

論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻
平成23年度博士課程 進学
氏名 安藤 卓也
指導教員名 浅見 忠男

論文題目 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

研究の背景と目的

植物は自身の成長段階や外部からの刺激によりその形態を制御し環境に最適な形態形成を行うが、その形態形成を誘引する端緒のシグナルとして植物ホルモンが関与している。植物ホルモンと呼ばれる物質はオーキシン、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種が挙げられるが、近年ではストリゴラクトンやサリチル酸も加えられるようになった。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、その生理作用は発芽や細胞伸長、光や重力屈性、花芽形成など植物の生活環のほぼ全てに関わる。これら様々な植物形態形成に関係する IAA は植物体内で厳密な濃度勾配を形成する事が知られている。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。よってオーキシンの生理作用の解明及び自在な調節は植物育成の自在な制御を可能にする非常に重要な基礎研究であると考えられている。オーキシンの生合成、輸送及びシグナル伝達経路に関する研究は近年著しく進展したものの、いずれにおいても解明すべき点が数多く残されている。私は、これら未解明な点を究明するために、化合物を用いた化学生物学的手法が有用であると考えた。化

化合物を用いる事により冗長性の高いオーキシシン生合成酵素の一括した抑制だけでなく、植物の正常な生育に不可欠であるために機能欠損にすると致死となってしまうオーキシシン生合成酵素についても投与する濃度や投与時期を工夫することで機能制御の効果を追究することが可能となる。つまり通常は観察が困難なオーキシシン欠損下における植物の性状解析ができると考えた。以上、本研究においてはオーキシシン制御剤の探索とそれらの化学遺伝学への応用による新規オーキシシン関連因子の取得を目的とした。本研究に先立ち、新規オーキシシンの生合成阻害剤候補物質である L-2-aminooxy-3-phenylpropionic acid (AOPP) が理化学研究所と所属研究室との共同研究により得られていた。AOPP はオーキシシン生合成の主要な経路である IPA 経路の TAA1 を阻害し IAA 応答性遺伝子及び内生 IAA 量の減少を引き起こす。一方、本研究室でも新たなオーキシシン機能制御剤候補物質である HJ27 を選抜していた。そこで両化合物を用いたオーキシシン関連シグナル因子の解明を行う事を目的として、まず両化合物のオーキシシンシグナルに関連する性状解析、そしてその作用機構の解明を行った。以上の結果に基づき、特に地下部においてオーキシシン生合成との関連が強く示唆された AOPP を用いて、AOPP 抵抗性変異体の選抜によるオーキシシンシグナル関連因子の取得を目指した。

オーキシシン生合成阻害剤 AOPP を用いた抵抗性変異体の選抜と機能解析

AOPP の性状解析を詳細に行った結果、AOPP を野生型のシロイヌナズナに処理すると主根の重力屈性異常が観察され、この形態が外生 IAA の投与で回復すると結果を得た。そこでこの性質を利用して AOPP に抵抗性を示すシロイヌナズナ変異体を選抜し、原因遺伝子の機能解析を行う事により新たなオーキシシンシグナル関連因子を発見出来ると考えた。培地条件の検討を行い、シロイヌナズナ遺伝子突然変異体のスクリーニングを行った結果、4 種の AOPP 抵抗性変異体を取得した。これら変異体を *rai1,rai2,rai3,rai4* (resistant to quxin inhibition 1, 2, 3, 4) と命名し、取得変異体中で最も強い抵抗性を示した *rai1* に関する機能解析を中心に研究を展開した。*rai1* は通常条件培地下においても主根伸長量の減少や根毛の増大などのオーキシシン過剰様形態を示したため、恒常的な IAA シグナル過剰変異体である事が示唆された。そこで IAA 応答性遺伝子発現量を測定した所、*rai1* において IAA1 及び IAA19 の発現量が上昇していた。しかし内生 IAA 量に変化は見られなかった。また *rai1* 変異体における恒常的な IAA シグナル過剰が成熟形態に与える影響を観察したところ、主茎長の増大や枝数の減少などのオーキシシンシグナル過剰による頂芽優性形態が観察された。*rai1* の原因遺伝子の同定のために既に

変異体との比較や掛け合わせを行ったところ、*rai1* がエチレン生合成過剰変異体 *ethylene overproduction 1 (eto1)* と未同定の変異を持つ二重変異体である事が判明した。マップベースクローニング法及び次世代シーケンサーを用いて未同定原因遺伝子の特定を目指したが、4番染色体のセントロメア付近である約 900 万 bp から 1050 万 bp の間に変異原因遺伝子がある事は判明したものの、特定には至らなかった。

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

AOPP 抵抗性変異体として *rai1* を選抜し機能解析を行う事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であったため原因遺伝子の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 *rai1* 同様迅速な原因遺伝子の同定が難しい事が予想されたため、新たなオーキシン関連変異体の取得を目的として、理化学研究所で開発された full-length cDNA overexpressor gene line (FOX ライン) を利用した変異体探索を行った。FOX ラインを利用する最大のメリットは原因遺伝子の同定が前述の突然変異体と比較して著しく簡易である事が挙げられる。また、突然変異体は一般的に機能欠損型変異体であるのに対して、FOX ラインは機能獲得型変異体である点の特徴である。よって FOX ラインを AOPP 抵抗性スクリーニングに供する事により新たなオーキシン関連変異体が取得出来ると考えた。前項で述べたスクリーニング系を用いて FOX ライン種子を約 6000 ラインスクリーニングしたところ、1 種の抵抗性変異体を取得し、これを *rai5-D (rai5-Dominant)* と命名した。*rai5-D* の原因遺伝子はアクアポリンの一種である *plasma membrane intrinsic protein 1D (PIP1D)* をコードしていたが、現在に至るまでアクアポリンとオーキシニングナルとの関連についての情報は非常に少なかったため、アクアポリンの過剰発現がオーキシニングナルに与える影響を中心に変異体の解析を行った。*RAI5-ox* 形質転換体は AOPP に抵抗性を示すものの、通常条件培地では根の伸長量に変化が無く、また IAA 応答性遺伝子の発現量も WT と比較して差が無かったため、*rai1* のような恒常的オーキシニングナル過剰変異体である可能性は低いと考えた。35S::*RAI5-GFP* 形質転換体の形態観察を行ったところ、細胞膜の上下方向に多く局在し、オーキシン排出キャリアである PIN1 や PIN2 と類似した局在を示す事が判明した。また 35S プロモーターで発現誘導しているにも関わらず蛍光が視認出来ない細胞があり、翻訳後制御を受けている可能性が示唆された。また、

RAI5::GUS 形質転換体の観察を行ったところ、オーキシン応答性遺伝子である DR5::GUS と比較しておよそ逆のタンパク質発現パターンを示しことに加え、IAA 処理によって発現が誘導されることも明らかとなった。

新規植物生長制御剤 HJ27 の作用点探索

前項まではオーキシン生合成阻害剤を用いた変異体の解析研究について述べた。同時に、オーキシン機能制御剤探索の過程で見出した HJ27 についてその作用機構の解析を行った。この化合物はオーキシン関連変異体の探索には用いることはできなかったが、新しい植物生長調節剤や除草剤開発のためのリード化合物としての価値があると考えている。HJ27 はエチレン様活性を示す化合物 HJ2 の高活性化を指向した構造展開の中で取得された化合物であり、HJ27 をシロイヌナズナに処理すると著しい主根伸長阻害及び根毛形成の増大を示した。これらの形態がオーキシンシグナル過剰様形態と部分的に類似していたため、HJ27 がオーキシンシグナル関連化合物であると考えて作用機構を追究した。しかしオーキシン応答によって発現する DR5::GUS 形質転換体に HJ27 を処理しても IAA 処理によって観察される発現誘導は起こらず、また IAA によって分解が誘導される DII-VENUS 形質転換体に HJ27 を処理しても、IAA 処理の様な強い分解活性は見られなかった。そこで他の植物ホルモン機能を制御している可能性について検討するために様々な試験を行ったが、HJ27 の作用と植物ホルモンシグナルとの関連は認められなかった。そこで作用機構の調査範囲を広げて追究したところ、セルロース生合成阻害剤である isoxaben (IXB) のシロイヌナズナへの処理形態が HJ27 と非常に似ている事が判明した。以上の結果より HJ27 の作用点がセルロース生合成阻害剤であると推定し、IXB との形態比較やシロイヌナズナのセルロース生合成阻害剤によって誘引される異所的なリグニン蓄積の観察、及び PI 染色法による根細胞壁の観察を行った。結果として HJ27 はいずれの試験においても IXB と同様の形態を示したため、HJ27 がセルロース生合成阻害剤である事が強く示唆された。一方で IXB 抵抗性変異体である *isoxaben resistance (ixr)* に対しても HJ27 は活性を示したが、一部変異体には弱い抵抗性を示した。以上の結果より、IXB はセルロース生合成阻害剤として効果を示すが、その標的部位は IXB とは異なることが示唆された。