

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 石田 遥介

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。天然型オーキシンはインドール酢酸 (IAA) 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。オーキシンは F-box タンパク質 Transport Inhibitor Response 1 (TIR1) によって受容され、シグナルが伝えられる。オーキシんと結合した TIR1 は転写抑制タンパク質 AUX/IAA をユビキチン化し、プロモーターに結合して転写調節をおこなう Auxin Response Factor (ARF) によるオーキシン応答性遺伝子の発現を誘導することでオーキシンの作用がもたらされるというモデルが示されてきた。しかしながら、生合成経路の複雑さ・オーキシン作用に関わる遺伝子の多様さのため、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を利用することでオーキシン作用機構の解明をめざした。

2章では2つの低分子プローブを用いて生合成経路の解析を行った。L-amino-oxypheyl propionic acid (AOPP) はシロイヌナズナ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 内生量を低下させる、オーキシン生合成阻害剤である。AOPP 含有培地でシロイヌナズナを育成すると主根の伸長の阻害と傾斜が観察される。これらの伸長阻害と傾斜の形態は IAA と AOPP との同時処理によっては観察されなくなる。IAA 中間体化合物を IAA 欠乏状態の植物に処理した場合、IAA 内生量を回復した結果と予想される応答が観察される。このことから主根の形態回復とオーキシン応答性遺伝子の発現レベルを指標として、オーキシンの生合成経路中間体と考えられる化合物が実際に IAA に変換されるか検証をおこなった。シロイヌナズナで、各種の中間体化合物が AOPP によるオーキシン欠乏状態を回復できるか試験を行った。主根形態を指標とした試験では、N-TAM と TOL 処理により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では、N-TAM 処理では遺伝子発現が回復したが、TOL 処理では回復しなかった。これまで中間体化合物としてシロイヌナズナで存在が確認され、変換酵素が見つかった化合物は AOPP 処理による根の形態・遺伝子発現変化を回復した。以上のように、AOPP 処理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かを網羅的に調べることができた。2章後半では、新しい化合物 2-(1H-indol-3-yl)-2-oxoethyl phosphonic acid (IOEP) の解析を行った。その結果、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。

3章では新しい Dof 型転写因子の機能解析を行った。オーキシンの受容されると転写抑制型タンパク質 AUX/IAA が分解され、ARF がオーキシン応答性遺伝子を発現制御することでオーキシン応答が引き起こされる。これまで、ARF によって発現が誘導される遺

伝子にはオーキシン応答性 *AUX/IAA* があり、フィードバック制御に関わることが知られている。しかしながら、根の伸長や光屈性などオーキシンが関与する現象に関わることが知られている遺伝子は限られている。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作用に関与すると考え、AOPP によって発現変動する転写因子に注目し、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。転写因子の探索には AOPP をシロイヌナズナに処理したマイクロアレイの結果を参考にした。AOPP 処理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* をみいだした。*Dof3.2* の機能解析のため、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リコンビナントタンパク質を過剰発現させたシロイヌナズナ (*35S::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制御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も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、*35S::Dof3.2-GR* に DEX を短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。得られたマイクロアレイ結果を既存ホルモン関連マイクロアレイ結果との関連を解析したところ、オーキシン関連変異体である *arf2*、*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との関連が示唆された。これらのマイクロアレイ結果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*)ファミリーの遺伝子の発現が共通して抑制されていることがわかった。これら *XTH* 遺伝子は TIR1-AUX/IAA-ARF の下流でも発現制御されているかを調べるため Kyn と受容体阻害剤 PEO-IAA を用いて *XTH* の発現解析を行った。*XTH* は IAA 単独では発現誘導されないが、Kyn と PEO-IAA によって発現が抑制され、IAA との共処理によって発現が回復した。このことから *XTH* がオーキシンによっても制御されていることがわかった。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*) では、野生型株に比べて主根が長く、根における *XTH genes* の発現レベルも野生型株に比べて高かった。*RNAiDof3.2* 株を Kyn 含有培地で育成すると野生型株に比べて主根伸長の阻害が抑えられた。以上から、*Dof3.2* はオーキシンシグナルの下流ではたらく *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が示唆された。4 章では、オーキシン阻害剤を用いたマイクロアレイ解析を行い、*XTH* 遺伝子のようにこれまでに知られていないオーキシン応答性遺伝子が多数存在することを明らかにした。

以上のように本研究において、様々なオーキシン関連の阻害剤を活用することで、生合成経路の解析や、新しい転写因子の機能解明が可能になることを示すことができた。また、転写因子研究の過程で、これまでに知られていなかったより低濃度のオーキシンに応答する遺伝子群が存在することも明らかにした。このように本研究はオーキシン作用機構を解明するために重要な知見を与え、学術的にも優れた成果を挙げている。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あるものと認めた。