

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580144

研究課題名(和文)代謝中間体を利用したオーキシン生合成経路の解析

研究課題名(英文)The analysis of auxin biosynthetic pathway using metabolic intermediates

研究代表者

鈴木 優志 (Suzuki, Masashi)

横浜市立大学・付置研究所・その他

研究者番号：30342801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では合成オーキシンやオーキシン生合成阻害剤投与およびオーキシン過剰・欠損変異体を用いることで、短期的・長期的なオーキシン過剰または欠損状態を作りだし、オーキシン生合成のフィードバック制御機構を生合成遺伝子の発現制御と代謝解析により調べた。その結果、主にYUCCAのステップ(オーキシン生合成の律速酵素)でオーキシン量に応じた負のフィードバック制御機構が存在することを明らかにした。このことはオーキシンのホメオスタシスにオーキシンの生合成がYUCCAステップを中心に寄与していることを示している。本研究成果はオーキシン量の調節による発根促進や着果安定などの農業技術の改善に貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：In this research, a feedback regulatory mechanism of auxin biosynthesis has been studied by transcription analysis of auxin biosynthetic genes and metabolic analysis in auxin excess and deficient condition of Arabidopsis seedlings. Auxin excess and deficient conditions were produced by feeding of synthetic auxin and auxin biosynthesis inhibitors to wild type Arabidopsis and by using genetic mutants in auxin biosynthesis. As a result, auxin biosynthesis has been demonstrated to be regulated at the step of YUCCA, a rate-limiting step of auxin biosynthesis, through the negative feedback manner. This suggests that auxin biosynthesis as well as conjugation and degradation contributes to auxin homeostasis. We consider that our results may be useful for agricultural technology such as promotion of rooting and stable fruiting.

研究分野：植物の代謝生理学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：インドールピルビン酸 オーキシン 生合成 阻害剤 フィードバック YUCCA

1. 研究開始当初の背景

オーキシンはダーウィンによって植物の生長を制御するものとしてその概念が提唱された最も古典的な植物ホルモンである。その後、植物ホルモンとして同定された低分子生理活性物質は増え、多くの植物ホルモンにおいてその構造・生理活性・生合成・シグナル伝達等について植物生理学的にも天然物有機化学的にも詳しく調べられている。しかし、1世紀近い努力にも関わらずオーキシンの生合成経路やその制御メカニズムについてはいまだに不明な部分が多い。その原因はこれまでにとられてきた研究手法にもあったと考えられる。多くの植物ホルモンでは生合成に異常が生じホルモン内含量が減少した(あるいは増加した)変異体を単離し、その変異体を分子遺伝学的に解析することで飛躍的に理解が進んだ。オーキシンについても当然のことながら多くの努力がそうしたアプローチに向けられたが、いまだにオーキシン欠損変異体の報告は無い。これはオーキシンが植物にとって欠くべからざる重要度のきわめて高い植物ホルモンであることを反映しており、植物体内でオーキシンレベルを適正に保つフィードバック制御システムが機能していることを示していると考えられる。したがって、オーキシンやその関連物質を植物生長調節物質として用いるためにはフィードバック制御メカニズムを明らかにしなければならない。これまでの研究からオーキシンの生合成には何本もの経路が提唱されており、生合成に関わる酵素も複数の遺伝子によってコードされていることが明らかにされるなど、経路および遺伝子ともに2重3重のリダンダンシーによってオーキシンのホメオスタシスは維持されていることが明らかになりつつある。しかし、代謝中間体と一連の生合成酵素遺伝子がすべて明らかになっている経路はいまだに無く、さまざまな環境下におけるホメオスタシス維持のためにどのようにフィードバックがかかりどの経路が主役を果たすのかというフィードバック制御メカニズムの分子実態についてはわかっていない。申請者らはすでに合成オーキシンの投与により内生オーキシン含量が減少する、つまりフィードバック制御機構が機能していることを見出している。このときの粗酵素抽出液におけるトリプトファンアミノトランスフェラーゼ(オーキシン生合成に関わる酵素の一つ)活性を *in vitro* で調べたが、有意な差は認められなかった。トリプトファンアミノトランスフェラーゼがフィードバック制御のターゲット酵素で無い可能性や粗酵素抽出液を用いたため生体内の反応を正確に反映していない可能性が考えられた。このことがきっかけとなりフィードバック制御機構を *in vivo* で明らかにしようとして着想した。

2. 研究の目的

オーキシンは最も古典的な植物ホルモンであり、植物の正常な発生と生長にはホメオスタシスが維持されることが重要である。そのために植物は複雑な生合成経路を用いて何重にもセイフティロックをかけており、オーキシン欠損変異体が単離出来ないことはこれを裏付けている。したがって、オーキシンやその関連物質を植物生長調節物質として効果的に用いるためには、オーキシンのフィードバック制御メカニズムを理解しておかなければならない。本研究は代謝中間体を利用した代謝化学的手法を用いて、オーキシン生合成がどのようにフィードバック制御されているのかを生合成経路ごとに理解することを目的とする。

申請時には代謝中間体と一連の生合成酵素遺伝子がすべて明らかになっている経路はなかったが、2011年に複数の研究室からインドールピルビン酸(IPyA)を中間体とし、トリプトファンアミノトランスフェラーゼ(TAA)とYUCCAという2段階のステップからなる経路が明らかとなり、シロイヌナズナではこの経路が天然オーキシンであるインドール酢酸(IAA)生合成の主経路であることが報告された。そこで、本研究ではIPyA経路のフィードバック制御機構を明らかにすることを中心に据えた。

3. 研究の方法

(1) IPyA経路のフィードバック制御機構を明らかにするために、オーキシン過剰・欠損環境におけるIPyA経路の酵素をコードする主要遺伝子(トリプトファンアミノトランスフェラーゼ: TAA1とTAA2、YUCCA: YUC1, YUC2, YUC4, YUC6)の発現様式を調べた。オーキシン過剰・欠損環境は野生型シロイヌナズナ芽生えにオーキシン生合成阻害剤および合成オーキシンを投与する短期的実験と、シロイヌナズナオーキシン過剰・欠損変異体を用いることで長期的なオーキシン過剰・欠損環境下でのIPyA経路遺伝子の発現を調べた。また、オーキシン生合成阻害剤および合成オーキシンをプレ処理することでIPyA経路がフィードバック制御された状態を作りだし、そこに代謝中間体であるIPyAを投与してIAAの蓄積にどのような影響が出るかを調べた。

(2) IPyA経路の初発酵素であるトリプトファンアミノトランスフェラーゼの阻害剤AOPPを野生型シロイヌナズナ芽生えに処理し、IAA生合成のさまざまな中間体を投与することで、オーキシン応答性遺伝子の発現と根の伸長及び重力屈性を指標に、オーキシン欠損を最も効率よく回復させる中間体を探索した。

(3) IAA生合成に関する新たな情報の探索のために、新規IAA生合成阻害剤を探索した。

TAA1 の結晶構造を元に indole-3-oxoethylphosphonic acid (IOEP)を合成した。IOEP を野生型シロイヌナズナに投与し、主根伸長・内生 IAA の蓄積量・オーキシン応答性遺伝子の発現に与える影響について調べた。

4. 研究成果

(1) IPyA 経路のフィードバック制御機構を明らかにするために、オーキシン過剰・欠損環境における IPyA 経路の主要遺伝子 (トリプトファンアミノトランスフェラーゼ: *TAA1* と *TAR2*, *YUCCA*: *YUC1*, *YUC2*, *YUC4*, *YUC6*) の発現様式を調べた。

まず、播種後 1 週間のシロイヌナズナ芽生えを合成オーキシンである 10 μ M の NAA や 2,4-D で 3 時間処理をすると、*YUC1*, *YUC2*, *YUC4*, *YUC6* は著しく発現レベルが減少した。一方、*TAA1* と *TAR2* は発現レベルの減少傾向は見られたが *YUC* 遺伝子と比べるとわずかであった。次に TAA の播種後 1 週間のシロイヌナズナ芽生えにオーキシン生合成阻害剤である 30 μ M Kynurenine (Kyn)を 3 時間処理すると *YUC1* と *YUC4* で 2 倍以上の発現上昇が観察された (図 1)。*TAA1*, *TAR2*, *YUC2*,

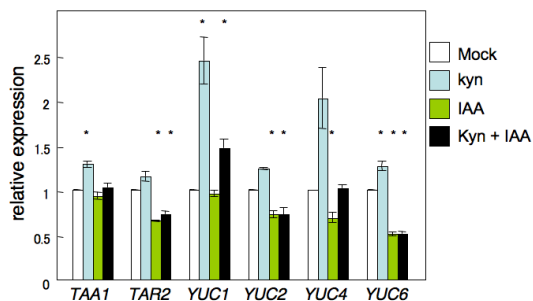


図1 オーキシン生合成阻害剤(Kyn)を処理したシロイヌナズナにおけるオーキシン生合成遺伝子の発現パターン

YUC4 も弱いながら発現上昇が観察された。さらに、阻害剤と 3 μ M IAA の同時処理により、これらの発現上昇はすべて見られなくなった。これらの結果から、IPyA 経路酵素遺伝子の発現はオーキシン量によって負のフィードバック制御を受けていると考えられた。

そこで、この転写制御が内生 IAA の蓄積量に影響を与えているかどうかを調べた。播種後 1 週間のシロイヌナズナ芽生えを合成オーキシンである 10 μ M の NAA や 2,4-D で 3 時間処理をすると、内生 IAA は半分以下に減少した。さらに播種後 1 週間のシロイヌナズナ芽生えを 30 μ M Kyn または 10 μ M 2,4-D でプレ

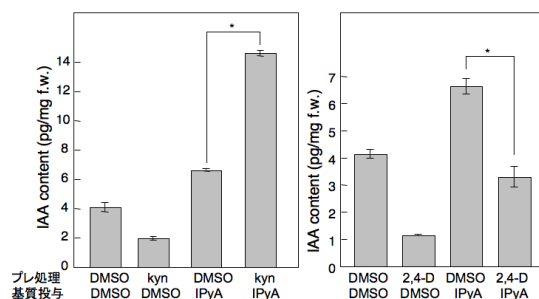


図2 Kyn(左図)または2,4-D(右図)をプレ処理したシロイヌナズナにYUCの基質であるIPyAを投与したときの内生IAA蓄積量

処理をした後に YUC の基質である IPyA を投与した。その結果、Kyn プレ処理後の IPyA 処理区では内生 IAA の蓄積量は IPyA 単独処理区に比べて 2 倍以上に増加した (図 2)。一方、2,4-D プレ処理後の IPyA 処理区では内生 IAA の蓄積量は IPyA 単独処理区に比べて半減していた (図 2)。これらの結果は、Kyn または 2,4-D 処理した時の YUC 遺伝子の発現制御の結果と良く合致しており、IPyA 経路の活性がオーキシンによってフィードバック制御されることを強く示唆している。

さらに、薬剤処理による短期的なオーキシン量の変動だけではなく、オーキシン過剰または欠損環境となる変異体でも IPyA 経路の主要遺伝子の発現パターンを調べた。弱いオーキシン欠損である *wei8-1* 変異体では IPyA 経路の主要遺伝子の発現に大きな変化は見られなかったが、強いオーキシン欠損を示す *wei8-1 tar2-1* 変異体では *YUC1*, *YUC2*, *YUC4* の強い発現上昇が見られた。一方、弱いオーキシン過剰である *YUC1* 過剰発現体では *YUC2*, *YUC4*, *YUC6* の発現がゆるやかに抑えられ、強いオーキシン過剰である *sur1-3* 変異体では *TAR2*, *YUC1*, *YUC2*, *YUC4*, *YUC6* の発現が抑制された。これらの結果から、IPyA 経路酵素遺伝子の発現は短期的だけではなく長期的なオーキシン変動によってもフィードバック制御されていることが示された。

生合成に加えて輸送や分解も含めたオーキシンホメオスタシスのための包括的な代謝バランスの研究を進めることで植物の成長制御機構のよりよい理解に繋がると共に、これらの知見はバイオマス増産や着果制御、発根促進などのさまざまな農業分野に還元されることが期待される。

(2) 多くのインドール化合物が IAA 生合成の代謝中間体として提唱されているが、これらが全て IAA 生合成中間体として機能するかどうかはよくわからない。この可能性を検証するために、IAA 生合成阻害剤である L-aminooxy-phenylpropionic acid (AOPP) を処理したシロイヌナズナ芽生えに 11 種類のインドール化合物を投与して化合物相補試験を試みた。インドール化合物処理 1 時間の短時間処理実験ではオーキシン応答性遺伝子 (*Aux/IAA1* と *Aux/IAA19*) の発現レベルを指標に評価した結果、インドールアセトアルデヒド (IAAld), IPyA, インドールアセトアミド (IAM), インドールアセトニトリル (IAN), インドールアセトアルドオキシム (IAOx), N-ヒドロキシトリプタミン (N-TAM) がオーキシン応答性遺伝子の発現レベルを回復させた。一方、シロイヌナズナ芽生えを AOPP と 4 種のインドール化合物を含む寒天培地に移植し、根の伸長と重力屈性に与える影響でインドール化合物を評価した。短時間処理実験でも相補効果の見られた N-TAM, IAOx に加えて、短時間処理では効果の見られなかったトリプトフォルでも根の伸長と重力屈

性は回復した。一方で、インドールアクリル酸はどちらの試験でも相補効果が見られず、IAA 生合成の中間体である可能性は低いことが示された(雑誌論文)。

(3) 新規オーキシン生合成阻害剤を探索する目的で、TAA1 の結晶構造を元に indole-3-oxoethylphosphonic acid (IOEP) を合成した。この化合物を含む寒天培地でシロイヌナズナ野生型を育てると、シロイヌナズナは矮化した。発芽後 1 週間のシロイヌナズナに IOEP を 3 時間投与すると内生 IAA 蓄積量は減少し、IOEP が植物体内でオーキシン生合成阻害剤として機能する可能性が示唆された。しかし、IOEP は TAA1 を *in vitro* の酵素アッセイで阻害できなかった。さらに、オーキシン応答性遺伝子の発現を指標としてオーキシン生合成中間体が IOEP による阻害を化合物相補できるかを調べた結果、IPyA と IAOx は相補できなかった。これらの結果は IOEP による阻害部位が IPyA や IAOx の下流に存在する可能性を示している。IOEP による阻害は IAA の同時処理で完全には回復しないので IAA 生合成以外の副作用があることも考えられる。IOEP を元にした化合物デザインにより、特異性が高く新規な阻害部位を持つオーキシン生合成阻害剤の開発が期待できると考えている(雑誌論文)。

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 2 件)

Ishida Y, Hayashi K, Soeno K, Asami T, Nakamura S, Suzuki M, Nakamura A, Shimada Y Analysis of a putative auxin biosynthesis inhibitor, indole-3-oxoethylphosphonic acid, in Arabidopsis. *Bioscience, Biochemistry and Biotechnology* 査読有り 78 巻、2014 年、67-70. DOI: 10.1080/09168451.2014.877183
Ishida Y, Nakamura A, Mitani Y, Suzuki M, Soeno K, Asami T, Shimada Y Comparison of indole derivatives as potential intermediates of auxin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Biotechnology* 査読有り 30 巻、2013 年、185-190. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.13.0128c

[学会発表](計 12 件)

鈴木優志、山崎千秋、三井麻利江、筧雄介、三谷由佳、中村郁子、石井貴広、添野和雄、嶋田幸久 インドールピルビン酸を経由するオーキシン生合成のフィードバック制御がオーキシンホメオスタシス維持に重要である、第 55 回日本植物生理学会、2014 年 3 月 18-20 日、富山
三井麻利江、石田遥介、鈴木優志、筧雄

介、持田恵一、藤岡昭三、中村郁子、嶋田幸久 オーキシン生合成酵素遺伝子 YUCCA のフィードバック発現機構の解析、第 55 回日本植物生理学会、2014 年 3 月 18-20 日、富山

鈴木優志、山崎千秋、三井麻利江、三谷由佳、中村郁子、添野和雄、嶋田幸久 シロイヌナズナのオーキシンホメオスタシスには YUCCA のフィードバック制御が重要である、植物化学調節学会第 48 回大会、2013 年 10 月 31 日-11 月 1 日、新潟

山崎千秋、石井貴広、国土祐未子、添野和雄、佐藤明子、鈴木優志、嶋田幸久 新型オーキシン生合成阻害剤、YUCCA 阻害剤の発見、植物化学調節学会第 48 回大会、2013 年 10 月 31 日-11 月 1 日、新潟

山崎千秋、佐藤明子、谷川友栄、三井麻利江、鈴木優志、国土祐未子、石井貴広、添野和雄、嶋田幸久 YUCCA を標的とする新型オーキシン生合成阻害剤の開発、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 24-28 日、仙台

鈴木優志、三井麻利江、嶋田幸久 種子の重量制御に関わるシトクロム P450、第 54 回日本植物生理学会、2013 年 3 月 21-23 日、岡山

山崎千秋、佐藤明子、谷川友栄、三井麻利江、鈴木優志、国土祐未子、石井貴広、添野和雄、嶋田幸久 オーキシン生合成酵素 YUCCA 阻害剤の発見とその生理作用、第 54 回日本植物生理学会、2013 年 3 月 21-23 日、岡山

石田遥介、中村郁子、鈴木優志、筧雄介、橋本恵、近藤陽一、松井南、豊岡公德、林謙一郎、浅見忠男、嶋田幸久 オーキシンのシグナルを抑制するシロイヌナズナ Dof 型転写因子の解析、第 54 回日本植物生理学会、2013 年 3 月 21-23 日、岡山

Ishida Y, Nakamura A, Suzuki M, Kakei Y, Kondou Y, Matsui M, Toyooka K, Hayashi K, Asami T, Shimada Y Characterization of a Dof-type transcription factor, which plays a negative role in auxin signaling in Arabidopsis root elongation. *AUXIN2012, Hawaii, USA, December 9-14, 2012*

鈴木優志、嶋田幸久 種子の重量制御に関わるシトクロム P450、第 25 回植物脂質シンポジウム、2012 年 11 月 30 日-12 月 1 日、神戸

鈴木優志、三谷由佳、添野和雄、嶋田幸久 オーキシン生合成制御機構の探索、第 53 回日本植物生理学会、2012 年 3 月 16-18 日、京都

石田遥介、中村郁子、鈴木優志、浅見忠男、嶋田幸久 シロイヌナズナ Dof 型転写因子 AtDof3.2 の機能解析、第 53 回日本植物生理学会、2012 年 3 月 16-18 日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 優志 (SUZUKI, Masashi)
横浜市立大学・木原生物学研究所・特任助
教
研究者番号：30342801

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
嶋田 幸久 (SHIMADA, Yukihiisa)
横浜市立大学・木原生物学研究所・教授
研究者番号：30300875