

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510285

研究課題名(和文)オーキシンの極性輸送系に特異的なケミカルツールの開発

研究課題名(英文)Chemical tools specific for auxin polar transport

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) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：植物ホルモンであるオーキシンは、植物体内で極性をもって輸送される。植物の胚形成や光・重力屈性などの重要な成長分化は、オーキシンの極性輸送により調節されるため、オーキシンの極性輸送に関する分子機構の解明は重要な研究課題である。オーキシンの極性輸送システムの研究を加速するためには、それらに特異的に作用するケミカルツールを用いたアプローチが有効である。本研究では、第一に細胞のオーキシン輸送のライブイメージング、第二に細胞レベルでのオーキシン濃度の人工制御を可能とする新しいケミカルツールの開発を目的に研究を遂行し、所定の機能を有する化学ツールの開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：The auxin polar transport establish an asymmetric auxin distribution to respond environmental stimulus and consequently modulate the auxin responses of cells. Therefore, the auxin transport system plays a crucial role in plant development. The distribution of cellular auxin is regulated by auxin influx and efflux carriers/transporters localized in plant cell membrane. Therefore, the dynamic of intracellular auxin distribution are important for the understanding of molecular mechanism for auxin transport system. In this study, we developed the new chemical tools for the visualization and modulation of auxin gradient, such as fluorescent auxin and caged auxin. Fluorescent auxin analogs can visualize the distribution of auxin, and caged auxin can precisely modulate cellular auxin level. Both chemical tools can be promising to dissect the mechanism for the formation of auxin gradient.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：植物ホルモン オーキシン イメージング

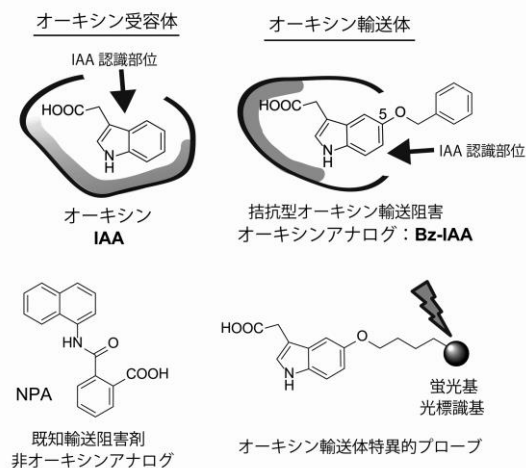
1. 研究開始当初の背景

植物の成長は、非常に単純な低分子有機化合物である植物ホルモンにより調節されており、そのなかでもオーキシンであるインドール3-酢酸 (Indole-3-Acetic Acid: IAA) により、細胞の分裂と伸長が制御されている。オーキシン (IAA) による成長制御は、(1) オーキシンの生合成、(2) 細胞間の能動的なオーキシン輸送、(3) 受容体からの信号伝達の3つの段階で調節されている。このうち、オーキシンの極性輸送は、細胞・組織間のオーキシン濃度を調節することで、植物の分化成長を制御する。これまでに、モデル植物・シロイヌナズナを用いた分子生物学的手法と変異体解析より、その輸送を担うオーキシン輸送体の遺伝子が同定された。オーキシンの極性輸送には、細胞内にオーキシンを取り込む AUX1 トランスポーターと、細胞外へとオーキシンを排出する担体である PIN や ABCB トランスポーターが関与している。また、オーキシンの極性輸送の解析には、分子遺伝学的手法とあわせて、1-naphthylphthalamic acid (NPA) などの非拮抗型のオーキシン輸送の阻害剤が大きな役割を果たしてきた。しかしながら、その詳細な作用機構はいまだ解明されていない。

2. 研究の目的

これまでに我々は、新しいオーキシンアナログ (オーキシン誘導体) の合成を展開しており、それらアナログの生理活性を、最新のオーキシンバイオロジーに関する知見にもとづいて、評価してきた。その過程で IAA の5位にアリル基やアルキル基を導入したオーキシン誘導体 (Bz-IAA など) が、オーキシン輸送に対して強い阻害活性を示すことを見出した。これらオーキシンのアルコキシ誘導体は、オーキシン受容体には認識されないアナログであったが、驚くべきことにオーキシン輸送タンパク質により認識・輸送された。すなわち、これらのアナログはオーキシン輸送タンパク質により、内生の IAA と拮抗して輸送されることで、内生 IAA の輸送量を低下させると推定され、これまでにない拮抗型のオーキシン輸送阻害剤であった。このアナログの構造活性相関の結果、IAA の5位に様々な機能性官能基を導入しても、オーキシン輸送体によって、認識されると考えた。すなわち、機能性官能基として、蛍光基を導入すると、オーキシン輸送体によって認識されることから、オーキシン輸送のライブイメージングツールになると考えられた。

オーキシン輸送の研究では、局所的にオーキシンを投与することが必須となる。これまでオーキシンを含有するワックスや寒天ゲルを、組織に接触させて投与する手法が一般的であった。このような手法では、微小部位へ正確に投与することは困難である。そこで、オーキシンを光解離基と結合させて不活性



化したケージドオーキシン (caged IAA) をもちいて、光照射で投与を制御することを試みた。さらに細胞レベルで正確にオーキシンを投与するためには、後に述べる3次元的な光照射制御による2光子励起が適用可能なケージドオーキシンが望まれている。

本研究では、オーキシン輸送体に特異的な蛍光ライブイメージングプローブや、光でオーキシン投与を制御できるケージドオーキシンを利用することで、① オーキシン輸送体の基質認識・作用機構の解明や ② 細胞内オーキシン輸送動態を解明することを研究目的とする。

3. 研究の方法

オーキシン輸送のライブイメージング

IAA や NAA などのオーキシンの5位や7位に適度なリンカーを介して蛍光基を導入した蛍光オーキシンアナログを分子設計した。また蛍光顕微鏡で蛍光オーキシンアナログの動的な解析をして、植物体内のオーキシン輸送のライブイメージングを達成する。

オーキシンバイオロジーにとり、オーキシンの組織内分布の可視化は非常に重要であるため、これまでに生物学的なアプローチとして次のような手法が幅広く利用されてきた。すなわち、オーキシン応答性 GFP レポーター遺伝子をもつ形質転換植物で、内生オーキシンに比例した GFP レポーター遺伝子の発現を指標として、間接的にオーキシン濃度を推測する。この方法では、各細胞間のオーキシン感受性の違うことから、オーキシン分布を正しく反映しないと考えられる。また、その時空間分解能に問題があり、動的なオーキシン分布の観察は非常に困難である。

蛍光オーキシンの分子設計の基本方針として、オーキシン輸送体の光標識プローブと同様に、蛍光基を導入してもオーキシン輸送体に認識されるプローブを設計できるかが鍵となる。そこで、生理活性が消失しないように、できるだけコンパクトな蛍光基を導入した。現時点で励起波長が可視光領域でかつコンパクトな蛍光基として、NBD 基を選択した。また、インドールは、蛍光消光作用を有

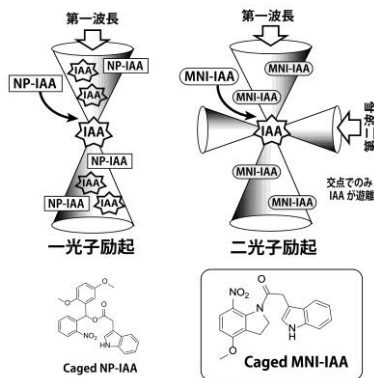
するので、インドール環と蛍光基の間のリンカー設計も重要である。合成したプローブについては、共焦点蛍光顕微鏡による蛍光オーキシニンアナログのイメージとして解析した。また、蛍光イメージが、オーキシニンの輸送を反映しているのかを確認するため、コントロール化合物として不活性な蛍光アナログを合成した。

光照射によるオーキシニンの細胞内投与の3次元制御

光は、その照射位置、強度、時間を厳密に制御することが容易である。光解離基と結合させて不活性化したケージドオーキシニン (caged IAA) は、オーキシニン投与を光照射で制御することが可能であり、植物細胞では、光照射で単一細胞内に、直接オーキシニンを投与することにも可能である。

植物個体で、3次元的な光解離反応の制御によって、細胞レベルで正確にオーキシニンを投与するためには、2光子励起が適用可能なケージドオーキシニンが望まれる。この2光子励起では、2方向からの光の交差した点のみ

2光子励起によるオーキシニン投与の3次元



で光解離がおこる2光子励起によって、ピンポイントで3次元的なオーキシニンの投与制御が可能となる。既報のケージドオーキシニンは、2-ニトロベンジル誘導体 (NP-IAA) をケージ基として使用したが、2光子励起には適していない。そこで、2光子励起が可能でかつ実績のあるニトロインダリン (MNI) をケージド基として、ケージドオーキシニン (MNI-IAA) を合成した。合成したケージドオーキシニン類は、その量子効率や細胞内での安定性などをオーキシニン応答性のレポーター株を用いて評価・検討した。

4. 研究成果

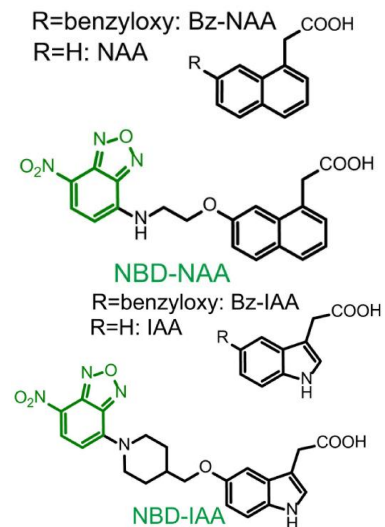
オーキシニンの濃度勾配の形成には、オーキシニンの極性移動による植物体内のオーキシ

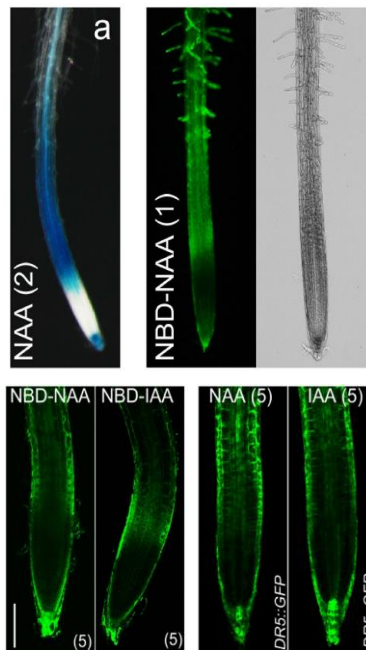
ン濃度の調節が深く関与しており、オーキシニン取り込みタンパクである AUX1、オーキシニン排出タンパクである PIN や PGP が協調して、細胞内のオーキシニン濃度を制御する。

これまで、オーキシニンの極性輸送によるオーキシニン濃度勾配を可視化し、特に、オーキシニン輸送のみを観察するために蛍光オーキシニンアナログを分子設計した。これら蛍光オーキシニンアナログは、次の指針で分子設計した。①オーキシニン輸送体に適度な親和性で認識され、輸送される分子構造とする。②IAA分子と疎水性や親水性が極端に異なると、自由拡散による移動率や、細胞膜などへの吸着率が大きく変化すると考えられるため、拡散による蛍光オーキシニン分子の移動は、可能な限り内生 IAA に近似させた。③大きな分子サイズの蛍光基をオーキシニンに導入すると、オーキシニン輸送タンパクの PIN や PGP によって認識されない可能性が高くなる。そこで、蛍光基の分子サイズは小さくなるようにした。④オーキシニン受容体には認識されないが、オーキシニン輸送担体には基質として認識され、輸送される。すなわち、蛍光オーキシニンアナログは、オーキシニン輸送担体へのみ認識されるオーキシニンアナログとして設計した。

上記の設計指針に基づいて、蛍光オーキシニンアナログを化学合成し、その蛍光分布像を検討した結果、従来から幅広く利用されているオーキシニン応答性遺伝子の遺伝子発現パターンに基づくオーキシニン分布とよく似た蛍光分布を示す蛍光オーキシニンアナログ NBD-IAA と NBD-NAA を合成できた。

DR5::GFP形質転換体では、オーキシニン応答性の DR5 プロモーターの制御下で、レポーター遺伝子である GFP が発現する。すなわち、細胞内にオーキシニンが存在すると、その濃度に





応じて緑色蛍光を示す。蛍光オーキシナーログが植物体の中で、オーキシン輸送体により取り込まれて輸送されれば、オーキシン応答性レポーター株の GFP 発現パターンとよく似た蛍光像が観察されると考えられた。シロイヌナズナのオーキシン応答性 DR5 プロモーターは、根の伸長領域や、側根の根冠などで強く発現しており、それらの部位では内生オーキシンが輸送、蓄積されて、濃度が高くなっていると考えられる。

そこで、根での NBD-NAA の蛍光像を観察した結果、DR5 レポーター遺伝子の発現部位と一致した蛍光像を確認することができた。

ネガティブコントロールとしてオーキシンの代わりに benzoic acid を導入した NBD-benzoic acid を合成し、NBD-NAA の蛍光像と比較した。NBD-benzoic acid では、蛍光オーキシンの様な蛍光パターンの偏差分布や局在化は観察されなかった。

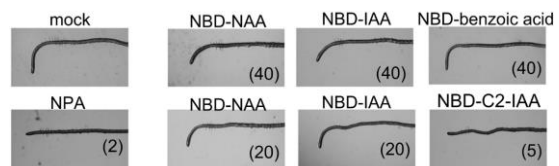
このことから、NBD 基に結合したオーキシン構造がオーキシン輸送担体により特異的に認識されることが確認できた。また、合成した蛍光オーキシンは、オーキシン応答性遺伝子の発現制御には全く影響を与えなかったことから、オーキシン受容体には認識されないことが明らかとなった。

オーキシン反応には重力屈性があり、これはオーキシンの輸送制御による濃度偏差形成が大きく関与する。つまり、オーキシン輸送体が阻害されると、オーキシンの輸送能力が低下し、根の重力屈性が消失する。NBD-NAA の根の重力屈性に対する作用を検討したところ、シロイヌナズナの輸送阻害剤である、Bz-NAA, NPA, TIBA と同様に NBD-NAA でも重力屈性が阻害されることが確認できた。この結果から、NBD-NAA はオーキシンの輸送体に認識されていると考えられた。

これまで細胞内においても、小胞体などの

細胞小器官において、オーキシンの偏差分布が存在すると考えられてきた。タバコ培養細胞内での蛍光オーキシン像を観察したところ、一様な蛍光分布ではなく、細胞内においても偏差分布が存在することが明らかとなった。

植物の胚軸は重力にตอบสนองして屈性を示す。この屈性反応はオーキシン濃度の偏差分布により引き起こされ、重力方向の下側でオーキシン濃度が高くなることで、細胞が伸長し、偏差成長が起こる。重量刺激を与えていないまっすぐな胚軸では、蛍光オーキシンの偏差分布は観察されなかったが、重力刺激を与えたシロイヌナズナの胚軸を蛍光オーキシンで処理したところ、胚軸の伸長側にのみ、強い蛍光が観察され、オーキシン分布が屈性応答で重要な働きをするという従来の知見と一致した。



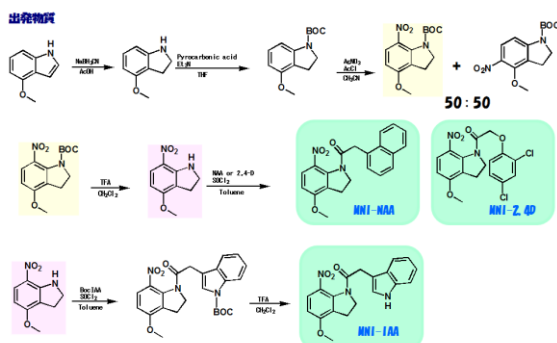
このように、本研究で報告した蛍光オーキシンは、細胞内のオーキシン分布を反映する蛍光像を示し、その分布は従来報告されているオーキシンの組織分布とよく一致していた。今後、これらの蛍光オーキシンを用いた詳細なオーキシンの分布の動的解析が期待される。

細胞内の安定性が高い新規 MNI-ケージドオーキシンの合成と生理活性

オーキシン濃度勾配による分化・成長調節機構を詳細に解析するためには、正確にオーキシンを細胞内へ投与することが望まれてきた。しかしながら、オーキシン溶液やゲル・ワックス剤などを用いた従来の投与方法では、時間的、空間的な精度に限界があった。そこで、我々は光照射によりオーキシンを遊離するケージドオーキシンを利用することで、オーキシン投与の正確な制御が可能になると考え、ケージドオーキシンの設計と合成を試みた。

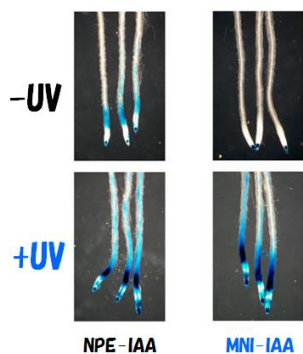
従来、主に動物細胞に用いられたケージド基である 2-nitrophenyl 誘導体で、オーキシンのカルボキシル基をエステル化したケージドオーキシンを設計・合成したが、それらは、植物体内でエステラーゼによる加水分解を受け、光照射と無関係にオーキシンの遊離が確認された。4-methoxy nitoroindoline (MNI) 基は、オーキシンのカルボキシル基を 3 級アミド結合でケージド化することが可能なケージド基である。今回、その MNI 基を用いてケージド化したオーキシン (MNI-ケージドオーキシン) を合成し、それらの評価を行った。

オーキシンの発現を指標として MNI-オーキシンの遊離が認められ、植物体内でエステラーゼによる加水分解はまったく確認されなかった。MNI-IAA を用い



て、光による植物の成長制御を検討した。MNI-IAA の取り込み後、根に長波長紫外光照射を行った。その結果、光照射により遊離したオーキシンの主根の伸長を抑制することを確認できた。

一方、光照射をしない場合には、主根の伸長の抑制は観察されなかった。今回我々が合成したエステラーゼ抵抗性 MNI-オーキシンは、植物生理学の有用な分子ツールになると期待される。



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 16 件)

1. Tanaka K, Hayashi K, Natsume M, Kamiya Y, Sakakibara H, Kawaide H, Kasahara H (2014) UGT74D1 catalyzes the glucosylation of 2-oxindole-3-acetic acid in the auxin metabolic pathway in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 55(1):218-228. (査読有)
2. Nishimura T, Hayashi K, Suzuki H, Gyohda A, Takaoka C, Sakaguchi Y, Matsumoto S, Kasahara H, Sakai T, Kato J, Kamiya Y, Koshiba T (2014) Yucasin is a potent inhibitor of YUCCA, a key enzyme in auxin biosynthesis. *Plant J* 77(3):352-366. (査読有)
3. Tatsuki M, Nakajima N, Fujii H, Shimada T, Nakano M, Hayashi K, Hayama H, Yoshioka H, Nakamura Y (2013) Increased levels of IAA are required for system 2 ethylene synthesis causing fruit softening in peach (*Prunus persica* L. Batsch). *J Exp Bot* 64(4):1049-1059. (査読有)
4. Yoshimoto K, Noutoshi Y, Hayashi K, Shirasu K, Takahashi T, Motose H (2012) A chemical biology approach reveals an opposite action

between thermospermine and auxin in xylem development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 53(4):635-645. (査読有)

5. Yoshimoto K, Noutoshi Y, Hayashi K, Shirasu K, Takahashi T, Motose H (2012) Thermospermine suppresses auxin-inducible xylem differentiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav* 7(8):937-939. (査読有)
6. Takahashi K, Hayashi K, & Kinoshita T (2012) Auxin activates the plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation during hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 159(2):632-641. (査読有)
7. Nishimura T, Matano N, Morishima T, Kakinuma C, Hayashi K, Komano T, Kubo M, Hasebe M, Kasahara H, Kamiya Y, Koshiba T (2012) Identification of IAA transport inhibitors including compounds affecting cellular PIN trafficking by two chemical screening approaches using maize coleoptile systems. *Plant Cell Physiol* 53(10):1671-1682. (査読有)
8. Hayashi K, Neve J, Hirose M, Kuboki A, Shimada Y, Kepinski S, Nozaki H (2012) Rational design of an auxin antagonist of the SCF(TIR1) auxin receptor complex. *ACS Chem Biol* 7(3):590-598. (査読有)
9. Hayashi K, Kusaka N, Ando K, Mitsui T, Aoyama T, Nozaki H (2012) Design and synthesis of photolabile caged cytokinin. *Bioorg Med Chem Lett* 22(17):5663-5667. (査読有)
10. Hayashi K (2012) The interaction and integration of auxin signaling components. *Plant Cell Physiol* 53(6):965-975. (査読有)
11. 林謙一郎, 野崎浩, オーキシンの受容と信号伝達の分子機構 =TIR1 オーキシン受容体拮抗剤の分子設計= 化学と生物 (日本農芸化学会誌) **2012**, 50 (12), 876-882. (査読有)
12. オーキシンのケミカルプローブ 林謙一郎, 植物の成長調節, **2012**, 47 (2), 74-84. (査読有)
13. オーキシンの信号伝達・輸送に関するケミカルバイオロジー 林謙一郎, 植物の成長調節, **2012**, 47 (1), 1-9 (査読有)
14. Yoshimitsu Y, Tanaka K, Fukuda W, Asami T, Yoshida S, Hayashi K, Kamiya Y, Jikumaru Y, Shigeta T, Nakamura Y, Matsuo T, Okamoto S (2011) Transcription of DWARF4 plays a crucial role in auxin-regulated root elongation in addition to brassinosteroid homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 6(8):e23851. (査読有)
15. Tsuda E, Yang H, Nishimura T, Uehara Y, Sakai T, Furutani M, Koshiba T, Hirose M, Nozaki H, Murphy AS, Hayashi K (2011) Alkoxy-auxins are selective inhibitors of auxin transport mediated by PIN, ABCB, and AUX1 transporters. *J Biol Chem* 286(3):2354-2364. (査読有)
16. Mashiguchi K, Tanaka K, Sakai T, Sugawara S,

Kawaide H, Natsume M, Hanada A, Yaeno T, Shirasu K, Yao H, McSteen P, Zhao Y, Hayashi K, Kamiya Y, Kasahara H (2011) The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(45):18512-18517. (査読有)

[学会発表] (計 12 件)

1. 植物ホルモン・オーキシンの温故知新
林謙一郎
第 17 回生体触媒化学シンポジウム, 岡山, 2013 年 12 月 20 日 (招待講演)
2. シロイヌナズナの根の光屈性におけるオーキシンの機能と作用機序の解析
木村太郎・芳賀健・林謙一郎・Yunde Zhao・竹林裕美子・笠原博幸・酒井達也
第 48 回植物化学調節学会, 新潟, 2013 年 10 月 31 日
3. Chemical Biology for Auxin signaling and Transport
Hayashi K
International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology (KSMCB), Seoul, 2013. 10. 9
4. 蛍光オーキシンによるオーキシン分布の可視化
中村昌一・福永紫穂・古谷将彦・野崎浩・青山卓史・林謙一郎
日本農芸化学会 中四国支部大会, 広島, 2013 年 9 月 5 日
5. Auxin activates the plasma membrane H⁺-ATPase through phosphorylation of the penultimate threonine without the involvement of TIR1/AFBs auxin receptors.
Takahashi K, Hayashi K, Kinoshita T.
International Workshop on Plant Membrane Biology XVI, Kurashiki, Japan, 2013.3.26
6. ケミカルツールによるオーキシン分布の可視化に関する研究
中村昌一・福永紫穂・古谷将彦・野崎浩・青山卓史・林謙一郎
第 54 回 植物生理学会年会, 岡山, 2013 年 3 月 21 日
7. Visualization of cellular auxin distribution by chemical biology approach.
Hayashi K
Auxin 2012, Hawaii, USA, 2012.12 .9 (Invited, Oral)
8. 蛍光オーキシンアナログを用いたオーキシン分布の可視化に関する研究
中村昌一・福永紫穂・青山卓史・古谷将彦・西村岳志・小柴共一・野崎浩・林謙一郎
第 47 回植物化学調節学会, 鶴岡, 2012 年 10 月 27 日
9. オーキシンの輸送・分布を可視化・制御するケミカルツール
シンポジウム: 植物生命がつむぎだす化学物質: その応用展開の可能性
林謙一郎
日本植物生理学会第 53 回年会, 京都, 2012 年 3 月 17 日 (シンポジウム依頼講演)
10. 植物ホルモン・オーキシンの光による投与制御
林謙一郎, 山崎壮真, 野崎浩
日本農芸化学会中四国支部 第 32 回講演会, 鳥取, 2012 年 1 月 21 日.
11. 細胞内オーキシン分布の可視化に関する研究 - IAA のリアルタイムイメージング
福永紫穂, 青山卓史, 野崎浩, 林謙一郎
第 46 回植物化学調節学会, 宇都宮, 2011 年 11 月 1 日.

12. オーキシンの信号伝達・輸送に関するケミカルバイオロジー
林謙一郎
第 46 回植物化学調節学会, 宇都宮, 2011 年 11 月 1 日. (受賞講演, 招待講演)

[図書] (計 2 件)

1. オーキシンの生合成と信号伝達経路 “植調剤の標的として”
林謙一郎
植調 (公益財団法人・日本植物調節剤研究協会機関紙), **2013**, 47 (6), 197-206 (査読無)
2. Metabolism, Signaling, and Polar Transport.
Hayashi K, & Overvoorde P
“Plant Chemical Biology,” (ISBN: 978-0-470-94669-5), D. Audenaert and P. Overvoorde, eds, Wiley-Blackwell, UK, **2013**, pp 95-127, total 312 pages (分担執筆)

6. 研究組織

1. 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

2. 連携研究者

野崎 浩 (NOZAKI, Hiroshi)
岡山理科大学・理学部・教授
研究者番号: 60159085

小柴 共一 (KOSHIBA, Tomokazu)
首都大学東京・理工学研究科・教授
研究者番号: 80117704