

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22780108  
 研究課題名（和文） 植物のインドール酢酸生合成経路が有する新しい機能に関する研究  
 研究課題名（英文） Dual role of the main auxin biosynthesis pathway in plants  
 研究代表者  
 増口 潔 (MASHIGUCHI KIYOSHI)  
 独立行政法人理化学研究所・生長制御研究グループ・研究員  
 研究者番号：00569725

### 研究成果の概要（和文）：

オーキシンは植物の生長や分化などに重要な植物ホルモンである。本研究では、これまで生理的機能が未知のままであった天然オーキシン、フェニル酢酸（PAA）がインドール-3-酢酸（IAA）生合成経路の律速酵素である YUCCA フラビン含有モノオキシゲナーゼによってフェニルピルビン酸から生合成される事を明らかにした。さらに PAA は IAA 受容体 TIR1/AFB ファミリーに結合することで下流へとシグナルを伝達するが、IAA の極性移動を司るトランスポーターに輸送されないことが明らかとなった。植物が IAA と PAA の2種類のオーキシンを利用して、その生長や分化を制御している可能性が示唆された。

### 研究成果の概要（英文）：

Auxins are a group of phytohormones that regulate many aspects of plant growth and development. Phenylacetic acid (PAA) has been known as a naturally-occurring auxin as well as indole-3-acetic acid (IAA), but its physiological function is still unknown. Here we elucidate that PAA is produced from phenylpyruvate by YUCCA flavin-containing monooxygenases, which catalyze a rate-limiting step in IAA biosynthesis. We further show that PAA is recognized by IAA receptors TIR1/AFBs, whereas not by IAA polar transporters, suggesting that IAA and PAA play different physiological roles in plants.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：植物ホルモン、オーキシン、インドール-3-酢酸、フェニル酢酸、YUCCA

### 1. 研究開始当初の背景

オーキシンは植物の生長や環境応答など様々な局面において中心的な役割を果たす植物ホルモンである。近年、主にモデル植物シロイヌナズナを用いて植物における天然オーキシン、インドール-3-酢酸 (IAA, 図1)

の生合成や代謝、輸送、情報伝達機構に関する研究に著しい進展が見られる。

植物より IAA が単離され約 60 年を経た 2005 年にはシロイヌナズナの IAA 受容体 (TIR1) が同定され、オーキシン情報伝達研究は一つの到達点に達したと考えられる。ま

た、これまで研究が遅れていたオーキシン生合成研究においても、IAA 生合成酵素の候補遺伝子の発見や生合成中間体分析法の確立などを足がかりに、2009 年の時点でシロイヌナズナに4つの生合成経路が存在することが示唆されるに至っていた。

一方、IAA 以外の植物内生の天然オーキシンとしてフェニル酢酸 (PAA, 図 1) や4-クロロ IAA、インドール-3-酪酸が存在することが知られている。オーキシンによる植物の生長制御のメカニズムを包括的に理解するためには、これらの天然オーキシンの生理的な機能を明らかにする必要がある。

今回注目した PAA は様々な植物種に存在することが報告されていたものの、その生合成・代謝、輸送、情報伝達機構についてはこれまで殆ど研究されておらず、生理的な役割は全く未知のままであった。

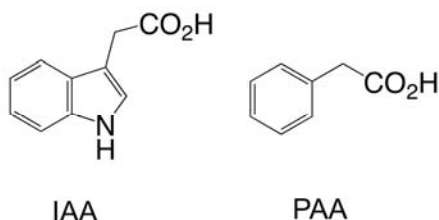


図 1. IAA と PAA

## 2. 研究の目的

PAA の機能解明を最終目標として、以下の2点を具体的な研究目的に設定した。

### (1) PAA 生合成・代謝経路の解明

PAA の主要な生合成・代謝経路を明らかにすることで、PAA 生合成・代謝酵素遺伝子の欠損変異体や過剰発現体の作出が可能となる。内生の PAA 量を自在に増減させた植物体の解析により、PAA の生理機能の推測が可能となる。

### (2) PAA の作用機構の解明

PAA がオーキシン活性を示すという過去の事実は、PAA が IAA 受容体下流の情報伝達系を活性化することを示唆しているものの、その作用機作は明らかにされていない。

## 3. 研究の方法

本研究では、IAA と PAA の化学構造の類似点から、PAA の生合成・代謝や作用機構が IAA のそれらと重複する可能性を検討することを出発点として、以下の項目を実施した。

(1) LC-ESI-MS/MS を用いた PAA 及び PAA の代謝物と想定される PAA アミノ酸結合体の高感度分析法を確立した。

(2) IAA 生合成・代謝酵素遺伝子の過剰発

現植物体及び IAA 生合成酵素遺伝子の欠損変異体を用いて PAA や PAA アミノ酸結合体の定量分析を行い、IAA の生合成経路が PAA 生合成に寄与するか検討した。

(3) YUCCA フラビン含有モノオキシゲナーゼ (YUC) の酵素活性試験系を確立し、YUC ファミリーの基質特異性や反応機構を解析した。

(4) IAA 受容体や情報伝達因子の欠損変異体を用いた PAA 感受性試験や PAA と IAA 受容体との結合試験、マイクロアレイ解析等によって、PAA と IAA の情報伝達経路の相違点もしくは類似点を検討した。

(5) 極性輸送阻害剤を処理した植物体における IAA 及び PAA の挙動を定量分析によって調査し、PAA が IAA 同様に細胞間を極性輸送されるのか解析した。

## 4. 研究成果

(1) 確立した PAA の定量分析法を用いて様々な植物に含まれる PAA と IAA の内生量を調査した。コケ植物を含む全ての植物から PAA が検出され、PAA が植物全般に普遍的に存在する内生オーキシンであることが示された。

(2) IAA 生合成酵素である TAA1 と YUC の一過的な過剰発現植物体を用いて PAA と PAA アミノ酸結合体の定量分析を行った。YUC の過剰発現によって PAA アミノ酸結合体の内生量が大幅に増加したことから、YUC が PAA 生合成に関与することが示唆された (図 2)。さらに IAA-アミノ酸結合体合成酵素 GH3 の一過的な過剰発現植物体において PAA アミノ酸結合体の内生量が大幅に増加した結果から、IAA 同様に PAA が GH3 によってアミノ酸結合体へ代謝されることが明確になった。

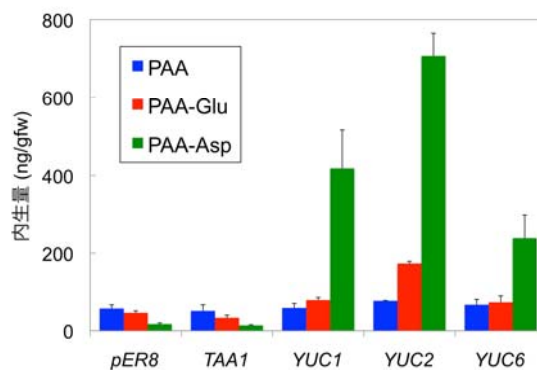


図 2. TAA1 と YUC 過剰発現植物体における PAA と PAA アミノ酸結合体内生量

(3) 本研究に平行して、研究代表者らは TAA1 と YUC による 2 段階の酵素反応によって IAA が Trp から生合成されることを明らかにした。この経路では TAA1 が Trp をインドール-3-ピルビン酸 (IPA) へ変換し、YUC が IPA から IAA への反応を触媒する。

この研究の過程において、YUC の発現及び酵素活性試験系の確立に成功し、YUC (YUC2) が NADPH 依存的に IPA を IAA へ変換することを示した。さらに、YUC2 はフェニルピルビン酸 (PPA) を基質として PAA を合成したことから(図 3)、YUC が IAA と PAA の生合成酵素であることが明らかとなった。

(4) YUC (YUC6) の酵素反応機構の詳細を解析し、YUC が FAD と NADPH を補酵素にして IPA や PPA の酸化脱炭酸反応を触媒するタイプのフラビン含有モノオキシゲナーゼであることを明らかにした。

(5) シロイヌナズナの YUC ファミリー (11 個) のうち系統樹上で異なるグループに属する 5 個の YUC の基質特異性を調査した。全ての YUC が IPA と PPA に高い親和性を示し(図 3)、両者に対する酵素反応速度パラメーターにも大きな違いは認められなかった。

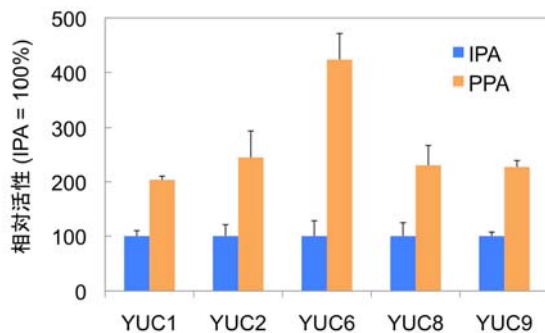


図 3. シロイヌナズナ YUC ファミリーの IPA と PPA に対する基質特異性

(6) シロイヌナズナの IAA 受容体 TIR1/AFB ファミリーの機能喪失変異体を用いて、PAA による根の伸長阻害に対する感受性を評価した。*tir1* 変異体と *tir1afb2* 二重変異体に PAA に対する感受性の大幅な低下が認められた。さらに TIR1 ファミリーの下流で機能する AXR1 の欠損変異体 (*axr1*) でも PAA に対する感受性の低下が認められたことから、PAA は IAA 同様に TIR1/AFB 受容体を介して下流へシグナルを伝達することが示唆された。

(7) DNA マイクロアレイ解析により PAA 独自の情報伝達経路の有無を検討したが、

IAA と PAA の応答性遺伝子に大きな違いは認められなかった。

(8) 極性輸送阻害剤処理したトウモロコシ幼葉鞘を用いて IAA 及び PAA 内生量分析を行い、PAA が IAA と異なり極性輸送されないタイプのオーキシンである事が明らかとなった。

現時点で PAA の生理機能は明確でないものの、本研究によって PAA 作用機構の概要が初めて明らかとなった(図 4)。PAA と IAA には生合成・代謝や情報伝達系に非常に高い重複性がある一方、PAA は PIN タンパク質などの極性輸送体を介したオーキシン作用には関与していない可能性が示された。この輸送機構の違いが生理的にどのような意味があるのか興味深い。

今後、PAA の生合成や代謝経路を完全解明し、内生 PAA 量を変化させた植物体の作出と解析が PAA の生理機能の解明に不可欠であると考えられる。

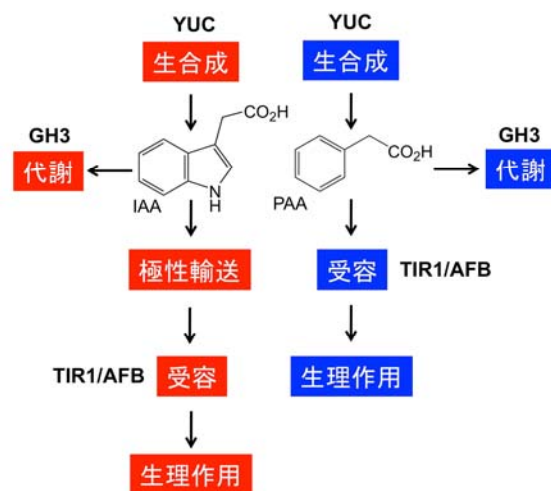


図 4. 本研究で明らかとなった IAA と PAA の作用機構の類似点と相違点

## 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 3 件)

① Dai X, Mashiguchi K, Chen Q, Kasahara H, Kamiya Y, Ojha S, DuBois J, Ballou D, Zhao Y. The biochemical mechanism of auxin biosynthesis by an arabidopsis YUCCA flavin-containing monooxygenase. *J Biol Chem.* 288(3):1448-1457. (2013) 査読有り

② Won C, Shen X, Mashiguchi K, Zheng Z, Dai X, Cheng Y, Kasahara H, Kamiya Y, Chory J,

Zhao Y. Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF ARABIDOPSIS and YUCCAs in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A. 108(45):18518-18523. (2011) 査読有り

③ Mashiguchi K, Tanaka K, Sakai T, Sugawara S, Kawaide H, Natsume M, Hanada A, Yaeno T, Shirasu K, Yao H, McSteen P, Zhao Y, Hayashi K-i, Kamiya Y, Kasahara H. The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A. 108(45):18512-18517. (2011) 査読有り

〔学会発表〕(計 13 件)

① 増口潔, Yunde Zhao, 神谷勇治, 笠原博幸 "オーキシン生合成酵素 YUCCA の生化学的解析" 第 54 回日本植物生理学会年会, 岡山, 2013 年 3 月 21-23 日.

② Mashiguchi K, Zhao Y, Kamiya Y, Kasahara H. "Biochemical characterization of YUCCA flavin monooxygenases in auxin biosynthesis in Arabidopsis." Auxin 2012, Hawaii, USA, Dec. 9-14, 2012

③ Tanaka K, Mashiguchi K, Sugawara S, Hishiyama S, Sakai T, Hanada K, Kinoshita-Tsujimura K, Kakimoto T, Dai X, Kawaide H, Natsume M, Estelle M, Zhao Y, Hayashi K-i, Kamiya Y, Kasahara, H. "Phenylacetic acid is a novel non-polar transport-type auxin in plants." Auxin 2012, Hawaii, USA, Dec. 9-14, 2012

④ 増口潔, 田中慧太, 酒井達也, 菅原聡子, 夏目雅裕, 川出洋, 花田篤志, 林謙一郎, 神谷勇治, 笠原博幸 "TAA と YUC によるインドール-3-酢酸生合成経路の生化学的解析" 第 30 回日本植物細胞分子生物学会. 奈良. 2012 年 8 月 3-5 日

⑤ Mashiguchi K, Tanaka K, Tatsuya S, Sugawara S, Kawaide H, Natsume M, Hanada A, Yaeno T, Shirasu K, Yao H, McSteen P, Zhao Y, Hayashi K-i, Kamiya Y, Kasahara H. "Auxin biosynthesis by TAA and YUCCA families in plants." The 23rd International Conference on Arabidopsis Research (ICAR), Vienna, Austria, Jul. 3-7, 2012

⑥ 増口潔, 田中慧太, 酒井達也, 菅原聡子, 夏目雅裕, 川出洋, 花田篤志, 八丈野孝, 白須賢, Hong Yao, Paula Mcsteeen, Yunde Zhao, 林謙一郎, 神谷勇治, 笠原博幸 "TAA と YUC によるインドール-3-酢酸の生合成" 第 53 回日

本植物生理学会年会, 京都, 2012 年 3 月 16-18 日

⑦ 増口潔, 田中慧太, 酒井達也, 菅原聡子, 夏目雅裕, 川出洋, 花田篤志, 林謙一郎, 神谷勇治, 笠原博幸 "シロイヌナズナのインドール-3-酢酸生合成経路の解明" 植物化学調節学会第 46 回大会, 宇都宮, 2011 年 11 月 1-2 日

⑧ 増口潔, 田中慧太, 酒井達也, 菅原聡子, 夏目雅裕, 川出洋, 花田篤志, 林謙一郎, 神谷勇治, 笠原博幸 "インドール-3-ピルビン酸 (IPA) を介した植物のオーキシン生合成経路の解析" 日本植物学会第 75 回大会, 東京, 2011 年 9 月 17-19 日

⑨ 菅原聡子, 増口潔, 田中慧太, 菱山正二郎, 花田篤志, 川出洋, 夏目雅裕, 酒井達也, 林謙一郎, 神谷勇治, 笠原博幸 "植物におけるフェニル酢酸の生合成および代謝経路の解析" 日本植物学会第 75 回大会, 東京, 2011 年 9 月 17-19 日

⑩ 田中慧太, 増口潔, 酒井達也, 夏目雅裕, 川出洋, 林謙一郎, 神谷勇治, 笠原博幸 "フェニル酢酸のオーキシンシグナル伝達および輸送機構の解析" 日本植物学会第 75 回大会, 東京, 2011 年 9 月 17-19 日

⑪ 増口潔, 菅原聡子, 田中慧太, 軸丸裕介, 花田篤志, 夏目雅裕, 川出洋, 酒井達也, 神谷勇治, 林謙一郎, 笠原博幸 "植物におけるフェニル酢酸生合成経路の解析" 第 52 回日本植物生理学会, 仙台, 2011 年 3 月 20-22 日 (要旨集配布をもって成立)

⑫ 田中慧太, 増口潔, 菅原聡子, 軸丸裕介, 夏目雅裕, 川出洋, 酒井達也, 林謙一郎, 神谷勇治, 笠原博幸. "植物におけるフェニル酢酸の濃度調節機構の解析" 第 52 回日本植物生理学会, 仙台, 2011 年 3 月 20-22 日 (要旨集配布をもって成立)

⑬ Mashiguchi K, Hayashi K, Tanaka K, Sugawara S, Jikumaru Y, Hanada A, Natsume M, Kawaide H, Yunde Z, Kamiya Y, Kasahara H. "Dissection of auxin biosynthesis via indole-3-acetaldehyde in plants." 20th International Conference on Plant Growth Substances (IPGSA), Tarragona, Spain, Jun. 28-Jul. 2, 2010

〔図書〕(計 1 件)

① 笠原博幸, 増口潔, 神谷勇治. 植物のオーキシン生合成主経路の解明: TAA および YUCCA ファミリーによるインドール-3-酢

酸の生合成. 化学と生物. 50(6):394-396.  
(2012)

[その他]

ホームページ等

<http://labs.psc.riken.jp/grrt/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

増口 潔 (MASHIGUCHI KIYOSHI)

独立行政法人理化学研究所・生長制御研究  
グループ・研究員

研究者番号：00569725

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

笠原 博幸 (KASAHARA HIROYUKI)

独立行政法人理化学研究所・生長制御研究  
グループ・上級研究員

田中 慧太 (TANAKA KEITA)

東京農工大学大学院・大学院生/理化学研究  
所研修生

Yunde Zhao

University of California, San Diego・Professor