

博士論文（要約）

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 ₂ 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	α -(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

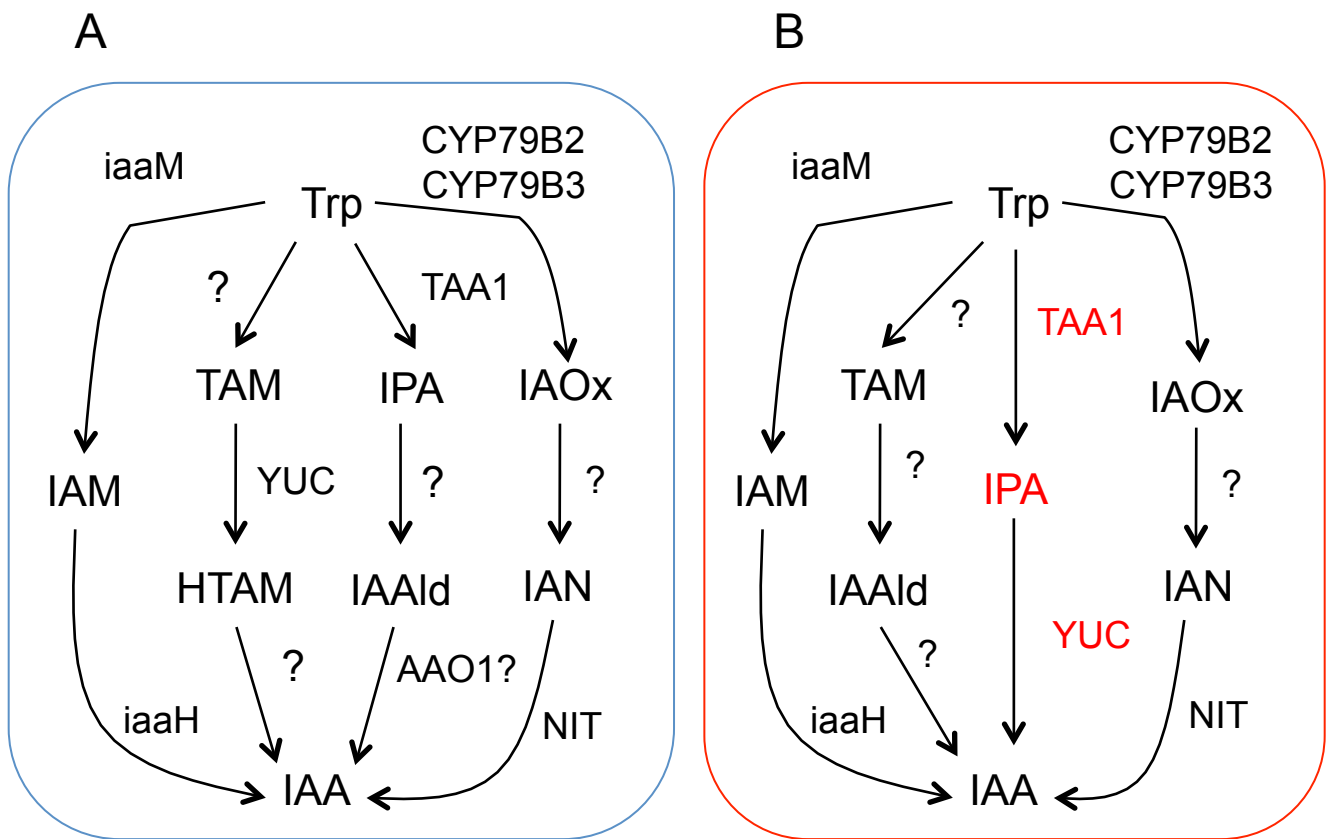


図1-1. シロイヌナズナにおけるTrp依存的IAA生合成経路の変遷

- 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の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

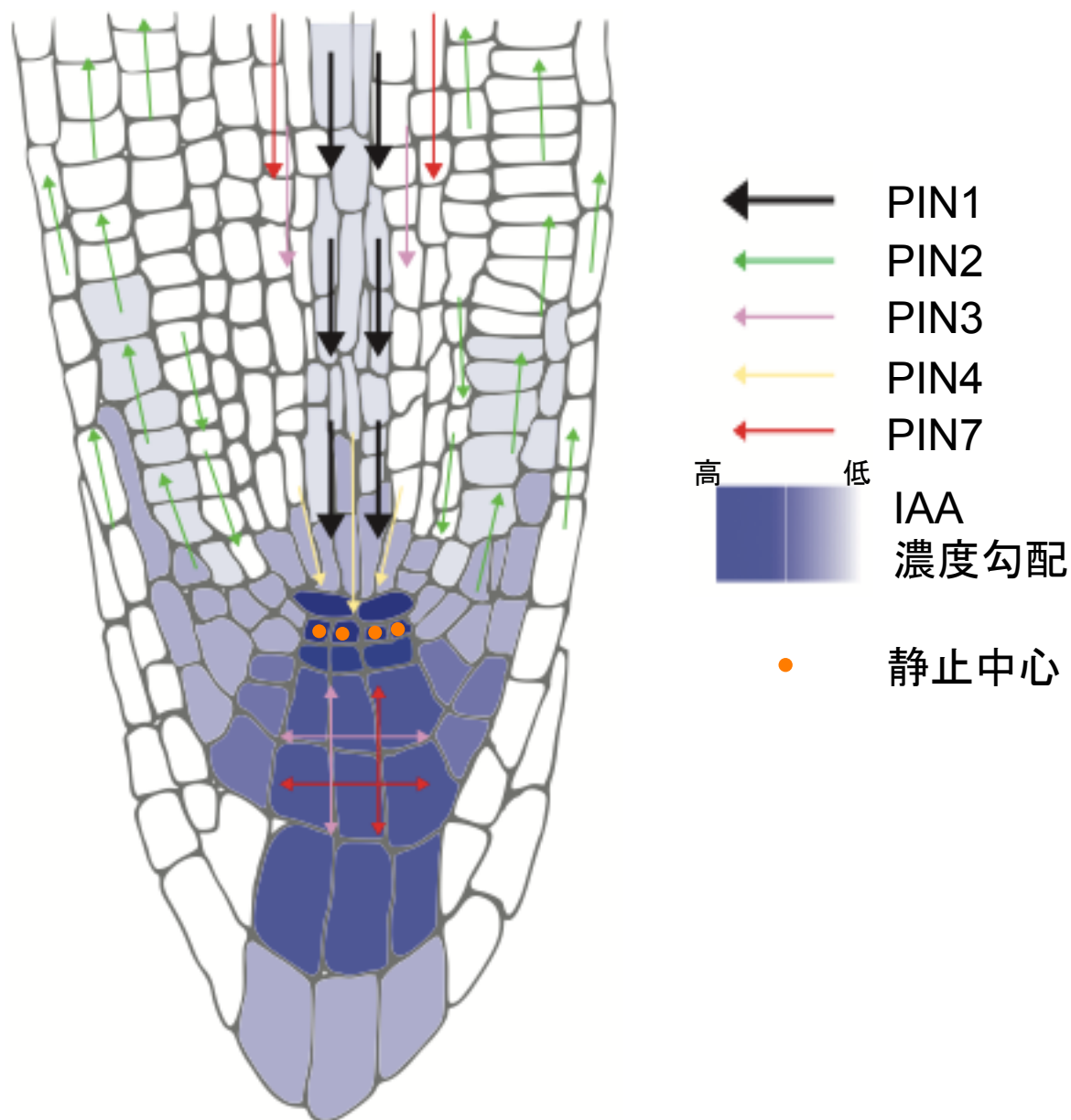
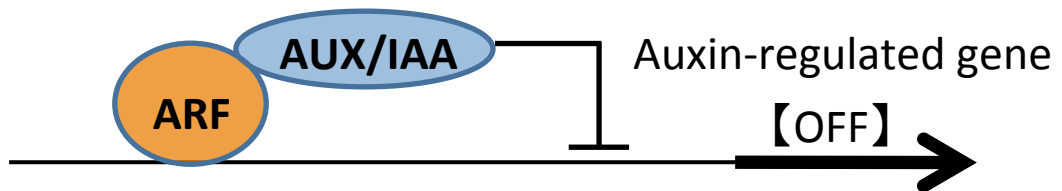


図1-2. シロイヌナズナ根端部におけるPINの分布と
オーキシンの極性輸送による濃度勾配

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

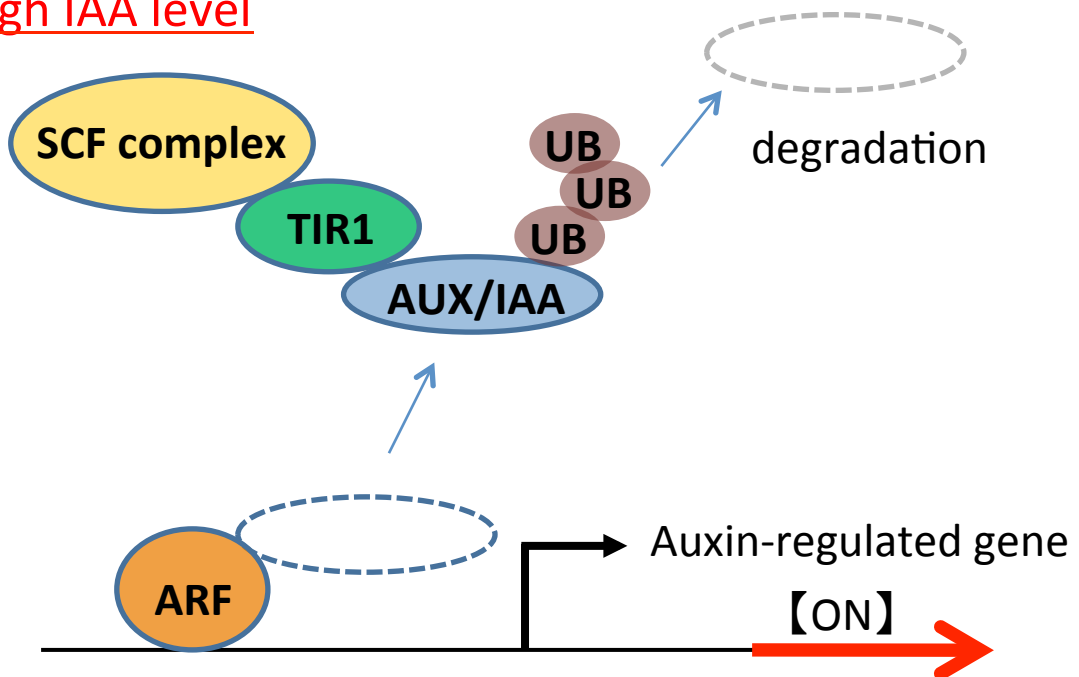


図1-3. AUX/IAAを介したIAAシグナル伝達経路の模式図

- 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があるために、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ン機能制御剤、特にオーキ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 オーキシン生合成阻害剤 AOPP の利用

前節でオーキ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 α -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。

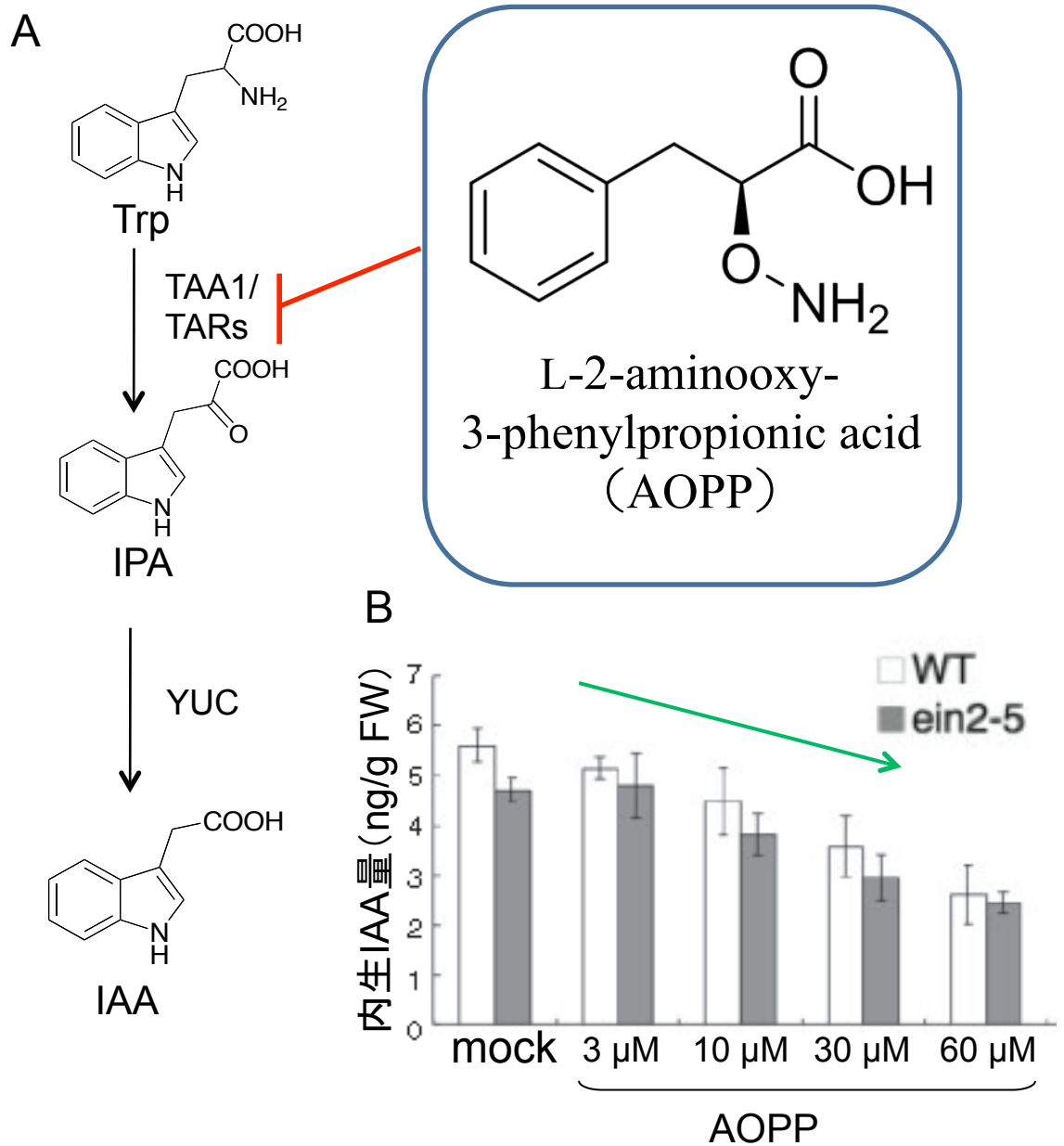


図1-4. AOPPの構造式と作用点

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

本章の内容は学術雑誌論文として出版する計画があるため公表出来ない。5年以内に出版予定である

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。

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

本章の内容は学術雑誌論文として出版予定であるため公表出来ない。5年以内
に出版予定である。

第4章 新規植物生長制御剤 HJ27 の作用点探索

緒言

本章の内容は学術雑誌論文として出版予定であるため公表出来ない。5年以内
に出版予定である。

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
とができるが、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 (C¹⁴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。

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 Ca²⁺ 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.