

博士論文

オーキシン機能発現制御剤の  
化学生物学的応用に関する研究

平成23年度進学 安藤卓也

指導教官 浅見忠男



## 目次

### 第1章 序論

- 1-1 植物ホルモンオーキシンの生理作用とその作用機構 (1)
- 1-2 オーキシン研究にオーキシン機能制御活性化化合物を用いる  
事の意義 (7)
- 1-3 オーキシン生合成阻害剤 AOPP の利用 (11)
- 1-4 本研究の目的 (12)

### 第2章 オーキシン生合成阻害剤 AOPP を用いた抵抗性変異体の選抜と機能解析

- 第2章緒言 (14)
- 2-1 *rail* の主根細胞及び根毛の観察 (17)
- 2-2 *rail* の内生 IAA 量及び IAA 応答性遺伝子発現量の測定 (17)
- 2-3 *rail* の成熟形態の観察 (20)
- 2-4 *rail* の原因遺伝子の探索 (24)
- 2-5 *rail* 単変異体の作出と形態解析 (25)
- 2-6 マップベースドクローニング法及び次世代シーケンサーを  
用いた *rail* 原因遺伝子同定の試み (31)
- 第2章考察 (34)
- 第2章実験方法 (35)

### 第3章 FOX ラインを利用した更なる AOPP 抵抗性変異体の探索と機能解析

- 第3章緒言 (43)
- 3-1 FOX ラインを利用した AOPP 抵抗性変異体の選抜 (44)
- 3-2 *rai5-D* の原因遺伝子の同定 (46)
- 3-3 *RAI5-ox* の IAA 応答性遺伝子発現量の測定及び外生 IAA  
応答性の観察 (49)
- 3-4 *RAI5-ox* の成熟形態観察 (49)

3-5	RAI5 の細胞内局在観察	(52)
3-6	RAI5 の発現部位観察	(55)
	第3章考察	(59)
	第3章実験方法	(61)
<u>第4章 新規植物生長制御剤 HJ27 の作用点探索</u>		
	第4章緒言	(66)
4-1	HJ27 の作用点探索-植物ホルモン関連	(70)
4-2	HJ27 の作用点探索-セルロース生合成阻害剤 IXB との比較	(75)
4-3	HJ27 の間接的なセルロース生合成阻害能評価	(77)
4-4	HJ27 処理時の植物細胞壁の観察	(79)
4-5	HJ27 による擬似的な暗所光形態形成	(83)
	第4章考察	(86)
	第4章実験方法	(88)
	参考文献	(90)
	謝辞	

## 図表目次

1-1	シロイヌナズナにおける Trp 依存的 IAA 生合成経路の変遷	(3)
1-2	シロイヌナズナ根端部における PIN の分布とオーキシン輸送による濃度勾配	(5)
1-3	AUX/IAA を介した IAA シグナル伝達経路の模式図	(6)
1-4	AOPP の構造式と作用点	(13)
2-1	AOPP 処理による主根の斜行と IAA 関連化合物による回復	(15)
2-2	抵抗性変異体 <i>rai1</i> の形態及び AOPP 含有培地における <i>rai1</i> の主根長と斜行度	(18)
2-3	<i>rai1</i> の根毛及び主根細胞の観察	(19)
2-4	<i>rai1</i> の IAA 内生量及び IAA 応答性遺伝子発現量	(21)
2-5	<i>rai1</i> の部位別 IAA 応答性遺伝子発現量測定	(22)
2-6	<i>rai1</i> の成熟形態の観察	(23)
2-7	<i>rai1</i> とエチレンシグナル過剰変異体の形態比較	(26)
2-8	<i>ownETO1</i> 挿入による <i>rai1</i> の主根伸長抑制の回復	(27)
2-9	<i>rai1</i> と <i>eto1</i> の AOPP 抵抗性の比較	(29)
2-10	<i>rai1</i> 単変異体の AOPP 抵抗性と根毛観察	(30)
2-11	マップベースドクローニング法による <i>rai1</i> 原因遺伝子の絞り込み	(33)
3-1	FOX ラインからの <i>rai5-D</i> の取得	(45)
3-2	<i>RAI5-ox</i> 形質転換体の AOPP 抵抗性	(47)
3-3	シロイヌナズナにおけるアクアポリンの系統樹	(48)
3-4	<i>RAI5-ox</i> ラインの IAA 応答性遺伝子発現量変動及び IAA 処理による主根伸長量減少の観察	(50)
3-5	<i>RAI5-ox</i> の成熟茎の形態観察	(51)
3-6	<i>RAI5-GFP</i> の共焦点顕微鏡による局在観察	(53)
3-7	根端部に置ける <i>RAI5-GFP</i> の発現と <i>PIN1-GFP</i> 及び <i>PIN2-GFP</i> との比較	(54)
3-8	幼植物体における <i>RAI5-GUS</i> の観察	(56)
3-9	<i>RAI5-GUS</i> と <i>DR5-GUS</i> の比較	(57)
3-10	IAA 処理による <i>RAI5-GUS</i> の発現誘導	(58)
4-1	HJ27 化合物の基本骨格と HJ2 及び HJ27 の構造式	(68)

4-2	HJ27 処理による濃度依存的な主根伸長量の減少	(69)
4-3	HJ27 処理に対する DR5-GUS の応答性	(71)
4-4	HJ27 処理時の D II -VENUS の蛍光観察	(72)
4-5	HJ27 の植物ホルモン関連作用点の探索試験	(74)
4-6	HJ27 及び IXB 処理時の植物形態	(76)
4-7	HJ27 及び IXB 処理時の主根伸長量	(78)
4-8	HJ27 及び IXB に誘引されるリグニン蓄積の観察	(80)
4-9	HJ27 及び IXB 処理時の根細胞壁の観察	(81)
4-1 0	HJ27 及び IXB 処理時のタバコ培養細胞プロトプラストの 細胞壁再形成阻害の観察	(82)
4-1 1	HJ27 及び IXB 処理時の暗所光形態形成	(84)
4-1 2	HJ27 及び IXB 処理による光応答性因子の発現量変動	(85)

## 略語表

AOPP	L-2-aminooxy-3-phenylpropionic acid
BR	brassinosteroid
Col	Columbia
CaMV	Cauliflower mosaic virus
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
dH <sub>2</sub> O	distilled water
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
EMS	ethyl metansulfonate
FOX	full-length cDNA overexpressor gene
g	gram
GWB	gateway vector
Hyg	hygromycin
IAA	indole-3-acetic acid
IAAld	indole-3-acetaldehyde
IAM	indole-3-acetamide
IAN	indole-3-acetonitrile
IAOx	indole-3-acetaldoxime
IBA	indole-3-butylic acid
IPA	indole-3-pyruvic acid
IXB	isoxaben
Km	kanamycin
L	liter
LC/MS/MS	liquid chromatography tandem mass spectrometry
Ler	Landesberg
m	milli
M	molarity
MS	Murashige & Skoog plant salt mixture
μ	micro
n	nano

NPA	1-N-naphthylphthalamic acid
PCR	polymerase chain reaction
PEO-IAA	$\alpha$ -(phenyl ethyl-2-oxo)-IAA
PLP	pyridoxal-5-phosphate
rpm	revolutions per minute
rai	resistant to auxin inhibition
Rif	rifampicillin
RNA	ribonucleic acid
TAM	tryptamine
Trp	L-tryptophan
UBQ	ubiquitin
WT	wild-type plant

## 第1章 序論

### 1-1. 植物ホルモンオーキシンの生理作用とその作用機構

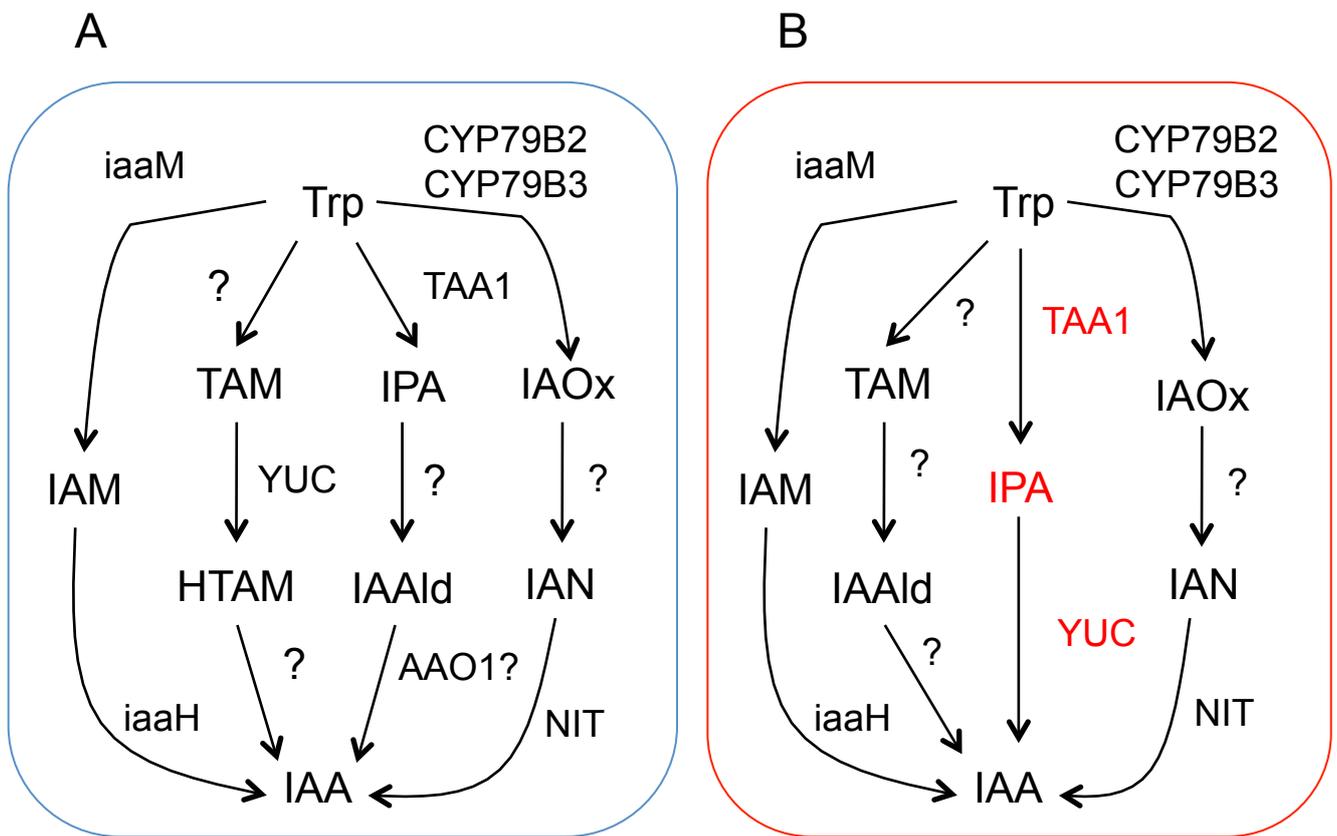
植物は自身の成長段階そして外部環境に応じて最も適した対応をする能力を有している。このような植物の生存戦略上重要な形態形成やストレス抵抗性のシグナルとして植物ホルモンが関与している。植物ホルモンとして定義されている低分子物質には、オーキシン、サイトカイニン、ジベレリン、アブシジン酸、エチレン、ジャスモン酸、ブラシノステロイドの7種に加えて近年ではストリゴラクトンやサリチル酸などが含まれている。そのうちの一つであるオーキシンは *indole-3-acetic acid* (IAA) を主要な天然活性物質とする植物ホルモンであり、その生理作用は細胞伸長、光屈性や重力屈性、花芽形成など植物の生活環のほぼ全てに関わっている。これら植物の形態変化を伴う様々な生理現象に関係する IAA は植物体内で厳密な濃度勾配を形成することが知られている。つまり植物中の IAA 量は生合成及び代謝から輸送を通じて常に細かく制御されている。以上よりオーキシンの生理作用の解明及び自在な調節法の開発は、植物育成を自在にコントロールする新しい農業技術を開発するための重要な基礎研究であると考えている。オーキシンの生理作用の農業利用はすでに広く行われており、オーキシン様活性を示す化合物の開発と利用を代表例としてあげることができる。実際に除草剤として、環境中での安定性が増した合成オーキシンである *2,4-dichlorophenoxyacetic acid* (2,4-D) が用いられている。また、挿し木の際の発根促進剤の原体として *1-naphthalene acetamide* (NAA) や

indole-3-butylic acid (IBA) が用いられているほか、トマトの着果、肥大化促進剤の原体として 4-chlorophenoxy acetic acid (CPA) が用いられている (Ludwid-Muller et al., 2005)。

植物ホルモンは状況に応じて生体内で生産された後、各部位に輸送され、各器官で受容されることによってシグナルを伝達することが明らかになりつつある。特に、オーキシンにおける主要な天然活性物質である IAA の生合成及び代謝による内生量の調節、そして輸送から受容へのメカニズムは近年目覚ましい速度で解明されてきた。

まず生合成であるが、かつてシロイヌナズナにおけるオーキシンの生合成経路は L-tryptophan (Trp) を起点とした 4 つの生合成経路及び Trp を介さない経路が存在すると考えられていた (Zhao et al., 2008)。しかしその 4 つの経路の一つである tryptamine (TAM) から N-hydroxy tryptamine (HTAM) への変換を触媒すると考えられていた YUCCA (YUC) が indole-3-pyruvic acid (IPA) から IAA への変換を行う酵素であることが明らかになったことにより、シロイヌナズナにおける主要な経路は Trp から IPA を介して IAA を生産する 2 段階からなる簡潔な IPA 経路であると結論づけられた (Mashiguchi et al., 2011) (図 1-1 A, B)。

次に輸送であるが、IAA は主に茎頂で生産され根に極性輸送されると考えられている。その輸送は IAA 取り込みキャリアである AUX/LAX (auxin/like auxin) ファミリーと、排出キャリアである PIN (PIN-formed) ファミリー、取り込みと排出の両方に関わる一部の ABC トランスポーターによって調節されている (Peret et al., 2012)。特に排出キャリアである PIN ファミリーの各器官における局在や、細胞膜上における極性を持った局在と重力などの外部刺激に応じた



**図1-1. シロイヌナズナにおけるTrp依存的IAA生合成経路の変遷**

- A. 以前提唱されていたシロイヌナズナにおけるIAA生合成経路の略図
- B. 近年明らかになった生合成経路の略図(Mashiguchi et al., 2012 一部改変)

細胞膜上での局在変化、そして局在に関わる因子や PIN タンパクのリサイクリング等の報告が相次いだ結果、オーキシンの輸送モデルは急速に解明が進んだ (Abas et al., 2006; Kakar et al., 2013; Kleine-Vehn et al., 2011)。シロイヌナズナの根端を例に挙げて PIN の局在を説明すると、茎長で生合成されたオーキシンが維管束根端部において主に発現が観察される PIN1 及び PIN7 が静止中心 (QC) までオーキシンを輸送し、その後 PIN2 によって内皮細胞、表皮細胞へと移動することにより QC を中心としたオーキシンの濃度勾配の形成が行われていると考えられている (Krecek et al., 2009) (図 1-2)。

最後にオーキシンの受容であるが、IAA は受容体である TIR1/AFB (transport inhibitor resistance 1/auxin signaling F-box protein) と結合することにより下流へとシグナルを伝える (Darmashi et al., 2005; Kenpishi et al., 2005)。TIR1 は SCFTIR1 ユビキチンリガーゼ複合体の F-box タンパク質 (SKP cullin F-box protein ligase) であり、IAA を受容することにより活性化し転写抑制因子である Aux/IAA (auxin/indole-3-acetic acid induced protein) タンパク質を分解する (図 1-3)。その結果 IAA 応答性遺伝子が発現する。この受容機構における結晶構造解析により、IAA が TIR1/AFB と Aux/IAA の結合において糊の様な役割を果たし両者の結合を促進することが判明し、また酵母ツーハイブリッド法を用いた試験により TIR1/AFBs と Aux/IAA の親和性には差があり、この差を通じて様々な種類のオーキシンスイグナルが下流に伝達されると推測されている (Tan et al., 2007; Calderon-Villalobos et al., 2012)。

A

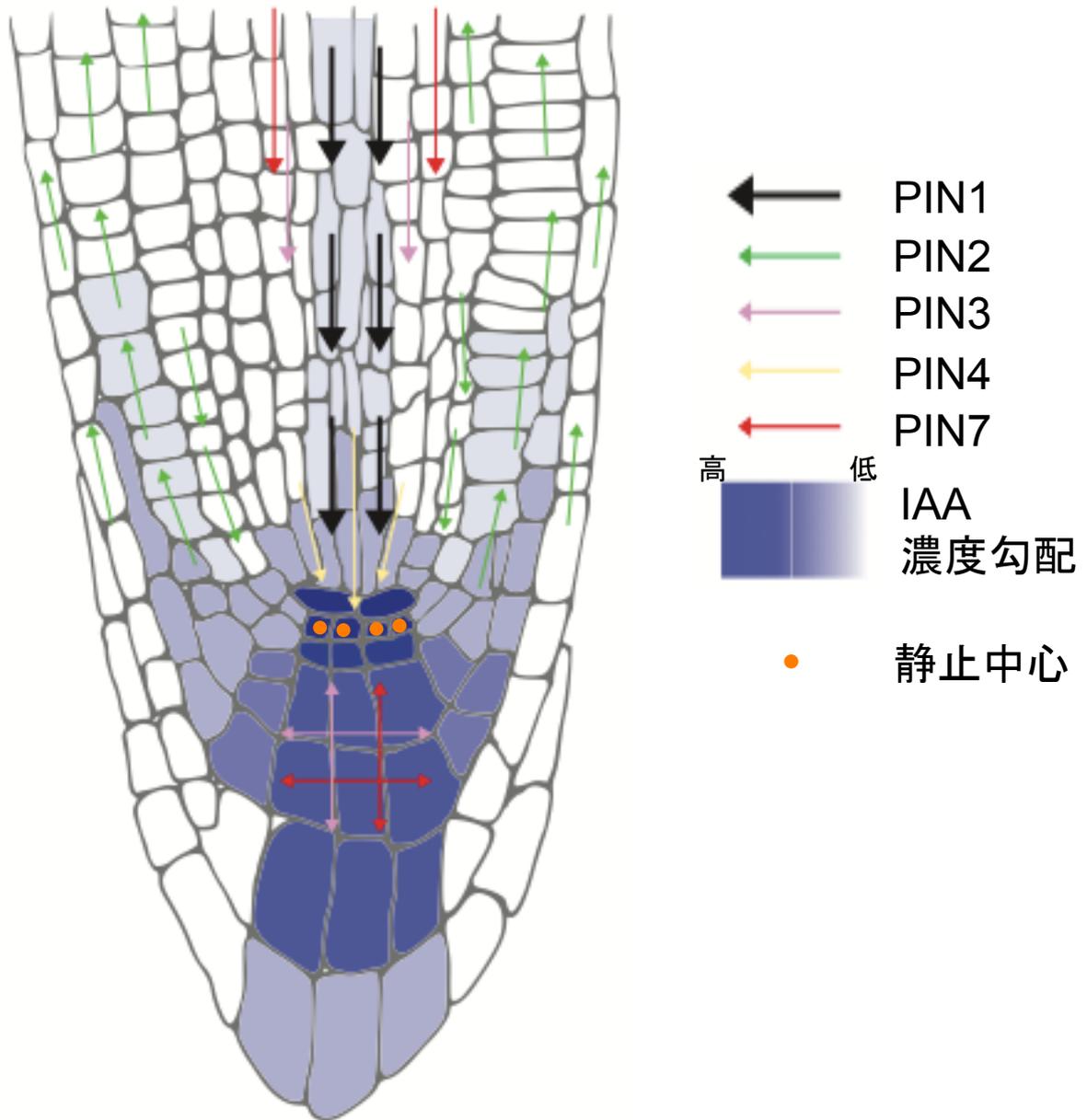
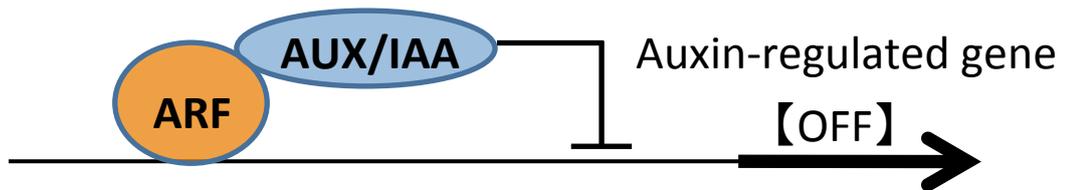


図1-2. シロイヌナズナ根端部におけるPINの分布と  
オーキシンの極性輸送による濃度勾配

A. IAA排出キャリアPINの分布とそれに伴うIAA濃度勾配の  
形成機構 (Krecek et al., 2009 一部改変)

A

low IAA level



B

high IAA level

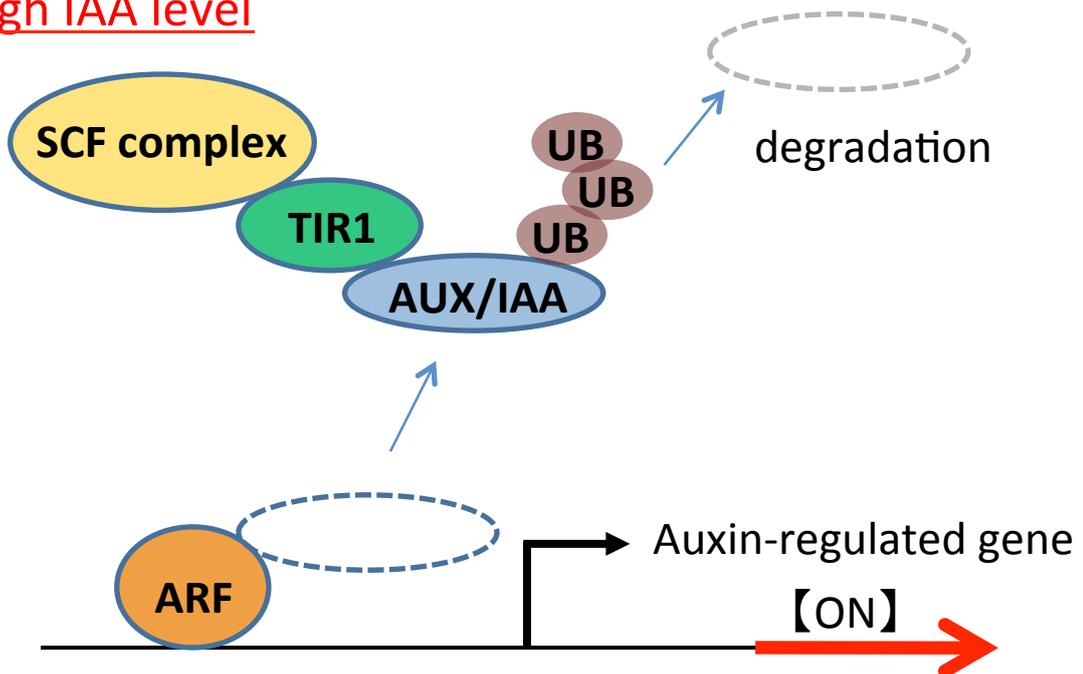


図1-3. AUX/IAAを介したIAAシグナル伝達経路の模式図

- A. 低濃度IAA下におけるAUX/IAAによる転写抑制
- B. 高濃度IAA下におけるAUX/IAAの分解による転写促進  
(UB : Ubiquitin)

## 1-2 オーキシン研究にオーキシン機能制御活性化合物を用いることの意義

上述の通りオーキシンの生合成から輸送、そしてシグナル伝達機構に至るまで多くの因子が同定されてきたが、未だその全容は明らかにはなっていない。例えば IAA の生合成経路に焦点を絞ると、中心的な役割を果たす IPA 経路が解明された一方で、それ以外の中間体を繋ぐ経路の酵素は同定されていないものもある。また IAA を不活性化し一時的なプールにすると考えられている IAA の配糖体化酵素や IAA アミノ酸複合体化酵素、及びカルボキシル基の炭素鎖長が変化した IBA への代謝、IBA から IAA への変換酵素は完全な解明には至っていない (Jackson et al., 2001; Staswick et al., 2005; Strader et al., 2011)。これらの経路におけるオーキシン誘導体の合成酵素や誘導体からオーキシンを生成する酵素を明らかにし、これら誘導体・類縁体の機能を明らかにするために有力な方法は、主要な IAA 生合成経路である IPA 経路の機能を抑制し他経路の働きを鮮明にすることである。IPA 経路の機能抑制の方法として一つは IPA 生合成経路の機能抑制型変異体を作成すること、もう一つは IPA 生合成経路の阻害剤の創製をあげることができる。本研究においては主に後者の手法である生合成阻害剤の利用による研究を進めたが、植物生理学・遺伝学の観点から、生合成変異体を用いた手法と比較した場合の生合成阻害剤を用いた手法の利点について以下に説明する。

まず IAA 生合成遺伝子変異の場合は発現量の任意な調節が非常に困難であるために変異が致死性となりやすいのに対して、化合物は適用濃度を目的に応じて最適化することにより、植物体が致死にならない程度の範囲で生合成

を抑えることが可能となり欠損型の形態変化を観察できるようになる点を利点として挙げるができる。また、ある現象に関わる遺伝子が複数ありそれぞれの機能が類似している場合には互いに相補的に働く為、一つの遺伝子機能を抑制しただけではその影響が形態変化として現れてこない。そのため該当する遺伝子が関与する形態についての解析を行う場合には多重変異体を作成する必要があり、研究に多くの時間を必要とするだけでなく、多様な植物への応用が難しい。一方で化合物を用いる場合、遺伝子から翻訳されて合成されてくるタンパク質に作用する為、標的となるタンパク質機能を発現するために存在する共通の活性部位に親和性を持たせることによりオーキシン機能を制御することが可能となる。その結果、阻害剤を用いた場合、一般的には多数の機能重複したタンパク質機能を同時に抑制することが可能となり、冗長性のある遺伝子の機能解析にも有用である。もちろん多様な植物への応用も容易である。

以上の通り、オーキシン作用とその発現メカニズムを追究するために IAA 生合成阻害剤を創製し生理学に応用する方法は有力であるが、他方、阻害剤を利用した変異体スクリーニングによりこれまで報告されていない変異体を単離しその原因遺伝子の機能解析を行うという、阻害剤の遺伝学への応用も考慮する必要がある。そこでオーキシン生合成阻害剤を利用したオーキシン変異体探索の利点について考察してみる。

まずこれまでに報告されているオーキシン関連変異体の単離について概観してみる。オーキシン関連変異体が野生型株と大きく異なる形態を示すならば、通常の形態変化に基づいた変異体探索による単離が可能である。これまで報告されてきたオーキシン関連変異体には野生型株とは異なる形態を示すこ

とを理由にして単離報告されてきている例もある (Okada et al., 1991; Boerjan et al., 1995)。しかしオーキシン関連変異体の形態が野生型株に近いもしくは同様の場合、このような変異体を通常の形態変化を指標にして単離してくることは困難である。だが、オーキシン機能を制御した結果植物の形態を変化させることができる化合物を用いれば、通常条件では野生型と類似した形態を示す変異体でも、その単離が可能となる場合がある。例えば合成オーキシンである 2,4-D を利用することにより、2,4-D に対して野生型株と異なる応答性を示す変異体 *axr* (*auxin resistance*) が単離され、その原因遺伝子の解析によりオーキシンの輸送や情報伝達の仕組みが明らかとなっている (Timpte et al., 1995)。このように植物ホルモン活性化化合物を投与しそれに抵抗性を示す変異体の選抜により、重要なシグナル関連因子が他の植物ホルモンにおいても数多く取得されてきた (Alonso et al., 1999; Peng et al., 1997)。しかしオーキシンシグナルにおいてこの 2,4-D を用いた方法で得られる変異体は既に飽和したと考えられており、現在では新しいオーキシン機能制御剤が求められている。そこで期待されているのがオーキシン生合成阻害剤を利用した変異体探索である。例えば、ブラシノステロイド (BR) 研究においては、BR 処理に抵抗性を示す変異体の解析から受容体 *BRI1* (*brassinosteroid insensitive 1*) が同定された一方で、BR 生合成酵素 DWF4 (*dwarf 4*) 特異的な生合成阻害剤 Brz (*brassinazole*) を遺伝学へと応用し、暗所胚軸伸長を指標とした阻害剤抵抗性変異体のスクリーニング及びその原因遺伝子の機能解析から、BR 情報伝達の鍵因子である *BZR1/BIL1* (*Brz resistant 1/Brz insensitive long hypocotyl 1*) が同定されている (Clouse et al., 1996; Asami et al., 2000; Wang et al., 2002)。以上より、オーキシン生合成阻害剤処理した結果、野生型株とは異

なる形態を示す変異体を選抜することにより、新たな IAA の生合成及び情報伝達経路関連因子を見出すことが可能である。特に、通常条件培地では野生型株と生育の形態上の差異が見られないが、阻害剤を処理した場合のみ野生型株と異なる変異体の場合、通常の方法では選抜が非常に困難なために、原因遺伝子を解析することにより未報告の新規性の高いオーキシシン機能に関連した遺伝子の情報が得られることが期待される。

阻害剤を用いたスクリーニングは、遺伝学的には二重変異体のスクリーニングを行うことと同等であるが、一般に二重変異体のスクリーニングには植物体の調製に問題がある場合が多い。例えばオーキシシン生合成遺伝子である *TAA1* においては遺伝子の冗長性があり (Stepanova et al., 2008)、生合成遺伝子の多重変異体を作成してから、変異原処理する必要性が生ずるために、大変な手間がかかる上に変異体の原因遺伝子の機能解析が難しくなるという問題も生じる。一方、阻害剤の利用により擬似的な二重変異体を作り出すことによる変異体探索の場合、ランダムな遺伝子のノックアウト体や過剰発現体、さらに **full-length cDNA overexpressor gene line** (FOX ライン) のような遺伝子過剰発現変異体ラインも整備され使用可能となっているため、新しく二重変異体のラインを整備してスクリーニングをおこなう場合と比較して著しく容易に実験を開始することができるだけでなく、変異体取得後の原因遺伝子の同定と性状解析もはるかに容易である。

以上、化合物を用いる手法の利点についてオーキシシン機能制御剤、特にオーキシシン生合成阻害剤の場合を中心に述べてきたが、一方で化合物を用いる際には化合物の副作用に留意しなければならない。化合物を処理した結果植物

に現れた形態が、目的とする標的、例えばオーキシシン生合成経路の阻害作用に起因していることを明確にしておく必要がある。一般的には化合物により引き起こされた形態変化が外生の生合成経路の産物処理により打ち消されることを確認すること、つまりオーキシシンの生合成阻害剤の場合は生合成阻害剤で引き起こされる植物の形態形成の異常が外生 IAA 投与によって回復する事確かめることで、標的と形態の因果関係を明確にしておく必要がある。この点を確実にしておくことによりその生合成経路に関係が無い、つまりオーキシシン機能に関係ない変異体を取得してしまう危険性を減らすことができる。

### 1-3 オーキシシン生合成阻害剤 AOPP の利用

前節でオーキシシン生合成阻害剤を用いた変異体探索の有用性を中心として述べてきたが、本研究を始めるに際しては変異体探索に応用可能なオーキシシン生合成阻害剤に関する報告は無かった。しかし当研究室では理化学研究所植物科学研究センターとの共同研究により、新規 IAA 生合成阻害剤である L-2-aminooxy-3-phenylpropionic acid (AOPP) を開発することに成功していた (Soeno et al. 2010) (図 1-4)。以下 AOPP について説明する。

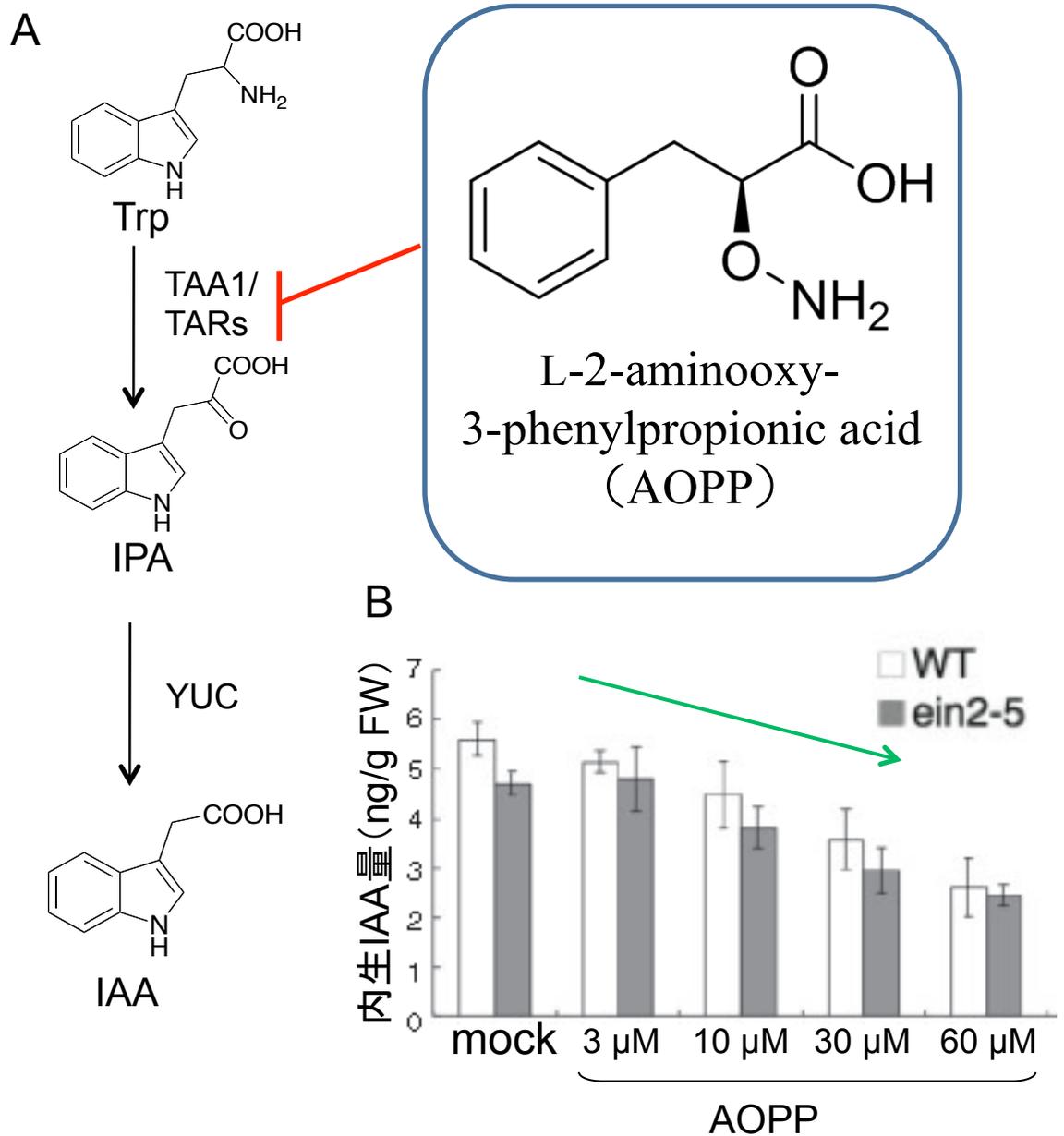
AOPP は pyridoxal-5-phosphate (PLP) 非依存型酵素であるフェニルアンモニアリアーゼの阻害剤として知られていたが (Jones and Northcote, 1984)、添野らによる化合物処理時のマイクロアレイデータの比較解析により IAA 生合成経路の阻害剤としての機能が見出された。AOPP の作用点は Trp から IPA への変換を行う TAA1 (tryptophan aminotransferase of arabidopsis) であり、AOPP 処理

したシロイヌナズナは根の伸長阻害及び主根の重力屈性異常を示すようになるが、外生の IAA 投与によりこれら形態異常や応答異常から回復する。よって AOPP は IAA 生合成経路に高い特異性を保有した IAA 生合成阻害剤であると言える。また AOPP の開発以降、同じ部位に作用点を持つ L-kynurenine や受容体阻害剤である  $\alpha$ -alkyl IAA の開発などオーキシシンシグナル阻害剤が次々に報告され、オーキシシン研究のケミカルツールが整いつつある (Hayashi et al., 2008; He et al., 2011)

#### 1-4. 本研究の目的

上記の通り、オーキシシン研究における化合物利用の有用性と新規開発したオーキシシン生合成阻害剤である AOPP が利用可能なことを踏まえて、この化合物を用いて新たな IAA 生合成及びシグナル伝達関連変異体の単離・性状解析を行い、変異体とオーキシシン機能との関連を明らかにすること、そして変異体原因遺伝子の同定と機能解析を行うことにより IAA 生合成及びシグナル伝達経路の解明に寄与することを第一の目的とした。変異体スクリーニングを行うことにより AOPP 高感受性変異体と抵抗性（低感受性）変異体の 2 通りの単離が可能であるが、本研究では主として抵抗性変異体の単離を目指して実験を行った。これに関しては第 2 章及び第 3 章にて報告する。

また、新たなオーキシシンシグナル制御剤の開発として、当研究室において見出された新規オーキシシン様植物生理活性物質の作用点探索も行ったので第 4 章にて報告する。



**図1-4. AOPPの構造式と作用点**

A. AOPPの作用点と構造式

B. AOPP処理による内生IAA量の低下 (Soeno et al., 2010 一部改変)

## 第2章 オーキシン生合成阻害剤 AOPP を用いた抵抗性変異体の選抜と機能解析

### 緒言

本研究に先立って見出されたオーキシン生合成阻害剤 AOPP は *in vitro* では非常に強い活性を示すものの、シロイヌナズナの主根伸長抑制や重力屈性異常などへの影響は期待されるほど強くはないとの情報を得ていた。そのため予備試験により AOPP 活性の確認を行ったが、AOPP を変異体探索へと利用することは難しいとの結論にいたった。この理由として化合物の不安定性および植物体内への低い浸透移行性が示唆されていた。そこでまず不安定性の問題を解決することを目的として、化合物の生理活性が安定的に見られる培地条件の検討を行った。結果として AOPP を含有する 1/2MS 培地の pH を 5.7 (弱酸性) から 7.0 (中性) に変化させ、その培地に明所で 4 日間育成したシロイヌナズナを植え替えることにより、主根の伸長阻害を観察することができた (data not shown)。しかしながら AOPP 抵抗性変異体のスクリーニングを考えた場合、植物体の植え替えは手間であるため、植え替えの必要が無い試験系を模索したところ、有機塩類を除いたスクロースとビタミン類を含む培地 (以下スクリーニング培地と呼称する) に AOPP を加え、この培地にシロイヌナズナを播種して角シャーレを垂直に立てかけて培養するという条件下で、主根生育時の重力屈性の異常が観察出来ることを見出した (図 2-1 A, B)。また、AOPP 処理によって観察された主根重力屈性の異常は、根が必ず重力方向に対して左方向に斜行

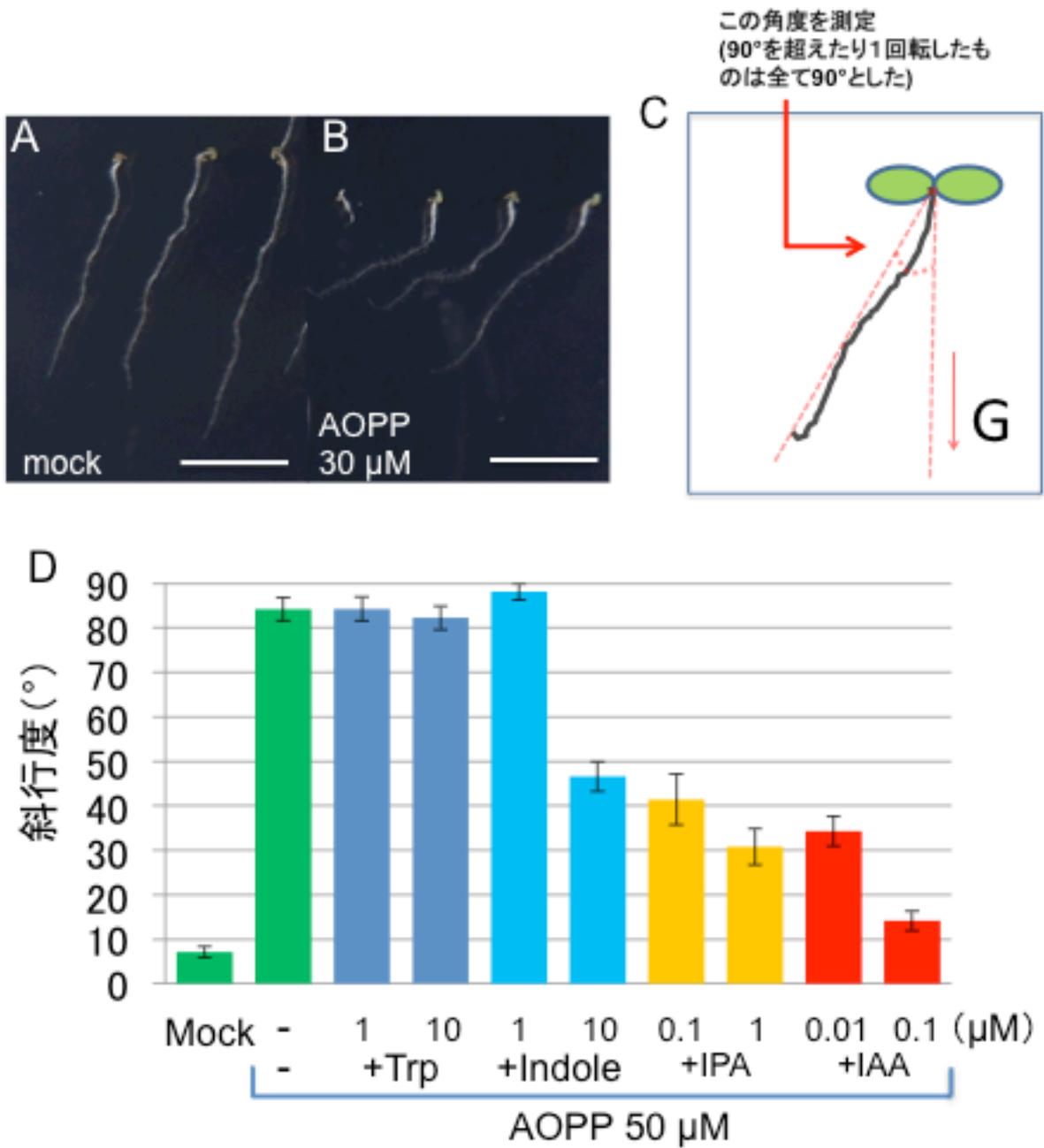


図2-1. AOPP処理による主根の斜行とIAA関連化合物による回復

A, B. AOPP処理による主根伸長阻害と重力屈性異常 (bar=1 cm)  
 C, D. AOPPとIAA関連化合物の共処理による主根斜行度  
 (明所7日目 n=18~21 bar=S.E.)

するという性質を有していた。オーキシン受容体阻害剤である PEO-IAA 処理ではこのような形態は見られなかった。次に、この AOPP 処理した植物体で観察される左方向への斜行からの回復を調べるために、IAA 及び IAA 生合成中間体を AOPP と共処理した。その結果、オーキシン生合成における AOPP の標的酵素である TAA1 の下流に位置する IAA 及び IPA を低濃度で処理した植物体では、AOPP による根の斜行形態からの回復が観察された。しかし、AOPP の標的酵素より上流に位置する Trp 処理条件では、明瞭な回復を示さなかった(図 2-1 C, D)。この結果は AOPP 処理した植物体に観察される根の斜行伸長が、AOPP による IAA 生合成経路中の TAA1 阻害による IAA 濃度の低下が原因であることを示唆している。以上より、AOPP を含む培地において生じる左方向への根の斜行に抵抗性を示す変異体を取得することにより、オーキシン生合成及びシグナル伝達関連の新規な変異体が取得可能になると考え、AOPP 抵抗性変異体のスクリーニングを行った。

AOPP 含有スクリーニング培地において主根が左に斜行せず重力方向に根が伸長している形態を示す個体を AOPP 抵抗性変異体候補として選抜し、次世代以降の植物体を用いて再現性の確認を行った結果、約 25000 種のスクリーニングから 4 種の AOPP 抵抗性変異体を取得できた(図 2-2 A)。これら抵抗性変異体を *rai1*, *rai2*, *rai3*, *rai4* (resistant to auxin inhibition 1, 2, 3, 4) と命名し、その中でも特に強い抵抗性を示した *rai1* について性状解析および原因遺伝子の解析を行うことにより新規オーキシン関連因子の同定を目指した。

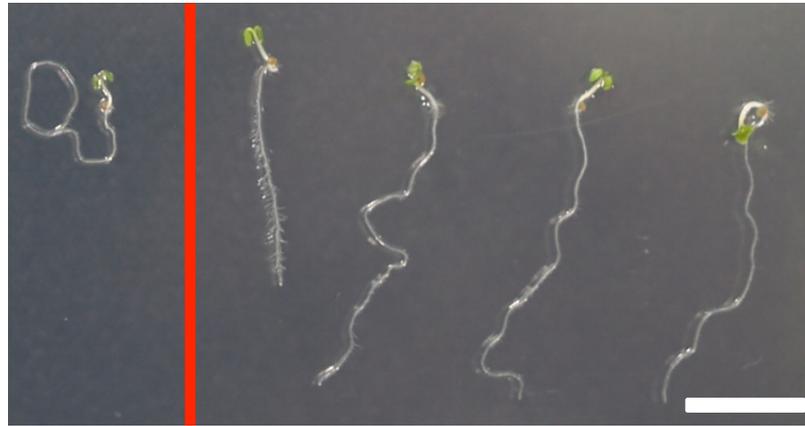
## 2-1. *rail* の主根細胞及び根毛の観察

*rail* は AOPP に強い抵抗性を示す一方で、野生型株と比較して根が短く、AOPP 処理によって主根伸長量が増大する。(図 2-2 B, C)。これらの形態観察はスクリーニング培地上であったため、*rail* を 1/2MS 培地上で生育させた場合の形態について観察したところ、同様に野生型株と比較して主根伸長量の減少及び根毛量の増大が観察された (図 2-3 A)。これらの形態変化がオーキシシンシグナルの過剰に起因する可能性について検討するために、外生オーキシシンを投与した野生型株と *rail* の根毛量及び根細胞長の比較を行った。結果、根毛に関しては *rail* と IAA 処理区において共に根毛量が増大していることが判明した (図 2-3 B-D)。また、主根中央付近の細胞長を観察するため PI 染色 (propidium iodide) によって細胞壁を染色し細胞概型を観察したところ (Rounds et al., 2011)、*rail* 及び IAA 処理区の両者において細胞の縦方向への伸長が阻害されていることが判明した (図 2-3 E-G)。以上の結果より *rail* 変異体における根の形態がオーキシシンシグナル過剰によって引き起こされている可能性が示唆された。

## 2-2. *rail* の内生 IAA 量及び IAA 応答性遺伝子発現量の測定

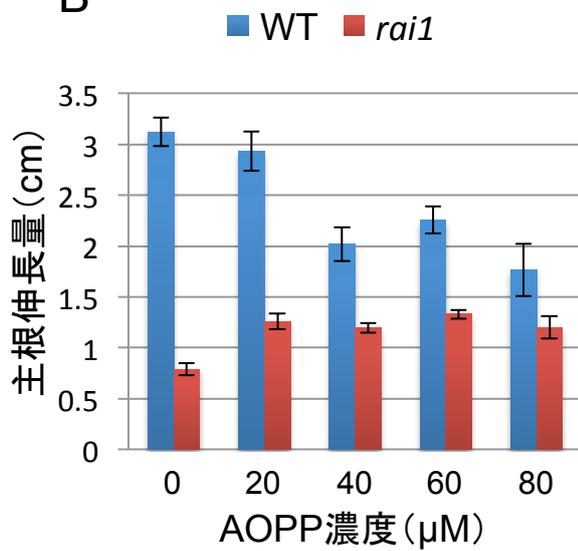
*rail* は AOPP に強い抵抗性を示すが、1/2MS 培地においても主根伸長の阻害や根毛数の増大などの恒常的なオーキシシンシグナル過剰様形態を示すだけでなく、AOPP 濃度依存的な主根伸長阻害からの回復を示した。これらのこと

A

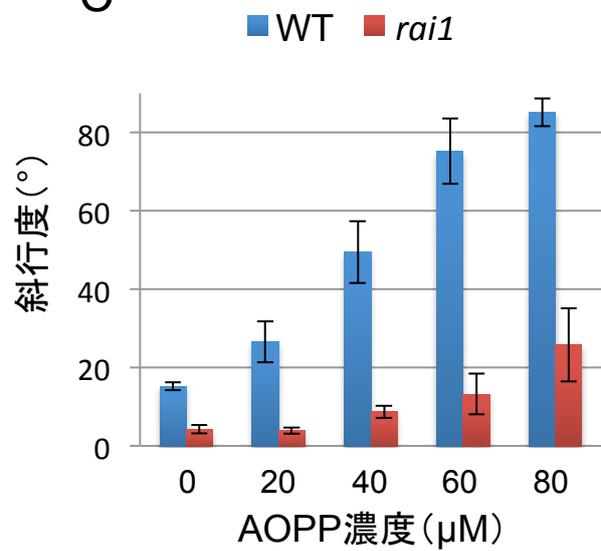


WT      *rai1*   *rai2*   *rai3*   *rai4*

B

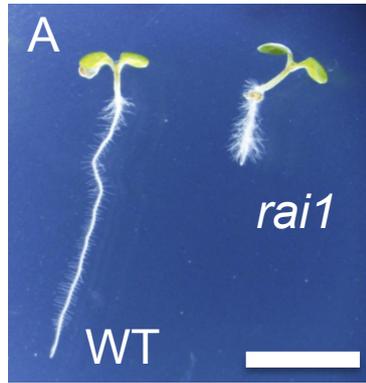


C



**図2-2. 抵抗性変異体*rai*の形態及びAOPP含有培地における*rai1*の主根長と斜行度**

A. 抵抗性変異体*rai*の形態 (AOPP 50 μM bar=1 cm)  
 B, C. AOPP含有培地における*rai1*の主根長及び主根斜行度 (明所6日目 n=7~8 bar=S.E.)



root hair

root cell

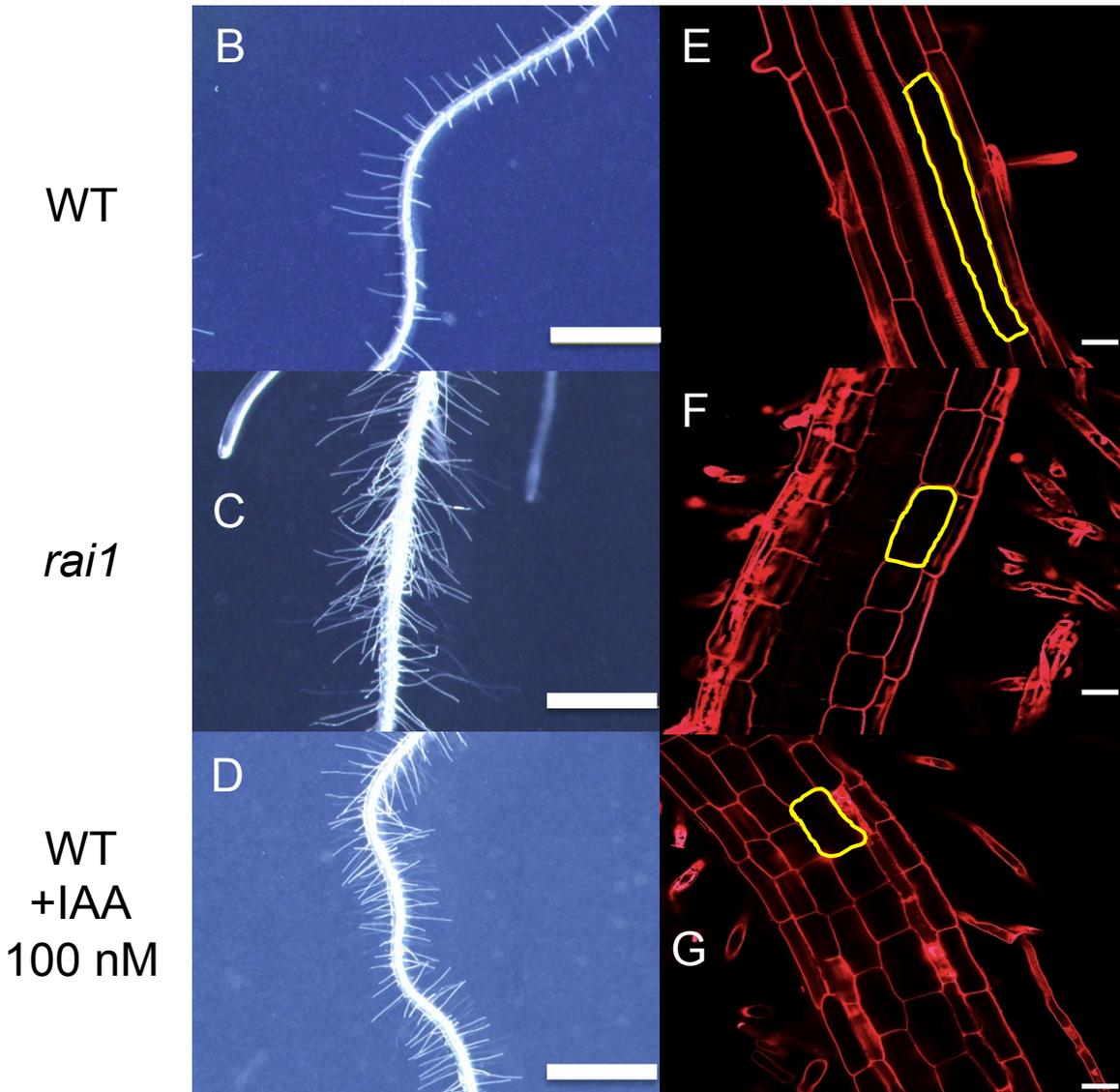


図2-3. *rai1*の根毛及び主根細胞の観察

A. 野生型株と*rai1*の形態比較(明所6日目 bar=1 cm)

B-G. 野生型株と*rai1*の根毛観察とPI染色による根細胞概型観察

(明所6日目 B-D. bar= 500  $\mu$ m E-G. bar=10  $\mu$ m 黄枠は1細胞を囲ったもの)

B, E. 野生型株

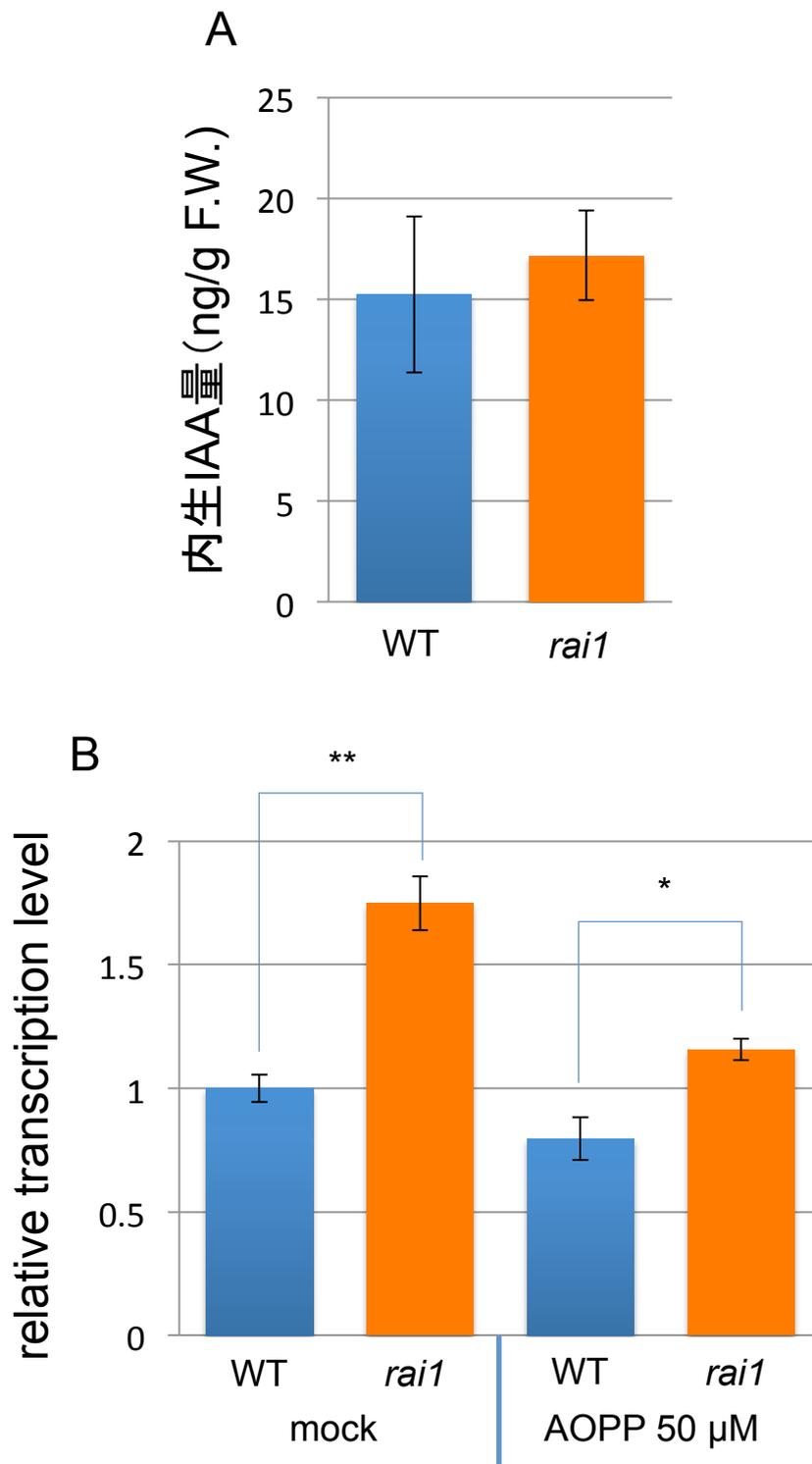
C, F. *rai1*

D, G. 野生型株をIAA100 nM含有培地で培養

から、*rail* においては IAA 生合成経路に起因する恒常的な IAA シグナル過剰によって AOPP 抵抗性や主根の伸長阻害が起こり、AOPP 処理による *rail* 主根伸長量の回復は IAA 生合成経路の阻害による恒常的な IAA シグナル過剰状態が解除されることによるものであると推測した。そこで、*rail* における内生 IAA 量を測定したが、野生型株と比較して有意な差は見られなかった (図 2-4 A)。次に、代表的な IAA 応答性遺伝子である *IAA19* の *rail* における発現量を測定したところ、野生型株に比べて無処理条件及び AOPP 処理条件のいずれにおいても発現量が有意に上昇していた (図 2-4 B)。また、*rail* が特に根において強いオーキシシンシグナル過剰様形態を示したため、植物体を根と葉に分けてサンプリングし各々の IAA 応答性遺伝子発現量を測定したところ、根において IAA 応答性遺伝子の発現量上昇傾向が観察された一方で、葉における発現量上昇は見られず、*IAA19* においては減少していた (図 2-5)。以上の結果より、*rail* においては内生 IAA 量の増加は見られないものの応答性遺伝子の発現量が上昇していることから、*rail* においてオーキシシンシグナルが過剰になっていることが強く示唆された。

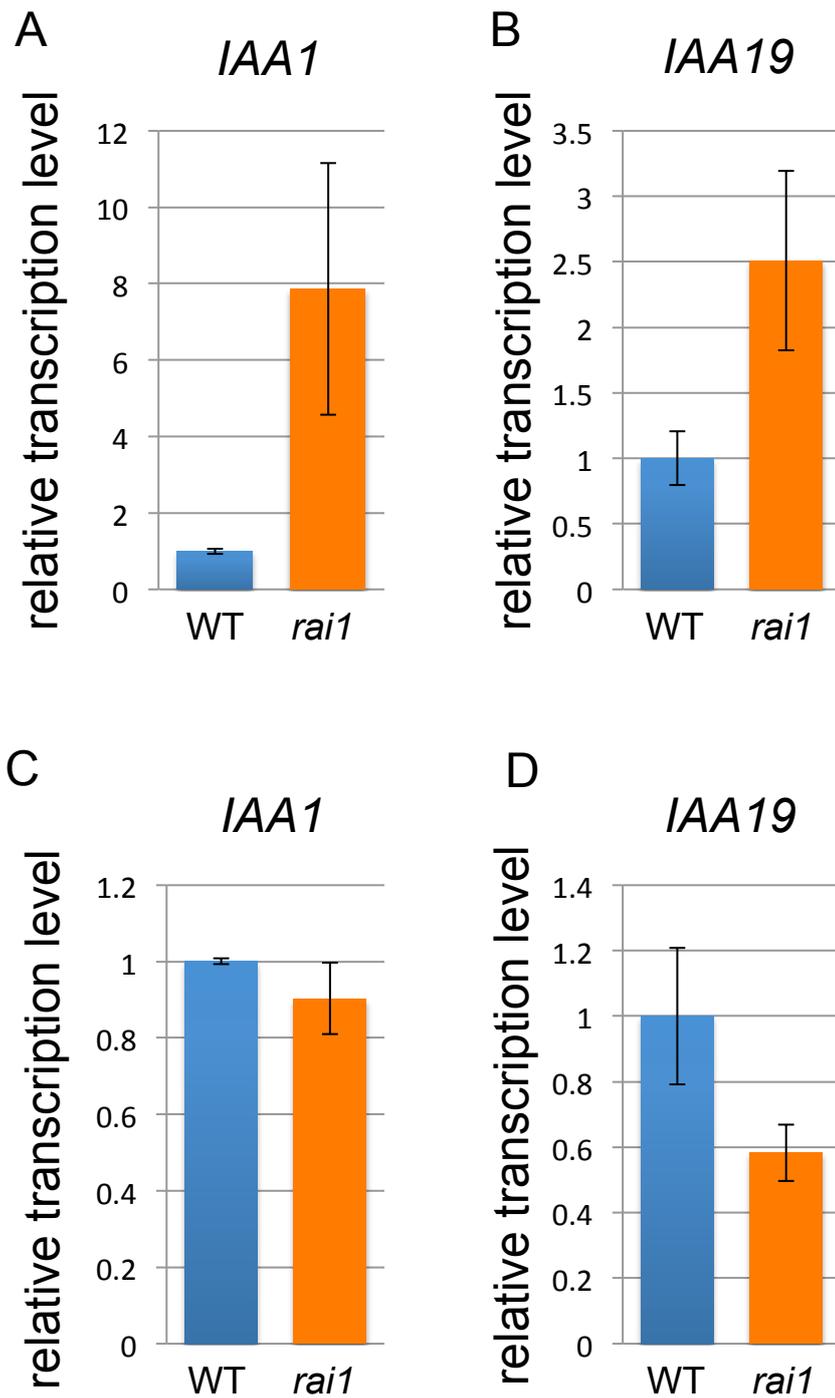
### 2-3. *rail* の成熟形態の観察

前項までは *rail* の幼植物体を中心に観察を行ったが、次に *rail* 成熟個体の形態を観察した。恒常的なオーキシシンシグナル過剰変異体ならば、オーキシシンの生理作用である頂芽優性により枝数の減少及び主茎長の増大が観察され



**図2-4. *rai1*のIAA内生量及びIAA応答性遺伝子発現量**

- A. 野生型株と*rai1*の内生IAA量(明所7日目 n=3 bar=S.E.)  
 B. 野生型株と*rai1*におけるIAA応答性遺伝子IAA19の発現量  
 (明所8日目の植物体に薬剤を3時間処理 n=3 bar=S.E.)  
 (\*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ )



**図2-5. *rai1*の部位別IAA応答性遺伝子発現量**

A-D. 野生型株と*rai1*のIAA1及びIAA19発現量  
 (明所10日目 A, Bは根のみ C, Dは地上部のみ n=3 bar=S.E.)

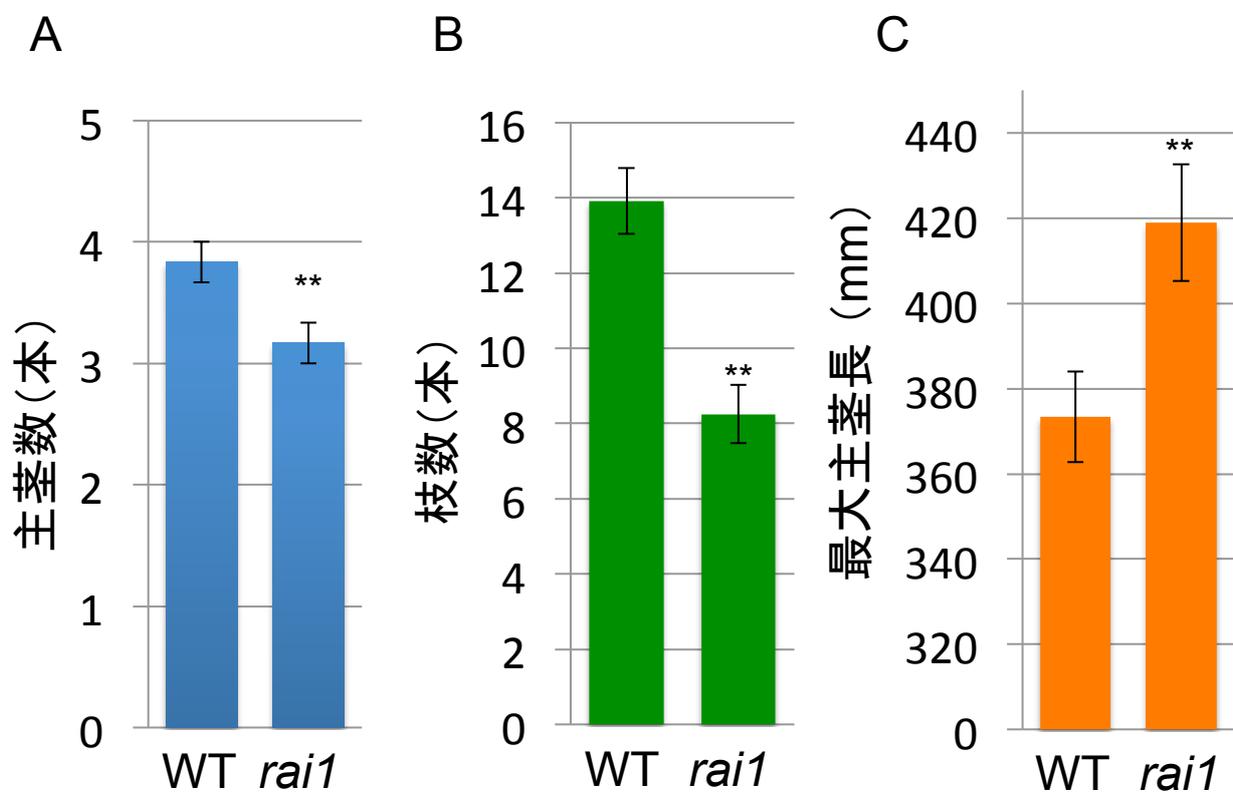


図2-6. *rai1*の成熟形態の観察

A-C. 野生型株と*rai1*の枝数と主茎長測定  
 (A, B. 明所45日目 n=12 bar=S.E. C. 明所75日目 n=8 bar=S.E.)  
 (\*\*= $p < 0.01$  \*\*\*= $p < 0.001$ )

ると考え、枝数と主茎長を測定した。その結果、野生型株と比較して、*rai1* において有意な枝数の減少と主茎長の増大が観察された (図 2-6)。よってこの結果も *rai1* が恒常的なオーキシシグナル過剰変異体である可能性を支持した。

#### 2-4. *rai1* の原因遺伝子の探索

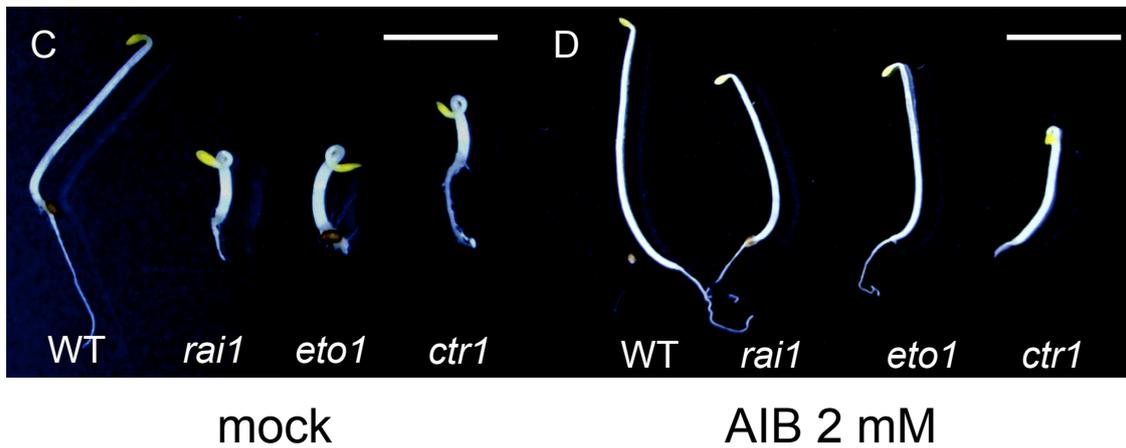
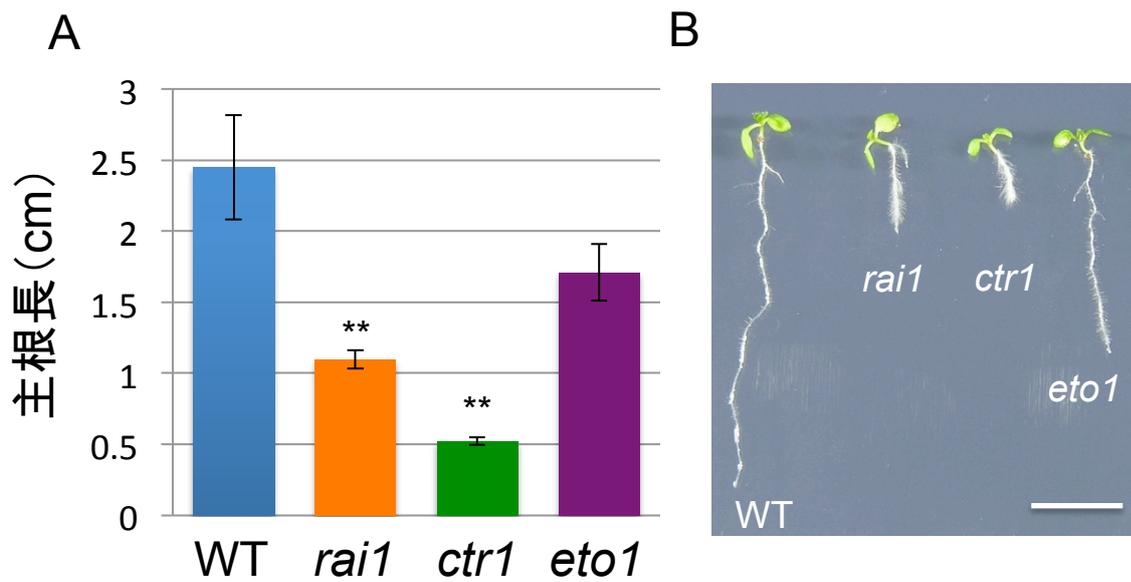
*rai1* が恒常的なオーキシシグナル過剰様形態を示すことから、原因遺伝子の絞り込みとして既知のオーキシシグナル過剰様変異体との形態比較を行った。オーキシシグナル生合成過剰を引き起こす変異体としてオーキシシグナル生合成経路中間体 IAOx からインドールグルコシノレートを生産する経路の変異体である *superroot1, 2* (*sur1, sur2*) があるが (Mikkelesen et al., 2004)、これら変異体が引き起こすオーキシシグナル過剰による強い生育抑制及び雄性不稔は *rai1* においては観察されなかった。次に注目したのがエチレンシグナル過剰変異体の *constitutive triple response (ctr1)* 及び *ethylene overproduction 1 (eto1)* である。CTR1 はエチレン受容体 ETR1 の直下に存在するエチレンシグナルを負に抑制する因子であり、機能欠損変異体 *ctr1* においては主根の著しい阻害と根毛形成を引き起こす (Kieber et al., 1993)。ETO1 はエチレン生合成経路における律速酵素 ACC Synthase (ACS) ファミリーの ACS5 の翻訳後制御に関わる因子であり、機能欠損変異体 *eto1* においては ACS5 の過剰蓄積によるエチレン生合成過剰を引き起こす (Guzman et al., 1990; Chae et al., 2003)。既にエチレンによるオーキシシグナル生合成の促進現象は広く知られていたため (Swarup et al., 2007)、*rai1* のオーキシシグナル過剰様形態もエチレン生合成及びシグナル伝達過剰に起因する可能性が考えら

れた。

これらの情報を元に *ctr1* 及び *eto1* と *rail* の幼植物体の主根形態を比較したところ、明所通常条件培地においては *rail* は *ctr1* よりは弱く、*eto1* よりは強い主根の伸長阻害を示した (図 2-7 A, B)。そこで *rail* における暗所胚軸形態を観察したところ、エチレンシグナル過剰形態である三重反応が観察され、エチレン生合成阻害剤である  $\alpha$ -aminoisobutyric acid (AIB) によって三重反応が解除された (図 2-7 C, D) (Martintunguy et al., 1993)。これらの結果から *rail* がエチレン生合成関連の変異体ではないかと推察し、*rail* 遺伝子配列解析による原因遺伝子の絞り込みを行ったところ、*eto1* をコードする AT3G51770 の ORF に二箇所の変異を保持していることが判明した (図 2-8 A)。そこで *rail* 変異体に own プロモーター領域を繋いだ *ETO1* の全長を挿入すると、*rail* で観察された主根伸長の抑制が解除されることが判明した (図 2-8 B-E)。よって、*rail* がエチレン生合成過剰変異体である *eto1* と同一の原因遺伝子を保有していることが明らかとなった。

## 2-5. *rail* 単変異体の作出と形態解析

*rail* が *ETO1* 領域に形態変化として現れる変異を保有していることが判明したが、*eto1* と *rail* の形態比較を行うと AOPP への強い抵抗性が *eto1* 単変異体では観察されなかった (図 2-9 A, B)。先の主根伸長量観察においても *rail*



**図2-7. *rai1*とエチレンジグナル過剰変異体の形態比較**

A, B. 各種変異体の形態と主根伸長量

(明所7日目 n=6 error bar=S.E. scale bar=1 cm \*\*= $p < 0.01$ )

C, D. 各種変異体の暗所形態とエチレン合成阻害剤AIB処理

(暗所3日目 bar=5 mm)

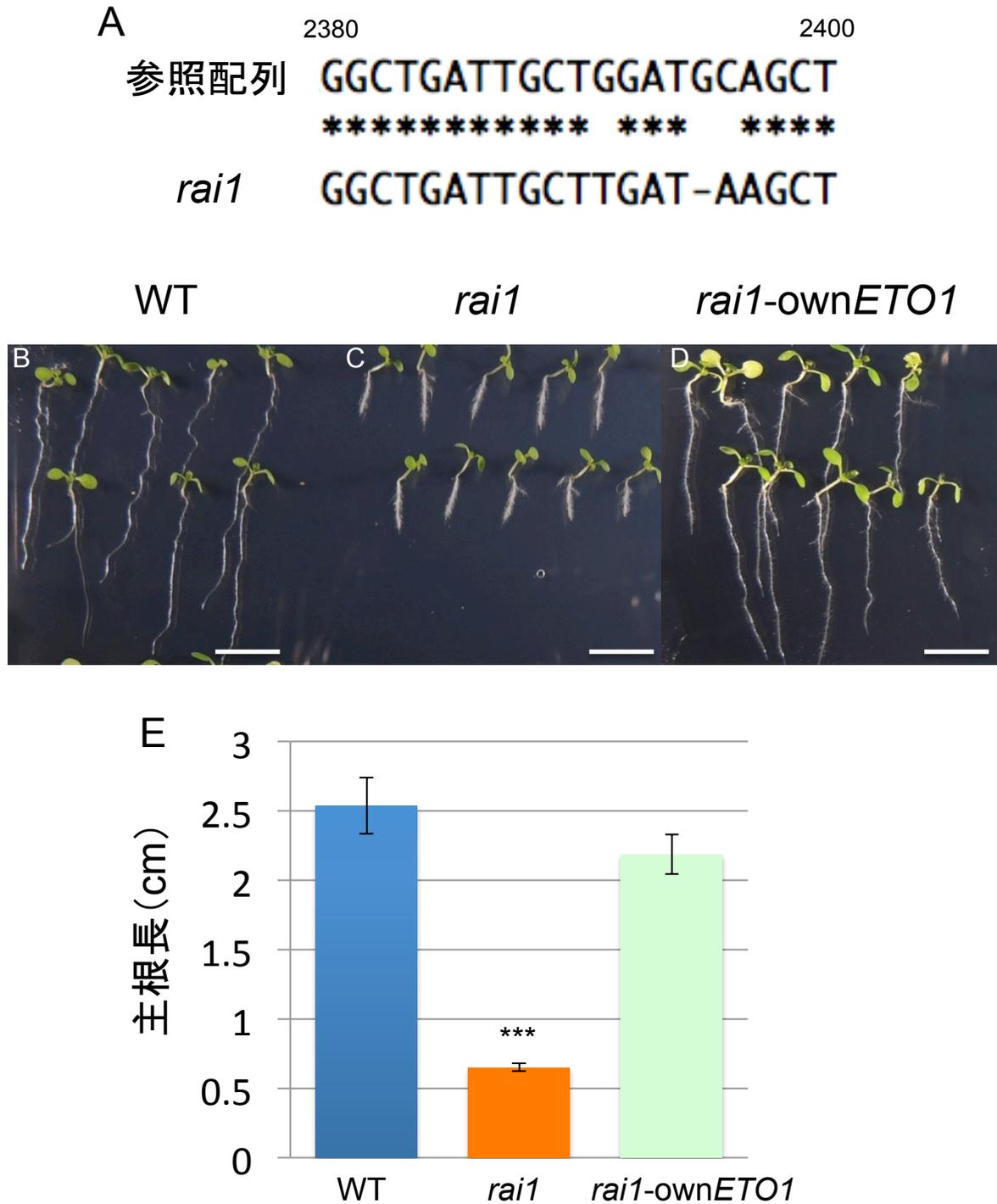


図2-8. ownETO1挿入による*rai1*の主根伸長抑制の回復

A. *rai1*におけるETO1配列の欠損部位(参照配列はTAIR10)

B-E. *rai1*及び*rai1-ownETO1*の形態と主根伸長量

(明所8日目 n=8~10 error bar=S.E. scale bar=5 mm \*\*\*= $p < 0.001$ )

は *etol* よりも強い主根伸長抑制を示したが、共に *ETOI* に変異を保有するにも関わらずこのような形態の差が現れる原因として2つの可能性が考えられた。一つは、*rail* と *etol* における *ETOI* 領域へ導入された遺伝子変異の差によるものであり、もう一つは *rail* の形質が *ETOI* 変異と更に別の遺伝子変異によって発現していることである。次項で述べるマップベースドクローニング法による原因遺伝子の絞り込みにおいて、ラフマッピングの段階で *ETOI* がある3番染色体とは異なる4番染色体上に原因遺伝子があることが示唆されていたことから、*rail* においては後者の可能性が高いと考えた。そこで、*rail* と野生型株を掛け合わせ、F2世代における *rail* 形態の分離比を調べた。結果、906個体中75個体が *rail* 様形質を示したことから、分離比はおよそ12:1であるため、15:1で形質が現れる劣勢の二重変異体ではないかと推察した。そこで、*rail* 変異体から *ETOI* 変異を含まない *rail* 単変異体の単離を試み、単変異体における植物形態やAOPP抵抗性を観察した。*rail* と野生型株の掛け合わせによって得られたF2世代のうち、*rail* 様の形態を示さない個体を選抜し、その中で *ETOI* に変異を持たない12個体を制限酵素を用いた手法により選抜した。選抜した12個体は *ETOI* に変異は入っていないものの、存在を想定しているもうひとつの未同定の変異がホモで入っている個体は1/4の確率で存在していると予想できるが、例えホモラインであってもAOPP抵抗性を示すか可能性については未知数であった。そこでこれらの後代を取得し、F3世代においてAOPPの抵抗性を観察した結果、AOPP抵抗性を示すラインを得ることが出来たため、これが *rail* の単変異体のホモラインではないかと推察した (図 2-10A)。抵抗性を示したラインの主根を観察す

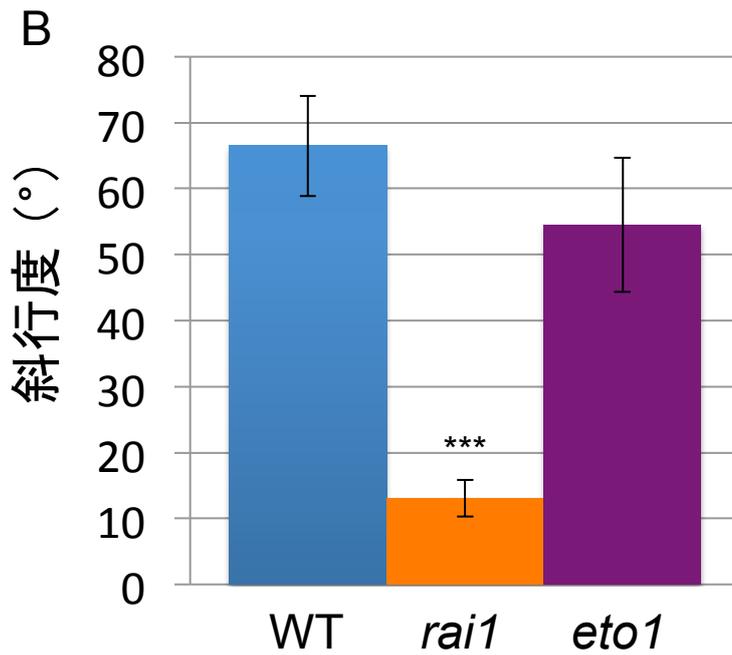
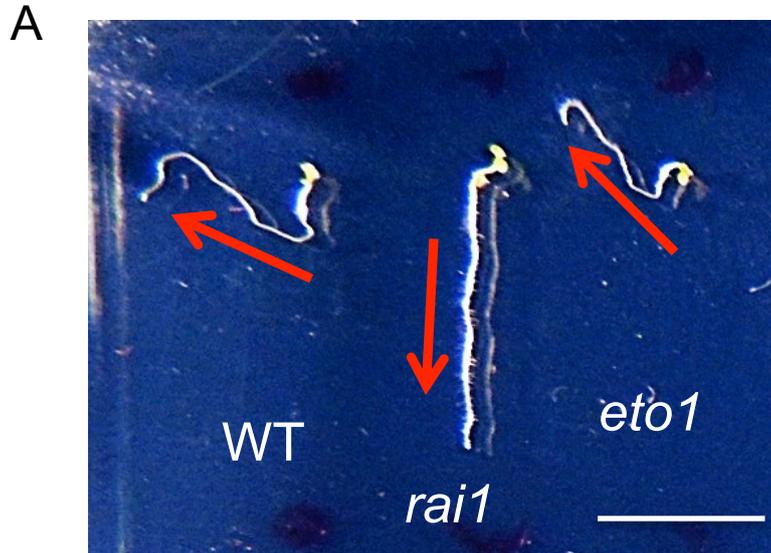
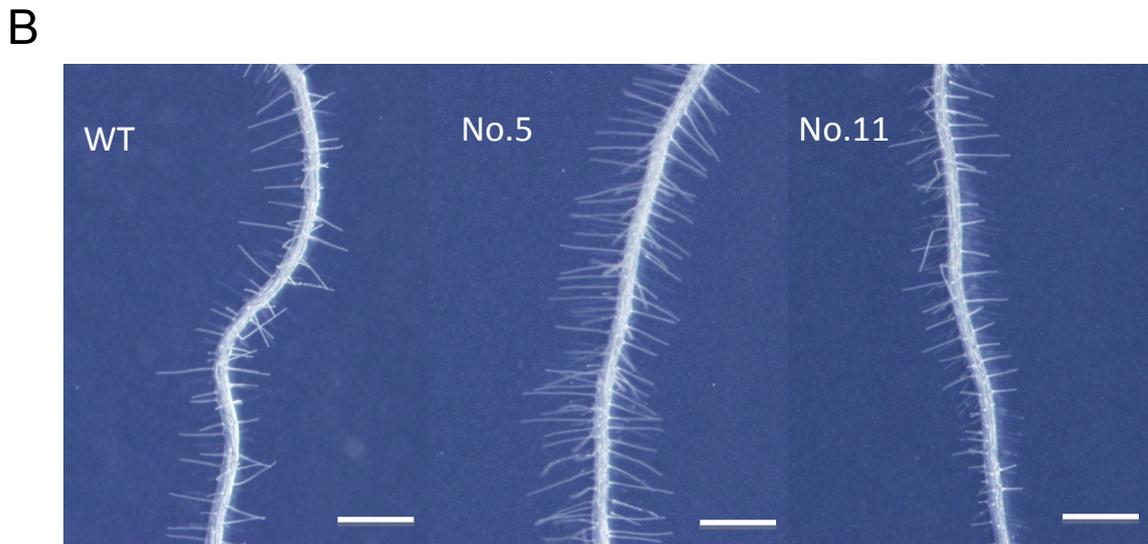
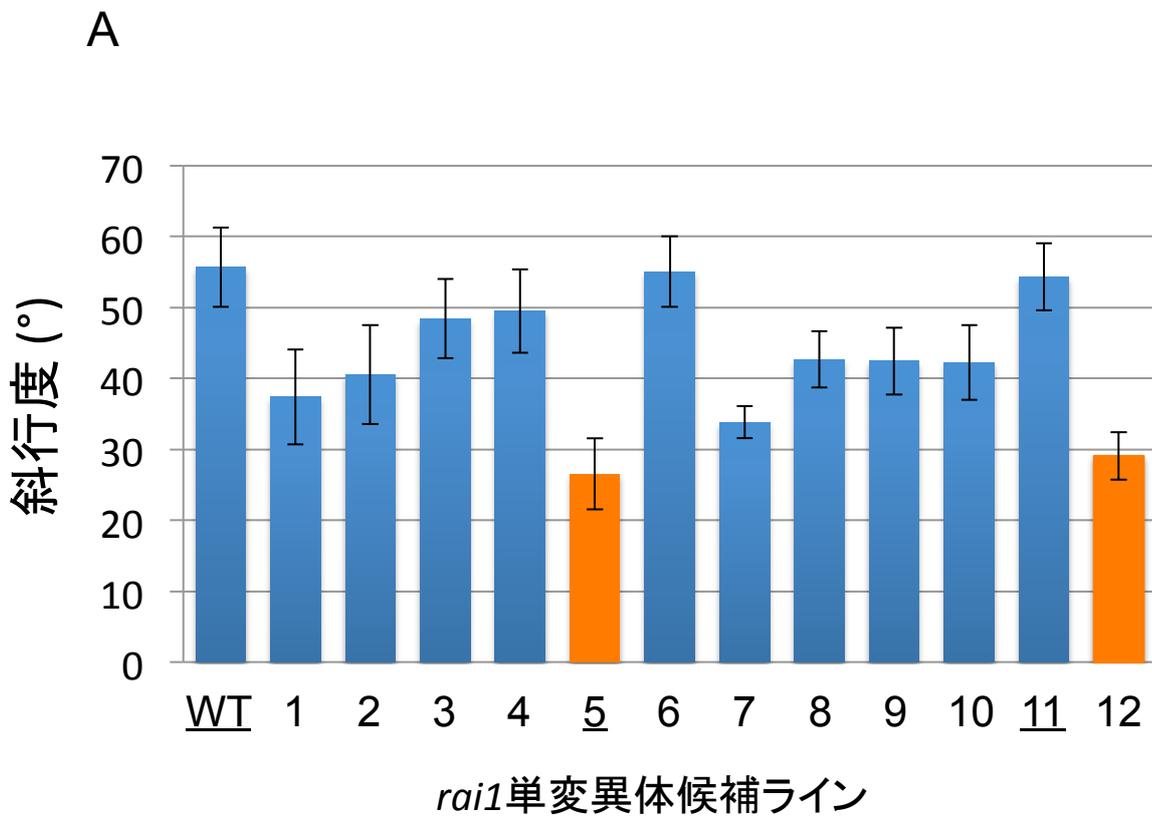


図2-9. *rai1*と*eto1*のAOPP抵抗性の比較

A. AOPP含有培地 (30  $\mu$ M) における野生型株, *rai1*, *eto1* の形態  
(明所6日目 bar=1 cm)

B. AOPP含有培地 (30  $\mu$ M) における野生型株, *rai1*, *eto1* の主根斜行度  
(明所6日目 n=16~18 bar=S.E. \*\*\*= $p<0.001$ )



**図2-10. *rai1*単変異体のAOPP抵抗性と根毛観察**

A. AOPP含有培地 (30  $\mu$ M) における*rai1*単変異体の主根斜行度 (明所6日目 n=12 bar=S.E.)

B. 1/2MS培地における*rai1*単変異体の根毛観察 (明所5日目 bar=500  $\mu$ m)

ると、主根伸長量に差は見られないものの、根毛伸長が促進されている形態を示した (図 2-10 B)。そしてこの単変異体ラインに *etol* を掛け合わせたところ、F2 世代において *rail* 様の形質を示す個体を得られた (data not shown)。以上の結果より、*rail* が *etol* と未同定因子の二重変異体であることと、未同定因子の単変異体でも AOPP 抵抗性や根毛伸長の促進などのオーキシシグナル過剰様形態を示すことがわかった。

#### 2-6. マップベースドクローニング法及び次世代シーケンサーを用いた *rail* 原因遺伝子同定の試み

*rail* の未同定の原因遺伝子を特定するため、*rail* のエコタイプである Col とは異なる Ler の野生型を *rail* と掛け合わせ、その分離比から原因遺伝子を絞り込むマップベースドクローニング法によって原因遺伝子の同定を目指した。まずは各染色体における上流と下流に作成したプライマー計 10 組を用いてラフマッピングを行った結果、遺伝子増幅が 2 組のプライマーで上手く行かなかったが、増幅した 8 組のうち 4 番染色体の上流に作成したマーカーにおいて Ler ゲノムの出現率が低いことが判明した (図 2-11 A)。そこで 4 番染色体に様々なマーカーを作成し順番に絞り込んでいったところ、4 番染色体のセントロメア近傍である 9120kbp から 10530kbp の領域に変異した原因遺伝子が存在することが示唆された (図 2-11 B)。この領域に既知のオーキシン関連遺伝子が報告されていないことから、*rail* が新規の原因遺伝子をコードしている可能性が高まった。しかしながら原因遺伝子がセントロメア付近に存在することにより、染色体の

組み換えを利用したマップベースドクローニング法の効率が悪くこれ以上の絞り込みは非常に困難な状況になった。そこで、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム情報の取得による *rail* 原因遺伝子の同定を試みた。しかしながらこの方法による原因遺伝子の同定には失敗した。原因としてはまず、解析の際に用いた参照配列を親株ではなくデータベースの TAIR10 としたことにより、検出された変異点の配列を再度親株とともに読み直しても *rail* と親株が一致するケースが殆どであったこと、更には高速シーケンサーによって提示された変異点を再度別のシーケンサーを用いて部分的に配列を確認した場合、変異点が確かに存在するものの、高速シーケンサーを用いた配列解析では提示されなかった変異が数多く含まれていたことから、仮に提示された全変異を調べても原因遺伝子に辿り着けない可能性が大いに含まれていたことが挙げられる。現在これらの課題を解決すべく、別の方法による次世代シーケンサーを用いた原因遺伝子の同定を模索中である。

A

chromosome	primer	Col	Ler	Ler/全体
1上	nga63	36	20	0.357
1下	nga280	35	21	0.375
2上	ciw3	—	—	—
2下	nga168	15	11	0.423
3上	nga162	32	16	0.333
3下	nga6	—	—	—
4上	nga8	2	54	0.036
4下	nga1107	30	22	0.423
5上	nga151	28	26	0.481
5下	nga76	32	22	0.407

B

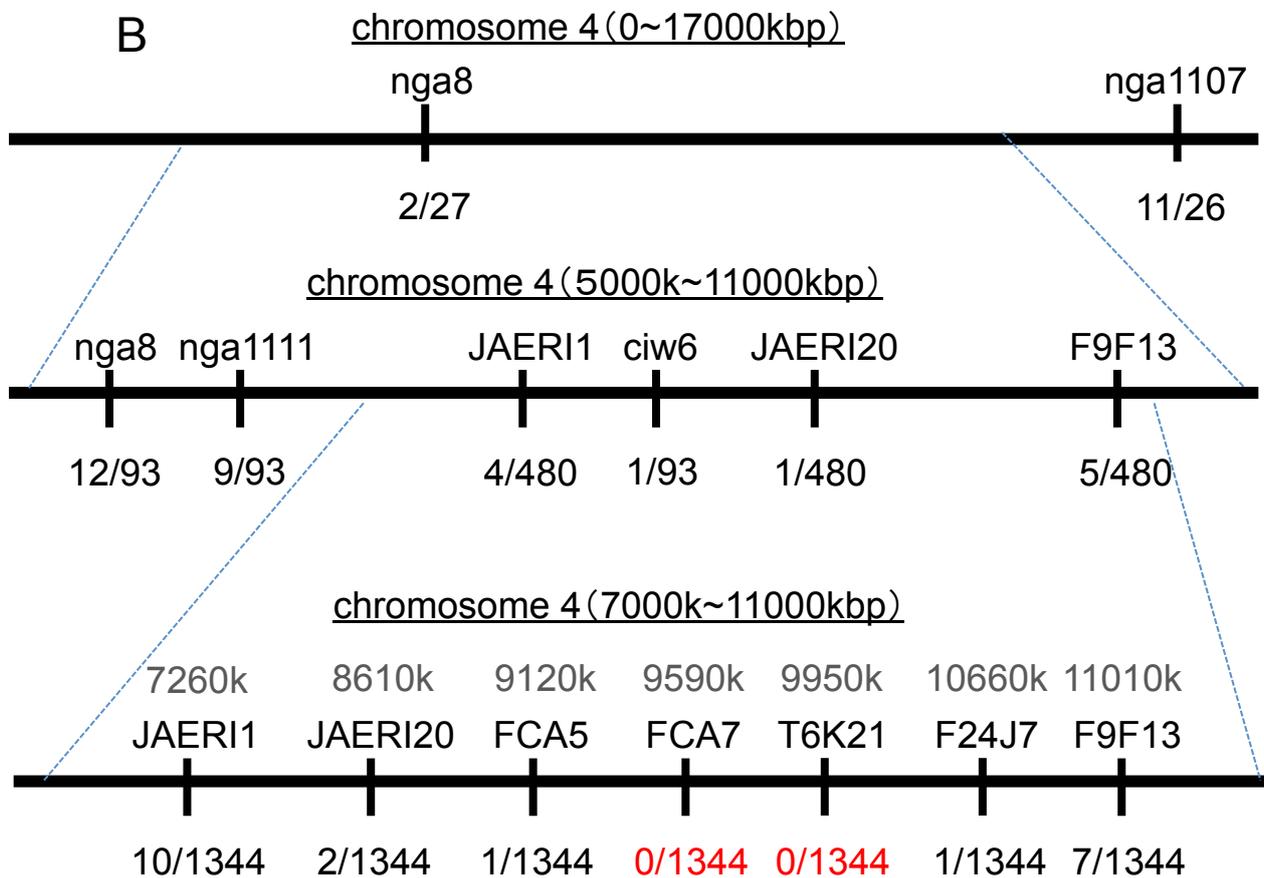


図2-11. マップベースドクローニング法による  
*rai1*原因遺伝子の絞り込み

- A. 各染色体上に作成したマーカーによるラフマッピング
- B. 4番染色体上におけるマッピングによる*rai1*原因遺伝子の所在の絞り込み

## 2 章 考察

新たに見出されたオーキシン生合成阻害剤 AOPP を利用したオーキシン生合成及びシグナル伝達関連因子の取得を目指して、AOPP 抵抗性変異体のスクリーニングを行い、4 種類の突然変異体を得た。

最も強い抵抗性を示した *rail* の形態解析を行った結果、オーキシンシグナルが過剰となっている可能性が示唆されたため、原因遺伝子の同定を目指した。単変異体が AOPP 抵抗性や根毛増大などのオーキシンシグナル過剰様形態を示したこと、および絞り込んだ領域内にオーキシンシグナルに関わると考えられている因子の報告が存在しないことから、恐らく *rail* が新規のオーキシンシグナル関連因子であると考えている。しかしながら、現在のところ原因遺伝子の同定には至っていないため、残念ながら *rail* 変異体に関しては変異体の性状解析を行った段階から研究を進展させることができなかった。

## 2 章実験方法

### 1. シロイヌナズナの培養と形態観察

#### 【角シャーレを用いたシロイヌナズナの培養】

滅菌 2 号角シャーレ (EIKEN) にオートクレーブした各種培地及び DMSO に溶かした各種薬剤を入れ、滅菌したシロイヌナズナ種子を植えた。サージカルテープでシャーレを密封して、暗所、4°C で 2 日間低温処理した後、連続光下 (18.2~46.5  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sec}$ ) のバイオトロンで静置した。根の形態観察を行い易くするために角シャーレをほぼ垂直に立て置いた。

#### <シロイヌナズナの滅菌>

シロイヌナズナ種子を 70%エタノールに 30 分浸漬した後、99%エタノールに 1 分浸漬し、滅菌濾紙の上に種子を広げて乾燥させた。

#### <1/2MS 培地>

Murashige & Skoog Salt Mixture (Gibco BRL)	2.3 g
スクロース	8 g
1000×ビタミンストック	1 mL

1N NaOH で pH 5.7 に調製した後、蒸留水で 1L にメスアップし、植物用寒天 8 g (0.8% (w/v)) を加えてオートクレーブし、プレートに分注した。

#### <スクリーニング培地>

スクロース	8 g
1000×ビタミンストック	1 mL

蒸留水で 1L にメスアップし、植物用寒天 8 g (0.8% (w/v)) を加えてオートクレーブした。pH 調製は行わなかった。

#### <1000×ビタミンストック>

ニコチン酸	50 mg
ピリドキシン塩酸塩	50 mg
チアミン塩酸塩	20 mg
グリシン	200 mg
ビオチン	5 mg
葉酸	50 mg

約 80 mL の蒸留水で懸濁し、溶解するまで 1N NaOH を加え、蒸留水で 100 mL

にメスアップした。

#### <化合物の取り扱いについて>

化合物はDMSOに0.1~100 mMの濃度で溶かし、-20℃で凍結保存した。但し、L-AOPPだけは、ストックは作らずに培地に加える前にその都度DMSOに溶かして使用した。培地に化合物のDMSO溶液を加える際は、オートクレーブした培地を冷ました後に加えた。また、DMSO溶液が培地の1/1000以下になるようにした。

#### 【主根伸長量及び斜行性の測定】

主根の伸長量及び斜行角度の測定は、シャーレをスキャナで画像化した後、画像解析ソフトのImage J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)を用いて、画像より測定を行った。主根の伸長量は胚軸以下から根の先端部までを測定した。斜行角度の測定は、胚軸の下端と根の先端を結んだ直線と重力方向に引いた直線が成す角度を斜行度として測定した。

#### 【PI染色による細胞概形の観察】

培養したシロイヌナズナをPI染色液に3分間浸漬し、滅菌水で洗浄後、共焦点顕微鏡 (LSM 700 laser scanning microscope, Zeiss) を用いて観察した。励起光は555nmを用い、パスフィルターは490-630nmとした。

#### <PI染色液>

Propidium iodine	10 µg
滅菌水	1 mL

---

PI染色液は200倍のストック (2 mg/mL) を調製し、暗所、4℃で保存した。実験毎にストックを滅菌水で200倍希釈し染色液とした。

## 2. IAA 応答性遺伝子の解析

シロイヌナズナからRNAを抽出し、逆転写後、リアルタイムPCRによりmRNA発現量の比較解析を行った。実験手法を以下に記す。

### 【シロイヌナズナの RNA 抽出】

RBC Bioscience の Total RNA Extraction Kit Mini (Plant)を用いて抽出した。

植物体 5~100 mg を液体窒素中ですり潰し、RB buffer 500  $\mu$ L と  $\beta$ -メルカプトエタノールを加えボルデックスにかけて混合し、室温で 5 分以上インキュベートした。Filter Column に溶液を入れ 13000 rpm で 2 分遠心、上清液を分取した。上清液の半量のエタノールを加え転倒混和し、溶液を RB Column に入れ 13000 rpm で 2 分遠心する事により RNA をカラムに結合させた。その後 W1 Buffer を 400  $\mu$ L 加え 13000 rpm で 1 分遠心、廃液を捨て Wash buffer を 600  $\mu$ L 加え 13000 rpm で 1 分遠心、廃液を捨てる事によりカラムを洗浄した。更にカラムを乾燥のために 13000 rpm で 3 分遠心した。乾燥したカラムに RNase-free-Water を 50  $\mu$ L 加え、3 分以上チューブを室温で静置した後、13000 rpm で 1 分遠心し、RNA 抽出液を得た。得られた RNA 抽出液は-80°Cで保存した。

### 【逆転写反応】

PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)を用いた。RNA 抽出液 (up to 1  $\mu$ g) に 5 $\times$ gDNA Eraser buffer を 2  $\mu$ L、gDNA Eraser を 1  $\mu$ L 加えた後、滅菌蒸留水で液量を 10  $\mu$ L に揃え、室温で 5 分間静置した。逆転写反応酵素溶液の Premix を 10  $\mu$ L 加え、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> Gradient を用いて PCR 反応を行った。

#### <Premix>

5 $\times$ PrimeScript Buffer 2 (for Real Time)	4 $\mu$ L
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1 $\mu$ L
RT Primer Mix	1 $\mu$ L
滅菌蒸留水	4 $\mu$ L

#### <PCR サイクル>

37°C 15 分

85°C 5 秒 1 cycle

### 【リアルタイム PCR による IAA 応答性遺伝子発現量比較】

氷上で SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (Perfect Real Time)の Premix を調製した後、cDNA 溶液 1.6  $\mu$ L と Premix 18.4  $\mu$ L を 0.2 ml 96 ウェル PCR プレート ABI タイプ (WATSON)に入れた。シーリング後、1000 rpm で 1 分間遠心し、Thermal Cycler

Dice<sup>®</sup> Real Time System (Takara) で PCR 反応を行った。

<Premix>

SYBR <sup>®</sup> Premix Ex Taq	10 $\mu$ L
PCR Forward + Backward Primer	0.4 $\mu$ L
滅菌蒸留水	8.0 $\mu$ L

<PCR サイクル>

95°C 10 秒	1 cycle
95°C 5 秒	
60°C 30 秒	40 cycle
95°C 15 秒	
60°C 30 秒	
95°C 15 秒	1 cycle

<使用プライマー>

name	Forward Primer	Reverse Primer
Ubiquitin	CCAAGATCCAGGACAAAGAAGGA	TGGAGACGAGCATAAACACTTGC
Actin	CGATGAAGCTCAATCCAAACGA	CAGAGTCGAGCACAATACCG
IAA1	GATTACCCGGAGCACAAGAAGAA	ATCTCACTGGAGGCCATCCA
IAA19	TGAATATGACGTCGTCGGGTAGTA	CCGGCGAATCATTAACCTTCT

### 3. 内生 IAA 量測定

植物体から IAA を抽出後、LC-MS を用いて内生 IAA 量を測定した。

#### 【シロイヌナズナの IAA 抽出】

乳鉢中で植物体 10~200 mg を液体窒素で凍結させてからすり潰し、90%メタノール水 1 ml を加えチューブに溶液を移した。これを 5 回行い、5 ml となった溶液に内標を加えた。IAA 抽出の為に溶液を -20°C で 1 時間以上静置した後、10000 rpm で 30 分遠心した。遠心後上清液を取り、濃縮乾固した。乾固したサンプルを 300  $\mu$ L のメタノールで溶かした後、蒸留水を 2.7 mL 加える事により溶液を 10%メタノール水とした。溶液を 10000 rpm で 30 分遠心し、10%メタノール水で洗った OASIS HLB cartridges (Waters) に上清液をチャージした。カラ

ムを 10%メタノールで洗った後、90%メタノール水 1 mL で溶出した。これを濃縮乾固したものを IAA 抽出サンプルとして、LC-MS による測定に供した。

#### 【LC/MS による内生 IAA 量測定】

前述の方法で作成した IAA 抽出サンプルをメタノールに溶かし、以下の測定条件で内生 IAA 量の測定を行った。

測定機器：Triple TOF™ 5600 (AB SCIEX)

カラム：Poroshell 120 EC-C18 2.1×50 mm, 2.7 μM (Agilent Technologies)

流速：0.4 mL / min

溶媒条件：A 1%ギ酸水溶液 (ギ酸：関東化学)

B 1%ギ酸メタノール (ギ酸、メタノール：関東化学)

グラジエント条件：

Minute	%A	%B
0	80	20
- 4	30	70
- 5	30	70
- 5.01	80	20
- 7	80	20

測定イオン：182.08 / 136.08 (<sup>13</sup>C6-IAA)

176.06 / 130.06 (IAA)

#### 4. シロイヌナズナ成熟形態の観察

バイオトロンに移動後 10 日~14 日間プレート上で生育させたシロイヌナズナをジフィーミックス (サカタのタネ) 及びバーミキュライトの混合土壌に植え替えて、明所 22℃、明所 16 時間暗所 8 時間サイクルの培養室で生育させた。主茎長の測定は定規で行った。

#### 5. マップベースドクローニング法による *rail* 変異部位の解明

取得した *rail* 変異体に同一のエコタイプである野生型株 (Col) を掛け合わせ種子を取得し、F2 世代で変異形質のホモラインを得た後、そのホモラインの種子とエコタイプの異なる野生型株 (Ler) を掛け合わせた。シロイヌナズナの掛け合わせに関する基本的な操作は「モデル植物の実験プロトコール」(秀潤社)

に従った。Col と Ler との掛け合わせで得られた F2 世代において、*rail* 様形態を示した植物個体の DNA を抽出し、各 SSLP マーカーを用いて PCR を行った。PCR 産物を 3%アガロースゲルによって電気泳動する事によりバンドを確認し、そのバンドサイズから各マーカーにおけるエコタイプを確認した。

#### 【DNA 抽出】

播種後 21 日程度経過したシロイヌナズナのロゼッタ葉 1 枚をチューブに取り、ジルコニアビーズ (φ5) 及び DNA 抽出バッファー 300 μL を加え、ショッカーに 1 分間かける事により葉を粉碎した。遠心後、上清を 100 μL 取り、イソプロパノール 100 μL と混合し、-20℃で 30 分間静置した。その後 5000 rpm で 30 分間遠心し、上清を捨て、滅菌蒸留水 100 μL を加え、DNA 抽出液とした。

#### <DNA 抽出バッファー>

1 M Tris (pH 7.5)	200 mL
5 M NaCl	50 mL
0.5 M EDTA	50 mL
10% SDS	50 mL
<u>dH<sub>2</sub>O</u>	<u>650 mL</u>

#### 【PCR 反応】

DNA 抽出液 1 mL と Premix 29 mL を混合し、PCR 反応を行った。

#### <Premix>

10×Ex Taq buffer (TaKaRa)	3 μL
dNTP Mix	3 μL
Home Taq (Labo original)	1 μL
50 mM Primer	0.4 μL
<u>dH<sub>2</sub>O</u>	<u>21.6 μL</u>

#### <PCR サイクル>

<u>94℃ 3分</u>	<u>1 cycle</u>
94℃ 30秒	
53℃ 30秒	
<u>72℃ 60秒</u>	<u>40 cycle</u>
<u>72℃ 7分</u>	<u>1 cycle</u>

<ラフマッピングのプライマー>

Map position	Forward Primer	Reverse Primer
CHR1-1	AACCAAGGCACAGAAGCG	ACCCAAGTGATCGCCACC
CHR1-2	CTGATCTCACGGACAATAGTGC	GGCTCCATAAAAAGTGCACC
CHR2-1	GAAACTCAATGAAATCCACTT	TGAACTTGTTGTGAGCTTTGA
CHR2-2	TCGTCTACTGCACTGCCG	GAGGACATGTATAGGAGCCTCG
CHR3-1	CATGCAATTTGCATCTGAGG	CTCTGTCACTCTTTTCCTCTGG
CHR3-2	TGGATTTCTTCTCTCTTCAC	ATGGAGAAGCTTACACTGATC
CHR4-1	GAGGGCAAATCTTTATTTTCGG	TGGCTTTCGTTTATAAACATCC
CHR4-2	GCGAAAAAACAAAAAATCCA	CGACGAATCGACAGAATTAGG
CHR5-1	GTTTTGGGAAGTTTTGCTGG	CAGTCTAAAAGCGAGAGTATGATG
CHR5-2	GGAGAAAATGTCCTCTCCACC	AGGCATGGGAGACATTTACG

CHR○-△：各プライマーによって増幅される遺伝子の位置

○=染色体番号 △=1が上流、2が下流

<4番染色体上に設計したプライマー>

Name	Forward primer	Reverse primer
nga12	AATGTTGTCCTCCCCTCCTC	TGAGCTCTCTGAAACAAGAGC
nga1111	GGGTTCGGTTACAATCGTGT	AGTTCAGATTGAGCTTTGAGC
JAERI1	TGGAAGACATGGGAACAAC	GAGCATGAAGCAGAGGAAT
ciw6	CTCGTAGTGCCTTTTCATCA	CACATGGTTAGGGAAACAATA
JAERI20	TCCAAATGAGGAATCACTTC	CCTCGGTCTACCATACAAAG
F9F13	CTCGAGAGCCACTTTAGCTT	ATTGGAGAGGTGCTACTGAG
FCA5	CACAGTTAAGATGGTGGCATC	CATCACATCTAACCTTCCAGG
FCA7	TTCCCTCGGCCTGGAGTAT	GGAGTAAGCTTTTCGTGGTT
T6K21	TAACTTCTCTGCTCATATGCC	TTAACCGCTTACGCCTTTGC
F24J7	TGGATGAGAAGGATTTGACTG	TCAGACAAGTATCAGCCACC

6. シロイヌナズナの形質転換

第3章実験方法にまとめて表記した。

## 7. 統計処理

主根長や IAA 内生量及び応答性遺伝子発現量などの正規分布が仮定される場合においては、Microsoft office excel を用いてスチューデントの T 検定を行う事により試験区間の有意差検定を行った。正規分布が仮定出来る場合の多群間検定の場合はウェルチの t 検定法を利用したライアンの多群間検定を行った。正規分布が仮定できない主根伸長量の屈曲度の有意差検定においては、2 群間を対象にした場合はマン・ホイットニーの U 検定を、多群間を対象にした場合はマン・ホイットニーの U 検定を用いたライアン法による多群間検定を行う事により有意差検定を行った。ウェルチの t 検定及びマン・ホイットニーの U 検定は「Phyton CGIによる統計計算」(<http://www.m-sugaya.jp/python/>)のプログラムを利用した。この統計処理法は3章及び4章の実験においても適用した

### 第3章 FOX ラインを利用した更なる AOPP 抵抗性変異体の探索と機能解析

#### 緒言

第2章においては AOPP 抵抗性変異体として *rai1* を選抜し、その機能解析と原因遺伝子解析を行うことにより新規オーキシン関連因子の取得を目指したが、*rai1* の原因遺伝子がセントロメア近傍に存在するため同定が非常に困難な作業であることが判明した。一方、*rai2* や *rai3* 変異体に関しても、その変異源がアルキル化剤である EMS や高速中性子線などの突然変異を誘導するものであり迅速な原因遺伝子の同定が難しいことが予想された。そのため、新たなオーキシン関連変異体の取得を目的として、理化学研究所が開発したシロイヌナズナの FOX ラインを利用した新規オーキシン関連変異体のスクリーニングを検討した。FOX ラインとはシロイヌナズナの cDNA を CaMV::35S プロモーター下で過剰発現させたラインであり、1 ライン毎に独立して種子が管理されている (Ichikawa et al., 2006)。このラインを利用する最大のメリットは、抵抗性を示したラインに挿入されている cDNA の同定が非常に容易なことである。突然変異体の原因遺伝子の同定には年単位の研究期間が必要な場合が多いのに対して、FOX ラインの原因遺伝子の同定は変異体から抽出した DNA の PCR による挿入 cDNA の同定及びその原因遺伝子を野生型株に再導入して形態の再現を確認することで完了する。また、過剰発現型の 1 世代前の変異体ラインであるアクチベーションタグラインのように、一つのタグによって複数の遺伝子が過剰発現してしまうことも無い。FOX ラインの原因遺伝子を同定する際に留意すべき点として、複数の cDNA が挿入されている可能性と、挿入によって欠損した配列によって形質変化が現れた可能性が挙げられるが、両者ともに候補遺伝子の

cDNA を過剰発現プロモーターで繋いだものを野生型株へ再導入し、形質の再現性を確認するという方法で解決できる。本章においては、阻害剤無添加の培地条件下では過剰発現を原因とする形態を示さないものの、特定遺伝子の過剰発現効果により阻害剤に抵抗性を示すようになった変異体の選抜を期待し、通常条件培地下で形態が現れない過剰発現ラインを探索した。このスクリーニング法を実行することで阻害剤を利用するという特性を活かした変異体の単離が可能になると考えている。

### 3-1. FOX ラインを利用した AOPP 抵抗性変異体の選抜

第2章で用いたスクリーニング系を用いて、約 6000 種の FOX ラインから 1 ラインの AOPP 抵抗性変異体を選抜した (図 3-1 A, B)。この変異体を *rai5-Dominant* (*rai5-D*) と名付け、まずは挿入されている原因候補遺伝子の発現量を測定した。データベースの情報より *rai5-D* に挿入されている cDNA が AT4G23400 であることが判明したため、まずは AT4G23400 の発現量をリアルタイム PCR で測定し、野生型株と比較して発現量が上昇していることを確認した (図 3-1 C)。よって AT4G23400 が *rai5-D* の原因遺伝子である可能性が示唆された。

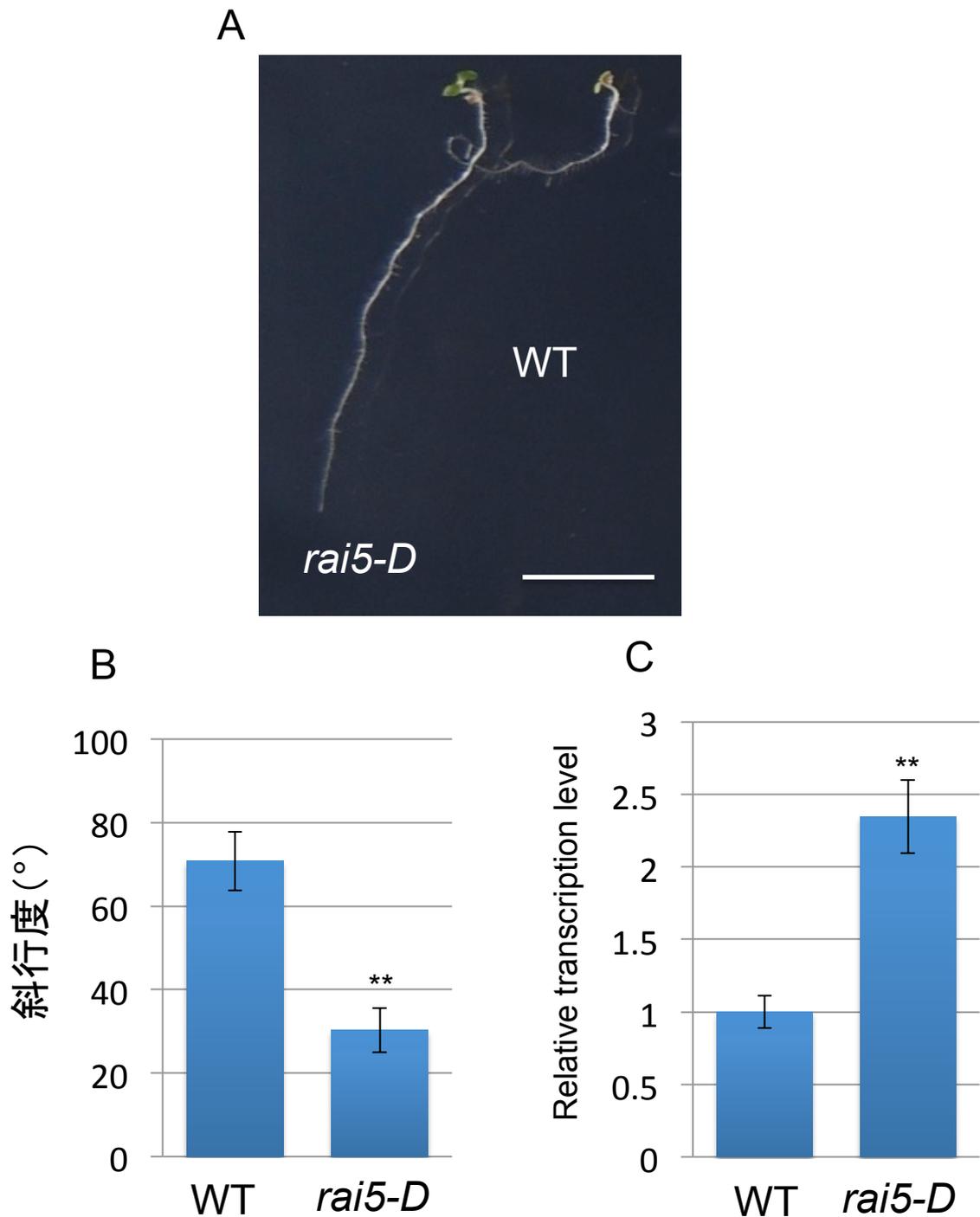


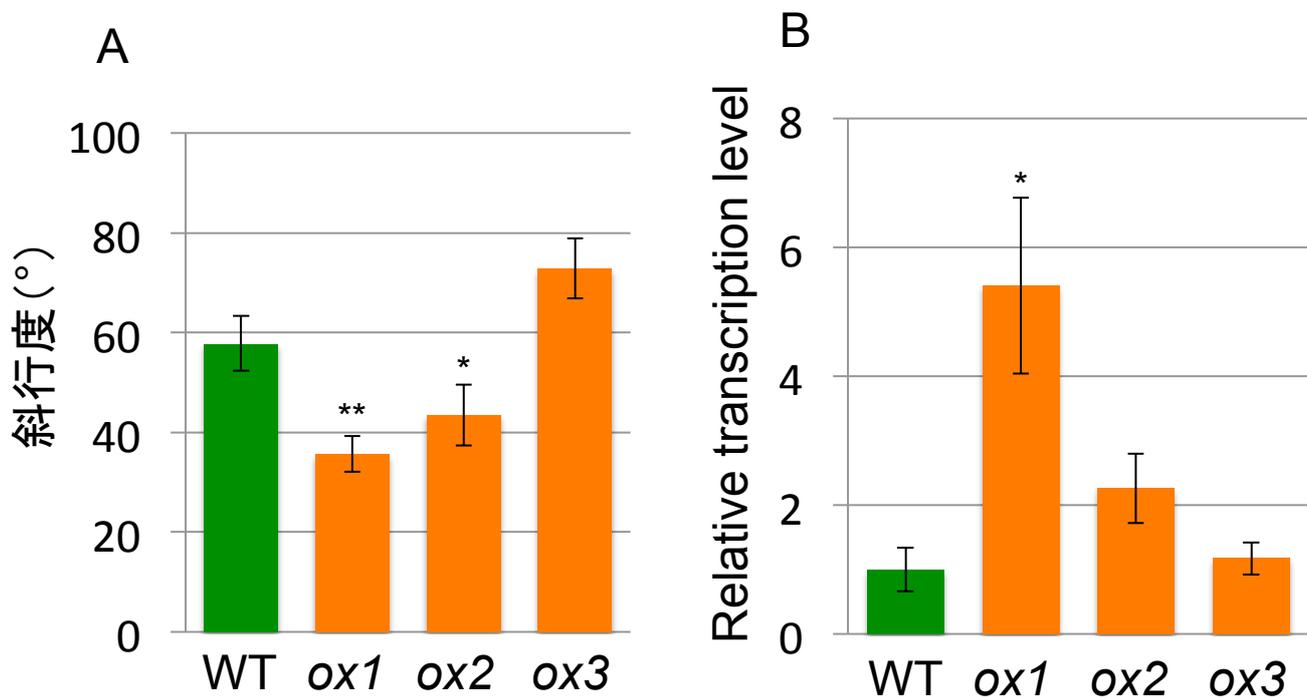
図3-1. FOXラインからの*rai5-D*の取得

- A. AOPP (30  $\mu$ M) 処理時の野生型株及び*rai5-D*の形態  
(明所6日目 bar=1 cm)
- B. 主根斜行度を指標とした*rai5-D*のAOPP抵抗性  
(明所6日目 n=10 bar=S.E. \*\*= $p<0.01$ )
- C. *rai5-D*における原因遺伝子候補AT4G23400の発現量  
(明所6日目 n=3 bar= S.E. \*\*= $p<0.01$ )

### 3-2. *rai5-D* の原因遺伝子の同定

*rai5-D* の AOPP 抵抗性を引き起こした原因遺伝子の同定のため、AT4G23400 の cDNA を CaMV::35S プロモーター下に組み込んだベクターを野生型株に形質転換することにより、AT4G23400 を高発現させた過剰発現体 (*RAI5-ox*) を作出し、*rai5-D* で観察された AOPP 抵抗性の再現性について検討した。結果、発現量に比例して AOPP 抵抗性が高まることから (図 3-2)、AT4G23400 がコードする遺伝子である *PIP1D* (*plasma membrane intrinsic protein 1D*) が原因遺伝子であると断定した。以下 PIP ファミリーに関して説明する。

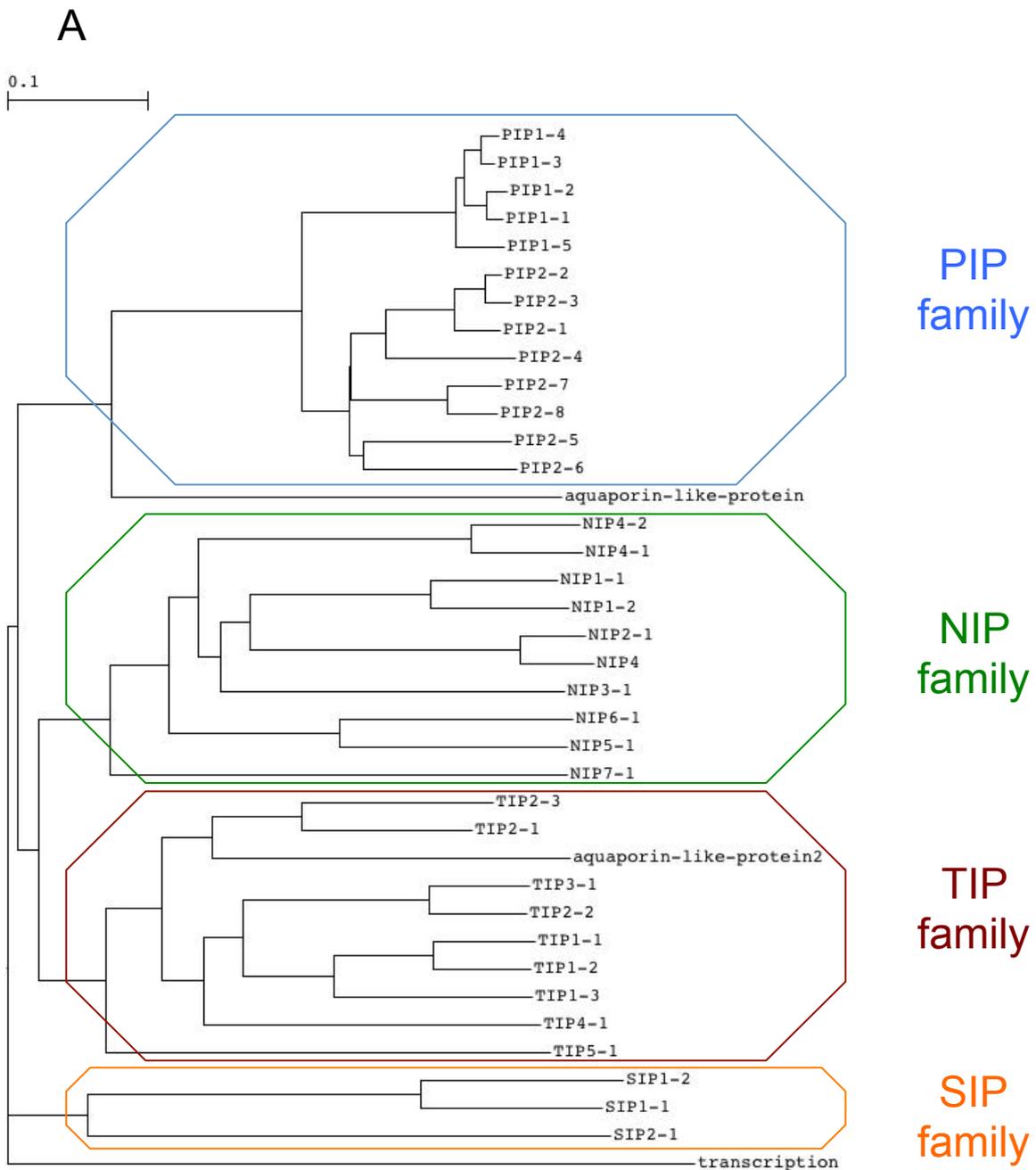
PIP はアクアポリンの一種でありシロイヌナズナにおいては 35 個のホモログを有し、配列情報によって大きく 4 つのグループ (MIP : major intrinsic protein, TIP : tonoplast intrinsic protein, NIP : NOD26-like intrinsic protein, PIP) に分類される (図 3-3)。PIP は更に 2 つのグループに分類され、それぞれ PIP1、PIP2 と呼ばれている。PIP はホモまたはヘテロの 4 量体を形成し水輸送を行うと考えられている (Tyerman et al., 1999)。アフリカツメガエル卵母細胞を用いた試験により PIP2 は単独でも高い水の輸送機能を持つが、PIP1 は単独では PIP2 と比較して著しく低い水の輸送能を示すことが報告されており (Johansson et al., 1998)、PIP1 は PIP2 の補助的な役割をとって機能しているものと推測されている。また、PIP の過剰発現による乾燥耐性や低温耐性の付与が報告されている (Jang et al., 2004; Matsumoto et al., 2009) こともあり、遺伝子の応用性も期待できる。オーキシンと PIP ファミリーとの関連についての報告は長い間無かったが、最近になって PIP2:1 が細胞の膨圧を調節することによって側根形成時におけるオーキシン



**図3-2. RAI5-ox形質転換体のAOPP抵抗性**

A. 主根斜行度を指標としたRAI5-oxのAOPP抵抗性  
(n=12 bar=S.E. \*= $p < 0.05$  \*\*= $p < 0.01$ )

B. RAI5-oxにおけるRAI5の発現量(n=3 bar=S.E. \*= $p < 0.05$ )



**図3-3. シロイヌナズナにおけるアクアポリンの系統樹**

A. NCBI BLASTを用いたシロイヌナズナにおけるアクアポリンの系統樹 (GENETYX-TREEにより整形)

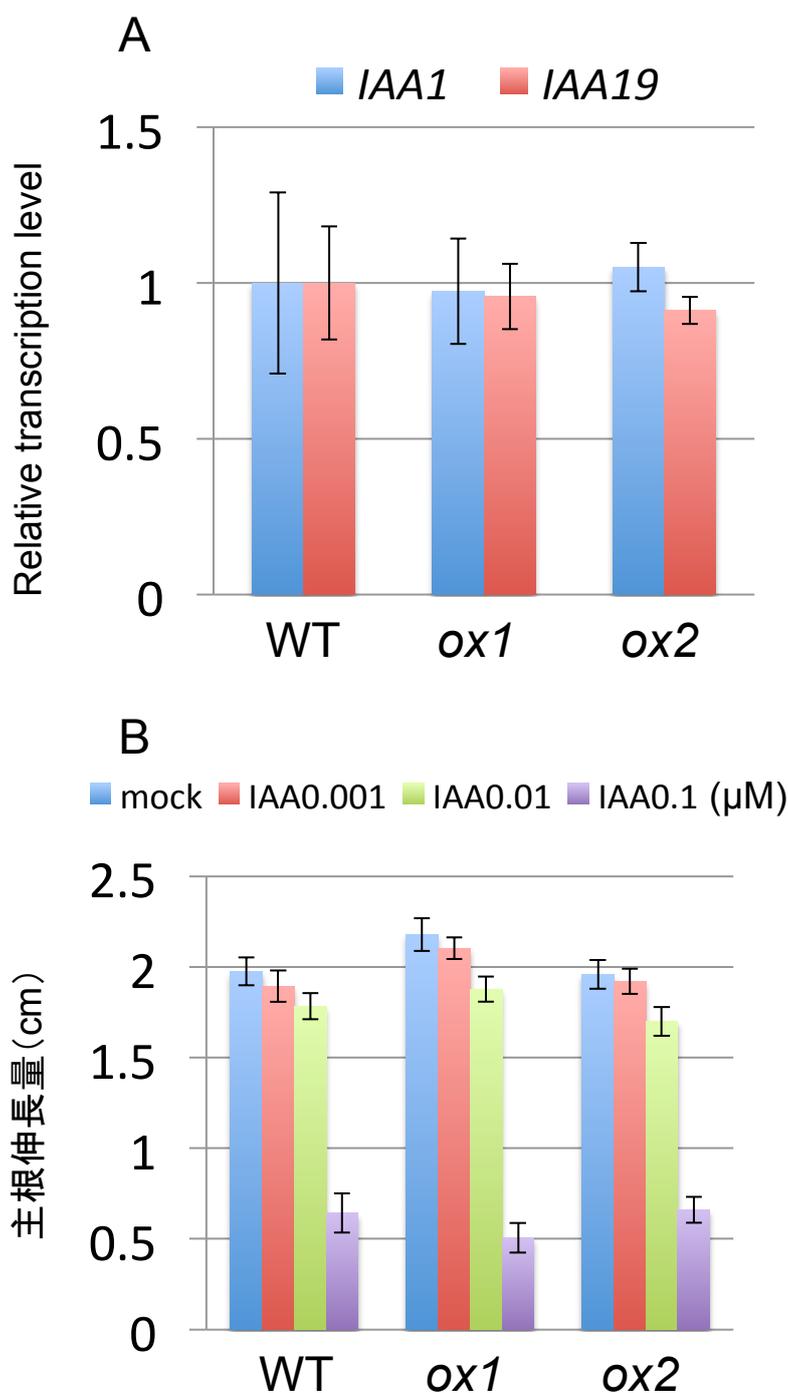
ンの蓄積に関与していることが報告された (Peret et al., 2012)。本研究においては植物形態形成に重要な因子であるアクアポリンとオーキシンとの関わりの解明を目指して、各種形質転換体を作成しその性状解析を行った。

### 3-3. *RAI5-ox* の IAA 応答性遺伝子発現量の測定及び IAA 応答性の観察

*RAI5-ox* における AOPP 抵抗性が *rail* のような恒常的な IAA シグナル過剰によって引き起こされている可能性について調べるため、*RAI5-ox* における IAA 応答性遺伝子発現量を調べた。しかし、野生型株と比較した場合でも、IAA 応答性遺伝子である IAA1 及び IAA19 の *RAI5-ox* における発現変動は観察されなかった (図 3-4 A)。また、IAA 処理時における根の伸長抑制も、野生型株の場合と同様に観察された (図 3-4 B)。以上の結果より、*RAI5-ox* は IAA シグナル伝達の恒常的な過剰発現や、過敏な IAA 応答性を示す変異体ではないことが示唆された。

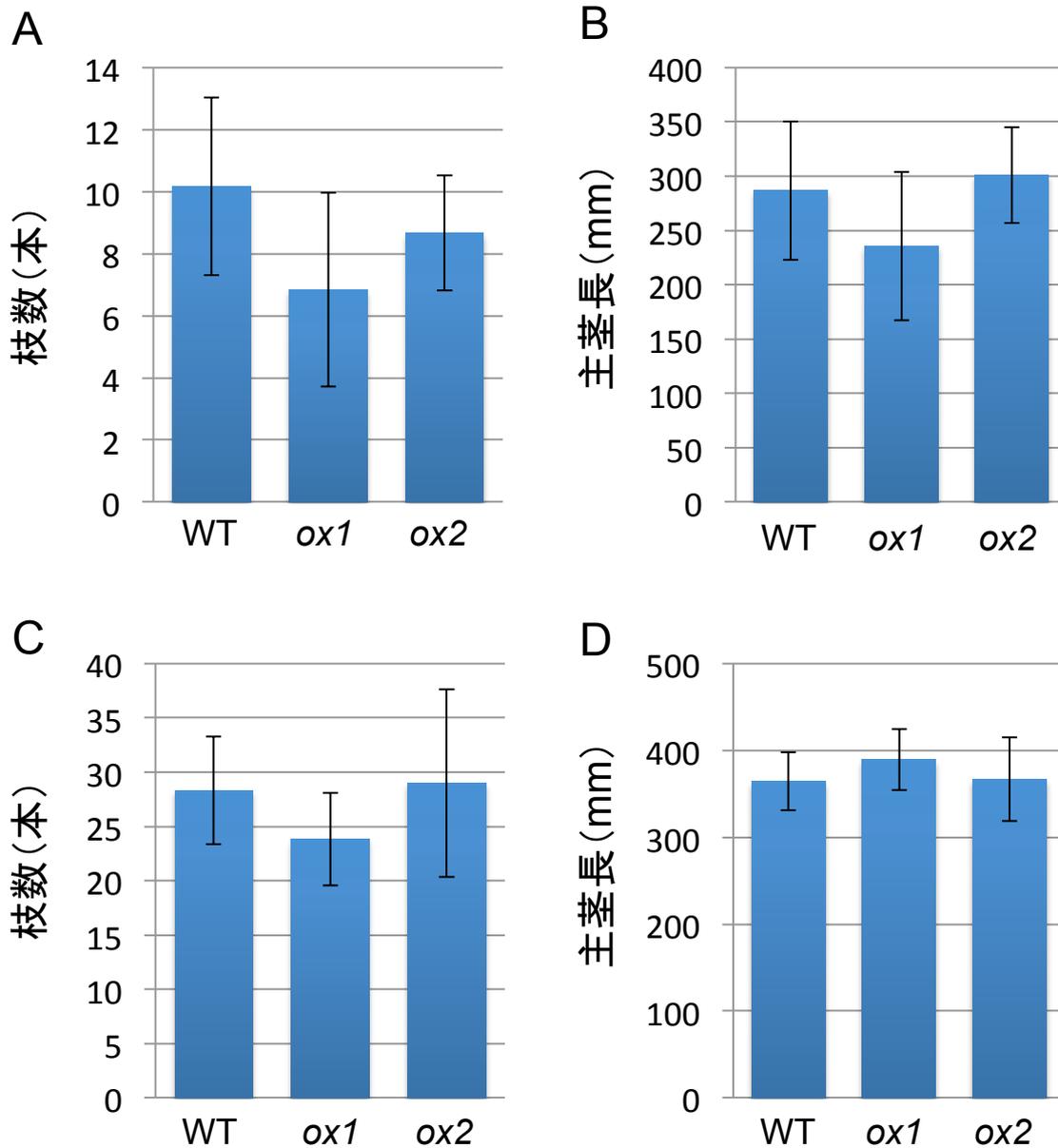
### 3-4. *RAI5-ox* の成熟形態観察

*RAI5-ox* が AOPP 抵抗性を示すことは判明したが、さらに *RAI5-ox* 成熟形態における茎の形態観察を行った。茎の形態に関しては、枝数及び主茎長に野生型株との差異は見られなかった (図 3-5)。これらの形態的特徴も *RAI5-ox* が恒常的な IAA シグナル過剰変異体とは異なる性質を有していることを示唆している。



**図3-4. *RAI5-ox*ラインのIAA応答性遺伝子発現量及びIAA処理による主根伸長量減少の観察**

- A. *RAI5-ox*のIAA応答性遺伝子発現量(明所6日目 n=3 bar=S.E.)  
 B. *RAI5-ox*のIAA処理による主根伸長量(明所6日目 n=8 bar=S.E.)



**図3-5. *RAI5-ox*の成熟茎の形態観察**

A-D. *RAI5-ox*の枝数及び主茎長の測定  
 (A, B 明所45日目 C, D 明所75日目 n=6 bar=S.E.)

### 3-5. RAI5 の細胞内局在観察

*RAI5-ox* における AOPP 抵抗性の機構を推測する為に、RAI5 の cDNA に GFP を繋ぎ CaMV::35S プロモーター下で過剰発現させた 35S::*RAI5-GFP* 形質転換体を作成し、RAI5 の細胞内局在を観察した。結果、細胞膜を染色する FM4 と共局在を示したことから、予想通りに細胞膜に局在していることが判明した (図 3-6 A-C)。一方で、根端付近の蛍光は 35S でドライブしているにもかかわらず根の上部に比べて弱い (図 3-6 D)。そこで根端の中央の縦断面を観察したところ、GFP 蛍光を示す細胞と示さない細胞の存在が確認できた。主に維管束と皮層細胞で発現が見られ、内皮細胞と内鞘細胞にも弱いながら発現が見られた一方、表皮細胞ではほぼ発現が見られなかった (図 3-7 C)。更に中央縦断面からやや上部に移行し皮層細胞に焦点を当てた結果、皮層細胞においては膜の上下において強い蛍光が観察されることが判明した (図 3-7 A, B)。一方で既知のオーキシン輸送体である PIN1 は維管束細胞の下部に局在し、PIN2 は皮層細胞と内皮細胞の上部に局在することが知られている (図 3-7 D, E)。RAI5 と PIN ファミリーの関連は不明であるが、細胞内で方向性を持った局在を示すこと、及び蛍光が観察される細胞に特徴的なパターンがあることなどの類似点があることが判明した。

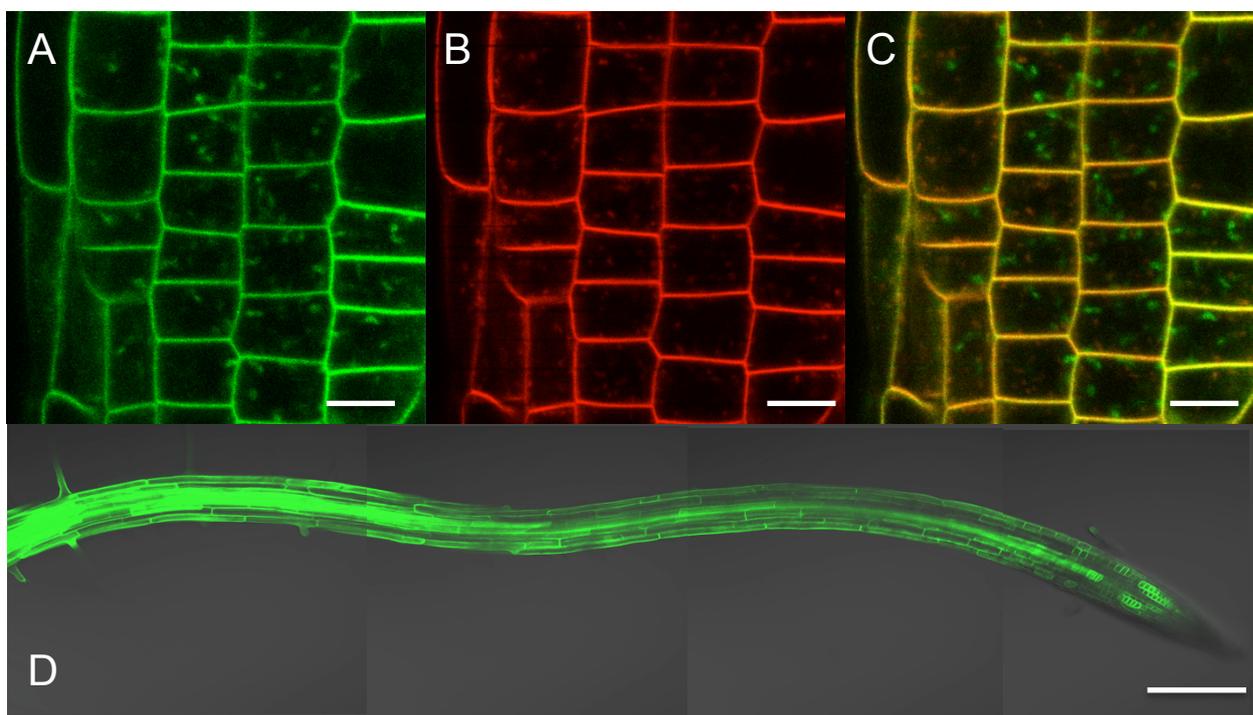


図3-6. 35S::*RAI5-GFP*の共焦点顕微鏡による局在観察

A-C. FM4処理によるRAI5-GFPの細胞膜局在の確認

A. 35S::*RAI5-GFP* B. FM4 C. merged (明所4日目 bar=10  $\mu\text{m}$ )

D. 35S::*RAI5-GFP*の根端の蛍光の弱化(明所4日目 bar=100  $\mu\text{m}$ )

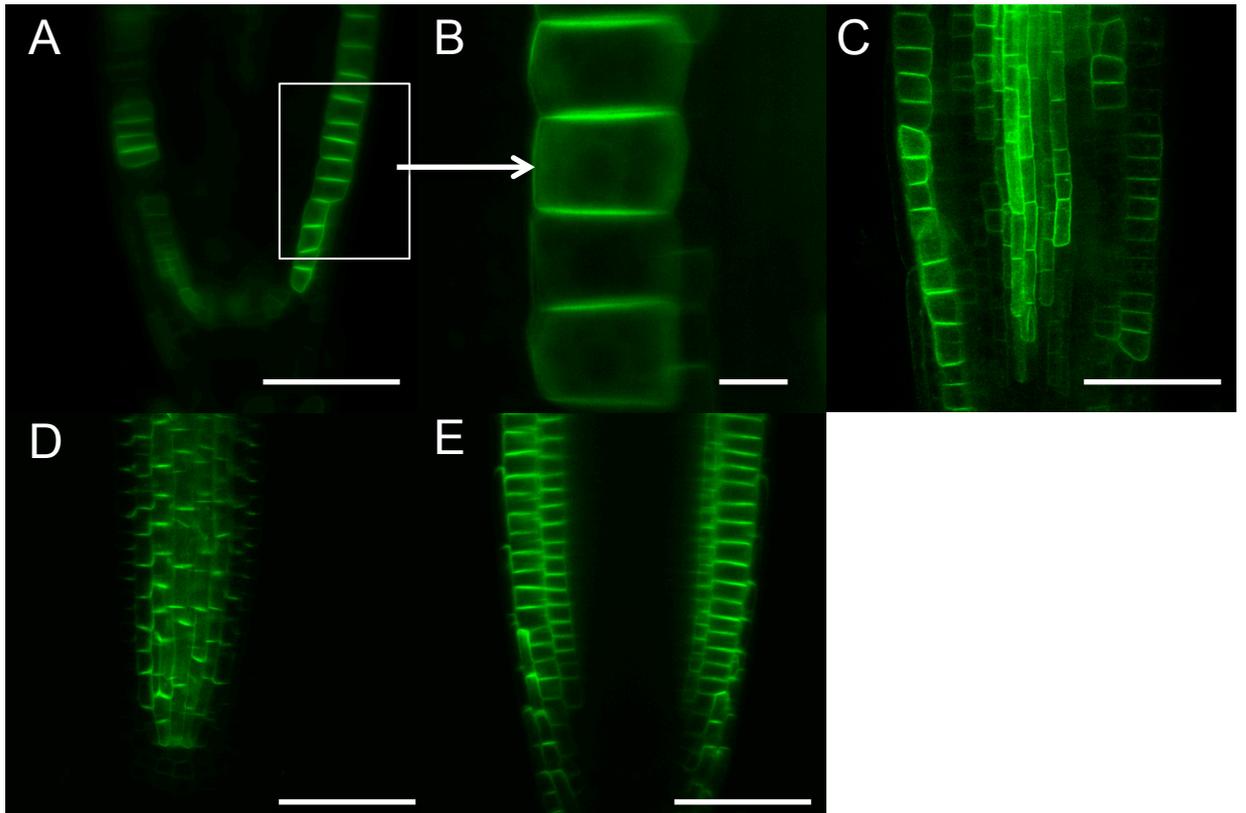
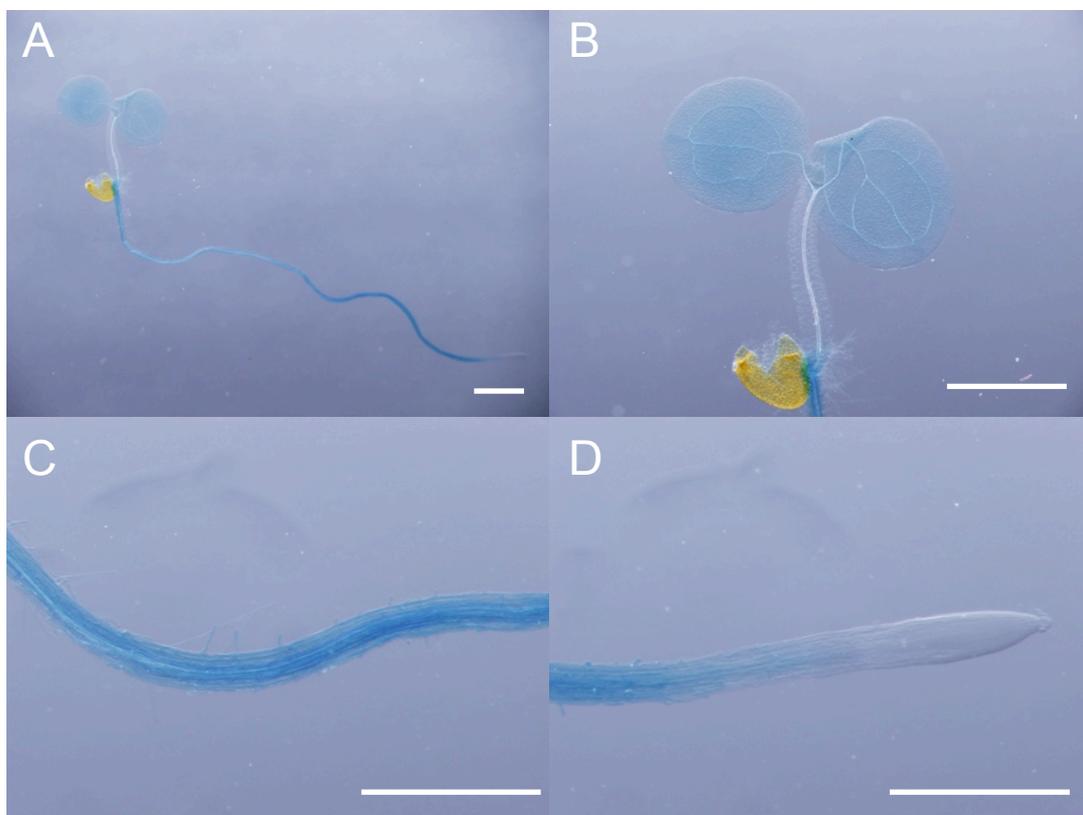


図3-7. 根端部における35S::*RAI5-GFP*の発現と  
PIN1-GFP及びPIN2-GFPとの比較

- A. 皮層細胞におけるRAI5-GFPの上下方向への局在
  - B. 図Aの白枠の拡大図
  - C. 根先端の中央縦断面における35S::*RAI5-GFP*の局在
  - D. 根先端の中央縦断面におけるPIN1-GFPの局在
  - E. 根先端の中央縦断面におけるPIN2-GFPの局在
- (明所4日目 図A, C, D, Eのbar=50 μm 図Bのbar=10 μm)

### 3-6. RAI5 の発現部位観察

RAI5 のオーキシンとの関わりを推定する為に、RAI5 のプロモーター領域に GUS を繋いだ *RAI5-GUS* 形質転換体を作成し、幼植物体における RAI5 の局在を観察するとともに、オーキシン応答性遺伝子 *DR5* のプロモーター領域に GUS を繋いだ *DR5-GUS* 遺伝子を形質転換して導入した植物体との発現パターンの比較を行った。*RAI5* は主に幼植物体の時期においては根の全体において発現が見られた (図 3-8)。この発現パターンを *DR5-GUS* の発現パターンと比較したところ、*DR5-GUS* が根端や側根の発生時において強く発現する一方で、*RAI5* はそれらの部位において発現していないなど、両者は根において逆の発現パターンを示すことが判明した (図 3-9)。また、外生 IAA 処理によって根端前部位の発現が誘導されることも判明した (図 3-10)。



**図3-8. 幼植物体におけるRAI5-GUSの観察**

- A-D. 幼植物体のRAI5-GUS観察(明所4日目)
- A. 植物体全体 (bar=1 mm)
  - B. 葉、胚軸、根上部 (bar=1 mm)
  - C. 根中央部 (bar=500  $\mu$ m)
  - D. 根端 (bar=500  $\mu$ m)

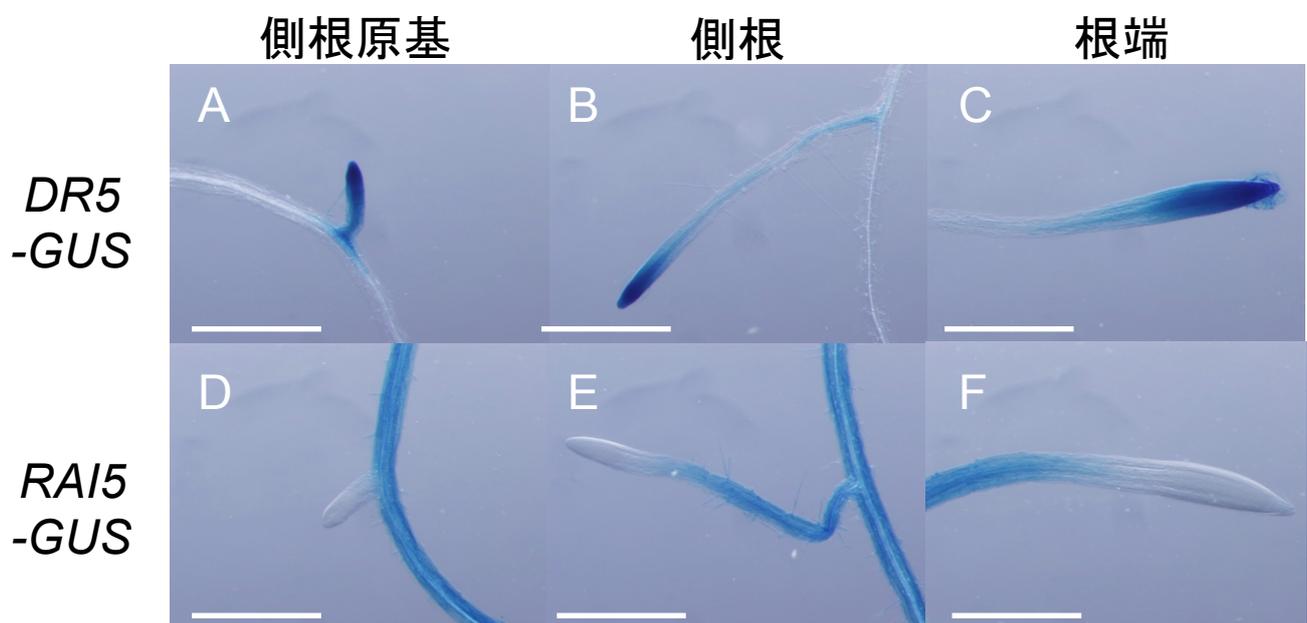
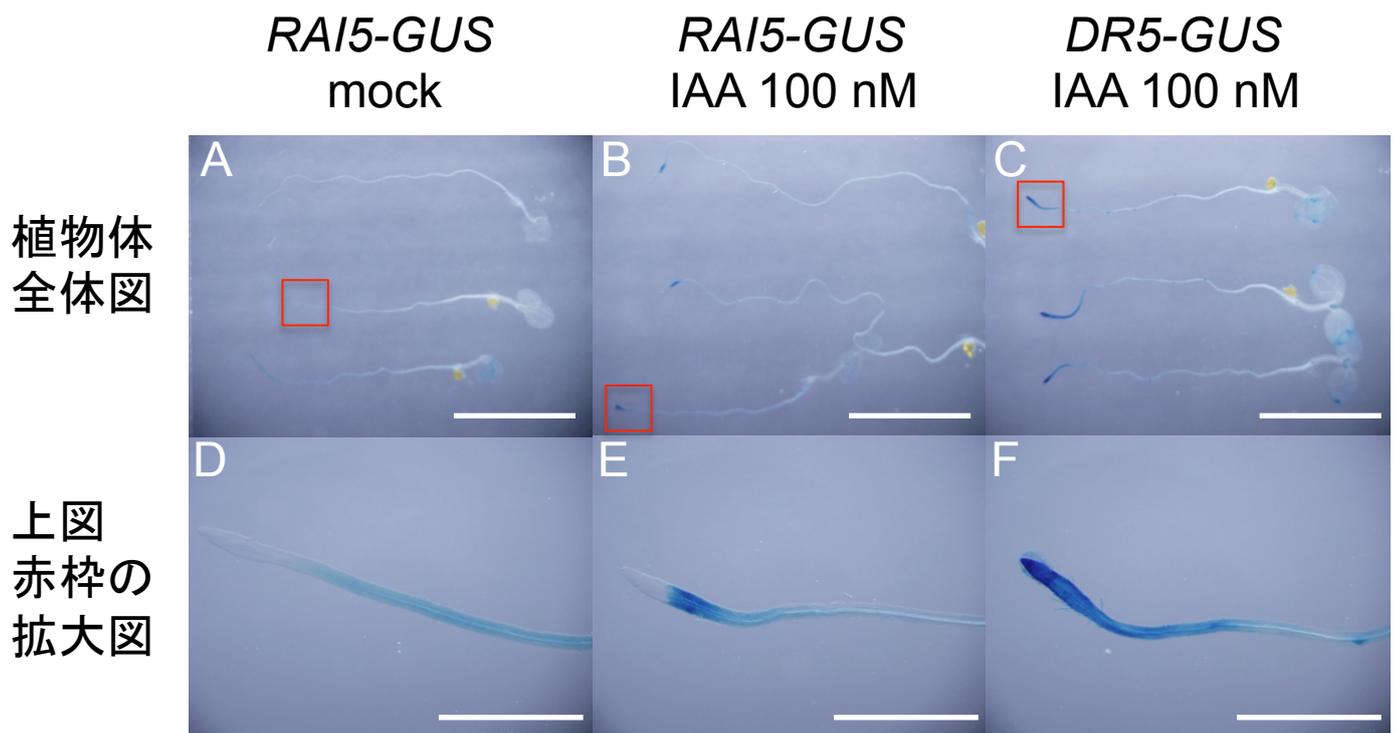


図3-9. RAI5-GUSとDR5-GUSの比較

A-F. 幼植物体におけるRAI5-GUSとDR5-GUSの発現比較  
(明所8日目 bar=500 μm)

A-C. *DR5-GUS* D-F. *RAI5-GUS*

A, D. 側根原基 B, E. 側根 C, F. 主根根端



**図3-10. IAA処理によるRAI5-GUSの発現誘導**

A-F. IAA100 nM処理によるRAI5-GUSとDR5-GUSの発現誘導  
(明所4日目の植物体を24時間薬剤処理)

A-C. 植物体全体 (bar=5 mm)

D-F. A-Cの赤枠部の拡大 (bar=1 mm)

A, D. *RAI5-GUS*のIAA未処理

B, E. *RAI5-GUS*のIAA100 nM処理

C, F. *DR5-GUS*のIAA100 nM処理

### 第3章考察

本章においては、FOX ラインを利用し新たなオーキシン機能に関連した変異体の取得を目指した。結果としてアクアポリンである *PIP1D* をコードする *rai5-D* 変異体を選抜し、*PIP1D* 過剰発現体の作出から *rai5-D* の原因遺伝子が *PIP1D* であることを同定した。ではこの遺伝子はどのような機構により AOPP 耐性を示したのだろうか。単純な予想としては *rai1* のように *RAI5* の過剰発現が恒常的なオーキシシグナル過剰を引き起こしたことが原因として挙げられる。しかしながらオーキシン応答性遺伝子の発現量や IAA 投与による主根伸長抑制効果に関しては、*RAI5-ox* は野生型と比較して変化が見られなかった。また成熟形態の主茎長や枝数においても野生型株との差異は認められなかったことから、*RAI5-ox* がオーキシシグナルを恒常的に上昇させている可能性は低いと考えられる。

次に予想されるのはオーキシン輸送機能の変化である。オーキシンの極性輸送は上述の通り主に取り込みキャリアの AUX 及び LAX ファミリーと排出キャリアの PIN ファミリーによって環境に応じた厳密な制御を受けている。ここで *RAI5* と *PIN1*, *PIN2* の GFP 蛍光パターンを比較すると、細胞内局在はオーキシン輸送キャリアである *PIN* のような上下方向への局在を示し、また局在する細胞においても維管束と皮層細胞に偏るという特徴的なパターンが観察された。*RAI5* のプロモーター下で発現させた *RAI5-GFP* 形質転換ラインは根端付近の蛍光が非常に弱く、蛍光の局在が観察できなかった。通常発現状態における根端付近の *RAI5* の挙動は不明であるが、*CaMV::35S* プロモーターで繋いだ *35S::RAI5-GFP* 形質転換ラインにおいては根端部分の蛍光が消失する細胞が見られたことから、恐らく根端における *RAI5* は転写後の制御を受けることにより

厳密な細胞毎の局在を本来は示していると考えられる。また、RAI5-GUS の発現パターンを観察したところ、RAI5 の発現が弱い部位とオーキシシンが局在する部位が共通することから、RAI5 は PIN のようなオーキシシンの排出的輸送に関わる可能性があると考えた。以上をまとめると、RAI5 過剰発現体の IAA 生合成阻害剤に対する耐性は、減少したオーキシシンシグナル条件下において輸送機能が直接的もしくは間接的に亢進することによりオーキシシンが根端に集積した結果重力屈性の回復が見られた可能性があると考えた。今後は RAI5 過剰発現体のオーキシシンの輸送能力や、RAI5 単独でのオーキシシン輸送活性の測定を行うことで、RAI5 の機能そして阻害剤抵抗性を示す機構について解明していきたいと考えている。

### 3章 実験方法

#### 1. シロイヌナズナの形質転換

形質転換体作出のためのベクターは全て Gateway vector system (Invitrogen) を用いて行った。目的配列を KOD-Plus Neo (TOYOBO) で増幅後、pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit によってエントリーベクターに挿入し、その後 Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix によって発現用のベクターへと移し替えた。アガロースゲルからの PCR 産物の精製には Gel extraction kit (Qiagen) を、大腸菌からのプラスミド抽出は Fastgene plasmid mini kit (Genetics) を用いてプロトコール通り行った。得られた発現用ベクターをアグロバクテリウム法によって植物体に導入し、形質転換種子を km を含む MS 培地で選抜した。

#### 【KOD-Plus neo を用いた遺伝子増幅】

各種テンプレートと Premix を混合し、転倒混和後、PCR により増幅した。

##### <Premix>

25 mM MgSO <sub>4</sub>	3 μL
2 mM dNTP	5 μL
10×PCR buffer	5 μL
DMSO	1 μL
Forward / Reverse primer (100 μM)	0.2 μL each
KOD-Plus neo	1 μL
dH <sub>2</sub> O	33.6 μL

計 49 μL にテンプレートを 1 μL 加えて PCR 反応を行った。増幅しにくい配列に対しては 25mM MgSO<sub>4</sub> の添加量を増やして PCR を行った。

##### <PCR cycle>

94°C 2分	1 cycle
98°C 10秒	
53°C 30秒	
68°C 1分/1kb	35 cycle
72°C 5分	1 cycle

増幅が見られない場合はアニーリングの温度 (53°C) をサンプル毎に 49°C~68°C までグラジエントをかけて PCR を行った。

<使用 primer>

name	forward primer	reverse primer
<i>ownETO1</i>	CACCTGATGGAATCCACTCTTCTTC	CTACTTTTCCTCGTTTGGTTC
<i>RAI5-ox</i>	CACCATGGAAGGCAAAGAAGAAGAC	TTATGTCTTGGACTTGAAAGG
RAI5-GFP	CACCATGGAAGGCAAAGAAGAAGAC	TGTCTTGGACTTGAAAGGAAT
RAI5-GUS	CACCGCCCATATGTAGATGCTAAAG	GTTTCTCTCTCACTCTATCAC

*RAI5-ox* 及び RAI5-GFP のクローニングには WT の cDNA を、*ownETO1* 及び RAI5-GUS のクローニングには WT の gDNA をテンプレートとして用いた。

#### 【エントリーベクターの作成】

PCR 産物を premix と混合し 5 分間常温で静置後、コンピテントセルである One Shot TOP10 (invitrogen) に全量を加えてタッピングし、15 分間氷上に置いた。その後 42°C で 30 秒間処理し、すぐさま氷上で 2 分間置いた後、SOC 液体培地を 125 µL 加え、37°C で 1 時間インキュベートし、km50 µM の LB プレートに全量を撒いて、乾燥後 37°C で一晩培養した。形成されたコロニーを PCR でバンドを確認し、目的サイズのバンドが得られたコロニーを液体培養し、プラスミド抽出を行った後、挿入配列の確認をシーケンサーを用いて行った。

<LB 培地>

bacto tryptone	10 g
yeast extract	5 g
NaCl	10 g
dH2O	1 L

pH 調製は行わず、オートクレーブして保存した。固形培地の際は bacto agar を 15 g 加えた。

#### 【発現用ベクターの作成】

TE buffer (pH8.0) にエントリーベクター溶液 1.3  $\mu$ L と発現用ベクター溶液 1.3  $\mu$ L を加え、Topoisomerase I (Invitrogen) を 0.5  $\mu$ L 加え混ぜ合わせた後氷上に静置した。この混合液に LR Clonase II (Invitrogen) を加え混合し、転倒混和後 25°C で 3 時間インキュベートした。proteasome K (Invitrogen) を 0.5  $\mu$ L 加えて 37°C で 10 分間静置し反応を停止させた後、溶液をコンピテントセルである DH5  $\alpha$  に 1  $\mu$ L 加えタッピングで混ぜ、氷上で 30 分静置後 42°C で 30 分処理し、また氷上で 2 分静置した。その後 SOC 培地を 110  $\mu$ L 加えて 37°C で 1 時間インキュベート後 Km50  $\mu$ M 及び Hyg50  $\mu$ M を含む培地に全量撒いて乾燥後、37°C で一晩インキュベートした。形成されたコロニーを PCR でバンドを確認し、目的サイズのバンドが得られたコロニーを液体培養しプラスミド抽出を行った後、挿入配列をシーケンサーで確認した。

<使用した発現用ベクター>

name	gateway vector
own <i>ETO1</i>	pGWB1
<i>RAI5-ox</i>	pGWB2
RAI5-GFP	pGWB5
RAI5-GUS	pGWB4

【アグロバクテリウム法による植物への形質転換】

アグロバクテリウムに発現用ベクターを挿入後、Floral dip 法によってアグロバクテリウムを植物体に感染させて植物体に発現用ベクターを導入した。以下に具体的な手順を記す。

発現用ベクター溶液 1  $\mu$ L とコンピテントセル化したアグロバクテリウム溶液 200  $\mu$ L を混ぜ合わせ 30 分間氷上で静置した後、液体窒素に 1 分間浸して氷上に戻し、37°C で 1 分間処理した。その後 YEP 培地を 1  $\mu$ L 加えて 28°C で 3 時間インキュベートし、13000 rpm で 1 分遠心して集菌した。上澄 1 mL を捨てて再懸濁し、km50  $\mu$ g/mL、Hyg50  $\mu$ g/mL、Rif100  $\mu$ g/mL を含む YEP プレートに撒いて乾燥後、28°C で 2~3 日間培養した。形成されたコロニーから 8 個選んで 28°C で一晩震盪培養し、PCR でバンドが確認されたコロニーの培養液各 1 mL を YEP 液体培地 500mL に加え、28°C で 12~14 時間震盪培養した。培養液を 5000 rpm で 10 分間遠心した後上澄を捨て、MES バッファーを 300 mL 加えて震盪し沈殿物を溶かした後、溶液をビーカーに移してシロイヌナズナを溶液に約 20 分間浸した。浸漬したシロイヌナズナはラップを被せて 1 日保湿した。形成された種子

を km25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  含有 MS 培地で選抜し、形質転換種子 F1 世代とした。

<MES buffer>

Murashige & Skoog medium (Duchefa)	4.4 g
スクロース	100 g
dH <sub>2</sub> O	2 L

pH を 5.7 に調整後、オートクレーブして保存した。使用の際には 1mg/ml BAP を 20  $\mu\text{L}/\text{L}$ 、Silwet を 50  $\mu\text{L}/\text{L}$  加えて使用した。

<YEP 培地>

Yeast Extract	10 g
Peptone	10 g
NaCl	5 g
dH <sub>2</sub> O	1 L

pH を 7.0 に調整後、オートクレーブして保存した。固形培地の場合は pH 調整後 bacto agar を 15 g 加えた。

2. 遺伝子発現量測定

RNA 抽出は RNeasy Plant mini kit (QIAGEN) 及び RNA 抽出機である QIAcube を用いて抽出した。それ以降の逆転写及びリアルタイム PCR による発現量測定は 2 章と同様の方法で行った。以下 RNA 抽出手順について記す。

ジルコニアビーズ ( $\phi 2.3$  を 6~8 個、 $\phi 5$  を 2 個) と植物体をチューブに入れ液体窒素で凍結後、Bead crusher (TAITEC) を用いて 3600 回/分、10 秒間で破碎し、1%のメルカプトエタノールを含む RLT buffer を 500  $\mu\text{L}$  加えてボルテックスした。その後 8000 rpm で 15 分間遠心し、上澄 450  $\mu\text{L}$  を分取し、RNA 抽出機 QIAcube にサンプルをセットして抽出を行った。

<使用プライマー>

IAA1	GATTACCCGGAGCACAAGAAGAA	ATCTCACTGGAGGCCATCCA
IAA19	TGAATATGACGTCGTCGGGTAGTA	CCGGCGAATCATTAACCTTCT
PIP1D	TGTTTCCTATGTCATGTGTGATG	GTACACAATGTATTCTTCCATTGAC
UBQ2	CCAAGATCCAGGACAAAGAAGGA	TGGAGACGAGCATAACACTTGC

### 3. GFP 及び GUS 形質転換植物体の観察

形質転換で得られた GUS 及び GFP ラインを顕微鏡を用いて観察した。

なお、GFP はホモ化した F3 ラインを、GUS ラインはホモ化していない F2 ラインを観察に用いた。

#### 【GFP 蛍光観察】

抗生物質を含まない 1/2MS 培地で形質転換した植物体を 4 日間生育後、LSM 700 laser scanning microscope (Zeiss) を用いて観察を行った。観察には 488nm のレーザー (GFP 蛍光用) と 555nm のレーザー (FM4 蛍光用) を用いた。

#### 【GUS 染色及び観察】

抗生物質を含まない 1/2MS 培地で形質転換した植物体を培養し、90%アセトンで固定した。リン酸バッファー (pH7.0) で洗浄し、GUS 染色液に付け込み 37°C で 2~16 時間インキュベートした。その後エタノールに 24 時間浸し脱色した後、スライドガラス上で植物体の透明化液を滴下し、観察を行った。観察には SZX16 stereoscopic microscope (Olympus) を用いた。

#### <GUS 染色液組成>

40 mg/ml X-Gluc	12.5 $\mu$ L
10 mM $K_3[Fe(CN)_6]$	50 $\mu$ L
10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$	50 $\mu$ L
0.5 M EDTA $\cdot$ 2Na	2 $\mu$ L
100mM $NaH_2PO_4$ (pH 7.0)	500 $\mu$ L
<u>dH<sub>2</sub>O</u>	<u>385.5 <math>\mu</math>L</u>

#### <透明化液の組成>

抱水クロラール	8 g
グリセロール	1 mL
<u>dH<sub>2</sub>O</u>	<u>2 mL</u>

## 第4章 新規植物生長制御剤 HJ27 の作用点探索

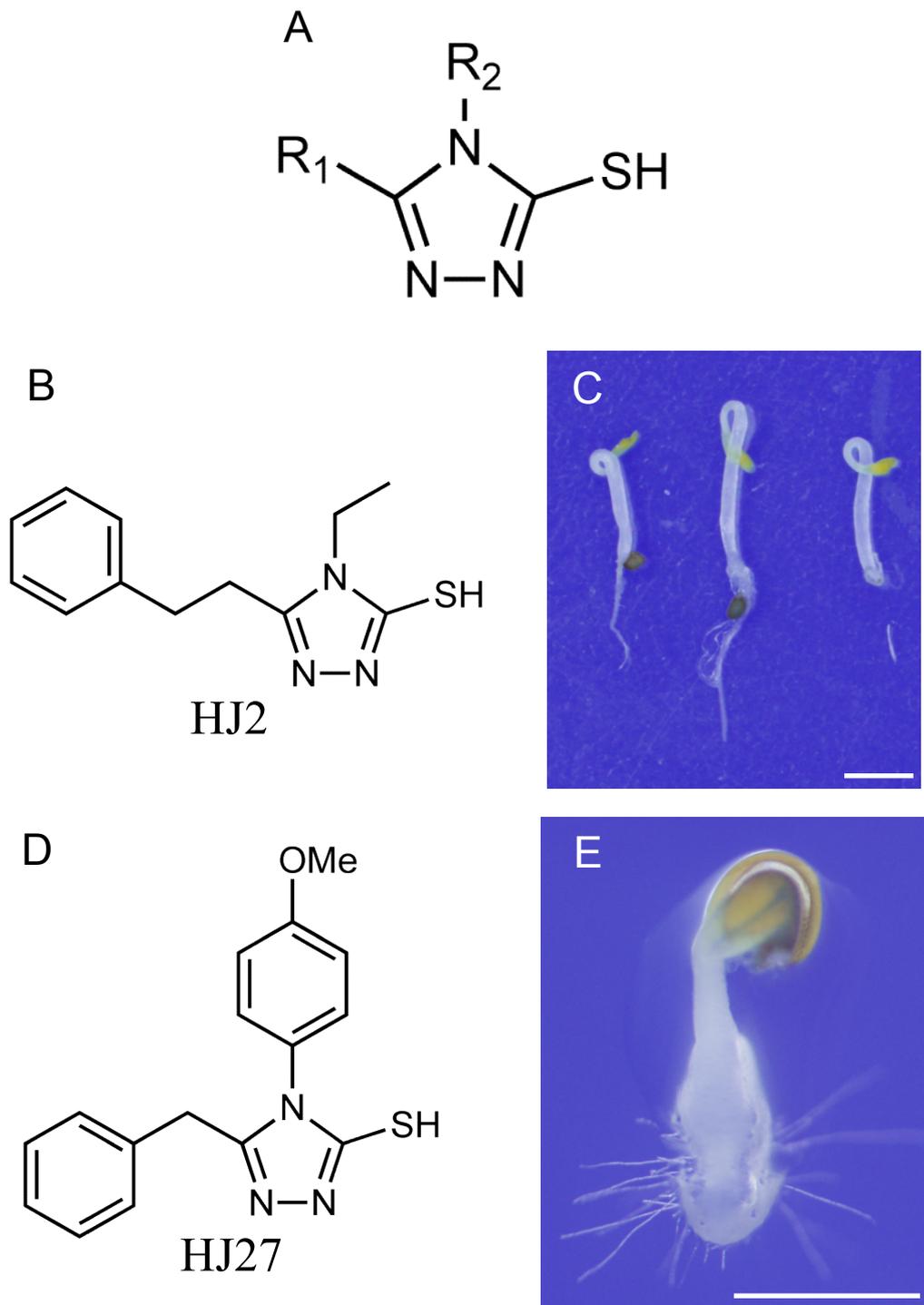
### 緒言

3章までにおいては、化合物を用いた遺伝学的手法による新規オーキシニンシグナル関連因子の発見を目的として研究を行った。本章においては、遺伝学的手法に応用可能な化合物の探索を行った過程で得られた新規植物生長制御剤 HJ27 の作用点の探索、及び機能解析結果について述べる。

植物ホルモンの生合成やシグナル伝達を制御する数多くの化合物が見出されており、それらを用いた研究により様々な植物ホルモンの受容・情報伝達機構が解明されてきた。また、見出された化合物の特異性や活性を有機化学的手法による構造展開によって上昇させることにより、農業上利用可能な化合物の開発も行われてきた。当研究室においても様々な植物ホルモン機能作動剤および機能阻害剤を報告している。本研究に先立って、ジベレリン受容体 GID1a の受容部位を標的とした阻害剤を探索するために、ジベレリンの立体構造情報を元にした *in silico* ligand-based screening を行い、受容体阻害剤候補化合物 HJ2 を約 10000 種の低分子化合物ライブラリーから見出した (図 4-1 B)。しかしながらこの化合物をシロイヌナズナに対して処理しても、ジベレリンのシグナル伝達阻害剤として期待される発芽率の減少は観察されず、また酵母ツーハイブリッド系を用いた GID1 と DELLA の相互作用を阻害する効果も観察されなかった。一方、エチレン前駆体 ACC 処理やエチレン生合成過剰変異体 *eto1* などで観察されるエチレンシグナル過剰応答である胚軸の短化、太化、フック形成が観察された (図 4-1 C)。そこで HJ2 の作用機構の追究を行ったが、エチレン生合成律速酵素 ACS に対する阻害剤である AIBA 処理では HJ2 が示すエチレン作用

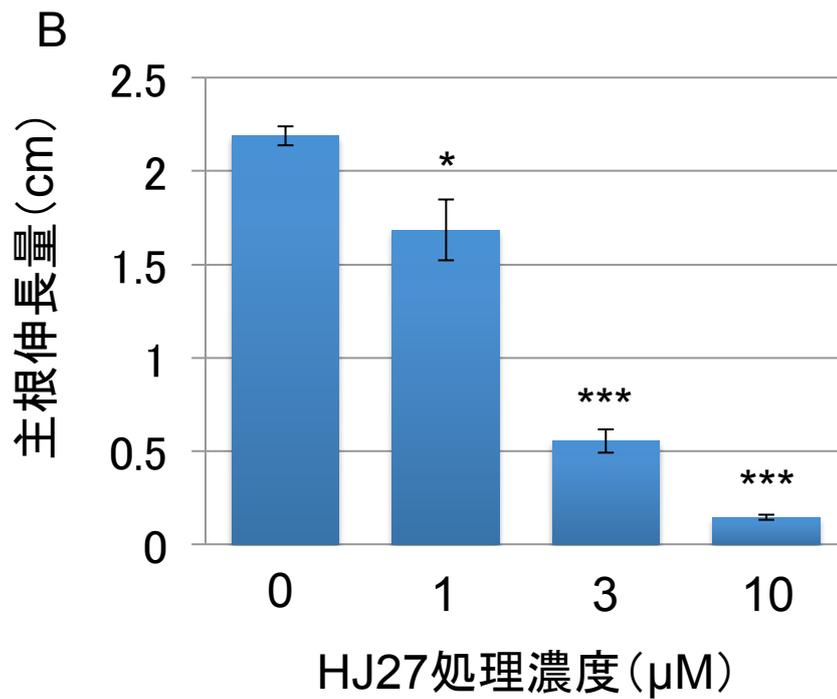
が打ち消せないこと、及びエチレン受容体の下流シグナル欠損変異体である *ein2* に対して効果を示さないことから、その間に位置するエチレン受容体に作用するのではないかと推定している。

この HJ2 のエチレン様生理活性の向上のため、HJ2 の構造展開が行われた。図 4-1A における R1 及び R2 を構造変化させていく過程で、HJ2 とは異なる形態をシロイヌナズナに誘導する化合物 HJ27 が見出された (図 4-1 D, E)。この化合物を含む培地で生育させたシロイヌナズナは暗所条件において著しい胚軸伸長阻害を示し、しかもリード化合物を含む培地で生育させたシロイヌナズナが示すエチレン誘導性形態では説明が出来ない形態を示した。また明所条件下において HJ27 濃度依存的なシロイヌナズナ主根伸長量の減少や根毛の増加が観察された (図 4-2)。これらの形態は過剰量のオーキシン処理と部分的に似ていることから、HJ27 がオーキシン活性を示す新規化合物ではないかと考え、本化合物の作用機構の解明を中心に研究を展開した。



**図4-1. HJ化合物の基本骨格とHJ2及びHJ27の構造式**

A. HJ化合物の基本骨格 B, D. HJ2及びHJ27の構造式  
 C, E. HJ2 (100  $\mu$ M) 及びHJ27 (10  $\mu$ M) 処理時の植物形態  
 (暗所3日目 bar=500  $\mu$ m)



**図4-2. HJ27処理による濃度依存的な主根伸長量の減少**

A. HJ27 (10 μM) 処理時の植物形態 (明所3日目 bar=100 μm)

B. HJ27処理時の主根伸長量

(明所6日目 n=10 bar=S.E. \*=p<0.05 \*\*\*=p<0.001)

#### 4-1. HJ27 の作用点探索-植物ホルモン関連

HJ27 の作用機構の解明を目指し、まずはオーキシンの関連を調べた。オーキシン早期応答性遺伝子である DR5 に GUS を繋いだ DR5-GUS 形質転換体に対して HJ27 処理を行ったが、HJ27 を処理しても IAA 処理した場合に強い発色として現れる応答は観察されなかった。24 時間処理した場合には、オーキシン処理の場合には観察されない根部における根毛様組織の発生や維管束組織における黄褐色物質の蓄積が観察された (図 4-3)。また、オーキシシンシグナルによって分解が誘導される Aux/IAA タンパク質のオーキシン応答性配列である DII ドメインと改変した YFP を繋いだ DII-VENUS 過剰発現体では IAA 処理に応答して DII-VENUS の分解が観察される (Brunoud et. al., 2012) が、HJ27 処理を行った場合には IAA 処理した場合に観察されるような DII-VENUS の分解は観察されなかった (図 4-4)。以上の結果より、HJ27 の作用部位は当初予想していたオーキシシンシグナル伝達系ではない可能性が強く示唆された。そこで、シロイヌナズナ幼植物体における根の形態を詳細に観察したところ、主根の伸長阻害の他に根先端にカルス状の膨らみが形成されることを見出した。組織のカルス化は、オーキシンとサイトカイニンを適切な濃度になるように調製した培地で植物を生育させることにより誘導できる。サイトカイニン単独培地ではカルス形成は誘導されず、オーキシン単独培地では細胞分裂は起こるものの正常なカルス塊は形成されない (Iwase et al., 2011)。そこで HJ27 の作用と再分化に関わる植物ホルモンであるサイトカイニンシグナルとの関連を調べた。合成オーキシ

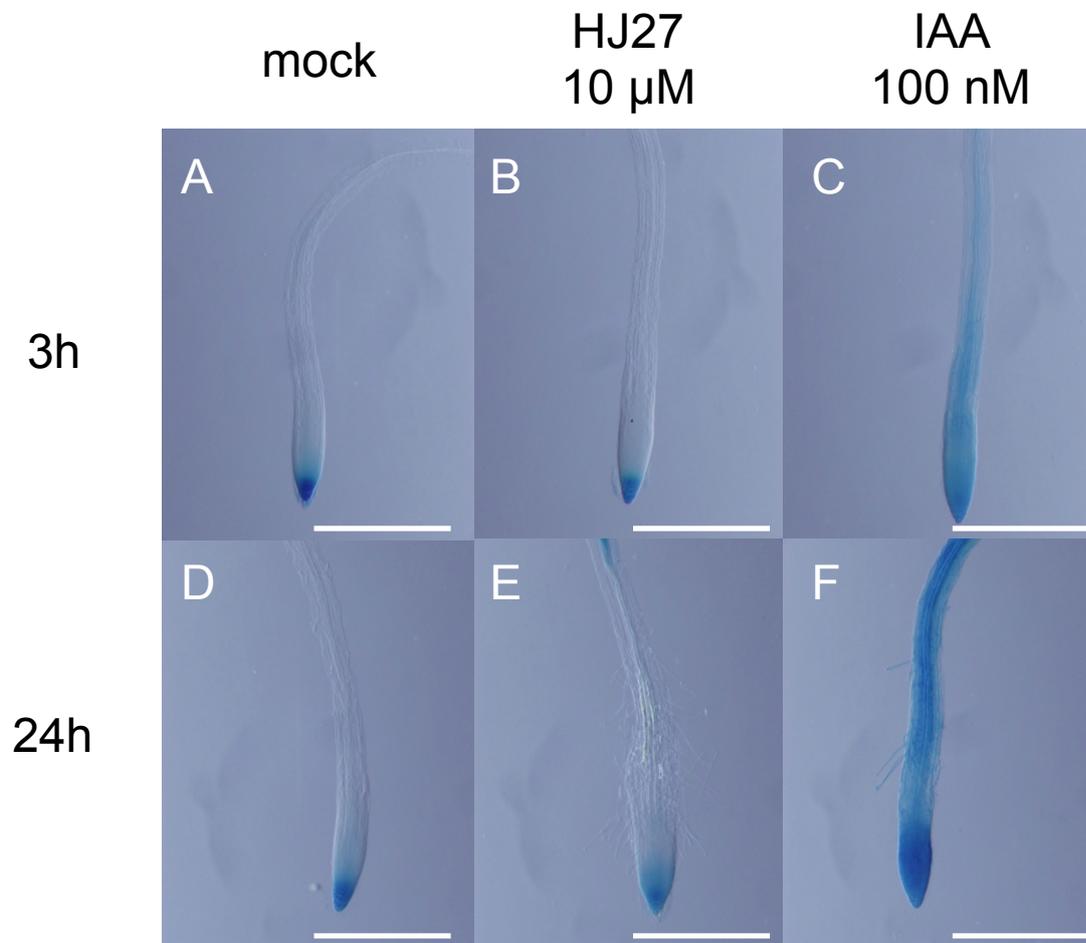


図4-3. HJ27処理に対するDR5-GUSの応答性

A-F. IAA及びHJ27処理に対するDR5-GUSの発現  
(明所4日目 bar=500  $\mu$ M)

A-C. 薬剤3時間処理 D-F. 薬剤24時間処理

A, D. mock

B, E. HJ27 10  $\mu$ M

C, F. IAA 100 nM

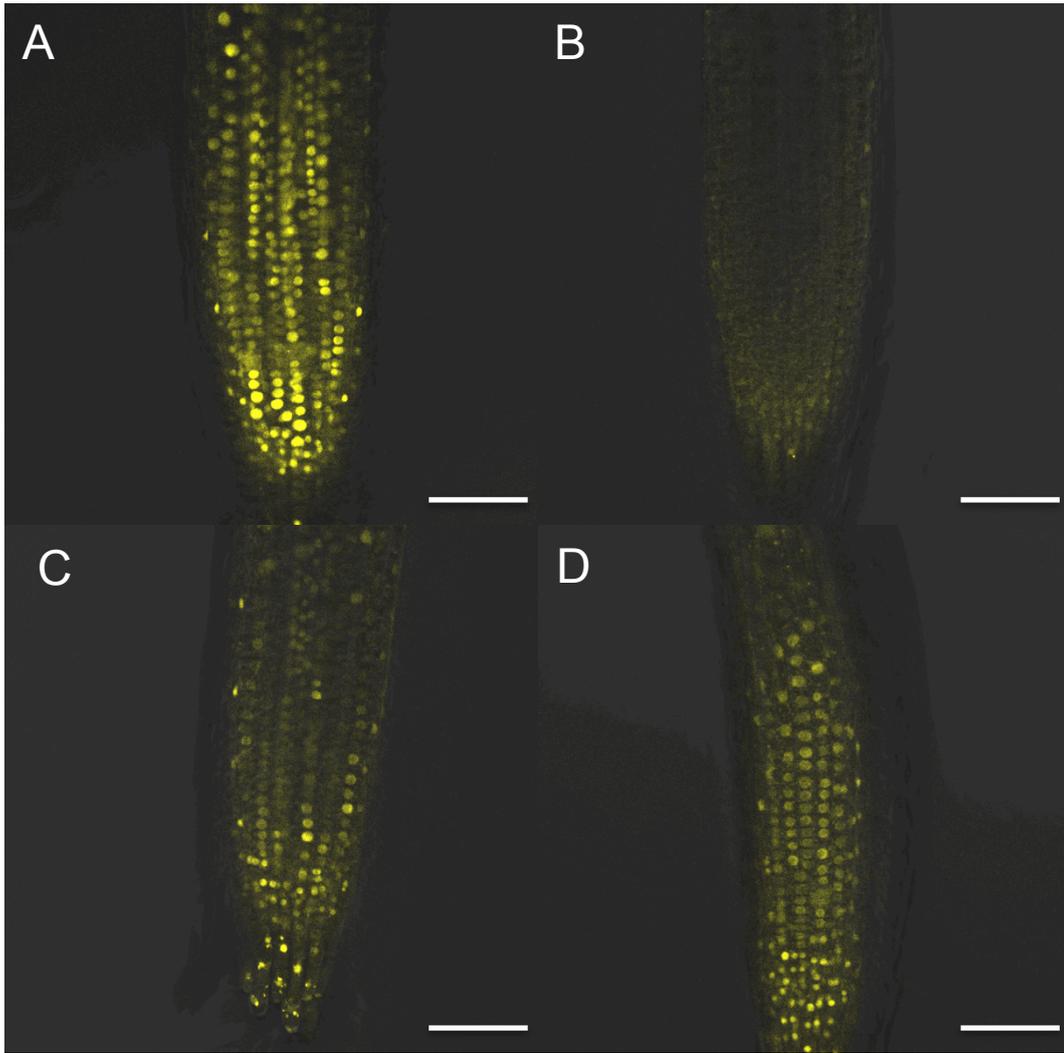


図4-4. HJ27処理時のD II -VENUSの蛍光観察

A-D. HJ27及びIAA処理時のD II -VENUS蛍光観察  
(明所4日目 bar=50  $\mu\text{m}$ )

A. mock 30min.

B. IAA 100 nM 30min.

C. HJ27 10  $\mu\text{M}$  30min.

D. HJ27 10  $\mu\text{M}$  120min.

ンである NAA の濃度を固定し、サイトカイニンの 1 種である kinetin を共処理すると、オーキシシンとサイトカイニンの共処理によってカルス形成が誘導される (図 4-5 C-E)、更に上記条件に HJ27 を加えるとカルス形成が促進される結果となった (図 4-5 H-J)。つまり HJ27 はオーキシシンとサイトカイニンによるカルス形成に対して相加的作用を示す。しかしながらオーキシシン単独処理 (図 4-5 B) と HJ27 とオーキシシンの共処理 (図 4-5 G) を比較すると、両者ともに細胞分裂は見られるものの正常なカルス形成が誘導されないことが判明した。つまり HJ27 は、カルス形成に関してオーキシシン及びサイトカイニンとの共力活性はあるものの、サイトカイニンとして働いている可能性は低いと考えた。他にも、暗所胚軸伸長の減退から HJ27 がブラシノステロイド (BR) 生合成阻害剤 Brz 様の活性を示す可能性を考え、Brz 抵抗性を示す BR シグナル過剰変異体である *bzr1/bil1* への HJ27 処理、そして、元々の活性であるエチレンシグナルとの関わりを調べるためエチレン非感受性変異体である *ein2* への処理を行った。もし HJ27 の胚軸伸長阻害活性が、BR の阻害活性もしくはエチレン様活性に起因するのであれば、これら変異体は HJ27 処理に抵抗性を示し、胚軸が伸長するはずである。しかしながら暗所胚軸伸長を指標にした形態観察において、*ein2* は 3  $\mu$ M の HJ27 に対して抵抗性を示したが 10  $\mu$ M の HJ27 に対してはどちらの変異体も明確な抵抗性応答は示さなかった (図 4-5 K)。以上より、HJ27 はこれら植物ホルモンに関わりのある活性を示す可能性あるものの、胚軸伸長阻害の原因がこれら植物ホルモン活性に由来するものではないことが示された。

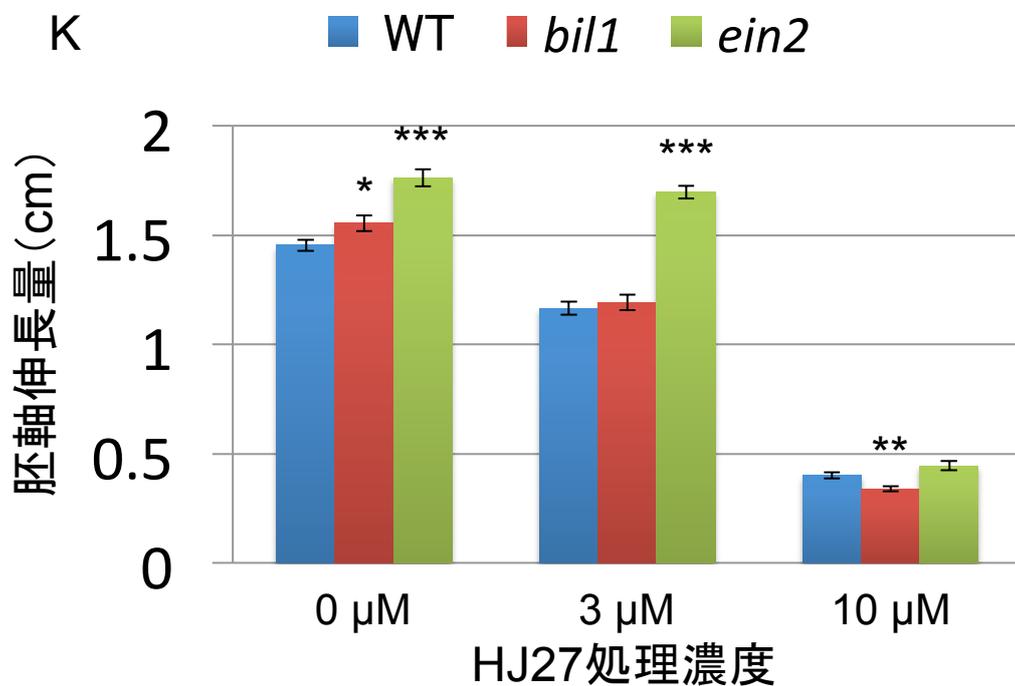
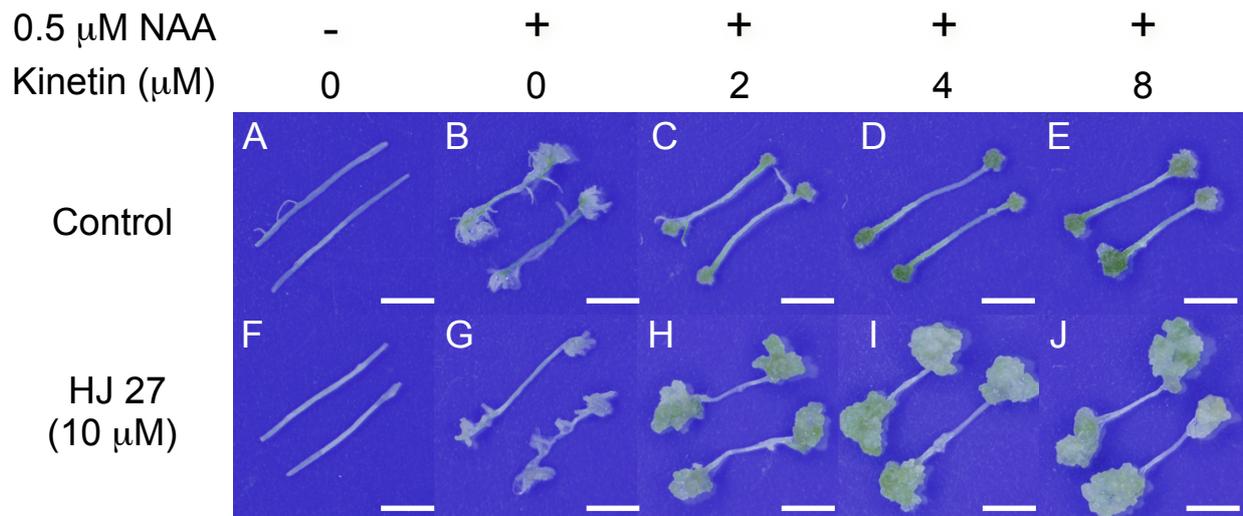


図4-5. HJ27の植物ホルモン関連作用点の探索試験

A-J. HJ27のサイトカイニンとしてのカルス誘導活性試験  
(暗所7日目の胚軸を切断し薬剤培地で明所14日間培養 bar=1 cm)

A. Control B. 0.5  $\mu$ M NAA

C-E. 0.5  $\mu$ M NAA + kinetin 2  $\mu$ M(C), 4  $\mu$ M(D), 8  $\mu$ M(E)

F-J. A-Eの条件にHJ27を10  $\mu$ M添加

K. *ein2*及び*bil1*へのHJ27処理時の胚軸長

(暗所7日目 n=20~30 bar=S.E. \*= $p$ <0.05, \*\*= $p$ <0.01, \*\*\*= $p$ <0.001)

#### 4-2 HJ27 の作用点探索-セルロース生合成阻害剤 IXB との比較

前項までにおいて HJ27 と種々の植物ホルモンとの関わりを調べたが、いずれも作用機構の同定にはいたらなかった。そこで、HJ27 が示す活性は植物ホルモン機能阻害以外を原因とする可能性を含めて作用部位の探索を行った結果、HJ27 によって引き起こされる植物の形態がセルロース生合成阻害剤であるイソキサベン (IXB) を処理した場合の形態と非常に似ている事実を見出した (図 4-6)。

シロイヌナズナにおけるセルロース生合成の概略について述べる。シロイヌナズナでは 10 種のセルロース生合成酵素 CESA (cellulose synthase) のうち少なくとも異なる 3 種以上が含まれるヘテロ 6 量体が 6 ユニット繋がったロゼッタ状の複合体を形成して細胞膜上に存在し、これら酵素複合体は UDP-グルコースを  $\beta$ -1,4-グリコシド結合によって鎖状に繋げることによりセルロース繊維を合成する (Brown et al., 1996; Kimura et al., 1999; Mutwil et al., 2008)。しかしながらその詳細な反応機構は未解明のままである。

さて、セルロースは植物細胞壁の主成分であり、セルロース以外の多糖類であるヘミセルロースとフェニルプロパノイド重合体であるリグニンと共に植物細胞壁を構成する。イソキサベンは CESA の機能を阻害することによってセルロース生合成阻害を引き起こす (Heim et. al., 1990)。IXB は 1 nM という低濃度で顕著なシロイヌナズナ形態変化を誘導する非常に強い阻害剤であり、IXB を原体とした除草剤も農薬として利用されている。一方で IXB の阻害機構は完

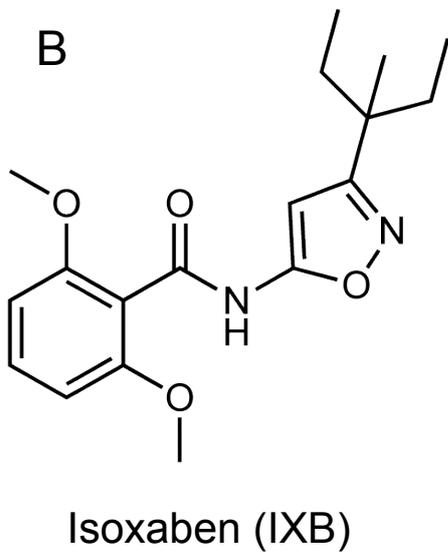
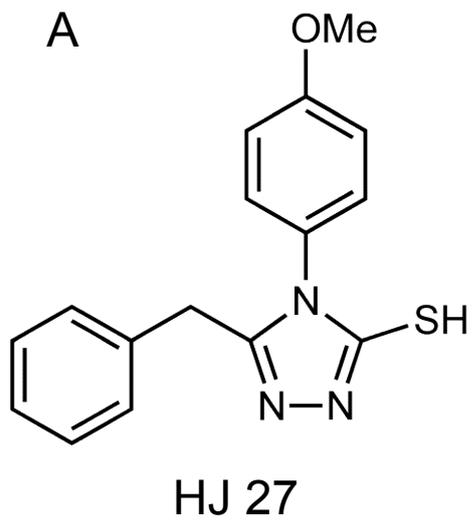


図4-6. HJ27及びIXB処理時の植物形態

A, B. HJ27及びIXBの構造

C. HJ27及びIXB処理時の植物形態(明所6日目 bar=1 cm)

全に解明されてはいないが、CESA の結晶構造解析や IXB 抵抗性変異体 *ixr1* (*cesa3*), *ixr2* (*cesa6*) の変異部位が活性中心ではなく細胞膜貫通領域 (*ixr1-1*) および膜貫通領域を繋ぐ部位 (*ixr1-2*)、そして膜貫通領域から伸びた C 末端領域 (*ixr2*) に存在することから、IXB によるセルロース生合成阻害活性は CESA の活性部位とは異なる場所に結合し、CESA の細胞内輸送が攪乱されることによるものではないかと推測されている (Desprez et al., 2002; Robert et al., 2005; Joshi et al., 2007)。

HJ27 がセルロース生合成阻害剤である可能性を考慮し、まずはイソキサベン抵抗性変異体である *ixr* に対する IXB 処理との形態比較を行った。WT 及び IXB 耐性変異体 *ixr1*, *ixr2*, *ixr3* に対する主根伸長量減少の観察を行った。結果、*ixr* 変異体中では *ixr2* が多少の耐性を示すものの、IXB に対して示すような強い抵抗性が HJ27 に対して観察されなかった (図 4-7)。よって HJ27 は IXB とは作用点が異なる可能性が示された。しかしながら HJ27 の 3  $\mu$ M に対して *ixr2* が抵抗性を示したことから、両化合物は似た作用機構もしくはタンパク質への結合部位が一部共通している可能性もあると考えている。

#### 4-3. HJ27 の間接的なセルロース生合成阻害能評価

前項においてシロイヌナズナを HJ27 で処理した結果現れる形態が IXB を処理した場合の形態と似ていること、しかしながら *ixr* 変異体の両化合物に対する応答性が異なることを明らかにした。そこで、HJ27 のセルロース生合成阻

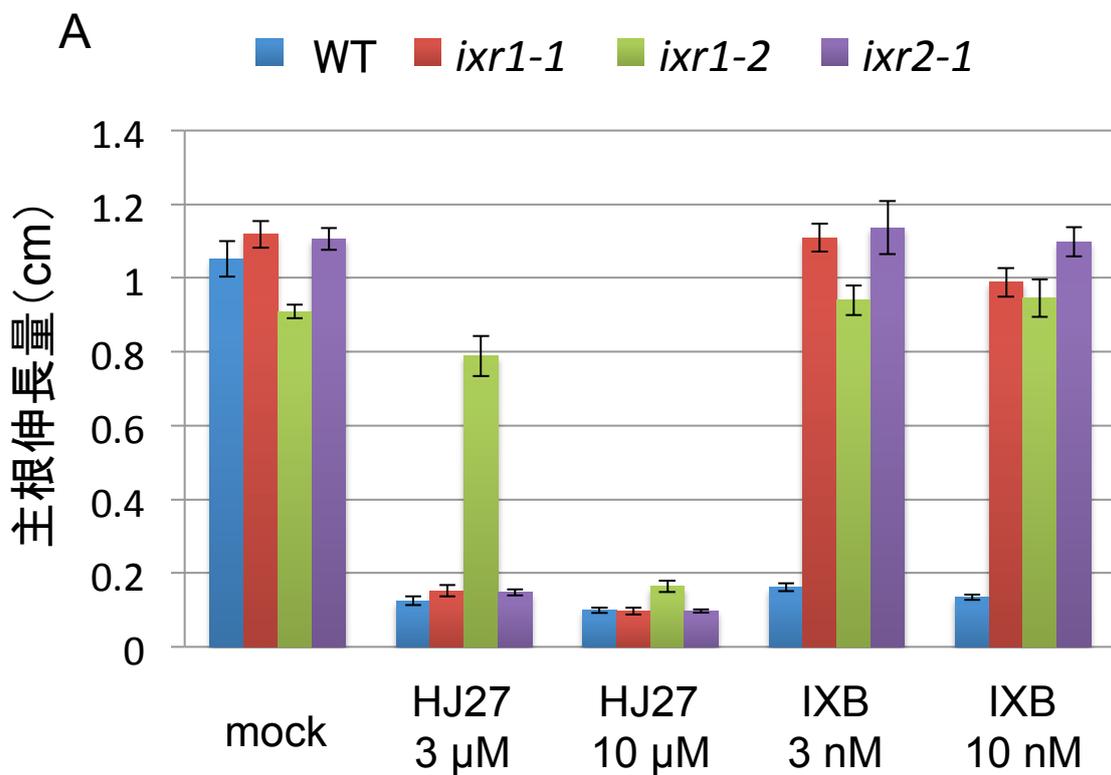


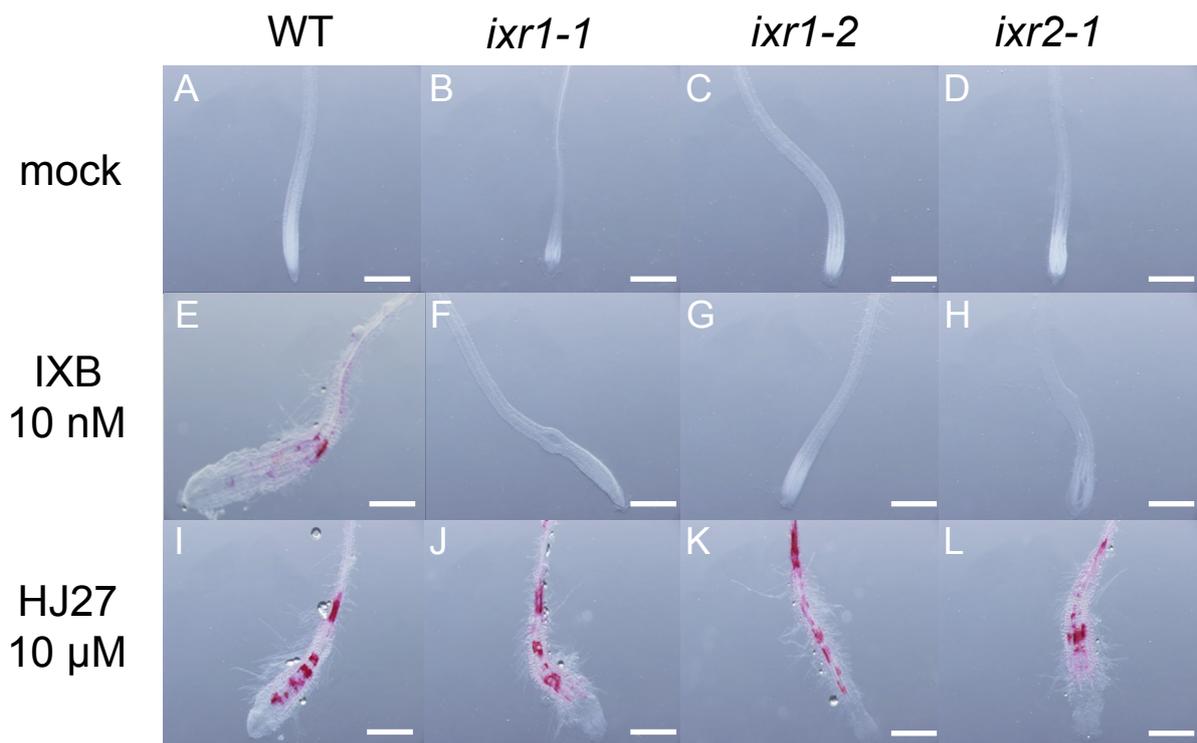
図4-7. HJ27及びIXB処理時の主根伸長量

A. HJ27及びIXB処理時の野生型株及び*ixr*変異体の主根伸長量  
(明所6日間培養後薬剤培地で2日間培養 n=6~8 bar=S.E.)

害活性についてさらに検討するため、HJ27 処理時のシロイヌナズナ幼植物体におけるリグニン蓄積を観察した。セルロース生合成阻害剤の特徴のひとつとして、リグニンの異所的な過剰蓄積が報告されており (Delgano et. al., 2003)、HJ27 がセルロース生合成阻害剤であれば同様の性質を示すはずである。リグニンの蓄積状態はフロログルシノール染色法によって観察した。結果、HJ27 は野生型株及び *ixr* 変異体に対してもリグニンの蓄積を引き起こすことが判明した (図 4-8)。

#### 4-4. HJ27 処理時の植物細胞壁の観察

前項までの試験より、HJ27 が植物体内でセルロース生合成阻害剤として働き様々な植物形態を引き起こすことが強く示唆された。そこで、HJ27 処理時における植物細胞壁の変化を観察するため、propidium iodine (PI) による細胞壁染色を行い、シロイヌナズナ幼植物体の根の細胞壁の観察を行った。その結果、HJ27 及び IXB 処理した植物体において、無処理時には観察することが出来る細胞壁に由来すると思われる細胞周辺の染色域が消失し、細胞間隙での異所的な染色が観察されるという、細胞外形の変化が観察された (図 4-9)。また、タバコ培養細胞からプロトプラストを調製し、カルコフロー染色により再形成された細胞壁の蛍光強度を観察したところ (Yoneda et. al., 2007)、HJ27 及び IXB 処理において蛍光が減退することが判明した (図 4-10)。以上 2 つの試験より、HJ27 は細胞壁の生合成を阻害していることが判明した。



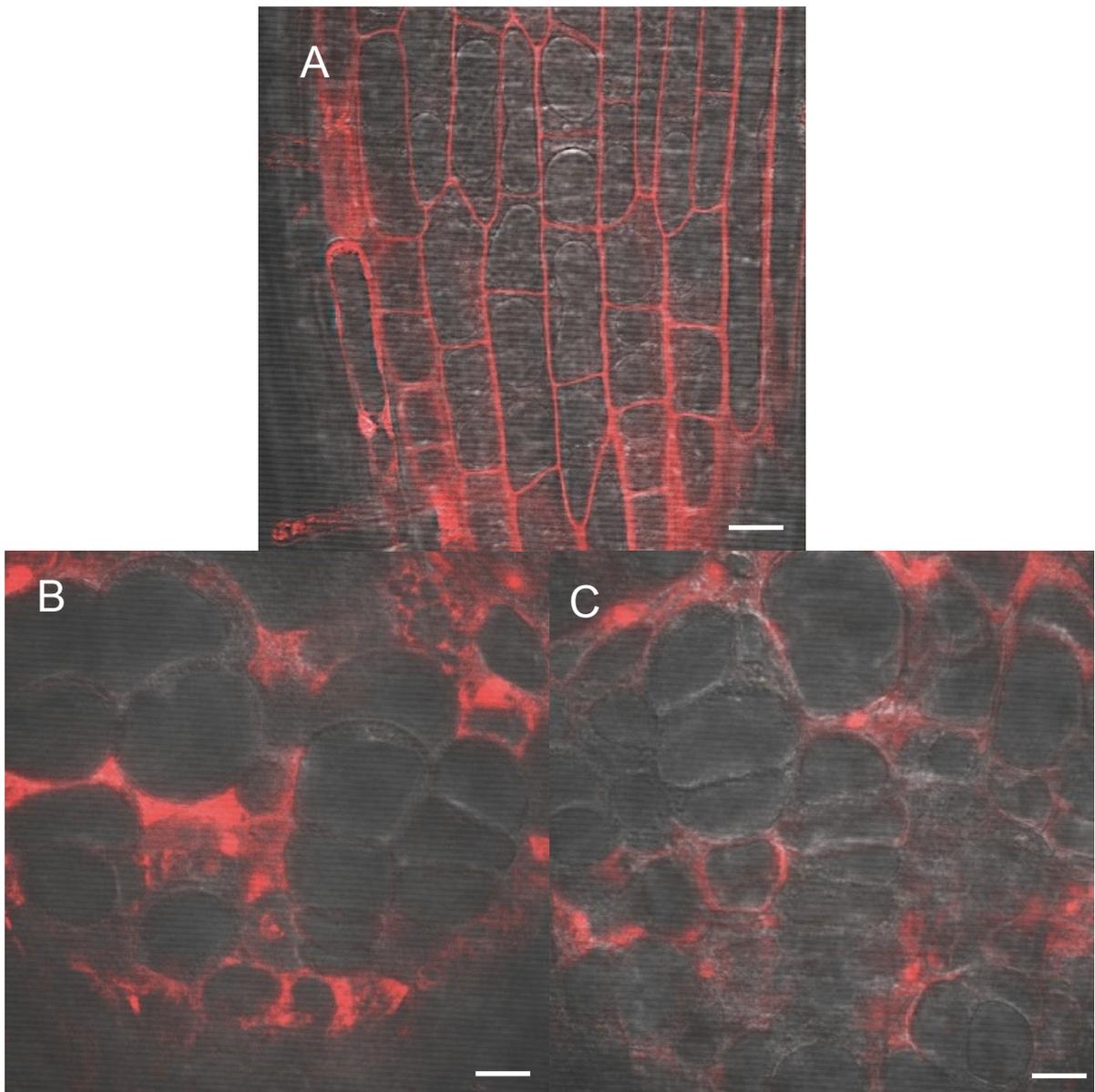
**図4-8. HJ27及びIXBに誘引されるリグニン蓄積の観察**

A-L. HJ27及びIXB処理による野生型株及び*ixr*変異体のリグニン蓄積の観察  
(明所4日間培養後薬剤培地で2日間培養し染色観察 bar=500 μm)

A-D. mock培地に野生型株(A), *ixr1-1*(B), *ixr1-2*(C), *ixr2-1*(D)を移植

E-H. IXB 10 nM培地に野生型株(E), *ixr1-1*(F), *ixr1-2*(G), *ixr2-1*(H)を移植

I-L. HJ27 10 μM培地に野生型株(I), *ixr1-1*(J), *ixr1-2*(K), *ixr2-1*(L)を移植



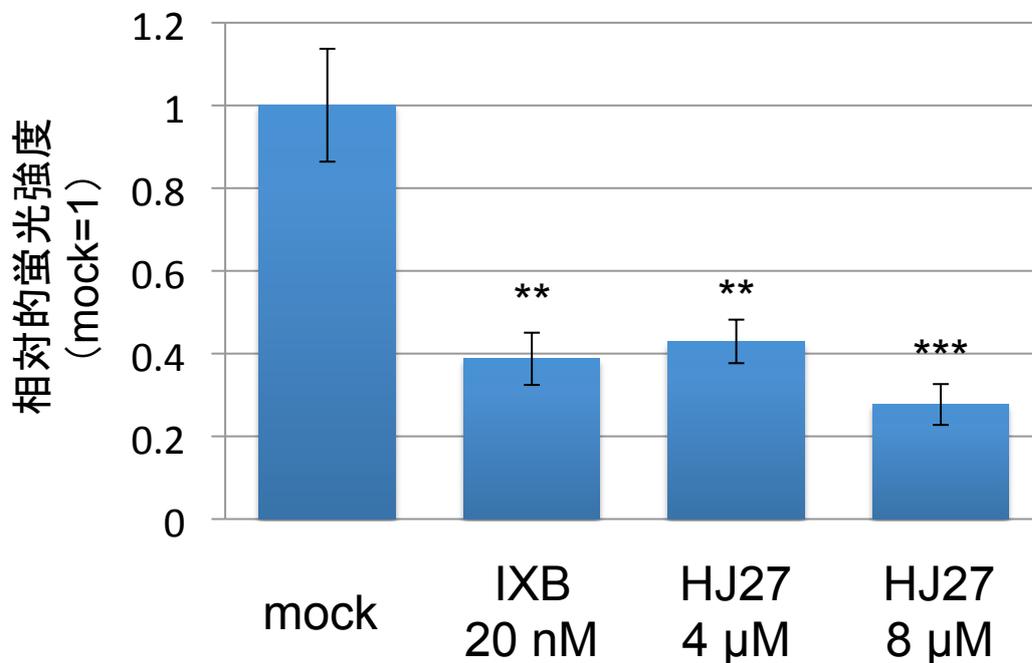
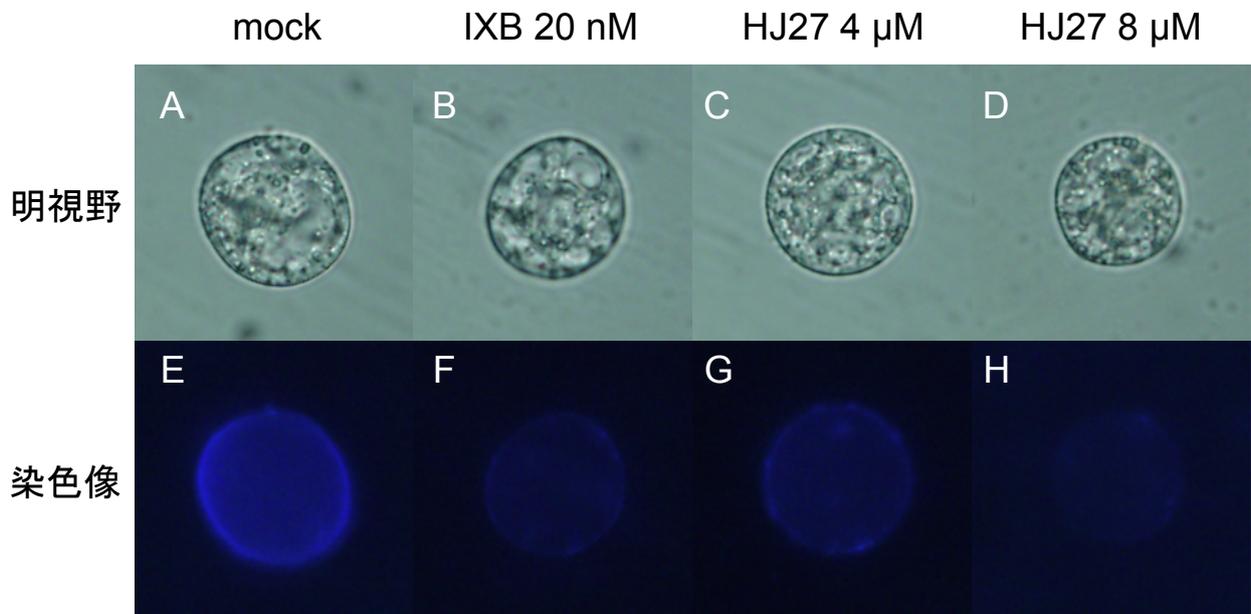
#### 図4-9. HJ27及びIXB処理時の根細胞壁の観察

A-C. PI染色法を用いたHJ27及びIXB処理時の根細胞壁の観察  
(明所4日間培養後薬剤培地で2日間培養し染色観察 bar=10  $\mu\text{m}$ )

A. mock培地に移植

B. HJ27 10  $\mu\text{M}$ 培地に移植

C. IXB 10 nM培地に移植



**図4-10. カルコフロール染色によるタバコ培養細胞プロトプラストの細胞壁再形成の観察**

A-H. タバコ培養細胞プロトプラストの再形成観察  
(プロトプラスト調製後24時間薬剤処理し、染色観察)

A-D. 明視野 D-H. 蛍光像

A, E. mock B, F. IXB 20 nM

C, G. HJ27 4 μM D, H. HJ27 8 μM

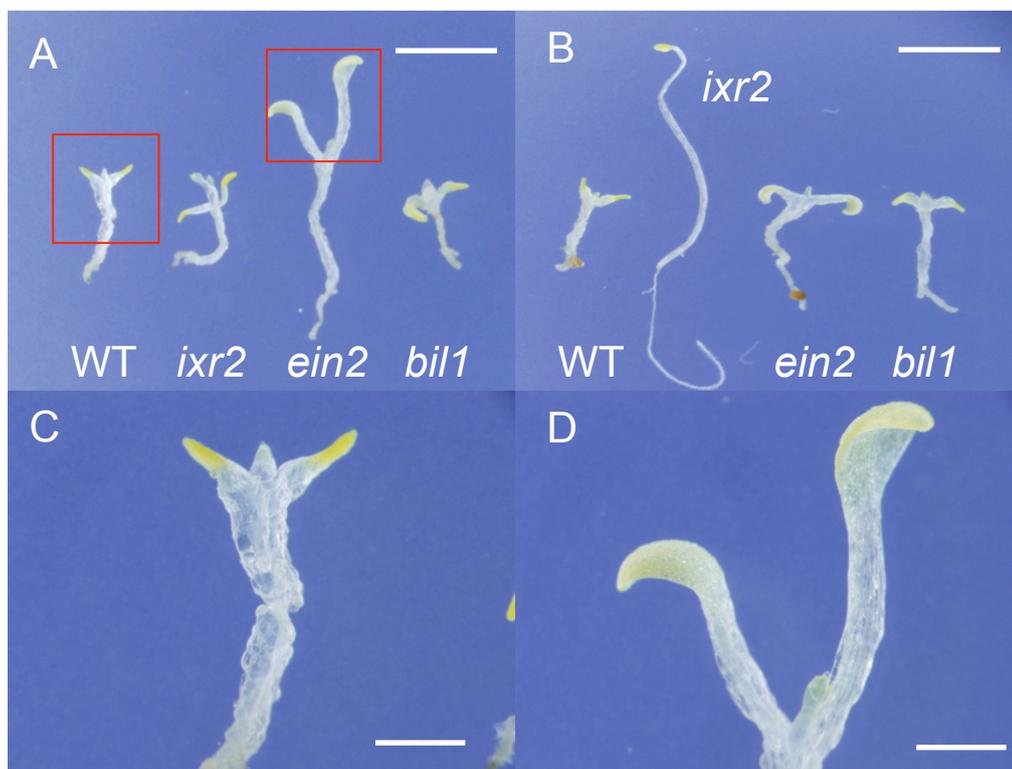
I. 上記条件におけるカルコフロール染色による細胞壁の蛍光強度  
(n=20 bar=S.E. \*\*= $p < 0.01$  \*\*\*= $p < 0.001$ )

#### 4-5. HJ27 による擬似的な暗所光形態形成

以上の実験より、HJ27 がセルロース生合成阻害剤である可能性が強く示唆された。この節では、実験の過程で新たに発見した HJ27 及び IXB などのセルロース生合成阻害剤が有する暗所光形態形成能について述べる。

暗所条件下で HJ27 や IXB を含む培地でシロイヌナズナを生育させると、芽生えのもやし化という通常の暗形態形成は観察されずに、先端の子葉展開と胚軸の矮化という擬似的な光形態形成が誘導された (図 4-11)。暗所光形態形成を誘引する化合物としてはブラシノステロイド (BR) 生合成阻害剤ブラシナゾール (Brz) が知られており、HJ27 も副作用として BR 生合成またはシグナル伝達経路を阻害している可能性が考えられたが、4 章 1 項における作用機構解明研究の過程で述べたように BR シグナル過剰発現変異体である *bzr1/bill* は HJ27 による胚軸伸長阻害に対して抵抗性を示さず、暗所光形態形成を示した。この結果は、HJ27 はブラシノステロイドシグナルの抑制を介すことなく暗所光形態形成を誘導する能力があることを示している。

HJ27 処理による光形態形成の機構を探るために、光応答性遺伝子である *chlorophyll A/B binding protein (CAB)*、*Rubisco small subunit (RBCS)*、*Rubisco large subunit (RBCL)*、*photosystem II reaction center protein A (PSBA)* の発現変動量をリアルタイム PCR によって測定した。結果として、HJ27 もしくは IXB 処理したシロイヌナズナにおいては CAB のみ発現上昇するという結果が得られた (図 4-12)。この結果は、セルロース生合成阻害が一部の光応答性遺伝子の発現



**図4-11. HJ27及びIXB処理時の暗所光形態形成**

- A-D. HJ27及びIXBに対する各種変異体の形態観察  
 (暗所9日目 図A, Bのbar=5 mm, 図C, Dのbar=1 mm)
- A. HJ27 10  $\mu$ M
  - B. IXB 10 nM
  - C. 図Aの野生型株の赤枠内の拡大図
  - D. 図Aの*ein2*の赤枠内の拡大図

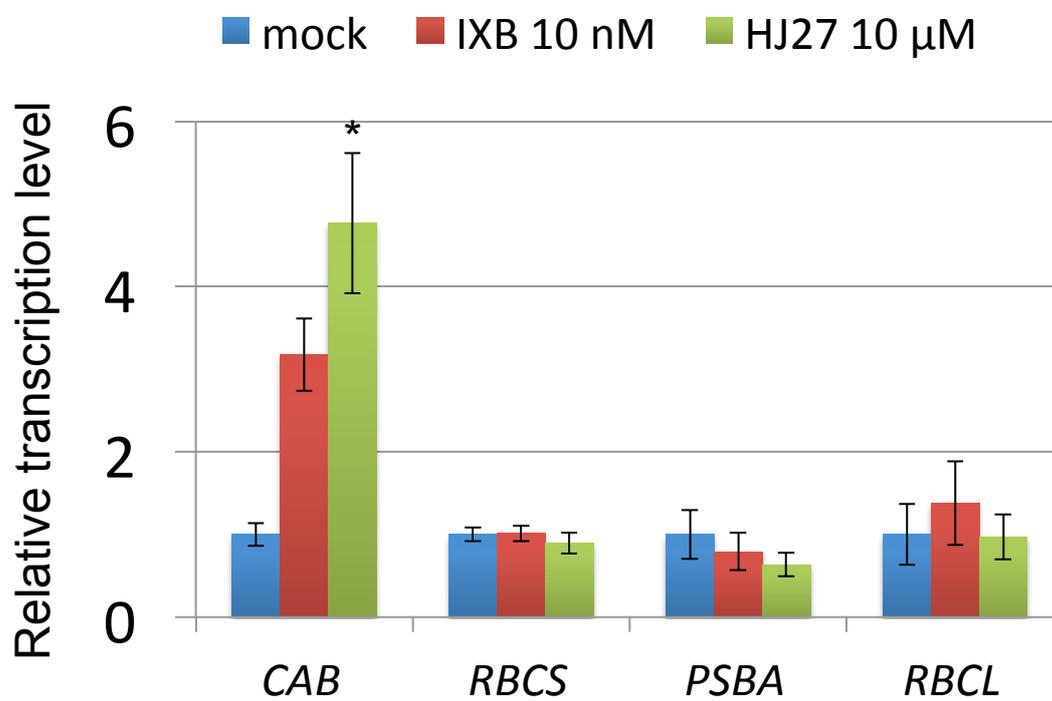


図4-12. HJ27及びIXB処理による光応答性因子の発現量

A. HJ27及びIXB処理による各種光応答性因子発現量  
 (薬剤培地で暗所7日間 n=3 bar=S.D. \*= $p < 0.05$ )

に影響を与えている可能性を示している。

#### 第4章考察

本章においては新規植物生長調節剤である HJ27 の作用機構の解明を中心に研究を進めた結果、HJ27 がセルロース生合成阻害剤である可能性を示すことができた。カルス形成においてサイトカイニンとの共力活性と考えられたカルスの肥大化も、細胞壁生合成が阻害されることによりカルス形成が容易になったためであると考えられる。IXB 以外のセルロース生合成阻害剤として 100 nM で植物形態に影響を与える DCB や天然物由来の thaxtomin Aなどを挙げることはできるが、これらの CESA への作用は 3 通りに分類されている。一つ目は CESA の細胞膜上への局在を阻害するもの、二つ目は CESA の細胞膜状での移動を阻害するもの、三つ目として CESA の酵素活性を阻害し細胞膜上での CESA の過剰蓄積を引き起こすものである (Debolt et al., 2007; Bishoff et al., 2009; Bradham and Debolt, 2011)。HJ27 を用いたシロイヌナズナにおける CESA 関連タンパク質の挙動観察実験を行うことにより、HJ27 による阻害が上記三つに分類される阻害タイプのどのタイプに分類されるのかを明らかにすることができるであろう。同時に、放射性同位体グルコース ( $C^{14}$  グルコース) を用いた放射性グルコースの取り込み量を指標とした HJ27 の細胞壁生合成阻害能試験も行っており、これらの結果から HJ27 がセルロース生合成阻害活性を示すことを直接的に証明できると考えている。

HJ27 の今後の応用であるが、除草剤としての応用は IXB と比較して有効終濃度に 1000 倍程度の差があるために HJ27 そのものを除草剤として開発することは難しいであろう。農薬開発のためには HJ27 をリード化合物としてさら

に構造展開による活性上昇を図ることが必須である。ただ *ixr* 変異体に対しても形態変化を示すことから、HJ27 そのものを既存の薬剤とは作用点の異なる新しいセルロース生合成阻害剤として研究分野で利用する価値は十分にあると考えている。

## 第4章実験方法

### 1. リグニン染色によるリグニン蓄積の観察

培養したシロイヌナズナをスライドグラス上に移し、リグニン染色液を植物体に滴下して3分間浸漬後、実体顕微鏡 SZX16 stereoscopic microscope (Olympus) を用いて観察した。

#### <リグニン染色液の組成>

フロログルシノール		2 mg
37%塩酸	1 ml	
メタノール		1 ml

リグニン染色液は変成しやすいので都度調製した。

### 2. カルス形成試験

1/2MS 培地上で暗所、22℃で7日間培養したシロイヌナズナの胚軸を切断し、1/2MS 培地に NAA 及び kinetin を加えたカルス誘導培地に胚軸切片を移植し、明所、22℃で2週間培養を行い、観察した。

### 3. カルコフロール染色による細胞壁の観察

継代3日目のタバコ BY-2 細胞からプロトプラストを調整し、各種阻害剤処理24時間後のセルロースを0.02%カルコフロールで染色した。

### 4. 光応答性遺伝子の発現量測定

RNA 抽出及びリアルタイム PCR は3章と同様の方法で行った。

#### <使用プライマー>

CAB	ATCCGACCGAGTCAAGTACT	GGTTCCTTGCGAATGTCT
RBCS	ATATCACCTTGTGCATATCC	CGTCCATCGTAGTATCCG

RBCL	GGTCTAAGGGATAAGCTACA	TACTGGTACATGGACAACCTG
PSBA	CTATACAACGGCGGTCCTT	GCATACCCAGACGGAAACTA
UBQ2	CCAAGATCCAGGACAAAGAAGGA	TGGAGACGAGCATAAACAATTGC

## 参考文献

1. Abas L, *et al.* (2006) Intracellular trafficking and proteolysis of the Arabidopsis auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nat Cell Biol* 8(3):249-256.
2. Alonso JM, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S, & Ecker JR (1999) EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. *Science* 284(5423):2148-2152.
3. Asami T, *et al.* (2000) Characterization of brassinazole, a triazole-type brassinosteroid biosynthesis inhibitor. *Plant Physiol* 123(1):93-100.
4. Bischoff V, Cookson SJ, Wu S, & Scheible WR (2009) Thaxtomin A affects CESA-complex density, expression of cell wall genes, cell wall composition, and causes ectopic lignification in Arabidopsis thaliana seedlings. *Journal of Experimental Botany* 60(3):955-965.
5. Boerjan W, *et al.* (1995) SUPERROOT, A RECESSIVE MUTATION IN ARABIDOPSIS, CONFERS AUXIN OVERPRODUCTION. *Plant Cell* 7(9):1405-1419.
6. Brown RM, Saxena IM, & Kudlicka K (1996) Cellulose biosynthesis in higher plants. *Trends in Plant Science* 1(5):149-156.
7. Brunoud G, *et al.* (2012) A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution. *Nature* 482(7383):103-U132.
8. Calderón Villalobos LI, *et al.* (2012) A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nat Chem Biol* 8(5):477-485.
9. Cano-Delgado A, Penfield S, Smith C, Catley M, & Bevan M (2003) Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal* 34(3):351-362.
10. Chae HS, Faure F, & Kieber JJ (2003) The eto1, eto2, and eto3 mutations and cytokinin treatment increase ethylene biosynthesis in Arabidopsis by increasing the stability of ACS protein. *Plant Cell* 15(2):545-559.
11. Clouse SD, Langford M, & McMorris TC (1996) A brassinosteroid-insensitive mutant in Arabidopsis thaliana exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiol* 111(3):671-678.
12. Desprez T, *et al.* (2002) Resistance against herbicide isoxaben and cellulose deficiency caused by distinct mutations in same cellulose synthase isoform CESA6. *Plant Physiology* 128(2):482-490.

13. Dharmasiri N, Dharmasiri S, & Estelle M (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435(7041):441-445.
14. Guzman P & Ecker JR (1990) EXPLOITING THE TRIPLE RESPONSE OF ARABIDOPSIS TO IDENTIFY ETHYLENE-RELATED MUTANTS. *Plant Cell* 2(6):513-523.
15. Hayashi K, *et al.* (2008) Small-molecule agonists and antagonists of F-box protein-substrate interactions in auxin perception and signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(14):5632-5637.
16. He WR, *et al.* (2011) A Small-Molecule Screen Identifies L-Kynurenine as a Competitive Inhibitor of TAA1/TAR Activity in Ethylene-Directed Auxin Biosynthesis and Root Growth in Arabidopsis. *Plant Cell* 23(11):3944-3960.
17. Heim DR, Skomp JR, Tschabold EE, & Larrinua IM (1990) ISOXABEN INHIBITS THE SYNTHESIS OF ACID INSOLUBLE CELL-WALL MATERIALS IN ARABIDOPSIS-THALIANA. *Plant Physiology* 93(2):695-700.
18. Ichikawa T, *et al.* (2006) The FOX hunting system: an alternative gain-of-function gene hunting technique. *Plant Journal* 48(6):974-985.
19. Jackson RG, *et al.* (2001) Identification and biochemical characterization of an Arabidopsis indole-3-acetic acid glucosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 276(6):4350-4356.
20. Jang JY, Kim DG, Kim YO, Kim JS, & Kang H (2004) An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol* 54(5):713-725.
21. Johansson I, *et al.* (1998) Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell* 10(3):451-459.
22. Jones DH & Northcote DH (1984) Stability of the complex formed between French bean (*Phaseolus vulgaris*) phenylalanine ammonia-lyase and its transition-state analog. *Arch Biochem Biophys* 235(1):167-177.
23. Joshi CP & Mansfield SD (2007) The cellulose paradox--simple molecule, complex biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 10(3):220-226.
24. Kakar K, Zhang H, Scheres B, & Dhonukshe P (2013) CLASP-mediated cortical microtubule organization guides PIN polarization axis. *Nature* 495(7442):529-533.
25. Kepinski S & Leyser O (2005) The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435(7041):446-451.
26. Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA, & Ecker JR (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a

member of the raf family of protein kinases. *Cell* 72(3):427-441.

27. Kimura S, *et al.* (1999) Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *vigna angularis*. *Plant Cell* 11(11):2075-2086.
28. Kleine-Vehn J, *et al.* (2011) Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane. *Mol Syst Biol* 7:540.
29. Krecek P, *et al.* (2009) The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biol* 10(12):249.
30. Ludwig-Müller J, Vertocnik A, & Town CD (2005) Analysis of indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation on *Arabidopsis* stem segments. *J Exp Bot* 56(418):2095-2105.
31. Martintanguy J, Corbineau F, Burtin D, Benhayyim G, & Tepfer D (1993) GENETIC-TRANSFORMATION WITH A DERIVATIVE OF ROLC FROM AGROBACTERIUM-RHIZOGENES AND TREATMENT WITH ALPHA-AMINOISOBUTYRIC-ACID PRODUCE SIMILAR PHENOTYPES AND REDUCE ETHYLENE PRODUCTION AND THE ACCUMULATION OF WATER-INSOLUBLE POLYAMINE-HYDROXYCINNAMIC ACID CONJUGATES IN TOBACCO FLOWERS. *Plant Science* 93(1-2):63-76.
32. Mashiguchi K, *et al.* (2011) The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(45):18512-18517.
33. Matsumoto T, *et al.* (2009) Role of the Aquaporin PIP1 Subfamily in the Chilling Tolerance of Rice. *Plant and Cell Physiology* 50(2):216-229.
34. Mikkelsen MD, Naur P, & Halkier BA (2004) *Arabidopsis* mutants in the C-S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis. *Plant J* 37(5):770-777.
35. Mutwil M, Debolt S, & Persson S (2008) Cellulose synthesis: a complex complex. *Current Opinion in Plant Biology* 11(3):252-257.
36. Okada K, Ueda J, Komaki MK, Bell CJ, & Shimura Y (1991) REQUIREMENT OF THE AUXIN POLAR TRANSPORT-SYSTEM IN EARLY STAGES OF ARABIDOPSIS FLORAL BUD FORMATION. *Plant Cell* 3(7):677-684.
37. Peng JR, *et al.* (1997) The *Arabidopsis* GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes & Development* 11(23):3194-3205.
38. Péret B, *et al.* (2012) Auxin regulates aquaporin function to facilitate lateral root emergence. *Nat Cell Biol* 14(10):991-998.
39. Péret B, *et al.* (2012) AUX/LAX genes encode a family of auxin influx

transporters that perform distinct functions during Arabidopsis development. *Plant Cell* 24(7):2874-2885.

40. Robert S, *et al.* (2005) An Arabidopsis endo-1,4-beta-D-glucanase involved in cellulose synthesis undergoes regulated intracellular cycling. *Plant Cell* 17(12):3378-3389.

41. Rounds CM, Lubeck E, Hepler PK, & Winship LJ (2011) Propidium Iodide Competes with Ca<sup>2+</sup> to Label Pectin in Pollen Tubes and Arabidopsis Root Hairs. *Plant Physiology* 157(1):175-187.

42. Soeno K, *et al.* (2010) Auxin biosynthesis inhibitors, identified by a genomics-based approach, provide insights into auxin biosynthesis. *Plant Cell Physiol* 51(4):524-536.

43. Staswick PE, *et al.* (2005) Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* 17(2):616-627.

44. Stepanova AN, *et al.* (2008) TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* 133(1):177-191.

45. Strader LC, *et al.* (2011) Multiple facets of Arabidopsis seedling development require indole-3-butyric acid-derived auxin. *Plant Cell* 23(3):984-999.

46. Swarup R, *et al.* (2007) Ethylene upregulates auxin biosynthesis in Arabidopsis seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. *Plant Cell* 19(7):2186-2196.

47. Tan X, *et al.* (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 446(7136):640-645.

48. Timpte C, Lincoln C, Pickett FB, Turner J, & Estelle M (1995) The AXR1 and AUX1 genes of Arabidopsis function in separate auxin-response pathways. *Plant J* 8(4):561-569.

49. Tsuda E, *et al.* (2011) Alkoxy-auxins are selective inhibitors of auxin transport mediated by PIN, ABCB, and AUX1 transporters. *J Biol Chem* 286(3):2354-2364.

50. Tyerman SD, Bohnert HJ, Maurel C, Steudle E, & Smith JAC (1999) Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *Journal of Experimental Botany* 50:1055-1071.

51. Wang ZY, *et al.* (2002) Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev Cell* 2(4):505-513.

52. Yoneda A, *et al.* (2007) Chemical genetic screening identifies a novel inhibitor of parallel alignment of cortical microtubules and cellulose microfibrils. *Plant*

*Cell Physiol* 48(10):1393-1403.

53. Zhao YD (2010) Auxin Biosynthesis and Its Role in Plant Development. *Annual Review of Plant Biology, Vol 61*, Annual Review of Plant Biology, eds Merchant S, Briggs WR, & Ort D (Annual Reviews, Palo Alto), Vol 61, pp 49-64.