

論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻
平成22年度博士課程 入学
氏 名 石田 遥介
指導教員名 浅見 忠男

論文題目 阻害剤を利用したオーキシンの作用機構に関する研究

オーキシンは根の伸長・果実の肥大・光屈性など、植物の成長や環境応答を制御する植物ホルモンである。インドール酢酸 (IAA) は天然型オーキシンであり、インドール環を有するアミノ酸であるトリプトファン (Trp) から生合成される経路が主要経路として活発に研究されている。オーキシンシグナルはまず、F-box タンパク質 Transport Inhibitor Response 1 (TIR1) によるオーキシンの受容を介して伝えられる。現在提唱されているモデルでは、オーキシンと結合した TIR1 複合体が転写抑制タンパク質 AUX/IAA のユビキチン化と、その後のプロテアソームによる AUX/IAA 分解を促進することで、転写調節因子 Auxin Response Factor (ARF) の抑制を解除し、その結果オーキシン応答性遺伝子の発現誘導に伴うオーキシン作用が顕現される機構が示されている。しかしながら、IAA 生合成経路として複数の経路が示唆されていること・オーキシン作用の複雑さを反映してシグナル伝達にかかわる因子も多様であることから、未だオーキシンの生理作用の全容解明にはいたっていない。本研究ではオーキシンの作用機構の解明に向け、近年開発された生合成阻害剤と受容体阻害剤を利用したケミカルバイオロジーに基づいた研究を行った。

生合成阻害剤を用いたオーキシン生合成経路の解析

IAA の生合成経路は他の植物ホルモンと比べて複雑であり、各々の生合成中間体が多様に変換されつつ IAA 合成へと収束する網目状の生合成経路が提唱されてきた。さらに、イネ科・アブラ

ナ科・マメ科など実験材料ごとに異なる経路で IAA が生合成されることも報告されている。しかし最近の研究からインドールピルビン酸 (IPyA) 経路は主要な経路の 1 つであり、植物に共通して存在していると考えられるようになった。一方、*N*-ヒドロキシトリプトタミン (*N*-TAM) やトリプトフォール (TOL) などが、IAA 生合成中間体として植物共通であるかどうかは未解明のままである。これまでの IAA 生合成経路の研究では、外から投与した化合物の IAA への変換が各経路の存在証明の指標とされてきたために、生理的に作用する濃度範囲を超えた濃度領域が研究に使用されてきた。このことが IAA 生合成研究を複雑にしてきた要因であった。

L-Amino-oxypyphenyl propionic acid (AOPP) は本研究に先立って、初めて発見されたオーキシン生合成阻害剤である。トリプトファンアミノ基転移酵素 (TAA1) を阻害することで IAA 内生量の低下を引き起こすと考えられている。AOPP 含有培地でシロイヌナズナを生育させると主根の成長が阻害され、成長阻害は AOPP と IAA の同時処理によって回復する。このことから、AOPP 処理に伴う IAA 欠乏状態に起因して主根が成長阻害された植物に、生理濃度領域における IAA 中間体候補化合物を同時に処理し、主根形態の回復を観察することで、中間体候補化合物の探索系としての適用が可能になると考えた。また主根の形態回復と同時にオーキシン応答性遺伝子の発現レベルについても阻害回復からの指標として用いることで、オーキシンの生合成経路中間体候補化合物が実際に IAA に変換される可能性について検討した。シロイヌナズナの主根形態を指標とした試験 (長期的阻害) では、*N*-TAM と TOL で主根形態が回復した。オーキシン応答性 *Aux/IAA* 遺伝子を指標とした試験 (短期的阻害) では、*N*-TAM では遺伝子発現が回復したが、TOL では回復しなかった。また、これまで中間体化合物としてシロイヌナズナでその存在と代謝酵素が確認されている他の化合物の共処理に伴い、植物は AOPP による根の成長阻害と遺伝子発現阻害状態から回復した。以上のように、AOPP によるオーキシン欠乏状態からの回復試験により、各種インドール化合物が IAA 生合成中間体となりうる可能性について初めて網羅的に検討することができた。

AOPP はもともとフェニルアラニンの代謝に関与する、Phenylalanin ammonia lyase (PAL) の阻害剤として発見されたことから明らかなように、オーキシン生合成阻害剤としての特異性が低い。そこで、TAA1 に対する特異性がより高い生合成阻害剤や TAA1 以外の酵素を標的とする化合物の探索による新たな生合成阻害剤の開発が期待される。本論文では新規 IAA 生合成阻害剤候補化合物として 2-(1H-indol-3-yl)-2-oxoethyl phosphonic acid (IOEP) の解析を行った。最近になって AOPP よりも特異性が高いと考えられるキヌレニン (Kyn) が報告されたが、TAA1 以外の作用点を阻害する化合物は報告されていない。作用点の異なる新規生合成阻害剤の開発により、オーキシン生合成の更なる解明が期待される。IOEP 含有培地でシロイヌナズナを育成すると主根の伸長阻害が観察された。この時、オーキシン応答性遺伝子 *Aux/IAA* の発現レベルと

IAA 内生量が減少したことから、IOEP が IAA 生合成阻害剤であることが示唆された。IOEP が阻害する作用点を見いだすため、各種中間体処理に伴う IOEP による *Aux/IAA* 遺伝子の発現阻害状態からの回復を調べた。IOEP で処理したシロイヌナズナ芽生えに IPyA を加えた場合、*Aux/IAA* の発現量は芽生えを IPyA 単独で処理したときよりも有意に抑制された。それに対して AOPP で処理したシロイヌナズナに IPyA を加えた場合は、オーキシン応答性遺伝子の発現量は IPyA 単独で芽生えを処理したときとの差はみられなかった。以上の結果から、IOEP が AOPP とは異なる作用点を持つ新規 IAA 生合成阻害剤である可能性を示すことができた。

AOPP 応答性転写因子 *Dof3.2* の機能解析

植物のオーキシン応答は、オーキシン受容後 ARF によって発現が誘導される遺伝子によって引き起こされる。しかしながら、従来のオーキシン応答性遺伝子の研究は外生のオーキシン過剰投与時のオーキシン応答を見ているため、生理レベルのオーキシン濃度に応答する遺伝子の発現制御機構に関する研究は不足している。そこで、オーキシン欠乏状態で発現変動する遺伝子がオーキシンの生理作用に重要な役割を担っていると考え、AOPP によって発現変動するシロイヌナズナ転写因子に注目し、オーキシンの作用を調節する転写因子とその下流で機能する遺伝子群の探索を試みた。AOPP をシロイヌナズナに処理し、DNA マイクロアレイ解析を行うことで応答性遺伝子の中から転写因子を探索した結果、AOPP によって発現が上昇する遺伝子として Dof 型転写因子 *Dof3.2* を見いだした。

Dof3.2 の機能を解析するため、転写因子を人工コルチコイドであるデキサメタゾン (DEX) で機能誘導できる実験系を用いた。*Dof3.2* とグルココルチコイド受容体の融合遺伝子を過剰発現させた形質転換株シロイヌナズナ (*p35S::Dof3.2-GR*) を DEX 含有培地で育成させると、根の伸長と根毛の形成が著しく抑制された。根の伸長と根毛の形成はオーキシンによって促進されていることから、*Dof3.2* はオーキシンの作用を抑制する機能を持つことが示唆された。

Dof3.2 によって制御される遺伝子を調べるため、*p35S::Dof3.2-GR* に DEX を 3 時間処理した際に発現変動する遺伝子をマイクロアレイによって調べた。マイクロアレイデータ解析ツール AtCAST (<http://atpbsmd.yokohama-cu.ac.jp/>) を用いて、得られた結果を約 200 種類の公開マイクロアレイデータと比較解析したところ、オーキシン関連変異体である *arf2-6*、*axr3-1* (AUX/IAA17 機能獲得優勢変異体) やオーキシン阻害剤 2,4,6-T 処理のマイクロアレイ結果と相関があることがわかった。これらの遺伝子発現プロファイル間で共通して発現変動する遺伝子を調べたところ、細胞壁構造の構築に関わるエンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素 (XTH) ファミリーのうち *XTH12*、*XTH13*、*XTH14*、*XTH26* (*XTH genes* と呼ぶ) を含む遺伝子群の発現が共通して抑制されていることがわかった。

XTHは細胞壁のセルロース微繊維を架橋する多糖であるキシログルカン分子の繋ぎ換え・切断を通じて細胞の伸長を制御する酵素群である。オーキシンによる細胞伸長にはXTHによる細胞壁の再構成が関与していると考えられるが、オーキシニングナルによるXTHファミリー遺伝子の発現制御機構は不明のままである。そこで、Dof3.2の機能誘導で発現抑制されるXTH genesが、オーキシン情報伝達因子であるTIR1-AUX/IAA-ARFの下流で発現制御されている可能性を調べるため、Kynと受容体阻害剤PEO-IAAを用いてXTH genesの発現解析を行った。XTH genesの発現は、IAA単独処理では上昇しないがKynとPEO-IAAによって抑制され、IAAとの共処理によって回復した。このことからXTH genesがオーキシン情報伝達系を経由して発現制御されていることを示すことができた。

RNAiによってDof3.2がノックダウンされた形質転換シロイヌナズナ(RNAiDof3.2株と呼ぶ)では、野生型株に比べて主根が長く、根におけるXTH genesの発現レベルは野生型株に比べて高かった。また、RNAiDof3.2株の根では野生型株に比べてKynに対する感受性が低かった。

以上の結果から、Dof3.2はオーキシニングナルの下流で働くXTH genesの発現を抑制し、細胞伸長を制御する転写因子であることを示すことができた。

オーキシン作用に関わる遺伝子の探索

これまで、オーキシンによって制御される遺伝子として外からオーキシンを過剰投与した際に応答する遺伝子が解析されてきた。しかしながら生合成阻害剤を利用した遺伝子機能探索の過程で、XTH genesのようにオーキシン処理によっては発現誘導されないがオーキシニングナルの下流で機能する遺伝子群を明らかにすることができた。そこでさらなる新規のオーキシン作用関連遺伝子探索のため、受容体阻害剤PEO-IAAによって発現変動がみられるシロイヌナズナ遺伝子をDNAマイクロアレイを用いて調べた。

オーキシン関連遺伝子のグループとして、①：オーキシン応答性Aux/IAAのようにPEO-IAAで発現が抑制されIAA単独で誘導される遺伝子群と、②：XTH genesのようにPEO-IAAで発現が抑制されPEO-IAAとIAAの共処理で発現が回復するがIAA単独では発現誘導されない遺伝子群に分けたところ、②の遺伝子群はおおむねオーキシン信号伝達の変異体axr3-1でも発現変動していることがわかった。これまで注目されてこなかった②に属する遺伝子群がオーキシンによる細胞の伸長などに機能する可能性が高く、今後はこれらの遺伝子の機能解析によりオーキシンによる植物の成長の仕組みを解明することができると考えられる。