

令和元年6月14日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05623

研究課題名（和文）オーキシン生合成酵素の新規な制御機構に関する研究

研究課題名（英文）Post-translational regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis

研究代表者

増口 潔 (Mashiguchi, Kiyoshi)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：00569725

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 18,500,000円

研究成果の概要（和文）：植物ホルモンであるインドール-3-酢酸（IAA）は、植物の成長や発達のほぼ全ての過程で中心的な役割を担っている。植物の主要なIAA生合成経路は、トリプトファンアミノ基転移酵素TAAファミリーとフラビン含有モノオキシゲナーゼYUCCAファミリーによるインドール-3-ピルビン酸経路である。本研究では、シロイヌナズナにおいてYUCCAと相互作用するF-boxタンパク質を見出し、その欠損変異体や過剰発現体の解析を通して、IAA生合成は、生合成酵素の遺伝子発現調節だけではなく、翻訳後調節によっても制御されている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物ホルモンとして働くオーキシンの生合成における鍵酵素タンパク質であるYUCCA（ユッカ）ファミリーが、遺伝子レベルだけではなく、タンパク質レベルの調節によっても制御されている可能性が示されました。今回モデル植物のシロイヌナズナから見出したYUCCAの調節タンパク質のホモログ（よく似たタンパク質）は他の双子葉植物にも存在するので、本メカニズムは様々な植物において共通したものかもしれません。

研究成果の概要（英文）：Auxins, a class of plant hormones, are essential for plant growth and development. The natural auxin indole-3-acetic acid (IAA) is biosynthesized from tryptophan via indole-3-pyruvic acid by TAA aminotransferase and YUCCA flavin-containing monooxygenase families. Although much progresses in the transcriptional regulation of IAA biosynthetic genes has been made in recent years, its post-translational regulation has remained unclear. In this study, we identified and analyzed a YUCCA-interacting protein to elucidate the regulation mechanism of IAA biosynthesis in Arabidopsis. Our results suggest that the regulation of YUCCAs at the level of protein has a role in the homeostatic regulation of IAA.

研究分野：農芸化学

キーワード：植物ホルモン オーキシン フラビン含有モノオキシゲナーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

天然オーキシンであるインドール酢酸(IAA)は植物の生活環のほぼ全ての過程で中心的な役割を果たす植物ホルモンである。最近、トリプトファンアミノ基転移酵素 TAA ファミリーとフラビン含有モノオキシゲナーゼ YUCCA ファミリーによる植物の主要 IAA 生合成経路であるインドールピルビン酸(IPA)経路が解明されたのを契機として、本経路の調節機構に関する研究が精力的に進められている。TAA ファミリーや YUCCA ファミリーの遺伝子発現を制御する因子が世界中で探索され、bHLH 型転写因子 PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR や SH1/STY 型転写因子 STYLISH、ヘテロクロマチンタンパク質 TERMINAL FLOWER2 など、これまで植物の成長に重要な役割を担うことが知られていた多くの転写制御因子が同定されている。しかし、IAA 生合成酵素のタンパク質レベルでの調節機構についてはほとんど明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

特定のタンパク質の認識とその分解に関する SCF タンパク質分解複合体を構成する F-box タンパク質ファミリーに属するシロイヌナズナの YUCCA 相互作用タンパク質の解析を通して、タンパク質の翻訳後調節による IAA 生合成制御が、どのようなオーキシンの生理作用に参与しているのかを調査し、本機構が植物における内生オーキシン濃度調節機構にどの程度寄与しているのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 酵母 two-hybrid 法などを用いて、シロイヌナズナに 11 個存在する YUCCA と予備的研究で見出した F-box タンパク質に属する YUCCA 相互作用タンパク質 (以降、YUCCA-interacting protein, YIP と略する)との相互作用を検証した。

(2) YIP 遺伝子の生理機能を明らかにするために、当該遺伝子に T-DNA が挿入されたシロイヌナズナの遺伝子破壊株を取得し、表現型解析を行なった。また、当該破壊株と IAA 生合成欠損変異体の二重変異体を作製し、表現型解析を行なった。

(3) YIP 遺伝子の開始コドン上流約 4.1 kbp を用いてプロモーター::レポーター株を作製し、発現部位を調査した。

(4) シロイヌナズナを用いて YIP 遺伝子のエストラジオール誘導系による一過的な過剰発現体を作製し、表現型解析を行なった。

(5) YIP がオーキシン作用に対して抑制的に機能することを実証するため、(4)の一過的な YIP 過剰発現体を用いて、次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析および液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)を用いた IAA 定量を行なった。

4. 研究成果

(1) 酵母 two-hybrid 法を用いて、YIP とシロイヌナズナに 11 個存在する YUCCA との相互作用を検証したところ、YIP は YUCCA5, 6, 7, 8 と強い相互作用、YUCCA1, 4, 9 と弱い相互作用が認められた(図 1)。この内、YIP と YUCCA8 の相互作用については、タマネギ表皮細胞を用いた Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) 法によっても確認された。

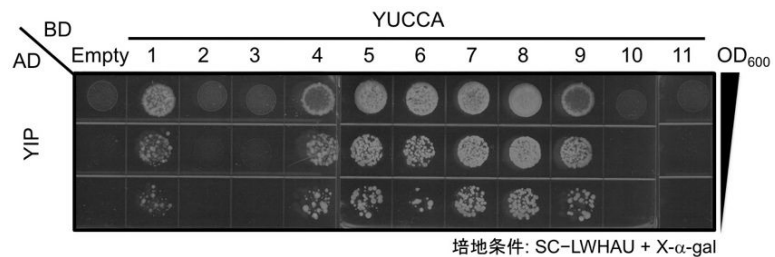


図1. 酵母two-hybrid法におけるYIPとYUCCAとの相互作用解析

(2) YIP 遺伝子のエキソン部分に T-DNA が挿入された 2 ラインの YIP 遺伝子破壊株 (*yip-1*、*yip-2*) を取得し、表現型を調査した。その結果、野生型(WT)と比較して、YIP 遺伝子破壊株は主根の伸長には差が見られなかったものの、側根の成長が促進されることが明らかとなった(図 2)。YIP と相互作用が見られた YUCCA8 や YUCCA9 は、主根の根端や側根で発現しており、*yucca8/9* 二重変異体では側根数が減少することが報告されていることから (Hentrich et al., *Plant J*, 2013) YIP は YUCCA8 や YUCCA9 との相互作用を介して、側根成長を抑制する機能を有していることが推測された。次に、もし YIP 遺伝子破壊株におい

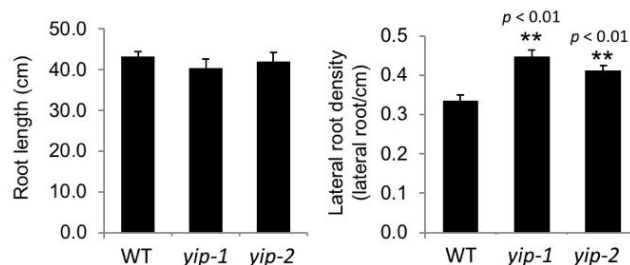


図2. 根におけるYIP破壊株の表現型

て YUCCA による IAA 生合成が活性化しているのであれば、当該破壊株とオーキシン生合成変異体の二重変異体では、オーキシン欠損の表現型が部分的に回復することが期待される。そこで、IPA 経路の主要な TAA ファミリーである TAA1 の欠損変異体である *sav3* 変異体と YIP 遺伝子破壊株の二重変異体を作製し、表現型を観察した。その結果、二重変異体では *sav3* 変異体で見られる矮化(根や胚軸の伸長不全)の程度が部分的に回復することが明らかとなった(図3)。このことから、YIP 遺伝子破壊株では YUCCA による IAA 生合成が亢進しており、YIP がオーキシン作用に対して抑制的に機能しているという仮説が支持された。

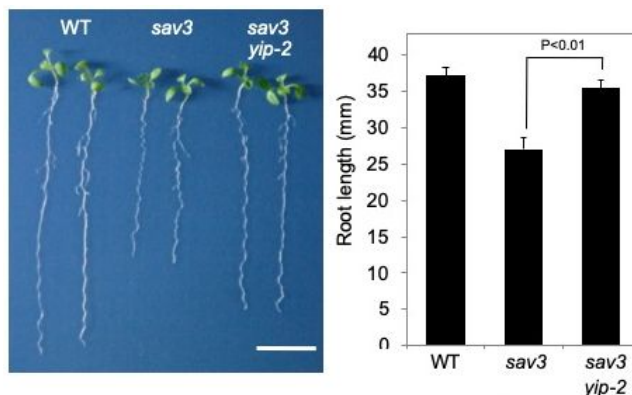


図3. *sav3 yip*二重変異体の表現型

(3) YIP 遺伝子のプロモーター::レポーター株 (YIPpro::GFP) を作成し、蛍光顕微鏡を用いた GFP レポーターの観察により、YIP の発現部位を調査した。その結果、根において YIPpro::GFP は側根の基部およびその周辺に強く発現しており、(2) で示唆された YIP が側根成長におけるオーキシン作用に関与する可能性が支持された。

(4) YIP 遺伝子のエストラジオール誘導系による一過的な過剰発現植物体を作製し、ベクターコントロール植物体 (pER8) と共に通常培地からエストラジオール含有培地に移植することで薬剤処理を行い、植物体の表現型を解析した。その結果、一過的な YIP 過剰発現体の独立した 2 ラインにおいて、薬剤処理後に主根伸長の抑制(図 4A) や異常な重力屈性(図 4B) が認められた。根の伸長抑制や重力屈性の異常は、オーキシンの情報伝達変異体や輸送変異体、オーキシン生合成阻害剤を処理した植物体で見られる表現型であることから、YIP 遺伝子の一過的な過剰発現は YUCCA が介する IAA 生合成を広範囲で抑制したと考えられ、上記までの仮説が支持された。

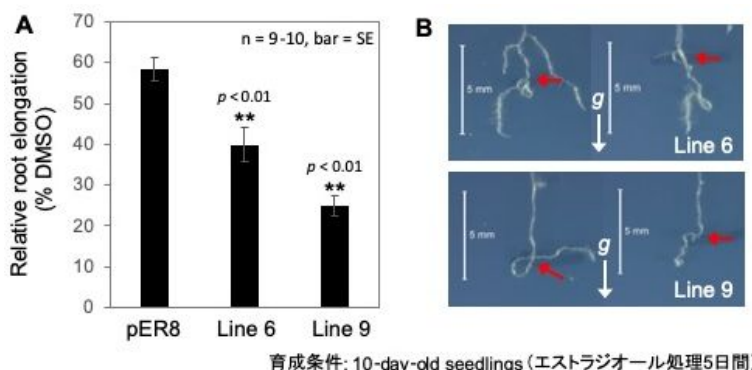


図4. 一過的な YIP 過剰発現植物体の表現型

(5) (4) の実験と同様に、通常培地からエストラジオール含有培地に移植することで、薬剤処理(12 時間)を行った播種後 10 日目の pER8 と独立した 2 ラインの YIP 過剰発現体の根から調製した mRNA を用いて RNA-Seq 解析を行なった。その結果、両ラインにおいてオーキシン応答性遺伝子である Aux/IAA 遺伝子、IAA-アミノ酸複合体合成酵素 (GH3) 遺伝子、LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN (LBD) 遺伝子、キシログルカンエンドトランスグルコシラーゼ/ヒドロラーゼ (XTH) 遺伝子などが pER8 と比較して有意に発現量が減少しており、当該遺伝子の過剰発現により、オーキシン情報伝達が阻害されていることが示唆された(表 1)。

表1. YIP 過剰発現体で共通して発現量が減少していた代表的な遺伝子 (pER8 = 1 とした相対発現量, n = 3)

Gene Name	Line 9-15	Line 6-5
YIP (Overexpressed gene)	43.5	35.1
XTH26	0.06	0.07
XTH13	0.08	0.18
XTH12	0.10	0.17
IAA31	0.25	0.31
IAA1	0.39	0.48
GH3.1	0.41	0.36
LBD17	0.43	0.46
GH3.6	0.47	0.55
IAA19	0.49	0.48

次に、エストラジオールを 16 時間処理した 10 日目の植物体の根から IAA を精製し、LC-MS/MS を用いて定量したところ、(4) においてより表現型が強かったライン 9 においてコン

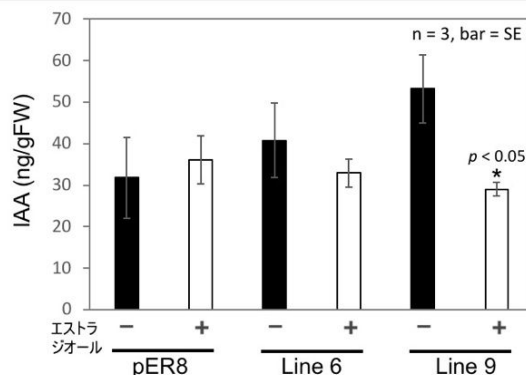


図5. 一過的な YIP 過剰発現植物体における IAA 内生量

トロールと比較して IAA 内生量が減少していた。一方、ライン 6 では IAA 内生量の有意な減少は認められなかった。植物体内における IAA 量の恒常性は、代謝（不活性化）によっても厳密に制御されていることが知られていることから、今後、これらの過剰発現体における IAA アミノ酸複合体やオキソ IAA といった IAA 代謝物の内生量も併せて測定することが必要であると考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Yasui R, Seto Y, Ito S, Kawada K, Itto-Nakama K, Mashiguchi K, Yamaguchi S. Chemical screening of novel strigolactone agonists that specifically interact with DWARF14 protein. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 29 (7):938-942, 2019 年, 査読有

DOI:10.1016/j.bmcl.2019.01.010

Seto Y, Yasui R, Kameoka H, Tamiru M, Cao M, Terauchi R, Sakurada A, Hirano R, Kisugi T, Hanada A, Umehara M, Seo E, Akiyama K, Burke J, Takeda-Kamiya N, Li W, Hirano Y, Hakoshima T, Mashiguchi K, Noel JP, Kyojuka J, Yamaguchi S. Strigolactone perception and deactivation by a hydrolase receptor DWARF14. *Nature communications*, 10 (1):191, 2019 年, 査読有

DOI:10.1038/s41467-018-08124-7

Mashiguchi K, Hisano H, Takeda-Kamiya N, Takebayashi Y, Ariizumi T, Gao Y, Ezura H, Sato K, Zhao Y, Hayashi KI, Kasahara H. *Agrobacterium tumefaciens* Enhances Biosynthesis of Two Distinct Auxins in the Formation of Crown Galls. *Plant Cell Physiol*, 60 (1):29-37, 2019 年, 査読有

DOI:10.1093/pcp/pcy182

Burger M, Mashiguchi K, Lee HJ, Nakano M, Takemoto K, Seto Y, Yamaguchi S, Chory J. Structural Basis of Karrikin and Non-natural Strigolactone Perception in *Physcomitrella patens*. *Cell Rep*, 26 (4):855-865 e855, 2019 年, 査読有

DOI:10.1016/j.celrep.2019.01.003

Yao J, Mashiguchi K, Scaffidi A, Akatsu T, Melville KT, Morita R, Morimoto Y, Smith SM, Seto Y, Flematti GR, Yamaguchi S, Waters MT. An allelic series at the *KARRIKIN INSENSITIVE 2* locus of *Arabidopsis thaliana* decouples ligand hydrolysis and receptor degradation from downstream signalling. *The Plant Journal*, 96 (1):75-89, 2018 年, 査読有

DOI:10.1111/tpj.14017

Ramírez V, Xiong G, Mashiguchi K, Yamaguchi S, Pauly M. Growth and stress related defects associated with wall hypoacetylation are strigolactone dependent. *Plant Direct*, 2 (6):e00062, 2018 年, 査読有

DOI:10.1002/pld3.62

Kuroha T, Nagai K, Gamuyao R, Wang DR, Furuta T, Nakamori M, Kitaoka T, Adachi K, Minami A, Mori Y, Mashiguchi K, Seto Y, Yamaguchi S, Kojima M, Sakakibara H, Wu J, Ebana K, Mitsuda N, Ohme-Takagi M, Yanagisawa S, Yamasaki M, Yokoyama R, Nishitani K, Mochizuki T, Tamiya G, McCouch SR, Ashikari M. Ethylene-gibberellin signaling underlies adaptation of rice to periodic flooding. *Science*, 361 (6398):181-186, 2018 年, 査読有

DOI:10.1126/science.aat1577

Tsugafune S, Mashiguchi K, Fukui K, Takebayashi Y, Nishimura T, Sakai T, Shimada Y, Kasahara H, Koshiba T, Hayashi KI. Yucasin DF, a potent and persistent inhibitor of auxin biosynthesis in plants. *Sci Rep*, 7 (1):13992, 2017 年, 査読有

DOI:10.1038/s41598-017-14332-w

Thussagunpanit J, Nagai Y, Nagae M, Mashiguchi K, Mitsuda N, Ohme-Takagi M, Nakano T, Nakamura H, Asami T (2017) Involvement of STH7 in light-adapted development in *Arabidopsis thaliana* promoted by both strigolactone and karrikin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 81 (2):292-301, 2017 年, 査読有

DOI:10.1080/09168451.2016.1254536

Sugawara S, Mashiguchi K, Tanaka K, Hishiyama S, Sakai T, Hanada K, Kinoshita-Tsujimura K, Yu H, Dai X, Takebayashi Y, Takeda-Kamiya N, Kakimoto T, Kawaide H, Natsume M, Estelle M, Zhao Y, Hayashi K, Kamiya Y, Kasahara H. Distinct characteristics of indole-3-acetic acid and phenylacetic acid, two common auxins in plants. *Plant Cell Physiol*, 56 (8):1641-1654, 2015 年, 査読有

DOI:10.1093/pcp/pcv088

〔学会発表〕(計 5 件)

鈴木馨, 来生貴也, 森愛実, 秋山康紀, 瀬戸義哉, 増口潔 (発表者), 山口信次郎. シロ

イヌナズナにおけるストリゴラクトン輸送体の探索. 第 59 回日本植物生理学会年会, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市), 2018 年 3 月

Tanaka K, Morita R, Kameoka H, Kyojuka J, Seto Y, Mashiguchi K (発表者), Yamaguchi S. Regulation of strigolactone biosynthesis by the D14 like pathway in rice. 2nd International Congress on Strigolactones, トリノ (イタリア), 2017 年 3 月

Mashiguchi K (発表者), Seto Y, Yamaguchi S. Strigolactone biosynthesis and its regulation. NAIST 異分野融合ワークショップ Frontiers in parasitic plant and host interactions, 奈良先端科学技術大学院大学 (奈良県生駒市), 2016 年 8 月

Akatsu T, Morimoto Y, Seto Y, Mashiguchi K (発表者), Yamaguchi S. Identification of essential amino acid residues in KAI2/HTL in Arabidopsis. The 22nd International Plant Growth Substances Association meeting, トロント (カナダ), 2016 年 6 月

赤津友基, 森本優, 瀬戸義哉, 増口潔 (発表者), 山口信次郎. シロイヌナズナのカリキン受容体 KAI2/HTL の機能に重要なアミノ酸残基の同定. 第 57 回日本植物生理学会年会, 岩手大学 (岩手県盛岡市), 2016 年 3 月

〔図書〕(計 1 件)

増口潔、山口信次郎、講談社、新しい植物ホルモンの科学・第 3 版 (第 11 章 ストリゴラクトン) 2016 年、148-160

〔その他〕

ホームページ等

Researchmap: <https://researchmap.jp/k.mashiguchi>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 笠原 博幸 (東京農工大学・教授)

ローマ字氏名: KASAHARA, hiroyuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。