

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19780090
 研究課題名（和文） シロイヌナズナのオーキシン生合成経路の解明に関する生化学的研究
 研究課題名（英文） Biochemical analyses of auxin biosynthetic pathway in Arabidopsis
 研究代表者
 笠原 博幸 (KASAHARA HIROYUKI)
 独立行政法人理化学研究所 生長制御研究チーム 上級研究員
 研究者番号：00342767

研究成果の概要：

オーキシンは植物の成長を調節する重要なホルモンだが、どのように合成されているかは殆ど分かっていない。本研究では LC-ESI-MS/MS 質量分析器を使って植物の極微量なオーキシン生合成中間物質を分析する技術を開発。これによりシロイヌナズナにはイネなどにはない固有のオーキシン生合成経路があることを解明した。また、シロイヌナズナの生育適温は 20℃強だが、気温の高い生育に不利な環境に置かれたときには、オーキシンが成長を助ける重要な働きをすることも分かった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	0
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	360,000	2,860,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：植物成長調節物質

1. 研究開始当初の背景

インドール酢酸 (IAA) は天然の活性型オーキシンとして植物の生長と分化における様々な局面で重要な役割を果たす植物ホルモンで

ある。近年、植物における IAA の生合成、代謝、移動、受容、情報伝達に関する研究が進み、昨年にはシロイヌナズナの IAA 受容体が同定され、受容から情報伝達へと続く段階の理解が飛躍的に進んだ。一方、IAA 生合成に目を

向けると、これまでに複数の合成経路が提唱されてきたが、未だ全貌の解明には至っていない。植物ホルモンの生合成経路ではIAAが最も複雑であると認識されているが、IAAの関与する多様な生理現象を分子レベルで理解するためには生合成経路の全容明は不可欠である。

近年、IAA生合成経路の研究はシロイヌナズナの分子遺伝学を中心に進められてきた。その結果、数種の生合成遺伝子が単離された。しかし、現在提唱されている経路はいくつもの中間体で収束した網目状の複雑なものであり、実際にこのような経路でIAAが合成されているかどうか分子遺伝学的手法のみでは解明が困難であった。この問題を解決するためには、不安定なIAA生合成中間体の分析法を確立することが必要であると考えた。

2. 研究の目的

シロイヌナズナでは少なくとも4つのトリプトファン (Trp) 依存型 IAA 生合成経路が提唱されていた。これらの中で YUCCA 経路と CYP79B 経路が収束している。これらが、それぞれ独立した IAA 生合成経路か、それとも実際に収束しているのかについて、予想中間体であるインドール-3-アセトアルドキシム (IAOx) の分析法を確立することにより解析する。

また、シロイヌナズナの数種の IAA 生合成変異体におけるインドール-3-アセトニトリル (IAN) およびトリプタミン (TAM)、インドール-3-アセトアミド (IAM) の分析や、トレーサー実験を行い、IAA 生合成経路を解析する。

3. 研究の方法

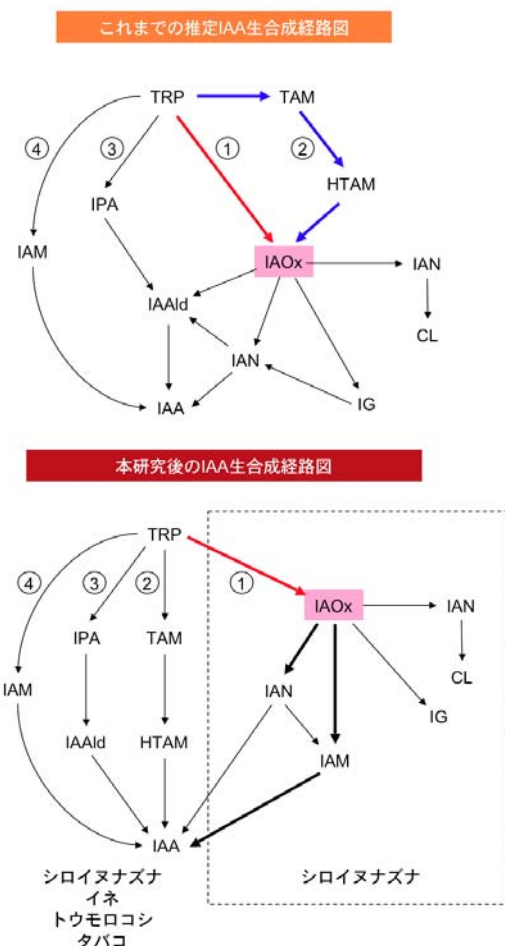
- 1) IAOx など IAA 生合成中間体の LC-ESI-MS/MS 分析法を確立し、これを含むと予想されている YUCCA 経路と

CYP79B 経路の生合成変異体の解析を行い、いずれの経路が IAOx を含むのか明らかにする。

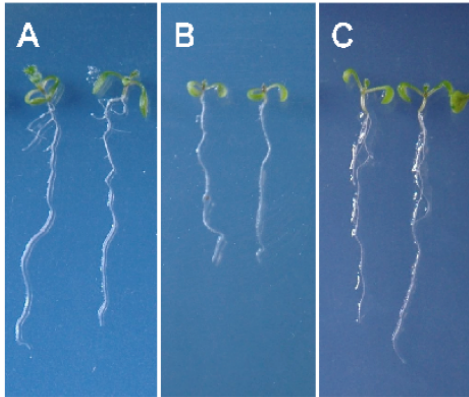
- 2) Trp を含む IAA 生合成中間体の安定同位体標識化合物を用いたトレーサー実験を行い、予想生合成経路を検証する。
- 3) YUCCA 経路に含まれると予想される Trp から TAM を生成する酵素トリプトファンデカルボキシラーゼ (TDC) の欠損変異体を作成し、その機能を解析する。

4. 研究成果

- 1) LC-ESI-MS/MS を用いた IAOx 分析法を確立。これにより IAOx はシロイヌナズナの CYP79B 経路に特異的な中間体であることを解明。
- 2) IAOx の下流の IAA 生合成中間体として IAN と IAM を新たに同定。シロイヌナズナの CYP79B 経路はイネなどにはない種特異的な IAA 生合成経路であることを発見。



IAOxを介するオーキシン生合成経路の
高温状態における役割



野生型 *cyp79b2-2*
cyp79b3-2 *cyp79b2-2*
cyp79b3-2
10 μM IAM

IAOxを介するオーキシン生合成経路を失ったシロイヌナズナのオーキシン生合成変異体を高い気温（26℃）で生育させると（B）、野生型のシロイヌナズナ（A）よりも生育が悪い。しかし、IAOxの下流の生合成中間物質であるIAMを与えるとオーキシンが作れるようになるため、生育状態が回復する（C）

- 3) シロイヌナズナのTDCをコードしていると予想された2つの遺伝子の欠損変異体を作成して解析を行ったが、これらのIAA量に変化は見られなかった。
- 4) インドールグルコシノレート（IG）を経由すると予想されていたIAA生合成経路は、通常の生育条件では見られないことを発見。
- 5) IAOxを介するIAA生合成経路はシロイヌナズナが高温条件下で生育された時に成長を助ける働きをもつことを発見。
- 6) IAAは植物にとって不可欠なホルモンであるが、その生合成経路は植物に普遍的な経路だけでなく、植物によって固有の経路が存在する可能性があることを発見。
- 7) 本研究の結果は、シロイヌナズナにおいて少なくとも4つの独立したIAA生合成

経路が存在することが初めて示された。今後は植物の様々な生理現象を調節する主要なIAA生合成経路の解明に繋がると期待される。この結果は米国科学アカデミー紀要（PNAS）に掲載されるなど、国際的にも高い評価を受けた。

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1件）

Sugawara, Satoko; Hishiyama, Shojiro; Jikumaru, Yusuke; Hanada, Atsushi; Nishimura, Takeshi; Koshiba, Tomokazu; Zhao, Yunde; Kamiya, Yuji; Kasahara, Hiroyuki.

Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*.

Proceeding of the National Academy of Science U.S.A. (2009) vol. 106, pp5430-5435. 査読有り

〔学会発表〕（計4件）

1. Hiroyuki Kasahara

Biochemical analysis of auxin biosynthesis via indole-3-acetaldoxime in *Arabidopsis*

Auxin 2008 meeting, 2008/10/5, Morocco

2. 菅原聡子、菱山正二郎、軸丸裕介、花田篤志、西村岳志、小柴共一、Yunde Zhao、神谷勇治、笠原博幸（研究代表者）

シロイヌナズナ特異的な新規オーキシン生合成経路の解析

植物化学調節学会第43回大会、2008年10

月 30 日

3. 笠原博幸(発表者)、菅原聡子、小柴共一、
神谷勇治

オーキシシン生合成中間体の LC-ESI-MS/MS に
よる分析法の確立

第 5 0 回日本植物生理学会、2009 年 3 月 21
日

4. 菅原聡子、菱山正二郎、軸丸裕介、花田篤
志、西村岳志、小柴共一、Yunde Zhao、神谷
勇治、笠原博幸(研究代表者)

シロイヌナズナにおけるインドール-3-アセ
トアルドキシムを介するオーキシシン生合成
経路の解析

第 5 0 回日本植物生理学会、2009 年 3 月 23
日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠原 博幸 (KASAHARA HIROYUKI)
独立行政法人理化学研究所
生長制御研究チーム 上級研究員
研究者番号：00342767

(2) 研究協力者

菅原 聡子
菱山 正二郎
軸丸 裕介
花田 篤志
西村 岳志
小柴 共一
Yunde Zhao
神谷 勇治