

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02501

研究課題名(和文)植物の生体防御機構における非極性移動型オーキシンの役割

研究課題名(英文)The role of a nonpolar transport-type auxin in plant defense mechanism

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：オーキシンは植物の成長や発達の制御に関わる非常に重要な植物ホルモンである。本研究では、オーキシンの一種であるフェニル酢酸(PAA)の生合成遺伝子をシロイヌナズナで同定し、その欠損変異体を用いてPAAの生体防御における役割を解明することを目指した。PAA生合成の候補遺伝子としてアルデヒドオキシダーゼ(AAO)ファミリーの多重欠損変異体などを解析した結果、この遺伝子ファミリーがPAA生合成に関わること示唆する結果を得た。また、フェニルアラニンからフェニルアセトアルデヒドを合成する芳香族アルデヒド合成酵素がAAOファミリーの上流でPAA生合成に関与することが示唆された。

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セトアルデヒドを経由して合成されている可能性を示した。このPAAは植物の生体防御に関与することがこれまでの研究で示されていることから、本研究の成果は植物の基本的な生体防御メカニズムの解明や、PAAの生合成酵素を標的とした新たな農薬の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The plant hormone auxin plays an important role in the regulation of plant growth and development. In this study, we aimed to identify the biosynthetic genes of phenylacetic acid (PAA), a nonpolar transport-type auxin, in Arabidopsis and elucidate the role of PAA in plant defense using its biosynthetic mutants. Through analysis of candidate genes for PAA biosynthesis, we obtained results suggesting that the aldehyde oxidase family contributes to PAA biosynthesis. Moreover, it was suggested that aromatic aldehyde synthase, which synthesizes phenylacetaldehyde from phenylalanine, is involved in PAA biosynthesis.

研究分野：植物生化学

キーワード：オーキシン 植物ホルモン 生体防御

## 1. 研究開始当初の背景

オーキシンは植物の成長や分化、環境応答の制御に関わる非常に重要な植物ホルモンである。これまでインドール-3-酢酸 (IAA) を中心にオーキシンの研究が行われ、極性輸送による IAA の濃度調節が細胞伸長や細胞分化に重要であることが示されてきた。最近、私たちはフェニル酢酸 (PAA) もオーキシン受容体に結合するが、極性輸送されないユニークな特性を持つオーキシンであることを発見した。さらに、PAA をシロイヌナズナに処理すると、スベリン層の形成を促進したり、植物免疫に関連する遺伝子の発現を誘導したりすることを見出した。これにより、PAA がオーキシンとして生体防御の調節に関与していることが示唆された。

PAA の生理的役割を解明するには、その生合成欠損変異体を解析することが重要であるが、まだ PAA の生合成遺伝子は同定されていない。私たちは、これまでにフェニルアラニン (Phe) からフェニルピルビン酸 (PPY) を経由して PAA を合成する経路について検討してきた。シロイヌナズナでフェニルアラニン合成酵素 (ADT) の遺伝子を過剰発現させると PAA と PPY の量が増加することから、この経路が重要であると考えた。そこで、IAA 合成酵素 TAA1 のホモログである TAA1-RELATED3 (TAR3) と TAA1-RELATED4 (TAR4) を PPY 合成酵素の候補として解析したが、それらの遺伝子の過剰発現体や二重欠損変異体の解析結果から PAA 生合成への関与は低いことが示唆された。さらに、Phe からフェニルアセトアルドキシム (PAOx) を経由して PAA を合成する経路についても検討した。PAOx 合成酵素である CYP79A2 の遺伝子過剰発現体を作成して解析したところ、PAA 量が増加し、側根形成の促進などオーキシン蓄積型の表現型を示した。しかし、*cyp79a2* 欠損変異体では PAA 量の減少が見られず、また有意な表現型を示さなかったことから、これが PAA 主要経路の酵素ではないことが示唆された。これらの結果から、他の PAA 中間体を経由する生合成経路について検討することにした。

## 2. 研究の目的

本研究では、シロイヌナズナの PAA 生合成遺伝子の同定を目的として、Phe からフェニルアセトアルデヒド (PAAld) 経由で PAA を合成する経路を検証した。PAA 生合成遺伝子の候補として、PAAld を酸化して PAA を生成することが知られているアルデヒドオキシダーゼ (AAO) をコードする *AAO* ファミリーを解析した。また、PAA 量が減少した植物体を得るための別の方法として、微生物の PAA 代謝酵素遺伝子をシロイヌナズナで発現させることにより、PAA を選択的に不活化させる実験も試みた。この実験では、ペニシリウム属菌の一種である *Penicillium chrysogenum* が持つ P450 モノオキシゲナーゼの一種で、PAA 代謝酵素として知られる PAA 2-hydroxylase (*pahA*) の遺伝子をシロイヌナズナで過剰発現させる実験を進めた。これら2つの方法により PAA 量が減少した変異体を獲得し、スベリン層形成など PAA の生体防御における役割を明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

### 1) AAO の解析

シロイヌナズナには4つの *AAO* 遺伝子が存在することから、初年度にそれらの遺伝子の多重欠損変異体の確立を行なった。また、シロイヌナズナにおいて *AAO1* の遺伝子過剰発現体の作成も進めた。2年目には、*aao* 多重欠損変異体および *AAO1* 過剰発現体における PAA とその代謝物の定量分析と表現型解析を行なった。3年目には、Phe から PAAld を合成する芳香族アルデヒド合成酵素 (AAS) の遺伝子過剰発現体と欠損変異体を用いて、これが AAO の上流で PAA 生合成に関与する可能性について検証した。

### 2) シロイヌナズナにおける *P. chrysogenum* の *pahA* 遺伝子過剰発現

初年度に *pahA* の合成 DNA をシロイヌナズナに導入する実験を進めた。また、*P. chrysogenum* の P450 リダクターゼ (PcP450R) の遺伝子についても、同様に合成 DNA をシロイヌナズナに導入する実験を行なった。さらに、*pahA* が PAA から生成する2-ヒドロキシフェニル酢酸 (2-HPAA) がシロイヌナズナにおいてオーキシン活性を示さないことを確認した。2年目には *pahA* と PcP450R の遺伝子を共発現したシロイヌナズナ系統の確立を進めた。3年目には、*pahA* と PcP450R の遺伝子共発現体の表現型解析とオーキシン代謝物分析を行なった。

## 4. 研究成果

1) シロイヌナズナにおいて AAO ファミリーが PAA 生合成に関与する可能性を調べるため、瀬尾光範博士 (現・琉球大)、岡本昌憲博士 (現・理研) との共同研究により、*aao* 多重欠損変異体 (二重、三重および四重欠損変異体) の系統を全て整備した。AAO ファミリーのうち、AAO3 は植物ホルモンの一種であるアブシシン酸 (ABA) の生合成酵素として広く知られている。これら *aao* 多重欠損変異体のオーキシン代謝物を定量分析したところ、三重および四重欠損変異体において PAA 及びその主要な代謝物 (PAA-アミノ酸結合体) の内生量が大幅に減少していることを発見した。一方、IAA とその代謝物の内生量には変化がみられなかった。これにより、PAA 生合成の最終段階に AAO が主に関与していること、また AAO が PAA と ABA という2種類の

植物ホルモンの合成に関与することが強く示唆された。これら *aao* 多重欠損変異体におけるスベリンの蓄積を解析したところ、その量が有意に減少していることが分かった。しかし、ABA もスベリンの合成に関与することが報告されているため、この結果から PAA がどの程度スベリンの合成に寄与しているのかを明らかにすることはできなかった。

PAA 生合成に AAO ファミリーが関与する証拠をさらに示すため、シロイヌナズナのエストラジオール誘導型 *AAOI* 遺伝子過剰発現体を作成した。*AAOI* 過剰発現体の PAA とそのアミノ酸結合体の内生量を定量したが、コントロール植物と比較して有意差は認められなかった。また、表現型についてもコントロール植物と比較して顕著な差は見られなかった。ABA の生合成において、AAO3 によるアルデヒド中間体の酸化反応は律速段階ではなく、AAO の上流にある 9-シスエポキシカロチノイドジオキシゲナーゼ (NCED) が律速酵素であることが知られている。これらの結果から、PAA 生合成においても AAO の上流に別の律速酵素が存在する可能性が強く示唆された。

本研究において AAO ファミリーが PAA 生合成の最終段階を触媒することが強く示唆された。そこで、続いて AAO の上流で PAAlid の合成に関与する可能性のある芳香族アルデヒド合成酵素 (AAS) と PAA 生合成の関係性についてシロイヌナズナで検証した。*AAS* 遺伝子の T-DNA 挿入変異体を Arabidopsis Biological Research Center (USA) から入手し、*AAS* のプロモーター領域に T-DNA が挿入されたことにより *AAS* を過剰発現した系統 (*aas-1*) と、ORF に T-DNA が挿入されたことにより *AAS* の機能を喪失した系統 (*aas-2*) を得た。*aas-1* 変異体のオーキシン代謝物分析の結果、*AAS* 過剰発現によって PAA およびアミノ酸結合体の量が有意に増加することが明らかになった。また、*aas-2* 変異体のオーキシン代謝物分析により、*AAS* の欠損によって PAA とその代謝物の量が減少することも分かった。以上の結果、シロイヌナズナにおいて AAS が PAA の生合成に関与することが示唆された。今後、PAA が AAS と AAO により 2 段階で合成されていることの遺伝学および生化学的な検証と、この経路の生体防御における役割の解析をさらに進める予定である。

2) 初年度に *Penicillium chrysogenum* がもつ PAA 代謝酵素 *pahA* と *PcP450R* の合成 DNA を作成し、それぞれの遺伝子をエストラジオール誘導型発現ベクターでシロイヌナズナに導入した。その後、*pahA* と *PcP450R* の遺伝子過剰発現体のホモ系統をそれぞれ確立した。

PAA は *P. chrysogenum* においてシトクロム P450 モノオキシゲナーゼの一種である *pahA* によって 2-HPAA へと酸化される。2-HPAA がシロイヌナズナにおいてオーキシン活性を示さないことを確認するため、DR5:GUS リポーターアッセイ系を用いて 2-HPAA が GUS 発現を誘導するか調べた。その結果、PAA が GUS 発現を誘導する濃度において 2-HPAA は誘導しないことから、2-HPAA はオーキシン活性を示さないことが確認された。また、シロイヌナズナの側根形成試験においても、PAA が側根形成を促進するのに対し、2-HPAA は 10 倍の濃度でもこれを促進しないことが分かった。よって、シロイヌナズナにおいて *pahA* を発現し、機能させることができれば、PAA を酸化して 2-HPAA に不活化できることが示唆された。

2 年目にこれらの遺伝子過剰発現体を交配することにより共発現系統を確立した。エストラジオール処理により、*pahA* および *PcP450R* の遺伝子発現が誘導されることを確認したのち、オーキシン内生量を質量分析計で定量した。しかし、*pahA* および *PcP450R* の共発現によって PAA 量の減少が確認できなかった。また、IAA 量についても変化は見られなかった。今後さらに共発現体の系統を増やし、PAA と 2-HPAA の定量分析ならびに表現型解析を進める予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Katagiri Sotaro, Kamiyama Yoshiaki, Yamashita Kota, Iizumi Sara, Suzuki Risa, Aoi Yuki, Takahashi Fuminori, Kasahara Hiroyuki, Kinoshita Toshinori, Umezawa Taishi	4. 巻 65
2. 論文標題 Accumulation of phosphorylated SnRK2-substrate 1 promotes drought escape in Arabidopsis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant And Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 259 ~ 268
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcad146	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 -

1. 著者名 Goto Chieko, Ikegami Akira, Goh Tatsuaki, Maruyama Kaisei, Kasahara Hiroyuki, Takebayashi Yumiko, Kamiya Yuji, Toyokura Koichi, Kondo Yuki, Ishizaki Kimitsune, Mimura Tetsuro, Fukaki Hidehiro	4. 巻 64
2. 論文標題 Genetic interaction between Arabidopsis SUR2/CYP83B1 and GNOM indicates the importance of stabilizing local auxin accumulation in lateral root initiation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant And Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1178 ~ 1188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcad084	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 -

1. 著者名 Ohbayashi Iwai, Sakamoto Yuki, Kuwae Hitomi, Kasahara Hiroyuki, Sugiyama Munetaka	4. 巻 39
2. 論文標題 Enhancement of shoot regeneration by treatment with inhibitors of auxin biosynthesis and transport during callus induction in tissue culture of <i>Arabidopsis thaliana</i>;	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 43 ~ 50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.21.1225a	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 -

1. 著者名 Akira Iwase, Arika Takebayashi, Yuki Aoi, David S Favero, Shunsuke Watanabe, Mitsunori Seo, Hiroyuki Kasahara, Keiko Sugimoto	4. 巻 39
2. 論文標題 4-Phenylbutyric acid promotes plant regeneration as an auxin by being converted to phenylacetic acid via an IBR3-independent pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 51-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.21.1224b	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 -

1. 著者名 Kosuke Fukui, Kazushi Arai, Yuka Tanaka, Yuki Aoi, Vandna Kukshal, Joseph M. Jez, Martin F. Kubes, Richard Napier, Yunde Zhao, Hiroyuki Kasahara, Ken-Ichiro Hayashi	4. 巻 119
2. 論文標題 Chemical inhibition of the auxin inactivation pathway uncovers the roles of metabolic turnover in auxin homeostasis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.	6. 最初と最後の頁 e2206869119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2206869119	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

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Kasahara Hiroyuki
2. 発表標題 Metabolic regulation of two natural auxins in plants
3. 学会等名 Auxin and cytokinin in plant development 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kasahara Hiroyuki
2. 発表標題 Metabolic regulation of two naturally occurring auxins in plants
3. 学会等名 The 24th International Conference on Plant Growth Substances (IPGSA) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Maruyama Kaisei, Hirai Shoko, Kasahara Hiroyuki
2. 発表標題 Distinct regulation of two natural auxins in seed formation and thermomorphogenesis
3. 学会等名 The 24th International Conference on Plant Growth Substances (IPGSA) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hayashi Ken-ichiro, Arai Kazushi, Watahiki Masaaki, Napier Richard, Zhao Yunde, Fukui Kosuke, Kasahara Hiroyuki
2. 発表標題 Auxin homeostasis is coordinately regulated by GH3 and AUX1
3. 学会等名 The 24th International Conference on Plant Growth Substances (IPGSA) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 丸山海成、平井晶子、笠原博幸
2. 発表標題 種子形成過程及び温度形態形成における2種の天然オーキシンの量的制御
3. 学会等名 植物科学調節学会第58回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菅沼 有紀、丸山 海成、嶋村 正樹、林 謙一郎、笠原 博幸
2. 発表標題 孢子植物におけるオーキシン不活化経路の解析
3. 学会等名 植物化学調節学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中佑佳, 新井一司, 福井康祐, 青井勇輝, 比良 隼, Yunde Zhao, 笠原博幸, 林謙一郎
2. 発表標題 単子葉・双子葉植物におけるオーキシン代謝産物の分析
3. 学会等名 日本農業学会第47回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中佑佳, 新井一司, 福井康祐, Ruipan Guo, Yun Hu, Chennan Ge, 青井勇輝, 比良 隼, Yunde Zhao, 笠原博幸, 林謙一郎
2. 発表標題 オーキシンの不活性化経路の再構築に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022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	Washington University in St. Louis	University of California San Diego	