

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01828

研究課題名(和文)植物ホルモン応答の細胞選択的な制御システムの構築

研究課題名(英文)Cell specific manipulation of plant hormone responses

研究代表者

林 謙一郎 (Hayashi, Ken-ichiro)

岡山理科大学・理学部・教授

研究者番号：30289136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：オーキシンの偏差濃度分布の調節は、植物の成長制御に重要である。オーキシンの濃度分布を自在に制御する目的で、新しいホルモNDERIPARISシステムの開発に挑んだ。本課題では、不活性型オーキシナンalogを代謝活性化する微生物酵素を探索し、植物に酵素遺伝子を形質転換することで特定の細胞で活性化酵素を発現させることに成功した。本システムはオーキシンの濃度分布を人為的に制御する技術として、オーキシンの生理応答の時空間的な解析に活用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Asymmetric auxin distribution plays a crucial role in plant growth and development to adapt the environmental stimulus. The local biosynthesis of IAA and the inactivation and degradation of IAA would also contribute to the modulation of auxin distribution. We present that new auxin application system using inactive auxin-prodrug and its metabolic activation enzyme. The IAA-prodrug activating enzyme (IAP) was cloned and expressed as GFP-IAP fusion protein in *E. coli* and *Arabidopsis thaliana*. Transgenic plant expressing GFP-IAP showed auxin-induced phenotypes when IAA-prodrug was applied. This new tools would be useful tools to dissect the spatiotemporal dynamics of IAA distribution leading to cell-specific auxin responses.

研究分野：生物有機化学

キーワード：オーキシン ケミカルバイオロジー 植物ホルモン

1. 研究開始当初の背景

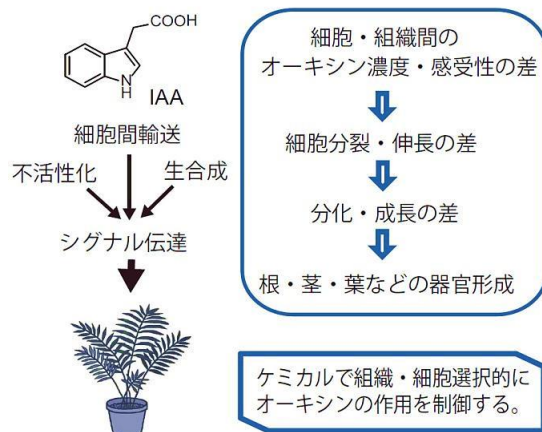
オーキシンであるインドール 3-酢酸 (IAA) は胚発生、花芽形成、側根形成、頂芽優勢、光・重力屈性など、植物の分化・成長のあらゆる局面に関与する。このように単純な分子である IAA が、他の植物ホルモンと協調して植物の複雑な形態形成や多様な環境応答を調節することから、オーキシンは植物ホルモンの”マスターレギュレーター”ともよばれている。現在までに、オーキシンのホルモン作用は、①～③の3つのステップで調節されることが明らかとされ、それら各ステップに関わる主要な遺伝子が同定された。

①オーキシンの生合成・代謝調節: 2段階の酵素反応で IAA が生合成されるとともに、IAA は不活性化されて IAA 量が調節される。

②オーキシンの極性輸送: 環境刺激などに対応して、IAA を能動的に輸送することで細胞間・組織間でホルモン濃度勾配を形成する。

③オーキシンのシグナル伝達: IAA は、核内受容体に結合し、一連のオーキシン応答性遺伝子群の発現調節を行う。

これらの3つの調節段階で、オーキシンの合成・代謝・輸送とシグナル伝達に関する制御メカニズムが働き、ホルモン濃度分布を制御することにより、組織・細胞特異的な成長・分化が調節される。すなわちオーキシン濃度分布の制御が、植物個体の統合的な成長調節にきわめて重要であると考えられている。



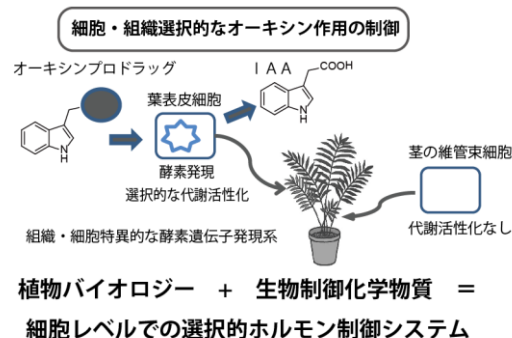
極めて単純な分子である IAA が、植物の複雑な成長・分化を、どのように調節しているのか？オーキシンによる成長制御には、ホルモン作用の時空間的な制御がきわめて重要であると考えられている。すなわち、オーキシンの濃度勾配が形成され、ある特定の細胞・組織でのホルモン濃度が高くなることで、一連の生理反応が引き起こされると考えられている。また、農業上も、特定の組織(イネ科作物の葯や綿花の胚珠)のオーキシン含量が、イネの高温障害や綿花の収量・品質にも大きく関係すると報告されている。

2. 研究の目的

オーキシンに関わる合成酵素、輸送体、受容

体をコードする遺伝子が同定されたが、それら遺伝子群の時空間的な機能解析は、十分には達成されていない。このことから、オーキシンの作用を統合的に理解するには、特定時期の特定組織・細胞における、オーキシン濃度や感受性の調節機構を解明することが極めて重要である。そこで、本研究では、オーキシン作用を組織・細胞選択的に制御する技術を開発することを目的として、遺伝子組換え植物とケミカルツールを融合した新しいドラッグデリバリーシステムを開発する。

循環器系をもち、ペプチドやタンパク質をホルモンとして利用する動物とは異なり、オーキシンを含めて低分子有機化合物である植物ホルモンにおいては、そのホルモンの時空間的な濃度制御がきわめて重要である。それら、ホルモン濃度を自在に制御するために、オーキシンやサイトカニンなどの投与を光乖離反応で、制御することができるケージドホルモン(光遊離基で不活性化したホルモン)が報告されている。しかしながら、ケージドホルモンでは、光分解反応によるホルモン応答が一過性であるため、持続性に問題があり、かつ植物の成長に必要な光照明下での使用に制限があるため、根での使用に限られていた。このケージドオーキシンの制限を克服するために、標的細胞・組織でのみオーキシンを放出することが可能な、細胞レベルまで分解能を高めた新しいオーキシンの細胞・組織分布を制御する手法が強く求められている。



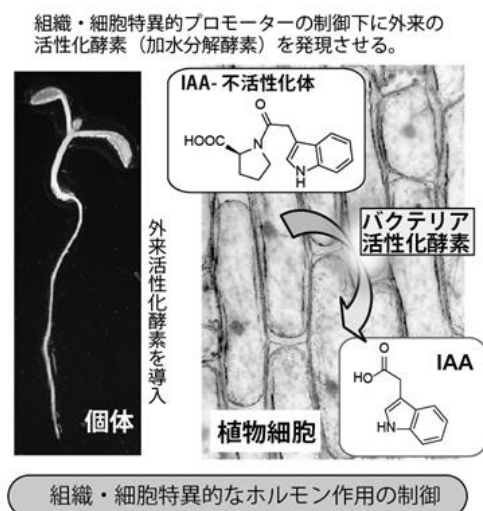
これまで、薬剤の安定性、組織移行性などを改良するために、活性化化合物(受容体・生合成阻害剤)などを化学修飾することにより不活性化するプロドラッグ化が、盛んに利用されてきた。しかしながら、通常、プロドラッグ化された薬剤は内因性の代謝酵素で活性化されるため、その活性化部位は、内在性酵素の発現部位に依存し、自在にコントロールすることは不可能であった。本研究では、ケミカルによる組織・細胞選択的なオーキシンの制御システムの技術基盤を提示する。すなわち、オーキシンのプロドラッグ化と、それらを選択的に活性化する微生物酵素(活性化酵素)のスクリーニングとクローニングを実施した。

モデル植物のシロイヌナズナでは、数多くの細胞・組織特異的なプロモーター配列が明らかとされており、特定の細胞・組織で働くプロモーターの下流に、プロドラッグの代謝活性化酵素遺伝子を導入した遺伝子組換え植物を構築し

て、プロドラッグを作用させれば、標的となる組織・細胞部位で選択的にオーキシン作用の制御が達成できると考えた。この細胞レベルまで分解能を高めたドラッグデリバリーシステムを構築し、オーキシン作用(オーキシンシグナル・生合成・輸送)の組織・細胞特異的な制御を目指した。

3. 研究の方法

オーキシンの成長調節は、組織・細胞特異的なオーキシン濃度分布の制御(合成・代謝・輸送)とその感受性(シグナル伝達)によって決定される。現在、オーキシンを植物全体に投与することで、ホルモン調節機構が研究されてきたが、過剰な外生ホルモン投与により、本来の成長調節が攪乱されて生育障害が現れることが問題となる。さらに、遺伝子組換え技術を用いて、植物内の内生 IAA 量を増やす技術が報告されているが、生合成遺伝子の発現を自在にON/OFFすることは困難なことから、その時空間的な制御は満足できるものではない。一方、オーキシン信号伝達や生合成に関与する遺伝子は多重遺伝子属を形成しているため、これらを遺伝子組換え技術のみで特定の部位のみを阻害する、すなわち組織・細胞選択的な機能阻害は不可能である。このように特定の時期の特定組織についてオーキシンの作用を調節することはいまだ達成されていない。



本研究では、オーキシンや活性化化合物などを化学修飾によりプロドラッグ化(エステル・アミド化)し、不活性化する。このプロドラッグを代謝分解し、活性化できる酵素遺伝子を導入した遺伝子組換え植物(形質転換体)に作用させた。この形質転換体では、特定の組織や細胞群で発現するプロモーターの制御下で代謝活性化酵素が発現するように構築することで、プロドラッグ化した活性化化合物を投与すると標的部位で活性化されると考えられる。すなわち、プロドラッグ化したオーキシンやオーキシン受容体阻害剤・生合成阻害剤と代謝改変した形質転換体を融合したシステムとすることで、組織・細胞選択的なオーキシン作用の制御が達成できると考えられる。

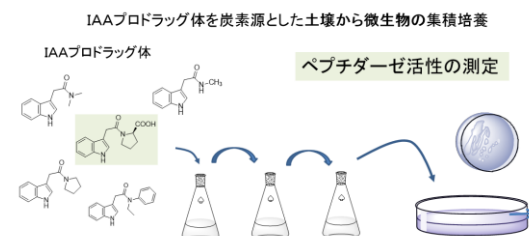
(1)プロドラッグ化オーキシンの合成と植物体内での安定性評価

①天然オーキシンである IAA のプロドラッグ体の合成指針

IAA のプロドラッグ体では、IAA に結合させる保護基は、植物で分解された後は、アミノ酸や糖など植物に対して毒性のない化合物であることが必須である。アミノ酸の中でも 2 級アミド基を有するプロリンのジペプチド結合を選択的に加水分解するプロリルペプチダーゼ (prolidase) は報告されておらず、IAA をプロリン誘導体でプロドラッグ化した化合物は植物体内で安定と予想され、検討を行ったところ、IAA-プロリン誘導体は、植物内で IAA を遊離せず、代謝安定性の高いことが確認された。

②微生物由来の IAA プロドラッグ体分解酵素のスクリーニング

IAA プロドラッグ体を唯一の炭素源として微生物を集積培養して、IAA-プロリン誘導体を代謝活性化する酵素(加水分解酵素)を生産する菌株を得た。この微生物由来の酵素のペプチダーゼ活性やその基質特異性などを検討した。有望菌株として複数の菌株が単離できた。一方微生物酵素のスクリーニングに合わせて、哺乳類の既存のアミダーゼやプロリダーゼなどの IAA プロドラッグ体に対する加水分解活性を検討したが、既存のペプチダーゼの中には、活性を示す酵素は見いだせなかった。



③ IAA プロドラッグ活性化酵素の植物体内での組織・細胞特異的な発現制御

選抜した微生物の酵素遺伝子をクローニングして大腸菌での大量発現と機能解析を実施した。また活性化酵素を各種細胞・組織特異的なプロモーターの下流に導入したシロイヌナズナの形質転換体を構築し、最終的にそれら組織での選択的な活性化制御を検討した。

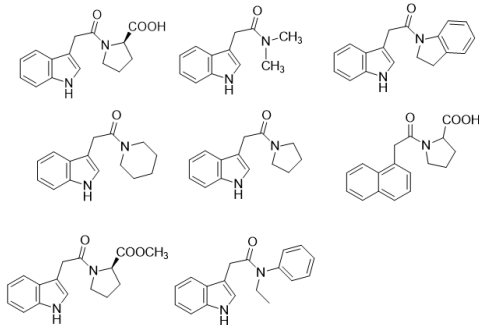
4. 研究成果

①オーキシンプロドラッグ体の合成

植物体内で、代謝活性化を受けず安定に存在できるオーキシンプロドラッグ体を得る目的で、IAA や NAA のカルボン酸をアミド保護基で修飾したプロドラッグ体を合成した。得られたプロドラッグ体を植物とともに培養したところ、直鎖のアルキルアミドやアリルアミドで保護した 2 級アミドの場合、植物体内で、速やかに加水分解を受けて、IAA や NAA を遊離することが示された。一方

3級アミド基としてプロドラッグ化したところ、それら誘導体は植物体内で安定であった。

Stable IAA prodrug in planta (no auxin activity in Arabidopsis)



それらの中でも分解物に毒性がないと推定される IAA-プロリン誘導体を中心に、オーキシシンプロドラッグを合成評価したところ、IAA-プロリンメチルエステルや IAA-プロリンなどが、組織移行性と安定性に優れると推測された。

② IAA プロドラッグ活性化酵素の同定・遺伝子クローニング

IAA-プロリンを大量合成し、この IAA-プロリンを単一炭素源として、土壤微生物の集積培養をしたところ、数種の細菌が、IAA-プロリンを栄養源として活発に増殖した。このうち IAP と命名した菌から得た粗酵素は、IAA-プロリンを速やかに IAA とプロリンに加水分解することが示された。

この IAP 菌株のゲノム DNA の全塩基配列を次世代シーケンサーにより解析した。

Illumina sequencing of active strain genome.

Candidate enzyme genes	<i>E. coli</i> expression	IAA-proline hydrolysis activity
Peptidase C1 family protein	○	negative
Peptidase C2 family protein	○	negative
Peptidase family M1 family protein	○	negative
Peptidase family M2 family protein	○	negative
Peptidase M3	○	negative
Peptidase M4: IAP	○	○
Pig prolidase: Proline dipeptidase (Sigma)	nd	negative
<i>E. coli</i> PepQ: Xaa-Pro dipeptidase	○	negative

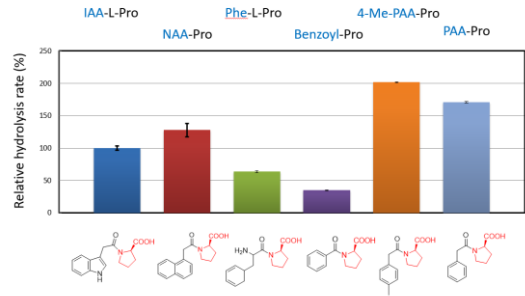
* Xaa-proline peptidase from mammal and *E. coli* could not hydrolyzed IAA-proline

その結果、ゲノム中には、6-8 個のペプチダーゼ・アミダーゼのホモログが存在した。これらすべてをクローニングし、大腸菌で発現させて酵素活性を検討したところ、IAP と命名した酵素遺伝子が IAA-プロリンを分解する活性を示した。大腸菌で、GFP 融合タンパクとして発現させたところ、GFP-IAP 融合タンパクにおいても、IAA-プロリン加水分解酵素活性を示した。

その基質特異性を詳細に検討したところ、GFP-IAP 酵素は、IAA-プロリンのみならず、NAA や安息香酸、4-メチルフェニル酢酸などのプロリン保護体も加水分解した。このことから IAP 酵素の基質特異性は、カルボン酸部位について低いことが分かった。

一方、D-プロリン、プロリンアミド、プロリンメチルエステルなどで保護した IAA 誘導体は、GFP-IAP によって全く加水分解を受けず、プロリン部位の認識は厳密であった。

Recombinant GFP-IAP hydrolyzed various proline aromatic carboxamide.

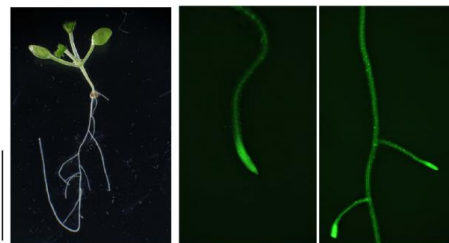


③ IAA プロドラッグ活性化酵素の植物体内での組織・細胞特異的な発現制御

モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) では細胞タイプ特異的に発現するプロモーターが数多く報告されている。細胞・組織特異的なプロモーターにより IAA プロドラッグ代謝活性化酵素 GFP-IAP が発現制御を受ける形質転換体を構築した。

35S 強制発現プロモーターの制御下で GFP-IAP をシロイヌナズナで過剰発現させたところ、懸念されていた GFP-IAP 酵素の過剰発現による生育への明確な影響は観察されなかった。この 35S::GFP-IAP 形質転換体に IAA-プロリンを作用させると、子葉の屈曲、著しい側根形成、主根の伸長抑制など、典型的なオーキシシン過剰の表現型が観察された。一方、同様な処理をした非形質転換体では何ら変化は観察されなかった。

35S::GFP-SIAP



35S::GFP-SIAP



WT

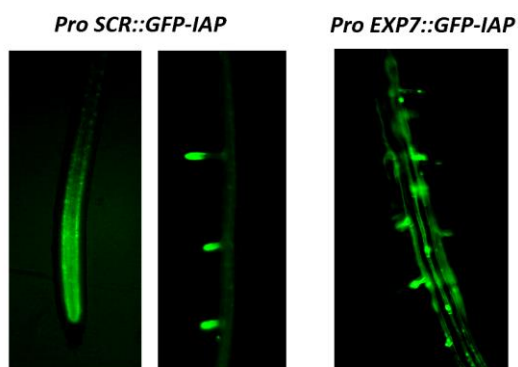


GFP-IAP を過剰発現する形質転換体

以上のことから、植物体内で発現させた GFP-IAP は、植物に対する毒性などの作用を示さない。また植物体内で発現させた GFP-IAP は、IAA-プロリン加水分解活性を示し、細胞内へと流入した IAA-プロリンを加水分解して IAA を遊離する活性を示すことが明らかとなった。

シロイヌナズナでは、根毛細胞に特異的に発現する *EXPANSIN7 (EXP7)* や、根の内皮細胞で発現する *SCARECROW (SCR)* など、多様な遺伝子が知られている。GFP-IAP を、これら細胞・組織特異的なプロモーターの下流で発現す

る GATEWAY ベクター系を構築し、*EXP7* と *SCR* のプロモーター領域を挿入したコンストラクトを作成し、シロイヌナズナに形質転換し、細胞・組織特異的なプロモーターの制御下で GFP-IAP を発現させることに成功した。



本研究では、IAA-プロドラッグを鍵として、オーキシン濃度分布を細胞特異的に制御する手法を開発することができた。今後、さまざまな組織・細胞特異的なオーキシン作用と、分化・成長の変化の関連を研究する新しいツールとなりうると期待される。さらに、本研究の手法がより精密なホルモン作用の解析に発展すれば、オーキシン作用の統合的な理解につながると期待される。さらに、得られた学術的な知見を応用的に活用すれば、すでに幅広く遺伝子組換え体が生用されている綿花の品質向上などで、オーキシンが関わる植物成長の制御技術に利用できると期待される。

これまで、医薬分野ではドラッグデリバリーの技術により、薬物の組織特異性を達成しようとするコンセプトは幅広く認知されているが、最終標的がヒトである以上、当然ながら、その概念の適用対象は医薬分子(ケミカル)のみに限られる。一方、本研究のコンセプトは、遺伝子組換え植物とケミカルツールを融合した新しい細胞分解能のドラッグデリバリーシステムへと拡張する点においてきわめて独創的であるといえる。

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 10 件)

① K. Fukui and K. Hayashi (2018) Manipulation and Sensing of auxin metabolism, transport and signaling. *Plant Cell Physiol*. doi: 10.1093/pcp/pcy076. (査読あり)

② T. Kimura, K. Haga, Y. Shimizu-Mitao, Y. Takebayashi, H. Kasahara, K. Hayashi, T. Kakimoto and T. Sakai (2018) Asymmetric Auxin Distribution is Not Required to Establish Root Phototropism in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 59: 823-835. doi: 10.1093/pcp/pcy018. (査読あり)

③ A.M. Middleton, C. Dal Bosco, P. Chlap, R.

Bensch, H. Harz, F. Ren, S. Bergmann, S. Wend, W. Weber, K. Hayashi, M.D. Zurbriggen, R. Uhl, O. Ronneberger, K. Palme, C. Fleck and A. Dovzhenko (2018) Data-Driven Modeling of Intracellular Auxin Fluxes Indicates a Dominant Role of the ER in Controlling Nuclear Auxin Uptake. *Cell Rep* 22: 3044-3057. doi: 10.1016/j.celrep.2018.02.074. (査読あり)

④ B. Shi, X. Guo, Y. Wang, Y. Xiong, J. Wang, K. Hayashi, J. Lei, L. Zhang and Y. Jiao (2018) Feedback from Lateral Organs Controls Shoot Apical Meristem Growth by Modulating Auxin Transport. *Dev Cell* 44: 204-216 e206. doi: 10.1016/j.devcel.2017.12.021. (査読あり)

⑤ S. Tsugafune, K. Mashiguchi, K. Fukui, Y. Takebayashi, T. Nishimura, T. Sakai, Y. Shimada, H. Kasahara, T. Koshiba and K. Hayashi (2017) Yucasin DF, a potent and persistent inhibitor of auxin biosynthesis in plants. *Sci Rep* 7: 13992. doi: 10.1038/s41598-017-14332-w. (査読あり)

⑥ S. Takato, Y. Kakei, M. Mitsui, Y. Ishida, M. Suzuki, C. Yamazaki, K. Hayashi, T. Ishii, A. Nakamura, K. Soeno and Y. Shimada (2017) Auxin signaling through SCF(TIR1/AFBs) mediates feedback regulation of IAA biosynthesis. *Biosci Biotechnol Biochem* 81: 1320-1326. doi: 10.1080/09168451. 2017. 1313694 (査読あり)

⑦ Z.B. Yang, G. Liu, J. Liu, B. Zhang, W. Meng, B. Muller, K. Hayashi, X. Zhang, Z. Zhao, I. De Smet and Z. Ding (2017) Synergistic action of auxin and cytokinin mediates aluminum-induced root growth inhibition in Arabidopsis. *EMBO Rep* 18: 1213-1230. doi: 10.15252/embr. 201643806. (査読あり)

⑧ M. Narukawa-Nara, A. Nakamura, K. Kikuzato, Y. Kakei, A. Sato, Y. Mitani, Y. Yamasaki-Kokudo, T. Ishii, K. Hayashi, T. Asami, T. Ogura, S. Yoshida, S. Fujioka, T. Kamakura, T. Kawatsu, M. Tachikawa, K. Soeno and Y. Shimada (2016) Aminooxy-naphthylpropionic acid and its derivatives are inhibitors of auxin biosynthesis targeting l-tryptophan aminotransferase: structure-activity relationships. *Plant J* 87: 245-257. doi: 10.1111/tpj.13197 (査読あり)

⑨ S. Sugawara, K. Mashiguchi, K. Tanaka, S. Hishiyama, T. Sakai, K. Hanada, K. Kinoshita-Tsujimura, H. Yu, X. Dai, Y. Takebayashi, N. Takeda-Kamiya, T. Kakimoto, H. Kawaide, M. Natsume, M. Estelle, Y. Zhao, K. Hayashi, Y. Kamiya and H. Kasahara (2015) Distinct Characteristics of Indole-3-Acetic Acid and Phenylacetic Acid, Two Common Auxins in

Plants. Plant Cell Physiol 56: 1641-1654. doi: 10.1093/pcp/pcv088 (査読あり)

⑩ K. Hayashi, N. Kusaka, S. Yamasaki, Y. Zhao and H. Nozaki (2015) Development of 4-methoxy-7-nitroindolyl (MNI)-caged auxins which are extremely stable in planta. Bioorg Med Chem Lett 25: 4464-4471. doi: 10.1016/j.bmcl.2015.09.001 (査読あり)

[学会発表] (計 13 件)

① K. Hayashi, H. Motose, A. Funakoshi, K. Fukui, R. Mitsui, Manipulation of cellular auxin distribution by chemical biology approach Taiwan-Japan Plant Biology 2017 (国際学会) 2017 年 Taipei, Taiwan

② K. Fukui, A. Oochi, N. Takeuchi, H. Motose, T. Aoyama, T. Fujita, K. Hayashi, Intracellular auxin gradient is essential for the tip growth of a protonemal cell in the moss, Physcomitrella patens IPGSA2016 (国際学会) 2016 年 Toronto, Canada

③ K. Hayashi, New auxin analogs as chemical tool for the modulation of cellular PIN localization Auxin2016 conference (国際学会) 2016 年 Haitang Bay, Sanya, China

④ 林謙一郎, 船越 淳, 本瀬宏康, 福井康祐, 三井亮司, 代謝活性化を利用したオーキシン応答の細胞選択的な制御システムの構築 第 51 回植物化学調節学会 2016 年 高知

⑤ 大地啓寛, 本瀬宏康, 野崎 浩, 林謙一郎, オーキシン輸送担体 PIN の局在制御に関するケミカルツール 第 50 回植物化学調節学会大会 2015 年 (東京大学)

(他8件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林謙一郎 (Kenichiro Hayashi)

岡山理科大学・理学部・教授

研究者番号 : 30289136

(2) 研究分担者

三井 亮司 (Ryoji Mitsui)

岡山理科大学・理学部・教授

研究者番号 : 60319936

(3) 連携研究者

笠原 博幸 (Hiroyuki Kasahara)

東京農工大学・農学部・教授

研究者番号 : 00342767

(4) 研究協力者

Yunde Zhao

カルフォルニア大学サンディエゴ校・教授