

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510228

研究課題名（和文）オーキシンの酸化的代謝機構解明をめざした化学プローブの探索

研究課題名（英文）Exploration of chemical probes for investigation of oxidative metabolism of auxins

研究代表者

宮川 恒 (MIYAGAWA HISASHI)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：10219735

研究成果の概要（和文）：インドール-3-酢酸（IAA）は、植物の生長制御に関わるホルモンであり、その濃度は代謝・輸送により厳密に調節されている。IAA の異化代謝においては、酸化代謝が中心的役割を果たしているが、その詳細なメカニズムはほとんど明らかにされていない。本研究では、IAA の酸化代謝反応を阻害する低分子化合物の探索を目的としたスクリーニング法の開発を行った。その結果、質量分析計を用いた酸化代謝物の迅速測定法を活用することにより、効率的な IAA 酸化反応阻害剤のスクリーニング法を確立できた。また、この手法を用いてイネにおける既知化合物による IAA 酸化反応に対する阻害効果を評価した。

研究成果の概要（英文）：Indole-3-acetic acid is a class of plant hormones, which is responsible for plant growth regulation. The concentration of IAA is strictly controlled by metabolism and transport. In IAA metabolism, oxidation plays an important role, but its mechanisms are not fully understood. In this study, we developed a screening system for inhibitors of IAA oxidation. As a result, we could establish a high-throughput screening system using LC/MS/MS to detect oxidative metabolites and evaluated the action of the known inhibitor of IAA oxidation in rice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：オーキシン、異化代謝、質量分析、スクリーニング、酸化酵素

### 1. 研究開始当初の背景

インドール-3-酢酸（IAA と略す）は、植物の生長制御に関わる植物ホルモンであるオーキシンの 1 種である。IAA の細胞あるいは組織内濃度は、異化代謝（代謝と略す）および植物体内の輸送のバランスによって調節される。IAA の代謝は主に酸化代謝・抱合形成・脱炭酸反応によって行われている（図 1）。本申請者はこれまでに、シロイヌナズ

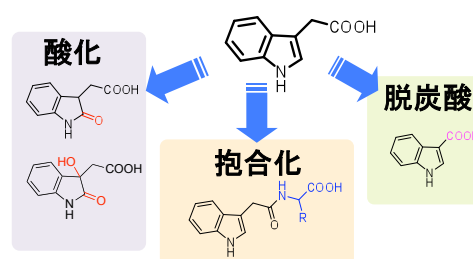


図 1 IAA の異化代謝

ナやイネなどに含まれる IAA 代謝物の同定ならびに定量を、質量分析技術を駆使して行ってきた。その結果、酸化代謝物が最も多く存在し、酸化代謝が植物における IAA 代謝の中心的役割を果たしていることを明らかにした。酸化代謝は不可逆的であり、代謝物はオーキシン活性を失うことから、この代謝反応は IAA の不活性化に関わるものと考えられている。このように、酸化代謝は IAA の濃度調節にとって重要な役割を担っているにもかかわらず、酸化反応に関与する酵素など、詳細なメカニズムについてはほとんど明らかにされていない。

植物の生理機能を解明しようとする研究では、注目する生理機能を欠損した変異体を見出し、その変異体における遺伝子の変異点の解析を進めることにより、その機構の解明が進展するケースが多い。しかしながら、オーキシンのように成長や分化に大きく関与するホルモンの場合、これに関わる機能が欠損すると生育すらできない可能性が高く、変異体の作出自体が難しいといった問題がある。このことが、IAA 酸化代謝機構の解明が進展しない理由の1つであると考えられる。このような状況においては、次に挙げる化学遺伝学手法による機構の解明が有効であると考えられる。

化学遺伝学研究 (chemical genetics) は、文字通り化学による遺伝学へのアプローチであり、遺伝学において点変異にあたる操作を低分子化合物に置き換え、主にタンパク質を標的としてその活性を阻害し、機能解析を進める研究手法である。遺伝学においては上でも述べたように、注目する機能が重要であればあるほど、遺伝子変異の導入が致死性となる可能性があり、研究遂行が難しい。それに対して、低分子化合物による機能制御は、時間的・作用的にピンポイントであるため致死性を回避でき、詳細な機能解析が可能となる利点がある。IAA 酸化代謝の機能解明においても、その機能の重要性から遺伝子変異による機能解析は困難であることが予想される。そこで本申請課題においては、化学遺伝学手法を用いた研究を進めることとした。つまり、IAA の酸化代謝を阻害する低分子化合物を見出し、それを化学プローブとして代謝反応に関わる酵素を同定することにより、IAA 酸化代謝の全貌を明らかにしようと考えた。

## 2. 研究の目的

化学遺伝学手法において最も重要な実験は、注目する生理機能を特異的に制御 (阻害あるいは促進) することのできる低分子化合物を発見することである。このためには、構造的多様性をもつ化合物ライブラリを迅速にスクリーニングできるバイオアッセイ系

が必須となる。申請者はこれまでに、様々な植物種を対象に、新規 IAA 代謝物の同定ならびにそれらの網羅的定量を行ってきた。これらの分析は、高感度質量分析ならびに安定同位体標識化合物の合成によって成し遂げられたものであり、現状では少量の植物サンプルから、複数の代謝物の定量が可能となっている。本研究においては、この分析手法をさらに改良し、代謝阻害剤の発見のためのバイオアッセイとして確立する。つまり阻害剤候補化合物を植物に処理した後、IAA の主要な酸化代謝物の定量をおこない、その減少を指標にして化合物の活性を判定する。

また、インドール 3-酪酸 (IBA と略す) は IAA と同様に天然オーキシンであるが、これに関しては植物体内での代謝について不明な点が多い。そこで、IAA と同様に IBA も酸化代謝が主要な経路となるかについて調べ、IAA 酸化酵素阻害剤の探索において阻害効果の指標物質として用いるべきか検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) IAA 酸化代謝阻害剤スクリーニングのためのバイオアッセイ法の確立

質量分析計による IAA 代謝物の定量法はこれまでの研究によって確立されており、1サンプルあたり約 15-20 分で行うことが可能であった。しかしながら、この分析法を阻害剤スクリーニングに応用する場合、さらなる分析時間の短縮化が必要である。そこで近年開発されたコアシェル型 HPLC カラム (高流速で高分離能を有する) を用い、既存の装置での IAA 代謝物 (本研究では IAA とその酸化体である OxIAA) の分析法のさらなる迅速化について検討した。

### (2) 植物体を用いた IAA 酸化代謝反応の解析

2 週間生育させたイネ植物体に阻害剤候補化合物を作用させた。この植物体から、一定時間後に IAA 代謝物を抽出し、分析を行なった。ここでは供試化合物として、これまでに IAA 酸化反応阻害活性を示すことが報告されている 2,3,5-トリヨード安息香酸 (TIBA) を用い、その効果を検証した。

### (3) 新規 IBA 酸化代謝物の探索

IBA の標品として、 $^{13}\text{C}$ -インドールおよび  $\gamma$ -ピクロラクトンを出発原料として  $^{13}\text{C}$ -IBA を合成した。さらにこれを酸化して  $^{13}\text{C}$ -OxIBA を合成した。これらを内部標準物質として用いてそれぞれの定量を行った。植物材料として、2 週間生育させたイネを用いた。

## 4. 研究成果

### (1) IAA 酸化代謝阻害剤スクリーニングのためのバイオアッセイ法の確立

IAA 代謝物の分析は、LC/MS/MS によって行ってきたが、その分析に要する時間は主に

HPLC の分離条件により決定される。これまで IAA の代謝物分析に用いていた条件では、1 分析あたり 15-20 分程度必要としており、やや効率が悪い。近年、微粒子化されたシリカゲルカラムを用いることによって、高速・高分離能分析が可能となっているが、専用の装置 (UHPLC と呼ばれる) を必要とすることが難点である。一方、最近開発されたコアシェル型カラムは、UHPLC には及ばないものの、専用の装置を必要とせず、これまでのカラムでは不可能であった高速・高分離能分析を行うことができる。本研究においてもコアシェル型カラム (Poroshell 120、2 x 50 mm、アジレント社) を用いることにより、分析時間をこれまでの半分以下の 7 分程度にまで短縮することができた (図 2)。この分析手法を用いることにより、IAA 酸化代謝阻害剤スクリーニングを効率的に行うことが可能となった。

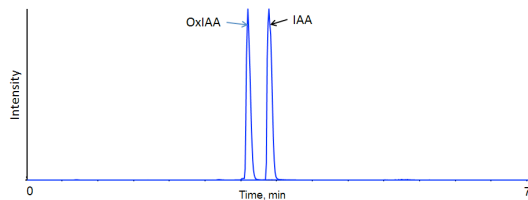


図 2 LC/MS/MS による IAA と OxIAA の検出

### (2) 既知化合物による IAA 酸化反応阻害活性の解析

TIBA は極性オーキシン輸送を阻害する化合物として知られているが、一方でトウモロコシから調製された粗酵素液を用いた実験により、IAA の酸化代謝反応を阻害する活性を有していることが報告されている。そこで、本研究においては、この化合物をイネ植物体に処理し、その IAA 酸化阻害活性について調べた。TIBA 処理 (10  $\mu$ M) したときの IAA および OxIAA の含量の経時変化を図 3、4 に示した。IAA 含量は TIBA 処理すると根部、地上部ともに有意に増加し、OxIAA 含量については減少傾向がみられた。このことから、イネに対しても TIBA は IAA 酸化代謝反応阻害活性を有していることが示唆された。TIBA の効果が弱い原因として、本実験では植物体を用いているため、TIBA の主要な活性である極性輸送阻害などの影響が排除できないだけでなく、個体差による影響も大きいことが考えられる。今後、粗酵素液を作製してより直接的に IAA 酸化代謝反応を解析することにより、さらに詳細な酸化反応阻害の様式が明らかになるものと思われる。

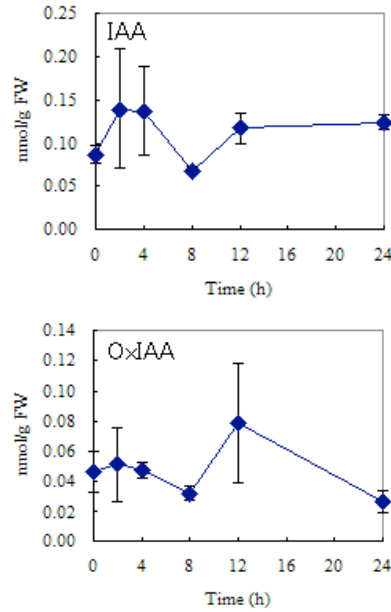


図 3 TIBA 処理したイネ植物体根部における IAA と OxIAA の変化

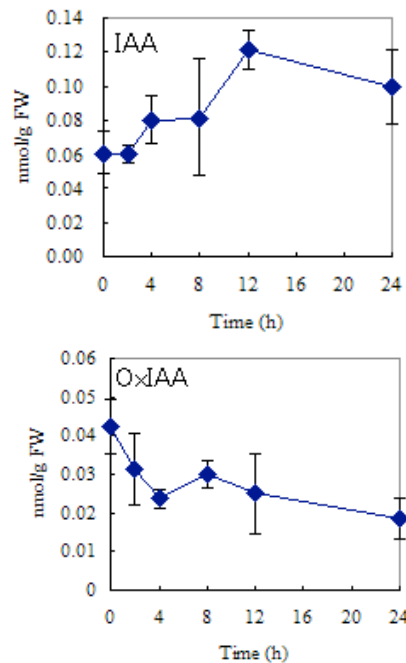


図 4 TIBA 処理したイネ植物体地上部における IAA と OxIAA の変化

### (3) 新規 IBA 酸化代謝物の探索

IAA の酸化代謝反応より予想された IBA の酸化代謝物 (OxIBA) の同位体標識体を化学合成し、これを標品としてイネ植物体抽出物に含まれる IBA および OxIBA の同定・定量を、質量分析計を用いて行った (図 5)。

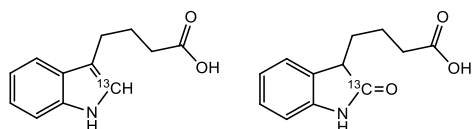


図5  $^{13}\text{C}$ -IBA (左) および  $^{13}\text{C}$ -OxIBA (右) の構造

LC/MS/MS 分析の結果、IBA および OxIBA が根部・地上部いずれからも検出された。このことから、IAA と同様の酸化代謝反応が IBA においても存在することが示唆された。しかしながら、過剰の IBA を外部投与した場合、OxIBA の増加量は OxIAA の場合に比べて、低いものであった。このことから IBA の酸化反応は主要な代謝経路ではなく、IAA 酸化反応阻害剤の探索において阻害効果の指標物質として考慮する必要がないことが分かった。

## 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 2 件)

(1) Miyashita, M; Oda, M; Ono, Y; Komoda, E; and Miyagawa, H, Discovery of a small Peptide from combinatorial libraries that can activate the plant immune system by a jasmonic acid signaling pathway, *ChemBioChem*, 査読あり **12**, 2011, 1323-9.  
DOI: 10.1002/cbic.201000694

(2) Ishihara, A; Nakao, T; Mashimo, Y; Murai, M; Ichimaru, N; Tanaka, C; Nakajima, H; Wakasa, K; Miyagawa, H, Probing the role of tryptophan-derived secondary metabolism in defense responses against *Bipolaris oryzae* infection in rice leaves by a suicide substrate of tryptophan decarboxylase, *Phytochemistry*, 査読あり, **72**, 2011, 7-13.  
DOI: 10.1016/j.phytochem.201011001

[学会発表] (計 6 件)

(1) 西野 雄人、小山 彩香、大西 敦子、宮下 正弘、宮川 恒「植物におけるインドール-3-酪酸代謝物の分析」日本農芸化学会 2013 年度大会、2013/3/27、東北大学

(2) 大西 敦子、田中 千尋、青木 秀之、宮下 正弘、宮川 恒「病原感染イネにおけるオーキシン代謝」日本農薬学会第 38 回大会、2013/3/16、筑波大学

(3) 青木 秀之、大西 敦子、宮下 正弘、宮川 恒、矢頭 治「ネ OsSAUR51 遺伝子の高発現がもたらす白葉枯病抵抗性とオーキシン量の変化について」第 30 回日本植物細胞分子生物学会大会、2012/8/4、奈良先端科学技術大学院大学

(4) 深水 愛理沙、石原 亨、宮川 恒、中島 廣光、若狭 暁「イネ sl 変異体に感染したごま葉枯病菌によるインドール-3-酢酸の生産」日本農芸化学会 2012 年度大会、2012/3/24、京都女子大学

(5) 松田 洋子、中村 俊介、大西 敦子、宮川 恒「インドール酢酸のイネ植物体における酸化的代謝」第 29 回日本植物細胞分子生物学会大会、2011/9/8、九州大学

(6) 松田 洋子、宮川 恒「イネにおける IAA の酸化代謝」日本農芸化学会 2011 年度大会、2011/03/26、京都女子大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮川 恒 (MIYAGAWA HISASHI)  
京都大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：10219735