

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570060

研究課題名(和文)新奇オーキシン輸送阻害剤の探索と作用機構の解析

研究課題名(英文)Identification of novel IAA transport inhibitors and their functions

研究代表者

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

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)：植物ホルモンオーキシン(IAA)は、植物の発生、分化、成長、さらには環境応答に至る全生活環を通し重要な役割を果たすホルモンである。IAAは植物内を輸送されることで厳密にその分布を制御することが示されており、その輸送に関わる多くのキャリアータンパクが同定されている。本計画では、それぞれのタンパクに特異的な阻害剤を開発することを目的とし、阻害剤を用いた研究を進展させIAA輸送キャリアーの生理的役割、さらには新奇輸送タンパクの発見とIAA輸送分子メカニズムの解明を目指した。その結果、特に新規のIAA排出運搬体、流入運搬体の探索、特定に成功し、それぞれ論文として発表した。

研究成果の概要(英文)：We established two chemical screening methods by assessing the effect on gravitropic curvature and on IAA quantity transported from tip sections using the maize coleoptile systems. We used HitFinder 10,000 chemical library and identified 8 candidate compounds of IAA efflux inhibitor and it was revealed that 4 compounds among them showed lethality and affected cellular trafficking of PIN protein. We also found 10 compounds which affected slightly IAA transport in maize coleoptiles even at higher concentrations. One of the compound was similar to that of synthetic auxin 2,4-D, and it is possible that it could preferentially inhibit IAA influx. These active compounds may represent new tools for dissecting mechanisms of IAA transport and for identifying new protein components involving in IAA transport systems.

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：基礎生化学・植物分子生物・生理学

キーワード：環境 酵素 植物 生化学 発生・分化 ケミカルゲノミクス

## 1. 研究開始当初の背景

植物内の IAA (Indole-3-acetic acid)の輸送は、細胞膜にある IAA 輸送キャリアータンパクによる IAA の取り込みと排出により制御される(図 1-1)。シロイヌナズナを用いた研究により、取り込みキャリアー-AUX、排出キャリアー-PIN および PGP ファミリーが同定され、これら複数のキャリアータンパクが相互作用しながら IAA 輸送を決定していることが示唆されている(図 1-2)。また、これらは細胞内局在も小胞輸送経路やそれに伴うリン酸化により制御されていることが示されており、その制御が組織レベルでの IAA 輸送方向を決定していることが明らかとなっている。しかし、それぞれのキャリアータンパクによって運ばれる IAA がどのような生理現象に働いているかわかっておらず、またキャリアータンパクの IAA 輸送分子メカニズムについても全く解明されていない。

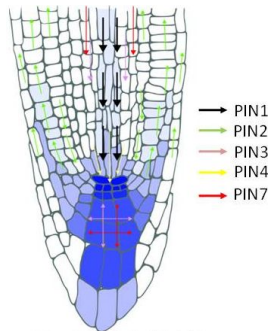
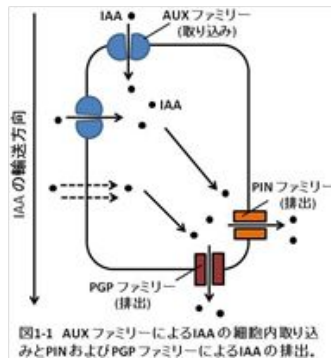


図1-2シロイヌナズナの根におけるPINの発現。(Krecek et al., 2009, Genom Biol.)

トウモロコシ幼葉鞘は先端 2 mm 以内で IAA が合成されており、その IAA は ZmPIN1 などにより基部方向へ輸送され、さらに、その輸送される IAA が重力屈曲を引き起こすことがわかってきた。NPA を幼葉鞘先端に処理すると、合成された IAA は屈曲反応部位へ供給されなくなるため、重力屈曲が阻害される(図 2 - 1)。申請者らはそのことを利用して IAA 輸送阻害剤のスクリーニングを行ってきた(図 2-2)。このスクリーニングの利点は、阻害剤を処理する部位と反応が生じる部位が異なっていることであり、すなわち、屈曲部位に阻害剤のアーティフィシャルな影響が及ばないことである。

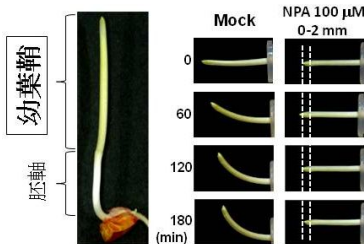


図2-1トウモロコシ幼葉鞘(左)幼葉鞘先端にNPAを処理すると、重力屈曲は完全に阻害される(右)。(Nishimura et al., 2009, PCP)

## 2. 研究の目的

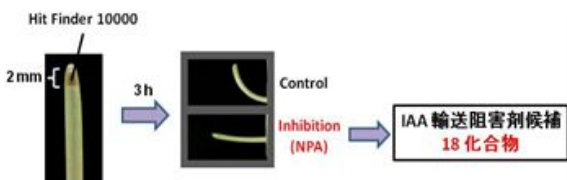
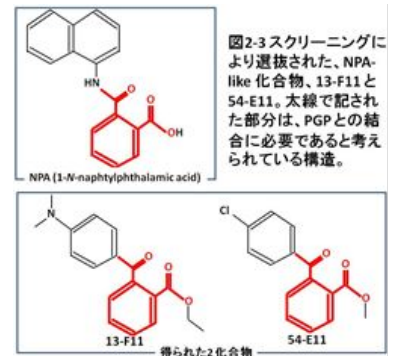


図2-2トウモロコシ幼葉鞘の重力屈曲を用いたIAA輸送阻害剤のスクリーニング

ケミカルライブラリー (Maybridge 社 HitFinder 10000) をトウモロコシ幼葉鞘先端に処理し重力屈曲を阻害する物質を選抜したところ、18種の化合物の選抜に成功した。このうち2種はNPAと構造相関を持っており、PGPの阻害剤であることが考えられる(図 2-3)。残り16種に関しては、既知の IAA 輸送阻害剤との構造相関が見られておらず、これらは新奇 IAA 輸送タンパクの発見に繋がる可能性がある。これらの化合物をシロイヌナズナに処理し表現型を観察したところ、それぞれの化合物で特異的な表現型を示すものも見つかってきており、IAA 輸送の制御に関わる新たな因子の同定が期待される。



## 3. 研究の方法

トウモロコシ幼葉鞘を用いて輸送阻害活性を GC-MS による IAA 定量実験で評価する。

スクリーニングにより得られた IAA 輸送阻害剤候補のシロイヌナズナの成長および分化に与える影響を観察し、輸送タンパク選択性オーキシンである 2,4-D と NAA を用いて表現型の回復実験を行い、阻害剤候補の作用点が IAA 搬入か排出か分類する。

*AtPIN1pro:PIN1-GFP*、*AtPIN2pro:PIN2-GFP*、*35Spro:Talin-YFP* 植物を用いて阻害剤候補のうち IAA 輸送タンパクの細胞内局在制御に関与しているものを分類する。

ブルダウンアッセイとシロイヌナズナのそれぞれ IAA 輸送タンパクの過剰発現体や欠損変異体を用いた解析により、阻害剤の標的タンパクを特定する。

## 4. 研究成果

植物ホルモンオーキシン (IAA) は、植物の発生、分化、成長、さらには環境応答に至る全生活環を通し重要な役割を果たすホルモンである。IAA は植物内を輸送されることで、厳密にその分布を制御することが示されており、その輸送に関わる多くのキャリアータンパクが同定されている。本計画では、数あるキャリアータンパクの役割を個別に解析可能なツールとして、それぞれのタンパクに特異的な阻害剤を開発することを目的とし、阻害剤を用いた研究を進展させ IAA 輸送キャリアーの生理的役割、さらには新奇輸送タンパクの発見と IAA 輸送の分子メカニズムの解明を目指し、特に新規の IAA 排出運搬体、流入運搬体の探索、IAA 合成阻害剤の特定に成功し、それぞれ論文として発表した。

## 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)

1. Suzuki H., Matano N., Nishimura T., Koshiba T. (2014) A 2,4-dichlorophenoxyacetic acid analog screened using a maize coleoptile system potentially inhibits indole-3-acetic acid influx in *Arabidopsis thaliana*. Plant Signal. Behav., (Recent paper [9:e29077])
2. Suzuki, H., Okamoto, A., Kojima, A., Nishimura, T., Takano, M., Kagawa, T., Kadota, A., Kanegae, T., \*Koshiba, T. (2014) Blue-light regulation of *ZmPHOT1* and *ZmPHOT2* gene expression and the possible involvement of *Zmphot1* in phototropism in maize coleoptiles. Planta, in press. [DOI:10.1007/s00425-014-2082-6]
3. 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(s), a key enzyme in auxin biosynthesis. Plant J. 77: 352-366. [doi: 10.1111/tbj.12399]
4. 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 indole-3-acetic acid transport inhibitors including compounds affecting cellular PIN trafficking by two chemical screening approaches using maize coleoptile systems. Plant Cell Physiol. 53: 1671-1682. (Editor-in-Chief's choice). [doi: 10.1093/pcp/pcs112]

[学会発表](計 9件(国際3、国内6))

1. Nishimura, T., Hayashi, K., Suzuki, H., Gyohda, A., Koshiba, T. (2013) YUCASIN is a novel potent inhibitor of a key enzyme YUCCA(s) in plant auxin biosynthesis. Ann Meeting of Plant Signal Behav 2013 (Vancouver, Canada)
2. Suzuki, H., Koshiba, T. (2013) Possible involvement of *ZmPHOT1* and *ZmPHOT2* in blue light perception to phototropic curvature in maize coleoptiles. Ann Meeting of Plant Signal Behav 2013 (Vancouver, Canada)
3. Kojima, A., Suzuki, H., Matsuda, S., Nishimura, N., Kadota, A., Koshiba, T. (2012) Changes in IAA distribution and expression pattern of *ZmSAUR2* after photo-stimulation in maize coleoptiles. Plant Biology Congress (Freiburg, Germany)
4. Suzuki, H., Nishimura, T., Kadota, A., Kanegae, T., Koshiba, T. (2014) "Blue light regulation of *ZmPHOT1* and *ZmPHOT2* gene expression and a possible involvement of *Zmphot1* on phototropism in maize coleoptiles" 第55回日本植物生理学会年会(3月、富山)
5. Suzuki, H., Okamoto, A., Koshiba, T. (2013) "Rapid modification of *ZmPHOT1* after blue light stimulation in maize coleoptiles" 日本植物学会第77回大会(9月、札幌)
6. 西村岳志 日本植物生理学会 2014年度 PCP 論文賞授賞講演、第55回日本植物生理学会年会(3月、富山) 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 indole-3-acetic acid transport inhibitors including compounds affecting cellular PIN trafficking by two chemical screening approaches using maize coleoptile systems. Plant Cell Physiol. 53: 1671-1682.

7. 小柴共一 (2013) 「植物ホルモンオーキシン生合成の新規阻害剤“YUCASIN”の発見」住友化学宝塚研究所セミナー、招待講演(3月、宝塚)
8. 西村岳志、林謙一郎、笠原博幸、神谷勇治、小柴共一 (2012) YUCCA を標的とする新規 IAA 合成阻害剤の探索。日本植物生理学会第53回大会(京都)
9. 松本さちこ、西村岳志、林謙一郎、俣野由行、森島大智、坂口祐介、駒野照弥、久保稔、長谷部光泰、笠原博幸、神谷勇治、小柴共一 (2012) トウモロコシ幼葉鞘を用いた IAA 合成および輸送阻害剤のケミカルスクリーニング。日本植物生理学会第53回大会(京都)

[図書](計 1件)

1. Nishimura, T., Koshiba, T. (2013) Auxin Biosynthesis and Polar Auxin Transport during Tropisms in Maize Coleoptiles. In "Signaling and Communication in Plants. Polar Auxin Transport", Eds, Rujin Chen and Frantisek Baluška, Springer, p.221-238.

[産業財産権]

出願状況(計 1件)

名称: 植物ホルモン・オーキシンの新規合成阻害剤と農園芸での利用

発明者: 小柴共一、西村岳志

権利者: 首都大学東京

種類: 特許

番号: 特開 2013-184930

出願年月日: 出願 2012.3.8, 公開 2013年9月19日

国内外の別: 国内

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

研究室

<http://www.biol.se.tmu.ac.jp/labo.asp?ID=horcel>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

西村 岳志 (NISHIMURA, Takeshi)  
農業生物資源研・遺伝子組換え研究センター  
・研究員  
研究者番号： 50599983

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：