

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03846

研究課題名(和文) 樹木の生長、分岐を制御する植物ペルオキシダーゼの作用機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of CWPO-C peroxidase function on the regulation of plant growth, differentiation, and branching

研究代表者

堤 祐司 (Tsutsumi, Yuji)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：30236921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナのCWPO-C過剰発現体およびCWPO-Cのオーソログ遺伝子AtPrx71のKO変異体ならびに内生IAA定量結果から、CWPO-CはIAAを代謝・不活化することが示唆され、組換え体CWPO-Cを用いたin vitroのIAA代謝実験でも支持された。一方で、ポプラCWPO-C過剰発現体はシロイヌナズナとは異なる表現型をみせたことから、両植物ではIAA代謝において異なる制御機構を有することが示唆された。また、シロイヌナズナのCWPO-C過剰発現では、AOHの成長促進効果が現れず、内生AOH量が顕著に低下していたことなどから、FCsが関与する成長・分化にもCWPO-Cの関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IAAの代謝不活化機構については、未解明の部分が残されておりIAAオキシダーゼによるOxIAAへの代謝変換やアミノ酸抱合体やグルコース抱合体への変換などが提案されている。一方本研究において、万能ペルオキシダーゼCWPO-C過剰発現体の表現型は、IAA欠乏状態の表現型とよく一致し、内生IAA量が著しく低下していたこと、組換え体CWPO-CによるIAA代謝が確認されたことからCWPO-Cによる新たなIAA代謝経路が示唆された。IAAは植物の成長や分岐を制御する重要な因子であり、生産性と価値に大きな影響を持つため、その作用メカニズム解明は植物生産において非常に重要な知見になりうる。

研究成果の概要(英文)：The over-expression of CWPO-C (OE), a unique all-round peroxidase, in Arabidopsis were analyzed. The OE mutants showed delay of growth and gravitropism. And IAA contents were largely decreased. The results strongly suggest that CWPO-C catabolizes and inactivates IAA in vivo. This observation was further supported by the in vitro conversion of IAA by rCWPO-C. This finding may give a new insight of IAA catabolism in plant. On the other hand, The OE of CWPO-C in poplar showed the different phenotype, suggesting these two plant species have different regulatory mechanisms in IAA catabolism. The effect of CWPO-C on the fairy compounds (FCs) those were recently proposed as possible new plant hormones, were also investigated. The CWPO-C over-expression mutant of Arabidopsis attenuated the positive growth effect of the exogenous AOH, one of FCs, and decrease endogenous AOH. It suggests that CWPO-C may also related to the metabolism and regulation of FCs in plant.

研究分野：樹木生化学

キーワード：ペルオキシダーゼ 植物ホルモン オーキシン 成長 分化 リグニン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物特有の酸化酵素である植物ペルオキシダーゼは、大きな遺伝子ファミリーを形成している。しかし、大部分の植物ペルオキシダーゼの役割や作用機構は依然不明のままである。我々が発見したポプラの万能ペルオキシダーゼである CWPO-C は、リグニンの高分子化反応を触媒する木化特異的に機能するペルオキシダーゼであると考えられてきた。ところが、CWPO-C に関してさらに詳細な検討を進めた結果、平成 26 年度～27 年度挑戦的萌芽研究の成果において、

1. CWPO-C が茎頂部、若い葉など生長または分化が盛んな組織中心に発現すること
2. 頂芽を切断した際、側芽発生部位に強い発現を示すこと
3. CWPO-C を過剰発現したシロイヌナズナは側芽本数の顕著な増加を示すこと
4. CWPO-C を発現抑制したポプラは生長速度が上昇すること

などの新たな現象を発見した。以上の発見は、植物ペルオキシダーゼの新機能 (→植物の生長、枝分かれの制御) の発見と同時に、植物ペルオキシダーゼを介した新しい生長、分岐制御メカニズムが存在することを示している。

### 2. 研究の目的

生長、分枝を調節する因子には、オーキシンをはじめとする植物ホルモンがよく知られている。CWPO-C を介した生長、分枝制御機構に植物ホルモンが関与すると仮定すると、「CWPO-C は何らかの植物ホルモンを酸化的に異化することによって生長、分枝を調節する」と予想される。

本研究では上記の仮説を検証するため、組換え CWPO-C タンパクを用いた *in vitro* での実験、形質転換体を用いた実験、CWPO-C 発現部位特異的な代謝物解析等を行う。そして、①CWPO-C の植物ホルモンに対する酸化能力、②酸化生成物の生理活性、③外因性の植物ホルモンに対する応答、④形質転換体の茎頂切断時の応答、⑤形質転換体の力学的性質、⑥CWPO-C 発現部位における CWPO-C の基質となる物質、およびその酸化生成物と考えられる化合物量を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1)シロイヌナズナおよびポプラ CWPO-C 過剰発現体の解析

シロイヌナズナおよびポプラの CWPO-C 過剰発現体を作成した。選抜された過剰発現体の成長速度、重力屈性試験、内生 IAA の定量分析に供した。

#### (2)CWPO-C 発現解析

CWPO-C および *AtPxx71* プロモーター下流に  $\beta$ -glucuronidase(GUS)を連結したコンストラクトを導入した組換体を作成した。また、定量的発現解析には RT-qPCR を用いた。

#### (3)内生 IAA および OxIAA の定量

シロイヌナズナおよびポプラの主茎を採取し、必要な部分に切り分け所定の操作に従ってホルモンを抽出した。内部標準として重水素で認識したホルモン試料を添加した後、所定の精製操作の後、LC-MS の SIM モード分析を行った。なお、UltiMate 3000 RSLC-Q-Exactive (Thermo Scientific) を使用した。カラムは ACQUITY UPLC®BEH C18 (1.7  $\mu$ m, 2.1 $\times$ 100 mm) を用いた。

#### (5)リコンビナント CWPO-C を用いた *in vitro* 変換

所定の方法に従い rCWPO-C を調製した。反応は室温で行い、反応開始から 0、15、30、60、120、360 min に経時的に反応液を採取し、HPLC 分析 (Jasca PU-980-Jasca UV-2070 Plus、カラム InertSustain C18(5  $\mu$ m, 4.6 $\times$ 150 mm)に供した。

### 4. 研究成果

#### 1. CWPO-C 過剰発現体シロイヌナズナの表現型

シロイヌナズナ CWPO-C 過剰発現体の表現型観察を行ったところ、主茎長、乾燥重量において WT に対して有意に減少した。さらに、各 CWPO-C 過剰発現ラインのウエスタンブロットによる CWPO-C 発現量と主茎長、乾燥重量には相関性があり、CWPO-C 発現量が多い植物体ほど、成長が抑制されていた (図 1)。このことから、CWPO-C は植物の伸長生長を抑制する働きを有していると考えられる。また、CWPO-C 過剰発現体の重力屈性試験を行ったところ、WT と比較して、CWPO-C 過剰発現体の方が、茎が 90 度起き上がるまでに有する時間がおおよそ 2 倍に遅延した (WT, 86 分 → OE11, 150 分)。さらに、*pCWPO-C :: GUS* を導入したシロイヌナズナの重力屈性前後の GUS 染色実験を行ったところ、重力屈性前では頂芽付近が染色されていたのに対し、重力屈性後では屈曲部付近が染色されていた。(図 2)。以上の結果から、局部的伸長生長を伴う屈曲反応に CWPO-C が関与している可能性が示唆された。また、植物の生長を制御するオーキシンは、茎先端で合成され、植物を水平に倒すと、光の当たらない影側を下降し、影側の成長が促進されることで屈曲が起こるとされている。この知見と重力屈性に関する結果から、CWPO-C 発現部位は、屈性前の段階、屈性後の段階いずれの場合においてもオーキシン高濃度部位と類似していることが分かった。

すなわち、CWPO-C は植物の伸長生長を抑制し、CWPO-C 発現部位とオーキシン高濃度部位が類似していることから、CWPO-C はオーキシンを異化することで、オーキシン濃度をコントロールし、成長を制御する可能性が示唆された。

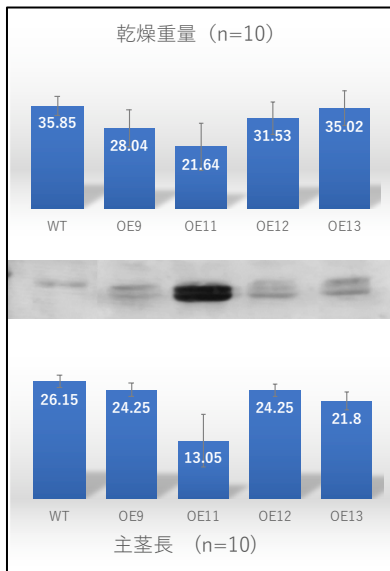


図 1 (左図) CWPO-C 過剰発現体の乾燥重量および主茎長と CWPO-C 発現量 WT:野生型、OE9, 11, 12, 13: 過剰発現体

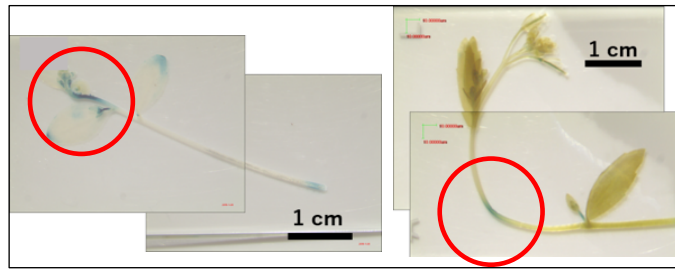


図 2 (上図): シロイヌナズナ重力屈性時の CWPO-C 発現部位 ( $p_{CWPO-C}::GUS$  を用いた染色) 左: 屈指処理前、右: 屈指処理後

## 2. シロイヌナズナ内生 IAA の定量

インドール-3-酢酸 (IAA) は、シロイヌナズナ植物体に最も多く含まれる植物ホルモンオーキシンであることから、CWPO-C 過剰発現体と WT の内生 IAA 量をシロイヌナズナの部位別に定量した。

シロイヌナズナ WT では、頂芽において最も IAA が高濃度に存在しており、次いで茎中央、茎基部の IAA 濃度が頂芽の半分程度存在していた。それに対して、シロイヌナズナ CWPO-C 過剰発現体 OE11 では頂芽、茎中央、茎基部いずれも部位においても WT と比較して IAA 濃度が大きく低下していることが確認できた (図 3)。OE11 では CWPO-C が全身に恒常的に発現しており、いずれの部位においても CWPO-C による IAA の異化代謝が起こることで、IAA 濃度が著しく減少したと考えられる。この結果は、CWPO-C はオーキシン (IAA) を異化することで、オーキシン (IAA) 濃度をコントロールし、成長を制御している可能性を示している。また、OE11 と屈曲 OE11 (後述) を比較したところ、OE11 と比較して、屈曲 OE11 の方は IAA 濃度が半分程度にまで減少していることが確認できた (図 3)。屈曲 OE11 は OE11 よりもさらに主茎長が短く、成長の抑制が OE11 よりも大きく働いていると考えられている。

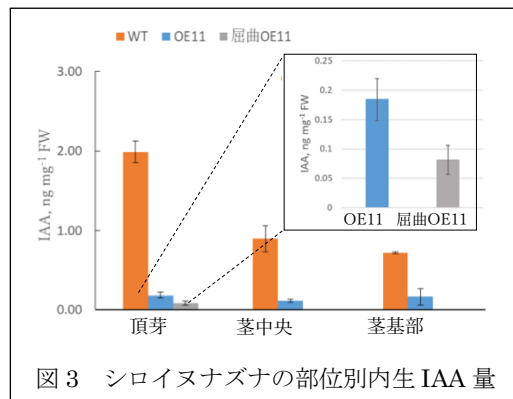


図 3 シロイヌナズナの部位別内生 IAA 量

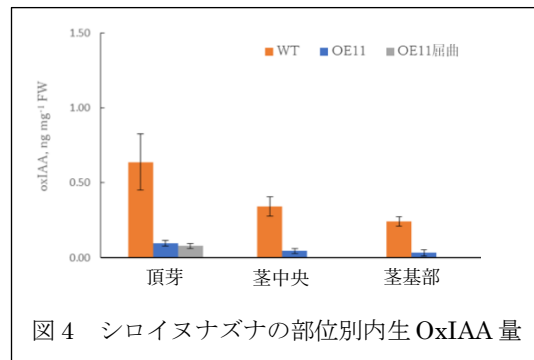


図 4 シロイヌナズナの部位別内生 OxIAA 量

次いで、IAA の酸化物予想される酸化型

IAA (OxIAA) の定量を行った。OE11 では WT と比較して、どの部位においても OxIAA 濃度が低いことが明らかとなり (図 4)、CWPO-C は IAA を OxIAA 以外の代謝物変換する可能性、あるいは OxIAA がさらにその先の代謝物 OxIAA-Glc などの複合体に代謝されている可能性が考えられた。

## 3. リコンビナント CWPO-C を IAA と OxIAA の in vitro 変換

CWPO-C による IAA の変換を確認するために rCWPO-C による反応を行った結果、RT: 4.24 min 付近にピーク (化合物 1) が現れた (図 5 上)。反応時間 120 min から 360 min に経過すると RT: 14.86 min 付近に新たなピーク (化合物 2) が明瞭に観察された。OxIAA の標品を同条件で分析したところ、OxIAA は RT: 5.76 min として現れことから、rCWPO-C による IAA の主変換物は OxIAA ではないことも確認された。化合物 1 の生成は速く、反応開始後速やかに生成した。反応時間が経過し化合物 1 の生成が停止した 120 min 以降、反応時間の経過に伴い化合物 2 の生成が顕著になった (図 5 下)。このことから、化合物 2 は化合物 1 のさらなる変換物質であることが強く示唆された。IAA の変換化合物 1 と化合物 2 を LC-MS を用いてスペクトル解析を行った結果、変換化合物 1 の構造は、図 6-A に示す、3-ヒドロキシメチルオキシインドール、化合物 2 は図 6-B に示す、3-メチレンオキシインドールと予想した。

さらに、同様の反応条件で 0xIAA についても変換反応を行ったが、全く変化は認められないことから、CWPO-C による IAA→0xIAA への変換は起こらなかった。すなわち、OE11 における内生 0xIAA の著しい低下は、CWPO-C によって IAA が他の化合物へ変換されたことが原因と判断した。

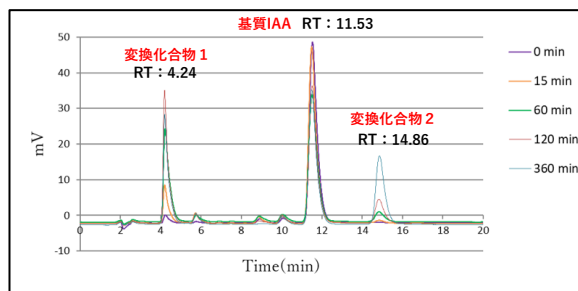


図5 rCWPO-CによるIAAのin vitro変換  
上図: IAA変換反応生成物のHPLCクロマトグラム

#### 4. CWPO-C オースログ遺伝子 *AtPrx71*

シロイヌナズナ由来のペルオキシダーゼである *AtPrx71* タンパクは、コニフェリルアルコール、シナピルアルコール、リグニンポリマー、いずれの分子サイズのリグニンや高分子のタンパクを酸化可能であり、基質特異性が CWPO-C と共通であること、また *AtPrx71* 発現部位と *CWPO-C* 発現部位が類似していることから、両者は機能ホモログタンパクであると考えられた。そこで、*pCWPO-C* :: *GUS* 植物体の重力屈性前後の発現部位と *pAtPrx71* :: *GUS* 植物体の重力屈性前後の発現部位を比較した結果 (図7)、図2に示す *CWPO-C* の発現部位とほぼ一致した。さらに、WT の重力屈性試験における *AtPrx71* の相対発現量は、屈曲部で大きく増加したことから *AtPrx71* は屈曲部で強く発現されることが確認された (図8)。

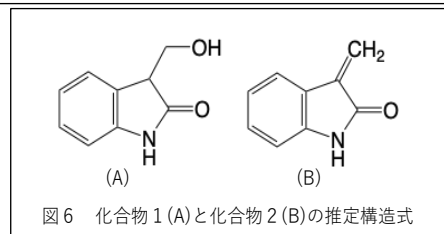


図6 化合物1(A)と化合物2(B)の推定構造式

#### 5. フェアリー化合物のホルモン作用と CWPO-C の関与

フェアリー化合物は近年、植物ホルモン作用を有する新たな化合物群として注目されている化合物である。そこで本研究では、①植物ホルモン様化合物であるフェアリー化合物がシロイヌナズナならびに木本植物であるポプラおよびに対してどのようなホルモン様作用を示すのか、②植物体内におけるフェアリー化合物の異化、代謝に CWPO-C が関与するかどうかを明らかにすることを目的として、ポプラと CWPO-C 過剰発現シロイヌナズナ OE11 にフェアリー化合物を与え、その表現型を解析した。

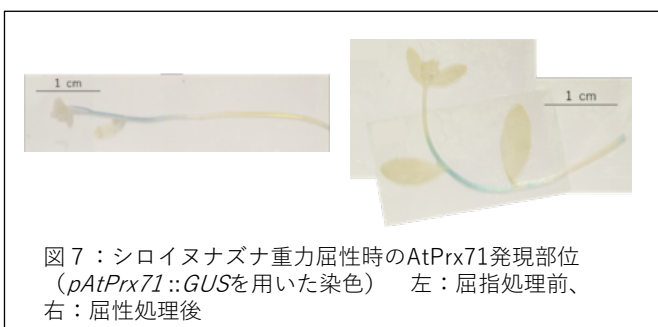


図7: シロイヌナズナ重力屈性時の *AtPrx71* 発現部位 (*pAtPrx71* :: *GUS* を用いた染色) 左: 屈指処理前、右: 屈指処理後

##### (1) ポプラに対する FCs の影響

ポプラの茎切片に4種の FCs を添加して不定芽発生における促進効果を確認した。FCs 無添加と比較して有意に不定芽発生を促進したのは 1  $\mu$ M の AICA のみであったが、その促進効果もさほど大きいものではなかった。次いで、ポプラの内生 FCs の定量を行った結果、AHX と AOH は主茎上部や中間部で確認された。しかしながら後述のシロイヌナズナ内生 FCs の 1/5-1/10 量しか存在しないことも明らかになった。

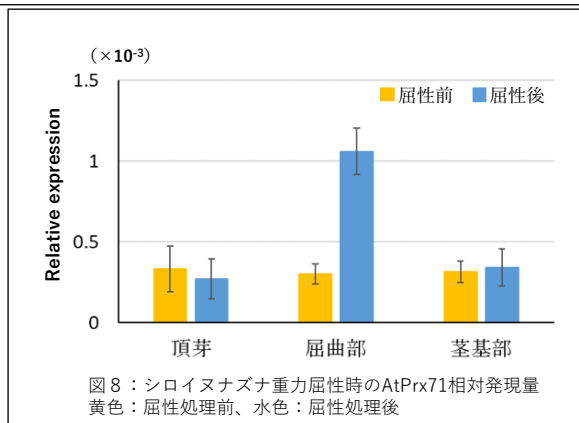


図8: シロイヌナズナ重力屈性時の *AtPrx71* 相対発現量  
黄色: 屈指処理前、水色: 屈指処理後

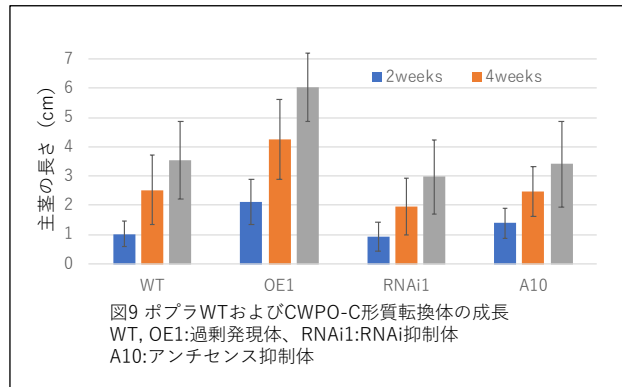
##### (2) シロイヌナズナに対する FCs の影響

シロイヌナズナ WT および CWPO-C 過剰発現体 OE11 に AOH を与え、ホルモン作用を確認した結果、WT の主茎長において、有意に AOH の成長促進効果が現れたが、促進の程度は 10% 未満であり大きな促進効果は発現しなかった。また、OE11 では有意差はみとめられなかった。次いで、シロイヌナズナ内生 FCs の定量を行った結果、茎頂部では、WT も OE11 共に ICA の内生量が多かったが、茎中央部では OE11 の AOH の内生量は WT と比較して大幅に少なかった。シロイヌナズナに対する AOH の成長促進効果ならびに WT と OE11 の内生 AOH の結果から、CWPO-C は AOH の代謝に関与する可能性が考えられた。また、rCWPO-C とフェアリー化合物を in vitro で反応させ、rCWPO-C によるフェアリー化合物の変換活性を確認した結果、AOH と AICA に変換活性が見られた。このことから CWPO-C が AOH を異化し、その作用を打ち消すという可能性は否定出来ない。

## 6. ポプラの成長・分化に対する CWPO-C の影響

### (1) ポプラ形質転換体(CWPO-C 過剰発現体、発現抑制体)の解析

CWPO-C の過剰発現体および発現抑制体 (RNAi およびアンチセンス) の形質転換効率 (形質転換体の発現効率) は、数百分の1と極めて低かった。このことは、CWPO-C がポプラの分化・発現についてクリティカルな役割を担っていることを示唆するものである。現在、過剰発現体1ライン (CWPO-C 発現量は WT の約30倍) および RNAi 3ラインおよびアンチセンス1ラインが得られており、形質転換体の作成を継続しながら解析を行った。過剰発現体1ラインのみの観察結果で

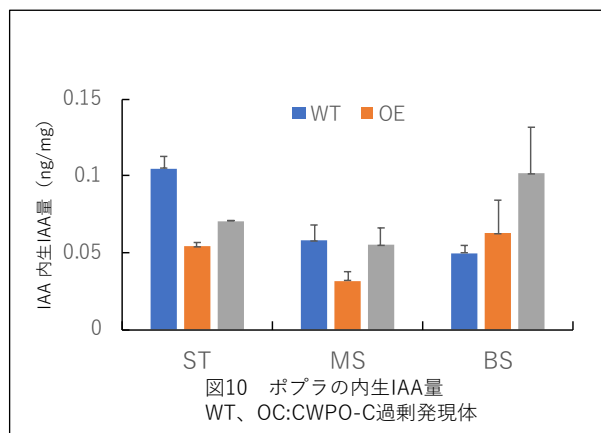


はあるが、過剰発現体の成長はWTと比べて早く (図9)、また中空根 (地上部の茎から発生する根) の発生が顕著である。このことは、CWPO-C がポプラの分化や形態形成に重要な役割を果たしていること強く示唆している。ポプラの頂芽を切断して7日後には、側芽の発生が開始し、側芽発生部に強い CWPO-C 発現が確認された。前述のシロイヌナズナを用いた実験およびポプラを用いた実験では、形態形成時にオーキシン濃度の高いと予想される部分と CWPO-C 発現部位が良く一致しており、CWPO-C と内生オーキシン調節に非常に密接な関係が存在する可能性を示唆した。

### (2) ポプラの重力屈性応答と CWPO-C

ポプラ CWPO-C 過剰発現体の重力屈性応答試験では、起き上がり時間は WT の 1/3 と短くなり (WT, 16 時間→過剰発現体, 5.5 時間)、アンチセンス抑制体で大きな違いは認められなかった。シロイヌナズナ過剰発現体 OE11 では屈曲反応が大幅に遅延 (2 倍以上) しており、全く異なる表現型として現れた。ポプラ CWPO-C 過剰発現体でもシロイヌナズナでも共に屈曲部における CWPO-C 発現は非常に大きいことから、重力屈性と CWPO-C は強く関連しているが、両者の違いの原因は不明である。

(2) ポプラの内生 IAA 濃度を WT と CWPO-C 過剰発現体で比較した結果、過剰発現体では先端部や茎中間で WT より IAA 量が低下した (図10)。前述の様に、シロイヌナズナの CWPO-C 過剰発現体では内生 IAA 濃度が著しく減少していたが、ポプラにおいては WT と過剰発現体の違いはシロイヌナズナの場合ほど顕著には表れなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takeuchi Manami, Kegasa Takahiro, Watanabe Atsushi, Tamura Miho, Tsutsumi Yuji	4. 巻 131
2. 論文標題 Expression analysis of transporter genes for screening candidate monolignol transporters using Arabidopsis thaliana cell suspensions during tracheary element differentiation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J plant Res	6. 最初と最後の頁 297 ~ 305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1007/s10265-017-0979-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 横山 裕亮、重藤 潤、大平 香織、堤 祐司
2. 発表標題 植物ベルオキシダーゼ、CWPO-Cによる分化成長の制御
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Tsutsumi, Jun Shigeto, Hiroki Honjo
2. 発表標題 Generation of lignin polymer models via dehydrogenative polymerization of coniferyl alcohol and sinapyl alcohol via plant peroxydase involved in lignification and analysis of the resulting DHPs by MALDI-TOF analysis
3. 学会等名 29th International Conference of Polyphenols (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Diego Yoshikay, Jun Shigeto, Yusuke Yokoyama, Yuji Tsutsumi
2. 発表標題 The contribution of CWPO-C to primary stage of plant growth and organogenesis
3. 学会等名 5th Symposium of Biotechnology Applied to Lignocelluloses (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武内 真奈美、堤 祐司
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるリグニンモノマー輸送体遺伝子の探索
3. 学会等名 第68回日本木材学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	河岸 洋和  (Kawagishi Hirokazu)  (70183283)	静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授    (13801)	