

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370027

研究課題名(和文)植物におけるオーキシン二重制御機構の解明

研究課題名(英文)Distinct characteristics of two natural auxins in plants

研究代表者

笠原 博幸 (Kasahara, Hiroyuki)

独立行政法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・上級研究員

研究者番号：00342767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、インドール-3-酢酸(IAA)とフェニル酢酸(PAA)が植物で似た機能を示すが、異なる移動特性をもつオーキシンであることを示した。PAAは植物界に広く分布し、生理活性は低い、IAAよりも多量に植物に存在していた。受容機構と制御遺伝子の解析から植物におけるPAAとIAAの機能は類似していると考えられ、またPAAとIAAの生合成経路も似ていると予想された。一方、IAAは極性輸送されるが、PAAはこの調節を受けないことから、植物における両者の移動特性は異なることが明らかになった。以上の結果、植物の成長制御には輸送機構の異なる2つのオーキシンが関与している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, I demonstrate that indole-3-acetic acid (IAA) and phenyl acetic acid (PAA) have overlapping regulatory roles but distinct transport characteristics as auxins in plants. I demonstrate that PAA is widely distributed in plant kingdom. Although biological activities of PAA are lower than those of IAA, the endogenous amounts of PAA are much higher than those of IAA in various plant tissues in Arabidopsis. PAA and IAA can regulate the same set of auxin responsive genes through the TIR1/AFB-Aux/IAA pathway. TAA and YUCCA families may contribute to PAA biosynthesis. IAA actively forms concentration gradients in maize coleoptiles in response to gravitropic stimulation, whereas PAA does not, suggesting that PAA is not actively transported in a polar manner. These results suggests that PAA may play important roles in the regulation of plant growth and development.

研究分野：植物生化学

キーワード：オーキシン インドール-3-酢酸 フェニル酢酸 情報伝達 極性輸送 生合成

1. 研究開始当初の背景

オーキシンは植物の形態形成や器官形成において非常に重要な働きをする植物ホルモンである。これまでインドール-3-酢酸 (IAA) を中心に植物におけるオーキシンの生合成、代謝、輸送、情報伝達、生理機能などに関する多くの研究が進められてきた。一方、フェニル酢酸 (PAA) も高等植物に存在する天然オーキシンとして 40 年以上前から知られている。また、同位体標識した PAA を植物に投与すると IAA のように極性輸送されないことが報告されている。PAA は植物において IAA と異なる働きをする可能性が考えられるが、しかし PAA のオーキシンとしての作用機構や生理的役割についてはこれまで解明されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、植物における PAA のオーキシンとしての生理的役割を明らかにするため、まずその作用機構について詳細に解析した。近年、IAA の作用機構については、モデル実験植物のシロイヌナズナを使って各組織における濃度分布、生合成、代謝、輸送、情報伝達のメカニズムが分子レベルで解明されてきており、生化学・分子生物学的手法も整備されてきた。そこで、これらの研究手法を用いて、PAA の作用機構に関する解析を分子レベルで進めることにした。

3. 研究の方法

1) 植物界における PAA の分布、PAA の生合成・代謝機構については、質量分析器 (LC-MS/MS) による内生量の分析、IAA 生合成・代謝酵素を使った酵素活性試験、それらの遺伝子の過剰発現体および欠損変異体における PAA とその代謝物の内生量の分析などにより調べた。

2) PAA の輸送機構については、トウモロコシの幼葉鞘を用いて、重力刺激や極性輸送阻害剤処理による IAA/PAA 濃度分布の変動の差などを解析した。また、シロイヌナズナのオーキシン生合成欠損変異体を使って、IAA と PAA による根の成長や重力屈性の回復の差を調べた。

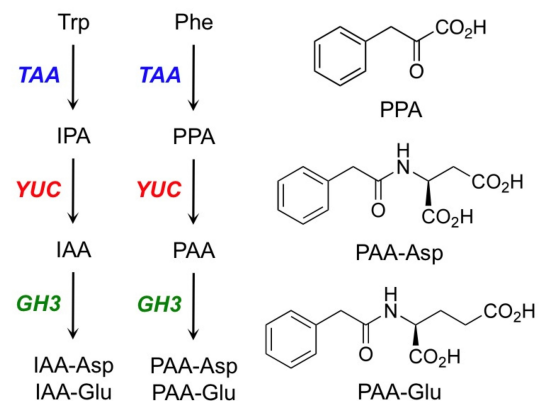
3) 情報伝達機構については、酵母ツーハイブリッドシステムやプルダウンアッセイを用いたオーキシン受容体複合体形成試験や、マイクロアレイによる遺伝子発現解析などで IAA と PAA の受容機構・遺伝子発現の差を詳細に調べた。

4. 研究成果

LC-MS/MS を使って植物界における PAA の分布を解析した結果、IAA と同様にコケ植物などからシロイヌナズナ、イネなどまで広く存在し、また IAA よりも PAA の内生量の方が一般的に多いことが明らかになった。また、今回分析したシロイヌナズナの全ての器官から PAA は検出され、果実を除く殆どの

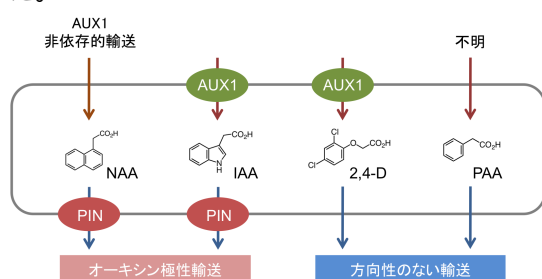
器官で IAA よりも PAA の内生量の方が高いことが分かった。シロイヌナズナの側根形成促進試験において、PAA は IAA よりも生理活性は低かったが、植物には IAA よりも多量に含まれていたことから、PAA がオーキシンとして植物の成長制御に關与する可能性が示された。

PAA の生合成と代謝機構について解析した結果、IAA 生合成酵素として知られる TAA (トリプトファンアミノ基転移酵素) と YUCCA (フラビンモノオキシゲナーゼ) が PAA の生合成にも關与する可能性があることが明らかになった。YUCCA2 タンパク質の酵素活性を詳細に調べたところ、IAA だけでなく PAA も生成することが判明した (Dai & Mashiguchi et al. *J. Biol. Chem.* 2013)。シロイヌナズナにおいて YUCCA 遺伝子の過剰発現体を作成し、PAA とその予想代謝物を分析したところ、PAA アミノ酸結合体 (PAA-Asp と PAA-Glu) が顕著に増加したことから、YUCCA が PAA 合成の律速酵素である可能性が示唆された。TAA と YUCCA はゼニゴケ (*Marchantia Polymorpha*) のオーキシン生合成においても重要な働きをすることから (Eklund et al. *Plant Cell.* 2015, *in press*) 植物界の広い範囲でこれらの酵素が PAA の生合成に關与する可能性がある。また、IAA 代謝酵素として知られる GH3 (IAA-アミノ酸複合体合成酵素) が PAA の内生量を維持するために PAA を代謝することも示唆された。一方、TAA や YUCCA の多重欠損変異体のオーキシン量をそれぞれ分析したところ、IAA 量は顕著に減少していたが、PAA 量は僅かな変化しか認められなかったことから、TAA と YUCCA 以外の経路からも PAA が合成されている可能性が考えられた。



PAA の輸送機構について、トウモロコシの幼葉鞘を用いて重力刺激による IAA と PAA の濃度分布の変動を解析したところ、IAA は極性輸送されて重力側の組織に偏差分布するのに対し、PAA は濃度分布に有意な変化が認められなかった。また、オーキシン輸送阻害剤として知られる NPA を先端部に処理したところ、IAA は輸送阻害されて蓄積するのに対し、PAA は蓄積が認められなかった。こ

これらの結果、IAA は極性輸送による制御を受けるが、PAA はこれと異なる機構で制御されていることが示された。シロイヌナズナの根で発現の高い *YUCCA* 遺伝子ファミリーを欠損しているために根の形成が異常になった *yucQ* 変異体 (*yuc3/5/7/8/9*) を使ってオーキシン投与による根の回復試験を行ったところ、IAA は根の成長と重力屈性を完全に回復したが、PAA は重力屈性を回復できないことが明らかになった。これにより、極性輸送される IAA は重力刺激により偏差分布して回復した *yucQ* の根を屈曲させることができるが、PAA はこの特性を持たないために *yucQ* の根を屈曲させることができないと考えられた。また、合成オーキシンとして知られる NAA (1-ナフトレン酢酸) は IAA と同様に *yucQ* の根の成長と重力屈性を完全に回復したが、2,4-D (2,4-ジクロロフェノキシ酢酸) は PAA と同様に *yucQ* の重力屈性を回復できないことが明らかになった。この結果から、植物から排出されにくい強力な除草剤として知られる 2,4-D は PAA と似た移動特性をもつ合成オーキシンであることが示唆された。



天然および合成オーキシンの輸送機構

PAA の情報伝達機構について解析した結果、PAA は IAA と同様にオーキシン受容体 TIR1/AFB に結合してオーキシン誘導性遺伝子の発現を制御していることが明らかになった。酵母ツーハイブリッドシステムを用いた TIR1/AFB タンパク質と転写抑制因子 Aux/IAA タンパク質の結合を解析したところ、IAA と同様に PAA が様々な組み合わせの TIR1/AFB-Aux/IAA 複合体を形成することが示された。また、プルダウンアッセイ系を用いて TIR1/AFB-Aux/IAA 複合体の形成を検証したところ、IAA よりも活性は低い、PAA がこの受容体複合体を形成することが確認された。さらに、マイクロアレイ解析により IAA と PAA により発現が早期誘導される遺伝子を解析したところ、この2つのオーキシンに応答する遺伝子群に高い相関があることが明らかになった。

以上の結果、植物において IAA だけでなく PAA もオーキシンとして機能しており、輸送機構の異なる2つのオーキシンが協調的に働く成長制御機構が存在する可能性が示唆された (Sugawara et al. *Plant Cell Physiol.* 2015, *in press*)。

植物における PAA の生理的役割を明らかにするためには、PAA のみを欠損した変異体

を作成し、解析することが重要である。しかし、PAA の生合成を解析した結果、現時点では PAA の生合成のみを遺伝学的に遮断して欠損変異体を作成することは困難であった。本研究は当初計画していたよりも進展したことから、次に PAA を選択的に代謝して減少させることができる新規酵素の探索を行った。シロイヌナズナの UDP-グルコシル基転移酵素 (UGT) の cDNA を出芽酵母に導入して UGT タンパク質を発現させ、これらの酵母を使ってオーキシン関連物質の代謝酵素を探索するシステムを構築した (Tanaka et al. *Plant Cell Physiol.* 2014)。このシステムを使って PAA 代謝酵素を探索した結果、PAA に対して高い選択性をもつ UGT を同定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- 1) Tanaka, Keita; Hayashi Ken-ichiro; Natsume, Masahiro; Kamiya, Yuji; Sakakibara, Hitoshi; Kawaide, Hiroshi; Kasahara, Hiroyuki.

UGT74D1 catalyzes the glucosylation of 2-oxindole-3-acetic acid in the auxin metabolic pathway in *Arabidopsis*.

Plant Cell Physiol. (2014) 55: 218-28.

doi: 10.1093/pcp/pct173.

査読あり

- 2) Dai, Xinhua; Mashiguchi, Kiyoshi; Chen, Q; Kasahara, Hiroyuki; Kamiya, Yuji; Ojha, S; Dubois, J; Ballou, D; Zhao, Yunde.

The biochemical mechanism of auxin biosynthesis by an *Arabidopsis* YUCCA flavin-containing monooxygenase.

J Biol Chem (2013) 288: 1448-57.

doi: 10.1074/jbc.M112.424077.

査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1) 笠原 博幸
植物の多様なオーキシン生合成・不活化機構
第 51 回植物化学シンポジウム
2014 年 11 月 21 日、東北大学、仙台
(招待講演)

- 2) Hiroyuki Kasahara
Indole-3-acetic acid and phenylacetic acid are two natural auxins in plants with distinct transport characteristics.
Plant Growth Regulation Society of America (PGRSA) and the Japanese Society for the Plant Growth Regulation

of Plants (JSCR) joint meeting 2014.
2014/7/13-16. San Francisco, USA.
(基調講演)

- 3) 田中 慧太、林 謙一郎、夏目 雅裕、神
谷 勇治、榊原 均、笠原 博幸
インドール環の酸化を伴う IAA 代謝経路
に関する配糖体化酵素の同定
植物化学調節学会第 48 回大会
2013 年 10 月 31 日、新潟大学、新潟

6 . 研究組織

(1)研究代表者

笠原 博幸 (KASAHARA, HIROYUKI)

国立研究開発法人理化学研究所

環境資源科学研究センター

生産機能研究グループ 上級研究員

研究者番号 : 00342767