ミニレビュー

移動特性が異なる2種類の天然オーキシンの作用機構[#]

笠原 博幸^{1,2,*}

¹東京農工大・グローバルイノベーション研究院

²理研・CSRS

(2016年11月21日受理)

Action mechanism of two naturally occurring auxins in plants with distinct transport characteristics

Hiroyuki KASAHARA^{1,2}

¹ Institute of Global Innovation Research, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183-8509, Japan

² RIKEN Center for Sustainable Resource Science, Tsurumi-ku, Yokohama 230-0045, Japan

Keywords: auxin, indole-3-acetic acid, phenylacetic acid, plant hormone, polar transport.

はじめに

オーキシンは植物の成長や分化を調節する非常に重要な植物ホルモンである。最初に生物から発見されたオーキシンはインドール-3-酢酸 (IAA) であり, この IAA を中心にオーキシンの生理機能や作用機構が研究されてきた (図1)。植物において IAA は主にトリプトファン (Trp) からインドール-3-ピルビン酸 (IPA) を経由して2段階で合成される¹⁾。この IPA 経路に含まれるトリプトファンアミノトランスフェラーゼ (TAA) とフラビン含有モノオキシゲナーゼ (YUCCA) をコードする遺伝子は陸上植物に広く存在し, 植物のさまざまな形態形成や環境応答の調節に関わる。また, シロイヌナズナには IPA 経路のほかにシトクローム P450 (CYP79B) に触媒されるアブラナ科固有の IAA 生合成経路も存在し, これは補助的な役割を果たすと考えられ

ている¹⁾。IAA はオーキシン排出輸送体 (PIN) や取り込み輸送体 (AUX1/LAX), B 型 ABC 輸送体 (ABCB) により細胞間を輸送されており, 特に PIN が極性輸送によるオーキシン濃度勾配の形成に重要だと考えられている²⁾。IAA は核内のオーキシン受容体 (TIR1/AFB) と転写抑制因子 (Aux/IAA) を結合させ, SCF^{TIR1/AFB} ユビキチン-E3 リガーゼ複合体による Aux/IAA のポリユビキチン化を促進する。26S-プロテアソームがポリユビキチン化された Aux/IAA を分解すると, オーキシン応答因子 (ARF) が活性化されて, さまざまなオーキシン応答遺伝子の転写が開始される³⁾。IAA の代謝調節においては, オーキシン酸化酵素 (DAO) と IAA-アミノ酸結合体合成酵素 (GH3) の2つの不活化経路が重要な役割を担うことが示されている⁴⁾。また, UDP-グルコシルトランスフェラーゼ (UGT) や IAA-メチル化酵素 (IAMT1) などさまざまな代謝酵素がオーキシンの代謝調節に関与している⁵⁾。このように植物における IAA の生合成, 輸送, 情報伝達として不活性化の分子機構がこれまでに明らかになってきた。

一方, 植物には IAA と異なる化学構造を持つフェニル酢酸 (PAA) も天然オーキシンの一種として存在することが古

[#] 第41回大会シンポジウムを取りまとめた解説。

* 〒183-8509 東京都府中市幸町3-5-8

E-mail: kasahara@go.tuat.ac.jp

© 日本農薬学会

図1. 植物におけるオーキシンの作用機構.

くから知られている (図1). 1935年, Haagen-SmitとWentは3種類の生物検定法を使ってさまざまな化合物のオーキシン活性を比較し, IAAより活性は弱いものの, PAAがオーキシン作用をもつことを最初に示した⁶⁾. その後, PAAは複数の高等植物から単離されて, 天然オーキシンの一種であることが示された⁷⁾. さらに, 植物の軸切片に標識化したPAAを与えると, IAAと異なり極性移動しないことが明らかになった⁸⁾. また, 高濃度のPAAを処理するとIAAの極性移動が阻害されたことから, PAAはIAAの極性移動や細胞内蓄積量を調節することにより間接的に植物の成長制御に関与するのではないかという仮説も提唱された⁹⁾. このように, 外部から与えたPAAが, IAAとは異なる移動特性を示すことが報告されていたにもかかわらず, 植物におけるPAAのオーキシンとしての役割や作用機構についてはほとんど研究が進んでいなかった¹⁰⁾. 本稿では, 植物におけるオーキシンとしてのPAAの作用機構について紹介する.

1. PAAは陸上植物に広く存在するオーキシン

PAAの植物界における分布について, 液体クロマトグラフィー・タンデム型質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いて調べると, ゼニゴケなどのコケ植物を含むさまざまな陸上植物に存在し, また分析した植物ではIAAに比べてPAAの内生量の方がいずれも多いことがわかった (表1). 興味深いことに, 発芽1週間後のオオムギやエンバクの実生では, シュート (地上部) にIAAの100倍以上のPAAが含まれていた. シロイヌナズナでは分析したすべての器官からPAAとIAAが検出され, 特に花芽, 根, 乾燥種子にPAAが多く含まれていた (図2). これらの結果, PAAが植物の成長や分化の

表1. さまざまな陸上植物におけるオーキシン内生量 (pmol/g生重量)

	IAA	PAA
シロイヌナズナ	49 ± 2	413 ± 15
エンバク (シュート)	31 ± 2	3860 ± 220
オオムギ (シュート)	30 ± 2	4353 ± 353
ヒメツリガネゴケ	14 ± 4	1049 ± 278
ゼニゴケ	74 ± 10	469 ± 103

図2. シロイヌナズナのさまざまな器官におけるオーキシン内生量 (pmol/g生重量). Sugawara et al.¹⁰⁾ を一部改訂. 図3. シロイヌナズナにおけるIAAとPAAの側根形成促進作用. Sugawara et al.¹⁰⁾ を一部改訂.

制御に関係している可能性が示唆された.

次に, シロイヌナズナの側根形成促進作用を指標にPAAのオーキシン作用を調べたところ, IAAに比べると1/10程度と弱いものの明確にこの作用が見られた (図3). また, ヒメツリガネゴケの茎葉体に処理すると, PAAは合成オーキシンの一種である2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) と似た成長促進作用を示した¹⁰⁾. これらの結果から, PAAのオーキシン作用は植物進化の早期から維持されていることが示唆された.

2. PAAはTIR1/AFB経路を介してオーキシン作用を示す

PAAとIAAの作用機構を比較するため, シロイヌナズナのオーキシン応答性DR5プロモーター: GUS系統を使った

図4. 酵母ツーハイブリッド法によるPAA依存的なTIR1/AFB-Aux/IAA相互作用の解析. GAL4タンパク質のDNA結合ドメイン (DBD) と融合させたシロイヌナズナのオーキシン受容体 (TIR1/AFB2/AFB5) と, GAL4タンパク質のアクティベータドメイン (AD) と融合させたAux/IAA転写抑制因子 (IAA3ほか) をさまざまな組み合わせで酵母に発現させ, オーキシンとX-galを含む培地上で培養した画像. オーキシンを介してオーキシン受容体とAux/IAAタンパク質が結合すると, GAL4タンパク質の調節を受けて発現する β -ガラクトシダーゼによりX-galが切断されて青い色素を生成するため酵母は呈色する. Sugawara *et al.*¹⁰⁾ を一部改訂.

リポーターアッセイを行ったところ, IAAの1/10から1/20ほどと活性は低いものの, PAAもGUS発現を誘導した¹⁰⁾. これによりPAAはIAAと同様にTIR1/AFB経路でオーキシン作用を示すことが示唆された. 次に, Estelle教授らが作成した酵母ツーハイブリッドシステムを用いて, PAAがTIR1/AFBとAux/IAAに結合してその受容体複合体を形成するか調べた (図4). その結果, IAAよりも1/10程度の活性ではあるが, PAAもさまざまな組み合わせのTIR1/AFB-Aux/IAA複合体を形成することが示された. また, IAAとPAAがそれぞれ形成するTIR1/AFB-Aux/IAA複合体を詳しく調べると, TIR1-IAA3複合体の形成はIAAの方が強く促進するが, TIR1-IAA7複合体の形成では両者の活性の差が少ない傾向が見られた. そこで, プルダウン試験によりこれらのオーキシンとTIR1/AFBおよびAux/IAAの直接的な結合活性を調べたところ, 酵母ツーハイブリッドシステムを用いた試験を支持する結果が得られた¹⁰⁾. これらの結果から, PAAはIAAと同様にTIR1/AFB経路を介してオーキシン作用を示すことが明らかになった. また, オーキシン受容体に対する親和性に差が見られたことから, PAAはIAAと異なるパターンの遺伝子発現を誘導する可能性もあることが示唆された¹⁰⁾.

次に, マイクロアレイ解析を用いて, PAAとIAAによりそれぞれ誘導されるオーキシン早期応答遺伝子を調べた¹⁰⁾. シロイヌナズナ実生をIAA (1 μ M) とPAA (10 μ M) でそれぞれ1時間処理して早期応答遺伝子の発現パターンを比較したところ, これらのオーキシンは同じGH3遺伝子やAux/

IAA遺伝子などを誘導した. また, 両者に早期応答した遺伝子の発現パターンには高い正の相関が見られることが明らかになった. これらの結果, IAAとPAAのオーキシンとしての役割は植物において重複している可能性が示唆された.

3. PAAは植物においてIAAと異なる移動特性をもつ

極性移動はオーキシンが植物ホルモンとして発見された時から知られる特性の一つである. しかし, 標識化したPAAを外から植物に与えても, IAAとは異なり, 極性移動しないことが報告されている^{8,9)}. そこで, 外部からPAAを与えるのではなく, 植物体内で合成されたPAAとIAAが植物の中で異なる移動特性を示すかどうか調べた¹⁰⁾.

トウモロコシの幼葉鞘では先端部でIAAが活発に合成され, さらに基部側に向かって極性輸送されることが報告されている. また, このIAAの極性移動はオーキシン輸送阻害剤NPAを先端部に処理することにより抑制され, 結果的に先端部へのIAAの蓄積を促進することが示されている. そこで, 暗所で栽培したトウモロコシの実生から幼葉鞘部を採取し, そこに含まれるIAAとPAAの濃度分布をLC-MS/MSで分析, さらに暗所でNPA処理を行った時のオーキシンの濃度分布の違いを調べた¹⁰⁾. 暗所で栽培した幼葉鞘から4つの切片を作成してそこに含まれるPAAとIAAの内生量を分析した結果, 両者とも先端部で濃度が高く, 基部側の組織に向かってその量が減少する濃度分布パターンを示すことがわかった (図5). この幼葉鞘の先端部にNPAを処理し, 暗所でしばらく静置した後, 4つの切片を作成して2つのオーキ

図5. トウモロコシ幼葉鞘における IAA と PAA の濃度分布パターン。(A) NPA 処理実験. 幼葉鞘の先端部 (0-3 mm) の内側から DMSO 溶液または NPA (200 μ M) を 1 時間処理したあと、切片を作成し、それらに含まれるオーキシンの量を分析。*コントロールと NPA 処理区で有意差あり (t -test, $p < 0.05$)。 (B) 重力刺激実験. 幼葉鞘を横に倒して 1 時間静置したあと、切片を作成し、それらのオーキシンの量を分析。*上側と下側で有意差あり (t -test, $p < 0.05$)。 Sugawara *et al.*¹⁰⁾ を一部改訂。

シンの濃度をそれぞれ分析した。その結果、これまでの報告通り IAA は先端部に蓄積し、また NPA 処理した先端部より下の組織で IAA が減少する濃度分布パターンを示した。一方、PAA の濃度分布パターンは NPA 処理をしても変化が見られなかった。この結果、幼葉鞘における内生 IAA の極性移動は NPA 処理により阻害されるが、内生 PAA の移動はこれにより阻害されないことが示された。

次に、実際の植物の生理現象の中で PAA と IAA の移動特性に違いがあることを証明するため、重力刺激を与えた幼葉鞘における IAA と PAA の濃度分布パターンの違いを調べた¹⁰⁾。暗所で幼葉鞘を横に倒して重力刺激を与えた後、これを縦方向と横方向から切って 8 つの切片を作成し、それぞれの切片に含まれる 2 つのオーキシン量を LC-MS/MS で分析した (図 5)。その結果、IAA は重力方向へ活発に極性移動するため、幼葉鞘の下側で濃度が高くなり、反対に上側で濃度が低くなる濃度分布パターンを示した。一方、PAA は重力刺激を受けても幼葉鞘における濃度分布パターンに変化が見られなかった。これにより、IAA は重力刺激にตอบสนองして極性移動の方向が変化するが、PAA は重力刺激により移動方向が変化しない天然オーキシンであることが明らかになった。

植物における PAA と IAA のオーキシンとしての特性が異

なることをさらに示すため、根におけるオーキシン生合成が顕著に低下したシロイヌナズナの *yucQ* 変異体を使った重力屈性回復実験を行った¹⁰⁾。*yucQ* 変異体は、シロイヌナズナの 11 個の IAA 生合成遺伝子 *YUCCA* (*YUC*) のうち根で発現が高い 5 つを欠損しており、地上部は野生型と比べて表現型に差が見られないが、主根の成長は著しく抑制され、重力屈性も異常を示す。この *yucQ* 変異体を IAA (10 nM) または PAA (1 μ M) を含む培地で栽培すると、どちらの条件でも根の成長を野生型レベルまで回復させることができた (図 6)。これら根の成長を回復させた *yucQ* の実生を横向きに置き、さらに重力刺激を 24 時間与えると、IAA を与えて回復させた *yucQ* の根は野生型と同じレベルの重力屈性を示した。これは植物に取り込まれた IAA が重力刺激により活発に極性移動して、下側でその濃度が高くなり、反対に上側で濃度が低下するように不均等分布したためと考えられる。一方、PAA を与えて回復させた *yucQ* の根は同じ条件でほとんど重力屈性を示さなかった。これは植物に取り込まれた PAA の量は根の成長を回復させるには十分であったが、PAA が重力刺激を受けても活発に下側へ極性移動しないためであると考えられた。この結果から、PAA は植物において IAA と異なる特性を持つことがさらに裏づけられた。

図6. IAAとPAAによる*yucQ*根部成長の回復。(A) オーキシンによる*yucQ*根部成長の回復。(B) オーキシンによる*yucQ*根部重力屈性の回復。植物を培地上で栽培後(重力1)、90度横に倒してさらに24時間栽培(重力2)した後の主根の成長方向。IAAやNAAを処理した*yucQ*の根は野生型と同程度まで重力屈性が回復したが、PAAや2,4-Dを処理した*yucQ*の根は重力屈性が回復しない。(C) 植物における天然オーキシンと合成オーキシンの移動特性のモデル図。Sugawara et al.¹⁰⁾を一部改訂。

4. PAAは合成オーキシン2,4-Dと似た移動特性をもつ

2,4-Dは広葉除草剤として戦後最初に日本に輸入された合成オーキシンである。興味深いことに、1-ナフタレン酢酸(NAA)はIAAと同様に極性移動する合成オーキシンとして知られているが、2,4-Dはこれらと異なり極性移動しないことが示されている(図6C)。これまで2,4-DとNAAは両者ともIAAに似た合成オーキシンと考えられてきたが、2,4-DはPAAと似た移動特性をもつオーキシンではないかと予想された¹⁰⁾。この仮説を証明するため、*yucQ*変異体にNAAと2,4-Dを与えて根の成長を野生型レベルまで回復させ、それらの重力屈性を調べた。その結果、NAA(60 nM)を与えて回復させた*yucQ*の根は、野生型やIAAで回復させた*yucQ*の根と同じレベルの重力屈性を示した。一方、2,4-D(10 nM)を与えて回復させた*yucQ*の根は、PAAと同様に同じ条件でもほとんど重力屈性を示さなかった。これらの結果、IAAとNAAは重力刺激に応答して活発に極性移動するオーキシンであるのに対し、PAAと2,4-Dは共に極性移動とは異なる機構で制御されるオーキシンであることが示唆された。

5. PAA生合成および不活性化経路の解析

植物におけるPAAの生合成経路はまだ解明されていない。PAAはIAAと化学構造が似ていることから、IAA生合成酵素がPAA生合成に関与する可能性について検討した(図7)。植物においてIAA生合成の律速酵素であるYUCの遺伝子を発現誘導すると、IAAの生合成量が増加し、胚軸伸長や側根形成促進などの特徴的な表現型を示す。また、植物ではIAA内生量を適度に維持しようとする調節機構が働くため、過剰に生産されたIAAをIAA-アスパラギン酸結合体(IAA-Asp)やIAA-グルタミン酸結合体(IAA-Glu)などに代謝して不活性化する(図7)。そこで、エストラジオール誘導系を使ってシロイヌナズナでYUC遺伝子を発現させ、PAAとその予想代謝物である2種のPAA-アミノ酸結合体を分析した(図7)。その結果、YUC1遺伝子の発現を誘導したシロイヌナズナにおいて、PAA-アスパラギン酸結合体(PAA-Asp)とPAA-グルタミン酸結合体(PAA-Glu)が顕著に蓄積することがわかった。また、YUC2やYUC6遺伝子の発現を誘導したシロイヌナズナでも、同様にPAA-AspやPAA-Gluの内生量が著しく増加した。これによりYUCがPAAの生合成にも関与している可能性が示唆された。

しかし、この実験では、YUC遺伝子の発現によりシロイ

図7. シロイヌナズナにおけるPAAの推定生成経路。(A) PAAの推定生成経路とGH3依存的不活化経路。(B) YUC過剰発現体の表現型。コントロール (*pER8*), *YUC1*過剰発現体 (*YUC1ox*), *YUC2*過剰発現体 (*YUC2ox*), *YUC6*過剰発現体 (*YUC6ox*) (C) YUC過剰発現体におけるIAA, PAAおよびアミノ酸結合体の内生量。Sugawara *et al.*¹⁰⁾ を一部改訂。

ヌナズナでIAAが増加し、それが代謝酵素GH3の遺伝子発現を誘導するためにPAAの代謝が促進される可能性も考えられる。そこで大腸菌でYUC2タンパク質を調製し、予想生成中間体のフェニルピルビン酸 (PPA) からPAAを生成できるか酵素活性試験により調べた。その結果、YUC2タンパク質がPPAからPAAも生成することが確認された¹⁰⁾。

これらの結果から、YUCがIAAだけでなくPAAの生合成にも関与する可能性が高いと考えて、次に*yuc1,2,6*三重変異体においてPAA内生量が減少するかLC-MS/MSを使って調べた¹⁰⁾。しかし、*yuc1,2,6*三重変異体の花芽でIAA内生量が顕著に減少しているにもかかわらず、PAA内生量は野生型と比べてほとんど変化が見られなかった。さらに、YUC上流のTAA1を欠損した*wei8-1*変異体の種子に含まれるオーキシン量を分析したところ、この変異体においてもIAA内生量は大幅に減少するが、PAA内生量の変化はごくわずかであった¹⁰⁾。以上の結果から、PAAの生合成にIAAと同じTAAとYUCが関与する可能性はあるが、ほかの経路からPAAが合成されていることも予想された¹⁰⁾。

YUC遺伝子の発現誘導によりPAA-AspやPAA-Gluの蓄積量が増加したことから、GH3がPAAの代謝にも関与することが示唆された。これを証明するため、シロイヌナズナのGH3遺伝子ファミリーの1つであるGH3.9遺伝子を、エストラジオール誘導系を使ってシロイヌナズナで高発現させた時に、IAA-アミノ酸結合体とPAA-アミノ酸結合体の内生量が増加するか調べた¹⁰⁾。その結果、GH3.9遺伝子の発現依存的にIAA-GluとPAA-Gluの量が増加することが明らかになった。YUC遺伝子の発現誘導によりPAA-アミノ酸結合体量が増加した結果も踏まえると、GH3遺伝子がPAAの代謝

経路に関与していることが強く示唆された。

まとめ

本研究により、植物におけるIAAとPAAの移動特性は異なり、IAAは重力刺激にตอบสนองして重力側に極性移動するが、PAAはこのような移動特性をもたないオーキシンであることが明らかになった。PAAはコケ植物を含む陸上植物に広く存在しており、IAAよりもオーキシン作用は弱い、高濃度のPAAが植物に含まれている。PAA濃度は植物器官によって大きな差があり、シロイヌナズナでは花芽、根、種子などで内生量が多い。また、ヒメツリガネゴケの茎葉体の成長を促進することから、PAAは植物進化の早期からオーキシンとして生産されている可能性がある。PAAはIAAと同様にTIR1/AFB経路でオーキシン応答遺伝子を制御しており、植物の成長制御においてIAAと重複した役割をもつ可能性がある。植物におけるPAAの生合成については、TAA-YUC経路が関与する可能性はあるが、今後さらに検討が必要である。PAAの不活性化においては、IAAと同様にGH3経路が関与する可能性が強く示された。以上のことから、植物においてはIAAだけでなくPAAもオーキシンとして植物の成長や分化の調節に関与している可能性が示された。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するには、PAAのみ欠乏した変異体の作成とその解析が重要な鍵と考えられる。

引用文献

- 1) H. Kasahara: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**, 34–42 (2016).

- 2) J. Friml: *Eur. J. Cell Biol.* **89**, 231–235 (2010).
- 3) L. I. Calderon-Villalobos, X. Tan, N. Zheng and M. Estelle: *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a005546 (2010).
- 4) A. N. Stepanova and J. M. Alonso: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **27**, 10742–10744 (2016).
- 5) K. Tanaka, K. Hayashi, M. Natsume, Y. Kamiya, H. Sakakibara, H. Kawaide and H. Kasahara: *Plant Cell Physiol.* **55**, 218–228 (2015).
- 6) A. J. Haagen-Smit and F. W. Went: *Proc. R. Acad. Amsterdam* **38**, 852–857 (1935).
- 7) F. Wightman and D. L. Lighty: *Physiol. Plant.* **55**, 17–24 (1982).
- 8) S. Prochazka and V. Borkovec: *Biol. Plant.* **26**, 358–363 (1984).
- 9) D. A. Morris and C. F. Johnson: *Planta* **172**, 408–416 (1987).
- 10) S. Sugawara, K. Mashiguchi, K. Tanaka, S. Hishiyama, T. Sakai, K. Hanada, K. Kinoshita-Tsujimura, H. Yu, X. Dai, Y. Takebayashi, N. Takeda-Kamiya, T. Kakimoto, H. Kawaide, M. Natsume, M. Estelle, Y. Zhao, K. Hayashi, Y. Kamiya and H. Kasahara: *Plant Cell Physiol.* **56**, 1641–1654 (2015).

略 歴

笠原博幸（かさはら ひろゆき）

生年月日：1969年12月11日

最終学歴：近畿大学大学院工学研究科博士後期課程修了

研究テーマ：植物ホルモンによる植物の成長と環境応答の制御機構

趣味：スポーツ