

平成 21 年 4 月 3 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19780246
 研究課題名（和文）高等植物におけるオーキシシン様除草剤 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸の作用機構
 研究課題名（英文）Elucidating the molecular mechanism of herbicidal action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid
 研究代表者
 ラーマン アビドゥール（Rahman Abidur）
 岩手大学・農学部・助教
 研究者番号：30447114

研究成果の概要：

本研究は植物ホルモン・オーキシシンの2つの化合物、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸（2,4-D）とインドール-3 酢酸（IAA）の採用機作の違いを明らかにする目的で行われた。2,4-D と IAA に対する表現系が異なるシロイヌナズナ SMAP1 タンパク質欠損変異体の根を用いた解析から、2,4-D あるいは IAA 処理で見られるアクチン分解やアポトーシスに差があることを見出し、SMAP1 が重要な役割を果たしていることが明らかになった。さらに、イネでは SMAP1 の発現が低いことも見出し、2,4-D が示す単子葉特異的除草性を関連していることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

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：オーキシシン、アクチン、細胞分裂、SMAP1、2,4-D、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

植物ホルモン・オーキシシンであるインドール-3 酢酸（IAA）は、胚形成から老化まで植物の全生育過程に影響を与える。シロイヌナズナの遺伝情報の解明に伴い、この10年ほどでIAAの分子レベルの機構解明が大幅に進んだ。しかし、その研究のほとんど（変異体のスクリーニングを含む）において、IAAの代わりにその類似化合物である2,4-ジクロロフェノキシ酢酸（2,4-D）が使用されている。

両者は、輸送および代謝に相違が見られる（2,4-D は IAA に比べ排出および分解の速度が緩やかである）ことが認識されているにもかかわらず、これまで一般に両ホルモンの作用機構は同じとみなされてきた。2,4-D は、オーキシシン類似化合物としての使用のほかにも、選択性除草剤として使用されている。2,4-D は双子葉植物のみに除草効果があるため、コメ、コムギ、トウモロコシ類などの単子葉作

物の圃場では世界で最も使用量の高い除草剤であるが、その選択性除草剤としての毒性機構は解明されていない。

しかし最近、2,4-D と IAA が共通の信号伝達経路を持つというこれまでの考え方が疑問視され始めた。まず、新たに分離された変異体 *aar1* の変異遺伝子の分子生物学的特徴付けを行ったところ、2,4-D 特異的耐性はタンパク質 SMAP1 によることが判明した (Rahman et al., 2006)。また、細胞の分裂・伸長、アクチン組成への影響から、2,4-D と IAA を 2 つのクラスに分類できることがわかった (Rahman et al., 2007)。オーキシンとアクチンが植物の成長に重要な役割を持っていることから、両者間の相互作用は予想できることであるが、アクチンが、IAA と 2,4-D の異なった応答の基礎となることは注目に値することであり、2,4-D の除草作用における分子レベル、細胞レベルでの機構の解明への手掛かりとなる。

2. 研究の目的

以下に当プロジェクトの主な目的を述べる。

目的 A) 細胞骨格構成における 2,4-D に誘導された変化の分子レベルでの機構解明、および細胞分裂抑制との関連の解明

2,4-D に制御されたアクチン分解の分子レベル機構を解明するため、以下の実験方法を用いた。

A-1) アクチン組成での 2,4-D 誘導変化における SMAP1 の役割の詳察

これまでの申請者の研究により、2,4-D では細胞のアクチン組成を変化させ根の分裂組織の成長を妨げる作用が見られるが IAA では見られないこと、また、シロイヌナズナ根の成長での 2,4-D 耐性が未知の機能を持った SMAP1 によるものであることが示されている。SMAP を欠損させた根では、1 種類のオーキシンでのみ選択的に耐性がもたらされることから、SMAP1 欠落変異体 *aar1* の 2,4-D への耐性がアクチンに制御されているという仮説が可能であり、これを調べる必要がある。以前に解明したアクチンに対する 2,4-D の影響から、この変異体の 2,4-D への耐性は、この変異背景では 2,4-D がアクチンを分解できないことによると考えられる。これは、SMAP1 がこの過程で中心的な役割を果たしていることを示唆するものである。

A-II) 細胞分裂および細胞伸長における SMAP1 の役割の解明

2,4-D を外から与えた際に見られるシロイヌナズナ根の細胞分裂の阻害は、IAA では見られない。2,4-D 誘導の細胞分裂抑制は、アクチンを分解する能力と関連している。細胞

分裂、細胞伸長、およびアクチンの機構的関連を理解するため、この変異体の 2,4-D 誘導による細胞分裂と細胞伸長の抑制への反応の特徴付けを行う必要がある。

A-III) 細胞アクチン組成および細胞伸長・分裂の過程に対する影響における 2,4-D 特有の経路の有無

これまで、2,4-D と IAA は共通の伝達経路を持つと考えられてきた。しかし、細胞のアクチン組成や細胞分裂・細胞伸長経路において 2,4-D と IAA が異なった影響を示すことから、2,4-D が、既知の IAA 経路とは異なった経路でこれらのプロセスを調節している可能性があり、それを明らかにする必要がある。

目的 B) 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) の単子葉と双子葉における選択性除草作用機構の解明

2,4-D は選択性除草剤で、単子葉植物を残して双子葉植物に作用する。2,4-D の選択性除草剤としての作用機構の分子レベルでの解明はまだ行われていない。当プロジェクトはまた、この経路の解明も目的としている。研究は以下の方法で行う。

B-I) 双子葉植物の根における細胞死の誘導における IAA と 2,4-D の比較

細胞死の誘導が 2,4-D が双子葉植物を枯死させる経路であると考えるのが最有力であるが、それを検証した研究はまだない。そこで申請者の研究グループはこの経路を明かすことに焦点を置いた。

B-II) 単子葉と双子葉における SMAP1 の発現の比較

双子葉における 2,4-D 特異的耐性をもたらすのは SMAP であるため、単子葉と双子葉の両者においてその発現を分析し、除草経路において SMAP が重要な調整役となっているという仮説を検証した。

B-III) SMAP と相互作用する物質の同定

細胞骨格、細胞分裂、細胞伸長における 2,4-D を介した変化およびその除草作用に関係する分子調整物質を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

生理学、分子生物学、細胞生物学など、多分野の方法を使用した。

4. 研究成果

SMAP1 は、2,4-D を介したアクチン分解の

性の調整因子であり、既知の伝達経路とは独立して作用する。

SMAP1 のアクチンの状態を調整する役割を理解するため、SMAP1 欠損変異体 (*aar1*) のアクチンに対する免疫染色を行った。2,4-D に対する根の成長耐性と同様、*aar1* のアクチンも 2,4-D への耐性を示した。野生型の根においては、30 nM の 2,4-D で細胞内アクチンのほとんどがなくなったが、*aar1* においては、50 nM でもアクチンが検出できた (Figure 1)。また、SMAP1 が 2,4-D に誘導された細胞分裂・細胞伸長の過程の抑制における調整作用を持つことがわかった (Table 1)。

SMAP の欠損は 2,4-D による細胞伸長の抑制を大幅に制限する。野生種においては、50 nM 2,4-D によって細胞伸長過程が大幅に抑制されたが、SMAP1 変異体では、その全てにおいて細胞伸長を抑制することができなかった。より低濃度の 2,4-D においても、細胞分裂に対する同様の結果が得られたが、より高濃度 (50 nM) では、2,4-D は *aar1* 変異体の細胞分裂を抑制した。これらの結果から、アクチンと同様、2,4-D に誘導された細胞分裂の抑制は、SMAP1 に依存するものと考えられる。また、SMAP1 は、2,4-D を介した細胞分裂の過程の調整にも部分的に関与している。

2,4-D と IAA が共通するオーキシン信号伝達経路を持つと考えられていたが、本研究では 2,4-D に特異的に依存する経路が存在する可能性を調べた。遺伝学的方法を用い、SMAP1 欠損変異体 *aar1* とオーキシン受容体変異体 *tir1* の二重変異体を使用した。TIR1 はユビキチンリガーゼの成分で IAA と 2,4-D 両方の受容体としても作用する (Kepinski and Leyser 2005)。シロイヌナズナの根におけるこの遺伝子の変異は、IAA と 2,4-D の両者に対し耐性をもたらす。根の成長アッセイにおいて、*aar1* と *tir1* の二重変異体は、各単独変異体よりも 2,4-D 耐性が強化されていた (Figure 2A)。この結果から、遺伝子損傷は相加的で、SMAP1 が既知のオーキシン伝達経路とは無関係に作用することが確認できる。

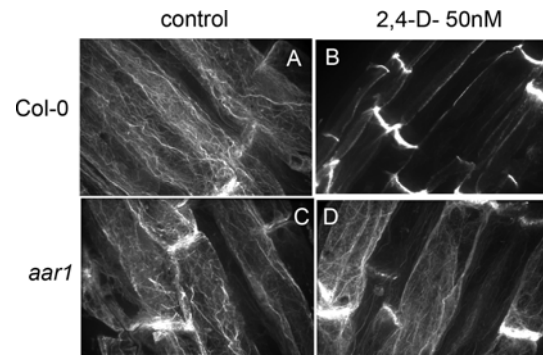


Figure 1. The null allele of SMAP1, *aar1* is resistant to 2,4-D induced degradation of actin. Five days old roots were treated with 50nM 2,4-D for two days and subjected to chemical fixation. Roots were immunostained against anti-actin antibody. A,C-control treatment; B,D 50nM 2,4-D treatment. Images are projection of 10-12 optical sections.

Treatment	Elongation rate (mm/2 nd day)	Cell length (μm)	Cell production rate (cells/day)
DMSO	9.7±0.2 (100)	190±8.5(100)	48.1±3.3(100)
20nM 2,4-D	4.9±0.49(50)	179±0.7(95)	27.5±2.9(57)
50nM 2,4-D	0.5± 0.4(5.2)	15± 5.7(8)	34.0± 3.4(67)
DMSO	7.5±0.8(100)	178±9.9(100)	42.3±0.06(100)
20nM 2,4-D	6.5±1.7 (87)	197±2.2(110)	33.4±6.3(79)
50nM 2,4-D	4.2±0.4 (55)	182±2.3(102)	22.9±2.0(54)

Table I: Comparison of Effect of 2,4-D on cell length and cell production in the wild-type and SMAP null mutant *aar1*. Data are means ± SEM of three replicate experiments. Values in parentheses are the percentage of control for each column.

この仮説を検証するために、単独変異体と二重変異体の細胞アクチンへの 2,4-D の影響を分析した。根の成長に対する 2,4-D に耐性を持つ変異体 *tir1* は、アクチンの 2,4-D 誘導分解に野生型の感度を示した (Figure 2B) が、*aar1* はこの現象に耐性を示した。ここで、*tir1* における SMAP1 の欠損が根のアクチンを 2,4-D を介した分解に耐性をもたらしたのは特に注目に値する。また、*aar1* と *tir1* で、2,4-D 介した細胞アクチン組成の変化が異なること、また、*tir1* を背景とした場合に SMAP1 の欠損によって耐性をもたらされたことは、SMAP1 が、オーキシンの既知のユビキチン・プロテアソーム経路とは無関係に作用するリガーゼ 2,4-D 特異的経路における正の調整因子であることを更に裏付けるものである。これは、知り得る限りでは、植物における 2,4-D の単独経路を同定した初めての報告である。

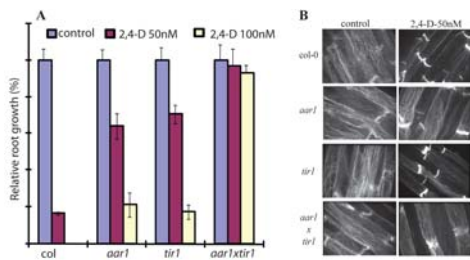


Figure 2: Effect of 2,4-D on the growth of the primary root of single and double mutants (A) and on cellular actin organization (B). The actin immunostaining was performed as described in Figure 1. Note that *aar1tir1* double mutant showed enhanced resistance to 2,4-D.

2,4-D はシロイヌナズナの根におけるアポトーシスを誘導するが、IAA は誘導しない

2,4-D が双子葉植物の枯死をもたらす経路を解明するため、この化合物が高濃度で細胞死を誘導すると仮定した。この仮説を証明するため、シロイヌナズナの根を高濃度の IAA と 2,4-D で長時間 (6 日間) 処理した。この処理の影響をアポトーシスの研究で広く使われている TUNEL アッセイを用いて調べた。TUNEL アッセイの結果、2,4-D でシロイヌナズナの根の枯死が見られたが、IAA では見られなかった。

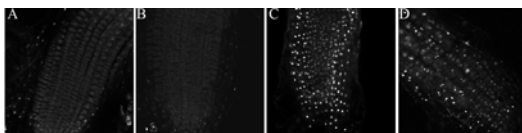


Figure 3. TUNEL assay for apoptosis. Representative images of control root (A), 3µM IAA treated root (B), 3µM 2,4-D treated root, (D) 3µM LatB treated root

次に、アポトーシスの過程におけるアクチンの役割を解明するため、アクチン抑制物質であるラトランクリン B (LatB) の影響を調べた。高濃度の LatB も 2,4-D と同様にアポトーシスを誘導し (Figure 3)、以前に当グループが行ったアクチンと細胞分裂の観察と一致した。これらの結果から、2,4-D の除草作用がアクチンの組成と密に関連していることが明確に示され、また、この経路が既知のオーキシン伝達経路とは独立して作用することが更に確認された。

SMAP1 によって 2,4-D の選択性除草作用の説明が可能となる

当グループの得た生理学的、分子および細

胞レベルのデータから、SMAP1 が、2,4-D 除草経路における重要な制御因子であることが示された。2,4-D が選択性除草剤として双子葉のみを枯死させ、圃場の単子葉作物に影響しないことはよく知られている。SMAP1 の欠損が 2,4-D への特異的耐性を与えることから、2,4-D の選択的作用を分子レベルで理解するためこの遺伝子を調べた。これにはリアルタイム PCR 分析を用い、シロイヌナズナとイネを対象に SMAP の発現を調査した。その結果、SMAP1 はシロイヌナズナの根では発現するが、イネの根では発現が制限されていることがわかった (データ未記載)。単子葉植物の根と双子葉植物の根で SMAP1 が異なった発現パターンを示すことは、SMAP1 が 2,4-D の除草作用を制御しているという申請者らの研究結果と完全に一致し、2,4-D の選択的な作用を分子レベルで説明するものである。

SMAP1 と相互作用するタンパク質

除草経路で機能する分子成分を同定するため、酵母ツーハイブリッド法を用いて SMAP1 と相互作用するタンパク質の検出を試みた。しかし、SMAP1 の性質 (酸性度と低分子量) のため、自己連結、あるいは他のタンパク質との非特異的作用のみが見られた。現在、酵母ツーハイブリッド法において GFP で標識した SMAP1 タンパク質をベイトとして使用することで自己連結と非特異的作用を回避し、この経路における他の分子構成物質を検出しようと試みている。

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 6 件)

1. Sukumar P, Edwards KS, Rahman A, Mattox C, Delong A, Muday GK (2009) PINOID kinase regulates root gravitropism through modulation of PIN2-dependent basipetal transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* (in press)

2. Xu S, Rahman A, Baskin T, Kieber J (2008) Two Leucine-Rich Repeat Receptor Kinases Regulate Cell Wall Function in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 20:3065-3069 *** This article was selected as one of the featured articles for November issue of *Plant Cell*.

3. Okamoto T, Tsurumi S, Shibasaki K, Obana Y, Takaji H, Oono Y, Rahman A (2008) Genetic Dissection of Hormonal Responses in the Roots of *Arabidopsis* Grown under Continuous

Mechanical Impedance. Plant Physiol 146:1651-1662 *** This article was selected as one of the featured articles for April issue of Plant Physiol.

4. Biswas KK, Ooura C, Higuchi K, Miyazaki Y, Nguyen VV, **Rahman A**, Uchimiya H, Kiyosue T, Koshiba T, Tanaka A, Narumi I, Oono Y (2007) Genetic Characterization of Mutants Resistant to the Antiauxin p-chlorophenoxyisobutyric Acid (PCIB) Reveals that AAR3, a Gene Encoding DCN1-Like Protein, regulates responses to the synthetic auxin 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in Arabidopsis roots. Plant Physiol 145:773-785

5. Oikawa A, **Rahman A**, Yamashita T, Taira H, Kidou S (2007) Virus-induced gene silencing of P23k in barley leaf reveals morphological changes involved in secondary wall formation. J. Exp. Bot. 58: 2617-2625

6. **Rahman A**, Bannigan A, Sulaman W, Pechter P, Blancaflor EB, Baskin TI (2007) Auxin, actin, and growth of the Arabidopsis thaliana primary root. Plant Journal 50:514-528***This article was evaluated as a must read article by the Faculty of 1000 Biology.

[学会発表] (計 6 件)

(Invited talk)

1. **Rahman A**. Auxin-ethylene response under abiotic stress: unraveling the molecular mechanism. Invited speaker for Spring semester seminar series, Wake forest University, Winston-Salem, North Carolina, U.S.A-Feb 18, 2009

2. **Rahman A**. Auxin response under cold stress and underlying molecular mechanism.-IU-UGAS Joint symposium. Oct-27-29, 2008, Morioka, Iwate-Japan

3. **Rahman A**. Auxin, actin and the growth of the Arabidopsis thaliana primary root.-Invited speaker for “auxin minisymposium” in Plant Biology 2007, held at Chicago, U.S.A. July 7-11-2007

4. **Rahman A**. Are all auxins equal? - Molecular and cellular evidence separating the responses to endogenous auxin IAA and its chemical analogue 2,4-D. 46th COE forum” Iwate University, Japan April 13, 2007

(Poster Presentation)

5. **Rahman A**. Genetic dissection of hormonal responses in the roots of Arabidopsis grown under continuous mechanical impedance. 19th International conference on Arabidopsis Research, held at Montreal, Canada, July 23-July 27, 2008

6. **Rahman A**. Auxin, actin, and growth of the Arabidopsis thaliana primary root. Plant Biology and Botany 2007, held at Chicago, U.S.A., July 7-July 11, 2007

[図書] (計 1 件)

1. Muday G K, **Rahman A** (2008) Auxin transport and the integration of gravitropic growth. In Tropism, (Gilroy S and Masson P, ed.). pp 47-68. Blackwell Publishing, MA, U.S.A.

[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・助教

研究者番号：30447114