

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14546

研究課題名(和文)植物の表皮形成を阻害する低分子化合物の探索と作用点の解明

研究課題名(英文)Analysis of chemical compounds that affect epidermal formation in plants

研究代表者

田中 博和(Tanaka, Hirokazu)

大阪大学・理学研究科・助教

研究者番号：10589922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：陸上植物の地上部はクチクラと呼ばれる疎水性の保護膜により覆われている。クチクラは地上部の表皮と外界の境界部分に形成され、体内の水分の保持や、葉状器官の形態形成などに重要な機能を担っている。植物のクチクラの主成分はワックスやクチンなどの脂肪酸派生物であり、これまでの研究により、クチクラの形成に關する脂質修飾酵素や、輸送体が同定されている。本研究では、クチクラの形成を阻害する39種の新規の化合物について、分子マーカーを用いて作用点の解明を試みた。その結果、輸送体の発現を阻害する化合物と、合成系因子の発現をかく乱する可能性のある化合物の候補が得られた。

研究成果の概要(英文)：The epidermis of land plants is covered by a transparent hydrophobic barrier called cuticle. Plant cuticle is formed at the outermost part of the aerial organs, and hence placed at the interface between the plants and environment. Cuticle plays important roles in water retention, defense against pathogens, prevention of organ fusions. In the past studies, several molecular components involved in cuticle formation, including fatty acid modification enzymes, transporters and transcription factors have been identified. Here, we tried to characterize potential new compounds which may affect expression of cuticle related components.

研究分野：植物科学

キーワード：細胞、組織 植物

## 1. 研究開始当初の背景

陸上植物において、地上部の表面は無色透明の保護膜であるクチクラに覆われている。クチクラはクチンやワックス等の脂肪酸派生物を主成分とし、地上部の表皮と外界の境界部分に形成されて体内の水分の保持や、葉状器官の形態形成等に重要な役割を担っている。クチクラの構成要素である脂肪酸派生物は、ヒドロキシ化酵素や脂肪酸伸長酵素などの種々の合成系因子の働きにより細胞内で合成される。クチクラは細胞外に形成されるため、クチクラ関連の脂肪酸派生物はある段階で細胞外へと輸送される必要がある。クチンの場合には前駆体が細胞外に輸送され、細胞外での重合反応を経て個体の最外部に形成されると考えられている。

シロイヌナズナなどのモデル植物を用いた分子遺伝学的研究などによりクチクラの形成に関わる種々の因子が同定されて来ている。また、それらの多くの因子は表皮で優先的に発現することも示されている。しかし、クチクラ形成の関わる分子機構の理解は断片的であり、クチクラを表皮の外界面に適切に形成するための分子機構は十分に理解されていない。

## 2. 研究の目的

これまでの研究により、クチクラ形成には表皮細胞が適切に分化し、脂肪酸の修飾に関わる種々の酵素をコードする遺伝子群が適切に働くことが必要であることが明らかになってきている。しかし、クチクラ合成酵素の発現制御機構は断片的にしか理解されておらず、また表皮の分化の制御系についても十分に解明されていない。

本研究では、これまでの分子遺伝学的アプローチを補完する可能性のあるアプローチとして、クチクラの形成を阻害する新規阻害剤の解析を行った。

## 3. 研究の方法

### クチクラの機能不全の評価

植物のクチクラが水溶性の物質の透過性を制限する性質を利用して、親水性で細胞壁成分に親和性の高い色素であるトルイジンブルーを用いて植物の地上部を染色し、水で洗浄した後に実体顕微鏡下で色素による染色度合いを評価した (TB 法; Tanaka et al. 2004)。染色には 0.45  $\mu\text{m}$  フィルターで濾過した 0.1%トルイジンブルー水溶液を用いた。定量的な解析のためには発芽 3 日目の芽生えを 2 日間、50  $\mu\text{M}$  の化合物により処理し、染色後の芽生えの地上部を回収し、バッファ

一中で破碎し、上澄み液の吸光度 (OD600 と OD435) を測定した。

### 化合物による処理方法

それぞれの化合物を DMSO に溶解したストック溶液を終濃度 25  $\mu\text{M}$ 、50  $\mu\text{M}$ 、または 100  $\mu\text{M}$  になるように 1/2MS 液体培地に加えて化合物溶液を作成した。1/2MS 固形培地で 3 日間生育させたシロイヌナズナの芽生えを化合物溶液に浸し、光条件下で化合物処理を行った。比較対象としては DMSO を 1:200 の割合で 1/2 MS 液体培地に加えた DMSO 溶液を用いた。

### GFP レポーター系統の化合物処理と GFP シグナルの検出

25  $\mu\text{M}$ 、50  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$  の濃度の化合物を含む溶液で芽生えを 24 時間または 48 時間処理し、液体培地でマウントして共焦点顕微鏡または蛍光顕微鏡により GFP の蛍光を観察した。

### GUS レポーター系統の化合物処理と GUS の発現パターンの検出

50  $\mu\text{M}$  の化合物溶液または DMSO 溶液で 48 時間、処理を行った。その後、芽生えを 90% アセトン溶液 ( $-20^{\circ}\text{C}$ 、30 分)、0.1M リン酸バッファー (pH 7)、染色用バッファー (0.1M リン酸バッファー; 2 mM  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ; 2 mM  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) で置換し、x-gluc. (0.48 mM) を含む GUS 染色液中で発色反応を行った ( $37^{\circ}\text{C}$ 、24 時間)。

## 4. 研究成果

スクリーニングにより単離した阻害剤の候補について、クチクラの異常を簡便に視覚化する手法である TB 法を用いて表皮の表面の性質に異常を引き起こすかどうかを調べることにより、39 種類の化合物について阻害効果を確認した (図 1)。植物体に吸着したトルイジンブルーの量を OD600 を測定することにより定量化し、植物組織の量 (OD435) により補正して評価したところ、

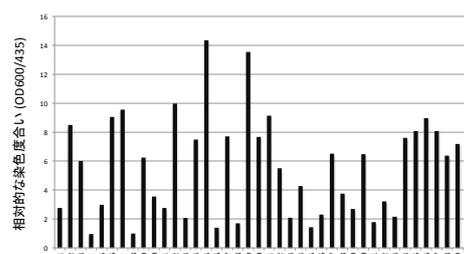


図 1. TB 法による表皮の異常の評価

薬剤処理をしていない対照 (図 1, C) と比較して化合物処理をした植物ではトルイジンブルーにより良く染色されていた (図 1)。このことから、これらの化合物は表皮のクチクラの異常を引き起こしていることが示唆された。

適切にクチクラが形成されるためには、表皮においてクチクラ関連遺伝子群が適切に発現し、機能する必要があることから、阻害剤はクチクラ形成に関わるこれらの素過程のどこかの段階を阻害している可能性が考えられた。そこで、クチクラ形成に関わる因子の発現や局在を解析するための分子マーカーの整備を行った。地上部において表皮で優先的に発現するか、クチクラの形成に関わることが知られていた 4 種類の遺伝子について、シロイヌナズナ (エコタイプ Col-0) に導入した GUS レポーター系統を確立した。また、クチクラの合成や輸送に関わる 5 種類の因子の蛍光蛋白質融合レポーターを収集あるいは作成し、これらについて、Col-0 背景のレポーターを整備し、蛍光シグナルを確認した。これらのなかで、安定にシグナルが検出された pABCG11::GFP-ABCG11、pACR4::GUS、pGDSL::GUS に着目して阻害剤の効果を解析した。ABCG11 はクチクラ関連の脂質を細胞外に排出する働きを持つ ABC トランスポーターであり、GFP-ABCG11 は表皮細胞の細胞膜に局在することが知られている。胚軸の表皮における GFP-ABCG11 の細胞膜局在に着目して化合物の効果を調べたところ、2 種類の化合物 (#38, #39) でシロイヌナズナの芽生えを処理することにより外界側の細胞膜におけるシグナルが若干減少した。また、本葉の原基においてもこれらの化合物の処理により GFP-ABCG11 のシグナルが減少した (図 2)。

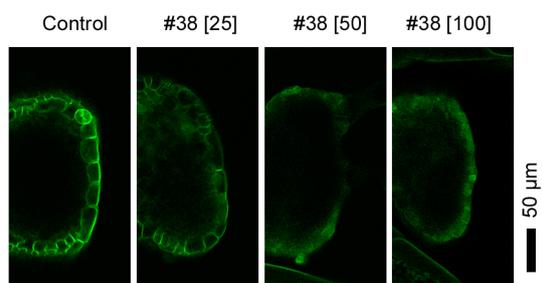


図 2. 葉原基における GFP-ABCG11 の蛍光シグナル

GDSL はグリシン、アスパラギン酸、セリン、ロイシンのモチーフをもつリパーゼ・ヒドロラーゼ様タンパク質をコードし、クチクラの主要成分であるクチンの重合に関与することが示唆されている遺伝子である。

GDSL::GUS は芽生えの葉原基において強い発現が認められた (図 3)。この発現に対する化合物の効果を調べたところ、2 種類の化合物 (#18, #35) で処理をした場合に本葉の原基におけるシグナルが減少していた (図 3)。また、クチクラ形成に関与する受容体型プロテインキナーゼをコードする ACR4 のプロモーター領域を用いた pACR4::GUS レポーターは、#35 の化合物で処理をした場合に本葉の原基におけるシグナルが減少していた。これらの結果から各種阻害剤にはクチクラ形成の異なる素過程に作用するものと、共通の過程に作用するものがあることが示唆された。

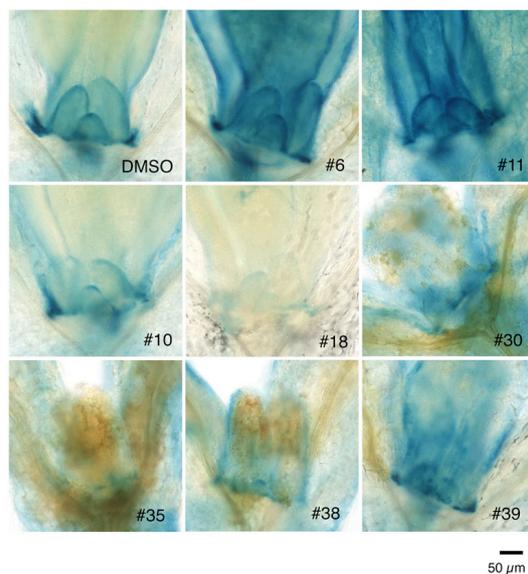


図 3. GDSL::GUS の染色結果の例

化合物 #38 と #39 は構造的に類似した、ピリミジン環、トリアゾール環とベンゼン環が連結した構造を持つ化合物であった。阻害活性に必要な構造についての知見を得るためにアナログの解析を行ったところ、ピリミジン環のメチル基を除いた構造を持つアナログ #7 はクチクラ形成を阻害する活性を示さなかった。一方、化合物 #38 と #39 はベンゼン環の置換基が異なる構造を有しており、ベンゼン環の置換基が異なる構造を持つアナログ #2 も、クチクラ形成を阻害する活性を示した。これらの結果から、化合物 #38, #39 の阻害活性には特定の化学構造が必要であるが、ベンゼン環周辺の構造は比較的自由度が高いことが明らかになった。

また、化合物 #38, #39 はシロイヌナズナの芽生えの根の生長も阻害することがわかった。この表現型を指標として耐性変異体のスクリーニングを行い、約 10,000 系統相当のライブラリーから阻害剤の存在下でも野生型植物よりも大きく生長する 2 系統の変異体を単離した。これらの変異体は薬剤に対する感受性が低下している可能性がある。今

後、変異体の薬剤感受性を詳細に解析し、pABCG11::GFP-ABCG11 や pGDSL::GUS、pACR4::GUS などのマーカーを用いて変異体の化合物に対する応答を解析し、さらに薬剤耐性の表現型に関わる原因遺伝子を同定することによりこれらの化合物の作用についての理解がより深まると期待される。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

田井聡美、柿本辰男、田中博和：クチクラ関連輸送体 ABCG11 の局在制御に関わる制御因子の探索. 第 57 回日本植物生理学会年会 (岩手県) 2016 年 3 月

田中博和、田井聡美、成瀬光、北倉左恵子、柿本辰男：植物のクチクラ形成に関与する新規制御因子の探索. 第 5 回近畿植物学会講演会 (兵庫県) 2016 年 11 月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 博和 (TANAKA, Hirokazu)  
大阪大学・理学研究科・助教  
研究者番号：10589922

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：

(4) 研究協力者

なし