

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：35302

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19097

研究課題名（和文）細胞内オルガネラにおける植物ホルモン分子の貯蔵・再放出系の解明

研究課題名（英文）Metabolic recycling of plant hormone in organelle.

研究代表者

林 謙一郎（Hayashi, Ken-ichiro）

岡山理科大学・生命科学部・教授

研究者番号：30289136

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：オーキシンの細胞内濃度は生合成、輸送および代謝不活性化でつり合い、一定のオーキシン濃度が維持されているモデルが通説となっている。このうち、代謝酵素の発現量や分解速度による調節に加えて、オーキシンのホメオスタシスを厳密に制御するため、細胞内オルガネラへ貯蔵されるオーキシン貯蔵体がオーキシンのホメオスタシスの維持に重要である証拠が得られた。本研究により、オーキシン貯蔵体の生理機能の一端が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オーキシンの細胞濃度の調節は、植物の分化成長の制御に直接関係することから、植物学上の重要な研究課題である。オーキシンは発根、茎の徒長、および結実などの農業上重要な形質にも関係する。オーキシンの配糖体やアミノ酸複合体などのオーキシン代謝物は、不活性化物として考えられてきたが、本研究によって、オーキシンの貯蔵体として小胞体などの細胞内コンパートメントへ一時貯蔵されることを見出した。これらオーキシンの合成・分解経路の全貌を解明することで、作物・園芸植物などの形質の理解につながると期待できる。

研究成果の概要（英文）：The intracellular auxin level is coordinately regulated by biosynthesis, transport, and metabolic inactivation of auxin. Endogenous auxin level is maintained by the expression and degradation rate of these metabolic enzymes. This study revealed that auxin storage forms are accumulated in intracellular organelles, which play an important role in maintaining auxin homeostasis to maintain auxin homeostasis. This study illustrates the physiological function of auxin storage forms.

研究分野：生物有機化学・植物科学

キーワード：オーキシン 植物ホルモン 代謝

1. 研究開始当初の背景

植物ホルモンであるオーキシシン・インドール 3-酢酸 (IAA) は胚発生、花芽形成、側根形成、頂芽優勢、光・重力屈性など、植物の分化・成長のあらゆる局面に關与する。このような植物の複雑な形態形成や多様な環境応答には、オーキシシンの組織・細胞濃度の動的制御が重要である。すなわち、植物細胞・組織・器官のオーキシシン濃度の偏差が形成されることで、細胞分裂や細胞伸長などが制御され、その結果、植物の形態形成や分化が調節される。これまで、オーキシシンの細胞濃度は、(1) IAA の極性輸送と IAA (内生オーキシシン) の生合成、(2) IAA の不活性化・分解の3つの経路により、協調して精緻に調節されると考えられ、その基本的な分子基盤も明らかとされてきた。

(1) オーキシシンの極性輸送と生合成

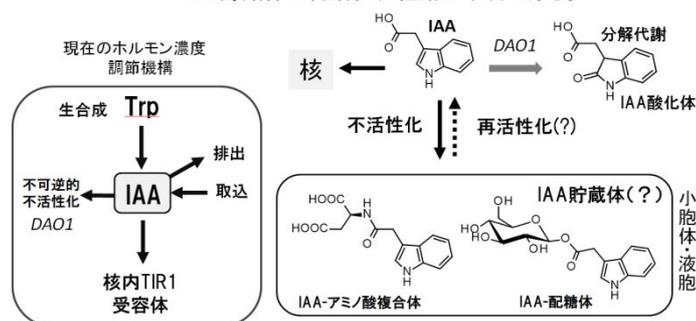
オーキシシンの極性輸送は、細胞内外にオーキシシンを極性輸送することで細胞内濃度を調節している。これまでに、実験植物であるシロイヌナズナについてオーキシシンを輸送する輸送タンパクや輸送担体 (PIN, PILS, WAT1) が同定され、そのうちのいくつかはオルガネラである小胞体や液胞の膜に局在しており、小胞体や液胞へのオーキシシンの細胞内輸送に關わると報告されている。これら輸送体の欠損変異体では、オーキシシンに關わる形態に異常が觀察されているが、オルガネラへ貯蔵されたオーキシシンの分布や生理的意義は実験的には明らかとされていない。オーキシシンである IAA は、アミノ酸である Trp から TAA1/TAR 酵素と YUCCA 酵素により生合成される。Trp からインドール 3-ピルビン酸へのアミノ基転移反応を担う TAA1/TAR 酵素のうち、TAA1 は細胞質に、TAR2 は小胞体に局在することが報告されている。また、インドール 3-ピルビン酸の酸化脱炭酸反応を担う YUCCA 酵素の 11 酵素うち、YUCCA5, 7, 8, 9 の 4 酵素は、小胞体に局在すると報告されている。しかしながら、これら生合成酵素の細胞内局在の生理的意義は明らかにされていない。

(2) オーキシシン不活性化・再活性化

オーキシシンは、細胞内でアミノ酸や糖と結合されることで不活性化される。不活性化体への代謝に關わる酵素遺伝子の多くは、2 次代謝産物の代謝酵素群に属するため、それら全てが同定されているわけではなく、各酵素の生理的役割、細胞内局在や発現調節の全貌も明らかとされていない(図1)。これまでのオーキシシン不活性化経路の研究から、IAA はオルガネラ内で、不活性化(貯蔵体の合成)と再活性化を受けることを支持する実験結果を得られている。細胞質で生合成された IAA や細胞外から輸送された IAA は、核内に移行して TIR1 オーキシシン受容体に結合し、ホルモン応答性遺伝子の発現を誘導する。動物細胞と異なり植物細胞では巨大な液胞において、代謝産物の貯蔵や不用物の分解などが行われる。本研究ではシグナル分子であるオーキシシンの核内への移行量は、小胞体や液胞への IAA や IAA 貯蔵体の蓄積・IAA への再活性化(細胞質への遊離)によって制御されるとの仮説を構築し、研究を推進した。

IAA貯蔵体の再活性化経路は不明である。

図 1

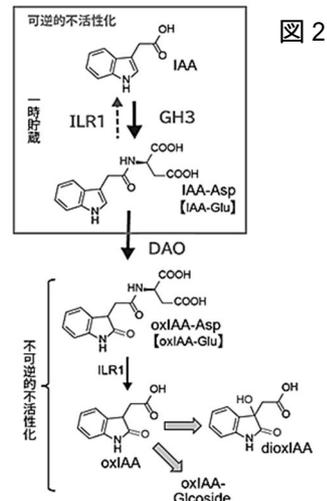


再活性化酵素遺伝子の同定・機能解析がされていない。

2. 研究の目的

申請者らは IAA の不活性化経路として GH3 - DAO - ILR1 経路を報告した(図2)。この経路では、IAA は GH3 酵素 (IAA - アミノ酸縮合酵素)により、IAA - アミノ酸複合体へと不活性化されて一時的な IAA 貯蔵体として蓄積される。この貯蔵体である IAA - アミノ酸は ILR1 加水分解酵素により、IAA へと再活性化される(図2)。本研究では、核内受容体に結合してホルモン活性を発揮する細胞内のオーキシシンが、小胞体などの細胞内オルガネラへ IAA - アミノ酸として一時貯蔵されることによって、核へと移行するオーキシシン量が調節されることを実験的に証明する。それにより、これまでのホルモンの生合成・輸送・分解によるホルモン活性の調節に加えて、ホルモンのオルガネラ局在制御による新奇な植物ホルモンの活性調節機構の解明に挑む。

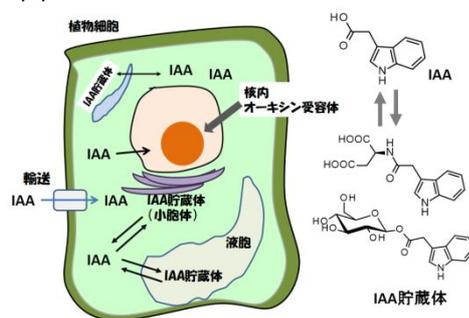
申請者らのオーキシンの不活性化経路を研究から、オーキシン代謝経路の欠損変異体の中には、IAA-アミノ酸複合体（アミノ酸貯蔵体）が、通常の数百倍も蓄積することを見出した。これら変異体では、IAA 複合体や IAA が過剰に蓄積するにもかかわらず、驚いたことに変異体では、オーキシン過剰の形態がほとんど観察されなかった。一方、それら蓄積した IAA 複合体や IAA 内生量に相当する量の 1/10 ~ 1/100 より少ない量の IAA や IAA 複合体を外部から投与すると、オーキシン過剰な形態が観察された。この結果から IAA や複合体の内生量と、植物のオーキシン応答の係に矛盾する結果が示唆された。この予備的な結果を矛盾なく説明できる仮説として、オーキシン濃度を調節するために IAA や IAA 不活性化体はオルガネラに貯蔵され、必要に応じて細胞質、核に再活性化・放出されて、最終的にオーキシン応答を制御していると考えに至った。オーキシン代謝酵素の細胞内局在や、さらに代謝経路の調節機構自体が明らかとされていないことから、オーキシン代謝酵素の細胞内局在制御とその局在制御を解析する。また、オーキシンや、その代謝物の動態と代謝酵素の細胞内局在の関係を明らかにすることで、新しいオーキシンの活性調節機構の解明に挑む。



3. 研究の方法

分子生物学と IAA 代謝物の高感度精密分析の手法を統合し、オルガネラで貯蔵される IAA や IAA 貯蔵体の代謝変動とオーキシン活性を解析する（図 3）。小胞体や核移行シグナルを付与したオーキシン代謝酵素を、形質転換植物で発現させて、標的オルガネラで選択的に代謝活性を誘導させる。すなわち、標的オルガネラ（小胞体、核、液胞など）での IAA の貯蔵体の合成・分解を自在に再現する。また、IAA の不活性化酵素を標的オルガネラ（小胞体、色素体、液胞）で発現させることで、オルガネラ内の IAA を選択的に欠失させる。本研究では、オルガネラ特異的に代謝酵素を発現させた形質転換体の LC-MS/MS 分析および、イメージング技術を統合して、オルガネラへ貯蔵されるオーキシンの動態を明らかとした。

図 3



本研究では IAA 配糖体化酵素である UGT84B1 を過剰発現させると、IAA 欠乏の表現型を示すが、LC-MS/MS で IAA を定量すると、驚いたことに予想とは反対に、IAA の内生量は増加していた。これは合成された IAA-glucoside は、液胞グルコシダーゼで加水分解をうけて、液胞内で IAA を遊離・蓄積するためと推測された。すなわち、細胞質もしくは小胞体などで生合成された IAA は、UGT84B1 酵素により IAA-glucoside へと不活性化された後、液胞へと輸送されて区画化・貯蔵されることが示唆された。そこで、GFP-UGT84B1 酵素を発現するシロイヌナズナ形質転換体を作製し、その細胞内局在を確認した。さらに、GFP-UGT84B1 酵素を小胞体や核で過剰発現するシロイヌナズナ形質転換体を作製し、その IAA 内生量を定量した。

GH3-DAO-ILR1 経路における各酵素および、IAA-アミノ酸の細胞内局在の解析を行うために、GH3.5, GH3.6 および GH3.17, ILR1 と DAO1 の蛍光タンパク融合酵素を発現するシロイヌナズナの形質転換体を構築した。また、それら形質転換体における各酵素の細胞内局在の解析並びに LC-MS/MS による IAA 代謝物の測定を試みた。その結果、GH3 と DAO1 酵素は細胞質に、ILR1 は小胞体に局在することが確認された。さらに、DAO1 や GH3 酵素に小胞体シグナルを付加して小胞体に局在するようにした変異酵素を、それぞれの欠損変異体に形質転換した変異体を作製した。また、ILR1 酵素の小胞体局在シグナルを欠損させた変異体も作成した。

4. 研究成果

4-1. ILR1 と DAO1 の細胞内局在

DAO1 酸化酵素は、IAA - アミノ酸を、oxIAA-アミノ酸へと酸化代謝する酵素である。最初に DAO1-GFP 融合酵素 (*proDAO1::genomicDAO1-GFP*) を DAO1 プロモーターの制御下で発現するシロイヌナズナ *dao1* 変異体の形質転換体を作製した。この DAO1-GFP 融合酵素の細胞内局在を共焦点顕微鏡により観察したところ、GFP 蛍光像は細胞質に局在する特徴が観察された。さらに *35S::GFP-DAO1* と小胞体局在型 *mRFP-HDEL* の共発現解析すると、両蛍光タンパクの蛍光像は一致しなかったことから、DAO1 は細胞質に局在することが確認できた（図 4）。ILR1-GFP を自身のプロモーターで発現する形質転換体では、ILR1-GFP の蛍光像が小胞体に局在する特徴が確認された。さらに、小胞体局在型 RFP の共発現解析から、ILR1 は小胞体に局在することが明らかとなった（図 4）。また DAO1-RFP と ILR1-GFP 酵素の共発現解析では、両蛍光像が一致しなかったことから、ILR1 と DAO1 の細胞内局在が異なることが明らかになった（図 4）。

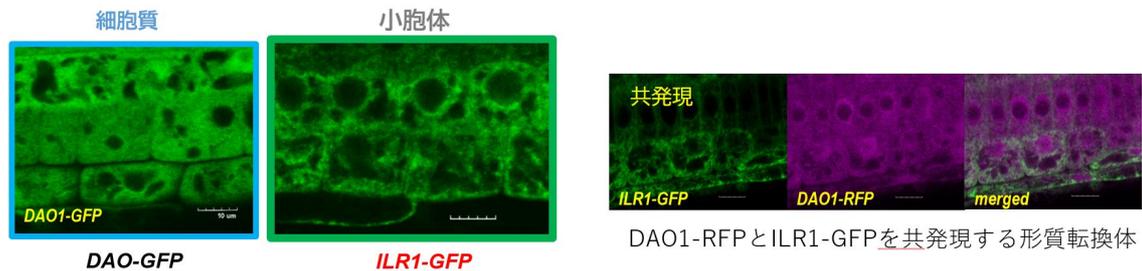


図4. DAO1 と ILR1 の細胞内局在

4-2. 細胞質局在型 DAO1 と小胞体局在型 DAO1 の IAA - アミノ酸に対する応答性

DAO1 酸化酵素の欠失変異体(*dao1*)では, IAA-アミノ酸である IAA-Asp や IAA - Glu が酸化代謝されないため, それら IAA-アミノ酸が顕著に蓄積する。蓄積した IAA-アミノ酸の細胞内局在を明らかにすることで, IAA-アミノ酸がオーキシン貯蔵体として細胞内の貯蔵部位を検討した。DAO1 酸化代謝酵素は, 細胞質に局在すると報告されている。そこで, DAO1 酵素を小胞体と細胞質それぞれに局在させて, 異なるオルガネラにおける IAA - アミノ酸に対する酸化代謝活性を検討した。小胞体 (ER) シグナルを付加した ER 局在型 GFP-DAO1 (ER-DAO1-HDEL) を発現する過剰発現体は, DAO1 (野生型・細胞質局在) と同様に, IAA-アミノ酸である IAA - Asp を酸化代謝して *dao1* 変異体の表現型を相補した。また, 細胞質に局在する GFP-DAO1 も同様に, *dao1* 変異体の表現型を相補した。これらの結果から, DAO1 酵素は, 細胞質と小胞体のいずれでも外生の IAA - アミノ酸を代謝することが示された。次に細胞質型 DAO1 と小胞体型 DAO1 を発現する *dao1* 変異体における IAA-Asp の内生量を LC-MS/MS によって精密定量した。その結果, 小胞体において DAO1 を発現させた場合, IAA-Asp の内生量が最も減少した。また, 細胞質型 DAO1 と小胞体型 DAO1 の両方で酸化代謝された IAA-Asp の内生量は, 元々の *dao1* 変異体の IAA-Asp の総蓄積量以下であり, 代謝されないまま残存していたことから, 一部の IAA-Asp は液胞に局在・蓄積している可能性が示唆された (図5)。

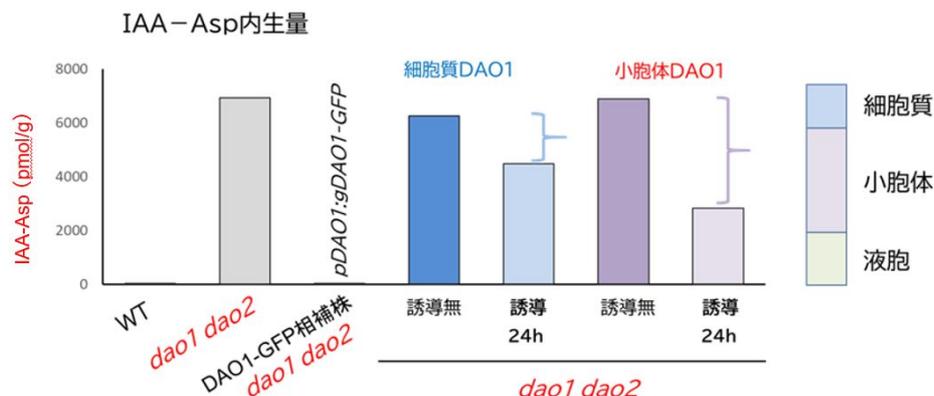


図5. オルガネラ局在型 DAO1 酵素発現体の IAA - アミノ酸の内生量

4-3. 細胞質局在型 ILR1 の IAA - アミノ酸に対する応答性

ILR1 酵素は, IAA - アミノ酸を IAA に再活性化する加水分解酵素である。この酵素のシグナル配列 (23 アミノ酸) と ER 保持シグナル (KDEL) を欠失させた細胞質型 ILR1 を発現する形質転換体と 細胞質型 ILR1 に既知 ER 局在シグナルを付加した小胞体型 ILR1 を発現する形質転換体を作成した。これら形質転換体の IAA - アミノ酸 (IAA-Glu・IAA-Leu) に対する応答性を確認すると, 小胞体型 ILR1 (野生型本来の局在) を発現させた時のみ, IAA-アミノ酸の加水分解により IAA が遊離された表現型 (遊離した IAA による主根伸長抑制と根毛形成促進) が確認された。しかしながら, 細胞質型 ILR1 を発現させても, IAA が遊離された表現型は観察されなかった (図6)。一方, *dao1* 欠損変異体においては, 細胞質型 ILR1 と小胞体型 ILR1 の両方で, IAA-アミノ酸から IAA を遊離した際の表現型が確認された (図6)。このことから, DAO1 は, 細胞質で IAA-アミノ酸を酸化代謝するが, 余剰の IAA-アミノ酸は小胞体に一時的に蓄積された後 IAA に再活性化された後, 受容体のある核に移行して IAA のホメオスタシスに寄与することが示唆された。

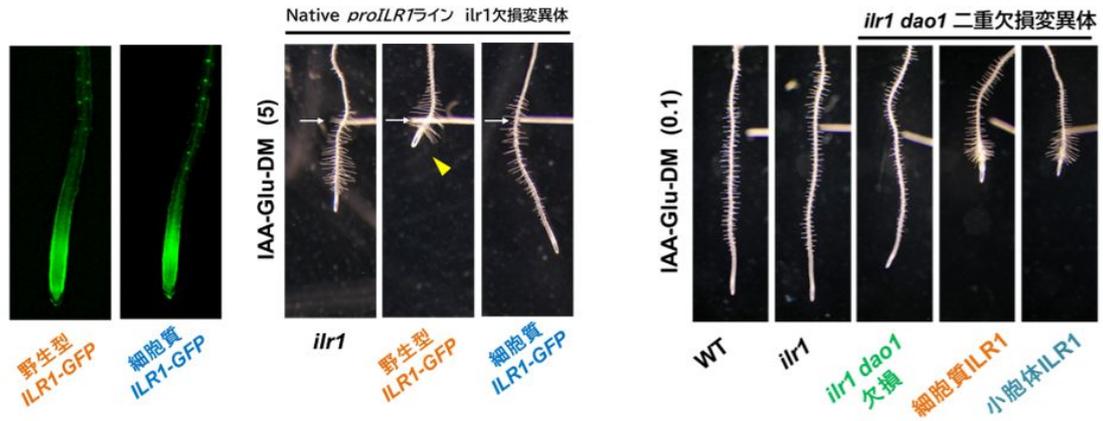


図6. 小胞体 ILR1 と細胞質 ILR1 の IAA - アミノ酸に対する応答性

本研究により，オーキシン貯蔵体の細胞内局在を介したオーキシンホメオスタシスの調節機構のモデルを推測した。分裂組織などで，IAA 濃度が上昇すると，オーキシン応答性 GH3 酵素が直ちに発現誘導されて IAA が不活性化され，IAA - アミノ酸が著しく蓄積する。この時，DAO 酵素で酸化代謝しきれない過剰な IAA-アミノ酸は，主に小胞体に一時貯蔵されると考えられる。その後，小胞体に局在する ILR1/ILL 酵素は，この貯蔵された IAA-アミノ酸をもとに IAA を再生することで，発現誘導された GH3 による極端な IAA 濃度の低下を補償し，分裂組織などで IAA 濃度を維持すると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sigurd Ramans-Harborough, Arnout P Kalverda, Iain W Manfield, Gary S Thompson, Martin Kieffer, Veselina Uzunova, Mussa Quareshy, Justyna M Prusinska, Suruchi Roychoudhry, Ken-Ichiro Hayashi, Richard Napier, Charo Del Genio, Stefan Kepinski	4. 巻 120
2. 論文標題 Intrinsic disorder and conformational coexistence in auxin coreceptors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A .	6. 最初と最後の頁 e2221286120.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2221286120.	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 Qing Wang, Hugues De Gernier, Xingliang Duan, Yuanming Xie, Danny Geelen, Ken-Ishiro Hayashi, Wei Xuan, Markus Geisler, Kirsten Ten Tusscher, Tom Beeckman, Steffen Vanneste	4. 巻 240
2. 論文標題 GH3-mediated auxin inactivation attenuates multiple stages of lateral root development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 1900-1912
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.19284	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 林 謙一郎、笠原博幸	4. 巻 58
2. 論文標題 オーキシンの生合成と不活性化経路 (総説)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 植物の生長調節	6. 最初と最後の頁 8-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Taya K, Takeuchi S, Takahashi M, Hayashi KI, Mikami K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Auxin Regulates Apical Stem Cell Regeneration and Tip Growth in the Marine Red Alga <i>Neopyropia yezoensis</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2652
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11172652.	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 Huang X, Maisch J, Hayashi KI, Nick P.	4. 巻 23
2. 論文標題 Fluorescent Auxin Analogs Report Two Auxin Binding Sites with Different Subcellular Distribution and Affinities: A Cue for Non-Transcriptional Auxin Signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 8593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11172652.	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 Fukui K, Arai K, Tanaka Y, Aoi Y, Kukshal V, Jez JM, Kubes MF, Napier R, Zhao Y, Kasahara H, Hayashi KI.	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 無
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 Negishi T, Kitagawa S, Horii N, Tanaka Y, Haruta N, Sugimoto A, Sawa H, Hayashi KI, Harata M, Kanemaki MT.	4. 巻 220 (2)
2. 論文標題 The auxin-inducible degron 2 (AID2) system enables controlled protein knockdown during embryogenesis and development in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genetics	6. 最初と最後の頁 iyab218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/genetics/iyab218.	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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Ken-ichiro Hayashi*, Kazushi Arai, Masaaki Watahiki, Richard Napier, Yunde Zhao, Kosuke Fukui, Hiroyuki Kasahara
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. (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 原田 実緒、丸山 海成、Yunde Zhao、笠原 博幸、林 謙一郎
2. 発表標題 オーキシンホメオスタシスにおけるUGT76F1配糖体化酵素の機能
3. 学会等名 植物化学調節学会 第58回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 窪津 智彬、丸山 海成、Yunde Zhao、笠原 博幸、林 謙一郎
2. 発表標題 IAA不活性化酵素の細胞内局在解析
3. 学会等名 植物化学調節学会 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 胞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 Ken-ichiro Hayashi
2. 発表標題 Chemical Biology of Indole Derivatives from Plant Hormone to Medicine
3. 学会等名 The 37th Symposium on Natural Products (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 標的細胞・オルガネラへの代謝活性化を利用したオーキシンドリパリー制御系の構築
2. 発表標題 田中佑佳, 江田 智彬, 前田 雅志, 古川 毅, 福井康祐, 三井亮司, 林謙一郎
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第61回講演会(例会)
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