

機関番号：11201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21780305

研究課題名（和文）システム生物学的アプローチによるオーキシシン様除草剤の細胞毒性解明

研究課題名（英文）Systems biology approach in unraveling the mechanism of cellular toxicity of auxinic herbicide

研究代表者

ラーマン アビドゥール（RAHMAN ABIDUR）

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：30447114

研究成果の概要（和文）：オーキシシン様除草剤（2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、2,4-D）は、耕作地において雑草を枯死させる目的で広く用いられている。しかし、双子葉類を枯らす分子機構は明らかとなっていない。以前、我々は 2,4-D が細胞骨格を分解し、オーキシシンとは独立した新規の経路によってアポトーシスを誘導するという証拠を示した（Rahman et al., 2007; Takahashi et al., 投稿準備中）。これらの結果は、2,4-D の除草効果は一般的に信じられているオーキシシン毒性とは異なる細胞に対する毒性と強くリンクしていることを示した。2,4-D の作用機構と細胞毒性の分子機構をさらに明らかにするため、オミックス、バイオインフォマティクスそして逆遺伝学を含むシステムバイオロジーの手法を用いた。IAA と 2,4-D 処理時のトランスクリプトーム比較によって 2,4-D 応答遺伝子セットを同定した。2,4-D 特異的応答性遺伝子の遺伝子オントロジー解析は細胞骨格とアポトーシスに関連した遺伝子のグループを明らかにし、2,4-D はアクチン分解とその後のアポトーシスを通して植物を枯らすということを示した。この経路を制御するタンパク質の機能を理解するために逆遺伝学的アプローチを用いた。

研究成果の概要（英文）：The auxinic herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is widely used to kill the weeds in crop fields. However, the molecular mechanism how it kills the dicot remains elusive. Previously, we provided evidence that 2,4-D degrades the cell cytoskeletal machinery and induces apoptosis through a novel auxin independent pathway (Rahman et al., 2007; Takahashi et al., manuscript in preparation). These results confirmed that the herbicidal action of 2,4-D is tightly linked to cellular toxicity instead of commonly believed acute auxin toxicity. To further clarify the mode of action of 2,4-D and unravel the molecular mechanism of its cellular toxicity, a systems biology approach was taken, which includes omics, bioinformatics and reverse genetics. Comparative transcriptome analysis between IAA and 2,4-D, identified distinct set of genes that are specifically responsive to 2,4-D. The Gene Ontology annotation analyses of these 2,4-D responsive genes reveal a group of genes that are linked to cell cytoskeletal component and apoptosis, confirming that 2,4-D kills the plant through actin degradation and subsequent apoptosis of cells. To understand the functional roles of the proteins that regulate this pathway, a reverse genetic approach has been taken.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,400,000 円	720,000 円	3,120,000 円
2010 年度	1,100,000 円	330,000 円	1,430,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000 円	1050,000 円	4,550,000 円

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：herbicide, 2,4-D, auxin, actin, apoptosis, transcriptome

1. 研究開始当初の背景

2,4-D は耕作地での使用において長い歴史のあるオーキシシン様除草剤である。2,4-D が除草剤として繁用され世界的に第3位の消費量を誇るのには、低コストで、選択的除草作用をもち、比較的安全であるためである。しかし、多用されているにも関わらずその除草作用の原因となるメカニズムについても、環境への影響も十分に評価されていない。最近の研究によって、2,4-D は動物、植物のシステムへ共通して有害な影響を与えることが示された。2,4-D は植物のアクチンを分解し(Rahman et al., 2007)、一本鎖 DNA を破壊し(Ateq et al., 2005)、神経毒を引き起こす(Ton et al., 2006)。また、小脳顆粒細胞において、微小管の集合を分解させることで神経突起の生長を阻害する (Rosso et al., 2000)。 *C. riparius*, はたつた $10\mu\text{g}\ \mu\text{l}^{-1}$ の投与で性別の割合が変化した (Park et al., 2010)。これらの結果は明らかに 2,4-D の除草作用が細胞毒性とリンクしており我々の環境を脅かす可能性があることを示している。

これまでのところ植物における 2,4-D の除草作用は急性のオーキシシン毒性のためであるとされていたが、この仮説を支えるような明確な実験に基づいた証拠はない。最近の仮説では Raghvan et al., (2005; 2006) によって、ABA とエチレンが 2,4-D の除草作用に関連しているという報告がある。なぜならば、高濃度の 2,4-D が ABA とエチレンに関連した遺伝子を誘導しておくため、2,4-D の除草作用は ABA とエチレンに制御されているのではないかと仮説が立てられている。2つの潜在的な問題がこの仮説には存在する。1) ABA やエチレンの過剰発現は植物を枯死させるには至らない。たとえば、野生型に比べて 10-20 倍のエチレンを生産する *eto1-1* 変異体は通常の生殖ライフサイクルを示す (keiber et al., 1983)。2) ABA かエチレンによる除草効果の制御もまた 2,4-D の選択的性質を説明するものとはならない。ABA と ethylene の制御は単子葉類と双子葉類で類似していると報告されている。総じて、これらのことにより、上記の仮説は全く不確かであることを示している。我々の発見によると、2,4-D の除草作用は新規の因子による細胞毒性によるものであると仮説を立てている。以前、我々は 2,4-D はアクチンを分解するのに対し、内生オーキシシンである IAA ではそれが生じないことを示した(Rahman et al., 2007)。加えて、我々は、IAA ではなく 2,4-D でのみ

シロイヌナズナにおいて細胞死が誘導されることを発見した (Rahman et al., 未発表データ)。総じて、これらの結果は、2,4-D によるアクチン細胞骨格の制御がこの細胞毒性の説明との関連性を持っていないことを示している。興味深いことに、アクチンのアイソフォームにおけるドミナント・ネガティブ変異はトリコブラストにおいて細胞死を引き起こし (Nishimura et al., 2003) アクチンを破壊し、花粉管でアポトーシスを引き起こしている (Thomas et al., 2006)。まとめると、これらの結果は、2,4-D が引き起こす細胞毒性と除草作用において、“アクチンを介したアポトーシス” というシンプルな仮説を導く。

2. 研究の目的

このプロジェクトの主な目的は 1) 2,4-D が引き起こすアクチン分解とアポトーシス制御に関わっている分子の構成を明らかにすること 2) 制御因子の分子ネットワークを構築すること 3) この制御の機能の特徴づけを行うことである。

3. 研究の方法

我々は今回提案したプロジェクトに明確な答えを出すためシステムバイオロジーを用いた。2,4-D によるアクチン分解とアポトーシスを制御する分子機構を明らかにするため、我々はゲノムの幅広いトランスクリプトームの変化を 2,4-D と IAA の有無で比較した。バイオインフォマティクスはトランスクリプトームのデータを解析するために用いられ、アクチン細胞骨格の維持やアポトーシスにリンクしているターゲット遺伝子が同定された。2,4-D の除草剤活性を制御している同定した遺伝子の機能は逆遺伝学的アプローチによって解析した。

4. 研究成果

ゲノムの幅広いトランスクリプトーム解析は、別々の遺伝子セットが 2, 4-D によって上昇もしくは抑制されることを明らかにした

以前我々はシロイヌナズナの根のメリステムにおいて $3\mu\text{M}$ の 2,4-D で細胞死が生じるが IAA では生じないことを発見した(図 1)。我々はこの違いを利用し、細胞死のプロセスに関わっている分子レギュレーターを導くデータを得るために慎重にマイクロアレイの実験をデザインした。加えて、アクチン細胞骨格の制御に関連している分子の構成要素を見つけることを期待した。

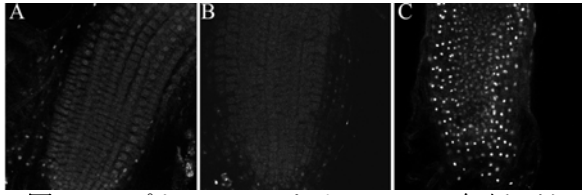


図 1: アポトーシスのための TUNEL 解析. 対照区の根の代表例 (A), 3 μ M IAA 処理を行った根 (B), 3 μ M 2,4-D 処理を行った根.

3 μ M 2,4-D と IAA 処理を行ったシロイヌナズナ根における相対的なトランスクリプトーム解析は 2,4-D によって明確に上昇もしくは抑制されている遺伝子のサブセットを明らかとし、2,4-D と IAA は異なる細胞内経路によって制御されていることを明らかとした。遺伝子は 2 つのカテゴリーに分けた 1) 対象区と比較して 2,4-D と IAA 処理で 3 倍以上上昇か下降しているもの、2) 2,4-D、IAA それぞれと比較して 3 倍以上誘導されていること、に基づいてスクリーニングをさらに行った。このスクリーニングの結果、上昇している遺伝子が 386、下降している遺伝子が 1760 特異的に 2,4-D とリンクしていることを発見した。2,4-D 経路のポジティブレギュレーターを見つけるため、上昇している遺伝子に注目した。

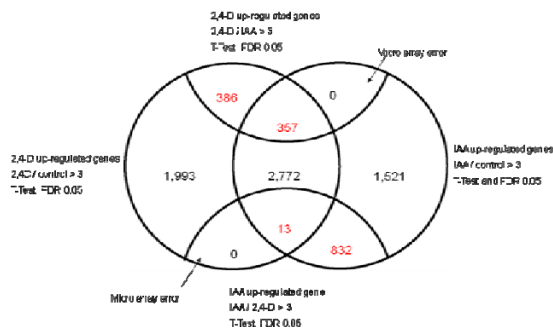


図 2: 2,4-D と IAA に対する応答の転写プロファイル

遺伝子のオントロジーアノテーションは、アクチン細胞骨格の制御と細胞死にリンクしている 2,4-D 特異的な遺伝子を明らかとした

我々は次に、バイオインフォマティクスを用いて、機能的な役割を持つ可能性のある遺伝子を分類した。最も大きいグループは、細胞骨格と細胞死に関連していることが明らかとなった。我々はさらに、RT-PCR を用いてマイクロアレイのデータ (データ未記載) の確認を行い、細胞骨格と細胞死に関連する遺伝子を 14 まで絞った (表 1)。

表 1: アクチン細胞骨格と細胞死に関連する、2,4-D によって制御されている遺伝子リスト

Probe ID	Normalized expression ratio 2,4-D/IAA	P value	Gene ID	Gene Annotation
P764629	3.5	0.005	At4g28566	RIC7
P10392	3.5	0.007	At4g28560	RIC7
P17352	40.0	0.002	At3g05140	RBK2
P12404	5.7	0.002	At1g55610	BRL1
P16055	4.0	0.002	At1g35612	TE
P153188	3.4	0.055	At5g32616	TE
P18859	3.1	0.0008	At1g64240	TE
P221148	11.2	0.0002	At5g57810	TET15
P14088	6.7	0.005	At5g60220	TET4
P18338	3.99	0.0003	At3g16770	AtEBP
P169543	3.78	0.005	At1g32540	LOL1
P13759	282	0.0007	At3g62610	MYB11
P11762	3.44	0.004	At3g28910	MYB30
P13376	3.88	0.005	At1g74430	MYB95

これらの遺伝子はさらに以下を含む 5 つの機能的なカテゴリーに分類された。1) アクチン経路のレギュレーター (赤で表示) 2) トランスポゾン (青表示) 3) 動物のテトラスパニンにおいて細胞死に関連するタンパク質 (紫で表示) 4) 転写因子 (緑で表示) 5) LSD1 様のタンパク質 LOL1 で、植物特異的であり、プログラム細胞死とエチレン応答性の DNA 結合タンパクである ATEBP に関係することが示されている。

TE ファミリーの遺伝子は細胞死の誘導に関連する可能性があるため、このファミリーのシロイヌナズナにおける 2,4-D と IAA への応答をさらに調べた。驚いたことに、テストされたすべてのトランスポゾン遺伝子は 2,4-D でのみ特異的に誘導され、IAA ではそれが生じなかった (図 3)。2,4-D の誘導は 3~20 倍の間の範囲であり、この遺伝子ファミリーは 2,4-D に誘導される細胞死を制御している可能性がある。

同定した分子レギュレーターの機能決定における逆遺伝学的アプローチ

2,4-D 誘導性のアクチン分解と細胞死において、これらの遺伝子ファミリーの機能を明らかとするため、我々はそれぞれの遺伝子で T-DNA 挿入変異体を解析している。我々はジェノタイプングによって T-DNA 挿入変異体のホモ体を作成中であり、これらの変異体でフェノタイプと 2,4-D 応答を解析している。いくつかの遺伝子は複数コピーを持っており、重複して機能しているため、単体

の遺伝子のノックアウトはおそらく異常なフェノタイプや2,4-D耐性を示さない。よって、我々は現在二重、三重変異体を作出中である。

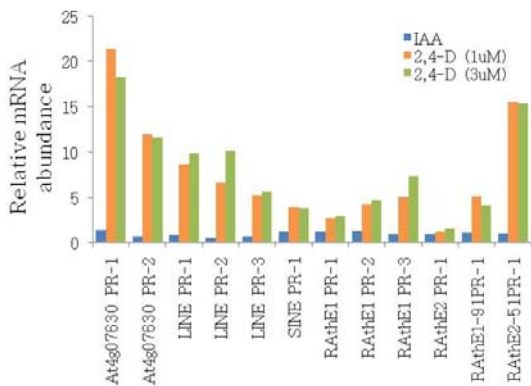


図3: 2,4-D処理はシロイヌナズナにおいてレトロトランスポゾンを上昇させる。IAA (3µM) と2,4-D(1µM, 3µM)処理した植物由来の cDNA を用いたqRT-PCRを行いレトロトランスポゾンの転写レベルを調査した。

加えて、今回のマイクロアレイ実験のトランスクリプトーム解析はこのプロジェクトへ大きな情報をもたらしたため、これらは他の研究者が使用している公共のデータベースと入れ替わることになるだろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件) 論文は全て査読有

1. Rahman A*, Takahashi M, Shibasaki K, Wu S, Inaba T, Tsurumi S, Baskin TI (2010)

Gravitropism of *Arabidopsis thaliana* roots requires the polarization of PIN2 toward the root tip in meristematic cortical cells. *Plant Cell* 22: 1762-1776

*Corresponding author

2. Baskin, TI, Peret, B, Baluška, F, Benfey, PN, Bennett, M, Forde, BG, Gilroy, S, Helariutta, Y, Hepler, PK, Leyser, O, Masson, PH, Muday, GK, Murphy, AS., Poethig, S, Rahman, A, Roberts, K, Scheres, B, Sharp, RE, and Somerville, C. (2010) Shootward and rootward: peak terminology for plant polarity. *Trends in Plant Science* 15: 593-594

3. Shibasaki K, Uemura M, Tsurumi S, Rahman A* (2009) Auxin response under cold stress: underlying molecular mechanisms. *Plant Cell* 21:3823-3838

*Corresponding author

4. Sukumar P, Edwards KS, Rahman A, DeLong A, Muday GK (2009) PINOID kinase regulates root gravitropism through modulation of PIN2-dependent basipetal auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 150: 722-735

[学会発表] (計 13 件)
(Invited talk)

1. Rahman, A. Indole-3-acetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid: a tale of two auxins. Invited speaker for “Special Biology Seminar” Biology Department, University of Massachusetts, Amherst, MA, U.S.A- February 28, 2011

2. Rahman, A. Auxin response in *Arabidopsis* under cold stress: underlying mechanisms, Invited speaker for “Biology Seminar” Biology Department, Howard University, Washington D.C.-U.S.A- February 23, 2011

4. Rahman A. Auxin response under cold stress: underlying molecular mechanisms- Invited speaker for Plant Biology 2010 spring seminar series, Noble Foundation, Ardmore, Oklahoma, U.S.A-Feb 11, 2010

4. Rahman, A. Actin-auxin interaction in regulating root growth and development- Invited speaker for “Special Biology Seminar” Wake Forest University, Winston-Salem, N.C., U.S.A- Aug 4, 2010

5. Rahman A. Auxin response under cold stress: underlying molecular mechanism-Plant Science Centre Seminar, RIKEN, Yokohama-November 9, 2009

6. Rahman A. Transcytosis of PIN2 in *Arabidopsis* is regulated by protein phosphatase2A and PID Kinase.-Invited speaker for “auxin minisymposium” in Plant Biology 2009, held at Hawaii, U.S.A. July 18-22- 2009

7. Rahman A. Science and the life of a plant biologist. Invited Guest Professor Lecture. Kobe University, Kobe, Japan-April 24, 2009

(Poster Presentation)

8. Rahman A, Takahashi M, Shibasaki K, Wu S, Inaba T, Tsurumi S, Baskin TI (2010)- Auxin response under cold stress: underlying molecular mechanisms. Abstract No.03008-21st

International conference on Arabidopsis Research,
Yokohama, Japan., 2010.6.6~10

9. Takahashi M, Oono Y, Rahman A (2010)-
SMAP1 acts as a positive regulator for
2,4-dichlorophenoxyacetic acid mediated actin
degradation and acts independent of known
signaling pathway. Abstract No.12045-21st
International conference on Arabidopsis Research,
Yokohama, Japan., 2010.6.6~10

10. Kawamura K, Rahman A (2010)- Role of
Indole-3-butyric acid in Arabidopsis root growth.
Abstract No. P1B042; 51st Annual meeting of the
Japanese Society of Plant Physiologists,
Kumamoto, Japan,2010.3.18~21

11. Rahman A, Takahashi M, Shibasaki K,
Shuang W, Baskin TI- Transcytosis of PIN2 in
Arabidopsis is regulated by protein phosphatase
2A and PID kinase. Abstract No. P53005; Plant
Biology 2009, July 18-22, 2009; Honolulu,
Hawaii, USA

12. Shibasaki K, Uemura M, Tsurumi S, Rahman
A- Auxin response under cold stress: underlying
molecular mechanism. Abstract No. P34002;
Plant Biology 2009, July 18-22, 2009; Honolulu,
Hawaii, USA

13. Takahashi M, Yutaka O, Rahman A – SMAP
is a positive regulator for 2,4-dichlorophenoxy-
acetic acid mediated actin degradation and acts
independent of known auxin signaling pathway.
Abstract No. P34039; Plant Biology 2009, July
18-22, 2009; Honolulu, Hawaii, USA

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://news7al.atm.iwate-u.ac.jp/~abidur/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

ラーマン アビドゥール (RAHMAN ABIDUR)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：30447114