

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 安藤卓也

本研究においては、植物ホルモンであるオーキシン機能の自在な制御による植物形態形成の制御を最終目的とし、それに向けたオーキシン機能発現機構の全容解明への手がかりとなりうる新規オーキシン機能関連変異体の取得と性状および遺伝子機能解析、そして新規植物生長制御剤の可能性を含むオーキシン様活性化化合物の作用機構の解明を行った。

1章においてオーキシン研究の概観について述べた後、2章においては、オーキシン生合成阻害剤に対して抵抗性を示す変異体の選抜と機能解析を行った。本研究に先立ち、新規オーキシンの生合成阻害剤候補物質として得られていた *L-2-aminooxy-3-phenylpropionic acid* (AOPP) の特性解析と遺伝学への応用可能性について検討した。AOPP の性状解析の結果、AOPP を野生型のシロイヌナズナに処理することで主根の重力屈性異常が観察されること、この形態が天然オーキシンである *indole-3-acetic acid* (IAA) の投与で回復することを見出した。そこでこの性質を利用して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 auxin 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ン過剰様形態を示したため、恒常的なオーキシン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オーキシン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知変異体との比較や掛け合わせを行い、*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り、AOPP 抵抗性形質は未同定の変異に由来することを明らかにした。遺伝子マッピングにより、この変異体の原因遺伝子は新しいオーキシン機能関連遺伝子であることを明らかにした。

3章においては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。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ンシグナルとの関連についての知見は明確でなかったため、アクアポリンの過剰発現がオーキシンシグナルに与える影響を中心に変異体の解析を行った。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 と比較して逆のタンパク質発現パターンを示したことに加え、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。以上、本研究により水チャネル遺伝子がオーキシン機能発現に明確に影響を与えていることを示す初めての結果を得た。

4章においては、オーキシン機能制御剤探索の過程で見出した新規植物生長制御剤 HJ27 についてその作用機構の解析を行った。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。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、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示された。一方で IXB 抵抗性変異体である *isoxaben resistance (ixr)* に対しても HJ27 は活性を示した事から、その標的部位は IXB とは異なることが示唆された。以上の結果は、除草剤として利用されている IXB の耐性株の出現に対して新たな作用点を有する除草剤開発のためのリード化合物として HJ27 を利用することが可能であることを示している。

以上、本研究では阻害剤を用いた変異体の取得系を構築し、得られた変異体 *rai1, rai5-D* の詳細な形態・遺伝子解析を行う事で、新しい遺伝子を利用したオーキシン機能制御による植物成長制御法開発の可能性を示した事、及び植物生長制御剤 HJ27 の詳細な作用点解析によりセルロース生合成阻害剤であることを解明し新たな農薬のリード化合物となりうる事示した。これらの結果は新たな植物形態形成制御法の開発への重要な基盤研究成果であり、よって審査委員一同は、本研究が博士（農学）の学位論文として価値のあるものと認めた。