

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02457

研究課題名(和文) 移動特性が異なる天然オーキシンの植物における生理的役割の違い

研究課題名(英文) Study on the physiological roles of naturally occurring auxins in plants with distinct transport characteristics

研究代表者

笠原 博幸 (Kasahara, Hiroyuki)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00342767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：オーキシンは植物の成長や分化を調節する植物ホルモンである。フェニル酢酸(PAA)は重力方向に極性移動しない特性を持つオーキシンであるが、その生合成や生理的役割はまだ解明されていない。そこで、シロイヌナズナにおけるPAAの生合成経路に関わる可能性のある候補遺伝子の機能を詳しく解析した。その結果、PAAはフェニルアラニンから主にフェニルピルビン酸を経由して合成されていることを示した。また、シロイヌナズナのインドール-3-酢酸(IAA)の生合成に関わるTAA1やCYP79Bの遺伝子ホモログは、PAAの生合成に主として寄与していない可能性が高いことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ユニークな移動特性を持つ天然オーキシンのフェニル酢酸(PAA)が、シロイヌナズナにおいてフェニルアラニンから主にフェニルピルビン酸を経由して合成されていることを示した。また、シロイヌナズナのインドール-3-酢酸(IAA)生合成に関わるTAA1やCYP79Bの遺伝子ホモログは、PAAの生合成には主として寄与していないことが示唆された。本研究の成果は、PAAの生合成を標的とした新たな除草剤や植物成長調整剤の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Auxin plays an essential role in plant growth and development. Phenylacetic acid (PAA) is an abundant natural auxin, but its biosynthesis and physiological roles remain elusive. In this study, we investigated the PAA biosynthesis pathway in Arabidopsis. We demonstrated that ADT genes can modulate the PAA levels and phenyl pyruvate is a key biosynthetic intermediate of PAA. CYP79A2 gene can modulate the PAA levels, but is not involved in the main PAA biosynthesis pathway. TAA1 homologs can catalyze the conversion of Phe to phenyl pyruvate in vitro, while they may not play important roles in PAA biosynthesis in plants.

研究分野：植物生化学

キーワード：植物ホルモン オーキシン 生合成 代謝

## 1．研究開始当初の背景

オーキシンは植物の成長や分化を調節する非常に重要な植物ホルモンである。これまで極性移動する天然オーキシンのインドール-3-酢酸 (IAA) を中心に、その生理機能や作用機構に関する研究が行われてきた。最近、我々はフェニル酢酸 (PAA) が IAA とは異なり極性移動しないユニークなオーキシンであることを明らかにした。しかし、植物における PAA の役割は未だ明らかになっていない。IAA と PAA の働きの違いを明らかにすることは、オーキシンによる植物の成長・分化調節の実態解明に繋がる可能性がある。

## 2．研究目的

PAA の生理的役割を解明するには、その生合成遺伝子の欠損変異体を作成し、PAA 量のみが減少した植物を解析することが重要である。しかし、植物における PAA の生合成経路はまだ解明されていない。そこで、モデル実験植物であるシロイヌナズナを使い、PAA 生合成に関わると予想される候補遺伝子の生化学的および分子遺伝学的な解析を行う。これにより、PAA の生合成経路と生合成遺伝子を同定し、それを元に PAA の生理的役割の解明を進める。

## 3．研究方法

1) シロイヌナズナの IAA 生合成酵素 TAA1 をコードする遺伝子のホモログ (TAR3 と TAR4) をクローニングし、それらの組換えタンパク質を調製した。これらを用いて、TAR

と TAR4 がフェニルアラニン (Phe) から PAA 生合成の予想中間体であるフェニルピルビン酸 (PPY) を生成する酵素活性を検証した。また、TAR3 および TAR4 遺伝子の過剰発現体と、CRISPR/Cas9 法を用いた *tar3 tar4* 二重欠損変異体をそれぞれシロイヌナズナで作成し、それらの表現型やオーキシン代謝物分析から、TAR3 と TAR4 が PAA の生合成に関与しているか検証した。

2) シロイヌナズナの IAA 生合成酵素 CYP79B2 をコードする遺伝子のホモログ *CYP79A2* をクローニングし、その遺伝子過剰発現体における PAA 量の変化や、表現型などを解析した。また、この遺伝子の欠損変異体についても同様に解析した。

3) PAA 生合成の上流に存在すると予想されたフェニルアラニン合成酵素 ADT について、その欠損変異体や過剰発現体を使って PAA 生合成における役割を解析した。

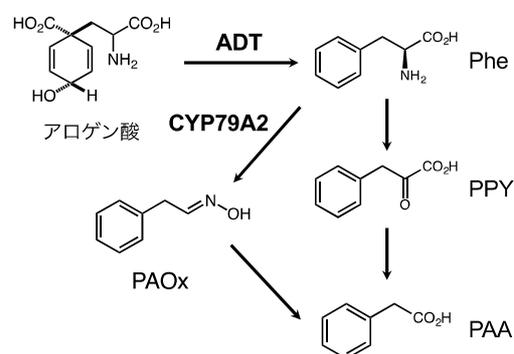
#### 4. 研究結果

1) シロイヌナズナからクローニングした *TAR3* および *TAR4* を大腸菌で発現させ、組換えタンパク質をそれぞれ調製した。これらのタンパク質が、PAA の第一段階として予想される Phe から PPY の変換を触媒するかどうか酵素活性を調べた。その結果、TAA1 に比べて弱い酵素活性ではあったが、*TAR3* および *TAR4* いずれも Phe から PPY を生成した。次に、*TAR3* と *TAR4* の過剰発現体をシロイヌナズナでそれぞれ作成した。しかし、これらの表現型を調べたが、野生型と比較して顕著な違いは見られなかった。また、オーキシン代謝物の分析を行ったが、顕著なオーキシン量の変化は認められなかった。さらに、

CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて *tar3 tar4* の二重欠損変異体を作成したが、本研究では表現型やオーキシン代謝物に顕著な変化は認められなかった。これらの結果、*in vitro* において TAR3 と TAR4 は弱い PPY 合成活性を示すものの、PAA 生合成への寄与を示す *in vivo* での十分な証拠は得られなかった。

2) シロイヌナズナでは、シトクロム P450 モノオキシゲナーゼ CYP79B2 と CYP79B3 が Trp からインドールアセトアルドキシム (IAOx) を生成しており、この IAOx はさらに IAA に変換される。この IAOx を経由する IAA 合成経路は、特に高温条件下で重要な役割を果たすと考えられている。CYP79A2 は Phe からフェ

ニルアセトアルドキシム (PAOx) を合成する活性を示すことから、PAOx から PAA が合成される経路がシロイヌナズナに存在することが予想された (図)。



シロイヌナズナの推定PAA生合成経路

そこで、*CYP79A2* 遺伝子の過剰発現体を作成し、表現型やオーキシン代謝物を分析した。その

結果、この過剰発現体では根でオーキシンが過剰蓄積した表現型が見られ、また野生型よりも PAA 蓄積量が増加した。興味深いことに、この *CYP79A2* 過剰発現体では IAA 量が減少しており、オーキシン代謝酵素 GH3 が IAA と PAA の比率を調節していることが明らかになった。一方、*cyp79a2* 欠損変異体では PAA 量は減少しておらず、また表現型も変化していないことから、*CYP79A2* 遺伝子は PAA 生合成の主経路には含まれていないことが示唆された。シロイヌナズナにおける *CYP79A2* 依存的な PAA 生合成経路の役割については今

後の解明が待たれる。

3) シロイヌナズナにはフェニルアラニン合成酵素のアロゲン酸デヒドラターゼ(ADT)が6つ存在する。PAA 生合成における ADT 遺伝子ファミリーの役割を調べるため、これらの過剰発現体や欠損変異体における PAA と PPY の内生量を調べた。その結果、ADT4 および ADT5 の過剰発現体で顕著に PAA と PPY の量が増加した。また、*adt* 多重欠損変異体で PAA と PPY の両方が減少した。これらの結果などから、PAA は主として Phe から PPY を経由して合成されていることが示された(図)。今後は、この PPY を含む主要な PAA 生合成経路の解明に取り組むことを計画している。

4) 本研究において、LC-MS/MS で様々な PAA 代謝物の定量法を確立した。これを用いることにより、アグロバクテリウムが形成するクラウンゴールにおいて IAA と PAA の両方が蓄積すること、シロイヌナズナの IAA メチル化酵素 IAMT1 が IAA と PAA の両方を *in vitro* でメチル化することができるが、植物体内では IAA のみを代謝すること、IAA 代謝酵素 UGT84B1 が IAA と PAA の両方をグルコシル化することなどを明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takubo Eiko, Kobayashi Makoto, Hirai Shoko, Aoi Yuki, Ge Chennan, Dai Xinhua, Fukui Kosuke, Hayashi Ken-ichiro, Zhao Yunde, Kasahara Hiroyuki	4. 巻 527
2. 論文標題 Role of Arabidopsis INDOLE-3-ACETIC ACID CARBOXYL METHYLTRANSFERASE 1 in auxin metabolism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1033 ~ 1038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.031	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 該当する

1. 著者名 Aoi Yuki, Tanaka Keita, Cook Sam David, Hayashi Ken-ichiro, Kasahara Hiroyuki	4. 巻 61
2. 論文標題 GH3 auxin-amido synthetases alter the ratio of indole-3-acetic acid and phenylacetic acid in Arabidopsis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 596 ~ 605
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz223	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Aoi Yuki, Oikawa Akira, Sasaki Ryosuke, Huang Jirong, Hayashi Ken-ichiro, Kasahara Hiroyuki	4. 巻 524
2. 論文標題 Arogenate dehydratases can modulate the levels of phenylacetic acid in Arabidopsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 83 ~ 88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.041	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 該当する

1. 著者名 Goh Tatsuaki, Toyokura Koichi, Yamaguchi Nobutoshi, Okamoto Yoshie, Uehara Takeo, Kaneko Shutaro, Takebayashi Yumiko, Kasahara Hiroyuki, Ikeyama Yoshifumi, Okushima Yoko, Nakajima Keiji, Mimura Tetsuro, Tasaka Masao, Fukaki Hidehiro	4. 巻 224
2. 論文標題 Lateral root initiation requires the sequential induction of transcription factors LBD16 and PUCHI in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 749 ~ 760
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.16065	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 -

1. 著者名 Mashiguchi Kiyoshi, Hisano Hiroshi, Takeda-Kamiya Noriko, Takebayashi Yumiko, Ariizumi Tohru, Gao Yangbin, Ezura Hiroshi, Sato Kazuhiro, Zhao Yunde, Hayashi Ken-ichiro, Kasahara Hiroyuki	4. 巻 60
2. 論文標題 Agrobacterium tumefaciens Enhances Biosynthesis of Two Distinct Auxins in the Formation of Crown Galls	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 29 ~ 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcy182	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Aoi Yuki, Hira Hayao, Hayakawa Yuya, Liu Hongquan, Fukui Kosuke, Dai Xinhua, Tanaka Keita, Hayashi Ken-ichiro, Zhao Yunde, Kasahara Hiroyuki	4. 巻 532
2. 論文標題 UDP-glucosyltransferase UGT84B1 regulates the levels of indole-3-acetic acid and phenylacetic acid in Arabidopsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 244 ~ 250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.08.026	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 該当する

1. 著者名 Kaneko Shutaro, Cook Sam David, Aoi Yuki, Watanabe Akie, Hayashi Ken-Ichiro, Kasahara Hiroyuki	4. 巻 61
2. 論文標題 An Evolutionarily Primitive and Distinct Auxin Metabolism in the Lycophyte Selaginella moellendorffii	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1724 ~ 1732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcaa098	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10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 青井勇輝、田中慧太、Cook Sam David、林謙一郎、笠原博幸
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるGH3を介したIAAとPAAの相互調節機構
3. 学会等名 植物化学調節学会第54回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 比良隼、青井勇輝、早川雄也、Hongquan Liu、福井康佑、Xinhua Dai、田中慧太、林謙一郎、Yunde Zhao、笠原博幸
2. 発表標題 シロイヌナズナのオーキシン濃度調節におけるUDP-グルコシル基転移酵素UGT84B1の役割
3. 学会等名 植物化学調節学会第55回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Cook Sam David、Kimura Seisuke、Kasahara Hiroyuki
2. 発表標題 Differential gene expression analysis of Arabidopsis seedlings reveals potential involvement of 2-phenylacetic acid in hormone crosstalk and a role in plant microbe interactions
3. 学会等名 The 23rd International Conference on Plant Growth Substances (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Aoi Yuki、Tanaka Keita、Cook Sam David、Hayashi Ken-ichiro、Kasahara Hiroyuki
2. 発表標題 Coordination in the regulation of indole-3-acetic acid and phenylacetic acid metabolism in Arabidopsis
3. 学会等名 The 23rd International Conference on Plant Growth Substances (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kasahara Hiroyuki
2. 発表標題 Biosynthesis and inactivation of two distinct auxins in plants
3. 学会等名 Tohoku Forum for Creativity Thematic Program 2010 Plant Stem Cells: Source of Plant Vitality Workshop2 Auxin and plant stem cells (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金子周太郎、Cook Sam David、林 謙一郎、笠原博幸
2. 発表標題 IPA 経路を介したオーキシンの生合成が小葉シダ類イヌカタヒバの根の伸長や高温応答を制御する
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青井 勇輝、佐々木 亮介、及川 彰、林 謙一郎、笠原 博幸
2. 発表標題 天然オーキシnPAAの生合成初期段階におけるフェニルアラニン合成酵素ADTの役割
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青井勇輝、武田紀子、竹林裕美子、林謙一郎、笠原博幸
2. 発表標題 シロイヌナズナにおける非極性移動型オーキシンのフェニル酢酸のCYP79A2依存的な生合成経路の解析
3. 学会等名 植物化学調節学会第53回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青井勇輝、武田紀子、竹林裕美子、林謙一郎、笠原博幸
2. 発表標題 シロイヌナズナにおける CYP79A2 依存的なフェニル酢酸生合成経路
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Aoi Yuki、Takeda Noriko、Takebayashi Yumiko、Hayashi Ken-ichiro、Kasahara Hiroyuki
2. 発表標題 New insights into auxin biosynthesis and inactivation in plants
3. 学会等名 Japan-Taiwan Plant Biology 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	University of California, San Diego		
オランダ	Wageningen University & Research		
米国	University of California, San Diego		
オランダ	Wageningen University & Research		
中国	Shanghai Normal University		
米国	University of California, San Diego		