

# 研究報告書

## 「オーキシンによる植物の器官形成制御技術の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研究者: 笠原 博幸

### 1. 研究のねらい

オーキシンは植物の器官形成を制御する非常に重要な植物ホルモンである。その研究をもとに、これまでに数多くの合成オーキシンが開発され、着果・肥大促進剤、着根剤、除草剤などとして農業で広く利用されてきた。オーキシンを投与する時期や部位、量を適度に調節することにより器官サイズを増加させて作物やバイオマスを増産できることから、二酸化炭素資源化におけるオーキシンの利用価値は高い。近年、オオムギなどの主要作物で温暖化による高温障害(雄性不稔)が大きな問題になっているが、雄蕊の形成初期にオーキシンを散布してその成長を回復させることにより、高温条件下でも高い稔実率を維持できることが報告された。また、綿花の胚の表皮細胞でアグロバクテリウムのオーキシン生合成遺伝子(*iaaM*)を発現させて胚珠成長期にオーキシンの内生量を増加させると、綿花を増産できることが報告された。これらは、様々な器官の形成期にオーキシン生合成量を適度に調節することにより、高温ストレスに強い作物の開発や、作物およびバイオマスの増産が可能であることを示唆している。

植物のオーキシンの生合成経路は60年以上にわたり不明であったが、私たちは天然オーキシンのインドール-3-酢酸(IAA)が主にトリプトファンアミノ基転移酵素(TAA1)とフラビン含有モノオキシゲナーゼ(YUCCA)により合成されていることを明らかにした。また、シロイヌナズナにはシトクローム P450 モノオキシゲナーゼ(CYP79B)により別経路からも IAA が合成されていることを示した。さらに、私たちは天然オーキシンのフェニル酢酸(PAA)が植物においてオーキシン極性輸送とは異なる仕組みで細胞間を移動するユニークな性質をもつことを発見した。本研究では、このユニークな性質をもつ PAA の作用機構と生理的役割を解明し、その機能を器官形成制御に利用することを目指した。さらに、小穂で IAA や PAA の生合成量を制御することにより、高温ストレス下でも雄蕊を形成して高い稔実性を維持できるオオムギの開発に取り組んだ。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

天然オーキシンである PAA の生理機能を明らかにするためその作用機構を解析した。PAA は IAA と同様に非維管束植物を含む様々な植物に存在し、IAA よりオーキシン活性は低いですが、シロイヌナズナのほぼ全ての器官で IAA より内生量が多いことが分かった。PAA の生合成には IAA の生合成と同様に YUCCA が、PAA の不活化にも IAA 不活化酵素である GH3 が関与する可能性が高い。また、シロイヌナズナには CYP79A2 の関与する PAA 生合成経路も存在することが示唆された。植物における IAA と PAA の輸送機構は異なり、IAA はオーキシン極性輸送により濃度調節されるが、PAA はこれと異なる機構で制御されていることが判明した。PAA は IAA と同じく TIR1/AFB 経路でオーキシン早期応答遺伝子を制御するが、これら2つのオーキシンが制御する遺伝子には差があり、多くの機能未知遺伝子が PAA 特異

的に誘導されることが明らかになった。これらの結果、PAA は植物界に広く存在するオーキシ  
ンで、IAA と協調的に植物の成長や分化の制御に関与する可能性のあることが示された(論  
文投稿中)。

本研究で新たに同定した PAA 生合成遺伝子や、これまでに植物や微生物から発見された  
IAA 生合成遺伝子を利用し、高温ストレス下でも小穂でこれらの遺伝子を発現誘導すること  
により高い稔実性を維持できるオオムギの開発を進めた。高温ストレスは小穂の IAA 量を著しく  
減少させるが、このとき複数のオーキシン生合成遺伝子の発現が抑制されていた。一方、オ  
ーキシン代謝遺伝子の発現には変化が見られないことから、高温ストレスが原因で生じる  
IAA 量の減少は主として生合成の低下によるものと考えられた。これまでに、異なるオーキシ  
ン生合成経路の2つの遺伝子(YUCCA2、*iaaM*)をそれぞれ導入した遺伝子組換えオオムギ  
の作成に成功しており、今後、これらを使って高温ストレス下でもオーキシン量を増加できる  
生合成遺伝子の選定を進める。また、高温ストレスにより小穂で発現誘導される遺伝子を複  
数同定していることから、これらの遺伝子のプロモーターを使ってオーキシン生合成遺伝子を  
オオムギに発現させて高温障害耐性を試験する予定である。

## (2) 詳細

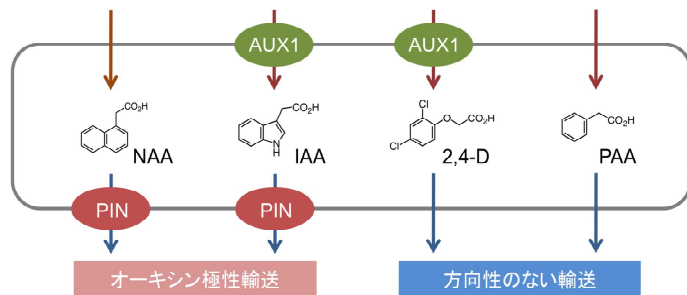
### 研究テーマ①「天然オーキシン PAA の作用機構および生理的役割の解明」

PAA の作用機構や生理的役割を解明するために、まず植物界における PAA の分布を質量  
分析法により調べたところ、非維管束植物を含む様々な植物から検出され、PAA が植物界に  
広く存在する天然オーキシンであることが示された。また、PAA のオーキシン活性はシロイヌ  
ナズナの側根形成促進作用において IAA よりも 10 倍程度低いが、殆どの器官で PAA の方  
が IAA よりも内生量が多いことが分かった。

PAA 生合成経路について解析したところ、IAA 生合成に含まれる数種の YUCCA 遺伝子を  
シロイヌナズナで高発現させると、PAA 量は変化しないが、その代謝物である PAA-アミノ酸  
結合体が顕著に増加した。また、大腸菌で調製した YUCCA6 タンパク質を使って酵素活性を  
調べたところ、フェニルピルビン酸(PPA)から PAA を生成した(Dai & Mashiguchi et al.  
2013)。従って、植物の PAA 生合成には YUCCA が関与していることが強く示唆された。ま  
た、フェニルアセトアルドキシム(PAOx)を生成する CYP79A2 をシロイヌナズナで高発現させ  
ると PAA と PAA-アミノ酸結合体の量が増加したことから、PAOx を介した PAA 生合成経路も  
同植物に存在することが示唆された。IAA から IAA-アミノ酸結合体を生成する GH3 ファミリー  
のひとつ GH3.9 の遺伝子をシロイヌナズナで高発現させると、IAA-グルタミン酸結合体と  
PAA-グルタミン酸結合体の量が著しく増加した。よって、PAA の生合成だけでなく、その不活  
化にも IAA と同じ代謝酵素が関与することが示唆された。

植物の軸器官における IAA の濃度分布はオーキシン輸送阻害剤(NPA)や重力刺激によっ  
て変動する。そこで、NPA や重力刺激が PAA の濃度分布に与える影響をトウモロコシ黄化芽  
生えの幼葉鞘を使って解析した。その結果、先端部への NPA 処理により基部方向へのオー  
キシン極性輸送が阻害されるため、IAA 量は先端部で増加し、反対に基部側で減少したが、  
PAA の濃度分布パターンにはこのような変化が見られなかった。また、横方向から重力刺激  
を与えることによって IAA 量は重力側で急速に増加し、その反対側で減少したが、PAA の濃

度分布パターンには変化がなかった。さらに、オーキシン生合成が低下したために根の形成異常を示すシロイヌナズナの *yucca3,5,7,8,9* 欠損変異体 (*yucQ*) に IAA と PAA をそれぞれ投与すると、IAA は根の形態を回復できるが、PAA は根の重力屈性を回復できないことが明らかになった。これらの結果、植物における IAA と PAA の移動特性は異なり、IAA はオーキシン極性輸送により調節されるが、PAA はこれと異なる方向性のない輸送機構で制御されていると考えられた。興味深いことに、*yucQ* の回復実験において合成オーキシンの 1-ナフトレン酢酸 (NAA) は IAA と同様に根の形態を回復したが、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) は PAA と同じく重力屈性を回復することができなかったことから、強力な除草剤として古くから利用されてきた 2,4-D は IAA ではなく PAA と似た移動特性をもつ合成オーキシンであることが明らかになった(右図)。



天然および合成オーキシンの輸送機構

PAA のシグナル伝達機構を解析したところ、PAA がシロイヌナズナにおいてオーキシン誘導性プロモーターDR5:GUS の発現を誘導し、またオーキシン受容体 TIR1/AFB の阻害剤である auxinole の共処理によりその発現が抑制されたことから、TIR1/AFB を介してシグナル伝達することが示唆された。酵母ツーハイブリッド系により TIR1/AFB-Aux/IAA 複合体の形成を調べたところ、IAA よりも 10 倍ほど活性は低いが、PAA が様々な組み合わせの複合体の形成を促進することが明らかになった。また、プルダウン法によっても PAA が TIR1/AFB と Aux/IAA の結合を促進することが示された。これらの結果、PAA は IAA と同じ TIR1/AFB 経路でシグナル伝達することが明らかになった。

PAA の生理的役割を明らかにするため、シロイヌナズナの IAA および PAA 早期応答遺伝子をマイクロアレイにて解析した。PAA は IAA と同様に *Aux/IAA* や *GH3* など多くのオーキシン早期応答遺伝子を誘導したが、PAA 特異的に応答する遺伝子も多数存在することが明らかになった。また PAA 特異的に応答する遺伝子には機能未知タンパク質をコードするものが多数含まれていた。以上の結果から、IAA と PAA の2種類のオーキシンが植物界に広く存在し、PAA も植物の成長や分化の制御において重要な役割をもつ可能性を示した(現在投稿中)。現在、PAA の生理的役割を解明するため、PAA 特異的に応答する遺伝子の機能解析を進めている。また、PAA を選択的に不活化して欠損させることのできる代謝酵素を、酵母による代謝活性スクリーニング法 (Tanaka et al. 2014) により探索している。

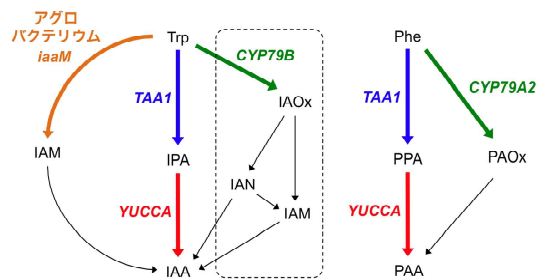
## 研究テーマ②「小穂における高温ストレス誘導的なオーキシン生合成遺伝子の発現制御および高温障害耐性オオムギの開発」

オオムギが雄蕊の形成初期に高温ストレスを受けると、オーキシンが減少して雄性不稔を生じることが高温障害の原因のひとつとして示されている。そこで植物や微生物から発見された IAA および PAA の生合成遺伝子をオオムギに導入し、高温ストレスを受けた時に小穂で高発現させてオーキシン量を維持できるオオムギの作出を目標に研究を進めた。

オオムギ(はるな二条)を使った実験系を確立し、高温ストレスによる小穂のオーキシン量への影響を調べたところ、小穂の IAA 内生量が顕著に減少することが質量分析法により確認された。このとき小穂で発現する主なオーキシン生合成遺伝子の発現量を解析したところ、TAA および YUCCA ファミリーの発現量が著しく減少した。一方、オーキシン不活化酵素をコードする GH3 ファミリーの発現量には有意な差が認められなかった。よって、高温ストレスによる小穂のオーキシンの減少は生合成の低下による影響が大きいことが示唆された。

次に、高温ストレスを受けた時に小穂で高発現する遺伝子をマイクロアレイの解析データをもとに選抜した。高温ストレスで誘導される auxin-repressed protein などの遺伝子を定量 PCR 解析し、小穂で高温により 1.5 倍から 10 倍ほど発現が誘導される9遺伝子を同定した。小穂でオーキシン生合成遺伝子を発現誘導させる時に利用するために、このうち3遺伝子のプロモーター領域のクローニングを進めている。

植物で高発現させることによりオーキシン内生量を増加することができるオーキシン生合成遺伝子は YUCCA、CYP79B2、CYP79A2、*iaaM* の4遺伝子である(右図)。YUCCA はオーキシン生合成主経路の律速酵素であるが、高温ストレスにより上流の TAA1 ホモログの発現が低下することからオーキシンの生合成に必要な中間体(IPA)の量が減少すると予想され、オオムギで高発現させてもオーキシン量を増加できない可能性がある。



シロイヌナズナおよびアグロバクテリウムのオーキシン生合成経路。黒字はオーキシン生合成中間体、黒矢印はオオムギで未同定の酵素反応ステップ。点線内はシロイヌナズナに存在するアブラナ科固有の経路。

一方、CYP79B2、CYP79A2、*iaaM* はそれぞれの生合成経路の第一段階を触媒する酵素であり、オオムギにおいて残りの生合成酵素が機能しているかについてはまだ確認されていない。そこで、エストラジオール誘導型発現系を用いてこれらの生合成遺伝子をオオムギで発現させ、高温ストレス条件下でもオーキシン量を有意に増加させることができる遺伝子を選抜する計画を立てていた。しかし、オオムギの形質転換は当初予想していたよりも非常に難しく、単独では遺伝子の導入に成功できず、研究計画が遅れることとなった。そこで、岡山大学の佐藤和広教授ならびに久野裕博士のご協力を得て、共同研究によりオオムギの形質転換を行って頂いた結果、これまでに YUCCA2 と *iaaM* の遺伝子組換え体を得ることに成功した。今後、これら遺伝子組換えオオムギ系統を使って、高温ストレス条件下でもオーキシンを増加できる生合成遺伝子の選定を進める。また、このオーキシン生合成遺伝子を高温誘導遺伝子のプロモーターを使って小穂で発現させてオオムギの高温障害耐性を調べる。

### 3. 今後の展開

本研究成果は、極性輸送とは異なる機構で調節されるオーキシンの分布、生合成機構、不活化機構、シグナル伝達機構、早期応答遺伝子の解明により、このオーキシンが植物の成長や環境応答の制御に関与する新たな可能性を示した。今後、植物における PAA と IAA の生理的役割の違いを明らかにしたい。さらに、強力な除草剤として古くから用いられてきた合成オーキシン 2,4-D と似た移動特性を PAA がもつことから、PAA の移動の仕組みを分子レベルで解明し、新たな植物成長調整剤などの開発研究に繋げたい。また、オオムギの小穂におけるオーキシン生



合成量を制御することにより、高温ストレス下での生殖器官の形成を正常に保ち、様々な農作物に高温ストレス耐性を獲得させる技術の開発に今後も取り組みたいと考えている。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

本研究の主たる成果は、極性輸送とは異なる機構で調節されるオーキシンの分布、生合成機構、不活化機構、シグナル伝達機構、早期応答遺伝子の解明により、このオーキシンが植物の成長や環境応答の制御に関与する新たな可能性を示したことである。本研究においては、研究費で導入した質量分析装置などの分析機器を駆使して微量の代謝物の同定や定量を行い、オーキシンの新たな生合成・不活化経路を解明した。強力な除草剤として古くから使われてきた合成オーキシンと似た移動特性をもつ天然オーキシンを発見したことは、今後、作物やバイオマスの増産に向けた新たな植物成長調整剤の開発に繋がる可能性が期待できる。一方、当初の計画通りにオオムギの形質転換実験が進まず、研究計画に遅れを生じたことが反省点として挙げられる。このさきがけ期間に学際分野の様々な研究者と交流し、共同研究をする機会を得られたことは、自身にとって非常に大きな価値があった。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

これまでに知られていた主要なオーキシン(インドール酢酸)とは別の、極性輸送されないタイプのオーキシン(フェニル酢酸)について、その生合成や生理機能を明らかにし、これらの生合成遺伝子の導入により、不良環境耐性、特にオオムギの高温不稔現象を回避する機能を付与しようと研究が進められた。これまでに、フェニル酢酸の生合成系を明らかにするなど、基礎的な研究は進展し、研究者としての高い評価を得、今後のフェニル酢酸の植物ホルモンとしての研究を進展させる駆動力になったといえる。現時点では、フェニル酢酸とインドール酢酸の生合成系の共通性も影響して、両ホルモンの植物における使い分けの機構や、フェニル酢酸の独自の生理機能を明確に示すことはできず、形質転換系の確立の遅れから、形質転換植物が得られたもののオオムギへの高温耐性の付与についての明確な結論も未だ得られていない。目標が明確で期待が大きい研究ではあったので、今後も本研究を継続して目標を達成して欲しい。

これまでに新オーキシン活用の基盤的な知見は得ているので、今後、研究を継続する中で、新オーキシン活用による植物の生長制御技術を開発することが期待される。特に、現在進行中のオオムギの形質転換実験の成果は注目に値する。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 論文(原著論文)発表

1. Xinhua Dai, Kiyoshi Mashiguchi, Qingguo Chen, Hiroyuki Kasahara, Yuji Kamiya, Sunil Ojha, Jennifer Dubois, David Ballou, Yunde Zhao. The biochemical

mechanism of auxin biosynthesis by an Arabidopsis YUCCA flavin-containing monooxygenase. *J. Biol. Chem.*, 2013, 288, 1448-57.

2. Keita Tanaka, Ken-ichiro Hayashi, Masahiro Natsume, Yuji Kamiya, Hitoshi Sakakibara, Hiroshi Kawaide, Hiroyuki Kasahara. UGT74D1 catalyzes the glucosylation of 2-oxindole-3-acetic acid in the auxin metabolic pathway in *Arabidopsis*, *Plant Cell Physiol.*, 2014, 55: 218-28.

3. Qingguo Chen, Xinhua Dai, Henrique De-Paoli, Youfa Cheng, Yumiko Takebayashi, Hiroyuki Kasahara, Yuji Kamiya, Yunde Zhao. Auxin Overproduction in Shoots Cannot Rescue Auxin Deficiencies in Arabidopsis Roots, *Plant Cell Physiol.*, 2014, 55: 1072-9.

## (2)特許出願

研究期間累積件数:0件

## (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

### <招待講演>

1. 笠原 博幸、植物の多様なオーキシン生合成・不活性化機構、第51回植物化学シンポジウム、仙台、2014.
2. Hiroyuki Kasahara. Indole-3-acetic acid and phenylacetic acid are two natural auxins in plants with distinct transport characteristics. Plant Growth Regulation Society of America (PGRSA) and the Japanese Society for the Chemical Regulation of Plants (JSCRCP) joint meeting. San Francisco, USA, 2014.
3. 笠原 博幸、オーキシン生合成とフラビンモノオキシゲナーゼ、日本植物生理学会年会シンポジウム、岡山、2013.
4. Hiroyuki Kasahara. Discovery of a novel nonpolar transport-type auxin in plants. Auxin 2012. Hawaii, USA, 2012.
5. 笠原 博幸、オーキシン：その生合成経路の解明と今後の展開、第27回農薬デザイン研究会(日本農薬学会主催)、東京、2012.
6. Hiroyuki Kasahara. The main auxin biosynthesis pathway in plants. 第53回日本植物生理学会年会シンポジウム、京都、2012.

### <受賞>

笠原 博幸、第9回(平成24年度)日本学術振興会賞「植物におけるオーキシン生合成主経路の解明」

### <TV出演>

笠原 博幸、BSジャパン、咲くシーズン「植物が創り出す未来(笠原博幸)」、2013.

### <新聞記事>

笠原 博幸、読売新聞「駆ける」、2015.