

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：35302

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15761

研究課題名(和文) オーキシン代謝不活性化経路の同定を目的としたケミカルバイオロジー研究

研究課題名(英文) A chemical inhibitor revealing auxin inactivation pathway

研究代表者

福井 康祐 (Fukui, Kosuke)

岡山理科大学・理学部・講師

研究者番号：80761147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物ホルモンの一種であるオーキシンは、細胞や組織における濃度によって様々な現象を引き起こす。そのため、植物体内でのオーキシン濃度は非常に厳密に制御されていると考えられている。オーキシンの濃度制御に関わるシステムのうち、生合成と輸送に関する知見は数多く得られているものの、不活性化については良くわかっていなかった。本研究では、オーキシンの不活性化を担うGH3酵素の阻害剤を創製し利用することで、植物体内ではオーキシンが常に作られると同時にGH3酵素によって代謝され、10分程度で全てのオーキシンが入れ替わっている可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オーキシンは植物のほとんど全ての生理現象に関わっているが、その主要な代謝経路は明らかとなっておらず、代謝によるオーキシン生理機能の制御機構についてはほとんどわかっていなかった。本研究では、オーキシンの代謝酵素の一つであるGH3ファミリーの機能阻害剤を創製し、機能冗長性の高いこれらの酵素ファミリーの主要な機能を明らかにすることに成功した。その結果、植物体内でオーキシン恒常性がどのように保たれているのか、生合成を含めた濃度制御の分子基盤を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：A plant hormone auxin induces various biological phenomena with a different concentration in the cell and/or the region. Therefore, the auxin level in the plant body is strictly regulated by biosynthetic pathways, transport, and catabolic pathways in a concerted manner. On the one hand, auxin biosynthetic pathways and transport have been well understood, but on the other hand, auxin catabolic pathways remain unclear. In this research, we developed a chemical inhibitor for the GH3 enzymes working on the auxin catabolic pathway. This chemical revealed that endogenous auxin is well balanced by constant auxin synthesis and catabolism. We demonstrated that the turnover time of auxin could be around 10 minutes.

研究分野：植物ホルモン

キーワード：オーキシン 代謝 ケミカルバイオロジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物のあらゆる形態形成に関与する植物ホルモン・オーキシンは、細胞や組織における濃度により様々な生理機能を示す。そのため、植物はオーキシン濃度を精緻に制御していると考えられてきた。オーキシンの濃度は、生合成・輸送・代謝不活性化が協調して制御していると考えられてきたが、代謝不活性化についてはその制御に関わる分子基盤が判然としていなかった。主要な代謝経路として提唱されていた DAO 酵素による酸化経路は、ロックアウトしても表現形にほとんど現れず、一時的な代謝を担うと考えられてきた GH3 酵素によるアミノ酸複合体化経路は、GH3 遺伝子の機能冗長性によりその生理機能の全容は明らかとなっていなかった。私は、DAO 遺伝子を過剰発現する遺伝子組換え植物が、オーキシン欠損の表現形を示さないことに着目し、GH3 経路こそが植物内でのオーキシンの主要な不活性化経路なのではないかと考えた。そこで、GH3 酵素の機能冗長性を克服すべく、阻害剤の創製によるケミカルバイオロジーの手法で GH3 経路の機能解明に挑戦することとした。

2. 研究の目的

本研究では、GH3 阻害剤を用いて GH3 経路がオーキシンの代謝不活性化にどのような役割をはたしているのかを明らかにし、植物内オーキシンの主要な代謝不活性化経路を明らかにすることを目的として研究を行なった。

3. 研究の方法

(1) 構造活性相関による高活性かつ高選択的な GH3 阻害剤の選抜

ケミカルライブラリーから植物を用いたスクリーニングにより得られたリード化合物を、有機合成により構造展開し、合成した類縁体化合物を用いて構造活性相関研究を行なった。高濃度のオーキシン処理はシロイヌナズナ主根伸長を抑制するため、合成した類縁体化合物処理がシロイヌナズナの主根長に与える影響を定量評価した。また、オーキシンの生合成遺伝子である YUC を過剰発現する組換え体シロイヌナズナは、胚軸の伸長を示すため、化合物が胚軸身長に与える影響も同様に評価した。

(2) オーキシン代謝遺伝子の過剰発現株と機能欠損変異株を用いた Kakeimide の機能解析

選抜した化合物を Kakeimide と名付け、その機能を詳細に解析した。野生型植物に Kakeimide を処理すると、オーキシンの過剰蓄積と類似する表現型を示した。そこで、オーキシンの生合成変異体や生合成阻害剤を用いて、Kakeimide によるオーキシン蓄積を示す表現型が内生のオーキシンに依存するか調べた。さらに、Kakeimide が GH3 酵素のみを阻害することを確認するため、オーキシンの代謝活性を持つと報告されていた DAO、IAMT1、UGT84B1 酵素遺伝子を過剰発現する組換え体シロイヌナズナに Kakeimide を処理し、与える影響を評価した。

(3) 組換え GH3 タンパク質を用いた Kakeimide の酵素反応速度論的阻害作用解析

大腸菌を用いていくつかの組換え GH3 酵素を合成し、精製タンパクとして単離した。これらの酵素を用いて *in vitro* 試験系での酵素反応を行い、Kakeimide の GH3 酵素に対する阻害活性の速度論的解析を行なった。また、GH3 の気質である ATP、IAA、アミノ酸のそれぞれに対して、Kakeimide がどのように阻害作用を示すか、その阻害様式を解析した。

(4) GH3 経路の阻害が内生オーキシンに与える影響の継時的な解析

ここまでの検討から、Kakeimide が GH3 酵素のみを選択的に阻害し、内生オーキシンを蓄積させることが明らかとなった。そこで、Kakeimide 処理により短時間でのオーキシンの蓄積が見られるのか、検討することとした。まず、オーキシンにより蛍光を消失するレポーターラインである DII-VENUS を用いて、Kakeimide 1 時間処理での蛍光の消失を確認した。次に Kakeimide 10 分、20 分、30 分、40 分処理での DII-VENUS の蛍光強度を定量し、同様の時間処理した IAA 処理区と mock 処理区と比較した。また、同様に Kakeimide 処理 10 分、30 分、60 分でのオーキシン応答性遺伝子の発現をリアルタイム PCR により定量評価するとともに、内生 IAA の蓄積量を定量した。

(5) イネに対する Kakeimide の機能解析

ここまで、シロイヌナズナに対する活性のみを評価してきたため、イネに対しても Kakeimide が効果を示し、オーキシンの蓄積を示す表現型を導くのか検討した。イネのオーキシン処理による形態の変化はあまり顕著ではないが、幼根の伸長阻害と、イネを冠水させた時のメソコチルの伸長を評価した。

4. 研究成果

(1) 構造活性相関による高活性かつ高選択的な GH3 阻害剤の選抜

得られたリード化合物から構造類縁体を 30 化合物合成し、植物を用いた試験系により活性を評価した。その結果、シロイヌナズナの胚軸を伸長させ、主根の伸長を抑制し、側根や不定根の形成をもっともよく促進した化合物を選抜した。本化合物を Kakeimide と命名し、その機能解析を行なった。

(2) オーキシン代謝遺伝子の過剰発現株と機能欠損変異株を用いた Kakeimide の機能解析

オーキシンの生合成遺伝子の欠損変異体に Kakeimide を処理すると、野生型のような劇的な形態の変化は観察されず、また YUC 遺伝子を過剰発現する組換えシロイヌナズナに Kakeimide を処理すると、低濃度でも過剰なオーキシンの蓄積を示す形態が観察された。従って、Kakeimide 処理により観察されたオーキシンの過剰蓄積を示す形態は、植物が生合成する内生のオーキシンに依存することが明らかとなった。一方で、オーキシン代謝酵素遺伝子の過剰発現株に Kakeimide を処理したところ、IAMT1 と UGT84B1 の過剰発現株では Kakeimide 処理によるオーキシン欠損形態からの回復は観察されず、DAO の過剰発現株ではそもそもオーキシン欠損形態が観察されなかった。従って、Kakeimide は GH3 酵素を阻害することで内生のオーキシンを蓄積させていると考えられた。

(3) 組換え GH3 タンパク質を用いた Kakeimide の酵素反応速度論的阻害作用解析

GH3.3、GH3.5、GH3.6、GH3.17、OsGH3-8 酵素を発現・精製することに成功した。これらの酵素を用いて IAA のアミノ酸複合体化反応を解析した。生成物である IAA-Aspartate と IAA-Glutamate を HPLC を用いて分離し、蛍光検出器を用いて定量した。その結果、各酵素に対する IAA の K_m が 9~60 μM であったのに対し、Kakeimide の K_i は 20~200 nM であった。また、GH3.17 を用いて各基質に対する阻害様式を調べた結果、ATP に対して非拮抗阻害、IAA に対して拮抗阻害、Glutamate に対して拮抗阻害を示すことが明らかとなった。既報で提唱されていた GH3 酵素の反応メカニズムと照らし合わせ、Kakeimide は GH3 と ATP の複合体、あるいは中間体である IAA-AMP 複合体に対し、IAA と拮抗する様式で結合することで酵素反応を阻害すると考察された。

(4) GH3 経路の阻害が内生オーキシンに与える影響の継時的な解析

DII-VENUS を用いた解析から、Kakeimide は処理後 30 分程度で IAA 処理と同程度に DII-VENUS の蛍光を消失させることが示された。また、リアルタイム PCR の結果から、Kakeimide は処理後 10 分ではオーキシン応答性遺伝子の発現を上昇させないが、処理後 30 分では IAA 処理と同程度に発現上昇させることが明らかとなった。さらに、内生 IAA 量を定量したところ、Kakeimide は処理後 10 分で mock 処理の約 2 倍の IAA を蓄積させることが明らかとなった。以上の結果から、内生の IAA は常に一定量合成され、常に代謝不活性化されることで恒常性を維持していることが示唆された。さらに、内生の IAA は 10 分程度でターンオーバーすることも示唆された。

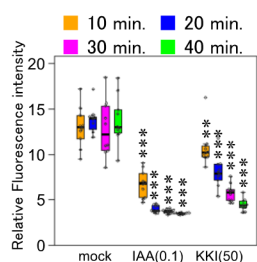


図1. DII-VENUSの蛍光強度

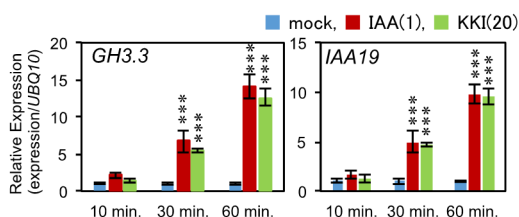


図2. オーキシン応答性遺伝子発現量

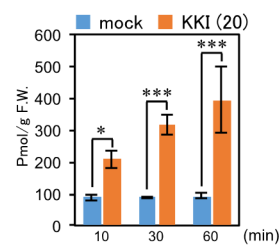


図3. シロイヌナズナIAA内生量

(5) イネに対する Kakeimide の機能解析

イネを用いた試験では、継時変化などの効果は観察しなかったが、Kakeimide 処理によりオーキシン処理と同様の形態の変化を観察することができた。イネ幼根の伸長は Kakeimide と IAA の共処理により顕著に阻害され、イネメソコチルの伸長は IAA 0.1 μM 処理と Kakeimide 10 μM 処理が同程度の伸長を誘導した。

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 Jun, Fukui Kosuke, Seto Yoshiya, Takaoka Yousuke, Okamoto Masanori	4. 巻 105
2. 論文標題 Ligand?receptor interactions in plant hormone signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 290 ~ 306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.15115	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福井康祐、新井一司、青井勇輝、竹林裕美子、笠原博幸、林謙一郎
2. 発表標題 オーキシニン-アミノ酸複合体合成酵素GH3の阻害剤を用いたIAA代謝経路の解析
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 新井一司、福井康祐、青井勇輝、竹林裕美子、笠原博幸、林謙一郎
2. 発表標題 オーキシニン-アミノ酸複合体合成酵素GH3の阻害剤の速度論的解析
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 新井一司、福井康祐、笠原博幸、林謙一郎
2. 発表標題 新規 GH3 阻害剤を用いたオーキシン代謝経路の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 2020年度大会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 新井一司、赤嶺孝太、青井勇輝、笠原博幸、福井康祐、林謙一郎
2. 発表標題 GH3アミノ酸複合体合成酵素は細胞内IAA濃度の恒常性を調節する
3. 学会等名 植物化学調節学会第55回大会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 新井一司、青井勇輝、笠原博幸、福井康祐、林謙一郎
2. 発表標題 細胞内IAA濃度の恒常性はGH3アミノ酸複合体酵素によって調節される
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第58回講演会（例会）
4. 発表年 2020年～2021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
連携研究者	林 謙一郎 (Hayashi Ken-ichiro) (30289136)	岡山理科大学・理学部生物科学科・教授 (35302)	

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			