で結ばれた正のモチーフは3つのプロフィールA、B、Cのプロフィールが互いに類似していることを示し、2本の負のエッジと1本の正のエッジで結ばれた負のモチーフは、プロフィールAに対し負の相関関係にあるプロフィールBとCが類似関係にあることを示している。

### 3-3-1-6 ホルモン処理プロフィールを中心としたネットワーク構造

リレーションマップを詳細に検証するために、植物ホルモン処理プロフィールを中心として、ネットワークの構造を調べることにした。植物ホルモンは、植物の生長、分化やストレス応答など多面的に植物を制御する。このため、ホルモン処理実験の遺伝子発現プロフィールは、多様な実験のプロフィールをつなぐことが予測される。以下に、2章の化合物(Table 2-1)を用いて行った各ホルモン処理の中からジャスモン酸、アブシジン酸、ジベレリンを取り上げ、これらを中心として検出されたプロフィールとの関係について述べる。



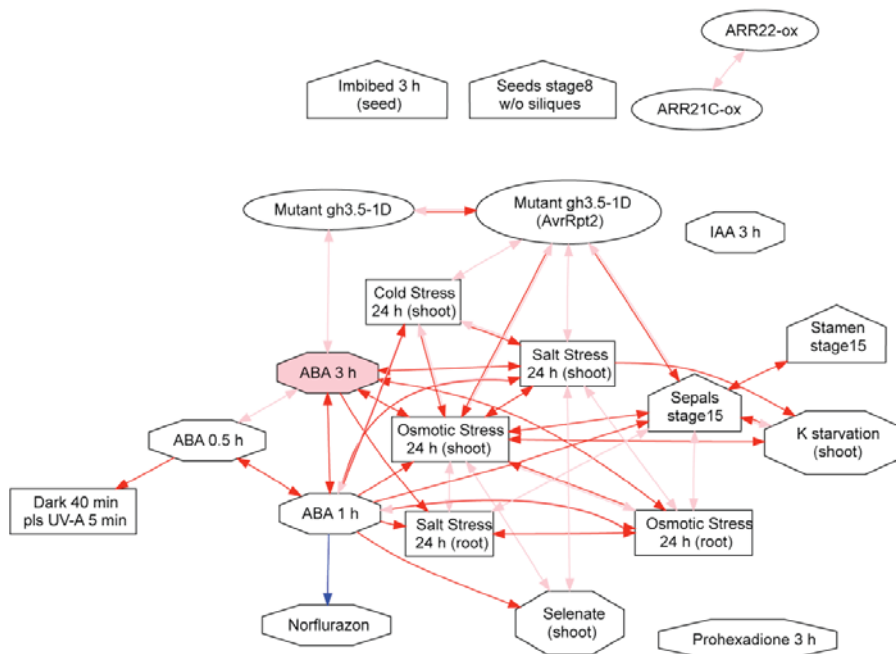
「Methyl Jasmonate 0.5 h」、「Methyl Jasmonate 1 h」、「Methyl Jasmonate 3 h」はジャスモン酸受容体欠損変異体「mutant *coi1*」[48, 49]と負の高相関を示し、ジャスモン酸生合成経路の中間体である「OPDA 4 h」(12-oxo-phytodienoic acid for 4 h)[8]と正の高相関を示した。「OPDA 4 h」は、「mutant *coi1*」と負の相関を示した。つまり、「Methyl Jasmonate」、「mutant *coi1*」、「OPDA 4 h」の間には Fig. 3-5 に示すような負のモチーフが存在し、相互の関係が強く裏付けられた。さらに、ジャスモン酸は様々なストレスのシグナル伝達を担うことが知られているが、「Methyl Jasmonate 1 h」、「Methyl Jasmonate 3 h」は「*B. cinerea* 18 h infection」(灰色カビ病菌接種処理 18 h)と正の相関を示した。ジャスモン酸処理は、ホルモン非感受性変異体、生合成中間体処理、糸状菌接種、ストレス処理など、ジャスモン酸の作用が既知のプロファイルをつなぐハブとなることが明らかになった(Fig. 3-6)。



**Fig. 3-6 「Methyl Jasmonate 3 h」を中心としたサブリリースンマップ** リレーションマップ中には、ピンク色の実験プロファイルと有意な相関関係(|SCC| ≥ 0.5)を満たすプロファイルが含まれる。赤矢印: 正の高相関(≥ 0.7)、青矢印: 負の高相関(≤ -0.65)、ピンク矢印: 双方向の低相関(≥ 0.5)、水色矢印: 双方向の低相関(≤ -0.5)。ノードの種類は、長方形: 環境刺激、楕円形: 変異体、五角形: 組織特異のプロファイル、八角形: 化合物処理。

## アブシジン酸

「ABA 1 h」、「ABA 3 h」は「Osmotic stress」(浸透圧ストレス処理)、「Salt stress」(塩ストレス処理)、「Cold stress」(低温ストレス処理)と正の相関を示した。アブシジン酸は、乾燥や高浸透圧条件などの環境ストレスに対する応答の中心的な役割を果たす[36]。「ABA 1 h」はアブシジン酸生合成阻害剤である「Norflurazon」処理に対し、負の高相関を示した。Norflurazon はカロテノイド生合成における phytoene 不飽和化のステップを阻害することから、アブシジン酸特異的な生合成阻害剤ではない[50, 51]。カロテノイドは様々な化合物生合成の上流に位置しており、新規生理活性物質として近年発見されたストリゴラクトンなどを含む物質が下流で合成される[12, 13]。つまり、様々な化合物の生合成経路に関する遺伝子発現が Norflurazon 処理によって影響を受けており、ABA 処理によって変動する遺伝子もその一部と考えられる。Norflurazon 処理のモジュールに含まれる遺伝子群は、より小さな単位のモジュールに分けることができ、アブシジン酸応答性遺伝子のモジュールも、その一つと考えられる (Fig. 3-7)。

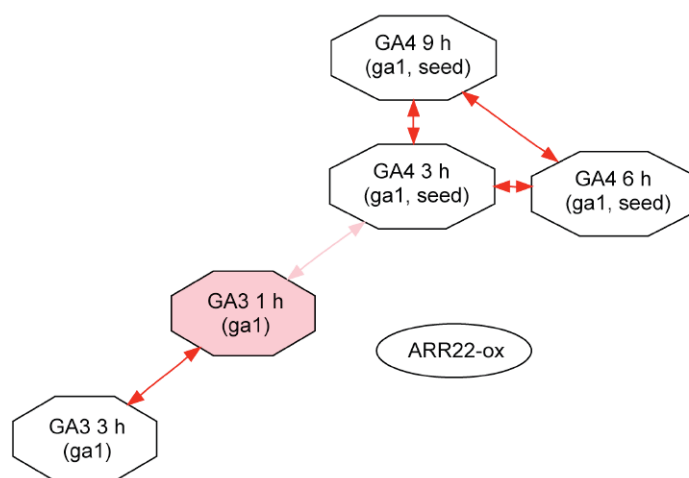


**Fig. 3-7「ABA 3 h」を中心としたサブリレーションマップ** リレーションマップ中には、ピンク色の実験プロファイルと有意な相関関係 ( $|SCC| \geq 0.5$ ) を満たすプロファイルが含まれる。赤矢印: 正の高相関 ( $\geq 0.7$ )、青矢印: 負の高相関 ( $\leq -0.65$ )、ピンク矢印: 双方向の低相関 ( $\geq 0.5$ )、水色矢印: 双方向の低相関 ( $\leq -0.5$ )。ノードの種類は、長方形: 環境刺激、楕円形: 変異体、五角形: 組織特異的プロファイル、八角形: 化合物処理。

## ジベレリン

リレーションマップには、花器官や茎の伸長部位を含む様々な組織や生育ステージのプロファイルが含まれており、ジベレリンはこれらの器官や生育ステージで機能することが広く報告されている。しかし  $GA_3$  処理(芽生え)は、他の研究グループが行った  $GA_4$  処理に対する種子の応答と正の低相関を示したものの、前述のように、他の処理や組織のプロファイルとほとんど相関を示さなかった。この結果から、種子と芽生えが外生ジベレリンに対して類似した応答を示すものの、外生ジベレリン処理のプロファイルは内生ジベレリンの変化を示すプロファイルと異なっていることが考えられる。

2 章では、既知のジベレリン阻害活性を持つ化合物処理との比較に基づいて、ジベレリンのホルモン応答性プロファイルを最適化した。リレーションマップでは類似した遺伝子応答が生じているプロファイルを検出することを目的として最適化した閾値でモジュールを選択しているため、両者の解析には、異なる結果が生じている可能性がある (Fig. 3-8)。



**Fig. 3-8 「GA<sub>3</sub> 1 h」、「GA<sub>3</sub> 3 h」を中心としたサブリレーションマップ** リレーションマップ中には、ピンク色の実験プロファイルと有意な相関関係 ( $|SCC| \geq 0.5$ ) を満たすプロファイルが含まれる。赤矢印: 正の高相関 ( $\geq 0.7$ )、青矢印: 負の高相関 ( $\leq -0.65$ )、ピンク矢印: 双方向の低相関 ( $\geq 0.5$ )、水色矢印: 双方向の低相関 ( $\leq -0.5$ )。ノードの種類は、長方形: 環境刺激、楕円形: 変異体、五角形: 組織特異的プロファイル、八角形: 化合物処理。

さらに、ここでは示さなかった他の植物ホルモン、オーキシシン、サイトカイニン、 brassinosteroid、エチレンについても、プロファイルの間に生物学的に既知の相関が確認された。(オーキシシンについては、*sav3-2* の解析、サイトカイニンについては、4 章にサブネットワークを示す。)

以上の結果から、リレーションマップは生物学的なプロファイル間の関係性を明らかにしていると結論づけた。プロファイル間の相関関係に加えて、モチーフやクラスターを構成する他のプロファイルは、データの解釈を助ける有力な手掛かりとなる。本アプローチはマイクロアレイの実験結果の解釈とともに生物学的に新規な仮説の構築に有用と考えられる。

#### 3-3-1-7 オンライン相関解析ツール AtCAST の開発

構築したリレーションマップを公開するために、マイクロアレイ実験プロファイルの相関解析ツール AtCAST (<http://igrt0.psc.riken.jp/>) の構築を行った。AtCAST はあらかじめデータベースに用意されたリレーションマップを検索、閲覧するビューワーと、研究者らが自分自身のデータをリレーションマップに統合して解析するツールで構成される。

トップ画面 (Fig. 3-9A) から、「検索メニュー」(Fig. 3-9B)、「解析メニュー」(Fig. 3-9C) のいずれかを選択し、コンテンツに入る。「検索メニュー」からリレーションマップを閲覧する場合には、「Experimental category」、「Genotype」、「Type of treatment」、「Tissue」から実験を選択する。「解析メニュー」から、ユーザーが自分のデータファイルを解析する場合には、データアップロードのページからデータをサーバに送る。解析終了後、AtCAST からユーザーに対して、解析結果を表示する URL が記載された E-mail が配信される。結果ページ (Fig. 3-9D) は、サブリレーションマップと、これに含まれる実験のリストの 2 つのセクションで構成される。

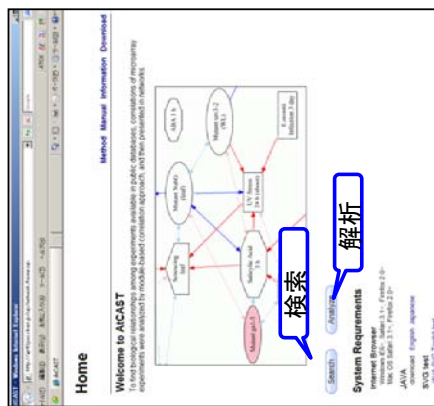
解析結果の詳細を Fig. 3-10 に示す。サブリレーションマップ (Fig. 3-10A) には、検索した実験、あるいは自分の送信したデータと有意な相関関係 ( $|\text{SCC}| \geq 0.5$ ) があつた実験のプロファイル群が含まれる。各ノードはクリックابلマップになっており、クリックしたノードを中心とするサブリレーションマップにリンクしている。実験リスト (Fig. 3-10B) は、1. 「Experiment」、2. 「Genotype」、3. 「Treatment/Tissue」、4. 「Control experiment」、5. 「Experimental Category」、6. 「Correlation」、7. 「Gene list」、それぞれの情報を示す。

「Treatment/Tissue」は、オリジナルのデータが公開されているデータベースの実験情報のページへリンクしており、実験条件の詳細を確認することができる。「Correlation」は、プロファイル間の 2 つの SCC: クエリー実験から相関のあったプロファイルへの SCC(上側の値)と、逆方向の SCC(下側の値)を表す。各矢印は、モジュールとプロファイルの相関情報(Fig. 3-10C)にリンクしている。このページは、プロファイル間の *sr* の比較(散布図)と、モジュールに含まれる遺伝子の情報(表)を表示している。二つ並んだ散布図の左側は全遺伝子のプロファイルの比較、右はモジュールを用いたプロファイルの比較である。この散布図をクリックすると、モジュールの散布図が拡大表示されるが(Fig. 3-10D)、拡大図では AGI コード、または遺伝子名がプロット上に表示される。散布図は、二つのプロファイルの比較に有効な手段である。プロファイルが部分的な相関関係を示す場合には、発現の変動が一致する遺伝子群や一致しない遺伝子群を容易に確認することができる。散布図の拡大、縮小を容易にするため、ファイルには SVG フォーマットを用いた。表は、モジュールに含まれる遺伝子リストとして、8.「Probe ID」、9.「AGI Code」、10.「Annotation」(TAIR 8 ゲノムアノテーション)、11.「gene expression」(*sr*)を示している。

「Gene list」の「Statistics」ボタンは、基本統計情報(Fig. 3-10E)にリンクしており、生データに関する統計情報が表示される。散布図は対照区、処理区それぞれの反復実験の再現性を示す。DNA マイクロアレイ実験では実験の反復が少ない事が多く、再現性の低いデータが混ざっていた場合には精度の低い結果しか得られない可能性がある。また、公開されているマイクロアレイデータには誤ったアノテーションが付けられている事もあり、例えば誤ったラベルが付けられたデータが混ざっていた場合には、誤った結論を導き出すことになりかねない。このため、反復実験の再現性を確認することは、エラーを回避する上でも非常に重要である。画面の下表は、データに含まれる全遺伝子の情報を示す。12.「probeID」、13.「AGI code」、14.「Signal Ratio」、遺伝子の発現変動として Student *t*-test の結果を 15.「*p*-value」、16.「*q*-value」に示した(Fig. 3-10F)。

また、AtCAST で検索が可能な、あらかじめ計算された相関情報はタブ区切りテキスト形式でダウンロードすることができ、Cytoscape[52](<http://www.cytoscape.org/>)などのネットワークソフトにインポートし、任意の閾値でネットワークを再構築することができる。

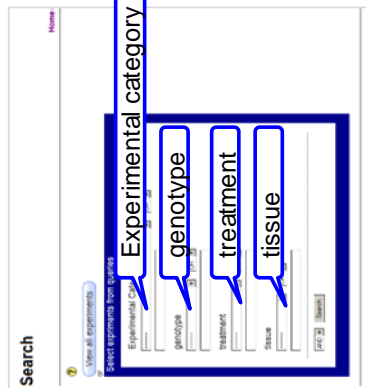
(A) AtCASTトップ画面



データベースに  
用意された実験データを  
選択

<http://igrt0.psc.riken.jp/cgi/network/home.cgi>

(B) 検索メニュー

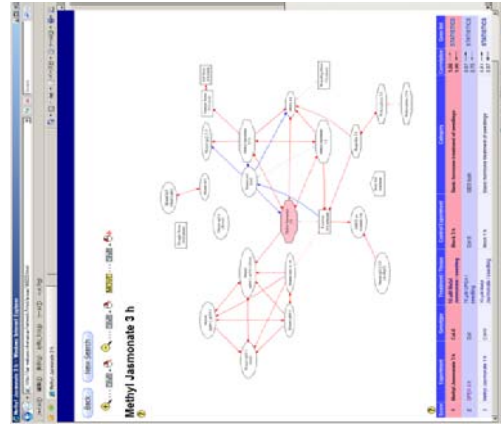


(C) 解析メニュー



用意したアレイデータを  
アップロード

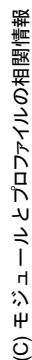
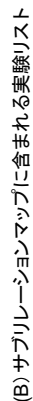
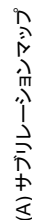
(D) 結果表示画面



解析終了後、解析結果を表示  
するためのURLがE-mailで配信  
される。

**Fig. 3-9 AtCAST の概要** スクリンショットを用いて操作手順を説明する。(A) AtCAST トップ画面で、検索、解析いずれかのボタンを選択して、コンテンツに入る。(B) 検索メニューから用意されたリレーションマップを検索、閲覧するときには、「Experimental Category」、「Genotype」、「Type of treatment」、「Tissue」から実験を選択する。(C) 「解析メニュー」から、ユーザーが自分のデータファイルを解析する場合には、データアップロードのページからデータをサーバに送る。解析終了後、AtCAST からユーザーに対して、解析結果を表示する URL が記載された E-mail が配信される。(D) 結果ページは、サブリレーションマップと、これに含まれる実験のリストの 2 つのセクションで構成される。





**Fig. 3-10 解析結果の詳細** (A) サブリレーションマップ。クエリーと有意な相関関係 ( $|SCC| \geq 0.5$ ) があったプロファイル群が含まれる。各ノードはクリッカブルとなっており、クリックしたノードを中心とするサブリレーションマップにリンクしている。(B) サブリレーションマップに含まれる実験のリスト。1. Experiment, 2. Genotype, 3. Treatment/Tissue, 4. Control experiment, 5. Experimental Category, 6. Correlation, 7. Gene list, 8. Probe ID, 9. AGI Code, 10. Annotation (TAIR 8 による遺伝子のアノテーション), 11. gene expression (sr) の詳細を確認することができる。「Correlation」は、プロファイル間の 2 つの SCC: クエリー実験のモジュールから相関のあったプロファイルへの SCC (上側の値) とクエリー実験プロファイルへ相関のあったモジュールからの SCC (下側の値) を表す。SCC 脇の各矢印は、(C) モジュールとプロファイルの相関情報にリンクしている。散布図は、プロファイル間の sr の比較である。表は、モジュールに含まれる遺伝子の情報として、8. Probe ID, 9. AGI Code, 10. Annotation (TAIR 8 による遺伝子のアノテーション), 11. gene expression (sr) を表示している。(D) 拡大散布図は、AGI コード、遺伝子名をプロット上に表示したものである。「Gene list」の「Statistics」ボタンは(E) 「基本統計情報」にリンクし、反復実験の再現性(散布図)や、変動遺伝子に関する基本的な統計情報(表)を示す。表中は、全遺伝子の 12. probeID, 13. AGI code, 14. Signal Ratio および Student-t-test の結果を 15. p-value, 16. q-value に示した。

### 3-3-2 モデル解析

#### 3-3-2-1 *sav3-2* 変異体の機能解析

リレーションマップを用いた遺伝子機能解析の一例として、*sav3-2* 変異体の解析結果について述べる。*sav3-2* は、オーキシン生合成欠損変異体である[32]。*TAA1/SAV3* 遺伝子はL-トリプトファンを基質としたインドールピルビン酸(IPA)合成を触媒するアミノトランスフェラーゼである。*SAV3* の欠損変異体は、日陰条件で胚軸伸長や葉の展開角度が鋭利になるなどの避陰応答を喪失する。この変異体は日陰で誘導される急激なオーキシンレベルの上昇が起こらないことが報告されている[32]。ここでは、Tao ら[32]が報告した「mutant *sav3-2* (SH)」(遠赤色光の比率を上げた光の照射によって日陰条件をシミュレートした条件下に置いた *sav3-2* を野生型と比較した)のプロファイルに注目し、その機能解析を試みた。

「mutant *sav3-2* (SH)」を中心としたサブリレーションマップを Fig. 3-11 に示す。このリレーションマップには、「mutant *sav3-2* (SH)」と有意な相関関係 ( $|SCC| \geq 0.5$ ) があつた実験のプロファイル群が含まれている。「mutant *sav3-2* (SH)」は「IAA 0.5 h」、「IAA 1 h」、「IAA 3 h」と負のモチーフを構成し、オーキシン処理のプロファイルとの間に負の高相関があることが示された。一方、「mutant *sav3-2* (WL)」(白色光下で生育させた *sav3-2* と野生型を比較した)はオーキシン処理のプロファイルと負の相関を示さなかった。この結果は、*sav3* のオーキシン内生量の低下は、特に日陰条件下で観察されるという Tao ら[32]の報告と一致した。

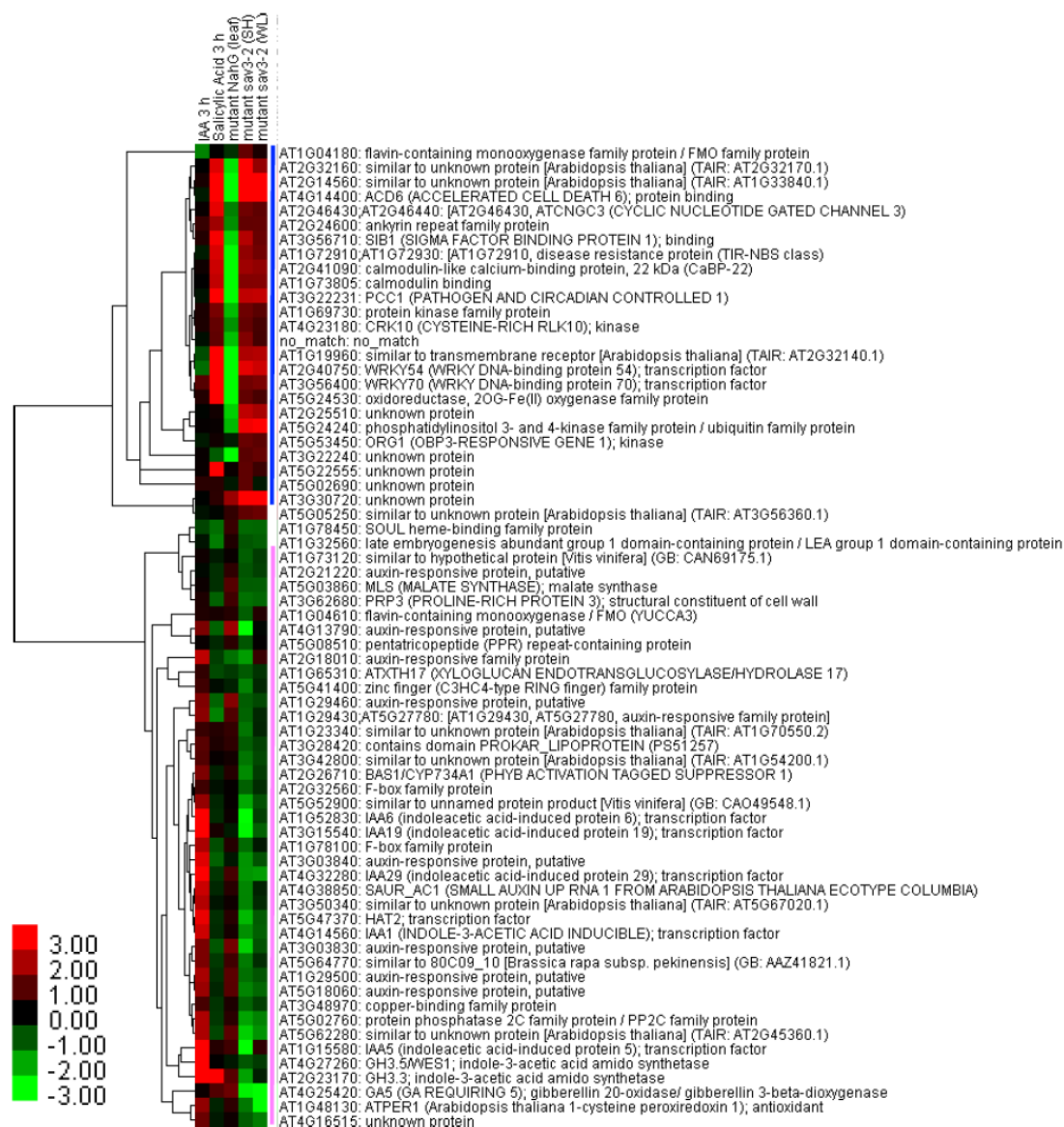
「mutant *sav3-2* (SH)」のサブリレーションマップは37のプロファイル(Fig. 3-11、Table 3-3)が含まれた。これらのうち 19 プロファイルは、「IAA 1 h」、「IAA 3 h」の少なくともいずれか一つのサブリレーションマップに含まれており、*sav3-2* がオーキシンに関わる変異体であることを裏付けた。一方で、17 プロファイルは「Salicylic acid 3 h」(サリチル酸処理と対照区の比較)に含まれていた。「mutant *sav3-2* (SH)」はサリチル酸処理[19]と正の相関を示し、一方でサリチル酸蓄積欠損変異体 *NahG* 株[53]のプロファイル「mutant *NahG* leaves」[48]と負の相関を示した。つまり、これらの3つのプロファイル「mutant *sav3-2* (SH)」、「Salicylic acid 3 h」、「mutant *NahG* leaves」は負のモチーフを示し、*sav3-2* とサリチル酸のプロファイルの類似性を支持している。「mutant *sav3-2* (SH)」、「Salicylic acid 3 h」ではサリチル酸応答性遺伝子 *WRKY54* (AT2g40750)、*WRKY70* (AT3g56400)、*ACD6* (AT4g14400)、*PCC1* (AT4g38550)の発現量が野生型



に比べて増加しており、オーキシン応答性遺伝子 *SAUR* (AT3g03830)、*IAA5* (AT1g15580)、*IAA29* (AT4g32280)、*GH3.3* (AT2g23170)の発現量は減少していた。一方、「mutant *NahG* leaves」においては、サリチル酸応答性遺伝子の発現量が減少し、オーキシン応答性遺伝子の発現量が増加した (Fig. 3-12)。

白色光下で生育させた *sav3-2* ではオーキシン応答性遺伝子の発現レベルは、*IAA19*(AT3g15540)を除いて野生型と変わらなかったが、サリチル酸応答性遺伝子 *WRKY54*、*WRKY70*、*ACD6*、*PCC1* は光条件に関わらず有意なレベル ( $p < 0.001$ )で発現量が増加した (Fig. 3-12)。これらの結果は、*TAA1/SAV3* に制御されるオーキシン応答性遺伝子は光の影響を受けるが、サリチル酸応答性遺伝子は光条件の影響を受けないことを示唆している。*WRKY70* はサリチル酸を介する植物の老化や、ジャスモン酸、エチレンとは独立した防御応答経路に関与する[54]。*ACD6* と *PCC1* も同様に、サリチル酸が関与する防御応答経路の正の制御因子として機能する[55, 56]。Zhang ら [57]は、*GH3.5* はサリチル酸とオーキシンの信号伝達経路の双方で機能することを報告している。本結果は、オーキシンとサリチル酸の間のクロストークが存在することを示唆しており、*TAA1/SAV3* がこのクロストークポイントにおいて機能する可能性を示唆した。*sav3* のモジュールは、複数のモジュールに分けることができ (Fig. 3-12)、オーキシンやサリチル酸のモジュールはその構成要素となっていることがリレーションマップから明らかになった。





**Fig. 3-12 「mutant sav3-2 (SH)」で変動する遺伝子群のオーキシン、サリチル酸関連プロファイルでの発現変動** 「mutant sav3-2 (SH)」で有意に変動した遺伝子 ( $p \leq 0.01$ ,  $|sr| \geq 1$ ) を抽出し、「IAA 3 h」、「Salicylic Acid 3 h」、「mutant NahG (leaf)」、「mutant sav3-2 (WL)」の *sr* を合わせて階層クラスター解析を行った。ヒートマップ右横の青線はサリチル酸処理に応答した遺伝子、ピンク色の線はオーキシン処理に応答した遺伝子を示した。カラーバーは、*sr* レベルを示す。

**Table 3-3 「mutant *sav3-2* (SH)」のサブネットワークに含まれるプロファイルリスト**

No	Experiment name	Genotype	Tissue	Control	SCC	IAA 1 h	IAA 3 h	SA 3 h
1	Mutant <i>sav3-2</i> (SH)	<i>sav3-2</i>	seedling	Col-0 (SH)	1.0 (1.0)	●	●	●
2	Mutant <i>sav3-2</i> (WL)	<i>sav3-2</i>	seedling	Col-0 (WL)	0.83 (0.92)		●	●
3	IAA 1 h	Col-0	seedling	Mock 1 h	-0.76 (-0.73)	●	●	
4	IAA 3 h	Col-0	seedling	Mock 3 h	-0.75 (-0.68)	●	●	
5	Mutant <i>nph4-1_arf19-1</i> (IAA)	<i>nph4-1 arf19-1</i>	seedling	Col (IAA)	0.72 (0.41)	●	●	
6	Mutant <i>hy5</i>	<i>hy5</i>	seedling	Col-0	-0.72 (-0.38)	●		
7	Senescing leaf	Col-0	senescing leaves	Control for tissue data	0.68 (0.08)			●
8	Mutant <i>siz1-3</i>	<i>siz1-3</i>	not identified	Col-0	0.68 (0.37)			●
9	Mutant <i>NahG</i> (leaf)	<i>NahG</i>	leaves	Col-0 (leaf)	-0.67 (-0.54)			●
10	IAA 0.5 h	Col-0	seedling	Mock 0.5 h	-0.64 (-0.56)	●	●	●
11	Salicylic Acid 3 h	Col-0	seedlings	Mock 3 h	0.64 (0.55)			●
12	Mutant <i>cry1</i>	<i>cry1</i>	seedling	Col-0	-0.63 (-0.3)			
13	Mutant <i>cry1</i> (High Light)	<i>cry1</i>	seedling	Col-0 (High Light)	-0.62 (-0.21)			
14	UV Stress 24 h (shoot)	Col-0	shoots	Stress mock 24 h (shoot)	0.61 (0.40)			●
15	Mutant <i>nph4-1</i> (IAA)	<i>nph4-1</i>	seedling	Col (IAA)	0.61 (0.40)	●	●	
16	Prohexadione 12 h	Col-0	seedling	Mock 12 h	0.60 (0.13)			●
17	FR Light 4 h	Col-0	seedlings	WhiteLight 4 h	0.60 (0.61)	●	●	
18	Brassinolide 1 h (det2)	<i>det2-1</i>	seedling	Mock 1 h (det2)	-0.59 (-0.39)	●		
19	Rosette leaf No12	<i>gl1-T</i>	rosette leaf #12	Control for tissue data	0.59 (0.33)			
20	Mutant <i>arf2-6</i> (IAA)	<i>arf2-6</i>	seedling	Col (IAA)	-0.59 (0.04)		●	
21	Brz220 12 h	Col-0	seedling	Mock 12 h	0.57 (0.29)	●		
22	AgNO3 3 h	Col-0	seedling	Mock 3 h	0.56 (0.38)	●		●
23	Sepals stage15	Col-0	flowers stage 15, epals	Control for tissue data	0.56 (0.04)			●
24	Mutant <i>iaa17-6</i>	<i>iaa17-6</i>	seedling	Col	0.56 (0.24)			
25	FR Light 45min	Col-0	seedlings	WhiteLight 45min	-0.55 (-0.71)	●	●	●
26	RedLight 45min	Col-0	seedlings	WhiteLight 45min	-0.55 (-0.61)	●	●	
27	Mutant <i>clv3-7</i> (flower)	<i>clv3-7</i>	flower stage 12	Flowers stage12	-0.55 (-0.24)			
28	Propiconazole 12 h	Col-0	seedling	Mock 12 h	0.53 (0.11)	●		
29	E.orontii Infection 6 h	Col-0	leaves	Uninfection 6 h	-0.53 (0.02)			
30	Mutant <i>axr3-1</i>	<i>axr3-1</i>	seedling	Col	0.53 (0.30)			●
31	Osmotic Stress 24 h (shoot)	Col-0	shoots	Stress mock 24 h (shoot)	0.52 (-0.05)			●
32	Heat Recovery 24 h (shoot)	Col-0	shoots	Stress mock 24 h (shoot)	0.51 (0.5)			
33	Mutant <i>iaa5_6_19</i>	<i>iaa5 iaa6 iaa19</i>	seedling	Col	0.50 (0.15)		●	
34	Mutant <i>siz1-3</i> (Drought)	<i>siz1-3</i>	not identified	Col-0 (Drought)	0.50 (0.17)		●	●
35	Blue Light 4 h	Col-0	seedlings	WhiteLight 4 h	0.40 (0.50)	●		
36	Ibuprofen 3 h	Col-0	seedlings	Mock 3 h	0.32 (0.71)			●
37	PNO8 3 h	Col-0	seedlings	Mock 3 h	0.21 (0.55)			●

### 3-4 まとめ

本章では、公開マイクロアレイデータベースから収集した大規模な実験のプロファイルの生物学的な関係性を可視化するリレーションマップを作成した。このアプローチは、マイクロアレイに含まれる実験プロトコルやサンプル調製などに起因するノイズの影響を受けにくく、プロファイル間の生物学的な関係性を検出することができた。

この応用として、リレーションマップは化合物の新しい活性などの検出にも利用できると考えられる。例えば、ホルモン処理と化合物間の強い負の相関関係は、化合物処理によってホルモンの応答が強く抑制されていることを示し、この関係に基づいて阻害剤を探索することもできるだろう。また本章で示したように、化合物処理と変異体のプロファイルの相関関係から、基質と代謝酵素や信号伝達因子と受容体などの関係性が明らかになる可能性がある。今後、さらなる解析によって、化合物の活性や変異体の機能について新しい知見を得ることができると考えられる。

一方で、今回作成したリレーションマップは、その全体ネットワークにおいても、いくつかの実験プロファイルは他のプロファイル群と相関関係を示さない傾向が見られた。この結果は、生物学研究の傾向や、今回収集した実験データが多くのマイクロアレイ実験の一部に過ぎないことが原因となり、それぞれのクラスターをつなぐような遺伝子発現変動を示すプロファイルが欠けている状態を示している可能性がある。個々のマイクロアレイデータは、各実験条件における遺伝子発現の状態を映し出すスナップ写真のようなものであるが、リレーションマップによってこれらが映し出す様々な場面を関係づけていくことによって、細胞内の生理的なプロセスのつながりを予測するネットワークが構築されていくと考えられる。データベース上のマイクロアレイ実験の数が増加するにつれて、リレーションマップ上では、独立したクラスターの間につながりが現れ、本解析手法はマイクロアレイデータの解釈の上で一層有効な手段となっていくと期待される。

## 4章 植物生長調節物質の新規機能の解析

### 4-1 緒言

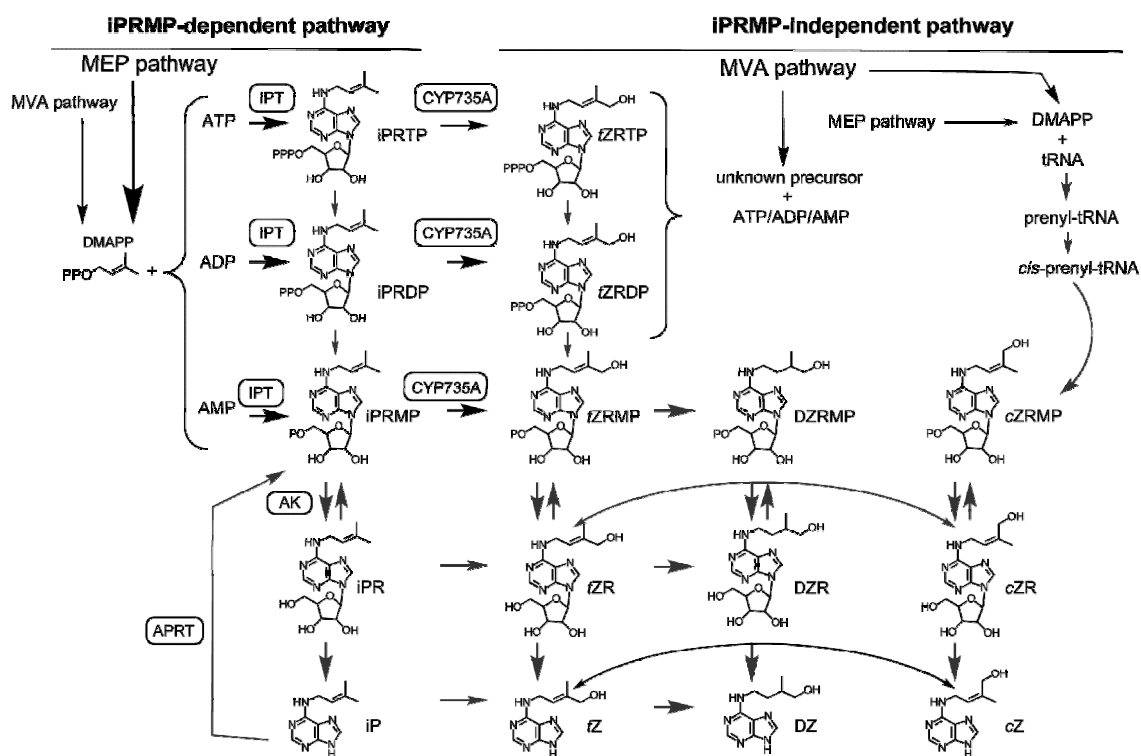
ケミカルジェネティクスは Schreiber ら[58]によって提唱された概念で、遺伝学における変異の役割を化合物に置き換えるものである。近年では、植物研究の分野でも広く使われるようになった[59]。従来の正遺伝学は、ある表現型を引き起こす原因遺伝子を同定することから遺伝子の機能を特定し、一方、逆遺伝学では解析の対象とする遺伝子に変異を与えた時に生ずる表現型から遺伝子の機能を特定する。ケミカルジェネティクスでは、化合物を用いて一過的な変異と同等の効果を植物体に引き起こし、これによって生ずる表現型を観察する。時期や組織特異的に変異を生じさせることができるほか、構造的にホモロジーが高いタンパク質を同時に標的にすることもできるため、冗長性が高い遺伝子の機能解析や生合成、代謝経路の研究ツールとして有用性が高い。植物ホルモン研究においても、これまでにブラシノステロイド阻害剤やオーキシン、アブシジン酸のアゴニストなどが新しい変異体のスクリーニングに使われており[60-62]、ホルモンの生合成や信号伝達経路の解明に大きな成果を上げている。しかしながら、有効な化合物が発見されていないために未だケミカルジェネティクスが適用できない植物ホルモンも存在する。そのひとつがサイトカイニンである。

サイトカイニンは、植物の細胞分裂を促進させる DNA の分解産物として発見された[63]。植物の生長制御において、非常に多様な役割を有しており、近年の研究により、細胞分裂、器官形成や再分化、葉の老化、頂芽優性、維管束の発達、防御応答、栄養の移動、根の伸長抑制などが報告されている[64]。生合成経路は、非メバロン酸経路を主要経路として *trans* ゼアチンを生成する経路と、メバロン酸経路を主要経路として *cis* ゼアチンを生成する経路が知られている。シロイヌナズナでは未だ証明されていないが、*trans*、*cis* ゼアチンの間では酵素的に変換が起こる可能性が示唆されているなど[65]、非常に複雑で冗長な経路と考えられている (Fig. 4-1)。サイトカイニンでは、生合成を特異的に阻害する化合物や、通常の生育条件下で内生量が減少する変異体が見つかっていないが、その理由としては生合成経路の冗長性や、完全な欠損状

態では個体が生育できないことなどが挙げられる。また、植物体を扱いやすい生育の初期段階では、簡易な *in vivo* スクリーニングの指標となる特異的な欠損状態を示す表現型がはっきりしていないことも、阻害剤や変異体の発見を困難にしているといえる。サイトカイニンの機能や生合成経路には不明な点が多く残されているが、サイトカイニンの機能を特異的に阻害するような化合物が開発されれば、これらの研究の有力なツールとなることが期待される。

そこで本研究では、サイトカイニンを取り上げ、2章、3章で述べた解析系を適用してサイトカイニンの応答を低下させる化合物を探索し、その機能解析を行うことにした。植物生長調節物質として知られる化合物には、主な作用に加えて複数の標的を有するものも多い。これらは特異性が低い反面、副作用の特定によりホルモン阻害剤のリード化合物として有用な情報をもたらす可能性がある。この複数の阻害効果を検出する上で、植物体内で起こっている転写レベルの変化を包括的に明らかにするマイクロアレイを使った解析は適していると考えられる。

本章では、AtGen 実験データの中から、サイトカイニンの機能を阻害する化合物を探索した結果と、得られた化合物の機能解析について述べる。



**Fig. 4-1** シロイヌナズナのサイトカイニン合成経路 (Sakakibara *et al.*, 2006[66])

より改編) *tZ*: *trans*-zeatin; *tZR*: *trans*-zeatin riboside;

*tZRMP*: *trans*-zeatinriboside 5'-monophosphate;*cZ*: *cis*-zeatin; *cZR*: *cis*-zeatin riboside;

*cZRMP*: *cis*-zeatinriboside 5'-monophosphate; *DZ*: dihydrozeatin; *DZRMP*: dihydrozeatinriboside

5'-monophosphate; *iP*: isopentenyladenine; *iPR*: isopentenyladenine riboside; *iPRMP*:

isopentenyladenine riboside 5'-monophosphate

## 4-2 方法

本章で用いた実験器具等は、特に記載がない限り、全て市販の物を購入した。ブライマー合成は北海道システム・サイエンス株式会社(札幌、日本)、プローブ合成は株式会社ニッポンイージーティー(富山、日本)に依頼した。

### 4-2-1 化合物等

Uniconazole-P、Paclobutrazol、Propiconazole、Prohexadione は和光純薬工業株式会社(大阪、日本)から購入した。Brassinazole91、Brassinazole220 は当研究室において合成されたものを用いた。 $[^2\text{H}_5]$ *trans*-zeatin riboside、*trans*-zeatin riboside (*tZR*)、isopentenyladenine riboside 5'-monophosphate (*iPRMP*)、Calf intestine alkaline



phosphatase (AP)は理化学研究所 生産制御研究チーム 榊原均博士から供与いただいた。 $\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate tetrasodium Salt Reduced (NADPH)はナカライテスク株式会社(京都、日本)から購入した。

#### 4-2-2 実験材料

##### 4-2-2-1 植物サンプル

実験には、特に記載がない限り、シロイヌナズナの野生型 Col-0 を用いた。次亜塩素酸ナトリウム溶液(10%)で10分間滅菌処理した種子を、3日間の低温処理後 1/2 MS 液体培地 (pH 5.7)に移し、22°C、24時間連続光照射下で7日間振とう培養した芽生えに薬剤を処理しサンプリングを行った。サイトカイニン、オーキシシン、アブシジン酸、ジベレリンの内生量の測定では、1/2MS 寒天培地 (0.8% Agar, pH 5.7) 50 ml を流し入れ、固めた角型プレート(栄研化学株式会社)に播種し、アルミ箔で上面以外を遮光して、垂直に立てた環境下で6日間生育させた芽生えの中から、生育のそろった20個体を1/2MS 液体培地に移して24時間振とう培養したものを用いた。植物はサンプリング後、ワイピングクロスに包んで50 ml ファルコンチューブに入れ、遠心(150×g 1 min, 4°C)で脱水した後に液体窒素で凍結し、-75°Cで保存した。

##### 4-2-2-2 プラスミド

本実験に用いたプラスミドは、理化学研究所 生産制御研究チーム 武井兼太郎博士からご恵与いただいた。ATR1(At4g24520)を pESC-LEU ベクター (Stratagene) に導入した pESC-ATR1、CYP735A1(At5g38450)、CYP735A2(At1g67110)をそれぞれ pYES2.1/V5-His-TOPO ベクター (Invitrogen) に導入した pYES-CYP750A1、pYES-CYP750A2 をタンパク質発現に用いた[67]。

#### 4-2-3 定量 PCR

##### 4-2-3-1 RNA の抽出

Total RNA は、RNeasy Plant mini kit (Qiagen)を用い、メーカーのプロトコルに従い抽出および DNase I 処理を行った。

#### 4-2-3-2 定量 PCR

cDNA の合成には、SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen)を用い、抽出した Total RNA を鋳型に逆転写反応を行った。プライマーには、Kit 付属の Random Hexamer を使用した。

定量 PCR は、合成した cDNA を鋳型として、TAQMAN-RT-PCR 法で行った。qPCR masterMIX (EUROGENTEC)を用いて、7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)で測定し、同等の方法で測定した 18S Ribosomal RNA 遺伝子の測定値をコントロールとして ddCT 法により発現量の定量、補正を行った。プライマー、プローブの配列は Table 4-1、PCR のプログラムは Table 4-2 に記載するものを用いた。

**Table 4-1 定量 PCR に用いたプライマーおよびプローブの配列**

遺伝子名	5' primer (5'→3')	3' primer (3'→5')	Taqman probe
ARR5 (AT3G48100)	TCGCACTATCGAC AACAGTAAC TTT	CATTAGCATCACCGA AACTTCTTC	(FAM)ACTCTGAGTAACCGCTC GATGAAC TCCG(TAMRA)
ARR6 (AT5G62920)	CACCGGATCCTCT TCATG TTC	ATCAACAACAGTAAC TTTGCAAGAAGATAC	(FAM)CGACAGTCACGTTGAT CGTAAATTCATCGA(TAMRA)
18S Ribosomal RNA	CGGCTACCACATC CAAGGAA	GCTGGAATTACCGCG GCT	(FAM)TGCTGGCACCAGACTT GCCCTC(TAMRA)

**Table 4-2 定量 PCR のプログラム**

	サイクル	温度	時間 (min)
	1	50.0 °C	2:00
	1	95.0 °C	10:00
解離	40	95.0 °C	0:15
アニーリング, 伸長		60.0 °C	1:00

#### 4-2-4 サイトカイニン等の定量

植物体から抽出したサイトカイニン類および、オーキシシン (IAA)、アブシジン酸 (ABA)、ジベレリン (GA<sub>4</sub>) の定量は、共同研究として理化学研究所 生産制御研究チームに測定を依頼した[7]。

酵素活性試験における *trans*-Zeatin Riboside (*t*ZR)の定量には、LC-MS/MS (QSTAR PULSER; Applied Biosystems)を用いた。*t*ZR: m/z 220, 352、 $[^2\text{H}_5]$ *t*ZR: m/z 225, 357 をモニターし、ポジティブイオンモードで定量を行った。

分析条件:

Agilent HPLC 1100 Series

カラム: COSMOSIL 5C18-MS-II Waters  $\phi 2.0 \times 150$  mm (ナカライテスク)

カラム温度: 40 °C

流速: 0.2 ml/min

移動層 A: 0.1 % 酢酸水溶液, B: 0.1 % 酢酸メタノール

グラジエント条件:

保持時間 (分)	溶媒 A (%)	溶媒 B (%)
0	100	0
3	100	0
16	30	70
21	30	70
22	100	0

#### 4-2-5 酵素活性試験

酵素活性試験は、酵母で目的タンパク質を発現させた後、このタンパク質を含むミクロソーム画分を用いて基質を反応させ、反応産物を LC-MS/MS で定量するという方法で行った。以下に詳細を述べる。

##### 4-2-5-1 タンパク質発現

形質転換は、Frozen-EZ Yeast Transformation KIT (Qbiogene)を用いて行った。酵母株 YPH499 (Stratagene) のコンピテントセルを作製し、(i) pESC-ATR1、pYES-CYP735A1、(ii) pESC-ATR1、pYES-CYP735A2 をそれぞれ同時に導入して形質転換させた。形質転換後の培養液を最小培地(SC 培地)から Leucine (Leu)、Uracil (Ura)を抜いた(-Leu, -Ura)選択培地プレートに塗布し、形成されたコロニーを選択培地で継代した後、Yeast plasmid Miniprep (ZYMO Research)を用いてプラスミドを抽出

し、PCRによるインサートチェックを行った。使用したプライマーは理化学研究所 生産制御研究チーム 武井兼太郎博士からご恵与いただいた。配列は Table 4-3 の通りである。

形質転換後の酵母のコロニーは、1%ラフィノースを加えた SC 培養液-Leu, -Ura 30°C、5 ml で 24 時間培養した後、同培地、温度条件で 100 ml の培養液に継代し 24 時間培養した後、1%ラフィノース、2%ガラクトース、80 µg/ml 5-aminolevulinic acid を加えた SC 培養液-Leu, -Ura 500 ml に OD<sub>600</sub>=0.4 になるように加え、オーバーナイト 20 °C で振とう培養した後、遠心(5000×g, 15 min)を行い集菌した。

**Table 4-3 インサートチェックに用いたプライマー塩基配列**

pESC-LEU-ATR1
ATR1forward, 5'-GCGGCCGCAAAATGACTTCTGCTTTGTATGCTTCC-3'
ATR1reverse, 5'-TCTAGAGTCACCAGACATCTCTGAGGTATC-3'
pYES2.1/v5-His-TOPO-CYP735A1
GAL1forward, 5'-AATATACCTCTATACTTTAACGTC-3'
CYP735A1 reverse, 5'-ATCCTCATGAAACCAATGGCTTC-3'
pYES2.1/v5-His-TOPO-CYP735A2
GAL1forward, 5'-AATATACCTCTATACTTTAACGTC-3'
CYP735A2reverse, 5'-CTTCATAGATCAAGTGGCTTC-3'

#### 4-2-5-2 ミクロソーム画分の抽出

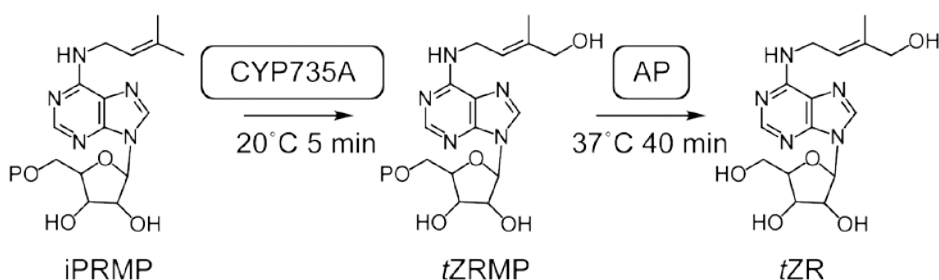
ミクロソーム画分の抽出は Venkateswarlu ら[68]の方法に従って行った。集菌後のペレットは、蒸留水で洗浄した後、バッファーA (100mM リン酸バッファー、10% sucrose pH7.5) 12 ml を加えて Vortex で攪拌した。ガラスビーズ (SIGMA-Aldrich Inc., G8772 425-600 µm) 10 ml を加え、Vortex で攪拌しながら細胞壁の破碎を行った後、回収し、遠心分離(10,000×g, 10 min, 4 °C)を行った。再度、上澄を回収し、遠心分離(15,000×g, 10 min, 4 °C)を行った後、上澄を回収し、ペーパーフィルターで濾過した後に、超遠心機 Optima L-70K (BECKMAN COULTER)を用いて遠心分離(160,000×g, 1.5 h, 4 °C)を行った。上澄を捨て、ペレット表面をバッファーA で洗い流した後、Vortex でペレットをバッファーA に懸濁させた。懸濁液は、1.5 ml マイクロチューブに分注し、液体窒素で凍結させ-75°C で保存した。

タンパク質濃度は、bovine serum albumin (BSA) を対照区として、Protein Assay (Bio Rad)を用いて、Bradford 法で測定した。

#### 4-2-5-3 阻害活性試験の方法

ミクロソームタンパク質 (0.5 µg/µl) 10 µl を 20°C で 1 分間インキュベートし、阻害剤 5 µl, iPRMP 10 µl, NADPH 20 µl を順に加えた。NADPH 溶液を加えてから 5 分間反応させた後、37°C でインキュベートした calf intestine alkaline phosphatase (AP) 溶液 (10 units AP/400µl, 50 mM CHES-NaOH バッファー、0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 10.0) 400 µl を加えて反応を停止した。CYP735A の反応生成物である *t*ZRMP はリン酸基が外れやすく構造的に不安定であるため、AP 溶液中で 37°C, 40 分間のインキュベートを続けることで *t*ZRMP を脱リン酸化し *t*ZR に変換した (Fig. 4-2)。20 % 酢酸水溶液 20 µl 加え、脱リン酸化反応を停止した後、内部標準物質として 20 nM [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]*t*ZR を加え、Vortex で充分に攪拌した。

メタノール 1 ml、超純水 1 ml で平衡化した逆相カラム(Oasis, HLB 10mg 1cc)を通して、酵素反応液を精製し、カラムを超純水 1 ml で 2 度洗浄した後、100%メタノール 1 ml で溶出した。遠心エバポレーターで溶出液を濃縮乾固し、0.005%酢酸水溶液 (125 µl) で溶解し、上記 LC-MS/MS によって *t*ZR を定量した。



**Fig. 4-2** 化合物による CYP735A の阻害活性試験の酵素反応 *i*PRMP を CYP735A の基質として加え 20°C で 5 分間反応させた後、生成産物である *t*ZRMP を AP で脱リン酸化させ *t*ZR に変換した。

## 4-3 結果

### 4-3-1 サイトカイニン応答を低下させる化合物の探索

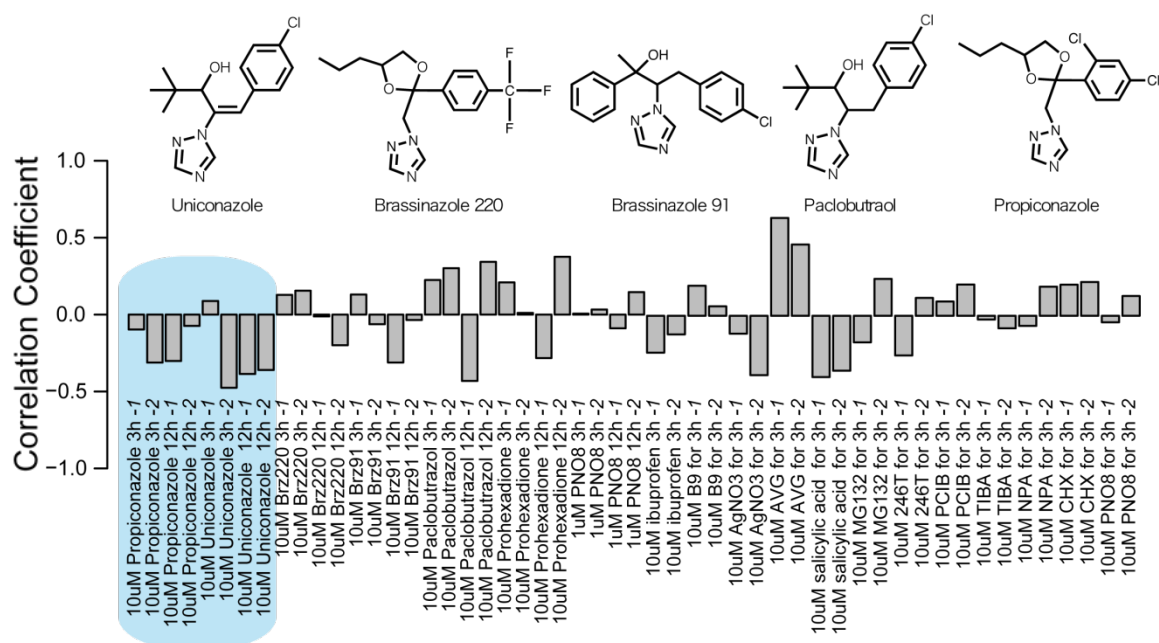
はじめに、第 2 章で構築したホルモン応答をモニタリングする解析手法を用いて、AtGen 実験データの化合物処理のプロファイルの中からサイトカイニンの応答が有意に低下している化合物を調べた。化合物処理のプロファイルは、ホルモンの阻害活性が知られる化合物を中心として 18 種の化合物をそれぞれシロイヌナズナの芽生えに処理したものである ( $n = 2$ )。

サイトカイニン応答性プロファイルを用いて、これらの化合物処理時のサイトカイニンの応答を調べると、Propiconazole (プロピコナゾール)、Uniconazole-P (ウニコナゾール-P) 処理が負の相関を示した。ウニコナゾール処理 12 h は再現性良く負の相関を示し、サイトカイニンの応答が低下していることを示したが、3 h は 1 回目の処理に再現性のある相関が見られなかった (Fig. 4-3)。プロピコナゾールは、ウニコナゾール-P よりも弱い負の相関を示した。

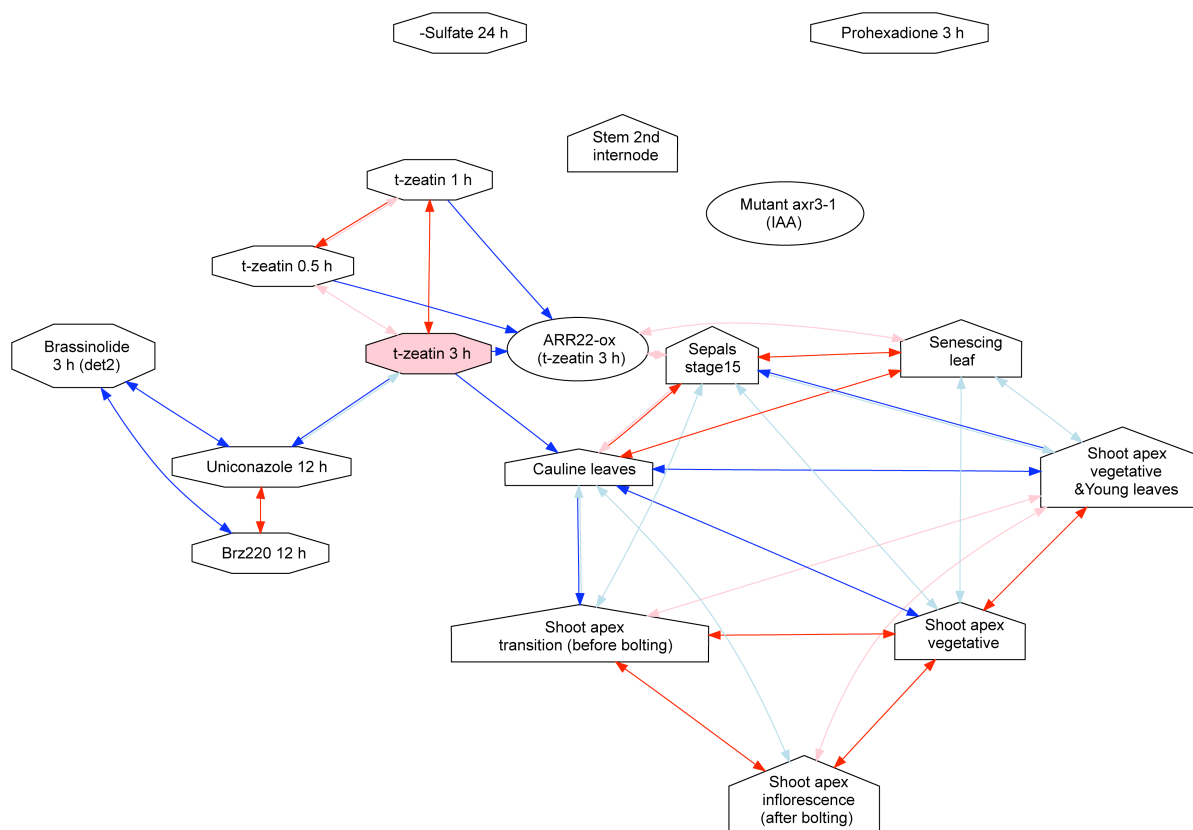
さらに、3 章で構築したリレーションマップから、「*t*-zeatin 3 h」を中心としたサブリレーションマップを取得してサイトカイニン処理と負の相関関係を示すプロファイル調べたところ、「Uniconazole 12 h」(処理区: ウニコナゾール-P 処理 12 h、対照区: mock 処理 12 h)との間に相互の負の高相関があり、上記の解析と一致する結果を示した (Fig. 4-3)。さらに、サブリレーションマップ内でウニコナゾール処理は同じトリアゾール構造をもつブラシナゾール「BRZ220 12 h」(処理区: ブラシナゾール 220 12 h、対照区: mock 処理 12 h) 処理と正の相関を示した。また、ウニコナゾール-P はブラシノステロイドの生合成阻害活性を有するが[69]、ブラシノライド処理「Brassinolide 3 h (*det2*)」(処理区: ブラシノライド 3 h、対照区 3 h)と負の高相関を示した (Fig. 4-4)。

これらの解析結果から、「ウニコナゾール処理 12 h」のプロファイルにおいて、既に報告されているように[69, 70]、ウニコナゾール-P がブラシノステロイドの機能を阻害すると同時に、サイトカイニンの機能を阻害する活性を持っている可能性が示唆された。そこで、改めてサイトカイニン応答性マーカー遺伝子の発現量を測定し、ここまでのプロファイルの相関解析結果と一致するか検証した。マーカー遺伝子には、サイトカイニン応答性の A-type レスポンスレギュレーターである *ARR5*(At3g48100)、*ARR6*(AT5G62920)を選び、マイクロアレイ実験と生育環境、ステージをそろえたシロイ

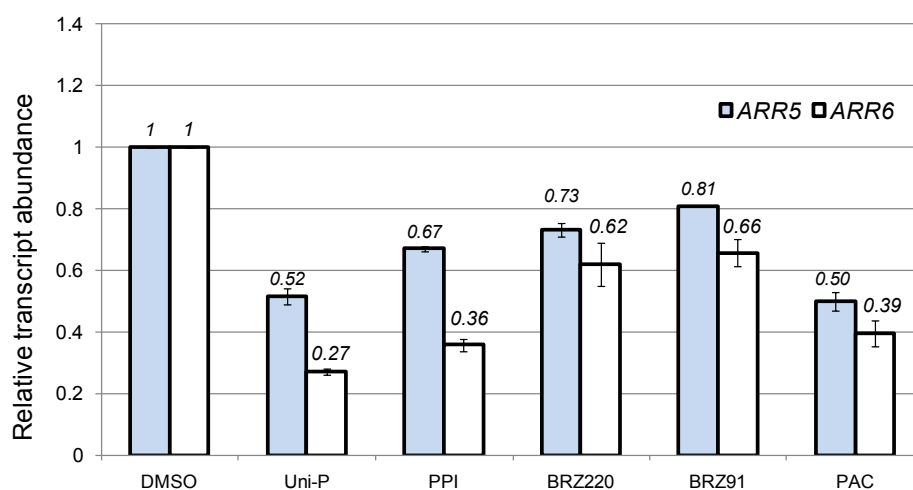
ヌナズナの芽生えに化合物を処理して、定量 PCR で発現量を測定した (Fig. 4-5)。なお、マイクロアレイの実験条件は各化合物を 10  $\mu\text{M}$  で用いていたが、化合物の効果を、二次応答の影響がより少ない短時間 (3 時間) で判定するために高濃度 (100  $\mu\text{M}$ ) で処理した。ウニコナゾール-P に加え、相関解析で調べたトリアゾール化合物をそれぞれ処理したシロイヌナズナにおけるマーカー遺伝子の発現量を比較したところ、プロピコナゾール、ウニコナゾール-P は、有意なレベルで発現量が減少し ( $p < 0.05$ )、他の処理では有意な変動は見られなかった。また、最も発現量を強く減少させる化合物は、ウニコナゾール-P であった。これらの傾向はプロファイルの相関解析の結果と一致したため、以降、ウニコナゾール-P がサイトカイニンの応答を低下させる機構を調べた。



**Fig. 4-3 サイトカイニン応答プロファイルと化合物処理の相関解析** 実験は処理セットごとにサイトカイニン応答プロファイルとの相関関係を求めた ( $n=2$ )。正の値はホルモン応答が誘導されていること、負の値はホルモン応答が抑制されていることを示す。青枠は、再現性良く負の相関を示した化合物を示している。AtGen 実験データには、上に構造を示す 5 種類のトリアゾール化合物処理が含まれている。



**Fig. 4-4 「*t*-Zeatin 3 h」を中心としたサブネットワーク** リレーションマップ中には、ピンク色の実験プロファイルと有意な相関関係 ( $|SCC| \geq 0.5$ ) を満たすプロファイルが含まれる。赤矢印: 正の高相関 ( $\geq 0.7$ )、青矢印: 負の高相関 ( $\leq -0.65$ )、ピンク矢印: 双方向の低相関 ( $\geq 0.5$ )、水色矢印: 双方向の低相関 ( $\leq -0.5$ )。ノードの種類は、長方形: 環境刺激、楕円形: 変異体、五角形: 組織特異的プロファイル、八角形: 化合物処理。



**Fig. 4-5 トリアゾール化合物がサイトカイニンのマーカー遺伝子 *ARR5*、*ARR6* の発現に及ぼす影響** DMSO: Dimethyl Sulfoxide (mock 処理), Uni-P: Uniconazole-P, PPI: Propiconazole, BRZ220: Brassinazole 220, BRZ91: Brassinazole 91, PAC: Paclobutrazol。化合物はいずれも終濃度 100  $\mu$ M、0.1% DMSO になるように処理を行い、3 時間後にサンプリングを行った。エラーバーは SE。n=3



#### 4-3-2 ホルモンの相互作用がサイトカイニン応答に及ぼす影響

ウニコナゾール-P は標的の選択性が低く、ジベレリン、ブラシノステロイドの生合成阻害活性[69-71]、アブシジン酸の代謝阻害活性[72, 73]を有する。これらのホルモンの生合成や代謝を制御することで、茎の伸長を押さえて植物を矮化させる他、培養細胞で再分化を抑制する作用などの機能が報告がされている (Fig. 4-6) [69-71]。そこではじめに、ウニコナゾール-P がこれらのホルモンの内生量を変化させ、その結果サイトカイニンの応答が低下している可能性について検討を行った。

ブラシノステロイド非感受性変異体 *bril-5* [74]、ジベレリン非感受性変異体 *gai* [75]、アブシジン酸非感受性変異体 *abil-1* [76]、サイトカイニン非感受性変異体 *ahk2 ahk3* [77] にウニコナゾール-P を処理し、それぞれのホルモンの信号伝達が異常になっている条件下でサイトカイニンの応答が低下するか、定量 PCR を用いて調べた。

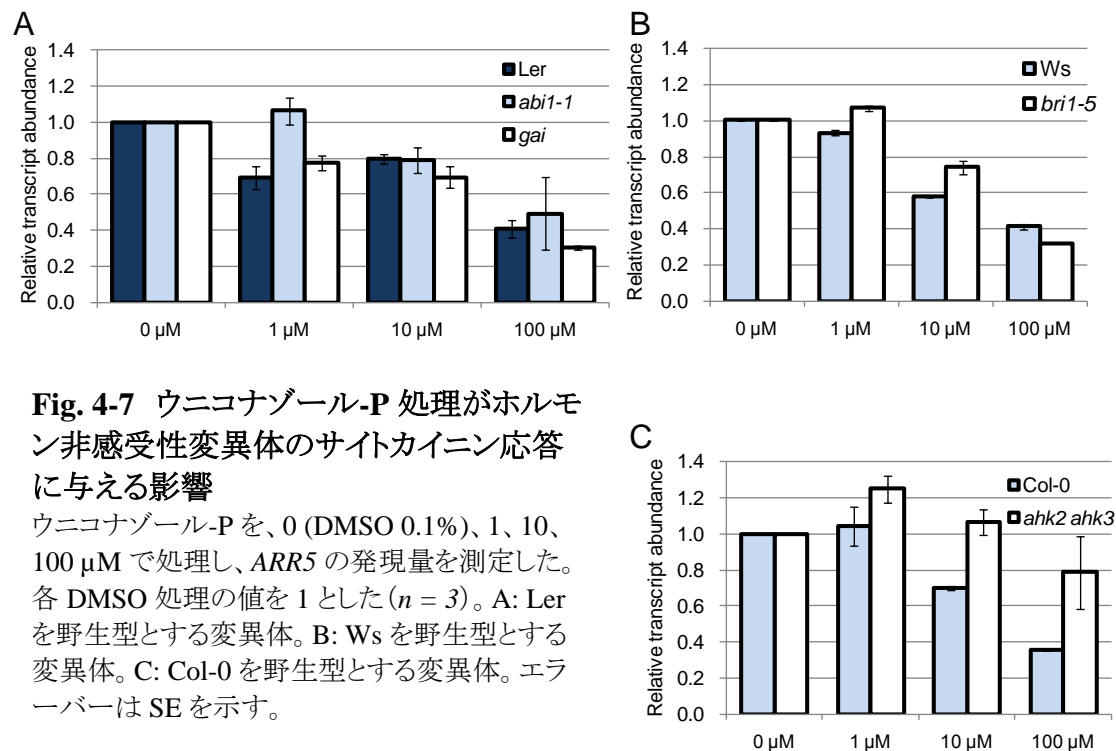
野生型はいずれも、ウニコナゾール-P 処理により濃度依存的に *ARR5* の発現量が減少し、100  $\mu$ M 処理で 60% 程度の減少が見られた。変異体 *bril-5*、*gai*、*abil-1* においても、ウニコナゾール-P 処理によって発現量が減少し、野生型と同様の傾向が見られた (Fig. 4-7A-C)。サイトカイニン非感受性変異体 *ahk2 ahk3* では *ARR5* の発現量の減少は非常に緩やかになった。

さらに Col-0 の芽生えにウニコナゾール-P 100  $\mu$ M を処理して、オーキシン、アブシジン酸、ジベレリン ( $GA_4$ ) の内生量を測定したが、本実験条件下では、処理による有意な内生量の変化は確認されなかった (Fig. 4-8)。また、定量 PCR を用いて同サンプルのジベレリン生合成遺伝子 *GA3ox1* の発現レベルの変化を調べたが、DMSO 区と同レベルであった (データ未掲載)。



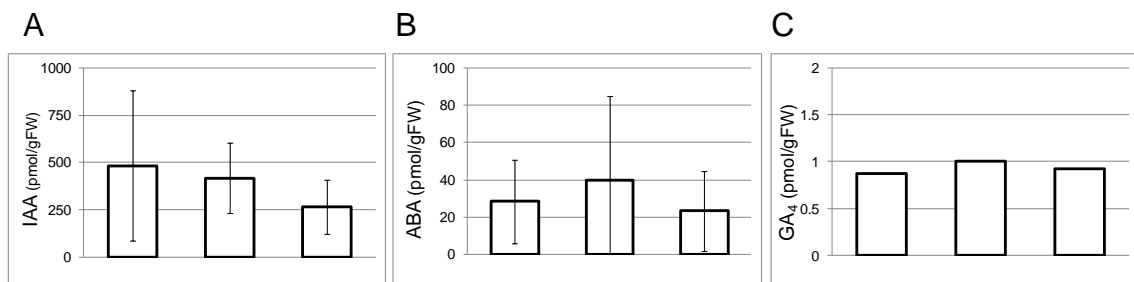
**Fig. 4-6 ウニコナゾール-P 処理による表現型**

発芽 4 日後の芽生えを 100  $\mu$ M ウニコナゾール-P 処理区 (左)、0.1 % DMSO 区 (右) に移し替え、10 日後の様子。



**Fig. 4-7** ウニコナゾール-P 処理がホルモン非感受性変異体のサイトカイニン応答に与える影響

ウニコナゾール-P を、0 (DMSO 0.1%)、1、10、100 μM で処理し、*ARR5* の発現量を測定した。各 DMSO 処理の値を 1 とした ( $n = 3$ )。A: *Ler* を野生型とする変異体。B: *Ws* を野生型とする変異体。C: *Col-0* を野生型とする変異体。エラーバーは SE を示す。

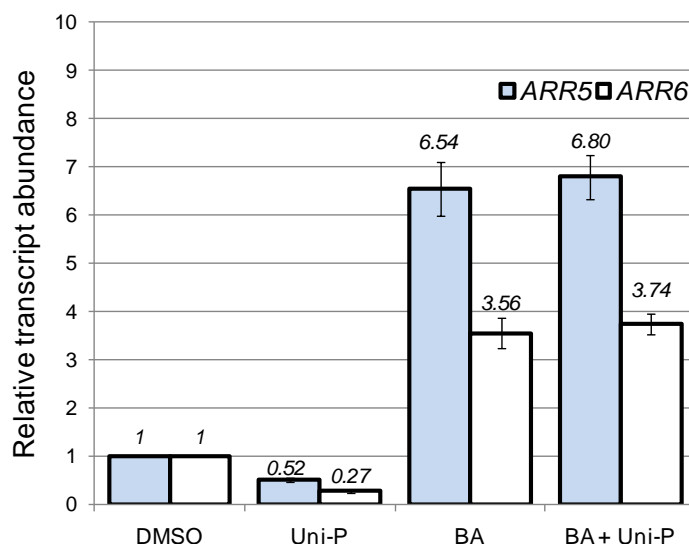


**Fig. 4-8** ウニコナゾール-P 処理時のホルモン内生量 ウニコナゾール-P を 0 (DMSO 0.1%)、10 μM、100 μM、になるよう処理を行った ( $n = 3$ )。A: IAA 内生量、B: ABA 内生量、C: GA<sub>4</sub> 内生量 GA<sub>4</sub> は、2 回の測定で化合物処理区、mock 処理区ともに検出限界下であったため、1 回の測定値のみを表す。エラーバーは SE を示す。

#### 4-3-3 サイトカイニンによる回復試験

ウニコナゾールがサイトカイニンの信号伝達を阻害する場合、サイトカイニン応答の低下はサイトカイニン処理により十分な回復が得られず、一方、生合成が阻害される場合には、回復すると予測される。そこで、ウニコナゾールによるサイトカイニン応答の低下がサイトカイニン処理によって回復するか、合成サイトカイニンであるベンジルアミノプリン (BA) 処理を行い、応答性遺伝子の発現量の変化を定量 PCR によって調べた。

BA 処理によって *ARR5*、*ARR6* の発現量は DMSO 処理に比べ、それぞれ 6.5、3.5 倍と増加し、BA とウニコナゾール-P の共処理でも 6.8、3.7 倍と同等の発現量がみられた。これらの結果から、ウニコナゾールはサイトカイニンの生合成を阻害していることが示された。



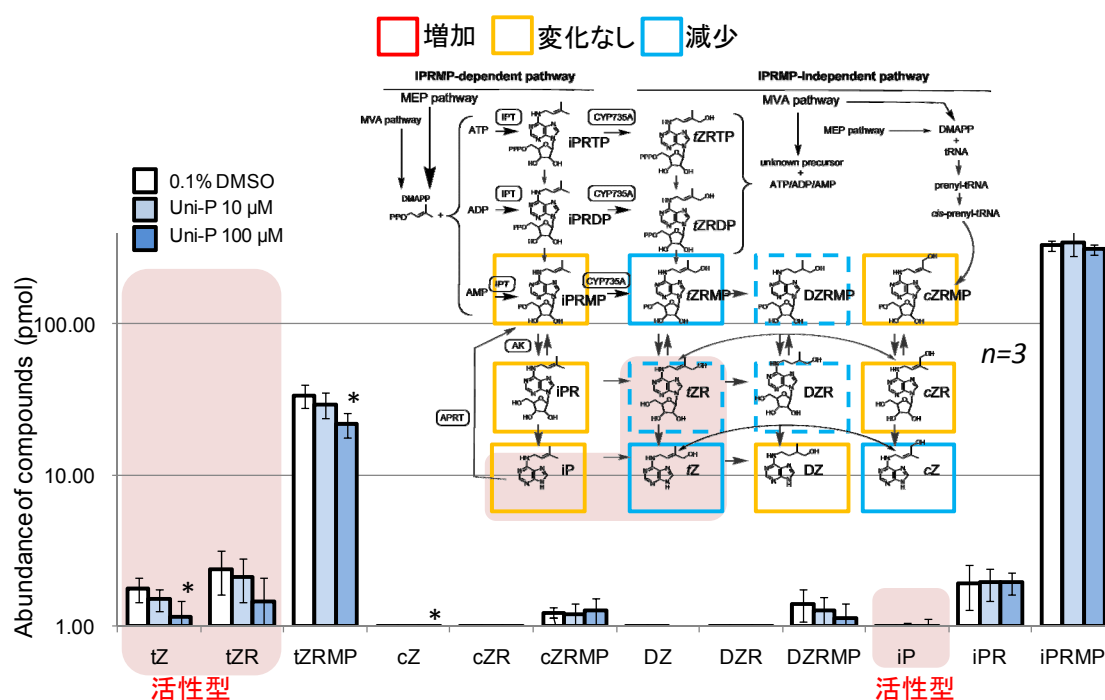
**Fig. 4-9 サイトカイニン処理による回復試験** BA 1  $\mu$ M、ウニコナゾール-P 100  $\mu$ M、0.1% DMSO になるよう処理を行い、3 時間後にサンプリングを行った。定量 PCR により、*ARR5*、*ARR6* の発現量を調べた。エラーバーは SE。n=3

#### 4-3-4 サイトカイニン内生量の変化と阻害ターゲットの予測

サイトカイニン生合成におけるウニコナゾール-P の標的を調べるために、生合成経路における中間体を含めたサイトカイニン類の内生量を調べた。生合成経路に沿った化合物の内生量を Fig. 4-10 に示す。

シロイヌナズナで活性型サイトカイニンとして働く *trans*-zeatin (*tZ*)は、濃度依存的に内生量が減少した。*tZ* よりも弱いものの同じく活性型である isopentenyladenine (*iP*)はほとんど検出されなかった。*cis*-zeatin (*cZ*)は、受容体への結合活性、内生量ともに低いことが報告されているが、*tZ* と同様に有意なレベルで内生量が減少した。さらに MEP 経路を主な出発経路とした *tZ* 合成の中間体と考えられている *trans*-zeatinriboside 5'-monophosphate (*tZRMP*)の内生量が有意なレベルで減少し、*tZRMP* の前駆体と考えられている *trans*-zeatin riboside (*tZR*)にも同様の傾向が見られ

た。また、*t*ZRMP、*t*ZR から合成されると予測され、それぞれのイソペンテニル側鎖が飽和した dihydrozeatin riboside 5'-monophosphate (DZRMP)、dihydrozeatinriboside (DZR)でも内生量の減少傾向が見られた。全体の傾向として、MEP 経路からの合成を中心として、イソペンテニル側鎖の水酸化以降のステップで内生量が減少している。この反応を触媒する CYP735A1、CYP735A2 [67]の酵素反応が主に阻害されていることが考えられるが、ウニコナゾール-P は CYP450 酵素を主な標的とするトリアゾール構造を有している。このためウニコナゾールは、CYP735A1、CYP735A2 をターゲットとして、iPRTP、iPRDP、iPRMP のイソペンテニル側鎖の水酸化を阻害している可能性が示唆された。

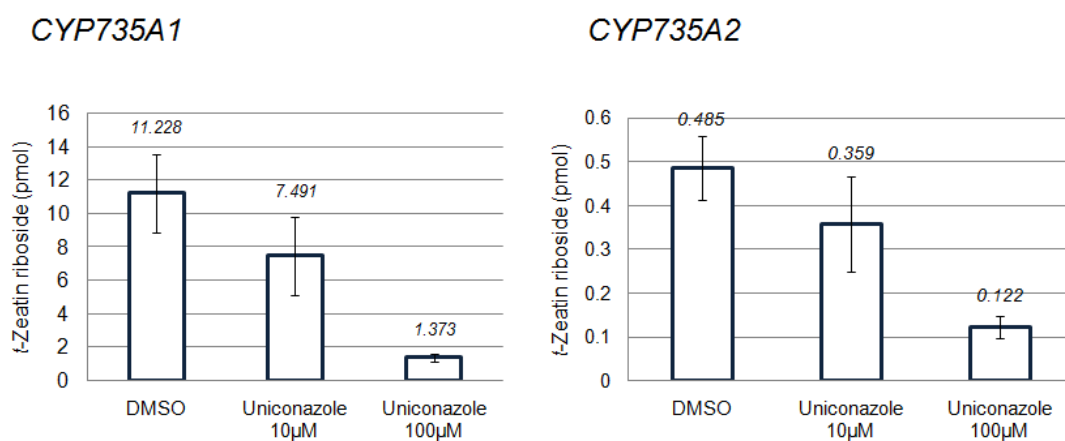


**Fig. 4-10** ウニコナゾール-P がサイトカイニンおよびサイトカイニン中間体の内生量に与える影響 *t*Z: *trans*-zeatin; *t*ZR: *trans*-zeatin riboside; *t*ZRMP: *trans*-zeatinriboside 5'-monophosphate; *c*Z: *cis*-zeatin; *c*ZR: *cis*-zeatin riboside; *c*ZRMP: *cis*-zeatinriboside 5'-monophosphate; *D*Z: dihydrozeatin; *D*ZR: dihydrozeatin riboside; *D*ZRMP: dihydrozeatin-riboside 5'-monophosphate; *i*P: isopentenyladenine; *i*PR: isopentenyladenine riboside; *i*PRMP: isopentenyladenine riboside 5'-monophosphate ウニコナゾール-P 処理白:0.1% DMSO、水色: 10 μM、青: 100μM 処理を行い、3 時間後にサンプリングを行った。ピンク色の網掛け部分は、シロイヌナズナで活性型とされるサイトカイニン類を示す。エラーバーは SE、\*は、 $p < 0.05$  を示す。(n=3) 生合成経路図は、ウニコナゾール-P 100 μM 処理時のサイトカイニン類の内生量の変化をプロットしたものである。青枠実線は内生量が減少 ( $P < 0.05$ )、青枠点線は平均値が減少したもの、オレンジは定量されたが、処理による差がなかったものを示す。

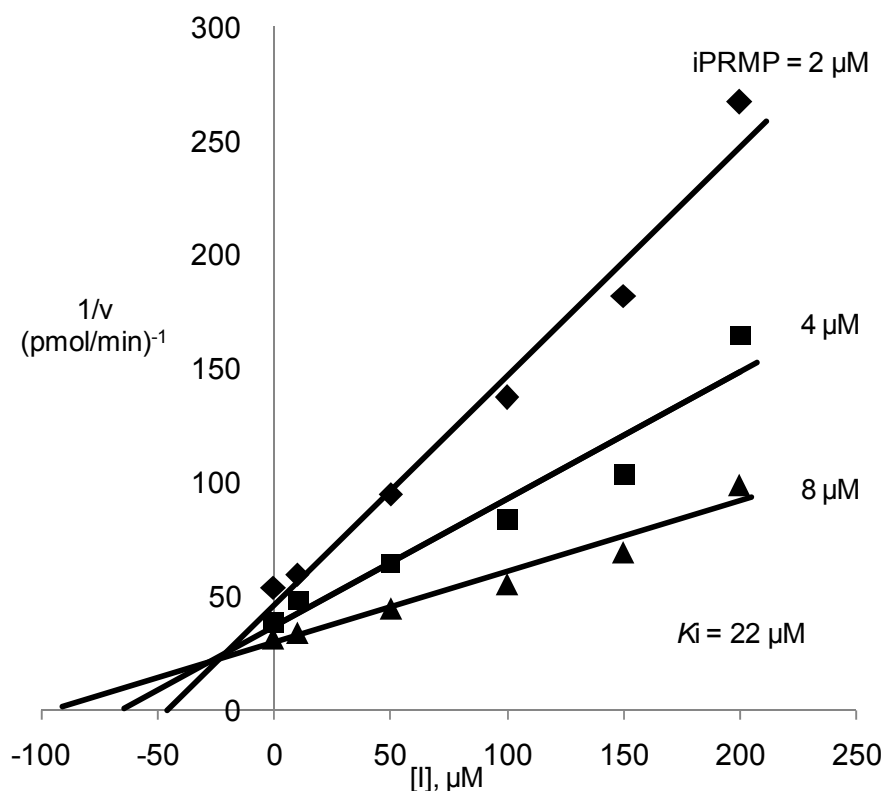
#### 4-3-5 *In vitro* での生合成阻害活性試験

ウニコナゾール-P が CYP735A1、CYP735A2 の酵素阻害活性を有するかを調べるために、*in vitro* の酵素活性試験を行った。酵素には、NADPH-P450 還元酵素 ATR1 と CYP735A または CYP735A2 を共発現させた酵母株から調製したミクロソームタンパク質を用いた。基質には、CYP735A1、CYP735A2 との基質親和性が最も高い iPRMP[67]を用い、酵素反応により生成された *t*ZRMP を脱リン酸化後、*t*ZR を CYP735A の反応生成物として定量した。

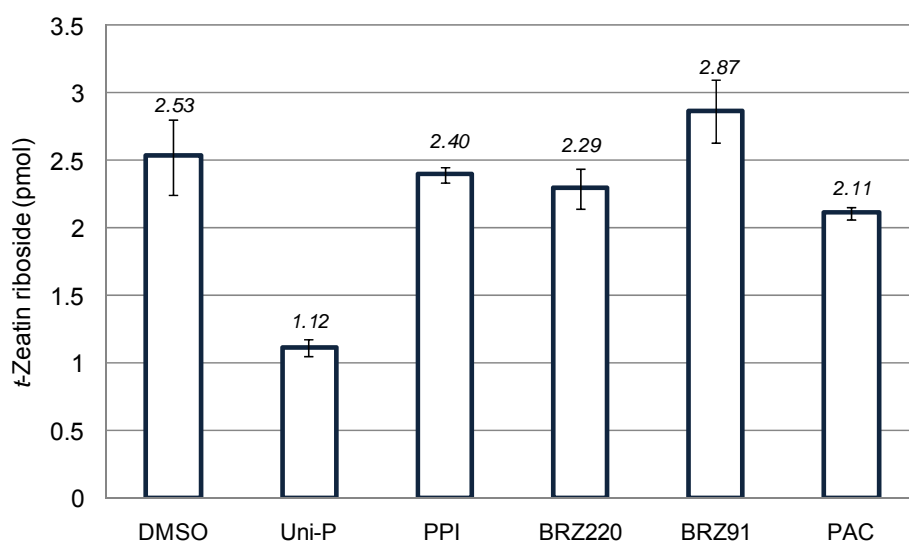
CYP735A1、CYP735A2 の活性は、ウニコナゾール-P 処理によりいずれも濃度依存的に低下した。CYP735A1 では 10  $\mu$ M、100  $\mu$ M 処理でそれぞれ 33%、88%、CYP735A2 では 26%、75%の阻害活性が見られた (Fig. 4-11)。CYP735A1 に対するウニコナゾール-P の  $K_i$  値は 22 $\mu$ M となった (Fig. 4-12)。さらに、CYP735A が、トリアゾール化合物によって非特異的に阻害を受ける可能性を排除するために、前述のトリアゾール化合物系列がウニコナゾール-P と同様に CYP735A1 の酵素阻害活性を有しているか調べたところ、ウニコナゾール-P 以外の化合物では、わずかに酵素活性が低下するものがあるものの、ほとんど活性を阻害せず、ウニコナゾール-P のみが酵素活性を強く阻害するという結果となった (Fig. 4-13)。プロピコナゾールの酵素阻害活性は、プロファイルの相関解析や、植物体にプロピコナゾールを処理したときのマーカー遺伝子の発現量の減少に比べて弱い活性しか示さなかったが、他の化合物では結果が一致した。



**Fig. 4-11 ウニコナゾール-P による CYP735A の活性阻害** CYP735A の活性は、40  $\mu$ M の iPRMP 存在下で、CYP735A1 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l , CYP735A2 2  $\mu$ g/ $\mu$ l のミクロソームタンパク質を用い、20  $^{\circ}$ C で 1 分間反応させて測定した ( $n = 3$ )。



**Fig. 4-12** ウニコナゾール-P による CYP735A1 の活性阻害解析 CYP735A1 の活性は、2  $\mu\text{M}$  (◆)、4  $\mu\text{M}$  (■)、8  $\mu\text{M}$  (▲) の iPRMP 存在下で、0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  のミクロソームタンパク質を用いて 20 °C で測定した。各点の値は 3 反復の平均値を用い、 $K_i$  値は Dixon プロットによって求めた。



**Fig. 4-13** トリアゾール系化合物処理による CYP735A1 の活性阻害 CYP735A1 の活性は、40  $\mu\text{M}$  の iPRMP 存在下で、2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  のミクロソームタンパク質を用いて 20 °C で 1 分間反応させて測定した ( $n = 3$ )。化合物は、それぞれ 100  $\mu\text{M}$  処理、DMSO は終濃度 0.1% となるように加えた。

#### 4-4 考察

本章では、マイクロアレイ実験から得られたプロファイルの相関解析を用いてサイトカイニンの応答を低下させる化合物としてウニコナゾール-P を選び出し、ウニコナゾール-P がサイトカイニンの生合成を低下させていることを明らかにした。本研究で用いたアプローチは、プロファイルからサイトカイニンの応答を低下させる化合物を選び出した後、生合成経路の一斉分析の結果と化合物の構造から標的を予測し、酵素の阻害活性を調べるというものである。これらの一連の解析結果により、前章までで構築したホルモン応答の一斉検出法や、リレーションマップが、植物体内の状態の変化をモニタリングし、化合物の機能の解析に有効に機能したことを一例として示した。

今回の一連の解析では、既知の植物ホルモン阻害活性を持つ化合物の副次的作用に着目しているため、まず、ウニコナゾール-P が他のホルモンの生合成に影響を与えることによってサイトカイニンの内生量を減少させているという可能性について、各ホルモンの非感受性変異体とホルモンの定量によって調べた。この結果、他のホルモンの信号伝達の変異体でもサイトカイニンの応答性遺伝子の発現量はウニコナゾール-P 処理によって有意に低下した。また今回用いた生育条件では、オーキシシン、アブシジン酸、活性型ジベレリン GA<sub>4</sub> の内生量は減少していないという結果を得た。CYP735A の発現量はサイトカイニン処理によって上昇するが[78]、オーキシシン、アブシジン酸処理によって低下することが報告されている[67]。相関解析に用いたマイクロアレイのプロファイルでは、ウニコナゾール-P 10  $\mu$ M 3 時間、12 時間処理を行ったとき、CYP735A1、CYP735A2 はいずれも発現量に有意な差はなかった。この事からも、サイトカイニンの内生量低下は既知の植物ホルモンとのクロストークとは独立した現象である可能性が高い。

一方、サイトカイニンの内生量を低下させるもう一つの要因として、サイトカイニンの代謝経路の活性化が考えられる。iP、tZ はアデニンやアデノシンに代謝するサイトカイニン脱水素酵素(CKX)により分解されるが、シロイヌナズナではこの酵素をコードする 6 遺伝子が知られている。AtCKX5、AtCKX6 の過剰発現体ではサイトカイニンの内生量が減少し、欠損形質がみられる[79]。また、tZ はゼアチン-O-グルコシルトランスフェラーゼ(ZOG)によって貯蔵型サイトカイニンと考えられているゼアチン-O-グリコシドに変換されることにより不活化される。これは、 $\beta$ -グルコシダーゼ( $\beta$  Glc)によってグルコ

シドが加水分解されて活性型に戻る可逆的な反応であることが予測される[66]。ウニコナゾール処理のプロファイルにおいて、いずれの **CKX**、**ZOG** 遺伝子も有意な発現変動を示さなかった(データ未掲載)。これらの遺伝子の発現量から、ウニコナゾール-P 処理によるサイトカイニンの内生量の減少は、代謝経路が活性化した結果によるものではないと考えられた。

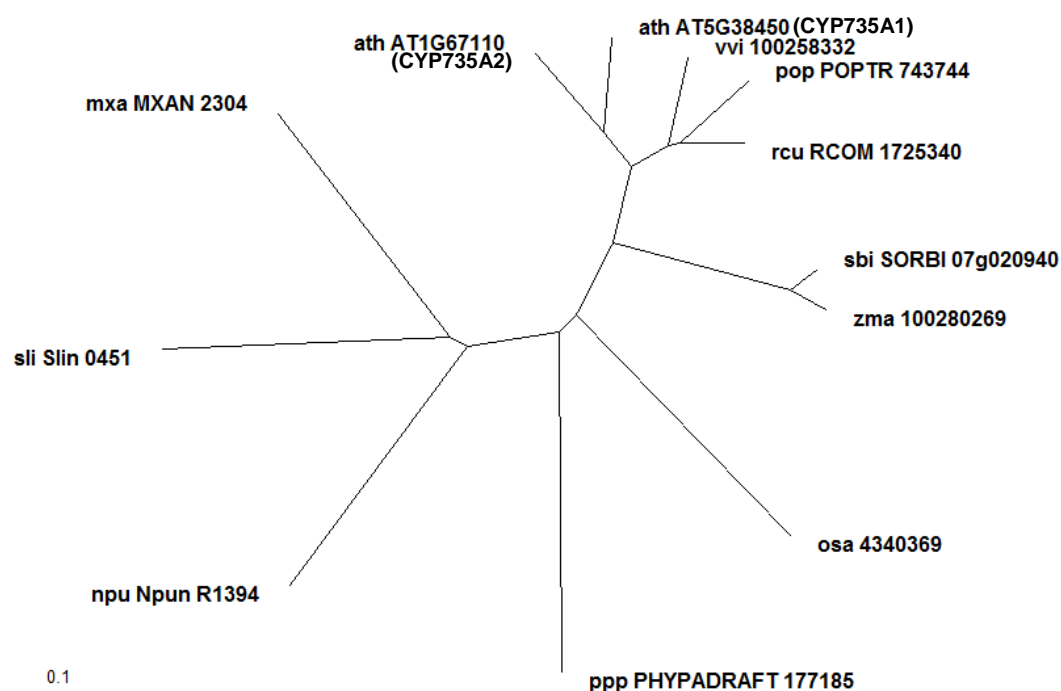
以上の一連の実験結果から、ウニコナゾール-P 処理のプロファイルで見られるサイトカイニンの応答の低下は、ウニコナゾール-P がサイトカイニン生合成酵素 **CYP735A** を標的の一つとしており、**CYP735A** によるイソペンテニル側鎖の水酸化が阻害されることによりシロイヌナズナで活性型として働く *tZ* の生合成が阻害され、サイトカイニンの応答が低下したと結論づけた。シロイヌナズナのサイトカイニンの生合成経路では、**CYP735A** の機能を低下させることにより、効果的に *tZ* の内生量を減少させられる可能性がある。また機能証明はされていないものの、**CYP735A** は高等植物では広く保存されていることから (Fig. 4-14)、他の植物への適用も可能であると考えられる。

しかしながら、現在明らかになっているサイトカイニン生合成経路では、サイトカイニン類の定量結果が示す *cZ* の内生量の減少は十分に説明できない。現在は、*cZ* 生合成経路はメバロン酸経路に依存し、水酸化されたペンテニル側鎖をもつ tRNA の分解が主な経路であると考えられている[80]。このため、*tZ* と *cZ* の生合成は基質を奪い合うことなく、独立して進行すると考えられている[66]。ウニコナゾール-P 処理は *tZ* 生合成経路に従い **CYP735A** による水酸化以降のステップで *tZRMP*、*tZR*、*tZ* を減少させたが、*cZ* 生合成経路では *cZ* のみの内生量を有意に減少させ、*cZRMP*、*cZR* 内生量に影響を与えなかった。これまでに、インゲンの未熟種子の粗酵素抽出液から *cZ*、*tZ* のイソメラーゼ活性が見つかったという報告[81]があり、Kasahara ら[80]はラベル体を用いた投与実験の結果と併せて、シロイヌナズナでも *cZ*、*tZ* を可逆的に変換する経路の存在を示唆している。本研究の結果も、*cZ* の生合成がメバロン酸以外の経路からの影響を受ける可能性を支持していると考えられる。

さらに、サイトカイニンの活性は植物種によって多様性があることが、これまでの研究で明らかになっている。サイトカイニンの受容体はファミリーを形成しており、シロイヌナズナでは 6 個あるヒスチジンキナーゼのうち 3 個 (**AHK2**、**AHK3**、**CRE1/AHK4**) が受容体としてサイトカイニンの信号伝達系に関与するが[8]、これらのリガンド識別の特異性がサイトカイニン活性の違いを生じさせていると考えられている。シロイヌナズナで



は *tZ*、*iP* 型が多く存在し活性型として機能するが、*AHK3* は *tZ* に加え、*tZR* や *tZRMP* にも応答する[82]。イネ、トウモロコシ、ヒヨスマメなどでは *cZ* が *tZ* の内生量と同レベルにあり、トウモロコシでは *cZ* に対し *tZ* と同様の応答をする *ZmHK1* や *tZR* にも応答する受容体 *ZmHK2* が報告されている[83]。*CYP735A* を標的とした生合成阻害剤は非メバロン酸経路による *tZ* 生合成を中心に効果的に機能すると考えられるが、植物のサイトカイニン機能を普遍的に阻害するものかどうかについては検討が必要である。一方、今後も本解析法を用いて新たな標的を持つ化合物が見つかっていくことが期待される。



**Fig. 4-14 CYP735A の進化系統樹** ath: *Arabidopsis thaliana*, vvi: *Vitis vinifera* (wine grape), pop: *Populus trichocarpa* (black cottonwood), rcu: *Ricinus communis* (castor bean), sbi: *Sorghum bicolor* (sorghum), zma: *Zea mays* (maize), osa: *Oryza sativa japonica* (Japanese rice), ppp: *Physcomitrella patens* subsp. *patens*, npu: *Nostoc punctiforme*, sli: *Spirosoma linguale*, mx: *Myxococcus xanthus* 配列情報は、KEGG Genes database (<http://www.genome.jp/kegg/genes.html>) から取得し、進化系統樹は NJ 法を用いて作成した。

## 5章 オミクス解析を用いた植物ホルモン関連変異体のプロファイリング

### 5-1 緒言

これまでの植物ホルモンの研究は、遺伝子発現解析、表現型解析、ホルモンの定量、分子レベルでの機能解析が中心となって発展してきた。本研究においても、ここまでの章では、主に遺伝子発現プロファイルの比較を中心とした手法を通じて植物ホルモンの機能について解析を進めてきた。

植物ホルモンは、環境の変化に対して敏感に応答し、形態形成の制御やストレス耐性の獲得に関与し、そこには常に細胞内の物質の組成の変化が伴っている。例えば、浸透圧や乾燥ストレス下において、水ストレスを受けた植物は浸透圧の調節や細胞膜の保護のために適合溶質と呼ばれる物質を細胞内に蓄積するが、適合溶質としてプロリンやグリシンベタインなどの内生量はアブシジン酸によって制御を受ける[84, 85]。栄養吸収においても、植物ホルモンは重要な役割を果たす。必須栄養素の一つである窒素は一次シグナルとして働くが、窒素吸収はサイトカイニンの合成を促し、サイトカイニンのシグナルを介して硫黄吸収の調節を行う[86, 87]。また、ジャスモン酸は病害応答シグナルを伝え、さまざまな変化を引き起こすが、防御物質であるグルコシノレイトの生合成促進[88]もその一つである。ここに挙げた機構はわずかな例に過ぎないが、植物体内ではホルモンが制御する多様で大規模な代謝変化が生じていると考えられる。しかし、これらの変化は非常に複雑な調節を受けており、莫大な数の化合物が存在するため、従来の手法では、非常に労力がかかり、解析が困難であった。このため、植物ホルモンと代謝の関係には、明らかにされていない点が多く残されている。

近年、新たなオミクス解析手法として注目されているメタボローム解析は、様々な条件下における生物の細胞内の状態を化合物の面から明らかにすることを目的とし、多様な物性をもつ代謝産物を包括的に調べる方法である。メタボローム解析によって得られた代謝物プロファイルを遺伝子発現プロファイルと統合することによって、転写と代謝をつなぐ、制御メカニズムの予測が可能になると考えられる。そこで本研究では、ホルモンによる制御と代謝物や代謝経路との関係を網羅的に明らかにするために、シ

ロイヌナズナの変異体を収集し、オミクスデータの統合解析を試みた。

本章で行った解析について概要を述べる (Fig. 5-1)。まず、植物ホルモンの生合成や信号伝達の異常が報告されているシロイヌナズナの変異体 28 種を収集し、マイクロアレイ (Affymetrix ATH1 GeneChip) による遺伝子発現プロファイルデータおよび LC-TOF/MS、GC-TOF/MS、LC-IT-TOF/MS、CE-TOF/MS による代謝物プロファイルデータを取得した。変異体は野生型と比較し、トランスクリプトーム、メタボロームデータによるプロファイリングを行った。また、植物ホルモンが制御する代謝物を明らかにするため、各ホルモンに応答して共通した発現や蓄積パターンを示している遺伝子、代謝物を明らかにした。さらに、本研究で取得した大規模なオミクスデータを用いて遺伝子と代謝物の共発現解析を行い、ホルモン変異体で協調的な蓄積パターンを示す遺伝子と代謝物の関係を調べた。以下、詳細について述べる。

なお本章は、(独) 理化学研究所メタボローム基盤研究グループとの共同研究 AtMet Express プロジェクトの一環として行ったものである。

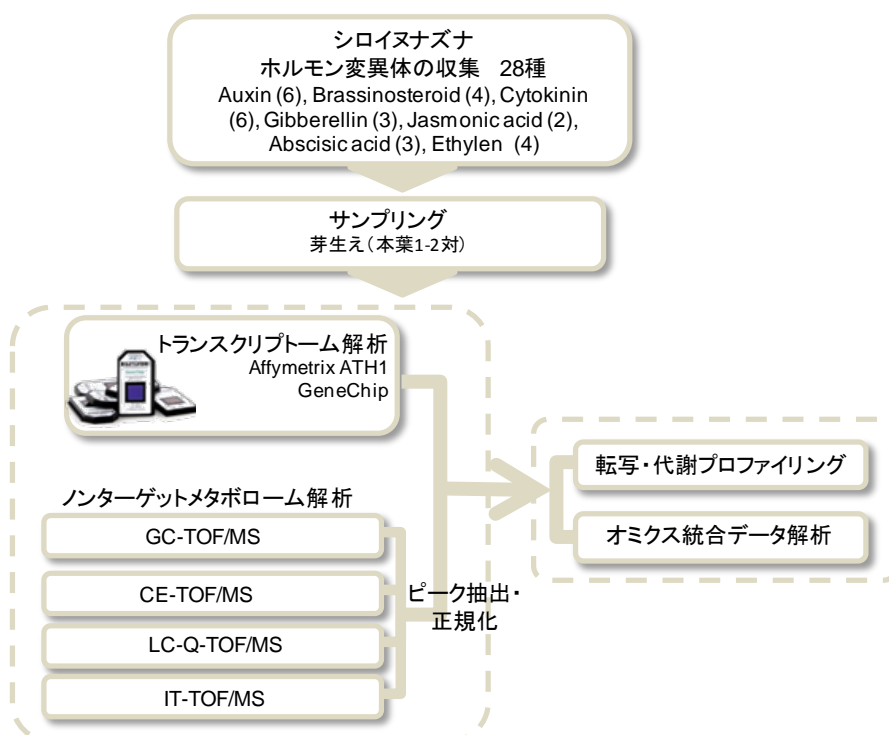


Fig. 5-1 オミクス解析による変異体プロファイリングの流れ

## 5-2 方法

### 5-2-1 化合物

Absciscic acid: (±) – abscisic acid、ACC: 1-aminocyclopropane carboxylic acid はシグマ アルドリッチ ジャパン株式会社(東京、日本)から、Methyl jasmonate は和光純薬工業株式会社(大阪、日本)から購入した。その他の試薬・実験器具は、特に記載がない限り、市販の物を購入して使用した。

### 5-2-2 植物サンプル

7 種類の植物ホルモンに関与する変異体 28 種 (Table 5-1) を収集し、実験に供した。野生型および変異体は、次亜塩素酸ナトリウム溶液 (10%) で 10 分間滅菌処理した種子を 3 日間低温処理したのち、22°C、24 時間連続光照射下で生育させ、本葉 1~2 対ステージでサンプリングを行った。

オーキシシン、ブラシノステロイド、サイトカイニン、ジベレリン変異体は、1/2 MS 培地 (0.8% Agar, pH 5.7) 50 ml を流し入れて固めた丸型プレート (150 × 25 mm CORNING) に播種し、水平に静置下で生育させ、地上部のみを切り取って液体窒素で凍結し、以降の分析に供した。メタボローム解析には、各 8 個体を使用した。ジャスモン酸、アブシジン酸、エチレンは、50 ml ファルコンに 1/2 MS 培地 (pH 5.7) 5 ml を加えて約 20 粒ずつ播種し、振とう培養を行い、全植物体を分析に供した。各サンプルは、別々のファルコンチューブ 4 本で生育させたサンプルを合わせて 1 サンプルとした。植物はサンプリング後、蒸留水で洗浄し、ワイピングクロスに包んで脱水し、液体窒素で凍結した。メタボローム解析には、各 40 個体を使用した。

### 5-2-3 ホルモンおよびストレス処理

ジャスモン酸、アブシジン酸、エチレンは植物ホルモンの中でも主にストレス応答に関与する他、種子休眠 (アブシジン酸) や花器官の成熟 (ジャスモン酸) など、生長・発達を組織、部位特異的に制御することが報告されている。このため、非ストレス条件下では生合成やホルモン応答が顕著に現れないと考えられたことから、これら 3 ホルモンの生合成欠損変異体にはホルモン生合成が活性すると報告されている刺激を与え、非感受性変異体には外生ホルモン処理を行い、野生型との比較を行った。変異体と

処理の組合せは Table 5-2 に示す。

傷害処理は、ジルコニアビーズ (YTZ ボール φ5mm: 株式会社ニッカトー 大阪、日本)を、植物体を培養している液体培地に 3 粒ずつ加え、Vortex で 15 秒間強く攪拌した後、24 時間振とう培養を行った。Mock 処理は、処理区と同様にジルコニアビーズを培地に加え、Vortex による攪拌は行わずに、振とう培養を行った。浸透圧ストレス処理は、終濃度が 300 mM になるようにマンニトールを培地に添加し 24 時間振とう培養を行った。Mock 処理は、マンニトールの代わりに蒸留水を加えた。Methyl jasmonate、ABA、ACC 処理は、いずれも化合物を DMSO に溶解し、終濃度 10 μM になるように液体培地に添加し、24 時間の振とう培養を行った。Mock 処理は、DMSO を終濃度 0.1%になるように培地に加えた。

**Table 5-1 実験に供した変異体の一覧**

変異体名	交配親	特徴	参考文献
<b>Auxin</b>			
<i>axr2-1/iaa7</i>	Col-0	オーキシン信号伝達異常	Wilson <i>et al.</i> , (1990) Mol Gen Genet., <b>222</b> : 377-383 [89]
<i>tir1-1</i>	Col-0	オーキシン受容体欠損	Ruegger <i>et al.</i> , (1998) Genes Dev., <b>12</b> : 198-207 [90]
<i>sur1-3</i>	Col-0	オーキシン過剰生産	Boerjan <i>et al.</i> , (1995) Plant Cell, <b>7</b> : 1405-1419 [91]
<i>axr3-3/iaa17</i>	Col-0	オーキシン信号伝達異常	Leyser <i>et al.</i> , (1996) Plant J., <b>10</b> : 403 [92]
<i>msg2-1/iaa19</i>	Col-0	オーキシン信号伝達異常	Tatematsu <i>et al.</i> , (2004) Plant Cell, <b>16</b> : 379-393 [93]
<i>nph4-1/arf7</i>	Col-0	オーキシン信号伝達異常	Harper <i>et al.</i> , (2000) Plant Cell, <b>12</b> : 757-770 [94]
<b>Brassinosteroid</b>			
<i>det2-1</i>	Col	ブラシノステロイド合成欠損	Chory <i>et al.</i> , (1991) Plant Cell, <b>3</b> : 445-459 [95]
<i>bri1-5</i>	Ws2	ブラシノステロイド受容体欠損	Noguchi <i>et al.</i> , (1999) Plant Physiol., <b>121</b> : 743-752 [74]
<i>cyp85a1 cyp85a2</i>	Col-0	ブラシノステロイド合成欠損	Nomura <i>et al.</i> , (2005) JBC, <b>280</b> : 17873-17879 [96]
<i>bil1/bzr1</i>	Col-0	恒常的ブラシノステロイド応答	Wang <i>et al.</i> , (2002) Developmental Cell, <b>2</b> : 505-513 [97]
<b>Cytokinin</b>			
<i>ahk2 ahk3</i>	Col-0	サイトカイニン信号伝達異常	Higuchi <i>et al.</i> , (2004) PNAS, <b>101</b> : 8821-8826 [77]
<i>wol-3</i>	Col-0	サイトカイニン信号伝達異常	Kuroha <i>et al.</i> , (2006) Plant Cell Physiol., <b>47</b> : 234-243 [98]
<i>arr10 arr12</i>	Col-0	サイトカイニン信号伝達異常	未発表
<i>cyp735a1 cyp735a2</i>	Col-0	trans-ゼアチン合成欠損	未発表
<i>ipt5-1</i>	Col-0	trans-ゼアチン合成欠損	未発表
<i>ipt3-1</i>	Nossen	trans-ゼアチン合成欠損	Takei <i>et al.</i> , (2004) Plant Cell Physiol., <b>45</b> : 1053-1062 [99]
<b>Gibberellin</b>			
<i>ga1-3</i>	Col	ジベレリン合成欠損	Sun T-p. <i>et al.</i> , (1994) Plant Cell, <b>6</b> : 1509-1518 [100]
<i>3ox1/3ox2</i>	Col	ジベレリン合成欠損	Mitchum <i>et al.</i> , (2006) Plant J., <b>45</b> : 804-818 [101]
<i>gai</i>	Ler	ジベレリン非感受性	Peng <i>et al.</i> , (1997) Genes Dev., <b>11</b> : 3194-2105[75]
<b>Jasmonate</b>			
<i>aos</i>	Col-6	ジャスモン酸合成欠損	Park <i>et al.</i> , (2002) Plant J., <b>31</b> : 1-12 [102]
<i>jar1</i>	Col	ジャスモン酸イソロイシル合成欠損	Staswick <i>et al.</i> , (1992) PNAS <b>89</b> : 6837-6840 [103]
<b>Abscisic acid</b>			
<i>cyp707a1-1 cyp707a3-1</i>	Col-0	アブシジン酸代謝欠損	Okamoto <i>et al.</i> , (2006) Plant physiol., <b>141</b> : 97-107 [104]
<i>aba2-2</i>	Col-0	アブシジン酸合成欠損	Nambara <i>et al.</i> , (1998) Plant Cell Physiol., <b>39</b> : 853-858 [105]
<i>abi1-1</i>	Ler	アブシジン酸非感受性	Koornneef <i>et al.</i> , (1984) Physiol. Plant, <b>61</b> : 377-383 [76]
<b>Ethylene</b>			
<i>ein2-5</i>	Col-0	エチレン非感受性	Alonso <i>et al.</i> , (1999) Science, <b>284</b> : 2148-2152 [106]
<i>ctr1-1</i>	Col-0	恒常的エチレン応答性	Kieber <i>et al.</i> , (1993) Cell, <b>72</b> : 427-441 [107]
<i>eto1-5</i>	Col-0	恒常的エチレン生産	Wang <i>et al.</i> , (2004) Nature, <b>428</b> : 945-950 [108]
<i>hls1-1</i>	Col-0	部分的エチレン非感受性	Lehman <i>et al.</i> , (1996) cell, <b>85</b> : 183-194 [109]

**Table 5-2 処理および生育条件**

変異体名	交配親	処理	培地	採取組織
<b>Wild Type</b>				
Col-0		No treatment	1/2 MS plate	地上部
WS2		No treatment	1/2 MS plate	地上部
Nossen		No treatment	1/2 MS plate	地上部
Ler		No treatment	1/2 MS plate	地上部
<b>Auxin</b>				
<i>axr2-1/iaa7</i>	Col-0	No treatment	1/2 MS plate	地上部
<i>tir1-1</i>	Col-0	No treatment	1/2 MS plate	地上部
<i>sur1-3</i>	Col-0	No treatment	1/2 MS plate	地上部
<i>axr3-3/iaa17</i>	Col-0	No treatment	1/2 MS plate	地上部
<i>msg2-1/iaa19</i>	Col-0	No treatment	1/2 MS plate	地上部
<i>nph4-1/ar17</i>	Col-0	No treatment	1/2 MS plate	地上部
<b>Brassinosteroid</b>				
<i>det2-1</i>	Col-0	No treatment	1/2 MS plate	地上部
<i>bri1-5</i>	Ws2	No treatment	1/2 MS plate	地上部
<i>cyp85a1 cyp85a2</i>	Col-0	No treatment	1/2 MS plate	地上部
<i>bil1/bzr1</i>	Col-0	No treatment	1/2 MS plate	地上部
<b>Cytokinin</b>				
<i>ahk2 ahk3</i>	Col-0	No treatment	1/2 MS plate	地上部
<i>wol-3</i>	Col-0	No treatment	1/2 MS plate	地上部
<i>arr10 arr12</i>	Col-0	No treatment	1/2 MS plate	地上部
<i>cyp735a1 cyp735a2</i>	Col-0	No treatment	1/2 MS plate	地上部
<i>ipt5-1</i>	Col-0	No treatment	1/2 MS plate	地上部
<i>ipt3-1</i>	Nossen	No treatment	1/2 MS plate	地上部
<b>Gibberellin</b>				
<i>ga1-3</i>	Col	No treatment	1/2 MS plate	地上部
<i>3ox1/3ox2</i>	Col	No treatment	1/2 MS plate	地上部
<i>gai</i>	Ler	No treatment	1/2 MS plate	地上部
<b>Jasmonate</b>				
<i>aos</i>	Col-6	mock (Shaking with beads)	1/2 MS liquid	全体
		Wounding treatment	1/2 MS liquid	全体
<i>jar1</i>	Col	mock (0.1% DMSO)	1/2 MS liquid	全体
		Methyl Jasmonate treatment 24 h	1/2 MS liquid	全体
Col-0		mock (Shaking with beads)	1/2 MS liquid	全体
		Wounding treatment	1/2 MS liquid	全体
		mock (0.1% DMSO)	1/2 MS liquid	全体
Col-6		mock (0.1% DMSO)	1/2 MS liquid	全体
		Methyl Jasmonate treatment 24 h	1/2 MS liquid	全体
<b>Abscisic acid</b>				
<i>cyp707a1-1 cyp707a3-1</i>	Col-0	mock (0.1% DMSO)	1/2 MS liquid	全体
<i>aba2-2</i>	Col-0	mock (0.1% DMSO)	1/2 MS liquid	全体
		Osmotic treatment 24 h	1/2 MS liquid	全体
<i>abi1-1</i>	Ler	mock (0.1% DMSO)	1/2 MS liquid	全体
		ABA treatment 24 h	1/2 MS liquid	全体
Col-0		mock (Water)	1/2 MS liquid	全体
		Osmotic treatment 24 h	1/2 MS liquid	全体
Ler		mock (0.1% DMSO)	1/2 MS liquid	全体
		ABA treatment 24 h	1/2 MS liquid	全体
<b>Ethylen</b>				
<i>ein2-5</i>	Col-0	mock (0.1% DMSO)	1/2 MS liquid	全体
		ACC treatment 24 h	1/2 MS liquid	全体
<i>ctr1-1</i>	Col-0	mock (0.1% DMSO)	1/2 MS liquid	全体
<i>eto1-5</i>	Col-0	mock (0.1% DMSO)	1/2 MS liquid	全体
<i>hls1-1</i>	Col-0	mock (0.1% DMSO)	1/2 MS liquid	全体

#### 5-2-4 マイクロアレイ解析

##### 5-2-4-1 データの取得

RNA 抽出は、定量 PCR と同様の方法で行った。マイクロアレイ分析には、Arabidopsis ATH1 GenChip (Affymetrix、California、USA)を用いた。ハイブリダイゼーション、ウォッシュ、シグナルの検出は、Affymetrix 社のプロトコルに従い行った。反復実験は、独立して3度行った。

##### 5-2-4-2 ノーマライズ

ノーマライズは、第2章に記載した方法で行った。

##### 5-2-4-3 遺伝子の発現解析

遺伝子の発現解析は第2章に記載した方法で行い、発現変動した遺伝子を得るための閾値は  $p < 0.01$ 、 $sr \geq |0.6|$  (遺伝子発現変動 1.5 倍程度)とした。

##### 5-2-4-4 遺伝子のオントロジー解析

遺伝子のオントロジー (GO)は、遺伝子機能をとらえることを目的として構築されてきた、階層構造を持つ遺伝子のアノテーション情報である。各遺伝子の機能は(1)生物プロセス、(2)分子機能、(3)細胞成分の観点から表わされる。GO 解析は、マイクロアレイの結果解釈に用いられる手法で、与えられた遺伝子リストにおける特定の語彙の出現頻度の解析から、遺伝子リストの特徴を予測する。

GO リストは TAIR からダウンロードした 20,290 アノテーションを用い、BiNGO [110]により「Hypergeometric test ( $p < 0.05$ , Benjamini & Hochberg False Discovery Rate correction)」を行った。

#### 5-2-5 代謝物の一斉解析

代謝物のデータ解析は、複数の質量分析計で網羅的な代謝物データを測定し、これらを統合した上でプロファイルの解析およびトランスクリプトームとの統合解析に供した (Fig. 5-2)。以下に詳細を述べる。

#### 5-2-5-1 データ取得

メタボロームデータは、AtMetExpress プロジェクトの一部として、理化学研究所メタボローム解析グループによって分析されたデータを用いた。分析は、サンプルグループを二つに分けて(前半:オーキシシン、サイトカイニン、ブラシノステロイド、ジベレリン、後半:ジャスモン酸、アブシジン酸、エチレン)、下記の 4 つの質量分析装置を用いて行い、ノンターゲット分析によって検出された全ての化合物情報を取得した。化合物が同定されていないものや、重複して測定されているものも含め、前半データは 1,532 の化合物情報、後半データは 3,067 の化合物情報を得た。分析条件は、以前の報告に従った[23, 24, 111, 112]。

#### 5-2-5-2 データ前処理

サンプル間での分析感度差を補正するために、各代謝物のピーク強度と内部標準物質のピーク強度の比をとった値を補正後のピーク強度として用いた。内部標準物質は、サンプルに規定量添加した下記の化合物を用いた。GC-TOF-MS は標準物質を用いる代わりに、Kusano ら[24]の方法によって正規化したマトリクスを使用した。

LC-Q-TOF/MS: ポジティブモード Lidocaine (m/z: 234), ネガティブモード *d*-camphor sulfonate (m/z: 232)

CE-TOF/MS: ポジティブモード(カチオン) Methionine sulfone (m/z: 182),  
ネガティブモード (アニオン) *d*-camphor sulfonate (m/z: 232)

LC-IT-TOF/MS: Dinervonylphosphatidylcholine (m/z: 954)

ノーマライズを行った化合物から、さらに分析精度の低い化合物を取り除くため、化合物ごとに反復実験間の全組合せでピアソンの積率相関係数( $r$ )を求め、 $r$ の最大値が 0.6 以上の代謝物を以降の解析に用いた。前半データは 901 化合物、後半データは 1,677 化合物だった。Null 値またはゼロの値は、各化合物のピーク強度のゼロを除いた最小値を代入して補正した。



#### 5-2-5-3 化合物の統合とアノテーション

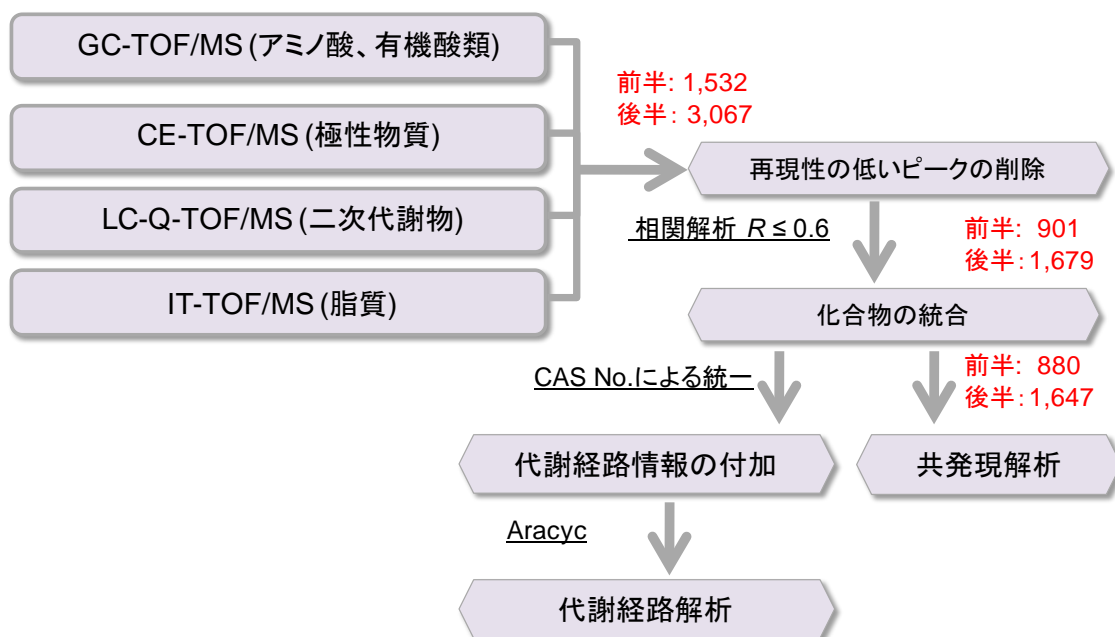
測定された化合物は、同一の化合物が重複して測定されている場合がある。これらの化合物には複数の慣用名が使用されていることがあるため、化合物名を統一して測定値をユニークにする必要がある。このためすべての化合物は、下記のデータベース (Table 5-3) を参考に CAS No.に変換し、化合物名をユニークなものに統合した。重複して測定されている化合物は、実験を通じて最も再現性  $r$  の値が高い測定値を選んだ。ただし、複数の質量分析計で検出された化合物の場合には、前半、後半のデータセットを通じて測定されている化合物 ( $r \geq 0.6$ ) を優先して選んだ。最終的に得られた化合物は、前半 880 化合物、後半 1,647 化合物となった。

**Table 5-3** 化合物名の統一に用いたデータベース

- 
- ・ 理研メタボロームグループ作成の化合物テーブル
  - ・ MASS BANK (<http://www.massbank.jp/>)
  - ・ KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>)
  - ・ PubChem Compound (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>)
- 

#### 5-2-5-4 代謝物の蓄積変動の解析

代謝物の蓄積変動の解析には、Student  $t$ -test を用い、 $p < 0.05$  を満たす化合物を変動があったとみなした。実験のエラーなどで  $n$  が 2 未満のデータは、解析を行わなかった。

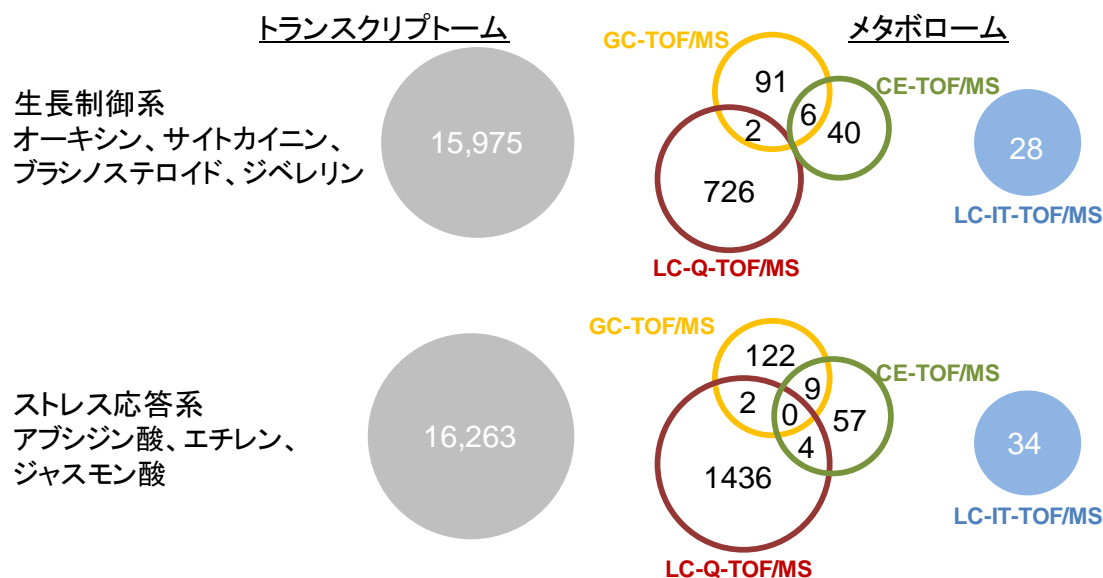


**Fig. 5-2** メタボロームデータの統合と解析の概要 赤字は、化合物数を示す。

### 5-3 結果および考察

#### 5-3-1 変異体のプロファイリング

収集したトランスクリプトーム、メタボロームデータの概要を Fig. 5-3 に記す。有意に発現が確認された遺伝子数は、前半セットで 15,975、後半セットで 16,263 遺伝子であった。メタボロームデータは、前半で GC-TOF/MS が 99 化合物、CE-TOF/MS が 46 化合物、LC-Q-TOF/MS が 728 化合物、IT-TOF/MS が 28 化合物であった。GC-TOF/MS と CE-TOF/MS、GC-TOF/MS と LC-Q-TOF/MS の間で重複して測定された化合物があった。後半セットは、前半セットよりも測定された化合物数が多かった。GC-TOF/MS が 133 化合物、CE-TOF/MS が 70 化合物、LC-Q-TOF/MS が 1442 化合物、IT-TOF/MS が 34 化合物であった。前半で検出されなかった重複化合物が CE-TOF/MS と LC-Q-TOF/MS の間に見られた (Fig. 5-3)。



**Fig. 5-3** 本実験セットで検出された遺伝子と代謝物の数 トランスクリプトームデータは、CEL ファイルを MAS5 で正規化し、実験セット中で 1 度でも発現が見られた(detection  $P$ -value<0.05)プローブセットを 1 遺伝子と数えた。実際の遺伝子をコードしていないプローブセットは除外した。メタボロームデータは、質量分析器ごとにピークを抽出して正規化を行った後、 $n=3$  の反復間でピアソンの相関係数を求め (NULL 値を除く)、 $R \geq 0.6$  を満たす化合物を解析に用いた。

### 5-3-2 代謝物と遺伝子変動による変異体のプロファイリング

はじめに、各変異体で変化が生じたホルモンを遺伝子レベルで解析した後、ホルモンと代謝の関係について遺伝子発現と化合物の蓄積量の変化から解析した。以下に詳細を述べる。

#### 5-3-2-1 変異体におけるホルモン応答の変化

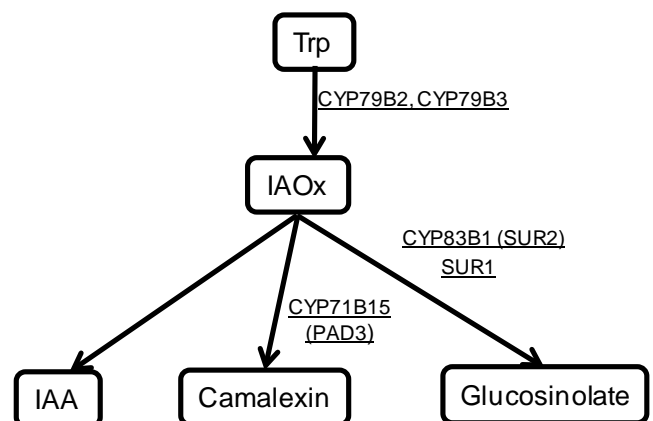
ホルモン間のクロストークは、変異体を解析した結果、発見されたケースが多いように、ホルモンに関わる変異体では、変異が直接関与するホルモン応答に加えて、複数のホルモン応答が変化していることが知られている[113]。そこで、ホルモンとの関係が明らかになっている遺伝子群をマーカーとして、各変異体で野生型と比較して変化が生じている植物ホルモンの応答を、GO 解析を用いて調べた。各変異体のマイクロアレイデータから、有意に変動した遺伝子を選び ( $p < 0.01$ ,  $|sr| \geq 0.6$ )、各変異体で変動した遺伝子群が属していたホルモン関係のカテゴリーを抽出した。カテゴリーは、生合成

(B)、代謝(M)、信号伝達(S)、応答性(R)を採択した。

結果を Table 5-4 に示す。多くの変異体で、複数のホルモンの生合成や信号伝達経路に変異が生じていることが確認された。以下に、本研究で着目している生合成、代謝の変化について詳細を述べる。

ジャスモン酸生合成欠損変異体 *aos* では、*CYP79B2*、*CYP79B3*、*CYP83B1* などのオーキシン生合成、代謝遺伝子の発現量が減少した (Table 5-4, Table S5-1)。*CYP79B2*、*CYP79B3* は tryptophan (Trp) から indole-3-acetaldoxime (IAOx) への変換経路を触媒する。シロイヌナズナでは、IAOx を中間体として、*CYP83B1*、*SUR1* が触媒する glucosinolate の経路、*CYP71B15* が触媒する camalexin の経路と IAA の合成経路が分岐すると考えられている[88] (Fig. 5-4)。*CYP79B2*、*CYP79B3* はジャスモン酸処理によっても誘導されることが報告されているが[114]、*aos* ではこれらの遺伝子の発現量は大きく減少しており、既知の応答と一致した。一方、ジャスモン酸のイソロイシル化酵素が欠損した *jar1* [103] では、*CYP79B2*、*CYP83B1* の発現量が増加した。これら *aos*、*jar1* ではオーキシン関連応答性遺伝子が動かないことから、IAA の合成経路よりも glucosinolate 等の二次代謝経路が強い影響を受けていることが示唆された。Methyl Jasmonate 処理を行った *jar1* では *CYP83B1*、*SUR1* に加え、Trp を基質として indole-3-pyruvic acid (IPA) 合成を触媒するアミノトランスフェラーゼ *TAA1* の発現量も増加した。これらの結果は、ジャスモン酸とジャスモン酸イソロイシルが異なる作用を持つ可能性を示唆した。さらに *aos* では、ジベレ

リン生合成遺伝子 *GA3ox2* を胚発生時期に負に制御する転写因子 *FUS3* (AT3G26790) [115]、*PhyB* の制御下で *GA20ox*、*GA3ox* の発現調節を行うと報告されている *ATH1* (AT4G32980) [116] の発現量が増加した。しかし、*aos* では *GA20ox*、*GA3ox* ともに変動していないため、ジベレリンの生合成への関与は限定的であると考えられた。これらの結果から、Table 5-4 の解析結果は、変異体のホルモンの変化を示す



**Fig. 5-4** IAOx を中心とした代謝経路  
四角内は化合物、下線は酵素を表す。略称は本文中に記載

ものであるが、直接的なホルモンの関与を必ずしも反映していない場合もあるので、個別の検討が必要なが示された。

ジベレリン欠損変異体 *gal-3*、オーキシン過剰変異体 *sur1* ではブラシノステロイド生合成遺伝子 *BR6ox2* (AT3G30180)、*CYP90D* (AT3G13730) の発現量が増加したが、同時に代謝酵素である *BASI* (AT2G26710) も大幅な増加を示した (Table 5-4, Table S5-1)。ジベレリン非感受性変異体 *gai* でも、*BR6ox2* (AT3G30180)、*BASI* (AT2G26710) が同様に变化した。ブラシノステロイドの生合成遺伝子の多くはフィードバック制御を受けることが知られており、実際にブラシノステロイド欠損変異体 *det2-1* では、生合成遺伝子 *BR6ox2* (AT3G30180) の発現量が増加し、活性型ブラシノステロイドを代謝する *BASI* (AT2G26710) の発現量が減少している。しかし、*gal-3*、*gai* では、いずれの遺伝子も発現量が増加しており、ジベレリン変異体においてブラシノステロイドの生合成がどのように変化しているかについては興味深い (Table 5-4, Table S5-1)。

*hls* [109] は、暗所でのフック形成欠損変異体で、部分的エチレン非感受性を示す。*HLS* はオーキシンを介してフック形成を制御していると考えられているが [109]、まだ十分に機能が明らかになっていない。*hls* はアブシジン酸の生合成遺伝子 *ABA4* (AT1G67080) の発現量が減少し、逆に不活性化酵素をコードする遺伝子 *CYP707A1* (AT4G19230)、*CYP707A2* (AT2G29090) の発現量が増加した。*hls* におけるアブシジン酸関連の変異については報告がまだないが、この結果からアブシジン酸の生合成、代謝が影響を受けていることが示唆された。オーキシンの影響は検出されなかったが、これは恒常的な光照射条件で生育させた芽生えを解析したことが一因かもしれない (Table 5-4, Table S5-1)。

多くの変異体中でさまざまなホルモンの応答性遺伝子の発現が変動していることが明らかになった。中でも、オーキシンの信号伝達経路に関わる *Aux/IAA17* の機能獲得変異体 *axr3-3/iaa17* や、オーキシン過剰の表現型を示す *sur1-3*、ジャスモン酸生合成欠損変異体 *aos* や *jar1* で顕著にその傾向がみられ、複数のホルモンに対する応答が変化していると考えられた (Table 5-4)。ブラシノステロイド合成欠損変異体 *CYP85A1* *CYP85A2* でのオーキシン応答性遺伝子の発現変動や、オーキシン信号伝達変異体 *msg2-1* *iaa19* や *axr3-3* *iaa17* でエチレン応答性遺伝子の発現変動は、既知のホルモン間のクロストークと一致した [3, 4]。

サイトカイニン変異体では、ほとんどが他のホルモンの影響を示さなかった。生合成

変異体 *ipt3-1*、*ipt5-1* は発現量が野生型と比べて変動している遺伝子が少なく、遺伝子レベルで顕著な特徴が見られなかった。これらは、遺伝子機能に冗長性がある上、通常の生育条件下ではサイトカイニンの内生量がほとんど野生型と変わらないために、遺伝子発現プロファイルがサイトカイニン欠損状態を示していないことが原因だと考えられる。同様の傾向はオーキシン受容体欠損変異体 *tir1* にも見られ、やはり機能が重複する遺伝子の存在による冗長性が一因だと考えられる[117]。また、アブシジン酸の変異体は、ストレス処理を行わない通常の生育条件下において、ホルモンに関連する遺伝子の発現に顕著な変動が生じていないことが確認された (Table 5-4)。

**Table 5-4 変異体におけるホルモン応答の変化**

変異体名		遺伝子のオントロジーカテゴリー <sup>a</sup>						
		Auxin	BR	GA	CK	ABA	JA	ET
Auxin	<i>msg2-1 iaa19</i>							RS
	<i>nph4-1 arf7</i>	R						
	<i>axr2-1 iaa7</i>	R						
	<i>axr3-3 iaa17</i>	R		R		RS	R	R
	<i>sur1-3</i>	RM	M	R		R	R	
	<i>tir1-1</i>							
BR	<i>cyp85a1 cyp85a2</i>	R	BM					
	<i>det2-1</i>	R	BM					
	<i>bri1-5</i>		BM					
	<i>bil1 bzi1</i>							
GA	<i>ga3ox1 ga3ox2</i>			R			R	
	<i>ga1-3</i>	R	BM	RSB			RS	
	<i>gai</i>		RM	RSB			R	
CK	<i>cyp735a1 cyp 735a2</i>				RS			
	<i>arr10 arr12</i>				RS			
	<i>ahk2 ahk3</i>				RS			
	<i>wol-3</i>				RS	R		
	<i>ipt3-1</i>							
	<i>ipt5-1</i>							
ABA	<i>abi1-1</i>					R		
	<i>aba2-2</i>							
	<i>cyp707a1-1 cyp707a3-1</i>							
JA	<i>aos</i>	BM		B			RBM	RS
	<i>jar1</i>	RBM		R		R		
ET	<i>ctr1-1</i>	R						RS
	<i>ein2-5 P0.1</i>							RS
	<i>hls1-1</i>			R		RM		
	<i>eto1-5</i>							

a: 表中の文字は変動した遺伝子のオントロジーカテゴリーを示す。B: 生合成、M: 代謝、S: 信号伝達、R: 応答性

### 5-3-2-2 ホルモン機能と代謝経路の関係

次に、野生型に比べて各変異体で有意に蓄積量が変動している代謝物を抽出し (Table S5-2)、遺伝子の発現量の変化と合わせてホルモンとの関係を調べた。同じホ

ルモンのグループに含まれる変異体間で化合物リストを比較したところ、傾向を調べるために十分な化合物の重複が見られないホルモンもあったが、ジベレリン欠損変異体 *ga3ox1 ga3ox2*, *gal-3*, *gai* の間で、多くの共通した化合物が変動している他、遺伝子発現パターン的一致が見られた (Table 5-5, Table 5-6)。そこで、ここではホルモンが制御する代謝経路の一例として、ジベレリン変異体で見られた遺伝子発現と化合物の変動について詳述する。

**Table 5-5 ジベレリン変異体で変動する遺伝子の比較**

AGI Code	Gene name/ Annotation	sr		
		ga1-3	ga3ox1 ga3ox2	gai
cell wall organization and biogenesis				
AT4G33220	enzyme inhibitor/ pectinesterase	0.00 <sup>a</sup>	-0.81	-0.65
AT4G17030	ATEXLB1 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN-LIKE B1)	-0.79	-0.79	0.00
AT5G06640	proline-rich 78xtension-like family protein	0.87	0.81	0.00
AT3G59010	pectinesterase family protein	-2.09	0.00	-0.97
AT2G40610	ATEXPA8 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A8)	0.00	-2.12	-1.32
AT2G37640	EXP3	0.00	-1.16	-0.85
AT3G29030	EXPA5 (EXPANSIN A5)	-1.30	0.00	-1.09
secondary metabolic process				
AT5G07990	TT7 (TRANSPARENT TESTA 7); flavonoid 3'-monooxygenase/ oxygen binding	0.00	1.45	1.77
AT1G15550	GA3 ox 1 (GIBBERELLIN 3-OXIDASE 1); gibberellin 3-β-dioxygenase/ transcription factor binding	3.24	-4.98	3.06
AT3G46490	iron ion binding / oxidoreductase/ oxidoreductase, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen, 2-oxoglutarate as one donor, and incorporation of one atom each of oxygen into both donors	-1.38	-1.19	-1.02
AT1G54040	ESP (EPITHIOSPECIFIER PROTEIN); enzyme regulator	-1.24	-0.98	0.00
AT5G51810	GA20 ox 2 (GIBBERELLIN 20 OXIDASE 2); gibberellin 20-oxidase	3.30	2.33	3.20
AT3G29590	AT5MAT; O-malonyltransferase/ transferase	1.13	1.33	1.52
AT3G43800	ATGSTU27 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 27); glutathione transferase	-0.63	-0.78	0.00
AT1G62540	FMO GS-ox2 (FLAVIN-MONOOXYGENASE GLUCOSINOLATE S-OXYGENASE 2); 3-methylthiopropyl glucosinolate S-oxygenase/ 4-methylthiopropyl glucosinolate S-oxygenase/ 5-methylthiopropyl glucosinolate S-oxygenase/ 7-methylthiopropyl glucosinolate S-oxygenase/ 8-methyl	-1.42	-1.28	0.00

a: 黒字の値は有意差がなかったもの、青の値は有意に減少したもの、赤の値は有意に増加したものを示す ( $p < 0.05$ )。

**Table 5-6** ジベレリン変異体で変動する代謝物の比較

化合物	sr		
	ga1-3	ga3ox1 ga3ox2	gai
Cyanidin 3-O-[2''-O-(xylosyl) glucoside] 5-O-glucoside	2.61		2.23
Quercetin-3-(2''-O- $\alpha$ -rhamnosyl)-O- $\beta$ -glucosyl-7-O- $\alpha$ -rhamnoside	1.69		0.97
$\alpha$ -Tocopherol	1.55		
Cyanidin 3-O-[2''-O-(2'''-O-(sinapoyl) xylosyl) 6''-O-(p-O-coumaroyl) glucoside]			2.42
5-O-[6'''-O-(malonyl) glucoside]	1.51		
Suberic acid	1.50		
3-Amino-Piperidin-2-one	1.47		
D-(+)-Cellobiose	1.44		
Quercetin-3-O-[6''-O-(rhamnosyl) glucoside] 7-O-rhamnoside	1.39		
Quercetin-3-O- $\beta$ -glucosyl-7-O- $\alpha$ -rhamnoside	1.34	1.31	
MST_1596.8	1.30		2.76
Maltotetraose	0.95	0.86	
Glutathione (oxidized form)	0.93	1.06	0.35
Quercetin 3-O-glucoside 7-O-rhamnoside	0.92	0.92	
MST_2182.9	0.82		1.33
MST_2406.9	0.82	0.64	1.25
MST_2494.8	0.68		
Campesterol glucoside	0.49		
MST_2539.9	0.48		1.04
32:0 PG	0.48		0.52
MST_2105.7	0.47		1.20
Threonine	0.39		1.26
Glutamic acid	0.28		1.21
Citric acid	0.22	0.30	1.27
34:3 PG	0.21		0.22
DL-Lactic acid	-0.57		
DL-Glycerol-3-phosphate	-0.78	-0.88	1.31
MST_2023.2	-1.01	-0.93	
D-Glucose	-1.03	-0.91	
MST_2128.3	-1.05		
D-Fructose	-1.33	-1.30	
D-Mannose	-1.67	-1.48	
N2-acetyl-Ornithine	-2.05	-1.66	
Malonic acid		1.65	0.79
Isonicotinic acid		1.21	
Proline		1.11	
D-Glucose-6-phosphate		0.99	
3-Indolylacetonitrile		0.91	0.29
L-Aspartic acid		0.89	
L-Glutamic acid		0.78	
Pyridoxamine phosphate		0.67	
Myo-Inositol-1-phosphate		0.58	0.27
DL-Ornithine		-1.93	
MST_1509.5			2.24
Serine			2.17
Alanine			2.11
MST_1688.6			2.08
Glutamine			1.97
MST_1589.2			1.95
Cyanidin 3-O-[2''-O-(6'''-O-(sinapoyl) xylosyl) 6''-O-(p-O-(glucosyl)-p-coumaroyl) glucoside]			1.93
5-O-(6'''-O-malonyl) glucoside			
Threonic acid			1.75
MST_1480.5			1.71
Asparagine			1.63
1,6-Anhydro- $\beta$ -D-Glucose			1.61
MST_1566.3			1.61
Phenylalanine			1.51
Quercetin-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1,2)- $\beta$ -D-glucopyranoside-7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside			1.26
MST_2446.7			1.17
Lysine			1.09
D- $\alpha$ , $\alpha'$ -Trehalose			1.04
Tyrosine			1.04
DL-Aspartic acid			0.89
Homoserine			0.88
Quercetin-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1,2)- $\beta$ -D-glucopyranoside-7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside			0.84
MST_2996.4			0.81
Glucose-6-phosphate			0.80
DL-Pyroglutamic acid			0.79
Phosphoric acid			0.78



(Table 5-6 続き)

化合物	sr		
	ga1-3	ga3ox1 ga3ox2	gai
Shikimic acid			0.77
Glycerate			0.76
1,4-Butanediamine			0.74
MST_2214.3			0.59
Pantothenate			0.55
Myo-Inositol			0.53
34:5 DGDG			0.32
34:3 DGDG			0.32
34:2 SQDG			0.21
34:4 PG			0.10
L-Homocystine			-0.21
7-(Methylsulfinyl)heptylglucosinolate			-0.70
5-(Methylsulfinyl)pentylglucosinolate			-0.80
MST_2429.6			-0.89
6-(Methylsulfinyl)hexylglucosinolate			-0.99

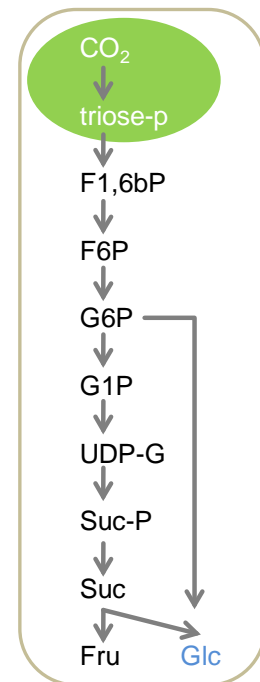
a: 黒字の値は有意差がなかったもの、青の値は有意に減少したもの、赤の値は有意に増加したものを示す ( $p < 0.05$ )

ジベレリンの主な機能には、種子の発芽、茎の伸長、葉の生長、花器官の発達などが知られている。今回実験に用いたジベレリン変異体 *gal-3* はジベレリン生合成経路の上流に位置する *ent*-コパリル二リン酸合成酵素が欠損しており、*ga3ox1 ga3ox2* は不活性型ジベレリン GA<sub>9</sub> から活性型ジベレリン GA<sub>4</sub> への変換を担う GA3 位酸化酵素の欠損体である[118]。これに加えて、もう一つのジベレリン変異体 *gai* は、ジベレリンの信号伝達経路における負の制御因子 DELLA に変異があり、ジベレリンに非感受性を示す機能獲得型の変異体である[75]。いずれも茎の伸張が抑制されることにより矮性となり、開花時期の遅延や葉色が濃緑色になるなどの形質を示す。

各変異体で変動した遺伝子、化合物数を比較すると、遺伝子数は、*gal-3*、*ga3ox1 ga3ox2* では *gai* の2倍以上変動したのに対し、化合物数では *gai* が最も多く、*gal-3*、*ga3ox1 ga3ox2* は、*gai* の半分程度であった (Fig. 5-6)。このような逆転の結果が得られた原因は明らかではないが、ジベレリンの欠損を補うような恒常性維持の機構が、ジベレリン欠損変異体で働いたのかもしれない。化合物の種類では、glucose や fructose のような様々な代謝に関わる糖類の内生量が顕著に減少しており、加えて二次代謝産物 flavonoid 類の内生量が増加する傾向がみられた。さらに、ジベレリンの変異体2種以上において変動した遺伝子のリストの GO 解析を行ったところ ( $p < 0.01$ ,  $|sr| \geq 0.6$ )、ジベレリン生合成や信号伝達に加え、細胞壁の調節、二次代謝産物の生合成、外部刺激への応答などの経路が有意に変動している結果が得られた (Fig. 5-7)。以下に、化合物および遺伝子発現の変動が大きかった糖の合成、細胞壁の調節、二次代謝物の生合成についての考察を述べる。

## 糖の合成

Glucose (Glc)は、植物の葉緑体内で固定された CO<sub>2</sub> が出発物質となり、主に triose-phosphate (triose-P)として細胞質に輸送された後、fructose-1,6-bisphosphate (F1,6bP)、fructose-6-phosphate (F6P)、glucose-6-phosphate (G6P)を経て合成される[119] (Fig. 5-5)。一方、glucose-6-phosphate の一部はUDP-glucose (UDP-G)を経て、最終的に sucrose (Suc)に変換され、主には液胞に蓄積されることが知られている[119]。今回の結果では、*ga3ox1 ga3ox2*、*gai*で glucose-6-phosphate の内生量が増加し、*gal-3*、*ga3ox1 ga3ox2* で d-glucose の内生量および sucrose の分解から得られる d-fructose (Fru)の内生量が大きく減少した (Table 5-6)。全体の傾向をみると、ジベレリン変



異体において、glucose-6-phosphate から glucose への変換が抑制されていることが示唆された。ジベレリンと糖生成の直接的な関係については、ほとんど明らかになっていない。また、これらの代謝に関わることが報告されている遺伝子の変動は検出されなかったが、細胞壁の骨格に相当するセルロース微繊維やフラボノイドの

生合成では、UDP-glucose が重要な基質として用いられるため、ここで見られた糖の内生量の変動は、次に述べる細胞壁や二次代謝の変動に影響を与えている可能性もある。

## 細胞壁の調節

植物の正常な形態形成において、細胞の伸長方向を調節し細胞の形を決める伸長機能と、細胞壁の伸長を調節して細胞の伸長量を決める伸展機能が重要である。ジベレリンの変異体で変動した細胞壁の調節に関わる遺伝子には、pH 依存的な細胞壁の伸展機能を有する酵素、エクспанシンをコードする *ATEXLB1* (AT4G17030)、*ATEXPA8* (AT2G40610)、*EXP3* (AT2G37640)、*EXPA5* (AT3G29030) および、ペクチンを加水分解するペクチンエステラーゼをコードする遺伝子群 (AT4G33220、

**Fig. 5-5 植物細胞内における糖合成経路** 緑の部分は、葉緑体内での反応を示す。  
F6P: fructose-6-phosphate; G1P: glucose-1-phosphate; Suc-P: sucrose-P その他の略称は、本文中に記載。

AT3G59010)が含まれ、いずれも発現量が減少した(Table 5-5)。エクспанシンは、シロイヌナズナでは 36 の遺伝子からなるファミリーを構成しており、個々の機能は、まだ明らかにされていないものが多い[120]。ワタの培養細胞にジベレリンを処理したとき、発現量が増加したという報告があり[121]、今回の結果はこれと一致した。また、*EXPA5* は変異体や阻害剤を用いた実験からブラシノステロイドによって制御を受けるという報告がある[122]。*gal-3*、*gai* ではブラシノステロイド不活化酵素 *BAS1* の発現量が増加しており、*EXPA5* が減少することから、ブラシノステロイドとの関係が示唆されたが、*ATEXLB1*、*ATEXPA8*、*EXP3* は *BAS1* とは発現パターンが一致しなかった。他にオーキシンにも細胞伸展調節能が知られているが[120]、オーキシン応答性遺伝子の発現に大きな変動は生じておらず、ジベレリン自体が上記の遺伝子群の制御を介して、細胞伸展調節能を有している可能性もある。今後の分子レベルでの解析が期待される。

## 二次代謝産物の生合成

二次代謝の生合成では、flavonoid、glucosinolate 生合成経路に関わる遺伝子が大きく変動し、化合物の内生量の変化と一致した(Table 5-5, Table 5-6)。Flavonoid 経路では、dihydrokaempferol を dihydroquercetin に変換するフラボノイド 3'モノオキシゲナーゼである *TT7*(AT5G07990)[123]の発現量が *ga3ox1 ga3ox2*、*gai* で増加しており、アントシアニンアシルトランスフェラーゼである *AT5MAT*(AT3G29590)[123]の発現量が 3 種のジベレリン変異体で共通して増加した。これに対応して dihydroquercetin の下流で合成される化合物である quercetin 類、*AT5MAT* の下流で合成される化合物 cyanidin 類の内生量が増加した。これらの結果は、ジベレリン処理を行った時にフラボノイド生合成遺伝子の発現が抑制されるという Jiang らの報告[124]に一致しており、これらは、ジベレリン欠損変異体で広くみられる濃緑色葉の原因である。また、glucosinolate 経路では、*gal-3*、*ga3ox1 ga3ox2* では methylthioalkyl glucosinolate を methylsulfinylalkyl glucosinolate に変換するフラビンモノオキシゲナーゼ *FMO*(AT1G62540)と、合成された methylsulfinylalkyl glucosinolate の加水分解酵素 *ESP*(AT1G62540)の発現量が大きく減少したが、glucosinolate 類の内生量に有意な変動は検出されなかった。一方、*gai* では、遺伝子レベルの変動は検出されなかったものの、*FMO* の下流で生成される glucosinolate 類 7-(methylsulfinyl)heptylglucosinolate、5-(methylsulfinyl)pentylglucosinolate、

6-(methylsulfinyl)hexylglucosinolate の内生量に有意な減少が見られた。ジベレリンと glucosinolat の関係については今のところ報告がないが、今回の結果から、ジベレリン変異体で glucosinolate の生合成が影響を受けていることが示唆された。

ここまではジベレリンの代謝について述べてきたが、この他にも、変異が直接関与するホルモンの種類は異なるものの、*wol3* と *arx3-1 iaa17* や *wol3* と *cyp85a1 cyp85a2*、*hls* と *aba2* (mock)の間にも、共通して変化した化合物が多く見られた (Table S5-2)。先に述べたように、*hls* ではアブシジン酸の生合成遺伝子の発現量が減少し、代謝酵素をコードする遺伝子の発現量の増加が見られた。このため、*hls* で変動する化合物は、アブシジン酸の内生量が減少した場合の影響も受けている可能性がある。一方、*wol3* と *arx3-1 iaa17* や *wol3* と *cyp85a1 cyp85a2* は、遺伝子レベルの解析では共通したホルモンの変動が検出されていないことから、共通の化合物が変動したことは、共通のホルモン作用による結果と考えるよりも、むしろ多様な制御によって最終的な表現型が類似した結果引き起こされたものである可能性がある。

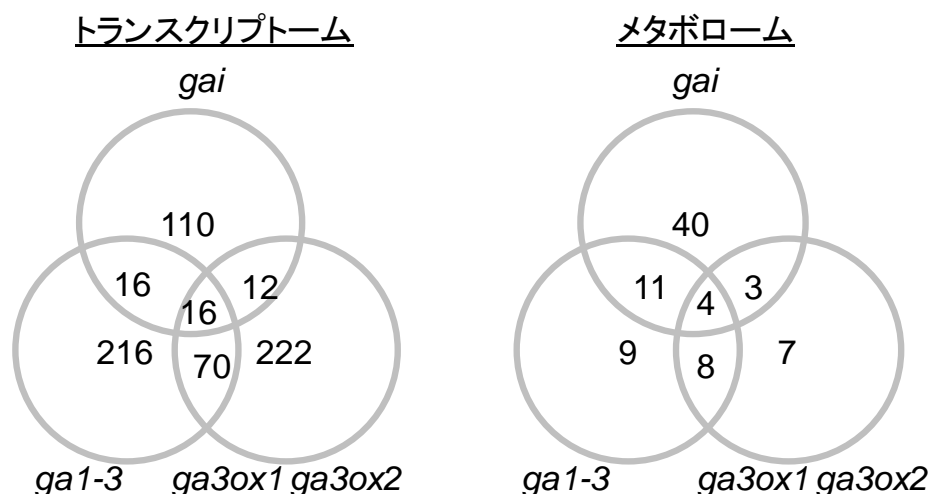
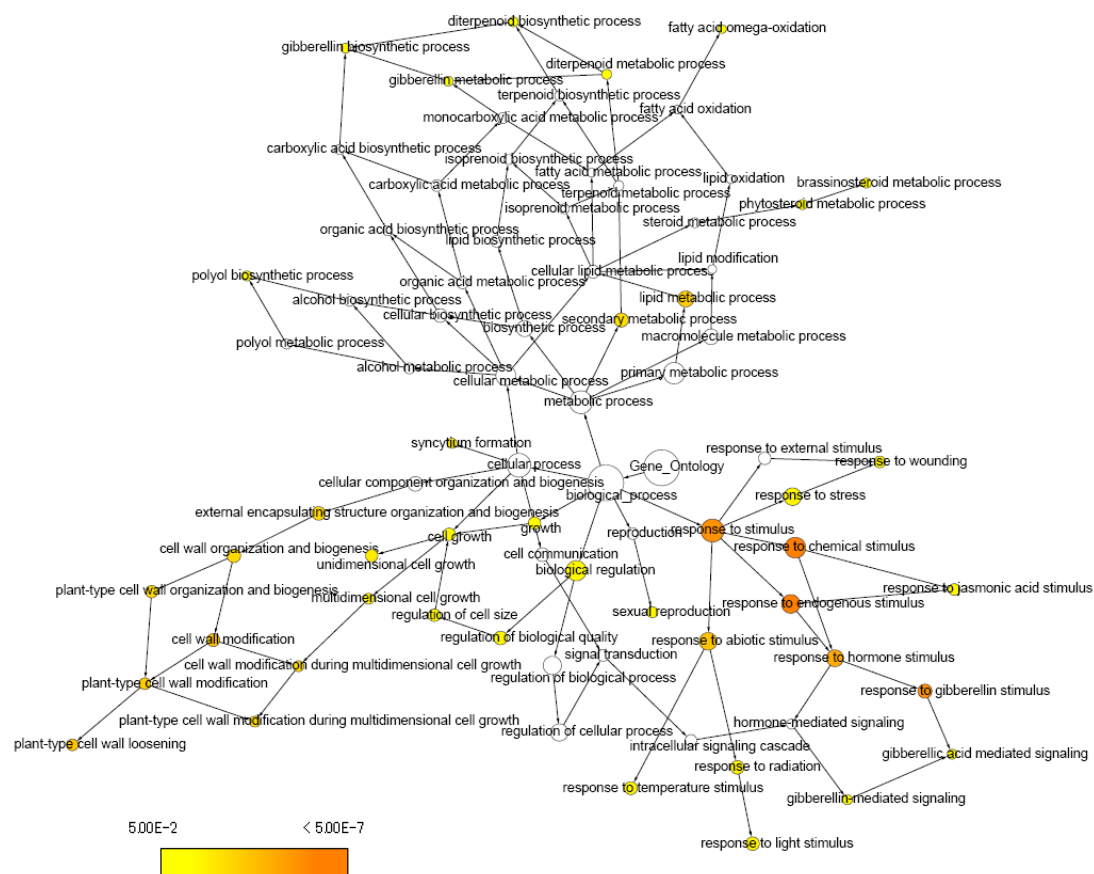


Fig. 5-6 ジベレリン変異体で変動する遺伝子、代謝物の重複



**Fig. 5-7** ジベレリン変異体で変動した遺伝子の分類 *gal-3*、*ga3ox1* *ga3ox2*、*gai* のうち、2 つ以上の変異体で変動した遺伝子リスト ( $p < 0.01$ ,  $|sr| \geq 0.6$ ) の GO 解析を行った。ノードの色は、有意水準を示す(値は、カラーバー)。

### 5-3-3 代謝物、遺伝子の共発現解析

#### 5-3-3-1 共発現ネットワークの構築

植物ホルモンの主要遺伝子の発現と協調的な蓄積パターンを示す化合物を探すため、共発現解析を行った。トランスクリプトーム、メタボロームデータともに *sr* に変換し、実験 (列、 $n = 28$ ) と遺伝子、代謝物 (行) から成るマトリクスを作成し、ピアソンの積率相関係数を用いて遺伝子発現、代謝物蓄積のパターンの類似性を調べた。遺伝子は、TAIR8 のゲノムアノテーション情報に基づき、植物ホルモンの生合成や信号伝達系に関わる 146 遺伝子、メタボロームは、前半、後半のデータセットでいずれも再現性良く検出され、化合物が同定されている 92 化合物を対象とした。有意な相関関係が検出された遺伝子、代謝物は相関係数に応じてリンクさせ、ネットワークとして可視化した (Fig. 5-8)。

#### 5-3-3-2 遺伝子および代謝物の共発現

遺伝子および多くの代謝物は密に繋がりがあい、大きなクラスターを形成した。遺伝子はホルモングループごとに複数のクラスターを形成していることが確認された。例えば、サイトカイニン (ライトグリーン) では、サイトカイニン受容体である *AHK4/WOL*、*AHK2*、タイプ A のレスポンスレギュレーター (RR) *ARR4*、*ARR5*、*ARR6*、*ARR7*、*ARR9* などに加え、ゼアチン配糖体化酵素 *UGT76C2* には高い発現パターンの類似性が見られ、信号伝達系とサイトカイニン代謝経路の遺伝子の挙動が一致することが確認できた。これらの遺伝子は、多くの未同定の化合物との間で共発現関係が確認できた他 (データ未掲載)、*ARR* 遺伝子群 (*ARR4*、*ARR6*、*ARR9*) は *Acetylserine* との間に強い負の相関を示した。エチレン (ピンク) は、エチレン生合成遺伝子 *ACS*、*ACO2* に加え、信号伝達系の遺伝子 *EFE*、*ERS*、*ETR*、*CTR1*、*EIN3* などがクラスターを形成し、密接な共発現の傾向を示した。この中で *ACO2* や *CTR1* は *Histidine* と強い正の相関を示し、また、*ETR* や *ERS* は *MGDG* や *PG* などの脂質と強い負の相関を示した。これらの生物学的な関係については明らかではない。

これまでの遺伝子と代謝物の共発現解析は、二次代謝産物と原因遺伝子の関係が中心となって研究されてきた [27, 125]。二次代謝は一次代謝産物に比べ蓄積の変動が大きく、比較的相関性が検出されやすいことが知られている。実際に、ホルモン関連遺伝子を中心としたネットワークでは個別のクラスターを形成している *glucosinolate*

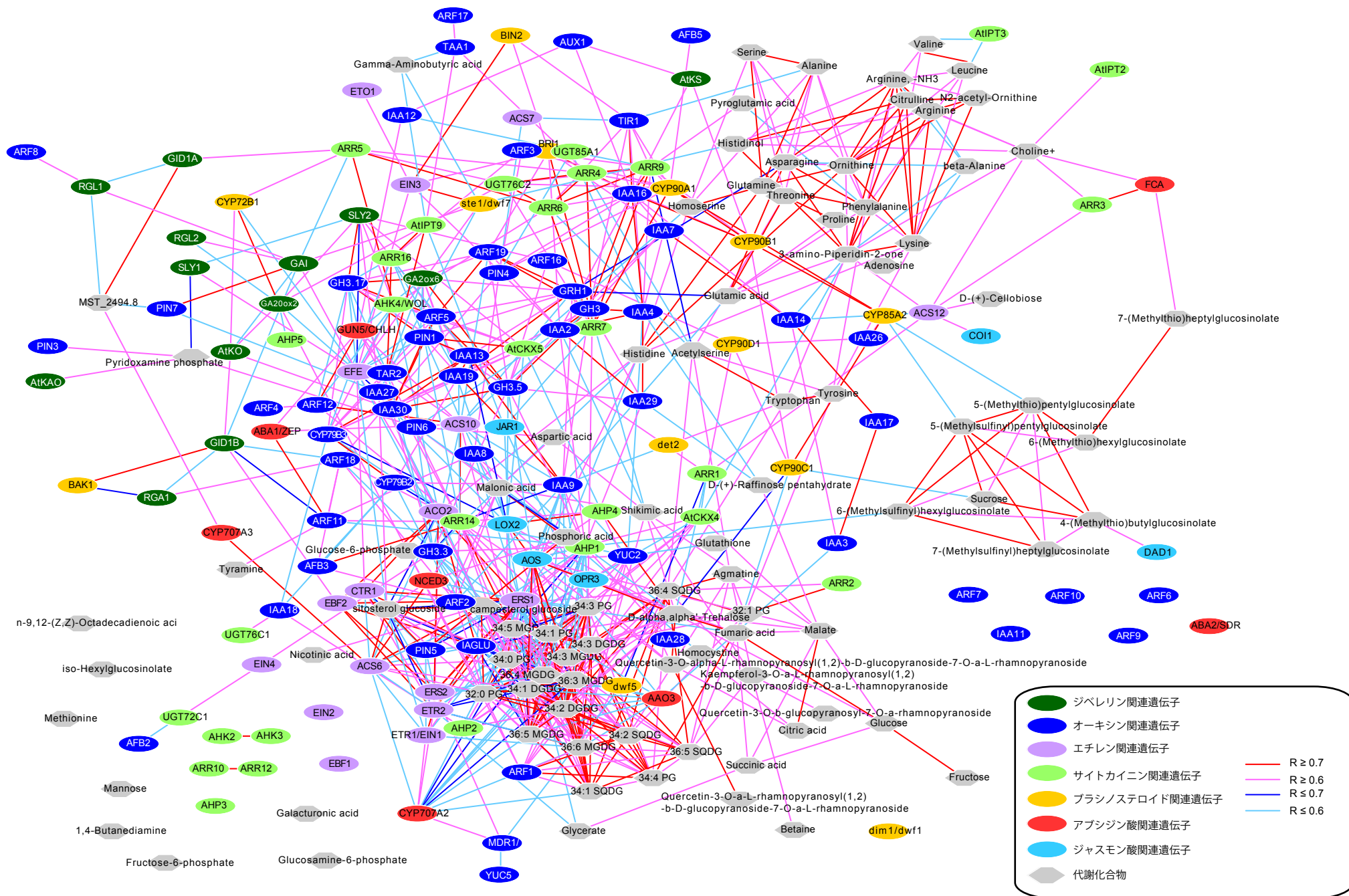
や flavonoid 類は、本データセットにおいても、それらの生合成遺伝子と強い共発現の傾向を示した(データ未掲載)。しかしながら、ここで構築した共発現ネットワークにおいては、ホルモン関連遺伝子はむしろ糖やアミノ酸や有機酸と共発現を示す傾向が見られた。今後、個々の遺伝子と化合物の関係を詳細に解析することにより、遺伝子と関連代謝物の新たな関連性が見つかっていくことが期待される。

#### 5-4 まとめ

本章では、植物ホルモンの生合成やシグナル伝達の異常が報告されているシロイヌナズナの変異体を収集し、大規模な遺伝子発現および代謝物プロファイルデータの解析を行った。個々の変異体と野生型との間で、転写、代謝レベルで生じている変動について調べ、副次的な植物ホルモンの変化や、ホルモングループの中で共通した変動がみられる代謝物を明らかにした。また、本研究で取得した大規模なオミクスデータを用いて遺伝子と代謝物の共発現解析を行い、ホルモン変異体で協調的な蓄積パターンを示す遺伝子と代謝物を調べた。

今回用いたデータセットにおいて、ホルモンの制御下にあると予測された化合物の多くは一次代謝物であった。ホルモングループ間で共通して変動した代謝物や、共発現解析でホルモンの主要な遺伝子群の変動に一致した代謝物は、いずれも植物の基本構成要素となるアミノ酸や有機酸が多く含まれていた。これらの結果がホルモンの直接的な影響を反映したものであるのか、今後、詳細な検討が必要だと考えられる。また一方で、メタボローム解析の技術自体は今も発展途上にあるものであり、定量した化合物の多くが未同定のものである。共発現の解析においては、多くの未同定化合物が主要なホルモン遺伝子と協調的な変動パターンを示しており、今回の解析では明らかにならなかったホルモンと関係の強い化合物の存在が示唆された。解析感度の向上に加え、代謝物を同定するための取り組みが現在も精力的に進められているが[23]、今後、メタボローム解析の中で、より多くの同定された化合物が測定されるようになることにより、植物ホルモンや遺伝子の新たな機能の解明が大きく前進すると考えられる。





**Fig. 5-8 植物ホルモンの主要遺伝子と代謝物の共発現ネットワーク** ノードは遺伝子、代謝物、エッジはノード間に相関関係があることを示す。閾値とエッジの種類は図中のカラーチャートに示す。ネットワークの可視化には、Cytoscape[52]を使用した。



## 6章 総括

本博士論文では、シロイヌナズナのおミクスデータの解析を中心として、さまざまな条件下での植物ホルモンの変動を包括的にとらえる方法を確立し、ホルモンが介する植物の生長、代謝調節機構を明らかにすることを目的として研究を行い、以下の成果を得た。

### 植物ホルモン応答の簡易一斉検出法の確立

2 章では、マイクロアレイを用いて多様な条件下でのシロイヌナズナの複数ホルモンへの応答状態を同一試料から一斉に解析する簡易な手法を構築した。シロイヌナズナのホルモン応答性遺伝子群の発現プロファイル(ホルモン応答性プロファイル)を各ホルモンについて定義し、これらと解析対象とするマイクロアレイデータとの間の発現変動の相関を求めることにより、高い精度でホルモン応答の一斉解析が可能になった。本手法の特徴は、応答性遺伝子群の発現変動パターンを解析することによって、組織や生育ステージによる、個々のマーカー遺伝子の発現特異性の影響を受けにくく、ホルモン応答の安定した解析を行うことができる点である。マイクロアレイは、微量試料(生重量 50  $\mu\text{g}$  以下)から全遺伝子の発現レベルが定量できるため、内生量の一斉分析が困難とされている微量ホルモンについても含めて、植物のホルモンへの応答の解析が可能になった。

### 公開マイクロアレイデータ統合のためのネットワーク解析法の確立

3 章では、前章の植物ホルモン応答の一斉解析法を発展させ、マイクロアレイ実験から得られた遺伝子発現プロファイル群の間に存在する生物学的なつながりを予測する有方向性ネットワーク解析法を構築した。プロファイルごとに、実験処理に対して発現量に変動する遺伝子群を統計的な閾値で選抜し、これらの遺伝子群のプロファイル(モジュール)を用いた相関解析によってプロファイル間の類似性を予測することで、大規模なプロファイルの生理的なつながりを明らかにすることができた。本手法の特徴は、すべての遺伝子群のプロファイルを比較する従来のクラスタリング法と異なり、モジ

ユールの発現パターンを比較するため、実験環境や組織の違いなどに起因するノイズの影響を受けにくいことである。

この解析を用いて、マイクロアレイ公開データベース上の多数の実験データのネットワーク(リレーションマップ)を構築し、シロイヌナズナのプロファイル間の様々な類似性を明らかにした。リレーションマップの閲覧と、同解析方法を研究者に提供するツール AtCAST の開発、公開を行った。

### 植物生長調節物質の新規機能の解析

2 章、3 章で構築した解析系を適用して、サイトカイニンの応答を低下させる化合物としてウニコナゾール-P を特定し、この既知の化合物がサイトカイニンの内生量を減少させる機能を有することを一連の実験で示した。ウニコナゾール-P は、活性型サイトカイニンである *tZ* の生合成経路に含まれる P450 酵素 CYP735A1、CYP735A2 の阻害活性を有しており、*tZ* の内生量を減少させた。サイトカイニンは生合成阻害剤や通常の生育条件下で内生量が減少する変異体が見つかっていないため、効果的に活性型サイトカイニンの内生量を減少させるリード化合物と、その標的が示されたことは新規性が高い。また、以上の結果は、ホルモン応答の簡易一斉検出法やリレーションマップの解析結果が、植物体内の応答の変化と一致しており、化合物の機能予測に利用可能なことを一例として示した。

### オミクス解析による植物ホルモン関連変異体のプロファイリング

理研メタボローム基盤研究グループとの共同研究により、ホルモンの生合成やシグナル伝達の異常が報告されているシロイヌナズナの 28 変異体のトランスクリプトームおよびメタボローム解析を行い、各変異体で発現量や蓄積量が変動している遺伝子および化合物を特定した。ジベレリンに着目して遺伝子と化合物の変動傾向を調べた結果、ジベレリン欠損や信号伝達変異体では、糖合成、二次代謝、細胞壁の伸展機能などに変化が生ずることが明らかになった。また、本研究で取得した大規模なオミクスデータを用いて遺伝子と代謝物の共発現解析を行った結果、植物ホルモン生合成遺伝子、応答性遺伝子は、有機酸や糖などの一次代謝産物の蓄積と関連のある発現パターンを示すものが多いことが示唆された。

## 今後の展望と課題

これまでの植物ホルモン研究の主流は、定量分析や、分子生物学的な手法を用いて、個々の植物ホルモンや遺伝子の機能を明らかにし、つなぎ合わせていくことによって、生体内で生じている複雑な制御ネットワークを予測することだった。しかしながら、重要な発見が相次ぐ中で、未だ、オーキシンやサイトカイニンの生合成経路の全貌も解明されていないなど、数多くの謎が残されている。今後の植物ホルモン研究においては、知識を再構築し、実験手法による生理機構の解明を加速させていくための俯瞰的なアプローチの重要性が増していくと考えられる。そして、近年の技術革新により急速に生み出されているオミクスデータの活用は、包括的に生体内で生じている遺伝子や化合物の変動を明らかにし、その変化を予測する用途に適しているといえる。

本研究では、オミクスデータの解析を通じて、植物ホルモンが介する植物の生長や代謝調節機構について、幅広い知見を得た。シロイヌナズナではストレス応答、ホルモン応答、組織・生育ステージ別などの遺伝子発現プロファイルが既に幅広く集められているため、本研究で述べたホルモン応答の一斉解析方法の適用により、さまざまな局面におけるホルモンの変動パターンについての知見を集めることができる。一方で、新たに解析対象とする変異体や化合物については、リレーションマップを使った機能推定をすることができるだろう。ここで述べたような網羅的データから得られる知見は、既存の知識に依らないために、これまでの研究では予想されなかったような、新たな発見を含んでいる可能性がある。これらの発見に基づいて詳細な実験を行い、分子レベルで現象を解き明かしていくことで、今後、植物の制御メカニズムの解明を加速させていくことができると期待できる。

しかし一方で、網羅的なデータ解析には、まだ多くの技術的な課題が残されている。例えば、メタボロミクスデータでは、十分な分析精度が得られないデータも多く、莫大な化合物が一度の解析で測定されても、実際に同定される化合物はわずかである。このため本研究においても、処理によって変動する化合物を測定しても、得られる情報が断片的で、制御を受けている代謝経路の同定に至らないケースもあった。また、実験セットごとに検出される化合物リストが異なるため、異なる実験セット間でデータを統合することが難しく、複数の実験セット間のデータの比較が困難である。今後、これらの課題を解決し、さらにこれまでの研究成果と結びつけていくことによって、植物ホルモンや遺伝子の機能の解明を大きく前進させられると考えられる。

本論文に関する原著論文

## 2 章

†Goda H., †Sasaki E., Akiyama K., Maruyama-Nakashita A., Nakabayashi K., Li W., *et al.*, The AtGenExpress hormone and chemical treatment dataset: experimental design, data evaluation, model data analysis and data access, *Plant J* **55**: 526-542 (2008)

† These authors contributed equally to this work.

## 3 章

Sasaki E., Takahashi C., Asami T., Shimada Y., The relation map, which enables the visualization of relationships among large-scale Arabidopsis DNA microarray experiments in a sample-wise network (2010) *submitted*

## 引用文献

- [1] A. Sasaki, M. Ashikari, M. Ueguchi-Tanaka, H. Itoh, A. Nishimura, D. Swapan, K. Ishiyama, T. Saito, M. Kobayashi, G.S. Khush, H. Kitano, M. Matsuoka, Green revolution: A mutant gibberellin-synthesis gene in rice - New insight into the rice variant that helped to avert famine over thirty years ago. *Nature* 416 (2002) 701-702.
- [2] J.J. Ross, D.P. O'Neill, D.A. Rathbone, Auxin-gibberellin interactions in pea: Integrating the old with the new. *J Plant Growth Regul* 22 (2003) 99-108.
- [3] H. Goda, S. Sawa, T. Asami, S. Fujioka, Y. Shimada, S. Yoshida, Comprehensive comparison brassinosteroid-regulated of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in *arabidopsis*. *Plant Physiol* 134 (2004) 1555-1573.
- [4] S. Abel, M.D. Nguyen, W. Chow, A. Theologis, ASC4, A PRIMARY INDOLEACETIC ACID-RESPONSIVE GENE ENCODING 1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE IN *ARABIDOPSIS-THALIANA* - STRUCTURAL CHARACTERIZATION, EXPRESSION IN *ESCHERICHIA-COLI*, AND EXPRESSION CHARACTERISTICS IN RESPONSE TO AUXIN. *J Biol Chem* 270 (1995) 19093-19099.
- [5] J.C. Rogers, S.W. Rogers, DEFINITION AND FUNCTIONAL IMPLICATIONS OF GIBBERELLIN AND ABSCISIC-ACID CIS-ACTING HORMONE RESPONSE COMPLEXES. *Plant Cell* 4 (1992) 1443-1451.
- [6] A. Nordstrom, P. Tarkowski, D. Tarkowska, R. Norbaek, C. Astot, K. Dolezal, G. Sandberg, Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: A factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 8039-8044.
- [7] M. Kojima, T. Kamada-Nobusada, H. Komatsu, K. Takei, T. Kuroha, M. Mizutani, M. Ashikari, M. Ueguchi-Tanaka, M. Matsuoka, K. Suzuki, H. Sakakibara, Highly Sensitive and High-Throughput Analysis of Plant Hormones Using MS-Probe Modification and Liquid ChromatographyTandem Mass Spectrometry: An Application for Hormone Profiling in *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol* 50 (2009) 1201-1214.
- [8] B. Muller, J. Sheen, Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature* 453 (2008) 1094-U1097.
- [9] T. Kondo, S. Sawa, A. Kinoshita, S. Mizuno, T. Kakimoto, H. Fukuda, Y. Sakagami, A plant peptide encoded by CLV3 identified by in situ MALDI-TOF MS analysis. *Science* 313 (2006) 845-848.
- [10] Y. Ito, I. Nakanomyo, H. Motose, K. Iwamoto, S. Sawa, N. Dohmae, H. Fukuda, Dodeca-CLE peptides as suppressors of plant stem cell differentiation. *Science* 313 (2006) 842-845.
- [11] S. Okuda, H. Tsutsui, K. Shiina, S. Sprunck, H. Takeuchi, R. Yui, R.D. Kasahara, Y. Hamamura, A. Mizukami, D. Susaki, N. Kawano, T. Sakakibara, S. Namiki, K. Itoh, K. Otsuka, M. Matsuzaki, H. Nozaki, T. Kuroiwa, A. Nakano, M.M. Kanaoka, T. Dresselhaus, N. Sasaki, T. Higashiyama, Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells. *Nature* 458 (2009) 357-U122.
- [12] V. Gomez-Roldan, S. Fermas, P.B. Brewer, V. Puech-Pages, E.A. Dun, J.P. Pillot, F. Letisse, R. Matusova, S. Danoun, J.C. Portais, H. Bouwmeester, G. Becard, C.A. Beveridge, C. Rameau, S.F. Rochange, Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455 (2008) 189-U122.

- [13] M. Umehara, A. Hanada, S. Yoshida, K. Akiyama, T. Arite, N. Takeda-Kamiya, H. Magome, Y. Kamiya, K. Shirasu, K. Yoneyama, J. Kyoizuka, S. Yamaguchi, Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* 455 (2008) 195-200.
- [14] A. Hayward, P. Stirnberg, C. Beveridge, O. Leyser, Interactions between Auxin and Strigolactone in Shoot Branching Control. *Plant Physiol* 151 (2009) 400-412.
- [15] S. Kaul, H.L. Koo, J. Jenkins, M. Rizzo, T. Rooney, L.J. Tallon, T. Feldblyum, W. Nierman, M.I. Benito, X.Y. Lin, C.D. Town, J.C. Venter, C.M. Fraser, S. Tabata, Y. Nakamura, T. Kaneko, S. Sato, E. Asamizu, T. Kato, H. Kotani, S. Sasamoto, J.R. Ecker, A. Theologis, N.A. Federspiel, C.J. Palm, B.I. Osborne, P. Shinn, A.B. Conway, V.S. Vysotskaia, K. Dewar, L. Conn, C.A. Lenz, C.J. Kim, N.F. Hansen, S.X. Liu, E. Buehler, H. Altafi, H. Sakano, P. Dunn, B. Lam, P.K. Pham, Q. Chao, M. Nguyen, G.X. Yu, H.M. Chen, A. Southwick, J.M. Lee, M. Miranda, M.J. Toriumi, R.W. Davis, R. Wambutt, G. Murphy, A. Dusterhoft, W. Stiekema, T. Pohl, K.D. Entian, N. Terry, G. Volckaert, M. Salanoubat, N. Choise, M. Rieger, W. Ansorge, M. Unseld, B. Fartmann, G. Valle, F. Artiguenave, J. Weissenbach, F. Quetier, R.K. Wilson, M. de la Bastide, M. Sekhon, E. Huang, L. Spiegel, L. Gnoj, K. Pepin, J. Murray, D. Johnson, K. Habermann, N. Dedhia, L. Parnell, R. Preston, L. Hillier, E. Chen, M. Marra, R. Martienssen, W.R. McCombie, K. Mayer, O. White, M. Bevan, K. Lemcke, T.H. Creasy, C. Bielke, B. Haas, D. Haase, R. Maiti, S. Rudd, J. Peterson, H. Schoof, D. Frishman, B. Morgenstern, et al., Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408 (2000) 796-815.
- [16] M. Schena, D. Shalon, R.W. Davis, P.O. Brown, QUANTITATIVE MONITORING OF GENE-EXPRESSION PATTERNS WITH A COMPLEMENTARY-DNA MICROARRAY. *Science* 270 (1995) 467-470.
- [17] M. Schmid, A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet* 37 (2005) 501-506.
- [18] J. Kilian, D. Whitehead, J. Horak, D. Wanke, S. Weinl, O. Batistic, C. D'Angelo, E. Bornberg-Bauer, J. Kudla, K. Harter, The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J* 50 (2007) 347-363.
- [19] H. Goda, E. Sasaki, K. Akiyama, A. Maruyama-Nakashita, K. Nakabayashi, W.Q. Li, M. Ogawa, Y. Yamauchi, J. Preston, K. Aoki, T. Kiba, S. Takatsuto, S. Fujioka, T. Asami, T. Nakano, H. Kato, T. Mizuno, H. Sakakibara, S. Yamaguchi, E. Nambara, Y. Kamiya, H. Takahashi, M.Y. Hirai, T. Sakurai, K. Shinozaki, K. Saito, S. Yoshida, Y. Shimada, The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design, data evaluation, model data analysis and data access. *Plant J* 55 (2008) 526-542.
- [20] R. Edgar, M. Domrachev, A.E. Lash, Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 30 (2002) 207-210.
- [21] T. Barrett, D.B. Troup, S.E. Wilhite, P. Ledoux, D. Rudnev, C. Evangelista, I.F. Kim, A. Soboleva, M. Tomashevsky, R. Edgar, NCBI GEO: mining tens of millions of expression profiles - database and tools update. *Nucleic Acids Res* 35 (2007) D760-D765.
- [22] D.J. Craigon, N. James, J. Okyere, J. Higgins, J. Jotham, S. May, NASCArrays: a repository for microarray data generated by NASC's transcriptomics service. *Nucleic Acids Res* 32 (2004) D575-D577.
- [23] F. Matsuda, K. Yonekura-Sakakibara, R. Niida, T. Kuromori, K. Shinozaki, K. Saito, MS/MS spectral tag-based annotation of non-targeted profile of plant secondary metabolites. *Plant J* 57 (2009) 555-577.
- [24] M. Kusano, A. Fukushima, M. Arita, P. Jonsson, T. Moritz, M. Kobayashi, N. Hayashi, T. Tohge, K. Saito, Unbiased characterization of genotype-dependent metabolic regulations by

- metabolomic approach in *Arabidopsis thaliana*. BMC Syst Biol 1 (2007).
- [25] F. Matsuda, M. Yokota- Hirai, E. Sasaki, K. Akiyama, K. Yonekura-Sakakibara, N.J. Provart, T. Sakurai, Y. Shimada, K. Saito, AtMetExpress development: A phytochemical atlas of *Arabidopsis thaliana* development. Plant Physiol (2010).
- [26] A.R. Joyce, B.O. Palsson, The model organism as a system: integrating 'omics' data sets. Nat Rev Mol Cell Biol 7 (2006) 198-210.
- [27] M.Y. Hirai, K. Sugiyama, Y. Sawada, T. Tohge, T. Obayashi, A. Suzuki, R. Araki, N. Sakurai, H. Suzuki, K. Aoki, H. Goda, O.I. Nishizawa, D. Shibata, K. Saito, Omics-based identification of *Arabidopsis* Myb transcription factors regulating aliphatic glucosinolate biosynthesis. Proc Natl Acad Sci U S A 104 (2007) 6478-6483.
- [28] K. Yonekura-Sakakibara, Identification of a flavonol 7-O-rhamnosyltransferase gene determining flavonoid pattern in *Arabidopsis* by transcriptome coexpression analysis and reverse genetics. J Biol Chem 282 (2007) 14932-14941.
- [29] T. Bammmler, R.P. Beyer, S. Bhattacharya, G.A. Boorman, A. Boyles, B.U. Bradford, R.E. Bumgarner, P.R. Bushel, K. Chaturvedi, D. Choi, M.L. Cunningham, S. Dengs, H.K. Dressman, R.D. Fannin, F.M. Farun, J.H. Freedman, R.C. Fry, A. Harper, M.C. Humble, P. Hurban, T.J. Kavanagh, W.K. Kaufmann, K.F. Kerr, L. Jing, J.A. Lapidus, M.R. Lasarev, J. Li, Y.J. Li, E.K. Lobenhofer, X. Lu, R.L. Malek, S. Milton, S.R. Nagalla, J.P. O'Malley, V.S. Palmer, P. Pattee, R.S. Paules, C.M. Perou, K. Phillips, L.X. Qin, Y. Qiu, S.D. Quigley, M. Rodland, I. Rusyn, L.D. Samson, D.A. Schwartz, Y. Shi, J.L. Shin, S.O. Sieber, S. Slifer, M.C. Speer, P.S. Spencer, D.I. Sproles, J.A. Swenberg, W.A. Suk, R.C. Sullivan, R. Tian, R.W. Tennant, S.A. Todd, C.J. Tucker, B. Van Houten, B.K. Weis, S. Xuan, H. Zarbl, C. Toxicogenomics Res, Standardizing global gene expression analysis between laboratories and across platforms. Nat Methods 2 (2005) 351-356.
- [30] R.A. Irizarry, D. Warren, F. Spencer, I.F. Kim, S. Biswal, B.C. Frank, E. Gabrielson, J.G.N. Garcia, J. Geoghegan, G. Germino, C. Griffin, S.C. Hilmer, E. Hoffman, A.E. Jedlicka, E. Kawasaki, F. Martinez-Murillo, L. Morsberger, H. Lee, D. Petersen, J. Quackenbush, A. Scott, M. Wilson, Y.Q. Yang, S.Q. Ye, W. Yu, Multiple-laboratory comparison of microarray platforms. Nat Methods 2 (2005) 345-349.
- [31] L.M. Shi, L.H. Reid, W.D. Jones, R. Shippy, J.A. Warrington, S.C. Baker, P.J. Collins, F. de Longueville, E.S. Kawasaki, K.Y. Lee, Y.L. Luo, Y.M.A. Sun, J.C. Willey, R.A. Setterquist, G.M. Fischer, W.D. Tong, Y.P. Dragan, D.J. Dix, F.W. Frueh, F.M. Goodsaid, D. Herman, R.V. Jensen, C.D. Johnson, E.K. Lobenhofer, R.K. Puri, U. Scherf, J. Thierry-Mieg, C. Wang, M. Wilson, P.K. Wolber, L. Zhang, S. Amur, W.J. Bao, C.C. Barbacioru, A.B. Lucas, V. Bertholet, C. Boysen, B. Bromley, D. Brown, A. Brunner, R. Canales, X.X.M. Cao, T.A. Cebula, J.J. Chen, J. Cheng, T.M. Chu, E. Chudin, J. Corson, J.C. Corton, L.J. Croner, C. Davies, T.S. Davison, G. Delenstarr, X.T. Deng, D. Dorris, A.C. Eklund, X.H. Fan, H. Fang, S. Fulmer-Smentek, J.C. Fuscoe, K. Gallagher, W.G. Ge, L. Guo, X. Guo, J. Hager, P.K. Haje, J. Han, T. Han, H.C. Harbottle, S.C. Harris, E. Hatchwell, C.A. Hauser, S. Hester, H.X. Hong, P. Hurban, S.A. Jackson, H.L. Ji, C.R. Knight, W.P. Kuo, J.E. LeClerc, S. Levy, Q.Z. Li, C.M. Liu, Y. Liu, M.J. Lombardi, Y.Q. Ma, S.R. Magnuson, B. Maqsodi, T. McDaniel, N. Mei, O. Myklebost, B.T. Ning, N. Novoradovskaya, M.S. Orr, T.W. Osborn, A. Papallo, T.A. Patterson, R.G. Perkins, E.H. Peters, R. Peterson, et al., The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. Nat Biotechnol 24 (2006) 1151-1161.
- [32] Y. Tao, J.L. Ferrer, K. Ljung, F. Pojer, F.X. Hong, J.A. Long, L. Li, J.E. Moreno, M.E. Bowman, L.J. Ivans, Y.F. Cheng, J. Lim, Y.D. Zhao, C.L. Ballare, G. Sandberg, J.P. Noel, J. Chory, Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. Cell 133 (2008) 164-176.

- [33] J.D. Storey, R. Tibshirani, Statistical significance for genomewide studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 9440-9445.
- [34] S. Sawa, M. Ohgishi, H. Goda, K. Higuchi, Y. Shimada, S. Yoshida, T. Koshiba, The HAT2 gene, a member of the HD-Zip gene family, isolated as an auxin inducible gene by DNA microarray screening, affects auxin response in *Arabidopsis*. *Plant J* 32 (2002) 1011-1022.
- [35] T. Kiba, K. Aoki, H. Sakakibara, T. Mizuno, *Arabidopsis* response regulator, ARR22, ectopic expression of which results in phenotypes similar to the wol cytokinin-receptor mutant. *Plant Cell Physiol* 45 (2004) 1063-1077.
- [36] K. Shinozaki, K. Yamaguchi, K. Shinozaki, Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol* 115 (1997) 327-334.
- [37] P.J. Odonnell, C. Calvert, R. Atzorn, C. Wasternack, H.M.O. Leyser, D.J. Bowles, Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* 274 (1996) 1914-1917.
- [38] R. Pierik, R. Sasidharan, L. Voesenek, Growth control by ethylene: Adjusting phenotypes to the environment. *J Plant Growth Regul* 26 (2007) 188-200.
- [39] S.A.H. Mackerness, S.L. Surplus, P. Blake, C.F. John, V. Buchanan-Wollaston, B.R. Jordan, B. Thomas, Ultraviolet-B-induced stress and changes in gene expression in *Arabidopsis thaliana*: role of signalling pathways controlled by jasmonic acid, ethylene and reactive oxygen species. *Plant Cell Environ* 22 (1999) 1413-1423.
- [40] H. Magome, S. Yamaguchi, A. Hanada, Y. Kamiya, K. Oda, The DDF1 transcriptional activator upregulates expression of a gibberellin-deactivating gene, GA2ox7, under high-salinity stress in *Arabidopsis*. *Plant J* 56 (2008) 613-626.
- [41] P. Achard, F. Gong, S. Cheminant, M. Alioua, P. Hedden, P. Genschik, The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. *Plant Cell* 20 (2008) 2117-2129.
- [42] J.C. Xia, H. Zhao, W.Z. Liu, L.G. Li, Y.K. He, Role of cytokinin and salicylic acid in plant growth at low temperatures. *Plant Growth Regul* 57 (2009) 211-221.
- [43] M.B. Eisen, P.T. Spellman, P.O. Brown, D. Botstein, Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 14863-14868.
- [44] D.V. Nguyen, D.M. Rocke, Tumor classification by partial least squares using microarray gene expression data. *Bioinformatics* 18 (2002) 39-50.
- [45] J. Lamb, E.D. Crawford, D. Peck, J.W. Modell, I.C. Blat, M.J. Wrobel, J. Lerner, J.P. Brunet, A. Subramanian, K.N. Ross, M. Reich, H. Hieronymus, G. Wei, S.A. Armstrong, S.J. Haggarty, P.A. Clemons, R. Wei, S.A. Carr, E.S. Lander, T.R. Golub, The connectivity map: Using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science* 313 (2006) 1929-1935.
- [46] H.K. Lee, A.K. Hsu, J. Sajdak, J. Qin, P. Pavlidis, Coexpression analysis of human genes across many microarray data sets. *Genome Res* 14 (2004) 1085-1094.
- [47] J.J. Chen, S.J. Wang, C.A. Tsai, C.J. Lin, Selection of differentially expressed genes in microarray data analysis. *Pharmacogenomics J* 7 (2007) 212-220.
- [48] V. Buchanan-Wollaston, T. Page, E. Harrison, E. Breeze, P.O. Lim, H.G. Nam, J.F. Lin, S.H. Wu, J. Swidzinski, K. Ishizaki, C.J. Leaver, Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J* 42 (2005) 567-585.
- [49] A. Chini, S. Fonseca, G. Fernandez, B. Adie, J.M. Chico, O. Lorenzo, G. Garcia-Casado, I. Lopez-Vidriero, F.M. Lozano, M.R. Ponce, J.L. Micol, R. Solano, The JAZ family of



- repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448 (2007) 666-U664.
- [50] H.K. Kleudgen, CHANGES IN COMPOSITION OF CHLOROPHYLLS, CAROTENOIDS, AND PRENYLQUINONES IN GREEN SEEDLINGS OF HORDEUM AND RAPHANUS INDUCED BY THE HERBICIDE SAN 6706 - EFFECT POSSIBLY ANTAGONISTIC TO PHYTOCHROME ACTION. *Pestic Biochem Physiol* 12 (1979) 231-238.
- [51] D. Chamovitz, I. Pecker, J. Hirschberg, THE MOLECULAR-BASIS OF RESISTANCE TO THE HERBICIDE NORFLURAZON. *Plant Mol Biol* 16 (1991) 967-974.
- [52] P. Shannon, A. Markiel, O. Ozier, N.S. Baliga, J.T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski, T. Ideker, Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 13 (2003) 2498-2504.
- [53] S.C.M. van Wees, J. Glazebrook, Loss of non-host resistance of *Arabidopsis* NahG to *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola is due to degradation products of salicylic acid. *Plant J* 33 (2003) 733-742.
- [54] B. Ulker, M.S. Mukhtar, I.E. Somssich, The WRKY70 transcription factor of *Arabidopsis* influences both the plant senescence and defense signaling pathways. *Planta* 226 (2007) 125-137.
- [55] D.N. Rate, J.V. Cuenca, G.R. Bowman, D.S. Guttman, J.T. Greenberg, The gain-of-function *Arabidopsis* acd6 mutant reveals novel regulation and function of the salicylic acid signaling pathway in controlling cell death, defenses, and cell growth. *Plant Cell* 11 (1999) 1695-1708.
- [56] N. Sauerbrunn, N.L. Schlaich, PCC1: a merging point for pathogen defence and circadian signalling in *Arabidopsis*. *Planta* 218 (2004) 552-561.
- [57] Z.Q. Zhang, Q. Li, Z.M. Li, P.E. Staswick, M.Y. Wang, Y. Zhu, Z.H. He, Dual regulation role of GH3.5 in salicylic acid and auxin signaling during *Arabidopsis-Pseudomonas syringae* interaction. *Plant Physiol* 145 (2007) 450-464.
- [58] S.L. Schreiber, Chemical genetics resulting from a passion for synthetic organic chemistry. *Bioorg Med Chem* 6 (1998) 1127-1152.
- [59] T. Asami, Y.K. Min, N. Nagata, K. Yamagishi, S. Takatsuto, S. Fujioka, N. Murofushi, I. Yamaguchi, S. Yoshida, Characterization of brassinazole, a triazole-type brassinosteroid biosynthesis inhibitor. *Plant Physiol* 123 (2000) 93-99.
- [60] Y.D. Zhao, X.H. Dai, H.E. Blackwell, S.L. Schreiber, J. Chory, SIR1, an upstream component in auxin signaling identified by chemical genetics. *Science* 301 (2003) 1107-1110.
- [61] D. Wang, N. Amornsiripanitch, X.N. Dong, A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathog* 2 (2006) 1042-1050.
- [62] S.Y. Park, P. Fung, N. Nishimura, D.R. Jensen, H. Fujii, Y. Zhao, S. Lumba, J. Santiago, A. Rodrigues, T.F.F. Chow, S.E. Alfred, D. Bonetta, R. Finkelstein, N.J. Provart, D. Desveaux, P.L. Rodriguez, P. McCourt, J.K. Zhu, J.I. Schroeder, B.F. Volkman, S.R. Cutler, Absciscic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins. *Science* 324 (2009) 1068-1071.
- [63] C.O. Miller, F. Skoog, F.S. Okumura, M.H. Vonsaltza, F.M. Strong, ISOLATION, STRUCTURE AND SYNTHESIS OF KINETIN, A SUBSTANCE PROMOTING CELL DIVISION. *J Am Chem Soc* 78 (1956) 1375-1380.
- [64] M. Riefler, O. Novak, M. Strnad, T. Schmulling, *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants

- reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell* 18 (2006) 40-54.
- [65] T. Kamada-Nobusada, H. Sakakibara, Molecular basis for cytokinin biosynthesis. *Phytochemistry* 70 (2009) 444-449.
- [66] H. Sakakibara, Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annu Rev Plant Biol* 57 (2006) 431-449.
- [67] K. Takei, T. Yamaya, H. Sakakibara, *Arabidopsis CYP735A1* and *CYP735A2* encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-Zeatin. *J Biol Chem* 279 (2004) 41866-41872.
- [68] K. Venkateswarlu, D.C. Lamb, D.E. Kelly, N.J. Manning, S.L. Kelly, The N-terminal membrane domain of yeast NADPH-cytochrome P450 (CYP) oxidoreductase is not required for catalytic activity in sterol biosynthesis or in reconstitution of CYP activity. *J Biol Chem* 273 (1998) 4492-4496.
- [69] R. Yamamoto, T. Demura, H. Fukuda, Brassinosteroids induce entry into the final stage of tracheary element differentiation in cultured *Zinnia* cells. *Plant Cell Physiol* 38 (1997) 980-983.
- [70] T. Iwasaki, H. Shibaoka, BRASSINOSTEROIDS ACT AS REGULATORS OF TRACHEARY-ELEMENT DIFFERENTIATION IN ISOLATED ZINNIA MESOPHYLL-CELLS. *Plant Cell Physiol* 32 (1991) 1007-1014.
- [71] K. Izumi, Y. Kamiya, A. Sakurai, H. Oshio, N. Takahashi, STUDIES OF SITES OF ACTION OF A NEW PLANT-GROWTH RETARDANT (E)-1-(4-CHLOROPHENYL)-4,4-DIMETHYL-2-(1,2,4-TRIAZOL-1-YL)-1-PENTEN-3-OL (S-3307) AND COMPARATIVE EFFECTS OF ITS STEREOISOMERS IN A CELL-FREE SYSTEM FROM CUCURBITA-MAXIMA. *Plant Cell Physiol* 26 (1985) 821-827.
- [72] N. Kitahata, S. Saito, Y. Miyazawa, T. Umezawa, Y. Shimada, Y.K. Min, M. Mizutani, N. Hirai, K. Shinozaki, S. Yoshida, T. Asami, Chemical regulation of abscisic acid catabolism in plants by cytochrome P450 inhibitors. *Bioorg Med Chem* 13 (2005) 4491-4498.
- [73] S. Saito, M. Okamoto, T. Kushiro, T. Koshiba, Y. Kamiya, N. Hirai, Y. Todoroki, K. Sakata, E. Nambara, M. Mizutani, A plant growth retardant, uniconazole, is a potent inhibitor of ABA catabolism in *Arabidopsis*. *Biosci Biotechnol Biochem* 70 (2006) 1731-1739.
- [74] T. Noguchi, S. Fujioka, S. Choe, S. Takatsuto, S. Yoshida, H. Yuan, K.A. Feldmann, F.E. Tax, Brassinosteroid-insensitive dwarf mutants of *Arabidopsis* accumulate brassinosteroids. *Plant Physiol* 121 (1999) 743-752.
- [75] J.R. Peng, P. Carol, D.E. Richards, K.E. King, R.J. Cowling, G.P. Murphy, N.P. Harberd, The *Arabidopsis GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* 11 (1997) 3194-3205.
- [76] M. Koornneef, G. Reuling, C.M. Karssen, THE ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ABSCISIC-ACID INSENSITIVE MUTANTS OF *ARABIDOPSIS-THALIANA*. *Physiol Plant* 61 (1984) 377-383.
- [77] M. Higuchi, M.S. Pischke, A.P. Mahonen, K. Miyawaki, Y. Hashimoto, M. Seki, M. Kobayashi, K. Shinozaki, T. Kato, S. Tabata, Y. Helariutta, M.R. Sussman, T. Kakimoto, In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 8821-8826.
- [78] A.M. Rashotte, S.D.B. Carson, J.P.C. To, J.J. Kieber, Expression profiling of cytokinin action in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 132 (2003) 1998-2011.

- [79] T. Schmulling, T. Werner, M. Riefler, E. Krupkova, I.B.Y. Manns, Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *J Plant Res* 116 (2003) 241-252.
- [80] H. Kasahara, K. Takei, N. Ueda, S. Hishiyama, T. Yamaya, Y. Kamiya, S. Yamaguchi, H. Sakakibara, Distinct isoprenoid origins of cis- and trans-zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 279 (2004) 14049-14054.
- [81] N.V. Bassil, D.W.S. Mok, M.C. Mok, PARTIAL-PURIFICATION OF A CIS-TRANS-ISOMERASE OF ZEATIN FROM IMMATURE SEED OF PHASEOLUS-VULGARIS L. *Plant Physiol* 102 (1993) 867-872.
- [82] L. Spichal, N.Y. Rakova, M. Riefler, T. Mizuno, G.A. Romanov, M. Strnad, T. Schmulling, Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant Cell Physiol* 45 (2004) 1299-1305.
- [83] K. Yonekura-Sakakibara, M. Kojima, T. Yamaya, H. Sakakibara, Molecular characterization of cytokinin-responsive histidine kinases in maize. Differential ligand preferences and response to cis-zeatin. *Plant Physiol* 134 (2004) 1654-1661.
- [84] E.S. Ober, R.E. Sharp, PROLINE ACCUMULATION IN MAIZE (ZEA-MAYS L) PRIMARY ROOTS AT LOW WATER POTENTIALS .1. REQUIREMENT FOR INCREASED LEVELS OF ABSCISIC-ACID. *Plant Physiol* 105 (1994) 981-987.
- [85] J. Su, R. Hirji, L. Zhang, C.K. He, G. Selvaraj, R. Wu, Evaluation of the stress-inducible production of choline oxidase in transgenic rice as a strategy for producing the stress-protectant glycine betaine. *J Exp Bot* 57 (2006) 1129-1135.
- [86] A. Maruyama-Nakashita, Y. Nakamura, T. Yamaya, H. Takahashi, A novel regulatory pathway of sulfate uptake in *Arabidopsis* roots: implication of CRE1/WOL/AHK4-mediated cytokinin-dependent regulation. *Plant J* 38 (2004) 779-789.
- [87] A. Maruyama-Nakashita, Y. Nakamura, A. Watanabe-Takahashi, E. Inoue, T. Yamaya, H. Takahashi, Identification of a novel cis-acting element conferring sulfur deficiency response in *Arabidopsis* roots. *Plant J* 42 (2005) 305-314.
- [88] B.A. Halkier, J. Gershenzon, Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu Rev Plant Biol* 57 (2006) 303-333.
- [89] A.K. Wilson, F.B. Pickett, J.C. Turner, M. Estelle, A DOMINANT MUTATION IN *ARABIDOPSIS* CONFERS RESISTANCE TO AUXIN, ETHYLENE AND ABSCISIC-ACID. *Mol Gen Genet* 222 (1990) 377-383.
- [90] M. Ruegger, E. Dewey, W.M. Gray, L. Hobbie, J. Turner, M. Estelle, The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes Dev* 12 (1998) 198-207.
- [91] W. Boerjan, M.T. Cervera, M. Delarue, T. Beeckman, W. Dewitte, C. Bellini, M. Caboche, H. Vanonckelen, M. Vanmontagu, D. Inze, SUPERROOT, A RECESSIVE MUTATION IN *ARABIDOPSIS*, CONFERS AUXIN OVERPRODUCTION. *Plant Cell* 7 (1995) 1405-1419.
- [92] H.M.O. Leyser, F.B. Pickett, S. Dharmasiri, M. Estelle, Mutations in the *AXR3* gene of *Arabidopsis* result in altered auxin response including ectopic expression from the SAUR-AC1 promoter. *Plant J* 10 (1996) 403-413.
- [93] K. Tatematsu, S. Kumagai, H. Muto, A. Sato, M.K. Watahiki, R.M. Harper, E. Liscum, K.T. Yamamoto, 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* 16 (2004) 379-393.

- [94] R.M. Harper, E.L. Stowe-Evans, D.R. Luesse, H. Muto, K. Tatematsu, M.K. Watahiki, K. Yamamoto, E. Liscum, The NPH4 locus encodes the auxin response factor ARF7, a conditional regulator of differential growth in aerial *Arabidopsis* tissue. *Plant Cell* 12 (2000) 757-770.
- [95] J. Chory, P. Nagpal, C.A. Peto, PHENOTYPIC AND GENETIC-ANALYSIS OF DET2, A NEW MUTANT THAT AFFECTS LIGHT-REGULATED SEEDLING DEVELOPMENT IN *ARABIDOPSIS*. *Plant Cell* 3 (1991) 445-459.
- [96] T. Nomura, T. Kushiro, T. Yokota, Y. Kamiya, G.J. Bishop, S. Yamaguchi, The last reaction producing brassinolide is catalyzed by cytochrome P-450s, CYP85A3 in tomato and CYP85A2 in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 280 (2005) 17873-17879.
- [97] Z.Y. Wang, T. Nakano, J. Gendron, J.X. He, M. Chen, D. Vafeados, Y.L. Yang, S. Fujioka, S. Yoshida, T. Asami, J. Chory, Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev Cell* 2 (2002) 505-513.
- [98] T. Kuroha, C. Ueguchi, H. Sakakibara, S. Satoh, Cytokinin receptors are required for normal development of auxin-transporting vascular tissues in the hypocotyl but not in adventitious roots. *Plant Cell Physiol* 47 (2006) 234-243.
- [99] K. Takei, N. Ueda, K. Aoki, T. Kuromori, T. Hirayama, K. Shinozaki, T. Yamaya, H. Sakakibara, AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 45 (2004) 1053-1062.
- [100] T.P. Sun, Y. Kamiya, THE *ARABIDOPSIS* *GAI* LOCUS ENCODES THE CYCLASE ENT-KAURENE SYNTHETASE-A OF GIBBERELLIN BIOSYNTHESIS. *Plant Cell* 6 (1994) 1509-1518.
- [101] M.G. Mitchum, S. Yamaguchi, A. Hanada, A. Kuwahara, Y. Yoshioka, T. Kato, S. Tabata, Y. Kamiya, T.P. Sun, Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in *Arabidopsis* development. *Plant J* 45 (2006) 804-818.
- [102] J.H. Park, R. Halitschke, H.B. Kim, I.T. Baldwin, K.A. Feldmann, R. Feyereisen, A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *Plant J* 31 (2002) 1-12.
- [103] P.E. Staswick, W.P. Su, S.H. Howell, METHYL JASMONATE INHIBITION OF ROOT-GROWTH AND INDUCTION OF A LEAF PROTEIN ARE DECREASED IN AN *ARABIDOPSIS-THALIANA* MUTANT. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) 6837-6840.
- [104] M. Okamoto, A. Kuwahara, M. Seo, T. Kushiro, T. Asami, N. Hirai, Y. Kamiya, T. Koshiba, E. Nambara, CYP707A1 and CYP707A2, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 141 (2006) 97-107.
- [105] E. Nambara, H. Kawaide, Y. Kamiya, S. Naito, Characterization of an *Arabidopsis thaliana* mutant that has a defect in ABA accumulation: ABA-dependent and ABA-independent accumulation of free amino acids during dehydration. *Plant Cell Physiol* 39 (1998) 853-858.
- [106] J.M. Alonso, T. Hirayama, G. Roman, S. Nourizadeh, J.R. Ecker, EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science* 284 (1999) 2148-2152.
- [107] J.J. Kieber, M. Rothenberg, G. Roman, K.A. Feldmann, J.R. Ecker, CTR1, A NEGATIVE REGULATOR OF THE ETHYLENE RESPONSE PATHWAY IN *ARABIDOPSIS*, ENCODES A MEMBER OF THE RAF FAMILY OF PROTEIN-KINASES. *Cell* 72 (1993) 427-441.

- [108] K.L.C. Wang, H. Yoshida, C. Lurin, J.R. Ecker, Regulation of ethylene gas biosynthesis by the *Arabidopsis* ETO1 protein. *Nature* 428 (2004) 945-950.
- [109] A. Lehman, R. Black, J.R. Ecker, HOOKLESS1, an ethylene response gene, is required for differential cell elongation in the *Arabidopsis* hypocotyl. *Cell* 85 (1996) 183-194.
- [110] S. Maere, K. Heymans, M. Kuiper, BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in Biological Networks. *Bioinformatics* 21 (2005) 3448-3449.
- [111] Y. Okazaki, M. Shimojima, Y. Sawada, K. Toyooka, T. Narisawa, K. Mochida, H. Tanaka, F. Matsuda, A. Hirai, M.Y. Hirai, H. Ohta, K. Saito, A Chloroplastic UDP-Glucose Pyrophosphorylase from *Arabidopsis* Is the Committed Enzyme for the First Step of Sulfolipid Biosynthesis. *Plant Cell* 21 (2009) 892-909.
- [112] M. Watanabe, M. Kusano, A. Oikawa, A. Fukushima, M. Noji, K. Saito, Physiological roles of the beta-substituted alanine synthase gene family in *arabidopsis*. *Plant Physiol* 146 (2008) 310-320.
- [113] W.D. Teale, F.A. Ditengou, A.D. Dovzhenko, X. Li, A.M. Molendijk, B. Ruperti, I. Paponov, K. Palme, Auxin as a model for the integration of hormonal signal processing and transduction. *Mol Plant* 1 (2008) 229-237.
- [114] M.D. Mikkelsen, B.L. Petersen, E. Glawischnig, A.B. Jensen, E. Andreasson, B.A. Halkier, Modulation of CYP79 genes and glucosinolate profiles in *Arabidopsis* by defense signaling pathways. *Plant Physiol* 131 (2003) 298-308.
- [115] J. Curaba, T. Moritz, R. Blervaque, F. Parcy, V. Raz, M. Herzog, G. Vachon, *AtGA3ox2*, a key gene responsible for bioactive gibberellin biosynthesis, is regulated during embryogenesis by LEAFY COTYLEDON2 and FUSCA3 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 136 (2004) 3660-3669.
- [116] J.L. Garcia-Martinez, J. Gil, Light regulation of gibberellin biosynthesis and mode of action. *J. Plant Growth Regul* 20 (2001) 354-368.
- [117] K. Mockaitis, M. Estelle, Auxin Receptors and Plant Development: A New Signaling Paradigm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24 (2008) 55-80.
- [118] S. Yamaguchi, Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol* 59 (2008) 225-251.
- [119] F. Rolland, E. Baena-Gonzalez, J. Sheen, Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 57 (2006) 675-709.
- [120] D.J. Cosgrove, Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (2005) 850-861.
- [121] L. Aleman, J. Kitamura, H. Abdel-Mageed, J. Lee, Y. Sun, M. Nakajima, M. Ueguchi-Tanaka, M. Matsuoka, R.D. Allen, Functional analysis of cotton orthologs of GA signal transduction factors GID1 and SLR1. *Plant Mol Biol* 68 (2008) 1-16.
- [122] C.H. Park, T.-W. Kim, S.-H. Son, J.-Y. Hwang, S.C. Lee, S.C. Chang, S.-H. Kim, S.W. Kim, S.-K. Kim, Brassinosteroids control AtEXPA5 gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 71 (2010) 380-387
- [123] K. Yonekura-Sakakibara, Identification of a flavonol 7-O-rhamnosyltransferase gene determining flavonoid pattern in *Arabidopsis* by transcriptome coexpression analysis and reverse genetics. *J Biol Chem* 282 (2007) 14932-14941.
- [124] C.F. Jiang, X.H. Gao, L. Liao, N.P. Harberd, X.D. Fu, Phosphate starvation root architecture and anthocyanin accumulation responses are modulated by the gibberellin-DELLA signaling pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 145 (2007) 1460-1470.
- [125] K. Yonekura-Sakakibara, T. Tohge, R. Niida, K. Saito, Identification of a flavonol

7-O-rhamnosyltransferase gene determining flavonoid pattern in *Arabidopsis* by transcriptome coexpression analysis and reverse genetics. J Biol Chem 282 (2007) 14932-14941.

[J1] 勝見允行, 植物ホルモンハンドブック[下]. (高橋信孝, 増田芳雄 共編) p241-278, 培風館 (1994)

[J2] 松田史生, 及川彰, 草野都, 菊池淳, 斉藤和季. メタボローム解析技術の現状と展望. 化学と生物 45 (2007) 754-760

[J3] 軸丸祐介, 花田篤志, 佐藤深雪, 笠原博幸, 南原英司, 山口信次郎, 神谷勇治, LC-ESI-MS/MS による植物ホルモンの一斉分析. 植物の生長調節 42 (2007) 167-175

## 謝辞

本研究を行うにあたり、以下の多くの方々に御指導、御助力頂きました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

浅見忠男教授、(独)理化学研究所 嶋田幸久博士、鈴木義人前准教授(現茨城大学教授)、中嶋正敏助教授には、このような素晴らしい研究の場を与えて頂き、ご指導いただきました。深く感謝いたします。

また本研究は、(独)理化学研究所の研修生制度、ジュニアリサーチアソシエイト制度により、ご支援を受けて行いました。この場を借りて、お礼申し上げます。

本研究は、(独)理化学研究所の多くの方々との共同研究により行いました。第3章の「AtCAST」構築は、ゲノム機能統合化研究チーム テクニカルスタッフ 高橋知登世さんにデータベース作成の上でお世話になりました。第4章のウニコナゾール-Pの機能解析では、生産制御研究チーム 榊原均博士、武井兼太郎博士にお世話になりました。プラスミド、サイトカイニン類定量のための内部標準物質をご恵与いただきました。また、ミクロソーム画分の抽出や酵素活性試験についてご指導いただきました。第5章の「オミクス解析を用いた植物ホルモン関連変異体のプロファイリング」は、メタボローム基盤研究グループのプロジェクトの一環として行われたものです。メタボローム分析は、草野都博士(GC-TOF/MS)、松田史生博士(LC-Q-TOF/MS)、及川彰博士(CE-TOF/MS)、岡咲洋三博士(LC-IT-TOF/MS)に行っていただきました。また、メタボロームデータの処理についても、多くの助言をいただきました。マイクロアレイ分析は、形体制御研究チームで行っていただきました。この場を借りて、お礼申し上げます。

生物制御化学研究室の皆様には、大変お世話になりました。研究生活のみならず、さまざまな行事を通じて、楽しい学生生活を送ることができました。また、朴昇玟博士、中村英光博士には研究に対するご指導に加え、研究者の先輩として多くのご助言をいただきました。(独)理化学研究所 ゲノム機能統合化研究チーム、代謝機能チーム

の皆様にも大変お世話になりました。吉田茂男博士には、研究室の先輩として、人生の先輩として、多くのご助言をいただくとともに、常に励ましの言葉をいただきました。この場を借りて、お礼申し上げます。

(独)理化学研究所 小倉岳彦博士、増口潔博士には、本研究を行うにあたり不可欠な実験手法のご指導をいただきました。また、常に丁寧で適切なアドバイスや、叱咤激励をいただき、本研究をまとめることができました。公私に渡り大変お世話になりました。深く感謝しております。

最後に、この学生生活を見守り支えてくれた家族と友人たちに感謝します。

2010 年 3 月