

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660091

研究課題名(和文) オーキシン生合成の可視化にむけた基盤的研究

研究課題名(英文) Biochemical mechanism of indole-3-acetic acid biosynthesis in plants

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) 2,600,000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)の生合成経路において機能するアミノ基転移酵素TAAとフラビン含有モノオキシゲナーゼYUCCAについて生化学的に解析し、植物細胞内における選択的なIAAの合成にTAAとYUCCAの協調的な働きが寄与する可能性を明らかにした。TAAとYUCCAのタンパク質間相互作用は確認することが出来なかったものの、蛍光タンパク質との融合タンパク質を用いた観察において、類似の発現パターンを示すTAAとYUCCAが存在したことから、植物は組織(もしくは細胞)レベルで同時にTAAとYUCCAを発現させる事でIAA生合成を調節している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Auxins are a class of plant hormones that are essential for growth and development. In this study, we analyzed the biochemical mechanism of the natural auxin indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis. IAA is biosynthesized from tryptophan via indole-3-pyruvic acid by TAA aminotransferase and YUCCA flavin-containing monooxygenase families. We found that YUCCAs efficiently converted aromatic amino acid-derived pyruvates to their carboxylic acid forms, suggesting that the substrate specificity of YUCCAs is not strict. We further showed that the enzymatic action of YUCCAs is metabolically linked to that of TAAs. Although we could not confirm protein-protein interaction between TAAs and YUCCAs, the cooperative action of TAAs and YUCCAs may play important roles in the selective synthesis of IAA at the sites of auxin production.

研究分野：農芸化学

キーワード：植物ホルモン オーキシン アミノ基転移酵素 フラビン含有モノオキシゲナーゼ 生合成 インドール酢酸

1. 研究開始当初の背景

オーキシンは植物の生長や環境応答など様々な局面において中心的な役割を果たす植物ホルモンである。オーキシンの生理作用を包括的に理解するためには、その合成/代謝、極性輸送、受容/シグナル伝達の3点を明らかにする必要がある。これまで蛍光タンパク質融合型の輸送体や輸送体に対する免疫抗体、オーキシン応答性のレポーター (DR5-GUS/GFP や) といった可視化マーカーを利用した研究から、オーキシンは合成される部位から、機能する部位まで輸送体によって運ばれていると考えられてきた。しかし、実際にどのような部位で IAA が生合成されるのかについては不明点が多い。2011年に天然オーキシンであるインドール-3-酢酸 (IAA) の主要な生合成経路 (図1) が明らかになったことで、極性輸送や情報伝達でのみ理解されて来たオーキシン作用は再検証が必要であると考えられた。

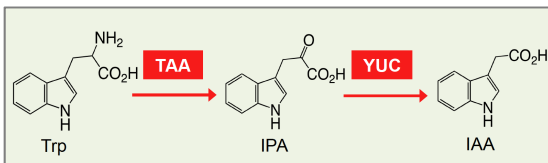


図1. IAA の生合成経路

2. 研究の目的

IAA はトリプトファン (Trp) を始発物質として、Trp アミノ基転移酵素 (TAA) とフラビン含有モノオキシゲナーゼ YUCCA による2段階の酵素反応で合成されるが (図1)、その詳細なメカニズムは未解明であった。申請者は過去に TAA1 遺伝子と YUCCA6 遺伝子の共過剰発現植物体では IAA 及び IAA 代謝物の内生量が劇的に増加するという実験結果 (Mashiguchi et al., 2011) から、植物体内で精密に調節されるべきオーキシン生合成は、TAA と YUCCA の細胞内もしくは組織レベルでの共局在を介して行われているのではないかと考えた。本研究では、まず IAA 生合成において TAA と YUCCA の協調的な作用があるかについて生化学的に検証し、協調的な作用があるような場合には、TAA と YUCCA の共発現部位を可視化することを目的として研究を遂行した。

3. 研究の方法

酵素機能の詳細が未解明であった YUCCA の酵素学的な解析を出発点として、以下の項目を実施した。

(1) YUCCA の酵素活性試験系を確立し、YUCCA ファミリーの基質特異性などの酵素特性を解析した。

(2) TAA と YUCCA によるオーキシン生合成経路を試験管内再構成し、解析した。

(3) 実際に植物体内で TAA と YUCCA が協調的に IAA 生合成に寄与しているかについて、LC-MS/MS を用いたオーキシン類の定量実験で検証した。

(4) リコンビナントタンパク質を用いた免疫沈降実験および酵母 two-hybrid 法を用いて、TAA と YUCCA がタンパク質間相互作用する可能性を調査した。

(5) 各種 TAA 及び YUCCA を恒常的もしくは自身のプロモーター制御下で蛍光タンパク質やタンパク質タグとの融合型タンパク質として発現する形質転換植物体を作成した。

4. 研究成果

(1) モデル植物シロイヌナズナに 11 個存在する YUCCA のうち、進化系統樹的に異なるグループに属する YUCCA タンパク質の酵素特性を調査し、YUCCA ファミリーは総じて Trp 由来の 2-オキソ酸であるインドールピルビン酸 (IPA) だけではなく、芳香族アミノ酸であるフェニルアラニン (Phe) やチロシン (Tyr) 由来の 2-オキソ酸に対しても IPA に匹敵する親和性を示す、基質特異性が緩い酵素である事を明らかにした (図2)。

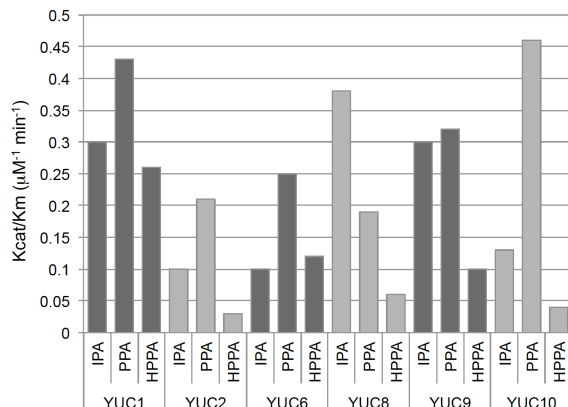


図2. YUCCA の特異性定数

(2) TAA (TAA1) と YUCCA (YUC1) のリコンビナントタンパク質を用いて、IAA 生合成を試験管内で再構成し、TAA と YUCCA が共存することで、芳香族アミノ酸が混在する条件下でも最も生理活性の高い IAA が Trp から選択的に生合成されることを明らかにした。

(3) IAA 生合成酵素である TAA1 と YUCCA6 の一過的な過剰発現植物体を用いて IAA と IAA アミノ酸結合体、フェニル酢酸 (PAA) と PAA アミノ酸結合体の定量分析を行ったところ、IAA および IAA アミノ酸結合体のみが大幅に増加したことから、TAA と YUCCA が協調して働く場合に、IAA が選択的に合成される事が、*in vivo* で示された。IAA 生合成の律速段階を担う YUCCA 酵素の基質特異性

が緩いという(1)の結果から、YUCCA が IAA 生合成に機能するためには、TAA の Trp に対する基質特異性が重要であることが考察された。

(4) TAA と YUCCA が同一細胞で同時に存在することが、IAA 生合成に重要であることが推測されたため、リコンビナントタンパク質を用いた免疫沈降実験および酵母 two-hybrid 法を用いて、両者の結合試験を行ったが、明瞭な相互作用を確認することができなかった。

(5)(4)で TAA と YUCCA の間に相互作用は認められなかったことから、TAA と YUCCA の細胞内での共局在の有無が次の検討課題だと考えた。共発現解析で TAA1 と YUCCA3 に高いスコアが確認されたために、この組み合わせをモデルとした。TAA1 及び YUCCA3 を自身のプロモーター制御下で蛍光タンパク質との融合型タンパク質として発現する形質転換植物体を作成し観察した結果、TAA1 と YUCCA3 がシロイヌナズナの主根(図3)や側根(図は省略)の先端の細胞で、同時期に発現していることが明らかとなった。根端に存在する IAA は、根の地上部側から輸送されているという考えがある中で、この組み合わせの TAA と YUCCA は根端自身における IAA 合成に機能する事が示唆された。今後、この2ラインを掛け合わせた植物体を用いて、TAA1 と YUCCA3 の細胞内での共局在性の有無や、発現時期・組織の共通性などを詳細に観察する必要があると考えている。

Root tips of 5-day-old seedlings

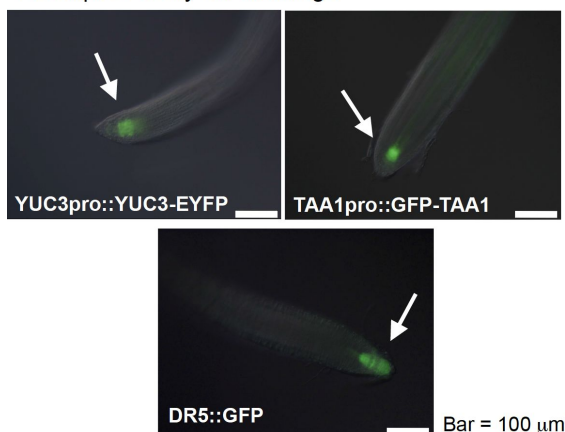


図3. TAA1 と YUCCA3 の発現
蛍光シグナルを矢印で示した。DR5::GFP は、オーキシン応答が起きている部位を示している。

以上、本研究期間内で得られた結果は、同一細胞内での TAA と YUCCA の協調した働きが IAA 生合成において重要であることを示唆しているものの、実際に細胞内で「TAA と YUCCA が(共局在などを介して)近接し

て IAA 生合成を行っている」という点を明確に出来ていない。

しかし、2014年に他グループが TAA1 (細胞質局在) のホモログである TAR2 が ER 膜に局在することを明らかにした (Ma et al., 2014)。また最近、YUCCA ファミリーが細胞質もしくは ER 膜に局在していることが報告された (Kriechbaumer et al., 2016)。興味深い事に、FRET-FLIM を用いた解析によって、TAR2 と YUCCA ファミリーのいくつかの組み合わせが、ER 膜上で相互作用する可能性も示されている (Kriechbaumer et al., 2016)。これらの結果は、前述の「TAA と YUCCA が(共局在などを介して)近接して IAA 生合成を行っている」という仮説を支持するものであるが、今後、細胞質での IAA 生合成と、ER における IAA 生合成の意味について検討を行う必要がある。

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3件)

1. 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

2. 増口潔. "オーキシン生合成に関わるフラビン酵素 YUCCA の機能解明", 植物の生長調節, 49 (1):18-24, 2014 年, 査読無.
<http://ci.nii.ac.jp/naid/110009815840>

3. 増口潔, 林謙一郎. "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-", 植調, 47 (6):197-206, 2013 年, 査読無.
<http://www.japr.or.jp/press/index.html>

〔学会発表〕(計6件)

1. 増口潔, 神谷勇治, 榊原均, 笠原博幸 "シロイヌナズナにおけるインドール-3-酢酸生合成機構の解析" 植物化学調節学会第 49 回大会, 京都大学 (京都府京都市), 2014 年 10 月 18 日-19 日.

2. Mashiguchi K., Zhao Y., Sakakibara H., Kamiya Y. and Kasahara H. "A biochemical framework for auxin biosynthesis in Arabidopsis." The 38th Naito Conference, シヤトレーゼ ガトーキングダム サッポロ (北海道札幌市), 2014 年 10 月 7 日-10 日.

3. 増口潔 "植物のオーキシン恒常性維持のメカニズム-生合成と代謝における最近の話題から-" 日本農芸化学会東北支部シンポジウム, 山形大学 (山形県鶴岡市), 2014年7月19日.

4. Mashiguchi K., Sakakibara H., Kamiya Y. and Kasahara H. "Biochemical mechanism of indole-3-acetic acid biosynthesis in *Arabidopsis*." 2014 Plant Growth Regulation Society of America Annual Conference, San Francisco, USA, 2014年7月13日-17日.

5. 増口潔, 神谷勇治, 榊原均, 笠原博幸 "植物におけるインドール-3-酢酸生合成機構の解析" 日本農芸化学会2014年度大会, 明治大学 (神奈川県川崎市), 2014年3月28日.

6. 増口潔 "オーキシン生合成に関わるフラビン酵素 YUCCA の機能解明" 植物化学調節学会第48回大会, 新潟大学 (新潟県新潟市), 2013年11月1日.

〔その他〕

ホームページ等

東北大学生命科学研究科活性分子動態分野

<http://labo.lifesci.tohoku.ac.jp/biomol/>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究協力者

笠原 博幸 (KASAHARA, HIROYUKI)

東京農工大学・グローバルイノベーション

研究院・教授

研究者番号：00342767