

シロイヌナズナにおける代謝を介したインドール-3-酢酸  
濃度調節機構に関する生化学的研究

東京農工大学大学院  
連合農学研究科  
生物生産科学専攻

田中 慧太

## 目次

緒論	...	3
第1章 出芽酵母を用いた系によるシロイヌナズナの IAA 酸化酵素の探索		
緒言	...	8
材料と方法	...	10
結果	...	14
考察	...	16
第2章 出芽酵母を用いた系による OxIAA グルコシル化酵素の探索		
緒言	...	23
材料と方法	...	25
結果	...	29
考察	...	31
第3章 組換えタンパク質を用いた UGT74D1 の酵素機能解析		
緒言	...	37
材料と方法	...	38
結果	...	43
考察	...	45
第4章 シロイヌナズナ <i>ugt74d1</i> 変異体の解析		
緒言	...	54
材料と方法	...	55
結果	...	61
考察	...	62
第5章 <i>UGT74D1</i> 過剰発現体シロイヌナズナの解析		
緒言	...	67
材料と方法	...	68
結果	...	71
考察	...	72

第6章 <i>UGT74D1</i> 遺伝子のオーキシン応答性の解析	
緒言	... 78
材料と方法	... 79
結果	... 81
考察	... 82
総括	... 84
参考文献	... 87
略語表	... 99
謝辞	... 100

## 緒論

オーキシンは植物の生活環のあらゆる段階で重要な役割を果たす植物ホルモンである。その研究は進化論で有名な Darwin らが 1880 年に発表した光屈性に関する研究に端を発する (Darwin 1880, 小柴・神谷 2010)。Darwin 親子はアベナ (*Avena sativa*) の幼葉鞘が先端部で光を感受すると、そこから伸長領域に「何らかの影響力」が伝わって屈曲が起こると予想した。その後、Boysen-Jensen, Paal, Went らが行った様々な屈性試験により、アベナ幼葉鞘の先端部に軸器官を移動して濃度依存的に細胞伸長を促進する物質が存在することが証明された。1930 年代に入ると、Kögl らがアベナ幼葉鞘の伸長を促進する活性物質を人尿から精製し、これらを auxin A, B と命名した。このとき同時に単離されたインドール-3-酢酸 (IAA) を heteroauxin と名付けたが、その後の研究により IAA がオーキシンの活性本体であることが判明した。1940 年代には Haagen-Smit をはじめとする研究者によって様々な植物から IAA が単離され、IAA が植物界に普遍的に存在する天然オーキシンであることが明らかになった。天然オーキシンとしてはインドール-3-酪酸 (IBA) やフェニル酢酸 (PAA) も植物から単離されているが、IAA が最も重要なオーキシンとして認識されている。その後、60 年以上にわたりオーキシンの生理学的な研究が進められた結果、オーキシンは光屈性の他にも、胚発生、器官形成、重力屈性、避陰反応、老化、障害や病害への応答など、植物の成長や分化の制御において中心的な役割を果たすことが明らかになった。

植物は、生合成・輸送・不活性化を介して細胞内のオーキシン濃度を調節し、組織内に適切なオーキシン濃度勾配を形成することによって成長や分化をコントロールすると考えられている (Benková *et al.* 2003, Denancé *et al.* 2013, Ljung 2013, Sauer *et al.* 2013, Vanneste and Friml 2009, Woodward and Bartel 2005)。天然オーキシンの IAA は主にトリプトファン (Trp) から 2 段階の酵素反応により合成されることがシロイヌナズナで示されている。この経路では Trp が TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS (TAA) ファミリーによりインドール-3-ピルビン酸 (IPA) へと変換された後、フラビン含有モノオキシゲナーゼの YUCCA (YUC) ファミリーによって IPA から IAA が合成される (Mashiguchi *et al.* 2011, Stepanova *et al.* 2011, Won *et al.* 2011) (Fig. 1)。TAA および YUC ファミリーは植物界に広く存在し、それらの欠損変異体は胚発生、花芽形成、維管束形成、頂芽優勢、避陰反応、重力屈性において多面的な異常を示すことから、この 2 つの遺伝子ファミリーがオーキシン生合成で中心的な役割を果たすと考えられている (Cheng *et al.* 2006, Cheng *et al.* 2007, Franklin *et al.* 2011, Rawat *et al.* 2009, Sairanen *et al.* 2012, Stepanova *et al.* 2008, Sun *et al.* 2012, Tao *et al.* 2008, Yamada *et*



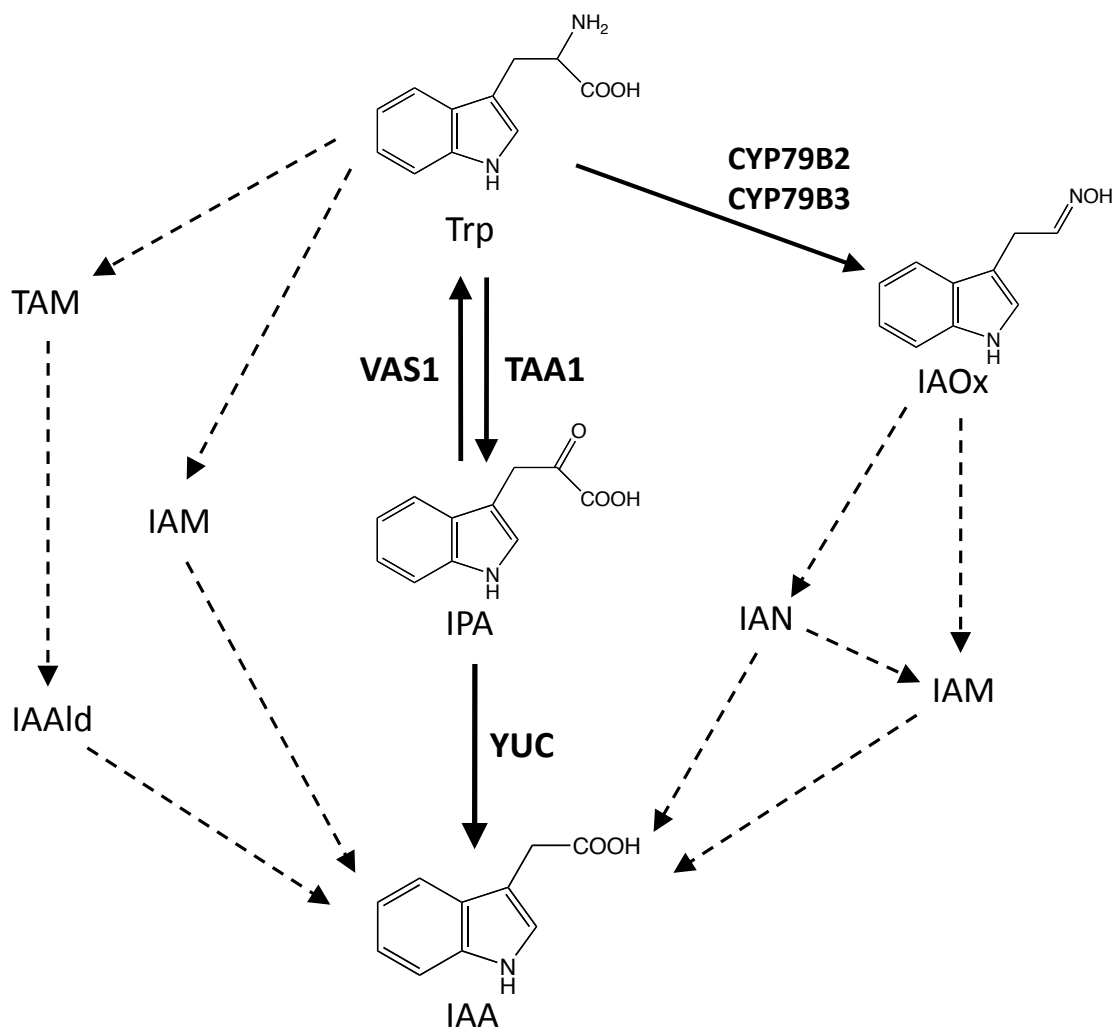
*al.* 2009). また, *TAA* ファミリーおよび *YUC* ファミリーの遺伝子発現は様々な転写因子によって制御されており, これらの転写因子が発生段階や生育環境に応じてオーキシン生合成量を調節すると考えられる. この他, シロイヌナズナにはインドール-3-アセトアルドキシム (IAOx) を介したアブラナ科固有の IAA 生合成経路も存在し, 側根形成や高温ストレス条件下などにおいて補助的な役割を果たす可能性が示唆されている (Sugawara *et al.* 2009, Zhao 2010, Zhao *et al.* 2002).

オーキシンの濃度調節においては, 細胞膜の輸送体を介したオーキシン極性輸送が重要な役割をもつことが知られている. これまでに PIN-FORMED (PIN) ファミリー, AUX1/LAX ファミリー, ATP 結合カセット B 型サブファミリー (ABCB) の 3 タイプが IAA 輸送体として報告されており, 特に PIN ファミリーはオーキシン排出輸送体としてオーキシン極性輸送に中心的な役割を果たすと考えられている. また, 植物は小胞輸送を介して PIN タンパク質の細胞膜局在を変化させることにより, オーキシン極性輸送の方向を決定し, 組織内にオーキシン濃度勾配を形成することが示されている. 近年, 小胞体膜に局在する PIN タンパク質や, 新規輸送体 PIN-LIKES ファミリーが発見されたほか, 液胞膜に局在する WALLS ARE THIN1 が IAA を輸送する可能性が示された. これらが制御するオルガネラ間の輸送も IAA の細胞内濃度の調節に寄与する可能性がある (Barbez *et al.* 2012, Ding *et al.* 2012, Mravec *et al.* 2009, Petrášek *et al.* 2006, Ranocha *et al.* 2013, Sakai and Haga 2012, Sauer, Robert and Kleine-Vehn 2013).

オーキシンの不活化において, IAA はアミド化 (amino acid conjugation), メチル化 (methylation), 配糖体化 (Glycosylation), 酸化など様々な代謝を受けることが知られている. 近年, 分子遺伝学的アプローチの発展に伴って IAA のアミド化を触媒する GRETHEN HAGEN 3 (GH3), メチル化を触媒する IAA METHYLTRANSFERASE 1 (IAMT1), 配糖体化を触媒する UGT84B1, IAA から生成すると考えられている IBA の配糖体化を触媒する UGT74E2 など様々な IAA 代謝酵素がシロイヌナズナで同定され, それらの機能解析が行われた (Fig. 2). また, アミド化を受けた IAA がさらに酸化される経路や, 酸化を受けた後さらに配糖体化される経路も報告されており, 植物には多様な IAA 代謝経路が存在する. 一方, シロイヌナズナを用いた <sup>14</sup>C 標識 IAA の投与実験により, 配糖体化を伴う IAA 酸化経路 (OxIAA 経路) が IAA の濃度調節に重要な役割をもつ可能性が示されているが, その遺伝子レベルでの解明はまだ進んでいない (Östin *et al.* 1998, Pěňčík *et al.* 2013, Ljung 2013).

本研究では, 植物におけるオーキシンの濃度調節機構の解明を目的として, シロイヌナズナの OxIAA 経路に含まれる IAA 酸化酵素の探索, OxIAA-glucosyltransferase (OxIAA グルコシル転移酵素) の探索と UGT74D1 の同定, およびその酵素機能の解析を行った.

本論文では、出芽酵母を用いたシロイヌナズナの IAA 酸化酵素の探索 (第 1 章)、出芽酵母を用いた OxIAA グルコシル転移酵素の探索 (第 2 章)、組換えタンパク質を用いた UGT74D1 の酵素機能解析 (第 3 章)、シロイヌナズナ *ugt74d1* 変異体の解析 (第 4 章)、シロイヌナズナ *UGT74D1* 過剰発現体の解析 (第 5 章)、*UGT74D1* のオーキシシン応答性解析 (第 6 章)、オーキシシン研究における今後の展望について述べる。

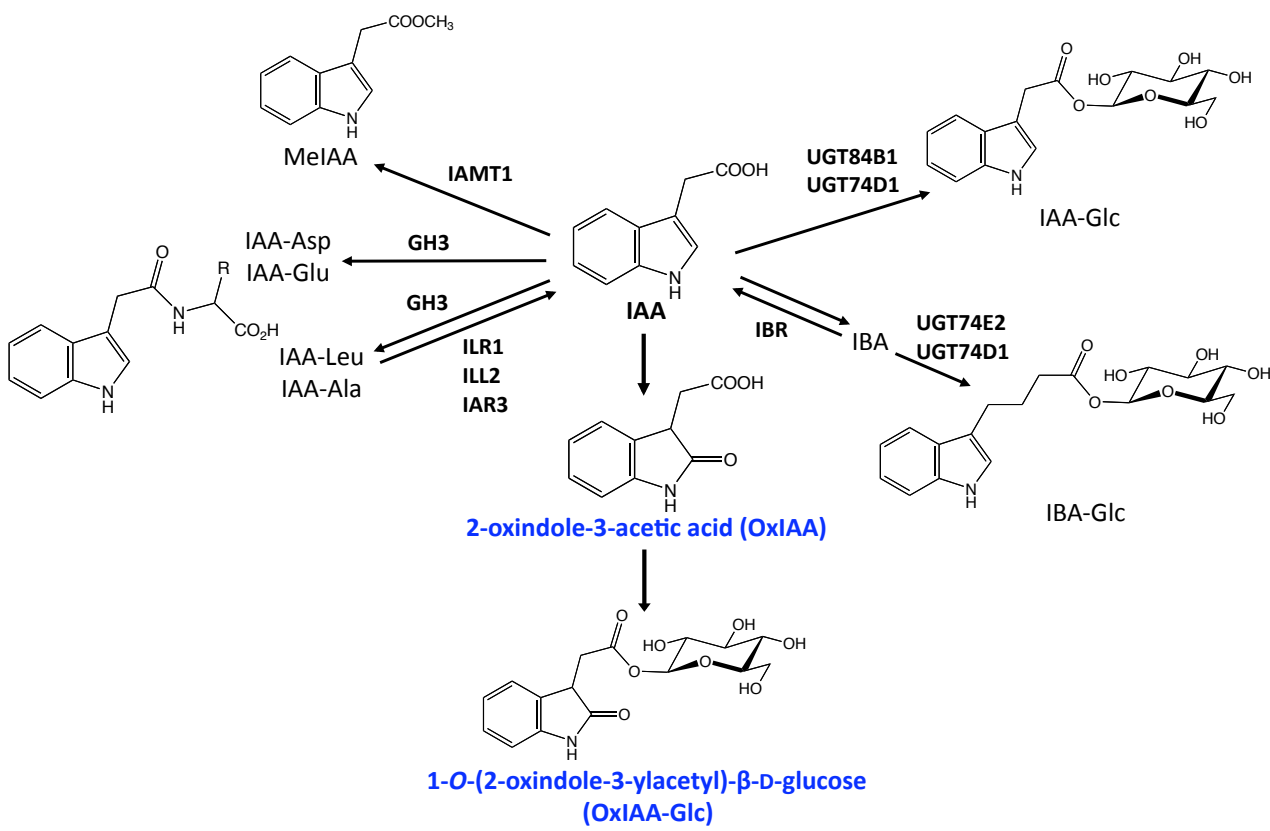


**Fig. 1** これまでに提唱されたシロイヌナズナの IAA 生合成経路

酵素が同定されており，欠損変異体が表現型を示す反応を実線で表す．

IAM：インドール-3-アセトアミド， IAN：インドール-3-アセトニトリル，

TAM：トリプタミン， IAAld：インドール-3-アセトアルデヒド



**Fig. 2** これまでに提唱されたシロイヌナズナの IAA 代謝経路.

## 第1章 出芽酵母を用いた系によるシロイヌナズナの IAA 酸化酵素の探索

### 緒言

1980年代, Reinecke と Bandurski は, 放射性同位体で標識化した IAA の投与実験により, トウモロコシ体内で IAA が 2-(2-oxo-1,3-dihydroindol-3-yl)acetic acid (2-oxindole-3-acetic acid, OxIAA) に代謝されることを発見した. また, GC-MS を用いて トウモロコシの茎と胚乳から OxIAA を検出し, OxIAA が天然の IAA 代謝物であることを示した. さらに, トウモロコシ粗抽出液を用いた実験により, 好気条件下で酵素的に IAA が酸化されることを示した(Ljung *et al.* 2001, Reinecke and Bandurski 1983, Reinecke and Bandurski 1988). その後, アカマツ, ポプラ, トマト, オレンジ, シロイヌナズナ, ゼニゴケなど様々な植物種から OxIAA とその誘導体が検出されている(Ernstsen *et al.* 1987, Riov and Bangerth 1992, Chamarro *et al.* 2001, Ljung *et al.* 2001, Sztein *et al.* 1999). これらの報告から, IAA の 2 位の酸化を介する経路 (OxIAA 経路) は, 陸上植物に広く存在する IAA 代謝経路だと予想されている.

ごく最近, 生化学的・分子生物学的手法によって OxIAA のオーキシン活性が詳細に解析された. Pěncík らはシロイヌナズナのオーキシンレポーター株 *DR5rev:GFP* に OxIAA を処理しても *GFP* の顕著な発現が誘導されないことを示した. また, 高濃度の OxIAA を与えてもシロイヌナズナの胚軸伸長は全く促進されないこと, 根の伸長は OxIAA によって阻害されるが, IAA が同程度の活性を示すときの 1000 倍以上高い濃度が必要であることを報告した. さらに, シロイヌナズナのオーキシン受容体 TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1) と Aux/IAA タンパク質を用いたプルダウンアッセイの結果, IAA は IAA3 または IAA6 と TIR1 の結合を促進するが, OxIAA は同じ条件で結合を促進しないことが判明した. これらの結果から, IAA は 2 位の酸化を受けるとオーキシン活性をほぼ完全に失うと考えられる(Pěncík *et al.* 2013). なお, IAA-Leu, IAA-Ala, IBA が植物体内で変換されて IAA を生じるのに対し, OxIAA は IAA へと変換されない. これらの結果から, インドール環 2 位の酸化によって IAA は不可逆的に不活性化されると考えられる(Korasick *et al.* 2013, Normanly 1997, Woodward and Bartel 2005).

1998年, Östin らは液体培地中でシロイヌナズナに  $^{14}\text{C}$  標識 IAA を投与し, 生成する代謝物を解析した. その結果, 比較的高濃度 (5  $\mu\text{M}$ ) の IAA を与えた時に IAA-Asp と IAA-Glu が生成する割合が高いのに対して, 低濃度 (0.5  $\mu\text{M}$ ) の IAA を処理した植物体内では OxIAA と OxIAA hexose を主に生成することを明らかにした(Östin *et al.* 1998). その後, Kai らはシロイヌナズナの実生に含まれる 1-O-(2-oxindol-3-ylacetyl)- $\beta$ -D-glucose

(OxIAA-Glc) の内生量が IAA-アミノ酸結合体 (IAA-Asp, IAA-Glu, IAA-Glc) よりも著しく高いことを LC-MS/MS 分析により示した(Kai *et al.* 2007). また, IAA 過剰生産型の *35S:YUC1*, *sur1*, *sur2* において OxIAA の内生量が野生型株に比べて非常に多いことや, グルコース処理によって IAA 生合成を誘導した実生では OxIAA 量も増加することが報告された(Novák *et al.* 2012, Pěncík *et al.* 2013, Sairanen *et al.* 2012). これらの報告は, IAA から OxIAA への変換, および OxIAA のグルコシル化が, 細胞内のオーキシン量を維持するための重要な代謝経路であることを示唆している. しかし, これらの反応を触媒する代謝酵素はまだ同定されていなかった. そこで本研究では, まずシロイヌナズナにおいて IAA から OxIAA を生成する IAA 酸化酵素の探索を行った.

## 材料と方法

### 1) ベクターの改変

#### ・ *TRP1* のクローニング

下記の組成と温度で PCR を行い、ベクター-pGBT9 内の *TRP1* の配列を増幅した。反応液を 1%アガロースゲルで電気泳動し、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いてゲルから増幅断片を抽出した。

Ex Taq	0.25
10× Ex Taq buffer	5.0
dNTP (each 2.5 mM)	4.0
TRP1_F	1.5
TRP1_R	1.5
pGBT9 (45.5 ng/μL)	1.5
milliQ water	36.5
<hr/>	
Total	50.25

94 °C, 2min – (96 °C, 20 sec – 56 °C, 20 sec – 68 °C, 1 min 10 sec) ×30 cycles

#### ・ pYES-DEST52 の制限酵素処理

マイクロチューブ内で pYES-DEST52 (Invitrogen) 5 μg , *NheI* 1μL (10 U), 10×buffer 5 μL, milliQ 水を加えて 50 μL の反応液を調製し, 37 °C で 6 h 静置した。エタノール沈殿の後, 沈殿を風乾させた。チューブに *EcoRV* 0.5 μL (7.5 U), 10×buffer 5 μL, milliQ 水 44.5 μL を加えて 37 °C に 3 h 静置した。反応液を 1%アガロースゲルで電気泳動し, QIAquick Gel Extraction Kit を用いて抽出した。

#### ・ In-fusion 反応

*TRP1* 断片の溶液 1.5μL, 切断した pYES-DEST52 の溶液 3 μL, In-Fusion HD enzyme premix (Clontech) 2 μL, milliQ 水 3.5 μL を混合し, 50 °C で 15 min 静置した。反応液 2 μL を用いて大腸菌 DB3.1 を形質転換し, 100 μg/mL Amp を含む LB 平板培地に塗布して 37 °C で 16 h 培養した。

TRP1\_check\_1, TRP1\_check\_R プライマーを用いたコロニーPCR で断片の増幅が確認

できた形質転換体を，100 µg/mL Amp を含む 2×YT 培地 2 mL に植菌して 37 °C で 16 h 培養した．培 QIAprep Spin Miniprep Kit を使用して培養液からプラスミドを精製した．

## **2) cDNA 発現ライブラリーの作成**

### **・ mRNA の精製**

シロイヌナズナ Col-0 野生型株を土壌で 6 週間栽培した．約 190 mgFW の花芽を回収し，Micro-FastTrack™ 2.0 mRNA Isolation Kit (Invitrogen) を用いて mRNA を精製した．

### **・ エントリーライブラリーの作成**

CloneMiner™ II cDNA Library Construction Kit (Invitrogen) を用いて，10 µg の mRNA から cDNA を合成した．これを BP 反応によって pDONR222.1 (Invitrogen) に挿入した．反応条件はマニュアルに従った．この BP 反応液を用いて，コンピテントセル ElectroMAX™ DH10B™ T1 Phage Resistant Cells (Invitrogen) を形質転換し，50µg/mL Kanamycin を含む LB 平板培地 (2 号角シャーレ 45 枚) に塗布した．このとき，培地 1 枚あたり約 2000 コロニーが生育するように塗布する量を調節した．37 °C で 16 h 培養した後，コロニーを掻き集め，QIAfilter Plasmid Mega Kit (Qiagen) を用いてプラスミドを精製した．これを Gateway エントリーライブラリーとした．

### **・ cDNA 発現用ライブラリーの作成**

LR 反応によって，Gateway エントリーライブラリー内の cDNA を pYES-DEST52 (Invitrogen) へ移行した．反応条件はマニュアルに従った．この LR 反応液を用いて，コンピテントセル ElectroMAX™ DH10B™ T1 Phage Resistant Cells (Invitrogen) を形質転換し，100µg/mL Ampicillin を含む LB 培地 (2 号角シャーレ，45 枚) に塗布した．37 °C で 16 h 培養した後，コロニーを掻き集め，QIAfilter Plasmid Mega Kit (Qiagen) を用いてプラスミドを精製した．これを cDNA 発現用ライブラリーとした．



### 3) スクリーニング

#### ・酵母の形質転換

10 mL の最少培地 (SD 培地) に植菌して 30 °C で 16 h 振とう培養し、前培養液とした。前培養液の濃度を測定し、50 mL の YPDA 培地に  $OD_{600} = 0.1$  となるように添加した。30 °C で 3 h 振とう培養した後 ( $OD_{600} = 0.6$  程度)、遠心 ( $400\times g$ , 5 min, 20 °C) して培地を捨てた。25 mL の滅菌水を加えて菌体を懸濁し、遠心 ( $400\times g$ , 5 min, 20 °C) して水を捨てた。菌体を 1 mL の 0.1 M 酢酸リチウムに懸濁して 1.5 mL マイクロチューブに移した。遠心 ( $13,000\times g$ , 5sec, 20 °C) して上清を除いた後、400  $\mu$ L の 0.1 M 酢酸リチウムに再懸濁した。1.5 mL チューブに 50  $\mu$ L ずつ分注し、遠心して上清を除いた。チューブに 50% (w/v) PEG 240  $\mu$ L, 1M 酢酸リチウム 36  $\mu$ L, 2.0mg/mL キャリア DNA 25  $\mu$ L, cDNA 発現用ライブラリー 50  $\mu$ L を加え、ボルテックスミキサーを用いて攪拌し、30 °C で 30 min 静置した。DMSO 40 $\mu$ L を加えてピペッティングで穏やかに攪拌し、42 °C で 20 min 静置した。このとき、5 min ごとに転倒混和した。遠心して上清を捨て、菌体を YPAD に懸濁した。遠心 ( $400\times g$ , 5 min, 20 °C) して上清を捨て、トリプトファン要求性培地 (SC-Trp 培地) 1 mL を加えて 30 °C で 1 h 振とう培養した。遠心 ( $400\times g$ , 5 min, 20 °C) して上清を捨て、菌体を滅菌水 10 mL に懸濁した。

#### ・陽性クローンの選抜

一度のスクリーニングにつき、10 $\mu$ M IAA を含む SC-Trp 平板培地を 20 枚前後使用した。上記の操作で調製した形質転換体の懸濁液を、200  $\mu$ L を、200  $\mu$ L ずつ培地に塗布し、24 °C で培養した。3–5 d 後、培地上に形成されたコロニーを爪楊枝で一つずつ掻き取り、新しい SC-Trp 培地に広げて 24 °C で培養した。この培地上に形成されたコロニーを掻き取って下記の反応液に懸濁し、下記の条件で PCR した。反応液のうち 3  $\mu$ L を 1% アガロースゲルで電気泳動した。単一の増幅断片が見られた反応液を illustra ExoStar (GE Healthcare) で処理し、断片の配列を解析した。

	( $\mu$ L)
KOD FX Neo (TOYOBO)	0.2
2 $\times$ PCR Buffer for KOD FX Neo	10
dNTP (each 2mM)	4
pYES-DEST52_F (10 $\mu$ M)	0.6
pYES-DEST52_R (10 $\mu$ M)	0.6
milliQ water	4.6
<hr/>	
Total	20

94 °C, 2 min – (98 °C, 10 sec – 56 °C, 30 sec – 68 °C, 2min 30 sec)  $\times$  33 cycles

**Table 1** 本章で使用したプライマー

Name	Sequence (5' to 3')
TRP1_F	AAAATCAGTCAAGATATCCAGCTGGCACGACAGGTTTC
TRP1_R	TCATCGATAAGCTAGCTCTACCGGCATGCCGGCAAGT
TRP1_check_F	GTATACACCCGCAGAGTACTGC
TRP1_check_R	GTGTATCGTACAGTAGACGGAGT
pYES-DEST52_F	ACTAGCAGCTGTAATACGACTCAC
pYES-DEST52_R	CCCTCTAGATCGAACCACCTTTG

## 結果

シロイヌナズナの IAA 酸化酵素を探索するために、本研究では Nishimura らが確立した出芽酵母の Auxin-inducible degron (AID) システム(Nishimura *et al.* 2009) を応用したスクリーニング系を構築した。AID システムは、植物以外の生物の細胞にオーキシン受容体 TIR1 と Aux/IAA を異種発現させることにより、Aux/IAA と融合させた標的タンパク質をオーキシン依存的に分解できる系である。植物において Aux/IAA はオーキシンを介して TIR1 と結合してユビキチン化を受けた後、26S プロテアソーム系で分解される(Dharmasiri *et al.* 2005, Gray *et al.* 2001, Kepinski and Leyser 2005, Tan *et al.* 2007)。この 26S プロテアソーム系で分解可能な Aux/IAA タンパク質の TIR1 結合領域が AID と呼ばれている。Nishimura らは遺伝子組換え酵母等を用いた実験を行い、Aux/IAA と融合した状態で発現したタンパク質は、オーキシン依存的に細胞内で TIR1 と結合して分解されることを示した。ここで重要なポイントは、植物由来の TIR1 タンパク質が酵母においても SCF<sup>TIR1</sup> ユビキチンリガーゼ E3 複合体を形成し、Aux/IAA タンパク質と結合できることである。

本実験では、出芽酵母 YMK683 株 (NBRP ID: BY25599) をナショナルバイオリソースプロジェクトから入手して使用した。この株は、ADH1 プロモーター下でイネ *OsTIR1* を発現すると同時に、DNA 複製装置の構成因子 Minichromosome maintenance (MCM) をコードする *MCM4* 遺伝子の 3'-末端に、シロイヌナズナ IAA7 の TIR1 結合領域をコードした配列が挿入されている。すなわち *MCM4* は Aux/IAA 融合タンパク質の状態 (*MCM4*-Aux/IAA) で発現する。したがって、この酵母をオーキシン濃度が高い環境に置くと、*MCM4*-Aux/IAA がプロテアソーム系で分解されるため、増殖が抑制される (Fig. 3)。この YMK683 株にシロイヌナズナ cDNA 発現用ライブラリーを導入したとき、IAA 酸化酵素を発現した形質転換体は細胞内の IAA を不活性化できるので、IAA を含む培地上でも生育できると予想した。一方、IAA を代謝できない大半の形質転換体は、*MCM4*-Aux/IAA タンパク質が分解されるため、増殖が抑制される (Fig. 4)。また、このスクリーニング系では IAA 酸化酵素以外にも、例えば IAA のアミド化やグルコシル化などを触媒する代謝酵素や、*MCM4*-Aux/IAA の分解を抑制する様々なタンパク質を発現した形質転換体が単離できると予想された。

本実験では良質な cDNA ライブラリーの調製がスクリーニングの成否を左右する重要な鍵である。標的遺伝子の発現レベルがより高い組織の mRNA から作成した cDNA ライブラリーを用いることにより、最終的に標的遺伝子を単離・同定できる確率が上がると考えられる。OxIAA の生産が活発な組織を材料として選択するために、液体クロマトグラフィ

ー・エレクトロスプレーイオン化・タンデム型質量分析装置 (LC-ESI-MS/MS) を用いて、土壌で約5週間栽培した植物体における花芽と長角果の IAA 内生量, および花芽, 長角果, 種子の OxIAA 内生量を測定した. その結果, 花芽には多量の OxIAA が蓄積しており, IAA 量に対する OxIAA 量の比も高かったことから, シロイヌナズナの花芽において, IAA は OxIAA 経路を介して活発に代謝されていると推測した. すなわち, IAA 酸化酵素の発現レベルが高いと考えられる (Table 2). この推測に基づいて, 花芽組織から精製した mRNA をライブラリーの作成に使用した. 常法に従い, 逆転写反応によって cDNA を合成し, 出芽酵母の組換えタンパク質発現用ベクター pYES-DEST52 に挿入して cDNA 発現用ライブラリーとした (Fig. 5). なお, YMK683 株では *OsTIR1* を導入する際の選抜マーカーとして *URA3* 遺伝子が用いられているため, 本実験では, あらかじめ選抜マーカーを *URA3* から *TRP1* に置換した pYES-DEST52 を使用した. この cDNA 発現ライブラリーで YMK683 株を形質転換して IAA 酸化酵素のスクリーニング実験に用いた. なお, スクリーニングに先立ち, 酵母を 50  $\mu$ M OxIAA を含む培地で培養したところ, 通常の培地と同様に増殖したことから, IAA 酸化酵素の発現は酵母の増殖を阻害しないと予想した (Fig. 6).

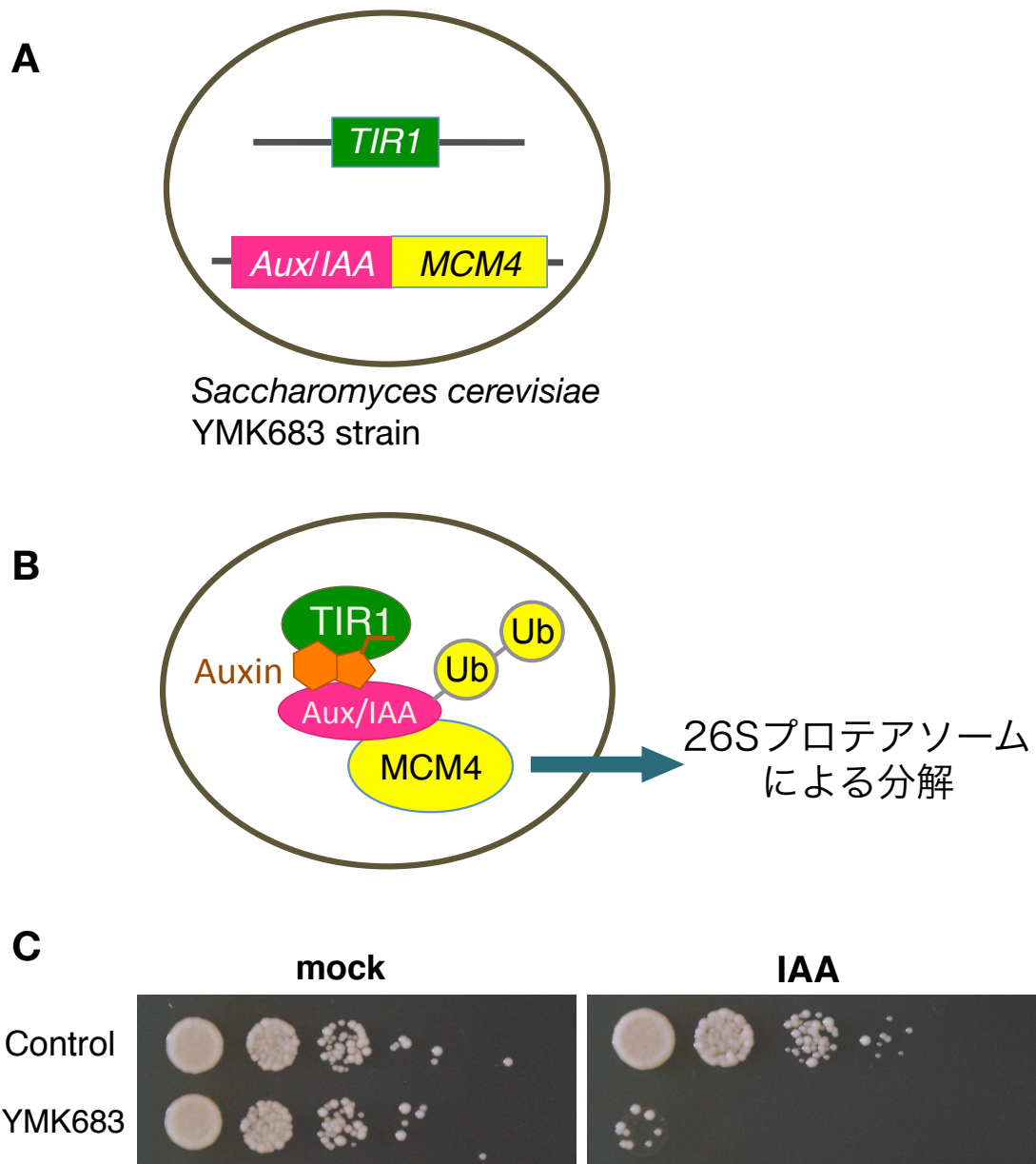
10  $\mu$ M IAA を含む SC-Trp 培地に形質転換体を塗布してスクリーニングを行った結果, 複数の IAA 耐性株が得られた. これらの IAA 耐性株に導入されていた cDNA の配列を解析し, BLAST で検索して候補遺伝子を同定した. Table 3 にスクリーニングで単離された候補遺伝子の一部を記す. 解析の結果, 複数の IAA 耐性体がシロイヌナズナの *Aux/IAA* ファミリーを発現していたことが明らかになった. これらの変異体では, 過剰発現した *Aux/IAA* タンパク質が MCM4- *Aux/IAA* タンパク質と *OsTIR1* の結合を競合阻害するため, MCM4- *Aux/IAA* の分解速度が下がり, IAA 耐性を獲得したと推測される. この結果は, *OsTIR1* と MCM4-AID タンパク質が相互作用する頻度が下がることにより YMK683 株が IAA 存在化でも増殖できることを示唆している.

また, 単離された数種の候補遺伝子には, ジオキシゲナーゼなどの酸化酵素をコードすると予想される遺伝子も複数含まれていた (Table 3).そこで, これらの候補遺伝子を発現した酵母変異株を 10 $\mu$ M IAA を含む培地で振とう培養し, 菌体の抽出物および培地を LC-ESI-MS/MS で分析したが, OxIAA を生成する酵母変異株は見つからなかった.

## 考察

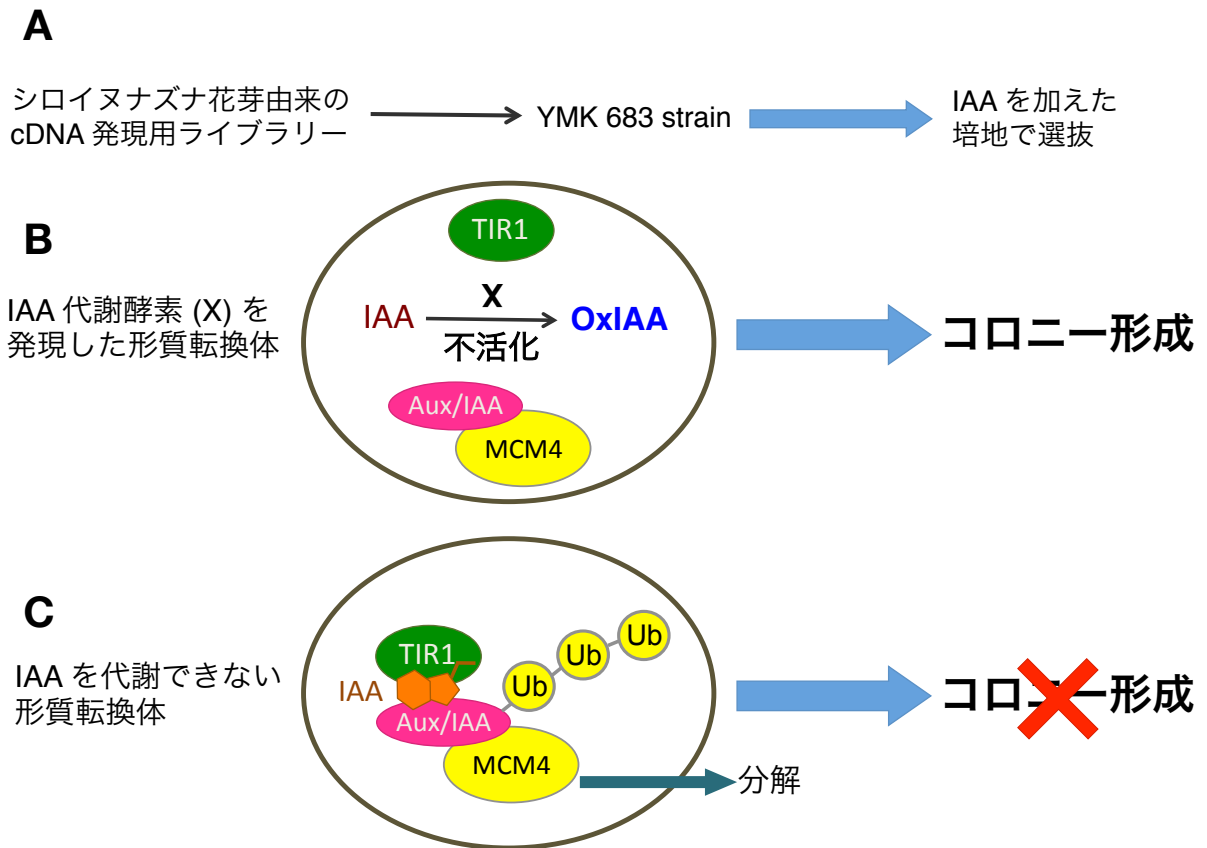
本実験で考案した酵母システムを用いて数回スクリーニングを実施したが、新規 IAA 代謝酵素の単離・同定には至らなかった。今回のスクリーニングで陽性を示した酵母変異体の 3 割近くが、*Aux/IAA* ファミリーを発現していた。これらの酵母変異体では、シロイヌナズナ由来の *Aux/IAA* タンパク質が MCM4-AID タンパク質と競合阻害することにより、OsTIR1 と MCM4-*Aux/IAA* の相互作用が低下するため、IAA 存在下でも増殖できたものと考えられる。また、シロイヌナズナの SCF ユビキチンリガーゼ E3 複合体の構成因子を発現する形質転換体も複数見つかった。このことから、OsTIR1 に加えてシロイヌナズナ SCF ユビキチンリガーゼ E3 複合体の構成因子も発現すると、酵母のユビキチン化能が低下する可能性が考えられる。これらの結果は、予想通り MCM4-*Aux/IAA* の分解が抑えられた形質転換体も IAA 耐性を獲得することを示している。今後さらにスクリーニングを続けることで、新規の IAA 酸化酵素や、ユビキチン-プロテアソーム系の制御に関わる新たなタンパク質を同定できる可能性がある。一方、機能未知のタンパク質をコードした cDNA を発現する変異体が複数獲得されたが、それらの変異体では OxIAA の生成は確認できなかった。これらの機能未知タンパク質には IAA から OxIAA への変換以外の酵素反応を触媒する可能性がある。従って、今後さらにこれらの候補遺伝子の機能解析や酵素活性を詳細に調べることが重要である。

ジベレリン 2 $\beta$  位を酸化する GA 2-oxidase や、アブシジン酸の 8'位水酸化酵素である CYP707A ファミリーなど、様々な植物ホルモンの代謝に 2-オキシグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼや P450 モノオキシゲナーゼが関与することが知られている(Bak *et al.* 2011, Kushiro *et al.* 2004, Mizutani and Ohta 2010, Schomburg *et al.* 2003, Thomas *et al.* 1999)。これらの酵素の活性には、非ヘム鉄、ヘム、2-オキシグルタル酸、NADPH などの補因子が必要である。今回のスクリーニングで使用した一般的な組成の培地では、これらの補因子が不足し、酸化酵素が十分に機能しなかった可能性がある。したがって、培地に補因子を添加することで、酸化酵素を発現する酵母変異体を得る確率が高まると期待している。



**Fig. 3** AID システムの概説

(A) 本実験で使用した出芽酵母 (YMK683 株) の模式図. 染色体 DNA を直線, 遺伝子を四角で示す. (B) オーキシシンに対する YMK683 株の応答. 各タンパク質を小円で示す. 融合タンパク質 MCM4-Aux/IAA は, オーキシシン依存的に TIR1 と結合してユビキチン化され, 酵母の 26S プロテアソーム系で分解される. (C) コントロール株 (w303-1a 株) と YMK683 株のオーキシシン感受性. 段階希釈 (右に向かって 10 倍ずつ希釈) した培養液を, DMSO (mock) または IAA を含む平板培地にスポットして 24 °C で培養した.



**Fig. 4** スクリーニングの概念図

(A) スクリーニングの手順.

(B) IAA 酸化酵素などの IAA 代謝酵素 (X) を発現した形質転換体.

IAA 存在下でも生育でき、コロニーを形成すると予想される.

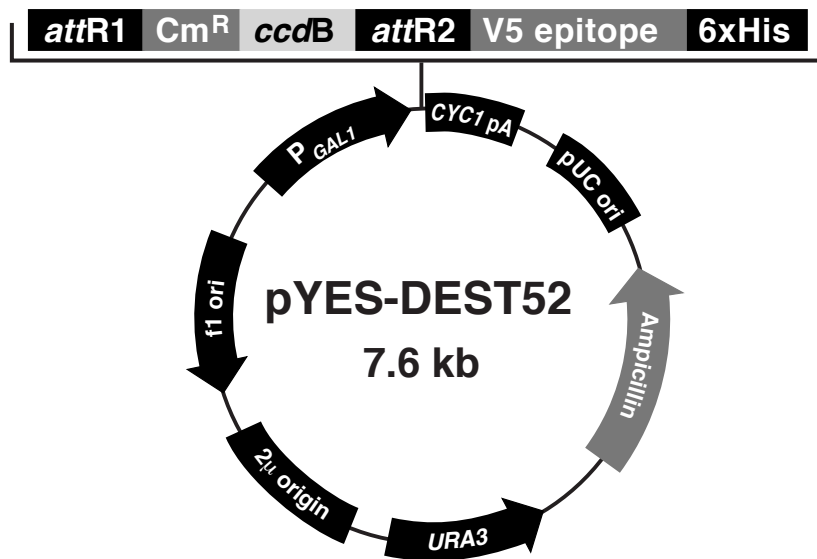
(C) IAA を代謝できない形質転換体. IAA 存在下では、MCM4-Aux/IAA が分解されるため増殖が抑制される.

**Table 2** 土壌で5週間栽培したシロイヌナズナ Col-0 野生型株の各組織に含まれる OxIAA と IAA の内生量.

OxIAA の値は平均値  $\pm$  標準偏差, IAA の値は平均値 (OxIAA 分析は  $n = 3$ , IAA 分析は  $n = 2$ ).

	<b>OxIAA</b>	<b>IAA</b>	(ng/gFW)
Floral bud	512 $\pm$ 119	31.0	
Silique	677 $\pm$ 129	416.1	
Seed	1270 $\pm$ 105		





**Comments for pYES-DEST52**  
**7621 nucleotides**

*GAL1* promoter: bases 1-451

T7 promoter: bases 475-494

*attR1* recombination site: bases 511-635

Chloramphenicol resistance gene: bases 771-1430

*ccdB* gene: bases 1772-2077

*attR2* recombination site: bases 2118-2242

V5 epitope: bases 2265-2306

Polyhistidine (6xHis) region: bases 2316-2333

*CYC1* polyadenylation region: bases 2366-2619

pUC origin: bases 2803-3476

Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 3321-4481 (complementary strand)

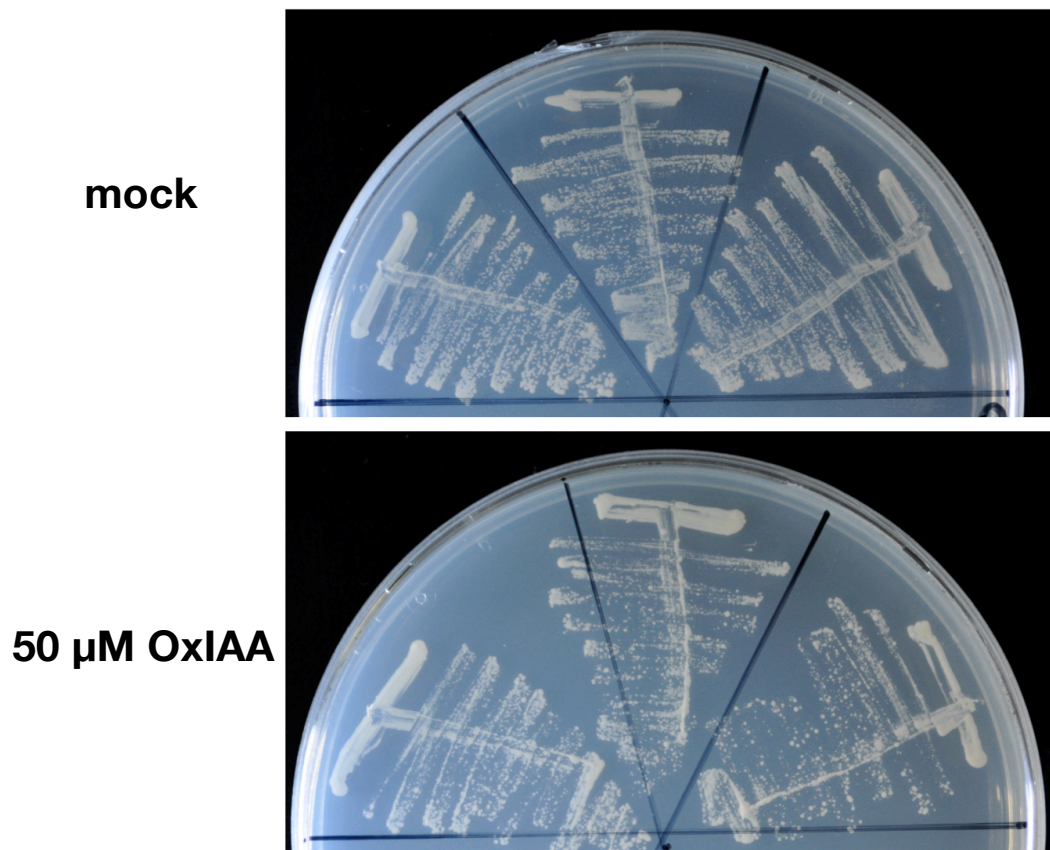
*URA3* gene: bases 4499-5606 (complementary strand)

2 $\mu$  origin: bases 5610-7081

f1 origin: bases 7149-7604 (complementary strand)



**Fig. 5** pYES-DES52 のベクターマップ (Life Technologies 社ウェブサイトより)  
 本章では *URA3* を *TRP1* に置換して使用した。



**Fig. 6** OxIAA 存在下での出芽酵母の生育.

出芽酵母 w303-1a 株を 0.1% DMSO (mock) または 50  $\mu$ M OxIAA を含む SD 培地上に画線して 30 °C で培養した.

**Table 3** 陽性クローン内で発現していたシロイヌナズナ由来の遺伝子

FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein
uncharacterized protein
INVOLVED IN: oxidation reduction; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Gamma-butyrobetaine dioxygenase/Trimethyllysine dioxygenase, N-terminal
putative aquaporin protein (At2g45960)
potassium transporter 1 (KT1)
Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
Arabidopsis thaliana D-xylose-proton symporter-like 2
S-phase kinase-associated protein 1 (SK13)
S-phase kinase-associated protein 1 (ASK2)
IAA7
IAA8
IAA9
IAA13
IAA16
IAA17
IAA19
IAA26
alpha/beta-hydrolase domain-containing protein (AT1G78210)
prolyl oligopeptidase-like protein (AT2G47390)
Arabidopsis thaliana bifunctional enolase 2/transcriptional activator (LOS2)
leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (LRR-RLK)
Arabidopsis thaliana SRPBCC ligand-binding domain-containing protein (AT3G23080)
CONSTANS-like B-box zinc finger protein
Arabidopsis thaliana pentatricopeptide repeat-containing protein (AT1G68980)
tetratricopeptide repeat-containing protein
strong similarity to spermidine synthase (At1g23820)

黄：酸化還元酵素，緑：膜タンパク質または輸送体タンパク質，青：SCF複合体の構成因子，灰：Aux/IAAファミリー

## 第2章 出芽酵母を用いた系による OxIAA グルコシル化酵素の探索

### 緒言

配糖体化は生理活性物質の活性を調節する重要な代謝反応の一つであり、単細胞生物から動植物まで広範な生物に存在する。植物は動物に比べて多様な二次代謝産物を生産することから、植物における配糖体化に関する研究も古くから盛んに行われてきた。配糖体化を受ける化合物はフラボノイドやテルペノイドをはじめ多岐にわたり、これらに転移される糖もグルコース、ガラクトース、ラムノースなど多種多様である(Bowles *et al.* 2005, Gachon *et al.* 2005)。ジベレリン、アブシジン酸、ブラシノステロイド、サリチル酸などの植物ホルモンとグルコースの結合した配糖体もこれまでに同定されている。これら植物ホルモンのグルコシル化 (glucosylation) に関わる遺伝子の解析が行われた結果、グルコシル化が植物の生長制御と環境応答において重要な役割をもつ可能性が示されている (Hasegawa *et al.* 1994, Lee *et al.* 2006, Lim and Bowles 2004, Noutoshi *et al.* 2012, Priest *et al.* 2005, von Saint Paul *et al.* 2011)。

オーキシンの研究分野においても、1970年以前から主にトウモロコシを対象として IAA のグルコシル化に関する研究が進められてきた。トウモロコシ種子の抽出物をアルカリ加水分解して分析した結果、胚乳に含まれる IAA 代謝物のうち 97–99% が 1-O-(indol-3-ylacetyl)- $\beta$ -D-glucose (IAA-Glc), IAA-*myo*-inositol (IAInos), IAINos-glycoside などの配糖体 (エステル型代謝物) であることが報告されている。1980年代には、これらの化合物の生成における初発反応が IAA から IAA-Glc への UDP-グルコース依存的な変換であることが示されており、1994年に IAA のグルコシル化を触媒する UDP-依存型配糖体化酵素 (UGT) をコードする遺伝子 *iaglu* が単離された (Cohen and Bandurski 1982, Leznicki and Bandurski 1988a, Leznicki and Bandurski 1988b, Michalczyk and Bandurski 1982, Szerszen *et al.* 1994)。また、一部のエステルは酵素的に加水分解されて IAA を生成することが知られている (Jakubowska and Kowalczyk 2005, Kowalczyk and Bandurski 1990)。トウモロコシ以外にもシロイヌナズナ、トマト、イネ等からも IAA-Glc が検出されたことから、IAA のグルコシル化は高等植物に広く存在することが予想される (Catalá *et al.* 1992, Iyer *et al.* 2005, Kai *et al.*, 2007, Tam *et al.* 2000)。

UGT ファミリーは植物の配糖体化酵素の中で最大であり、シロイヌナズナのゲノムには 100 を越える *UGT* 遺伝子が存在する。これらは配列類似性に従って 14 のサブグループに分類することが可能で、それぞれ Group A–N と名付けられている (Li *et al.* 2001, Ross *et al.* 2001, Yonekura-Sakakibara and Saito 2009)。大半のサブファミリーから水酸基への

糖転移を触媒する UGT が数多く同定されている中で、Group L にはエステル結合型の代謝物を生成する酵素が複数含まれている。

Jackson らは、Group L に属する UGT をスクリーニングした結果、UGT84B1 が *in vitro* で IAA のグルコシル化を触媒することを発見した。UGT84B1 過剰発現体シロイヌナズナは、矮化、葉の萎縮、根の重力応答の低下など、オーキシシグナルの低下を示唆する表現型を示し、IAA 感受性が低下した。また、UGT84B1 の発現レベルに応じて IAAGlc 内生量が増加することも確認された。これらの結果は、UGT84B1 が植物体内でも IAA を基質として認識すること、UGT84B1 が細胞内の IAA 濃度に影響を与え得ることを強く示唆する(Jackson *et al.* 2002, Jackson *et al.* 2001, Lim and Bowles 2004)。

2010 年には Tognetti らによって、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 誘導性遺伝子である UGT74E2 が IBA グルコシル化を触媒する UGT をコードすることが報告された。UGT74E2 の過剰発現体は、IBA-Glc 内生量の増加と同時に、背丈の低下、枝分かれの増加、頂芽優勢の低下など、オーキシシグナルの減少を示唆する表現型を示した。ただし、*ugt74e2* 欠損変異体の生育は野生型と変わらない。また、UGT74E2 過剰発現体は乾燥ストレスに対して強い耐性を示した。なぜ IBA グルコシル化の促進によってストレス耐性が付与されるのか、その原理は未だ解明されていない(Tognetti *et al.* 2010)。

ごく最近、Jin らは UGT74D1 が *in vitro* で IBA のグルコシル化を触媒することを示した。加えて、IAA、インドール-3-カルボン酸、インドール-3-プロピオン酸や合成オーキシンの 2,4-D や NAA も基質としてグルコシル化されることを *in vitro* で示した。しかし、UGT74D1 過剰発現体シロイヌナズナが、過去に報告された UGT84B1、UGT74E2 の過剰発現体とは異なる表現型を示したことから、Jin らは UGT74D1 の植物における生理的役割はこれらの UGT と異なる可能性もあるとした(Jin *et al.* 2013)。

以上のように、IAA をグルコシル化する UGT84B1、IBA をグルコシル化する UGT74E2、サリチル酸のグルコシル化を触媒する UGT74F1 と UGT74F2 (Dean and Delaney 2008, Dempsey *et al.* 2011, Lim *et al.* 2002)、アブシジン酸を基質として認識し得る UGT71B6 (Priest *et al.* 2006) など、これまでに同定された植物ホルモンのグルコシル化を触媒する酵素はいずれも UGT ファミリーの酵素である。これらの結果、OxIAA グルコシル化酵素も UGT ファミリーに存在する可能性が高いと予想された。そこで、シロイヌナズナの UGT ファミリーから OxIAA グルコシル化酵素を探索した。

## 材料と方法

### 酵母

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の w303-1a 株を使用した.

### 遺伝子材料

理研バイオリソースセンターから, Table 5 に記す RIKEN Arabidopsis full-length cDNA (RAFL) クローンを入手した.

### 1) cDNA 発現用コンストラクトの作成

#### • UGT ファミリーの配列の増幅

各 RAFL クローンを鋳型として, Table 4 に記したプライマーを用いた PCR により *UGT* の cDNA を含む断片を増幅した. PCR は, 0.2 mL チューブ内で以下の組成の反応液を調製し, 以下の反応温度で行った. 増幅断片の長さを 1% アガロースゲル電気泳動により確認した後, PCR purification Kit (Qiagen) を用いて PCR 産物を精製した.

	( $\mu$ L)
KOD FX neo	0.5
2 $\times$ KOD FX neo buffer	15
dNTP (each 2 mM)	6
F_Primer	0.9
R_Primer	0.9
RAFL clone	1
milliQ water	5.7
<hr/>	
Total	30

#### 反応温度

94 °C, 2min – (98 °C, 10 sec – 58 °C, 30 sec – 68 °C, 1 min 30 sec)  $\times$  33 cycles

### • BP 反応

0.2 mL チューブに、精製した PCR 産物、pDONR207、TE buffer (pH 8.0)、BP clonase II Enzyme Mix (Invitrogen) を加え、ピペティングで混合して 25 °C に 1 h おいた。Proteinase K 0.5  $\mu$ L を加えて 37°C に 10 min おいた後、氷上に保存した。

### • エントリークローンの精製

BP 反応液と大腸菌 DH5 $\alpha$  コンピテントセル 30  $\mu$ L を混合して氷上に 15 min おいた後、42 °C で 30 sec 加熱し、速やかに氷上で冷却した。SOC 培地 150  $\mu$ L を加えて 37 °C で 30 min 振とう培養した。培養液の 70  $\mu$ L を 15  $\mu$ g/mL ゲンタマイシン (Gen) を含む LB 寒天培地に塗布し、37 °C で 16 h 培養した。コロニーPCR によって、生育したコロニーへのプラスミドの導入を確認した。プラスミドの導入が確認できた形質転換体を、15  $\mu$ g/mL Gen を含む 2  $\times$  YT 培地 2 mL に植菌して 37 °C で 16 h 振とう培養した。QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を用いて培養液からプラスミドを精製した。これをエントリークローンとした。

### • LR 反応

Kanno らの方法に従い *GAL1* プロモーターを *ADH1* プロモーターに置換した pYES-DEST52 を使用した (Kanno *et al.* 2012)。0.2 mL チューブに、エントリークローン、pYES-DEST52、TE buffer (pH 8.0)、LR clonase II Enzyme Mix (Invitrogen) を加え、ピペティングで混合して 25 °C に 1 h おいた。Proteinase K 0.5  $\mu$ L を加えて 37°C に 10 min おいた。

### • UGT 発現用コンストラクトの精製

LR 反応液と大腸菌 DH5 $\alpha$  コンピテントセル 30  $\mu$ L を混合して氷上に 15 min おいた後、42 °C で 30 sec 加熱し、速やかに氷上で冷却した。SOC 培地 150  $\mu$ L を加えて 37 °C で 30 min 振とう培養した。培養液の 70  $\mu$ L を 100  $\mu$ g/mL アンピシリン (Amp) を含む LB 寒天培地に塗布し、37 °C で 16 h 培養した。コロニーPCR により、生育したコロニーへのプラスミドの導入を確認した。プラスミドの導入が確認できた形質転換体を、15  $\mu$ g/mL Amp を含む 2  $\times$  YT 培地 2 mL に植菌して 37 °C で 16 h 振とう培養した。QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を用いて培養液からプラスミドを精製した。これを UGT 発現用コンストラクトとした。

## 2) スクリーニング

### ・酵母コンピテントセルの作成

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* w303-1a 株のグリセロールストックを YPDA 寒天培地に画線してコロニーを形成させた。コロニーから菌体を掻き取って 10 mL の YPDA 液体培地に植菌し、30 °C で振とう培養した。培養液の OD<sub>600</sub> が 0.8 程度に達した時点で遠心 (800 ×g, 5 min) し、上清を捨てた。菌体を 5 mL の溶液 1 に懸濁し、再び遠心して上清を捨てた。菌体を 200 μL の溶液 1 に懸濁し、1.5 mL チューブに 20 μL ずつ分注してパラフィルムで密封した。チューブをビニル袋に入れ、その上からキムタオルを 5 枚重ねて包み、- 80 °C フリーザ内で凍結させた。これをコンピテントセルとした。

#### YPDA 液体培地

1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, adenine

#### YPDA 平板培地

YPDA 液体培地 + 2% agar

### ・酵母の形質転換

コンピテントセルをフリーザから出し、発現用コンストラクト 1 μL と 10 mg/mL キャリアー DNA 1 μL を乗せ、37 °C に約 15 sec おいた。コンピテントセルが融け始めたら室温で 140 μL の溶液 2 を加え、ボルテックスで 1 min 攪拌した後 30 °C に 1 h 静置した。遠心 (12,000 ×g, 5 sec) して上清を除き、菌体を 1 mL の溶液 3 に懸濁した。懸濁液の 100 μL をトリプトファン要求性 (SC-Trp) 寒天培地に塗布して 30 °C で 2 日間培養した。

#### 溶液 1

1 M ソルビトール, 10 mM Bicine-NaOH (pH 8.35), 3% エチレングリコール, 5% DMSO

#### 溶液 2

40% PEG1000, 0.2 M Bicine-NaOH (pH 8.35)

#### 溶液 3

0.15 M NaCl, 10 mM Bicine-NaOH (pH 8.35)



### • OxIAA グルコシル化活性の確認

形質転換体のコロニーを 10 mL の SC-Trp 液体培地に植菌し、30 °C で 16 h 振とう培養したものを前培養液とした。前培養液を SC-Trp 液体培地に加えて OD<sub>600</sub> が約 0.1 の懸濁液 10 mL を調製し、OxIAA (最終濃度 10 μM) を加えて 30 °C で 24 h 振とう培養した。培養液を遠心 (3000 ×g, 5 min, 4°C) して上清を別のチューブに移した。上清を Millex-GS 0.22 μm フィルターユニット (Merck Millipore) でろ過した後、10 μL を HPLC に注入した。第 4 章に記した方法に従って、HPLC 分取、固相抽出を行い、LC-ESI-MS/MS で分析した。

反応の基質および分析の標品とした OxIAA と OxIAA-Glc は、いずれも岡山理科大学理学部・林謙一郎教授が合成された化合物をご提供いただき使用した。

**Table 4** 本章で使用したプライマー

Primer name	Sequence (5' to 3')
RAFL04-06_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGCCAAATCGGCCCTCGAGTTAA
RAFL04-06_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGCCCTTATGGCCGAGCTCTTTT
RAFL07-11_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGCCAAATCGGCCGAGCTCGAATT
RAFL07-11_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGGCCCTTATGGCCGGATCCAAGA
RAFL12-25_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGCCAAATCGGCCGAGCTCGAATT
RAFL12-25_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGGCCCTTATGGCCGGATCCAA

下線部は *attB* 配列を示す。

## 結果

シロイヌナズナのゲノムには UGT をコードすると予想される遺伝子が 100 以上存在し、これらは翻訳後のアミノ酸配列に従って Group A から Group N まで 14 グループに分類される。シロイヌナズナの UGT ファミリーから水酸基への糖転移を触媒する酵素が多数同定されている中、Group L には IAA をグルコシル化する UGT84B1, IBA をグルコシル化する UGT74E2, アントラニル酸をグルコシル化する UGT74F2, インドールグルコシノレート生合成に関わる UGT74B1 など、カルボキシ基を持つ化合物を基質として、エステル結合の形成を触媒する UGT が多数存在する (Fig. 7)。これらの理由から、Group L に属する 17 種類の UGT のいずれかが OxIAA のグルコシル化を触媒する可能性が高いと推測した (Caputi *et al.* 2012, Yonekura-Sakakibara and Hanada 2011)。

そこで、出芽酵母 (*Saccharomyces seveviciae*) を用いて Group L から OxIAA-グルコシル化酵素 (OxIAA-glucosyltransferase) をスクリーニングするシステムを構築した。出芽酵母の細胞壁には細胞質内の UDP-グルコースを材料として合成される  $\beta$ -1,3-グルカン (40%) とキチン (1–3%) が含まれており、その細胞質には多量の UDP-グルコースが存在している (Douglas *et al.* 1994, Lesage and Bussey 2006, Oka and Jigami 2006)。よって、出芽酵母の細胞内で UGT 遺伝子を発現させ、OxIAA の存在下で培養することにより、UDP-グルコースを補因子とする OxIAA グルコシル化酵素を同定できると予想した。

理化学研究所バイオリソースセンターが提供する RIKEN Arabidopsis full-length cDNA (RAFL) clones の中から、Group L に属する 13 遺伝子の cDNA を入手した (Table 5)。UGT75B2 と UGT84B2 の cDNA は提供されていないが、組換えタンパク質を用いた酵素試験によって、UGT75B2 と UGT84B2 は OxIAA のグルコシル化を触媒しないことが既に確認されている (Jackson *et al.* 2001)。入手した cDNA を鋳型として、Table 5 に記すプライマーを用いた PCR を行い、増幅断片を BP 反応によってエンタリーベクター pDONR207 に挿入した。続いて、LR 反応によって、挿入断片をタンパク質発現用ベクター pYES-DEST52 にサブクローニングし、UGT 発現用コンストラクトを作成した。

これを用いて出芽酵母 *S. cerevisiae* w303-1a 株を形質転換し、形質転換体を 10  $\mu$ M OxIAA を含む液体培地で 24 h 振とう培養した。その培養液を遠心して菌体と上清を分け、ろ過した上清を HPLC で分取した。OxIAA-Glc が溶出すると予想された画分 (16.5–18.5 min) を回収し、Oasis HLB column で精製した後 LC-ESI-MS/MS (ネガティブイオンモード) で分析した。13 種類の形質転換体をスクリーニングした結果、UGT74D1 発現用コンストラクトを導入した形質転換体の培地上清から、分子イオン  $m/z = 352.1$ 、プロダクトイオン  $m/z = 190.1$  において OxIAA-Glc 標品と保持時間の一致するピークが検出された。

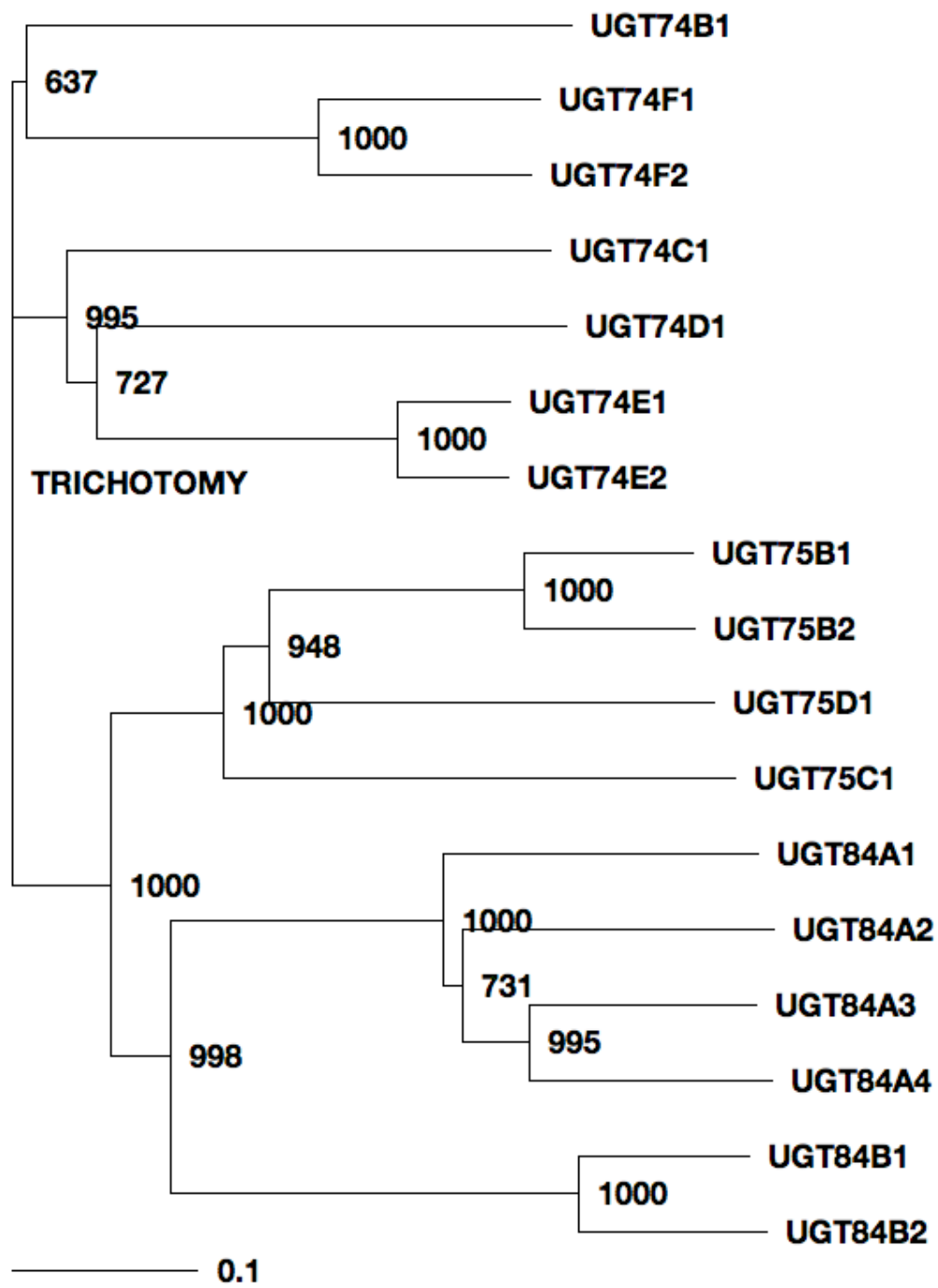
(Fig. 8). また、菌体の 80% アセトン抽出物を同様の手順で分析した場合も、同様のピークを検出した。これらの結果から、UGT74D1 を OxIAA グルコシル化酵素の候補として選抜した (Table 6).

## 考察

出芽酵母を使った活性スクリーニングの結果、*UGT74D1* を発現した出芽酵母において OxIAA がグルコシル化されることを見いだした。今回、シロイヌナズナ UGT Group L の 17 遺伝子のうち *UGT74E1*, *UGT74E2*, *UGT75B2*, *UGT84B2* の 4 遺伝子については cDNA が理研バイオリソースセンターから提供されていなかったため活性スクリーニングを行うことができなかった。しかし、このうち *UGT75B2* と *UGT84B2* については、組換えタンパク質を用いた *in vitro* の試験で OxIAA の変換を触媒しないことが既に報告されていることから、*UGT75B2* および *UGT84B2* がシロイヌナズナで OxIAA-Glc の生成に関わる可能性は低いと考えられる (Jackson *et al.* 2001)。一方、*UGT74E2* については IBA を代謝することが報告されているが、OxIAA に対する酵素活性はこれまでに報告されていない (Tognetti *et al.* 2010)。*UGT74E1* の活性についても報告されていない。Jackson の報告において *UGT84B1* が IAA の他にも IBA, インドール-3-プロピオン酸, ケイ皮酸に対して高い活性を示しているように、UGT によっては基質特異性が低いことから、*UGT74E1* および *UGT74E2* については組換えタンパク質を用いた酵素活性試験や、機能欠損型変異体および遺伝子過剰発現体を用いた解析などが必要である。

本章の実験結果は、出芽酵母を用いた活性スクリーニングが UGT の機能解析の手法として有効であることを示した。これまで可溶性酵素の機能解析をする際には、大腸菌等に組換えタンパク質を発現させ、精製したタンパク質の酵素活性を試験する手法が広く用いられてきた (Jackson *et al.* 2001)。しかし、候補遺伝子の数が多い場合には組換えタンパク質を精製し、酵素活性を検出するために多くの時間と労力が必要となる。また、酵素の活性を失活させずに精製するには、しばしば高い技術が要求されることから多検体の 1 次スクリーニングには不向きである。これに対して、本章で構築した酵母の活性スクリーニング系はタンパク質の精製を伴わないため簡便である。対象の遺伝子が数十個程度であれば、一度に形質転換してアッセイすることが可能である。材料と手法の項で述べたように、本実験では形質転換体の作成に 1-3 日と形質転換体を用いたアッセイに 1-2 日の計 1 週間程度で全行程を終了した。このスクリーニング系を利用すれば、植物の配糖体化酵素の中でも最大のファミリーである UGT ファミリーの中から様々な新規酵素を探索できると予想している。本スクリーニング法の欠点としては、酵素活性が検出できない場合に標的タンパク質が活性をもたないのか、それとも酵母に導入された遺伝子から活性を検出するために必要な量のタンパク質が十分に発現されていないのかを直ぐに判断できない点が挙げられる。*in vitro* の酵素活性試験の他、生体内における酵素機能および遺伝子の生理的役割を確かめるには遺伝子欠損変異体や過剰発現体の解析が重要である。第 3 章で *in vitro* で

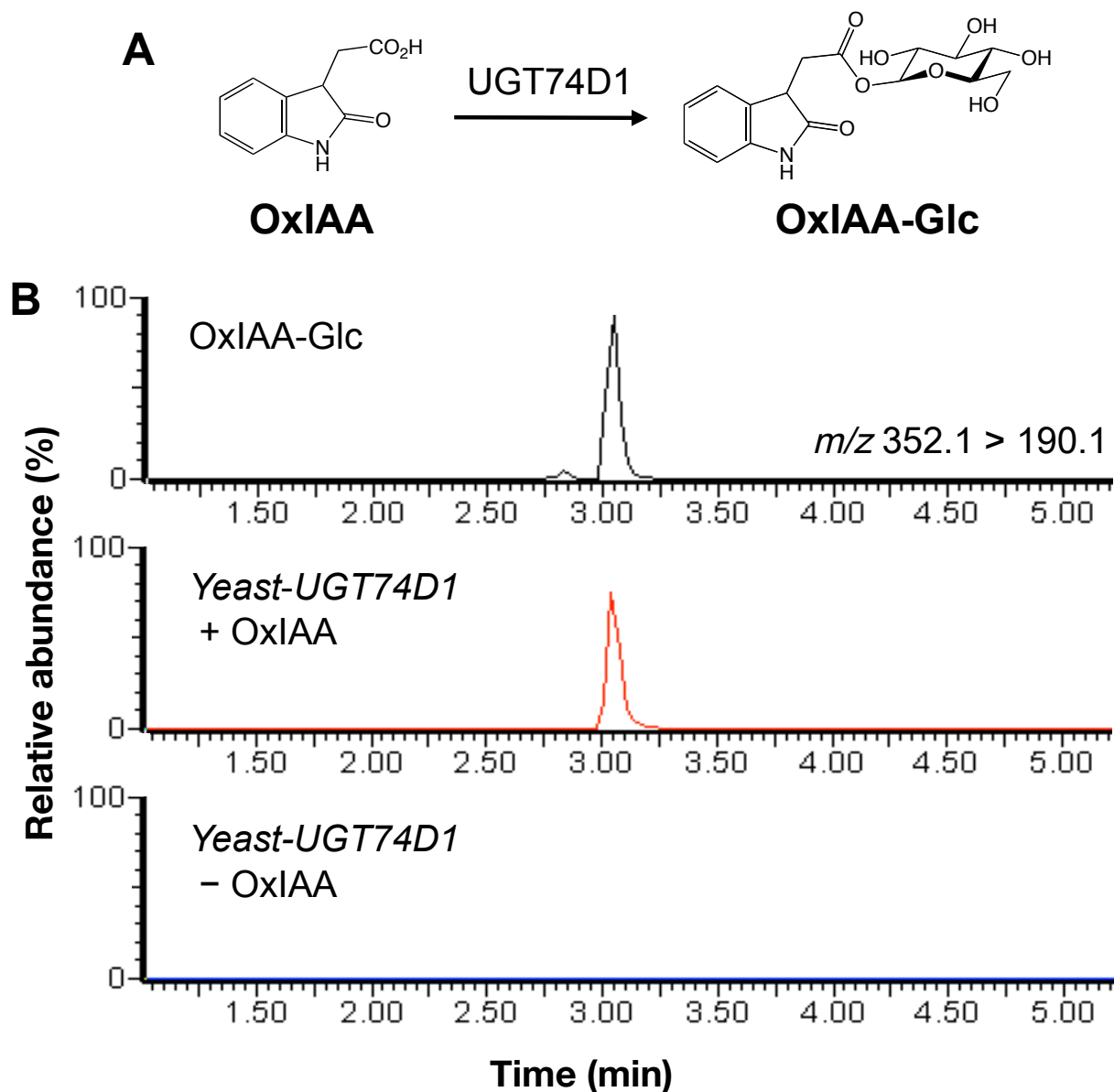
の酵素活性について検証し，第 4 章以降で変異体を用いた植物体内での UGT74D1 の生理的役割を検証する。



**Fig. 7** Group Lに属するシロイヌナズナ UGT ファミリーの系統樹. 数字はブートストラップ値を示す (反復回数 1000 回).

**Table 5** 本実験に使用した RIKEN Arabidopsis full-length cDNA (RAFL) clones.

Gene	AGI code	Resource number	cDNA clone name	Primers for vector construction
<i>UGT74B1</i>	AT1G24100	pda00614	RAFL04-19-M06	RAFL04-06_F & RAFL04-06_R
<i>UGT74F1</i>	AT2G43840	pda15474	RAFL07-84-M10	RAFL07-11_F & RAFL07-11_R
<i>UGT74F2</i>	AT2G43820	pda04176	RAFL07-12-I23	RAFL07-11_F & RAFL07-11_R
<i>UGT74C1</i>	AT2G31790	pda04758	RAFL08-13-B20	RAFL07-11_F & RAFL07-11_R
<i>UGT74D1</i>	AT2G31750	pda09424	RAFL06-15-P19	RAFL04-06_F & RAFL04-06_R
<i>UGT74E1</i>	AT1G05675	-	-	-
<i>UGT74E2</i>	AT1G05680	-	-	-
<i>UGT75B1</i>	AT1G05560	pda01666	RAFL09-11-P10	RAFL07-11_F & RAFL07-11_R
<i>UGT75B2</i>	AT1G05530	-	-	-
<i>UGT75D1</i>	AT4G15550	pda05237	RAFL09-09-C15	RAFL07-11_F & RAFL07-11_R
<i>UGT75C1</i>	AT4G14090	pda04986	RAFL08-18-I03	RAFL07-11_F & RAFL07-11_R
<i>UGT84A1</i>	AT4G15480	pda12406	RAFL11-02-N24	RAFL07-11_F & RAFL07-11_R
<i>UGT84A2</i>	AT3G21560	pda08060	RAFL09-24-B02	RAFL07-11_F & RAFL07-11_R
<i>UGT84A3</i>	AT4G15490	pda07420	RAFL05-18-O17	RAFL04-06_F & RAFL04-06_R
<i>UGT84A4</i>	AT4G15500	pda20336	RAFL21-84-C22	RAFL12-25_F & RAFL12-25_R
<i>UGT84B1</i>	AT2G23260	pda11460	RAFL19-68-D14	RAFL12-25_F & RAFL12-25_R
<i>UGT84B2</i>	AT2G23250	-	-	-



**Fig. 8** *UGT74D1* を発現した出芽酵母による OxIAA の OxIAA-Glc への変換

(A) 本実験で新たに示された, *UGT74D1* が触媒する反応. (B) OxIAA-Glc 標品 (OxIAA-Glc), *UGT74D1* を発現する酵母を OxIAA 存在下で培養した際に生成した代謝物(Yeast-*UGT74D1* + OxIAA), OxIAA を与えずに培養した後の培地 (Yeast-*UGT74D1* - OxIAA) から得られた MS/MS クロマトグラム.



**Table 6** Group L に属するシロイヌナズナ *UGT* ファミリーの出芽酵母内における活性.

Gene	AGI code	OxIAA-Glc
<i>UGT74B1</i>	AT1G24100	ND
<i>UGT74F1</i>	AT2G43840	ND
<i>UGT74F2</i>	AT2G43820	ND
<i>UGT74C1</i>	AT2G31790	ND
<i>UGT74D1</i>	AT2G31750	Detected
<i>UGT74E1</i>	AT1G05675	NT
<i>UGT74E2</i>	AT1G05680	NT
<i>UGT75B1</i> <sup>a</sup>	AT1G05560	ND
<i>UGT75B2</i> <sup>a</sup>	AT1G05530	NT
<i>UGT75D1</i>	AT4G15550	ND
<i>UGT75C1</i>	AT4G14090	ND
<i>UGT84A1</i>	AT4G15480	ND
<i>UGT84A2</i>	AT3G21560	ND
<i>UGT84A3</i>	AT4G15490	ND
<i>UGT84A4</i>	AT4G15500	ND
<i>UGT84B1</i>	AT2G23260	ND
<i>UGT84B2</i> <sup>a</sup>	AT2G23250	NT

<sup>a</sup> 以前の報告において OxIAA に対する活性が検出限界以下 (Jackson et al., 2001)

Detected : OxIAA を含む培地で OxIAA-Glc の生成を確認.

ND : OxIAA を含む培地で OxIAA-Glc の生成なし.

NT : 本章の実験には使用せず.

### 第3章 組換えタンパク質を用いた UGT74D1 の酵素機能解析

#### 緒言

前章では、シロイヌナズナ UGT ファミリーの活性スクリーニングにより、OxIAA グルコシル化酵素をコードする候補遺伝子として *UGT74D1* を単離した。しかし、本研究と同じ頃、UGT74D1 はシロイヌナズナの IBA や IAA をグルコシル化する新規オーキシン代謝酵素として報告された (Jin *et al.* 2013)。この報告の中で、Jin らは UGT74D1 組換えタンパク質の基質特異性が比較的 low、IBA や IAA 以外にも 2,4-D や NAA など様々な化合物をグルコシル化することを示した。本実験で得られた UGT74D1 が *in vitro* で本当に OxIAA に対する酵素活性をもつのか、また他の化合物に比べてどの程度 OxIAA に対する基質特異性を示すのか明らかにすることが重要である。

そこで本章では、大腸菌を用いてグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質を調製し、UGT74D1 の OxIAA グルコシル化活性を解析した。さらに、OxIAA と IAA に対する UGT74D1 の基質特異性を評価するために、両化合物に対する GST-UGT74D1 の酵素反応速度を解析した。

## 材料と方法

### 1) タンパク質発現用コンストラクトの作成

#### • *UGT74D1* 配列の増幅

前章で作成したエントリーライブラリーを鋳型として, Table 7 に記すプライマーを用いて以下の組成と温度条件で PCR した. 反応液を 1% アガロースゲルで電気泳動し, 約 1.4 kbp の増幅断片を含むゲルを切り出して精製した.

	( $\mu$ L)
KOD FX neo	1.0
2 $\times$ KOD FX neo buffer	25
dNTP (each 2 mM)	10
<i>UGT74D1</i> _F	1.5
<i>UGT74D1</i> _R	1.5
Entry library	0.4
milliQ water	11.6
<hr/>	
Total	50

94 °C, 2min – (98 °C, 10 sec – 55 °C, 30 sec – 68 °C, 1 min 30 sec)  $\times$  31 cycles

#### • エントリーベクターへの挿入

精製した *UGT74D1* 断片, pDONR207 (Invitrogen), TE buffer (pH 8.0), BP clonase II Enzyme Mix を混合してを混合して 25 °C に 1 h おいた後, Proteinase K を加えて 37 °C に 10 min おいた. この反応液を用いて, 大腸菌 DH5  $\alpha$  を以下の手順で形質転換した. はじめに, 大腸菌 DH5  $\alpha$  のコンピテントセル 50  $\mu$ L と反応液 0.4  $\mu$ L を緩やかに混合して氷上に 15 min おいた後, 42 °C で 30 sec 加熱した. 氷上で冷却した後, SOC 培地 250  $\mu$ L を加えて 37 °C で 30 min 振とうした. この懸濁液の 100  $\mu$ L を, 15  $\mu$ g / mL Gen を含む LB 平板培地に塗布し, 37 °C で 16h 培養した. コロニーPCR によってプラスミドの導入を確認した.

### ・プラスミド精製

単一コロニーを掻き取って 15 µg/mL Gen を含む 2×YT 培地に植菌し, 37 °C で 16 h 振とう培養した. QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を用いて培養液からプラスミドを精製した. このプラスミドを *pDONR207::UGT74D1* とした.

### ・タンパク質発現用ベクターへの挿入

*pDONR207::UGT74D1*, pDEST15 (Invitrogen) , LR clonaseII Enzyme Mix (Invitrogen) を混合して 25 °C に 1 h おいた後, Proteinase K を加えて 37 °C に 10 min おいた. 反応液 1 µL を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  を形質転換し, 100 µg / mL (Amp) を含む LB 平板培地に塗布して 37 °C で 16h 培養した. コロニーPCR によりプラスミドの導入を確認した.

### ・プラスミド精製

単一コロニーから菌体を掻き取って 100 µg / mL Amp を含む 2×YT 培地 2 mL に植菌し, 37°C で 12 h 振とう培養した. QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を用いて培養液からプラスミドを精製した. これを *pEXP15::UGT74D1* とした.

## 2) 組換えタンパク質の調製

### ・大腸菌の培養

大腸菌 BL21 Star (DE3) のコンピテントセルと *pEXP15::UGT74D1* を混合し, 上記と同様の手順で形質転換した. 形質転換体を 100 µg / mL カルベニシリンを含む LB 液体培地 2 mL に植菌し, 18 °C で 36 h 振とう培養したものを前培養液とした. 100 µg / mg カルベニシリンを含む Terrific broth 培地 600 mL に前培養液 600 µL を加えて 18 °C で振とう培養した. OD<sub>600</sub> が 0.6 前後に達した時点で終濃度 1 mM の IPTG を添加した. さらに 48 h 培養を続けた後, 遠心 (3000 ×g, 15min, 4 °C) して集菌し, 培養液の 25% (v/v) の Lysis buffer に懸濁して再び遠心 (3000 ×g, 15min, 4 °C) した. 上清を捨て, 菌体 1g あたり 5 mL の Lysis Buffer を加えてピペッティングにより懸濁した.

#### Lysis Buffer

8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/12H<sub>2</sub>O, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 1 mM Dithiothreitol

### ・菌体の破碎

BRANSON Advanced-Digital SONIFIER にマイクロチップを取り付け、振幅 12 % で超音波処理を行った。超音波処理 10 sec ごとに氷上で 30 sec 冷却しながら、計 60 sec 処理した。終濃度 1%となるように Triton X-100 を加えて穏やかに混合した後、遠心 (7500 ×g, 30 min, 4 °C) し、上清を可溶性画分として回収した。

### ・アフィニティー精製

可溶性画分を Millex-HV 0.45 μm フィルターユニット (Merck Millipore) でろ過した後、Lysis Buffer で洗浄した Glutathion Sepharose 4B (GE Helthcare) を加えて 4 °C で 2 h 穏やかに攪拌した。これをカラムにアプライし、自然落下により通過画分を流出させた後、10 mL の Lysis Buffer で 3 回洗浄した。続いて Elution Buffer 500 μL を流し、溶出画分を 1.5 mL チューブに回収した。溶出操作は 10 回繰り返した。各チューブから 2.5 μL の溶出画分をとり、Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) を用いてタンパク質濃度を見積もった。タンパク質濃度が高いと推測された画分をまとめ、ピペティングで混合した。終濃度 20% (w/v) のグリセロールを加えた後、100 μL ずつ分注して液体窒素中で速やかに凍結させた。酵素試験まで -80 °C で保存した。

#### Elution buffer

10 mM reduced glutathione in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

## 3) 酵素試験

-80 °C 冷凍庫から精製タンパク質溶液を取り出し、氷上で融解させた。氷上にて下記の組成で反応液を調製し、30 °C に設定したヒートブロック上に静置した。反応液と等量のアセトニトリルを添加して反応を停止した。

### ・OxIAA に対する反応速度の解析

氷上でタンパク質を除く反応液 45 μL を調製した。30 °C に 2 min 静置した後、HEPES buffer (pH7.5) で希釈した精製タンパク質溶液 5 μL を加えて反応を開始した。30 °C に 4 min 静置した後、1 ng/μL [Phenyl-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>] OxIAA-Glc を含むアセトニトリル 50 μL を加え、Vortex により混合して反応を停止した。反応液を遠心 (15,000 ×g, 10 min, 4 °C) し、上清を 50 %アセトニトリルで 10 倍に希釈してから LC-ESI-MS/MS で分析した。生成した OxIAA-Glc の量から反応速度を算出した。LC-ESI-MS/MS 分析の詳細は、第 4 章、材料

と手法の項に記す.

OxIAA と [Phenyl-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>] OxIAA-Glc は, 岡山理科大学理学部・林謙一郎教授が合成された化合物をご提供いただいて使用した.

反応液の組成

HEPES (pH 7.5)	50 mM
UDP-glucose	2.5 mM
2-mercaptoethanol	0.1% (v/v)
OxIAA	1–40 μM
Purified protein	
milliQ water	
<hr/>	
Total volume	50 μL

#### ・ IAA に対する反応速度の解析

氷上でタンパク質を除く反応液 45 μL を調製した. 30 °C に 2 min 静置した後, 精製タンパク質溶液 5 μL を加えて反応を開始した. 30 °C に 8 min 静置した後, アセトニトリル 50 μL を加えて反応を停止した. 反応液を遠心 (15,000 ×g, 10 min, 4 °C) し, 上清を HPLC に注入した. HPLC の条件は, 第 4 章, 材料と手法・HPLC 分取の項に記すものと同じである. 励起光 280 nm / 蛍光 355 nm で検出したピークの面積から IAA-Glc を定量した. 各反応液は HPLC 分析に使用するまで -80 °C に保存した.

生成物の同定と定量に用いた IAA-Glc 標品は, 岡山理科大学理学部・林謙一郎教授が合成された化合物を使用した.

反応液の組成

HEPES (pH 7.5)	50 mM
UDP-glucose	2.5 mM
2-mercaptoethanol	0.1% (v/v)
IAA	10–200 μM
Purified protein	
milliQ water	
<hr/>	
Total volume	50 μL

**Table 7** 本章で使用したプライマー

Primer name	Sequence (5' to 3')
UGT74D1_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGGGAGAGAAAGCGAAAGCAA
UGT74D1_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCTCACAATTTTAGCAACAACTC

下線部は *attB* 配列を示す.

## 結果

UGT74D1 が OxIAA のグルコシル化を触媒する直接的な証拠を得るために、大腸菌に生産させた組換えタンパク質を用いて *in vitro* の酵素活性試験を行った。はじめに、シロイヌナズナ mRNA から合成された cDNA を鋳型として、Table 1 に示したプライマーを用いて PCR を行い、UGT74D1 の CDS 配列を増幅した。増幅断片を BP 反応によって pDONR207 に挿入した後、LR 反応によって GST 融合タンパク質発現用ベクター pDEST15 に移した (Fig. 9)。これを GST-UGT74D1 発現用コンストラクト *pEXP15::UGT74D1* とした。このコンストラクトで形質転換した大腸菌 BL21 Star (DE3) 株を、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  カルベニシリンを含む TB 培地に植菌し、18 °C で培養した。IPTG 添加による発現誘導の 48 h 後に菌体を回収し、60 sec の超音波処理によって菌体を破碎した。Triton-X100 を添加した後、遠心 (7,500  $\times g$ , 30 min, 4°C) し、上清を可溶性画分として回収した。Glutathion Sepharose 4B(GE Healthcare) を用いて、可溶性画分から GST 融合タンパク質を精製した。SDS-PAGE により精製タンパク質のサイズを確認したところ、予想された GST-UGT74D1 タンパク質のサイズ (75 kDa) と一致した (Fig. 10)。

UGT74D1 と OxIAA の酵素反応液に含まれる OxIAA-Glc は LC-ESI-MS/MS で分析した。OxIAA-Glc の分子イオン ( $m/z$  352.1) から生成するプロダクトイオン ( $m/z$  190.1) を測定したところ、UGT74D1 の酵素反応液からも OxIAA-Glc 標品と同じ保持時間 (3.06 min) にプロダクトイオン ( $m/z$  190.1) が検出された。一方、煮沸した精製タンパク質を用いた場合には、この OxIAA-Glc 由来のプロダクトイオンは検出されなかった (Fig. 11, 12)。この結果、GST-UGT74D1 が *in vitro* で OxIAA グルコース転移酵素活性を示すことが確認された。

UGT74D1 と IAA の酵素反応液中の IAA-Glc は HPLC-蛍光検出システムで分析した。酵素反応液の上清を HPLC に導入し、励起光 280nm/蛍光 355 nm で代謝物を分析したところ、保持時間 (21.0 min) に IAA-Glc 標品と一致するピークが検出された (Fig. 13)。一方、煮沸した精製タンパク質を用いた反応液からは、この IAA-Glc 由来のプロダクトイオンは検出されなかった。この結果、Jin らの報告の通り、UGT74D1 が *in vitro* で IAA のグルコシル化も触媒することが示された (Jin *et al.* 2013)。

続いて、UGT74D1 の基質の選択性を調べるために、OxIAA と IAA をそれぞれ基質とした場合の速度パラメータを求めた。反応液は HEPES buffer (pH7.5)、反応温度は 30 °C に設定した。はじめに、OxIAA に対する反応速度を測定するために、1–40  $\mu\text{M}$  の OxIAA を含む反応液を調製した。それぞれの反応液に GST-UGT74D1 を加えて 30 °C で 4 min 反応させた後、[phenyl- $^{13}\text{C}_6$ ] OxIAA-Glc を含むアセトニトリルを加えて反応を停止した。



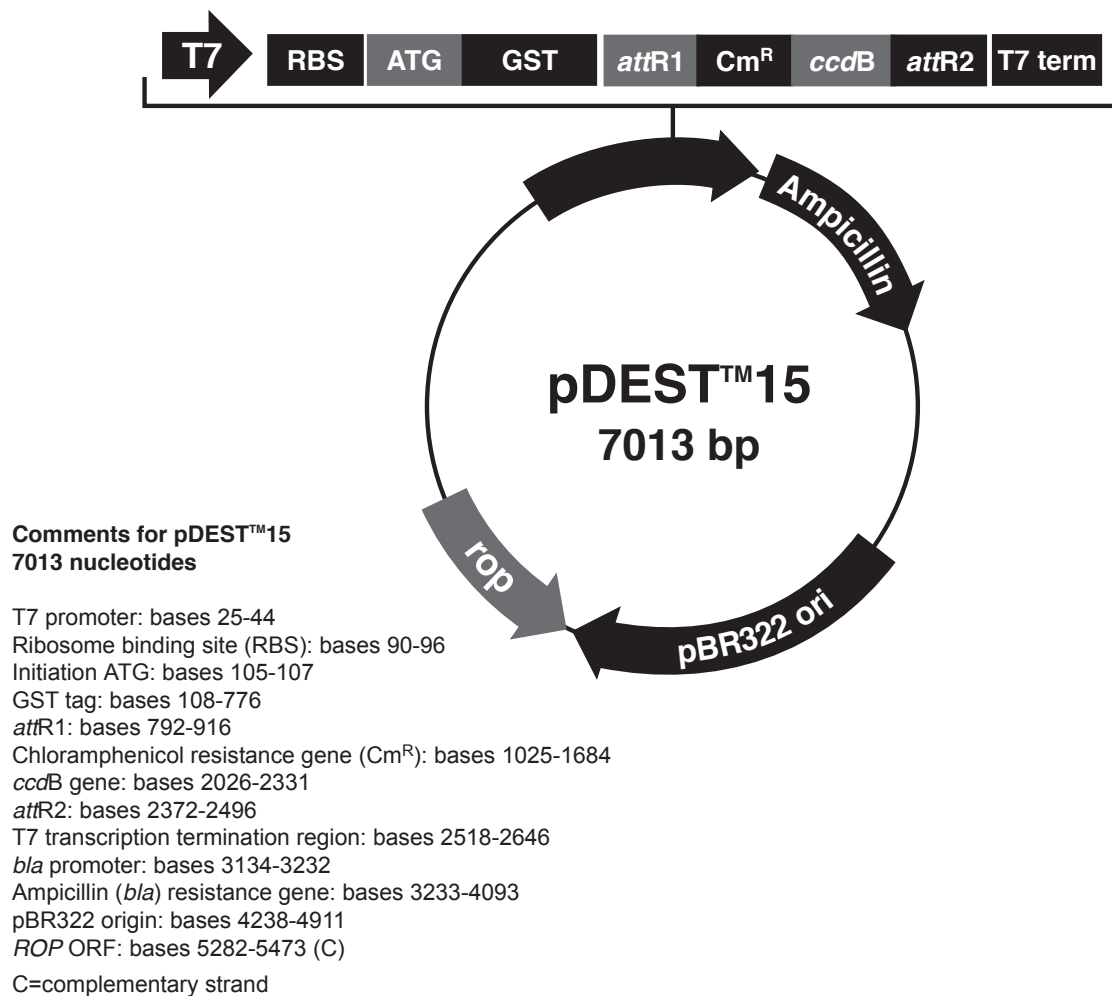
遠心した上清を LC-ESI-MS/MS で分析し、生成した OxIAA-Glc を定量した。同様に、IAA に対する反応速度を測定するために、10–200  $\mu\text{M}$  の IAA を含む反応液を調製した。それぞれの反応液に GST-UGT74D1 を加えて 30  $^{\circ}\text{C}$  で 8 min 反応させた後、アセトニトリルを加えて反応を停止した。遠心した上清を HPLC で分析し、生成した IAA-Glc を定量した (Fig. 14)。

機器分析の結果を元に、Lineweaver-Burk プロットにより算出した速度パラメータを Table 8 に記す。OxIAA に対する  $K_m$  (16.0  $\mu\text{M}$ ) は IAA に対する  $K_m$  (88.3  $\mu\text{M}$ ) の約 0.18 倍、OxIAA に対する触媒効率 ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) (3.65  $\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$ ) は IAA に対する  $k_{\text{cat}}/K_m$  (0.55  $\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$ ) の約 6.6 倍となった (Fig. 14, Table 8)。これらの結果、UGT74D1 が IAA よりも OxIAA に対して高い親和性を持つことが明らかになった。

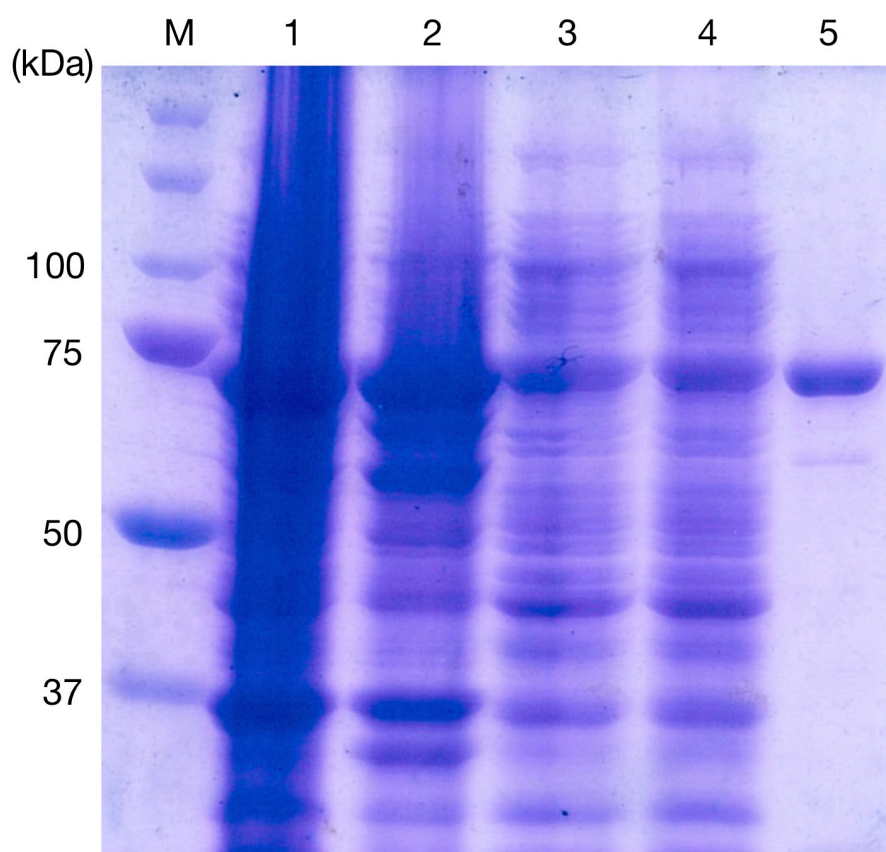
## 考察

最近, Jin らによつてが IBA, IAA, IPA, ICA, 2,4-D, NAA が UGT74D1 によりグルコシル化されることが *in vitro* で示されていたが, OxIAA に対する活性は調べられていなかった (Jin *et al.* 2013). 本章の実験によつて, UGT74D1 が OxIAA のグルコシル化を触媒する直接的な証拠が示された. また, このときの触媒効率 ( $k_{cat}/K_m$ ) は  $3.65 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  と算出された. この値は現在までに報告されてきた二次代謝に関わる酵素の触媒効率の中央値に近かつた (Milo and Last 2012).

UGT84B1 が IBA, NAA などに対しても高い活性を示したように, *in vitro* で複数の化合物を基質として認識する UGT が数多く報告されている (Jackson *et al.* 2001). 本実験においても, GST-UGT74D1 が IAA を基質として認識することが示された. 配列の相同性が比較的低い UGT74D1 と UGT84B1 (32%) が共に IAA を基質としたのは興味深い結果であつた (Fig. 15). しかし, 速度パラメータを測定したところ, OxIAA に対する  $k_{cat}/K_m$  ( $3.65 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) は, IAA に対する  $k_{cat}/K_m$  ( $0.55 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) に比べ 6.6 倍高かつた. この結果から, UGT74D1 は, 植物の細胞内において IAA よりも OxIAA を優先的に代謝する可能性が高いと考えられる. 今後, IAA 以外にも IBA を始めとするオーキシン関連化合物に対する反応速度を解析することによつて, UGT84B1 や UGT74E2 らとの間で基質特異性の比較が可能になる. オーキシン代謝経路における各グルコシル化酵素の役割を調べる上で基質特異性の比較は重要と考えられる.

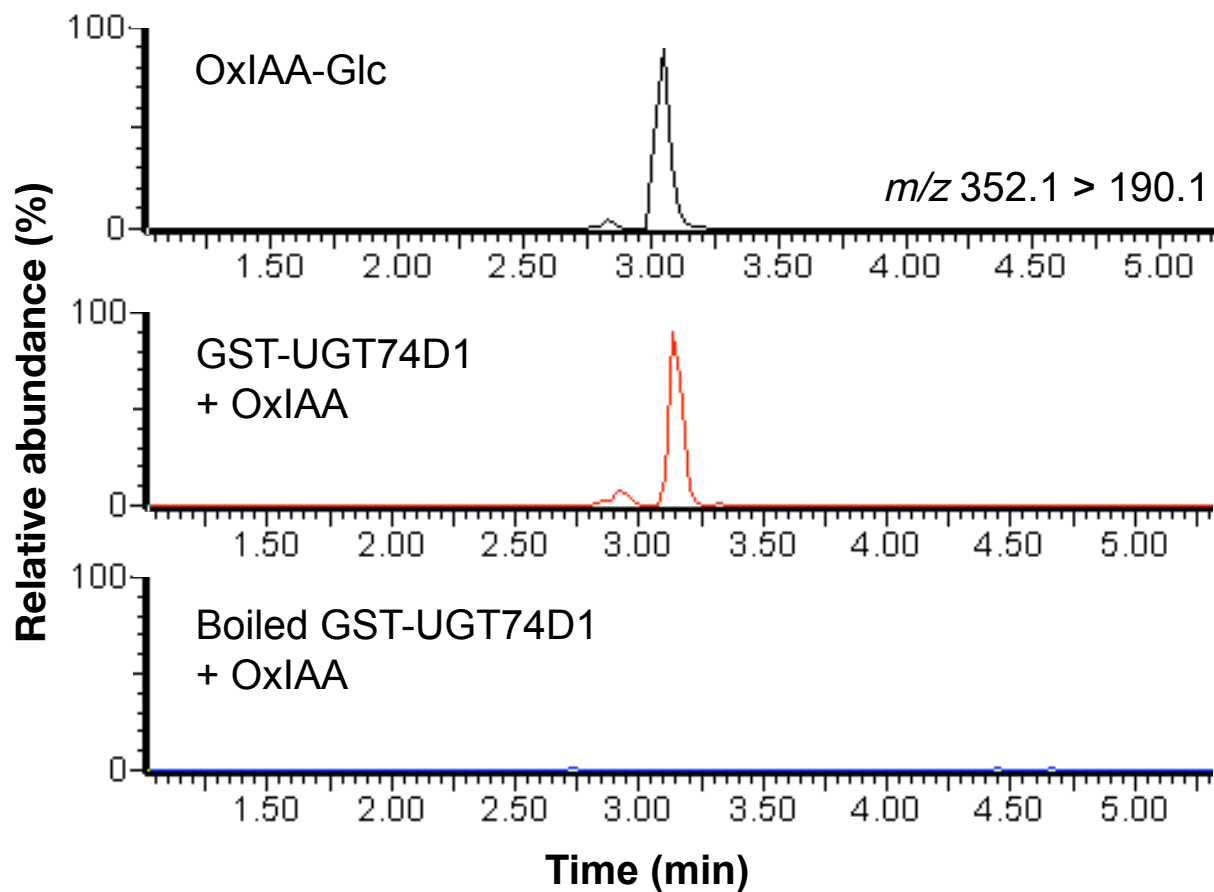


**Fig. 9** pDEST15 のベクターマップ(Life Technologies 社ウェブサイトより引用)



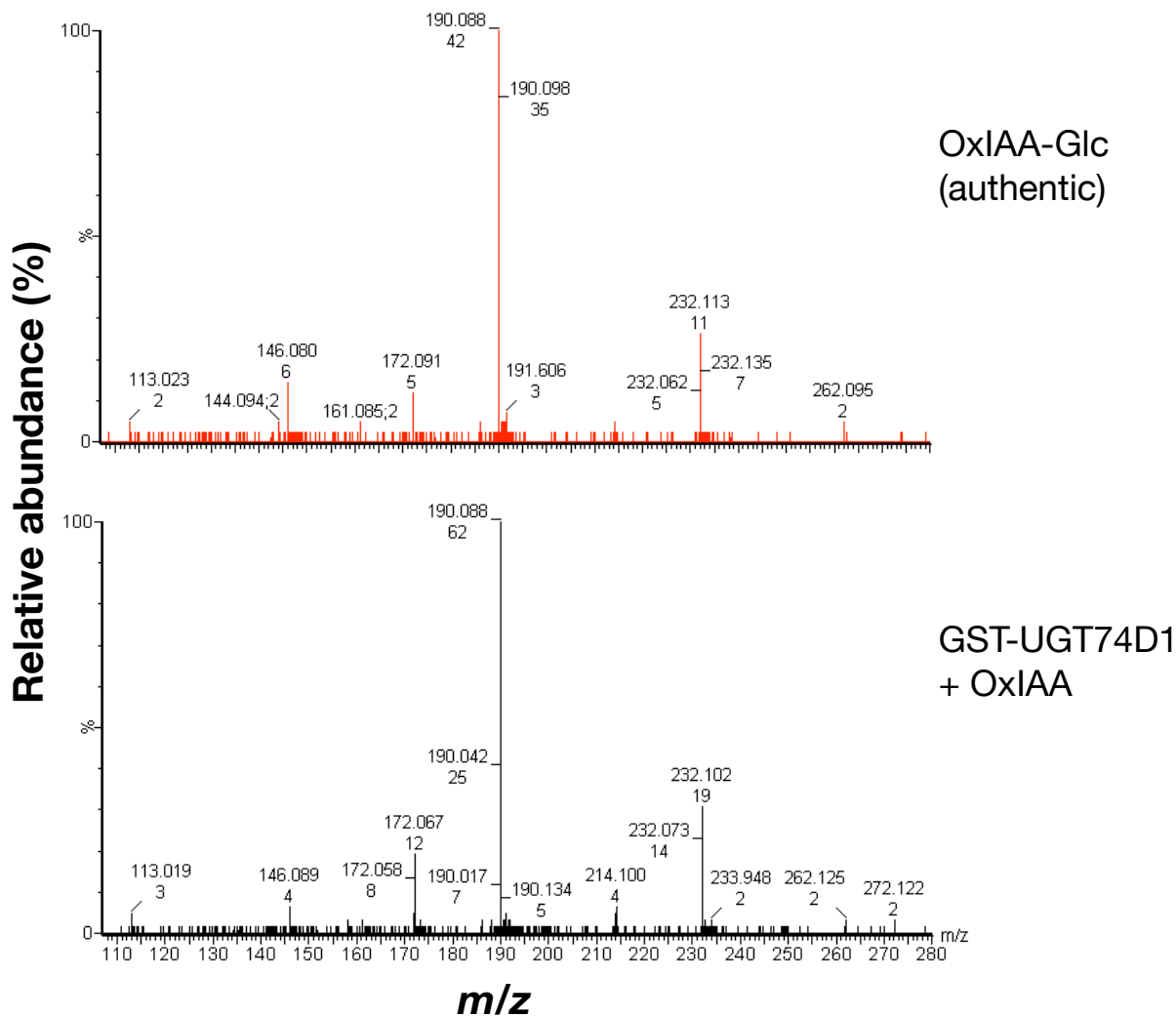
**Fig. 10** 組換えタンパク質の SDS-PAGE.

1. 可溶性画分, 2. 不溶性画分, 3, 4. アフィニティ精製の通過画分,
5. 精製タンパク質



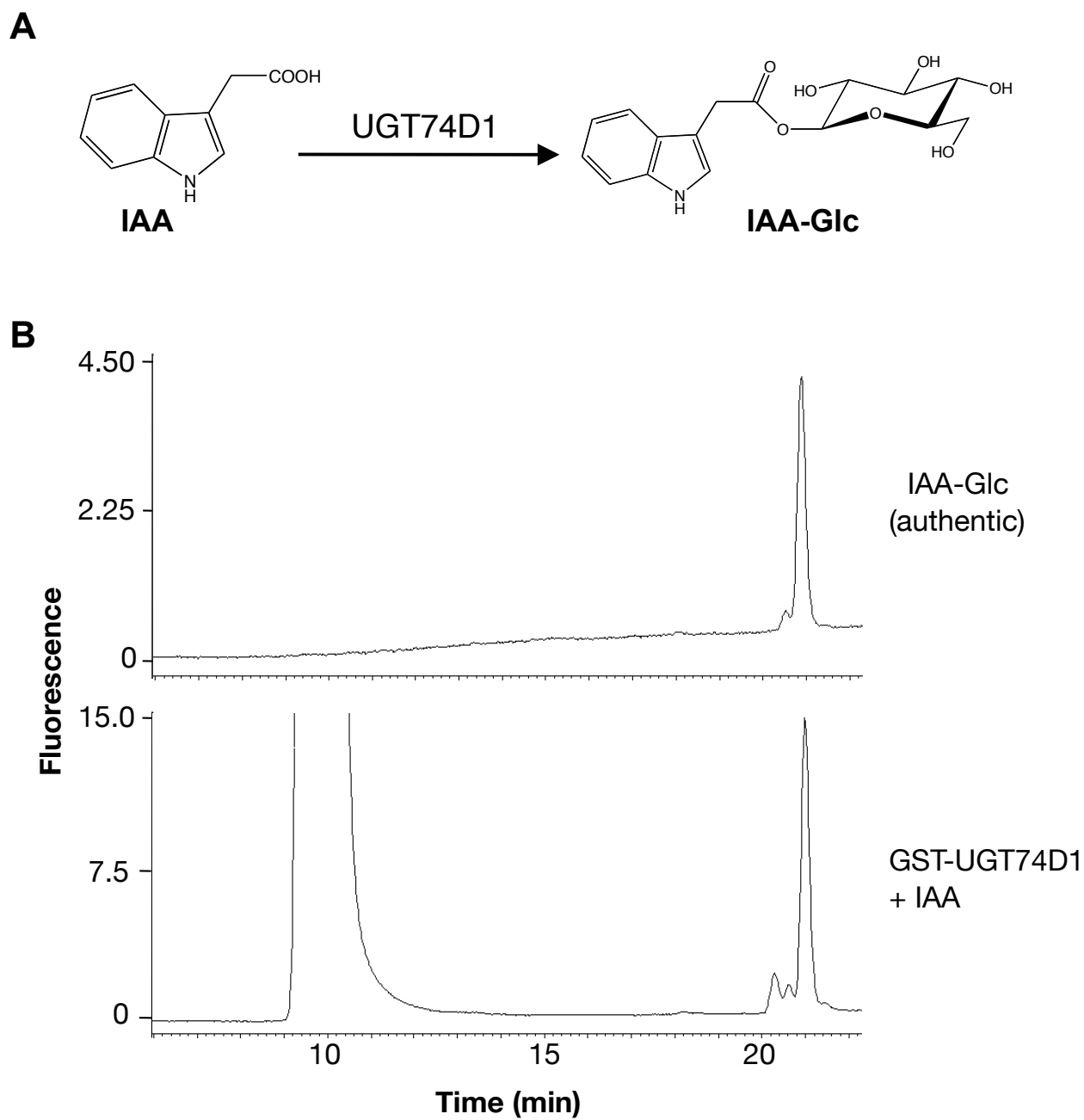
**Fig. 11** GST-UGT74D1 の反応生成物.

OxIAA-Glc 標品 (OxIAA-Glc), GST-UGT74D1 と OxIAA の反応生成物 (GST-UGT74D1 + OxIAA), 加熱した GST-UGT74D1 と OxIAA の反応液 (Boiled GST-UGT74D1 + OxIAA) の MS/MS クロマトグラム.



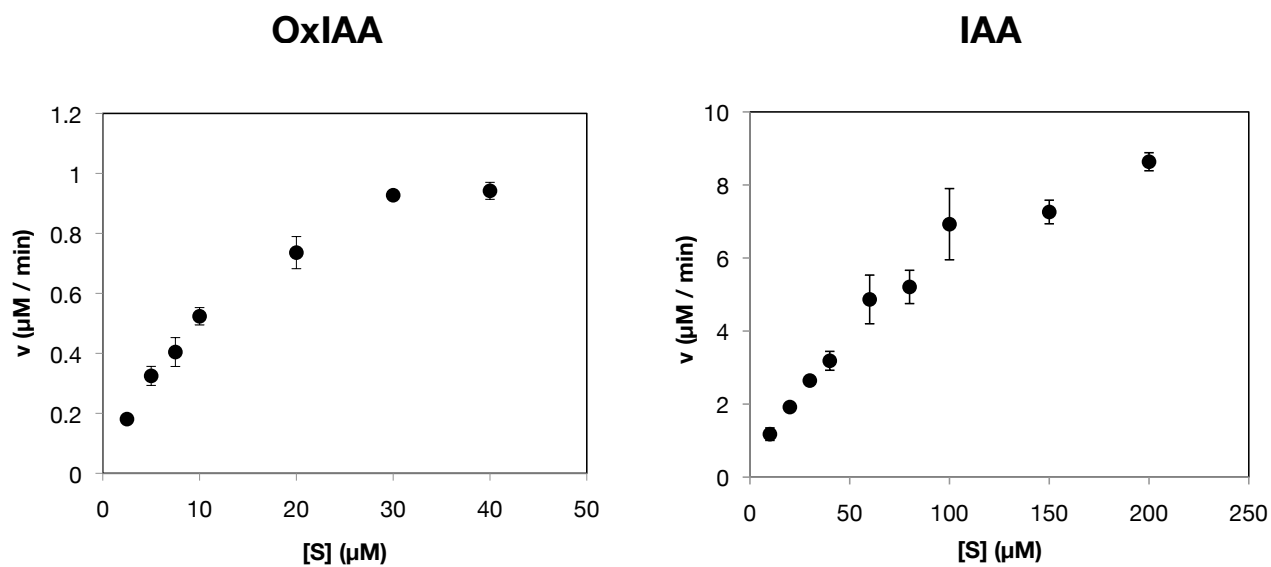
**Fig. 12** 酵素反応生成物の MS/MS スペクトル.

OxIAA-Glc 標品 (authentic), および GST-UGT74D1 と OxIAA の反応生成物 (GST-UGT74D1 + OxIAA) を LC-ESI-MS/MS で分析した際の、保持時間 3.06 min における、 $m/z$  352.1 をプリカーサーイオンとしたプロダクトイオンキャンスペクトル.



**Fig. 13** UGT74D1 による IAA の IAA-Glc への変換.

(A) UGT74D1 が触媒する反応. (B) IAA-Glc 標品 (21.0min) と, GST-UGT74D1 と IAA の反応生成物 (GST-UGT74D1 + IAA) の HPLC クロマトグラム. 波長 280 nm の励起光を照射し, 波長 355 nm の蛍光を検出した.



**Fig. 14** GST-UGT74D1 の反応速度.

基質濃度 ([S]) に対する初速度 ( $v$ ) をプロットした。初速度の測定は各基質濃度につき 3 回ずつ行った。エラーバーは標準偏差を示す。



**Table 8** GST-UGT74D1 の速度パラメータ

Substrate	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}} / K_m$ ( $\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ )
OxIAA	15.98	58.31	3.65
IAA	88.27	48.56	0.550

UGT74D1.seq	1	MGEKAKANLVVFSFPIQGHINPLLQFSKRLLSKNVNVTFLTTSSTHNSILRRAITGGATA	60
UGT84B1.seq	1	MGSSEGQETHVLMVTLPFQGHINPMLKLAKHLSLSSKNLHINLATIESARDLLSTVEKPR	60
UGT74D1.seq	61	LPLSFVPIDDGFEEDHPSTDTSPDYFAKFQENVSRSLSELISSMDPKPNAVVDSCLPYV	120
UGT84B1.seq	61	YPVDLVFFSDGLPKEDPKAPETLLKSLNKVGAMNLSKIIEEKRYSCIISSPFTPWVPAVA	120
UGT74D1.seq	121	LDVCRKHPGVAAASFFTQSTVNATYIHFLRGEFKEFQNDVVLPA M P L K G N D L P V F L Y D	180
UGT84B1.seq	121	ASHNISCAILWIQACGAYS V Y Y R Y M K T N S F P D L E D L N Q T V E L P A L P L L E V R D L P S F M L P	180
UGT74D1.seq	181	NNLCRPLFELISSQFVNVDIDFFLVNSFDELEVEVLQWMKNQWPVKNI G M I P S M Y L D K	240
UGT84B1.seq	181	SGGAHFYNLMAEFADCLRYVKWVLVNSFYELESEIIESMADLKPVIPIGPLVSPFLLGDG	240
UGT74D1.seq	241	RLAGDKDYGINLFNAQVNECLDWLDSKPPGSIYVSFGSLAVLKDDQMIEVAAGLKQTGH	300
UGT84B1.seq	241	EEETLDGKNLDFCKSDCCMEWLDKQARSSVYISFGSMLETLENQVETIAKALKNRGLP	300
UGT74D1.seq	301	NFLWVVRETETKKLPSNYIEDICKGLIVNWSPQLQVLAHKSIGCFVTHCGWNSTLEALS	360
UGT84B1.seq	301	FLWVIRPKEKAQNVAVLQEMVKEGGVLEWSPQEKILSHEAISC F V T H C G W N S T M E T V V	360
UGT74D1.seq	361	LGVALIGMPAYS D Q P T N A K F I E D V W K V G V R V K A D Q N G F V P K E E I V R C V G E V M E D M S E K G K	420
UGT84B1.seq	361	AGVPVVA Y P S W T D Q P I D A R L L V D V F G I G V R M R N D S V D G E L K V E E V E R C I E A V T E G P A A V D	420
UGT74D1.seq	421	EIRKNARRLMFAREALSDGNSDKNIDEFVAKIVR	456
UGT84B1.seq	421	IRRRAAELKRVARLALAPGGSSSTRNLDLFISDITIA	456

**Fig. 15** UGT74D1 と UGT84B1 のアラインメント.

## 第 4 章 シロイヌナズナ *ugt74d1* 変異体の解析

### 緒言

前章までの結果から、UGT74D1 が *in vitro* で OxIAA のグルコシル化を触媒することが示された。しかし、*in vitro* で酵素の基質特異性が高くても *in planta* においてはその酵素機能に寄与しない場合も多くあり、実際に UGT ファミリーではその様な例も報告されている (Bowles *et al.* 2005, Gachon *et al.* 2005)。また、基質と酵素の細胞内における局在が異なる場合や、基質が生産される細胞で酵素の遺伝子が発現しない可能性もある。UGT74D1 がシロイヌナズナの主要な OxIAA グルコシル転移酵素であることを証明するためには、UGT74D1 を欠損した変異体を分析し、代謝物の変化を調べることが重要である。

これまでに UGT84B1, UGT74D1, UGT74E2 がシロイヌナズナにおける IAA 関連化合物のグルコシル転移酵素として同定されていたが、驚くことに UGT84B1 と UGT74D1 の欠損変異体に含まれる予想代謝物の分析結果は報告されていない。また、UGT74E2 については欠損変異体の IBA-Glc 量を分析したが、その内生量に変化は認められなかったと報告されている。従って、UGT84B1, UGT74D1, UGT74E2 については、実際には提唱されている代謝経路に主として寄与しているかどうかは *in vivo* レベルでは完全に証明されていない。

そこで本章では、シロイヌナズナの *in vivo* における UGT74D1 の役割を確認するため、*ugt74d1* 欠損変異体の IAA, OxIAA, OxIAA-Glc の内生量を LC-ESI-MS/MS で分析した。また、UGT Group L に属するシロイヌナズナの UGT のうち、UGT74E1 と UGT74E2 をコードする cDNA は第 2 章での活性スクリーニングに使用できなかった。この 2 つの酵素は UGT74D1 に対して比較的高い相同性を持つことから、OxIAA のグルコシル化に寄与する可能性が高い (Fig. 16)。そこで *ugt74d1* 変異体と共に *ugt74e1* および *ugt74e2* 欠損変異体についても IAA, OxIAA, Ox-IAA-Glc を分析した。

## 材料と方法

### 植物

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) エコタイプ Columbia-0 (Col-0) を使用した。Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) から、T-DNA 挿入変異体株、SALK\_004870 (*ugt74d1*), SALK\_045974 (*ugt74e1*), SALK\_016116 (*ugt74e2*) を入手した。

### 栽培条件

シロイヌナズナの種子を 1.5 mL チューブに入れて、Plant Preservative Mixture (PPM) (ナカライ) 希釈液に浸けて 4 °C に一晩おき、表面を殺菌した。PPM 希釈液を捨てた後、0.1%アガロースに種子を懸濁し、ムラシゲ・スクーグ (MS) 平板培地 (pH5.7) の表面に播種した。培地を地面に対して垂直に置き、白色光下 ( $30\text{--}50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) , 21 °C で栽培した。

#### PPM 希釈液

PPM 1%, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MgSO<sub>4</sub>, 0.1% tween20

#### MS 平板培地

MS 培地用混合塩類 (和光純薬) 4.6 g/L, 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  チアミン塩酸塩, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ニコチン酸, 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ピリドキシン塩酸塩 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  myo-イノシトール, 1% (w/v) スクロース, 0.8% 精製寒天

### 1) 変異体の確認

#### ・ゲノム DNA の抽出

組織数 mg を 1.5 mL 容マイクロチューブにとり、爪楊枝で破碎した。抽出バッファー 400  $\mu\text{L}$  を加え、さらに破碎した。遠心分離 (12,000  $\times g$ , 4 min, 20 °C) して、上清 200  $\mu\text{L}$  を別のマイクロチューブに移した。移した上清にイソプロパノール 150  $\mu\text{L}$  を加えて転倒混和した。遠心分離 (12,000  $\times g$ , 4 min, 20 °C) し、上清を捨てた。70% エタノールを 100  $\mu\text{L}$  加えて遠心分離 (12,000  $\times g$ , 4 min, 20 °C) し、上清を捨てた。沈殿を室温で風乾した後、30–50  $\mu\text{L}$  の 10 mM Tris バッファー (pH 8.5) に溶かした。

抽出バッファー

200 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS

### ・ジェノタイピング

Table 9 に記すプライマーを使用した。氷上で反応液を調製し、下記の温度サイクルで PCR を行った。1%アガロースゲル電気泳動により断片の増幅を確認した。

	Volume (μL)
rTaq	0.2
10 x EX Taq buffer	2.0
dNTP	1.6
LP / LBb1.3	1.0
RP	1.0
ゲノム DNA 溶液	1.0
milliQ water	13.2
<hr/>	
TOTAL	20.0

94 °C ·2min – (94 °C ·20 sec – 54 °C ·20 sec – 72 °C ·1m 30 sec) × 40 cycles

### ・遺伝子発現の確認

MS 培地で 1 週間栽培した実生から Total RNA を抽出した。Total RNA から cDNA を合成し、以下の条件で PCR した。反応液を 1.5% アガロースゲルで電気泳動し、断片の増幅を確認した。*UGT74D1* の確認には LPd1 と RPd1, *UGT74E1* の確認には LPe1 と RPe1-2 を使用した (Table 9)。

	(μL)
EX Taq HS	0.1
10× EX Taq buffer	2.0
dNTP	1.6
LP	1.0
RP	1.0
cDNA	1.0
milliQ water	13.3
<hr/>	
Total	20.0

94 °C, 2min – (98 °C, 10 sec – 55 °C, 30 sec – 72 °C, 1 min 30sec) × 35 cycles – 72 °C, 30sec

## **2) 代謝物の抽出と精製**

### **• 植物組織からの抽出**

30–70 mg の組織を 2 mL 容チューブに集め、重量を測定した後、液体窒素で速やかに冷凍し、分析まで–80 °C に保存した。

岡山理科大学理学部・林謙一郎教授が合成された [phenyl-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>] IAA, [phenyl-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>] OxIAA, [phenyl-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>] OxIAA-Glc をご提供いただき、内部標準物質として使用した。

チューブに、0.2–1 mL の 80%アセトン/H<sub>2</sub>O, 内部標準物質 (20–40 ng の[phenyl-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>] OxIAA-Glc, 2–4 ng の[phenyl-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>] OxIAA, 2–4 ng の[phenyl-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>] IAA), ジルコニアビーズ (Ø 3mm) 2個 を加え、TissueLyser (Qiagen) で 3 min 処理して組織を破碎した。遠心 (15,000 ×g, 5 min, 4 °C) して上清を試験管に回収した後、2mL 容チューブに再び 0.2–1 mL のアセトン/H<sub>2</sub>O を加えて同様の抽出操作を行った。上清を回収し、さらに抽出を繰り返した。計 3 回の抽出操作で回収した上清は 1 本の試験管にまとめた。窒素ガスを吹き付けて体積が 200 μL 以下になるまで濃縮した後、遠心 (15,000 ×g, 5 min, 4 °C) した。この上清の全量を HPLC に注入した。

### **• HPLC 分取**

カラム：5-μm, 4.6 × 150 mm Symmetry shield C18 カラム (Waters), 5-μm, 4.6 × 10 mm C1 ガードカラム (Senshu Pak)

検出器：2475 マルチ λ 蛍光検出器 (Waters)

カラム温度：30 °C

流速 1 mL/min

溶媒 A：10 mM 酢酸アンモニウム

溶媒 B：100%メタノール

1 min, 10% 溶媒 B を保持した後、30 min, 10–50% 溶媒 B のグラジエントをかけた。

保持時間 7.0–9.0 min を OxIAA 画分, 9.0–11.0 min を IAA 画分, 16.5–18.5 min を OxIAA-Glc 画分として分取した。Speed Vac (Thermo) で溶媒を蒸発させた後、固相抽出

により精製した。

#### ・固相抽出

##### IAA 画分の精製

乾燥した IAA 画分を 1%酢酸水 (1 mL) に溶かした後, Oasis HLB カラム (Waters) に通した。自然落下で通過画分を流した後, 1%酢酸を含む 20%メタノール (1mL) を流して洗浄した。1% 酢酸を含む 70%メタノール (1 mL) を流して IAA を溶出した。溶出画分を 1.5 mL 容チューブに回収し, Speed Vac (Thermo) で溶媒を蒸発させた。乾燥した溶出画分を 20  $\mu$ L の 50%アセトニトリル / H<sub>2</sub>O に溶解して LC-ESI-MS/MS で分析した。

##### OxIAA 画分の精製

IAA 画分の精製と同様の手順で精製した。

##### OxIAA-Glc 画分の精製

乾燥した OxIAA-Glc 画分を 1%酢酸水 (1 mL) に溶かした後, Oasis HLB カラム (Waters) に通した。自然落下で通過画分を流した後, 1%酢酸を含む 10%メタノール (1mL) を流して洗浄した。1% 酢酸を含む 60%メタノール (1 mL) を流して OxIAA-Glc を溶出した。溶出画分は 1.5 mL 容チューブに回収し, Speed Vac (Thermo) で溶媒を蒸発させた。乾燥した溶出画分を 20  $\mu$ L の 50%アセトニトリル / H<sub>2</sub>O に溶解して LC-ESI-MS/MS で分析した。

### **3) LC-ESI-MS/MS 分析**

#### ・装置

ACQUITY Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)-MS/MS Q-Tof-premier (Waters)

カラム : ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 1.7  $\mu$ m, 2.1  $\times$  50 mm カラム (Waters)

#### ・IAA の分析

Sugawara ら, Mashiguci らの方法に従って検出, 定量した (Sugawara *et al.* 2009,

Mashiguchi *et al.* 2011).

#### • OxIAA 分析

分離条件を記す.

カラム温度, 溶媒, 流速は OxIAA-Glc 分析と同じ.

グラジエント : 0–0.1 min, 2%溶液 B ; 0.1–7.4 min, 2–50%溶液 B

イオン化と検出の条件を記す.

Capillary voltage: 2.65 kV

Source temperature: 100 °C

Collision energy: 8 V

Desolvation temperature: 400 °C

Sampling cone voltage: 15 V

Scan time: 0.6 s/scan

検出はネガティブイオンモードで行なった. 分子イオン  $m/z$  190.1, プロダクトイオン  $m/z$  146.1 のクロマトグラムから無標識 OxIAA のピークを同定した. 分子イオン  $m/z$  196.1, プロダクトイオン  $m/z$  152.1 のクロマトグラムから [phenyl- $^{13}\text{C}_6$ ] OxIAA のピークを同定した.

#### 定量

無標識 OxIAA と [phenyl- $^{13}\text{C}_6$ ] OxIAA の混合液を調製して, HPLC 分取と固相抽出を介さず LC-ESI-MS/MS に注入し, 両化合物のピーク面積から検量線を作成した. サンプルから検出した無標識 OxIAA と内部標準化合物のピーク面積比を検量線に照らし合わせることによって, OxIAA 内生量を定量した.

#### • OxIAA-Glc 分析

分離条件を記す.

カラム温度 : 40 °C

流速 : 0.2 mL/min

溶液 A : 0.05% 酢酸 / H<sub>2</sub>O

溶液 B : 0.05% 酢酸 / アセトニトリル



グラジエント：0–0.1 min, 2%溶液 B；0.1–7.4 min, 2–30%溶液 B

イオン化と検出の条件を記す.

Capillary voltage 2.65 kV

Source temperature 100 °C

Collision energy 9.4 V

Desolvation temperature 400 °C

Sampling cone voltage 28 V

Scan time 0.6 s/scan

検出はネガティブイオンモードで行なった. 分子イオン  $m/z$  352.1, プロダクトイオン  $m/z$  190.1 のクロマトグラムから無標識 OxIAA-Glc のピークを同定した. 分子イオン  $m/z$  358.1, プロダクトイオン  $m/z$  196.1 のクロマトグラムから [phenyl- $^{13}\text{C}_6$ ] OxIAA-Glc のピークを同定した.

#### 定量

無標識 OxIAA-Glc と [phenyl- $^{13}\text{C}_6$ ] OxIAA-Glc の混合液を調製して, HPLC 分取と固相抽出を介さず LC-ESI-MS/MS に注入し, 両化合物のピーク面積から検量線を作成した. サンプルから検出した無標識 OxIAA-Glc と内部標準化合物のピーク面積比を検量線に照らし合わせるにより, OxIAA-Glc 内生量を定量した.

**Table 9** 本章で使用したプライマー

Primer name	Sequence (5' to 3')
LPd1	ATGGGAGAGAAAGCGAAAGCAA
RPd1	CCTCACAATTTTAGCAACAAACTC
LPe1	CTTCAAGTTGTGGACTCCAGC
RPe1-1	CCCAACCTTATAAATACACACAC
RPe1-2	ATGAGAGAAGGATCTCATGTTATTGTT
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC

## 結果

シロイヌナズナの OxIAA 経路における UGT74D1 の役割を解析するため、ABRC より *UGT74D1* 遺伝子の T-DNA 挿入変異体 *ugt74d1* (SALK\_004870) の種子を入手した。また、UGT74D1 と相同性が高い UGT74E1 と UGT74E2 遺伝子についても、それぞれの T-DNA 挿入変異体 *ugt74e1* (SALK\_045974) と *ugt74e2* (SALK\_016116) の種子を入手した。これら 3 株のうち、*ugt74e2* が遺伝子欠損変異体であることは既に発表されていたが、その他の株に関する報告は現在まで無かった (Tognetti *et al.* 2010)。そこで、*ugt74d1* と *ugt74e1* が遺伝子欠損変異体であることを確認するために遺伝子型解析を行った。播種 1 週間前後の実生からゲノム DNA を抽出し、これを鋳型として PCR を行い、それぞれの変異体がホモ接合型であることを確認した。また、T-DNA 特異的プライマーを用いて各変異体の T-DNA 挿入位置を確認した。次に、ホモ接合型であることが確認できた個体から mRNA を抽出し、RT-PCR により各遺伝子の発現が完全に検出限界以下であることを確認した (Fig. 17)。MS 平板培地、21 °C、白色光下で栽培した時、*ugt74d1*、*ugt74e1*、*ugt74e2* の各欠損変異体と Col-0 野生型株 (WT) の間では形態に明確な差が見られなかった (Fig. 18)。

次に、 $^{13}\text{C}_6\text{-IAA}$  ([phenyl- $^{13}\text{C}_6$ ]IAA)、 $^{13}\text{C}_6\text{-OxIAA}$  ([phenyl- $^{13}\text{C}_6$ ]OxIAA)、 $^{13}\text{C}_6\text{-OxIAA-Glc}$  ([phenyl- $^{13}\text{C}_6$ ]OxIAA-Glc) を内部標準物質として、MS 平板培地で 2 週間栽培した実生に含まれる IAA、OxIAA、OxIAA-Glc を LC-ESI-MS/MS で定量した。野生型において、これらの内生量は OxIAA-Glc > OxIAA > IAA の順で高く、OxIAA-Glc と IAA の内生量には 2 桁 (52 倍) の差があった。これは Kai らの報告と一致していた (Fig. 19)。

*ugt74d1* 変異体と野生型の間では IAA 量に有意な差は認められなかった。しかし、*ugt74d1* 変異体の OxIAA 内生量は野生型に比べて約 2.5 倍増加していた。一方、*ugt74d1* 変異体の OxIAA-Glc 内生量は野生型の OxIAA-Glc 内生量に比べて 85% 程度減少していた (Fig. 19)。これらの結果は、シロイヌナズナにおいて UGT74D1 が OxIAA のグルコシル化を触媒する主要な酵素であることを示している。また、*ugt74e1* と *ugt74e2* と野生型の間では、IAA、OxIAA、OxIAA-Glc いずれの内生量においても統計的に有意といえる差が無かった (Fig. 19)。以上の結果から、UGT74D1 がシロイヌナズナの OxIAA 経路における主要なグルコシル転移酵素であり、これ以外の UGT が OxIAA-Glc の生成に対する寄与は僅かだと考えられた。

## 考察

本章の実験の結果, *ugt74d1* 欠損変異体シロイヌナズナでは OxIAA 量が野生型株の約 2.5 倍に増加し, OxIAA-Glc 量が野生型株の 85%程度低下することを示した. これにより, UGT74D1 はシロイヌナズナの OxIAA グルコシル化を触媒する主要な酵素と結論した. オーキシン代謝経路において代謝物が顕著に減少した遺伝子欠損変異体は *ugt74d1* が最初である. 一方, *ugt74d1* 欠損変異体は表現型を示さず, また IAA の内生量も変化しなかった. このことから, この変異体では OxIAA 経路以外の代謝経路や生合成経路の調節によって IAA 量が維持されている可能性がある.

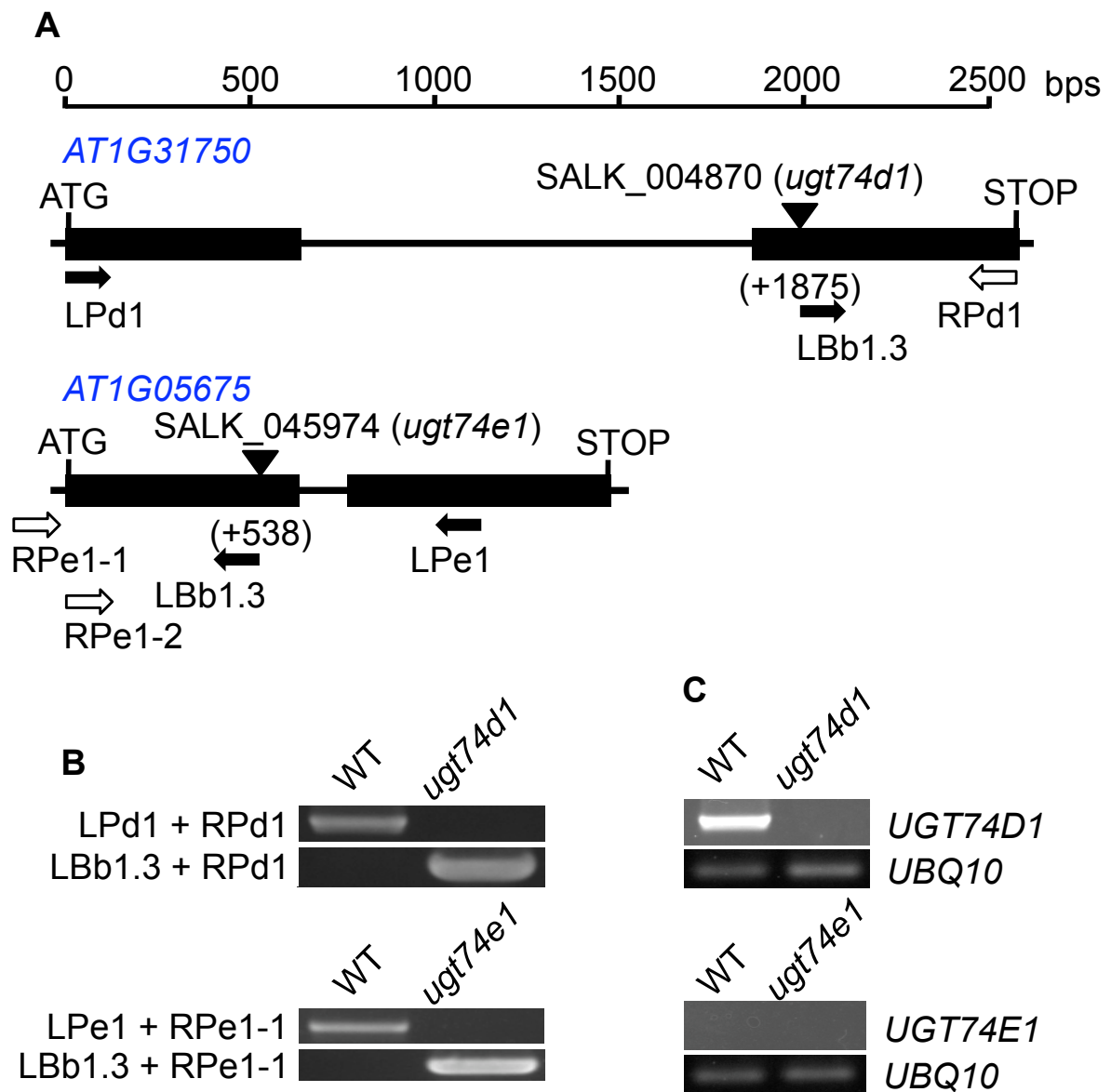
*ugt74d1* 欠損変異体において OxIAA-Glc の内生量は著しく減少していたが, 完全には消失しなかった. この理由としては OxIAA のグルコシル化を触媒する UGT が UGT74D1 以外にも存在する可能性が最も高い. アミノ酸配列の相同性が低い 2 つの UGT が同一の化合物を基質として認識する例がこれまでに報告されている (Osmani *et al.* 2009). 従って, 出芽酵母での活性スクリーニングに使用しなかったサブファミリーの UGT が OxIAA グルコシル化活性を持つ可能性がある. また, Group L の UGT についても, 出芽酵母を用いた活性スクリーニングでは酵素活性が低い場合や酵素の発現量が低い場合には, 反応生成物を検出できなかった可能性が予想される.

IAA-Glc が生成した後, 2 位が酸化されて OxIAA-Glc を生成する経路が存在する可能性もある. 本章の実験結果は, OxIAA のグルコシル化が主経路であることを示したが, IAA-Glc を前駆体とする経路を否定するには至らない. Kai らも  $[2',2'\text{-}^2\text{H}_2]\text{IAA-Glc}$  と  $[2',2'\text{-}^2\text{H}_2]\text{OxIAA}$  を用いた投与実験の結果から, OxIAA のグルコシル化が主経路だと推測したが断定には至っていない. IAA-Glc の加水分解で生じる IAA による混乱を避けるため, グルコースに標識を導入した IAA-Glc の投与実験が必要だと述べている (Kai *et al.* 2007). 投与実験の他に, IAA-Glc 欠損型植物の解析や IAA-Glc を基質とする酸化酵素の探索から有力な知見が得られる可能性がある. この観点から, *ugt84b1* 欠損変異体における OxIAA-Glc 量の分析は本経路を検証する点から重要である.

一方, *ugt74e1* 欠損変異体および *ugt74e2* 欠損変異体に含まれる IAA, OxIAA, OxIAA-Glc の内生量は, 野生型株の内生量と同程度であった. このことから, UGT74E1 と UGT74E2 は植物体内で OxIAA のグルコシル化に寄与しない, あるいは UGT74D1 に比べて活性が著しく低いと考えられる. UGT74E1 と UGT74E2 は近接しているため二重欠損変異体を得にくいことから, UGT74E1 と UGT74E2 の酵素活性の解析や, *ugt74d1* *ugt74e1* および *ugt74d1* *ugt74e2* における OxIAA-Glc 分析が重要と考えられる.

UGT74D1.seq	1	MGEKAKANVLFVFSFPIQGHINPLLQFSKRLLSKNVNVTFLLTTSSTHNSILRRAITGGATA	60
UGT74E1.seq	1	--MREGSHVIVLPFPAQGHITPMSQFCRKLASKSLKITLVLSDKPSPPYK-----TEH	52
UGT74E2.seq	1	--MREGSHLIVLPFPGQGHITPMSQFCRKLASKGLKLTLLVLSDKPSPPYK-----TEH	52
UGT74D1.seq	61	LPLSFVPIDDGFEDHPSTDTSPDYFAKFQENVSRSLSSELISSM---DPKPNAVVDYDSCL	117
UGT74E1.seq	53	DTITVVPISNGFQEGQERSEDLDEYMERVESSIKNRLPKLIEDMKLSGNPPRALVYDSTM	112
UGT74E2.seq	53	DSITVFPISNGFQEGEELQLDDYMERVETSIKNTLPKLVEDMKLSGNPPRAIVYDSTM	112
UGT74D1.seq	118	PYVLDVCRKHGVAASFFTOQSSTVNAVYIHFRLGFEFK---EF-QNDVV-LPAMPPLKG	171
UGT74E1.seq	113	PWLLDVVLAHSY-GLSGAVFFTQPLVSAIYYHVFKGSFSVPSTKYGHSTLASFSLPILNA	171
UGT74E2.seq	113	PWLLDVVLAHSY-GLSGAVFFTQPLVTAIYYHVFKGSFSVPSTKYGHSTLASFSPMLTA	171
UGT74D1.seq	172	NDLPVFLYDNNLCRPLFELISSQFVNVDDIDFFLVNSFDELEVEVLQWMKNQWPVKNIGP	231
UGT74E1.seq	172	NDLPSFLCESSYPYLRTVIDQLSNIDRVDIVLCNTFDKLEKLLKWIKSWPVLNIGP	231
UGT74E2.seq	172	NDLPSFLCESSYPNLRIVVDQLSNIDRVDIVLCNTFDKLEKLLKVVQSLWPVLNIGP	231
UGT74D1.seq	232	MIPSMYLDKRLAGDKDYGINLFNAQVNECLDWLDSKPPGGSVIVVYVSGSLAVLKDQDMIEV	291
UGT74E1.seq	232	TVPSMYLDKRLAEDKNYGFSLFGAKIAECMEWLNKQPSVYVYVSGSLVVLKQDLIEL	291
UGT74E2.seq	232	TVPSMYLDKRLSEDKNYGFSLFNAKVAECMEWLNKQPSVYVYVSGSLVILKEDQMLEL	291
UGT74D1.seq	292	AAGLKQTGHNFWVRETETKKLPSNYIEDICDKGLIVNWSPQLQVLAHKSIGCFMTHCG	351
UGT74E1.seq	292	AAGLKQSGHFLLWVRETERRKLPENYIEEIGEGLTVSWSPQLEVLTHKSIGCFMTHCG	351
UGT74E2.seq	292	AAGLKQSGRFFLLWVRETETHKLPENYVEEIGEGLIVSWSPQLDVLAKHSIGCFMTHCG	351
UGT74D1.seq	352	WNSTLEALSLGVALIGMPAYSQDPTNAKFIEDVWVGVVRVKADQNGFVPKKEELVRCVGEV	411
UGT74E1.seq	352	WNSTLEGLSLGVPMIGMPHWADQPTNAKFMEVWVGVVRVKADSDGFVRRREEFVRRVEEV	411
UGT74E2.seq	352	WNSTLEGLSLGVPMIGMPHWTQDPTNAKFMDVWVGVVRVKAEGDGFVRRREEMRSVEEV	411
UGT74D1.seq	412	MEDMSEKKGKEIRKNAARRLMEFAREALSDGGNSDKNIDEFVAKIVR	456
UGT74E1.seq	412	ME--AEQKKEIRKNAEKWKVLAQEAIVSEGGSSDKNINEFVSMFC-	453
UGT74E2.seq	412	ME--GEKKGKEIRKNAEKWKVLAQEAIVSEGGSSDKSINEFVSMFC-	453

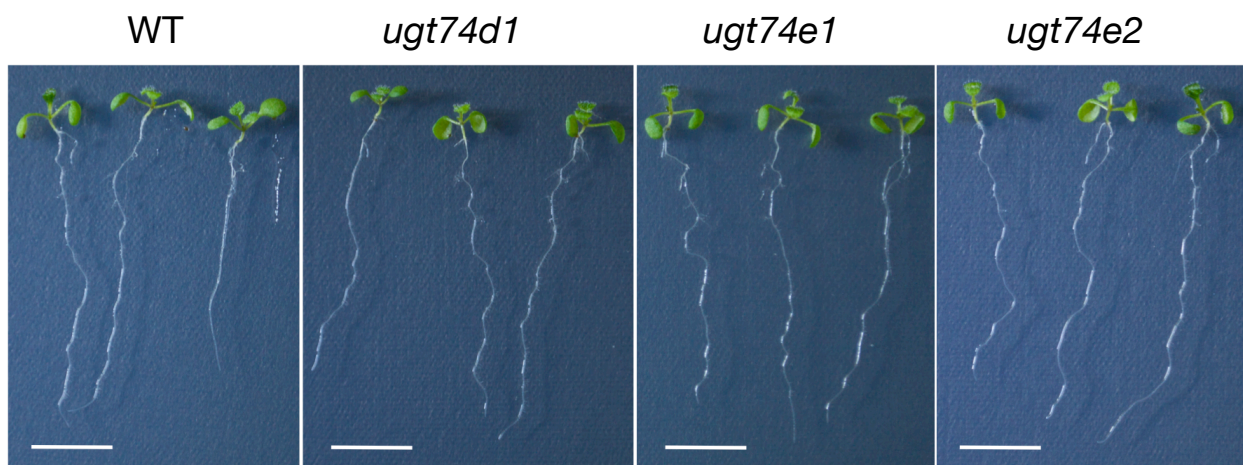
Fig. 16 UGT74D1, UGT74E1, UGT74E2 のアラインメント.



**Fig. 17** 変異体における T-DNA の挿入位置と遺伝子の発現

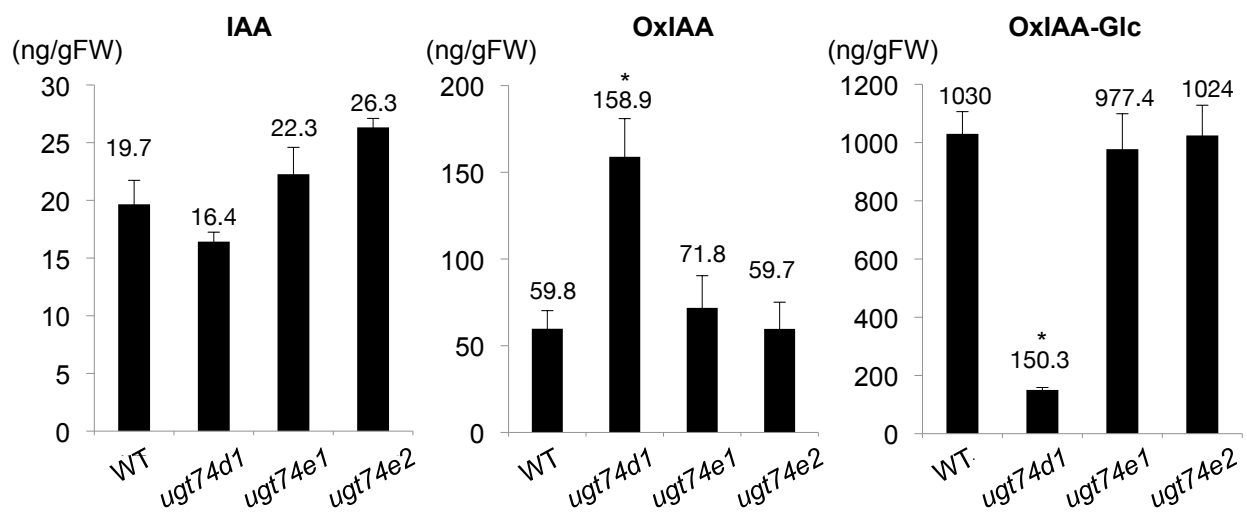
(A) シロイヌナズナの *UGT74D1* と *UGT74E1* 遺伝子，および SALK\_004870 (*ugt74d1*) と SALK\_045974 (*ugt74e1*) における T-DNA 挿入位置の模式図. エクソンを太線，イントロンを細線で示す. 開始コドンを (+1) として T-DNA の挿入位置を括弧内に記す. 矢印はジェノタイプングおよび RT-PCR に用いたプライマーの位置と方向を示す.

(B) *ugt74d1* と *ugt74e1* の T-DNA 挿入の確認. (C) RT-PCR による，変異体における *UGT74D1* と *UGT74E1* の発現の確認. *UGT74E1* の発現レベルは低く，本実験の PCR 条件では，野生型株と *ugt74e1* のいずれにおいても検出できなかった.



**Fig. 18** 野生型株 (WT), *ugt74d1*, *ugt74e1*, *ugt74e2* 欠損変異体の実生.

MS 平板培地に播種し, 白色光下, 21 °C で 2 週間栽培した.



**Fig. 19** 野生型株 (WT), *ugt74d1*, *ugt74e1*, *ugt74e2* の分析

MS 培地で 2 週間栽培した実生に含まれる IAA, OxIAA, OxIAA-Glc の内生量。エラーバーは標準偏差。 ( $n = 3$ , \* :  $P < 0.05$ )

## 第5章 UGT74D1 過剰発現体シロイヌナズナの解析

### 緒言

前章では, *ugt74d1* 欠損変異体の解析により UGT74D1 が OxIAA 経路の主要なグルコシル転移酵素であることが明らかになった. しかし, *ugt74d1* の欠損変異体は明らかな表現型を示さなかったことから, IAA の代謝調節における本酵素の役割は明らかになっていない. これまでオーキシン代謝遺伝子として同定された *UGT84B1* と *UGT74E2* では, それらの遺伝子過剰発現体で IAA-Glc や IBA-Glc が増加し, さらに矮化や頂芽優勢の低下などオーキシン欠損の表現型を示すことから, これらの UGT がオーキシンの代謝調節に関与していると考えられている. ただし, これらの過剰発現体で IAA の内生量は減少していない. 一方, *GH3.6* 過剰発現体 (*dfl1-D*) では IAA-Asp が増加し, さらに矮化や頂芽優勢の低下などオーキシン欠損の表現型が見られる. これにより *GH3* が IAA の代謝調節において重要な役割を示すと考えられてきた.

第5章では, UGT74D1 の *in vivo* における生理機能を明らかにするため,  $\beta$ -エストラジオール (EST) 誘導型の *UGT74D1* 過剰発現体 (*UGT74D1ox*) を作成して IAA 代謝物の内生量を分析した. シロイヌナズナの OxIAA-Glc は OxIAA から UGT74D1 によって主に生産されることから, *UGT74D1* 遺伝子を過剰発現した植物では OxIAA-Glc 量が増加し, OxIAA 量は減少すると予想された.



## 材料と方法

### 1) *UGT74D1ox* の作成

#### ・形質転換用コンストラクトの作成

*pDONR207::UGT74D1*, *pMDC7* (Curtis and Grossniklaus 2003), LR clonase II (Invitrogen) を混合し、タンパク質発現用ベクターの作成と同様の手順で LR 反応を行った。反応液 1 $\mu$ L を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  を形質転換し、100  $\mu$ g/mL スペクチノマイシン (Spe) を含む LB 培地に塗布した。コロニーPCR で断片の増幅が見えた形質転換体を、100  $\mu$ g/mL Spe を含む 2 mL の 2 $\times$ YT 培地に植菌して 37 °C で 16 h 震とう培養し、培養液からプラスミドを精製した。このプラスミドを過剰発現体作成用コンストラクト *pMDC7::UGT74D1* とした。

#### ・アグロバクテリウムの形質転換

*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 株をエレクトロポレーション法により形質転換した。手順を以下に記す。

氷上で、コンピテントセル 40  $\mu$ L にプラスミド溶液 2  $\mu$ L を加えてピペッティングで混合した。この混合液を 0.1 cm エレクトロポレーション・キュベット (Bio-Rad) に移し、Gene Pulser II (Bio-Rad) を用いて 2.5 kV, 25  $\mu$ F で通電した。キュベットを取り出し、SOC 培地 1 mL を加えてピペッティングした後、マイクロチューブに移して 30 °C で 1 h 振とう培養した。100  $\mu$ g/mL Spe  $\cdot$  50  $\mu$ g/mL ゲンタマイシン (Gen) を含む LB 平板培地に培養液 100  $\mu$ L を塗布し、30 °C で 2 d 培養した。得られたコロニーをシロイヌナズナの形質転換体に使用した。

#### ・形質転換用植物の栽培

Metro-Mix 350 とバーミキュライトを等量混合したものを土壌として使用した。ポットに詰めた土壌に Col-0 野生型株の種子を播種し、白色光下、21 °C で 3–5 週間栽培した。花茎が抽だいて数 cm に達した時点で摘心し、側枝の伸長を誘導した。側枝が 10 cm 前後まで伸長した植物を形質転換に使用した。

#### ・アグロバクテリウムの培養と懸濁液の調製

*pMDC7::UGT74D1* で形質転換したアグロバクテリウムのコロニーを数個掻き取って、100  $\mu$ g/mL Spe  $\cdot$  50  $\mu$ g/mL Gen を含む LB 培地 10 mL に植菌し、50 mL 容チューブを用

いて 30 °C で 16h 振とう培養したものを前培養液とした。1 L フラスコに入れた 100 µg/mg Spe · 50 µg/mL Gen を含む LB 培地 250 mL に、前培養液 1 mL を加え、30 °C で 2 d 振とう培養 (120 rpm) した。培養液の OD<sub>600</sub> が 1.2 を越えた時点で遠心分離 (4,000 rpm, 25 min, 22 °C) して上清を捨て、菌体を浸潤用懸濁培地 (pH 5.7) に懸濁した。懸濁液の OD<sub>600</sub> は 1–1.2 に調製した。

#### 浸潤用懸濁培地

MS 培地用混合塩類 2.3 g/L, 3 µg/mL チアミン塩酸塩, 5 µg/mL ニコチン酸, 0.5 µg/mL ピリドキシン塩酸塩 100 µg/mL myo-イノシトール, 5% (w/v) スクロース, 0.05% silwet-77

#### ・アグロバクテリウムの感染

アグロバクテリアの懸濁液を 500 mL 容ビーカーに注ぎ、植物体の地上部を 15 秒間浸した。処理後の植物は、鉢を横倒しにしてトレイに置き、ラップを被せて 21 °C に一晩静置した。ラップを外した後は、鉢を起こし、白色光下、21 °C で栽培を続けた。この植物から得られた種子を形質転換第一世代 (M<sub>1</sub> 世代) とした。

#### ・M<sub>1</sub> 世代の選抜

M<sub>1</sub> 種子 20–30 mg を 2 mL の PPM 希釈液に浸して 4 °C に 16 h おき、表面を滅菌した。PPM 溶液を除いた後、6 mL の 0.1 % アガロースに懸濁し、20 µg/mL ハイグロマイシン (Hyg) を含む MS 平板培地上に広げて 21°C, 白色光下で栽培した。Hyg 耐性を示した植物を、抗生物質を含まない MS 平板培地に移して数日間栽培した。その後、土壌に移して栽培し、各個体から別個に種子を回収した。これらを形質転換第二世代 (M<sub>2</sub> 世代) とした。

#### ・M<sub>2</sub> 世代の選抜

各ライン 30 粒前後の種子を 20 µM Hyg を含む MS 平板培地に播種し、耐性個体と感受性個体の比が 3 : 1 に近いラインを選抜した。1 ラインにつき数個体の耐性個体を土壌に移して栽培し、種子を回収した。この種子を形質転換第三世代 (M<sub>3</sub> 世代) とした。

#### ・M<sub>3</sub> 世代の選抜

各ライン 30 粒前後の種子を 20 µM Hyg を含む MS 寒天培地に播種し、全ての個体が Hyg 耐性を示すラインを選抜した。

## **2) UGT74D1ox の解析**

### **• EST 培地の作成**

粉末を DMSO に溶解して 20 mM EST 溶液を調製し，ストックとして使用した．これを固まる前の培地に添加することにより，EST を含む MS 平板培地を作成した．ストックは $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  に保存しておき，使用前に室温で融解させた．

### **• EST 処理**

*UGT74D1ox* の  $M_3$  世代の種子を PPM 希釈液に一晩浸して滅菌し，MS 平板培地に蒔いて  $21\text{ }^{\circ}\text{C}$  で 4 日間栽培した．この実生を 0.05% (v/v) DMSO または  $10\text{ }\mu\text{M}$  EST を含む MS 平板培地上に移し， $21\text{ }^{\circ}\text{C}$  で 3 日間栽培した．これらの植物体を 2 mL 容マイクロチューブに回収して速やかに液体窒素で凍結し，分析まで $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  に保存した．

### **• 重力屈性の解析**

MS 平板培地上で 4 d 栽培した *UGT74D1ox* を 9–10 個体ずつ，0.1% DMSO (mock)， $10\text{ }\mu\text{M}$  EST (EST)， $10\text{ }\mu\text{M}$  EST と  $20\text{ nM}$  IAA (EST + IAA) を含む培地に移した．このとき，シャーレの裏面に根端部を示す目印を着けた．その後 3 d 栽培し，各個体の写真を撮影した．写真をもとに，目印を頂点として主根の伸長方向と重力方向の間に形成される角度を測定した．

## 結果

植物体内における UGT74D1 の酵素活性をより詳細に解析すると共に、この酵素の生理的な機能を調べるために、エストラジオール (EST) 誘導型の *UGT74D1* 過剰発現変異体シロイヌナズナ (*UGT74D1ox*) を作成した。本章での実験には形質転換体の T3 世代の種子を使用した。この種子を MS 平板培地上で 4 日間栽培した後、10  $\mu$ M EST を含む MS 寒天培地に移してさらに 3 日間生育した実生を解析した。

はじめに *UGT74D1ox* とベクターコントロール植物 (*pER8*) に対して、10  $\mu$ M EST (EST) または DMSO (mock) を処理したときの遺伝子発現レベルを半定量 RT-PCR で解析した。その結果、*UGT74D1ox* 植物において *UGT74D1* 遺伝子の発現が EST 処理により顕著に上昇することを確認した (Fig. 20)。次に、*UGT74D1ox* 実生内の IAA, OxIAA, OxIAA-Glc を LC-ESI-MS/MS で定量したところ、EST 処理区 (EST) では OxIAA-Glc 内生量が対象区 (mock) と比べて約 13 % 上昇していた。この結果は、前章で得られた結論と同様に、UGT74D1 がシロイヌナズナの体内で OxIAA グルコシル化に寄与することを強く示す。一方、OxIAA の内生量は減少すると予想されたが、*UGT74D1* 遺伝子の発現誘導によって OxIAA 量は増加した。また、IAA の内生量も UGT74D1 の発現誘導により増加していた (Fig. 21)。

興味深いことに、EST 未処理の *UGT74D1ox* (mock) が野生型株と同様の生長を示したのに対し、EST 処理により *UGT74D1* を過剰発現した実生 (EST) では主根が異常な重力応答を示した (Fig. 22)。EST 誘導型の *GH3.6* 過剰発現変異体 (*GH3.6ox*) においても、同様の表現型が観察された (Fig. 23)。*GH3.6* 遺伝子は IAA-アミノ酸結合体合成酵素をコードしており、この遺伝子を異所発現させた変異体シロイヌナズナはオーキシン欠乏型の表現型を示すことが知られている (Nakazawa *et al.* 2001)。このことから、*UGT74D1* の発現誘導が根のオーキシン濃度調節に影響を及ぼしていると予想された。

そこで、*UGT74D1ox* で見られた重力応答の異常が根のオーキシンの欠乏によるものかについて調べるため、IAA による根の回復試験を行った。Fig. 24 に示すように、EST を含む培地で栽培した実生と比べて、EST10  $\mu$ M と IAA 20 nM を含む培地で栽培した実生は mock に近いレベルまで重力応答が回復した。*UGT74D1* 過剰発現によって生じる重力応答の異常が IAA 処理によって回復したことから、UGT74D1 がシロイヌナズナの根の IAA 濃度調節に寄与していると考えられた。

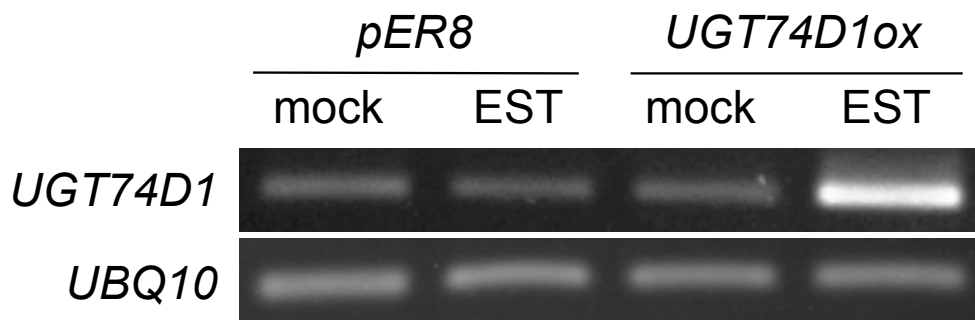
## 考察

本章の実験の結果, *UGT74D1* 遺伝子の発現誘導により OxIAA-Glc の内生量が増加することが明らかになった. この結果は, *UGT74D1* がシロイヌナズナにおいて OxIAA のグルコシル化を触媒するという前章の結果をさらに裏付けるものである. 一方, 当初の予想に反して, *UGT74D1* 過剰発現体では IAA および OxIAA 内生量が増加した. このような例は他のオーキシン代謝に関わる UGT でもすでに報告されている. まず, IAA グルコシル転移酵素である *UGT84B1* の遺伝子過剰発現体において IAA-Glc だけでなく IAA 内生量も増加することが示されている. また, IBA のグルコシル化を触媒する *UGT74E2* の過剰発現体においても IBA-Glc と共に IBA の蓄積が増えることが報告されている (Jackson *et al.* 2002). しかし, オーキシン代謝経路のグルコシル化が促進されることによって結果的に基質の内生量が増加する理由は今のところ良く分かっていない.

Tognetti らは *UGT74E2* 遺伝子の過剰発現体により減少した IBA の量を維持しようとして過剰補償 (overcompensate) したことが原因ではないかと予想している (Tognetti *et al.* 2010). 過剰補償のメカニズムとしては, OxIAA の代謝が促進されたことにより, 上流の IAA 生合成が活性化された可能性が考えられる. この濃度調節の分子機構を理解するためには, *UGT74D1ox* における *YUC*, *TAA*, *VAS1*, *CYP79B* などオーキシン生合成遺伝子の発現解析が重要と考えられる.

これと異なる過剰補償のメカニズムとしては, OxIAA-Glc の加水分解が促進された可能性が考えられる. イネでは IAA-Glc を加水分解して IAA を生成する酵素として *TGW6* が同定されている. また, シロイヌナズナの実生に IAA-Glc を投与すると IAA が生成されることも報告されている (Kai *et al.* 2007). シロイヌナズナから OxIAA-Glc の加水分解酵素は同定されていないが, IAA-Glc 加水分解酵素の存在から考えると, *UGT74D1* 過剰発現体では未知の加水分解酵素の働きにより OxIAA-Glc から OxIAA が生成している可能性も予想される.

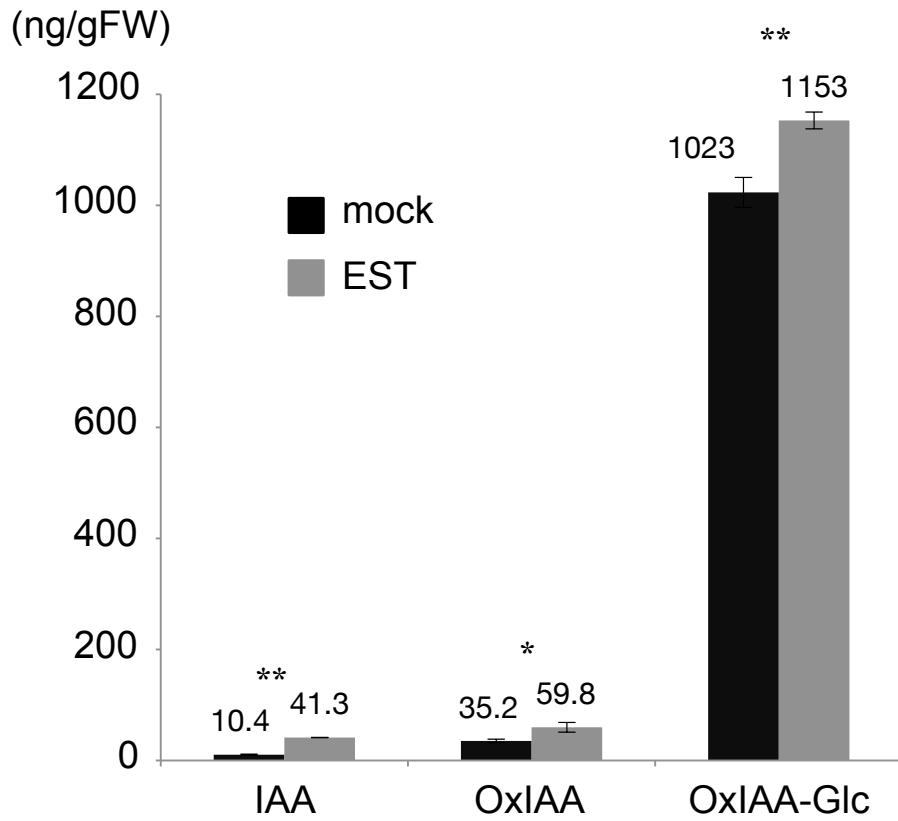
本実験では, *UGT74D1* 遺伝子の発現誘導によりシロイヌナズナの根で重力応答の低下を生じることが明らかになった. これは *UGT74D1* がシロイヌナズナにおいて IAA の恒常性維持に関与していることを示唆している. また, その表現型が IAA 投与により回復したことから, この変異体では重力応答に必要な IAA が根端メリステムなどの細胞内で低下している可能性が高い. なお, Jin らの作成した変異体では根の重力応答異常は報告されていない (Jin *et al.* 2013). これは, Jin らが 35S-プロモーターを用いた恒常的な *UGT74D1* 過剰発現体を解析したのに対し, 本研究では EST 誘導系を用いたことから一過的に多量の OxIAA を細胞内で減少させることが出来たからではないかと考えられる.



**Fig. 20** ベクターコントロール植物 (*pER8*) と EST 誘導型 *UGT74D1* 過剰発現体 (*UGT74D1ox*) における *UGT74D1* 遺伝子の発現解析.

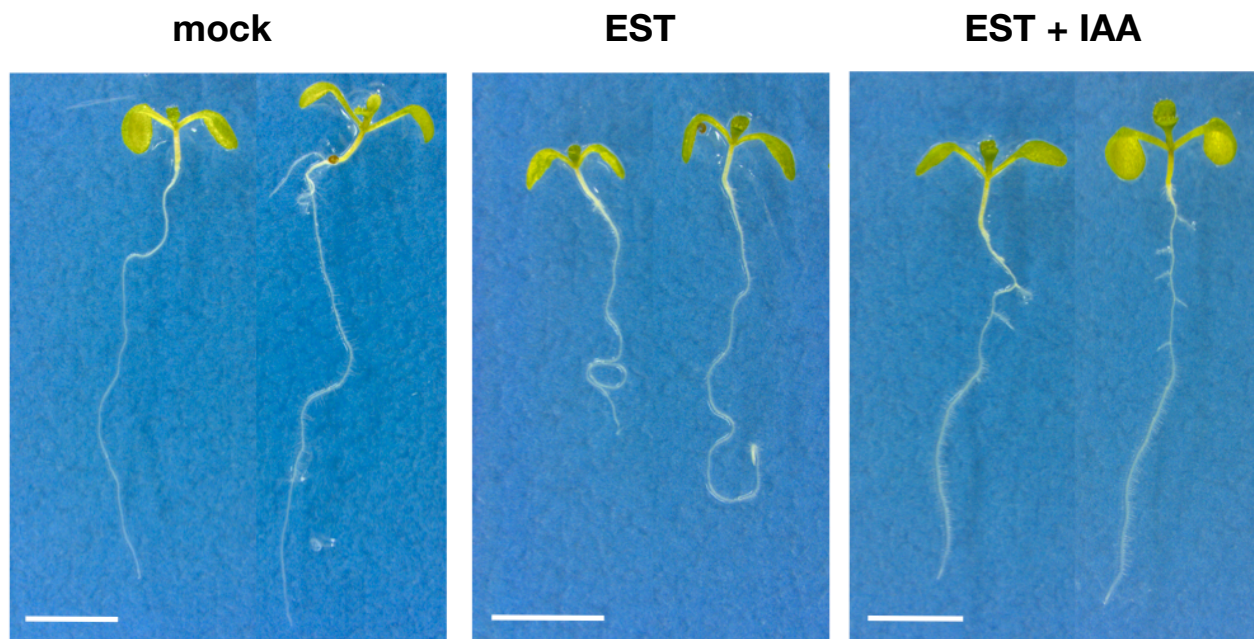
MS 平板培地で 4 日間栽培した実生を, 0.1% DMSO (mock) または 10  $\mu$ M EST (EST) を含む培地に移して 3 日間栽培した.

*UGT74D1* は 25 サイクル, *UBQ10* は 20 サイクルの PCR で増幅した.



**Fig. 21** *UGT74D1ox* の IAA, OxIAA, OxIAA-Glc 内生量

MS 培地で 4 日間栽培した実生を, 0.1% DMSO (mock) または 10  $\mu$ M EST (EST) を含む培地に移し, 3 日間栽培した. エラーバーは標準偏差を示す. ( $n = 3$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*:  $P < 0.05$ )



**Fig. 22** *UGT74D1ox* の表現型.

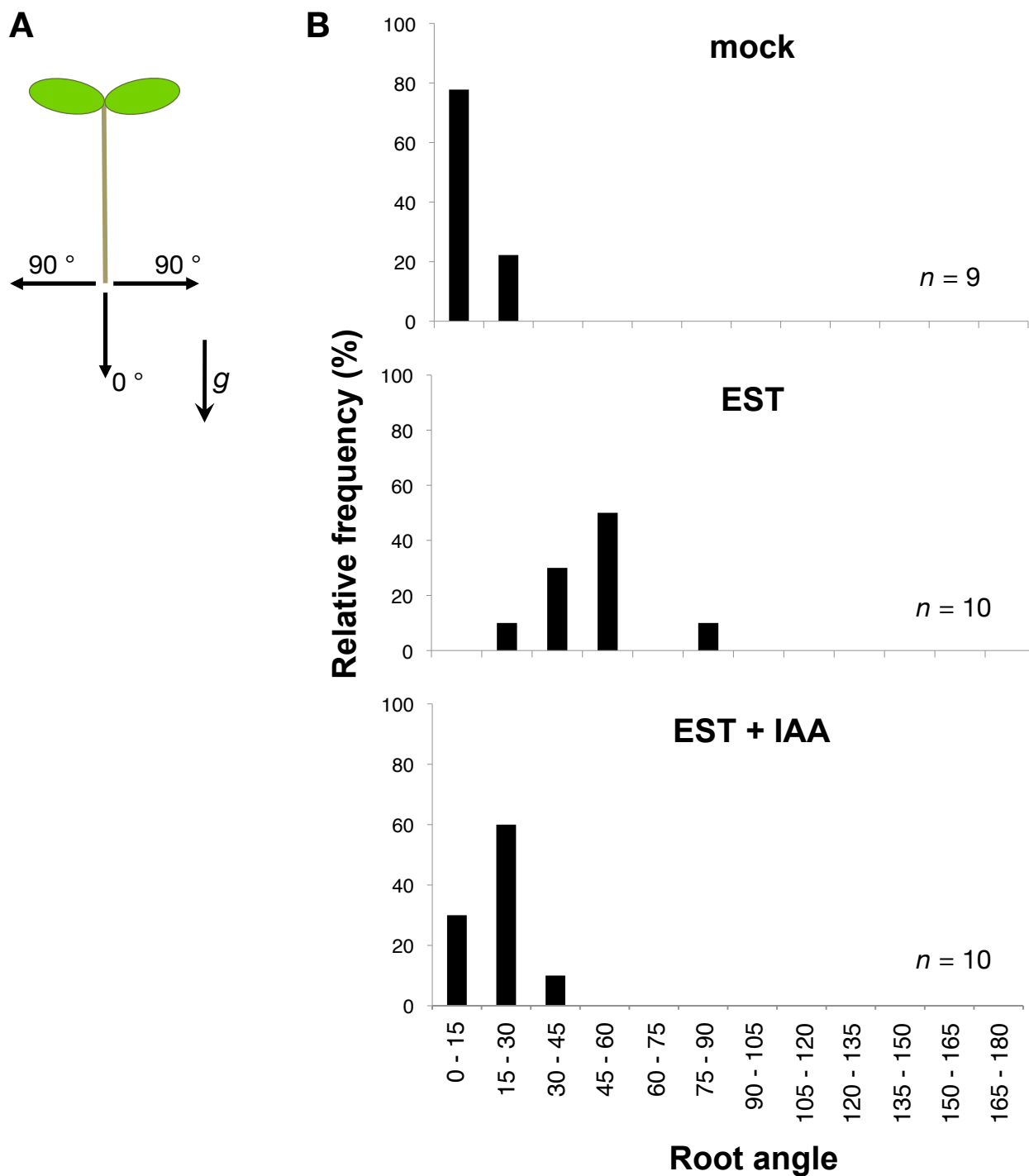
MS 平板培地で 4 日間栽培した実生を, 0.1% DMSO (mock), 10  $\mu$ M EST (EST), 10  $\mu$ M EST と 20 nM IAA (EST + IAA) を含む MS 培地に移して 3 日間栽培した. バーは 5 mm.





**Fig. 23** *GH3.6ox* の表現型

MS 平板培地で 4 日間栽培した実生を, 0.1% DMSO (mock) または 10  $\mu$ M EST (EST)を含む培地に移して 3 日間栽培した.  
バーは 5 mm.



**Fig. 24** *UGT74D1ox* の重力応答.

(A) 重力応答を判定する試験方法の模式図. MS 平板培地で 4 日間栽培した *UGT74D1ox* 実生を, 化合物を含む MS 平板培地に移して 3 日間栽培した後, 重力方向に対する主根の角度を測定した. (B) 0.1 % DMSO (mock), 10  $\mu$ M EST (EST), 10  $\mu$ M EST と 20 nM IAA (EST + IAA) を含む培地で栽培した *UGT74D1ox* の主根と重力方向の間に形成された角度のヒストグラム ( $n = 9-10$ ).

## 第6章 UGT74D1 遺伝子のオーキシシン応答性の解析

### 緒言

オーキシシンの代謝遺伝子はこれまで複数同定されているが、この中で *GH3* 遺伝子はオーキシシンを投与後、数分から1時間で発現が誘導されるオーキシシン早期応答性遺伝子として単離された(Hagen and Guilfoyle 1985, Wright *et al.* 1987). シロイヌナズナのゲノムには *GH3.1* から *GH3.19* まで 19 個の *GH3* 遺伝子が存在し、それぞれがコードする酵素の配列類似性と基質特異性から3つのグループに分類されている。グループ I には *GH3.10* と *GH3.11* が含まれ、*GH3.11* はジャスモン酸 (JA) とアミノ酸の結合を触媒する。グループ II はオーキシシン処理後、短時間で顕著に発現が上昇する *GH3.1*, *GH3.2*, *GH3.3*, *GH3.4*, *GH3.5*, *GH3.6* を含む。ダイズの *GH3* もこのグループに属する。上記した以外のメンバーは、シロイヌナズナに固有であるグループ III に分類される(Staswick 2002, Staswick *et al.* 2005, Staswick and Tiriyaki 2004).

Staswick らによる組換えタンパク質を用いた酵素活性試験の結果、グループ II の *GH3.2*, *GH3.3*, *GH3.4*, *GH3.5*, *GH3.6*, *GH3.17* は ATP 依存的にオーキシシンとアミノ酸を基質としてアミド結合の形成を触媒することが示された (Staswick *et al.* 2005). *GH3* 過剰発現体のシロイヌナズナは、胚軸の長さの低下・側根の減少・矮性などオーキシシン欠損型の表現型を示し、IAA や IBA 等に対する感受性が低下することが知られている(Nakazawa *et al.* 2001, Park *et al.* 2007, Takase *et al.* 2004, Takase *et al.* 2003). さらに Staswick らは、T-DNA 挿入変異体 *gh3.1*, *gh3.2*, *gh3.5*, *gh3.17* はオーキシシンに対する感受性が野生型株に比べて高いと述べている (Staswick *et al.* 2005). これらは、*GH3* による IAA のアミド化がオーキシシン恒常性の維持に重要な役割をもつ可能性を示している。

Östin らは液体培地中でシロイヌナズナに  $^{14}\text{C}$  標識 IAA を投与し、比較的高濃度 (5  $\mu\text{M}$ ) の IAA を与えた時に IAA-Asp と IAA-Glu が生成する割合が高いのに対して、低濃度 (0.5  $\mu\text{M}$ ) の IAA を処理した植物体内では OxIAA と OxIAA hexose を主に生成することを明らかにした (Östin *et al.* 1998). この結果から、シロイヌナズナの IAA 調節機構における *GH3* 経路と OxIAA 経路の役割は異なる可能性が示唆される。そこでシロイヌナズナにおける OxIAA 経路の役割を調べるため、*UGT74D1* と *GH3* 遺伝子のオーキシシン応答性について解析した。

## 材料と方法

### 植物

シロイヌナズナ Col-0 野生型株を使用した。

### 1) オーキシン処理

PPM 希釈液に浸して 4 °C に一晩静置し，種子の表面を殺菌した． PPM 希釈液を 0.1% アガロースに置換して MS 平板培地に蒔き，培地を地面に対し垂直に立てた状態で，白色光下，21 °C で 7 d 栽培した．この実生を，IAA 1 μM を含む MS 平板培地上にピンセットを用いて移した．培地 1 枚につき 10–12 個体を並べ，21 °C，白色光下に 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48 h おいた後，マイクロチューブに回収した．また，IAA を含む培地に移さずチューブに回収した植物体を 0h 処理区とした．回収した実生は液体窒素で速やかに冷凍し，RNA 抽出まで -80 °C に保存した．

### 2) RT-PCR

#### • cDNA の合成

40–60 mg のサンプルを，液体窒素で冷却しながら乳棒と乳鉢を使用して搗り潰し，RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて Total RNA を精製した．RNase フリー水 30 μL を添加して，スピнкаラム・メンブレンから Total RNA を溶出させた．PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (Takara)を用いて，Total RNA 溶液 1 μL から cDNA を合成した．

#### • PCR

下記の組成の反応液を調整し，下記の温度条件で PCR を行った．使用したプライマーの配列は Table 10 に記す．7–10 μL の反応液に 1 μL の 10×Loading Buffer を加えて，1.5% アガロースゲルで電気泳動した．

	( $\mu$ L)
EX Taq HS	0.1
10 $\times$ EX Taq buffer	2.0
2.5 mM dNTP	1.6
F primer	1.0
R primer	1.0
cDNA	1.0
milliQ water	13.3
<hr/>	
Total	20.0

94 °C · 2 min – (98 °C · 10 sec – 55 °C · 30 sec – 72 °C · 40 sec)  $\times$  21 cycle

**Table 10** 本章で使用したプライマー

Primer name	Sequence (5' to 3')
UGT74D1_RT-PCR_F	CCGTGAACGCGACCTATATT
UGT74D1_RT-PCR_R	GACACGTAGATCACTGAACC
GH3.2_F	GAAATGACTCGGAACCCTGA
GH3.2_R	ACCCACCTGACGTCTTTGAC
GH3.3_F	GATGATGCACTCACCGTCCA
GH3.3_R	TGGTAATCCACCGGGAGTCT
GH3.5_F	GGAGTATCTCAGGCGACACG
GH3.5_R	AGGATGGTCTCGTTAGGGCT
UBQ10_F	GGACCAGCAGCGTCTCATCTTCGCT
UBQ10_R	CTTATTCATCAGGGATTATACAAG

## 結果

GH3 経路と OxIAA 経路の生理的役割の違いを調べるために、*UGT74D1* 遺伝子と *GH3* 遺伝子ファミリーのオーキシン応答性を解析した。MS 平板培地で1週間栽培したシロイヌナズナ野生型株の実生を、1  $\mu$ M IAA を含む MS 培地に移し、1–48 h 後に回収した。それらの植物体から RNA を精製し、半定量 RT-PCR によって *UGT74D1*, *GH3.2*, *GH3.3*, *GH3.5*, *UBQ10* の発現レベルを解析した。

その結果、IAA 未処理の植物 (0 h) において *UGT74D1* の発現レベルは *GH3* ファミリーに比べて高かった (Fig. 25)。しかし、IAA 処理後 1 時間以内に *GH3.2*, *GH3.3*, *GH3.5* の発現レベルは著しく上昇し、6 時間以降は緩やかに下降した。これに対して *UGT74D1* は IAA 処理後 3 時間でやや発現が増加したことを除くと、発現量には顕著な差が見られなかった (Fig. 25)。*GH3* 遺伝子ファミリーがオーキシンに早期応答するのに対し、*UGT74D1* は僅かな変動しか見られなかったことから、2つの遺伝子はシロイヌナズナにおいて異なる発現調節を受けていることが示唆された。

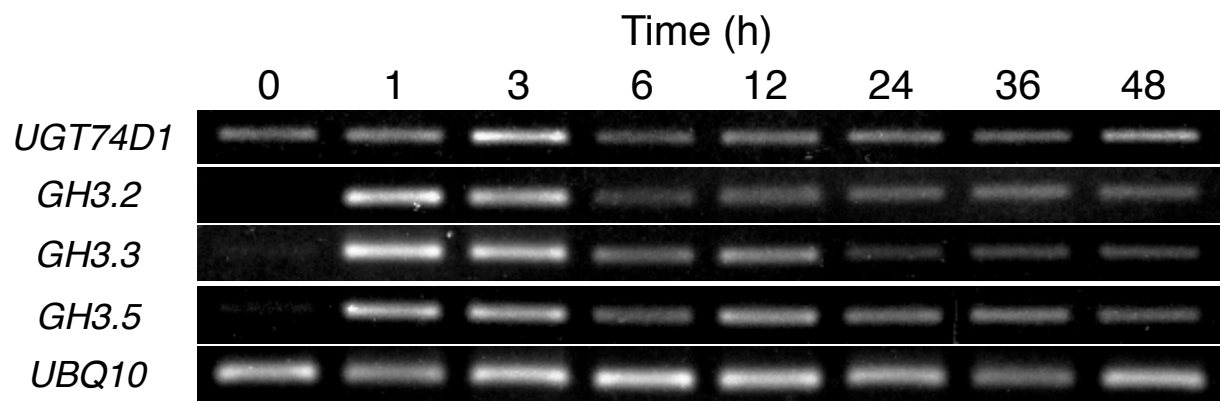
## 考察

本章の実験により、*UGT74D1* 遺伝子と *GH3* ファミリーのオーキシン応答性の違いが明確に示された。IAA 未処理のシロイヌナズナ実生における *UGT74D1* の発現レベルは、*GH3* ファミリーに比べて高かった。しかし、*GH3* ファミリーの発現は IAA 処理後 1 時間以内に劇的に増加したのに対し、*UGT74D1* の発現レベルは *GH3* に比べると僅かな変化しか示さなかった。

通常の栽培条件で生育したシロイヌナズナでは、一般的に IAA-アミノ酸結合体 (IAA-Asp や IAA-Glc) の内生量は IAA の内生量 (約 20ng/gFw) を下回るが、OxIAA (約 60 ng/gFW) と OxIAA-Glc (約 1000 ng/gFW) の内生量は IAA よりも顕著に高いことを第 4 章にて示した。これらの分析結果は、植物体内で IAA が恒常的に OxIAA 経路を介して代謝されていることを示唆している。よって、OxIAA 経路は常にある一定のレベルで IAA を代謝し続け、IAA の濃度を維持する役割を持つと予想される。一方、環境刺激等により IAA 内生量が急激に増加した場合や、発生の過程で IAA 濃度勾配を形成する場合には、*GH3* ファミリーの発現が誘導され、アミド化によって IAA を不活性化する可能性が考えられる。

上記の仮説を検証するには、シロイヌナズナの発生や環境応答における *UGT74D1* および *GH3* の時空間的発現解析や、遺伝子発現パターンと代謝物量の相関を解析することが重要である。また、OxIAA 経路の初発酵素である IAA 酸化酵素が同定できれば、さらに OxIAA 経路の生理的役割を詳しく調べる事が可能になる。

また、IAA の代謝調節においては代謝遺伝子の発現調節機構だけではなく、それぞれの代謝物の細胞内局在も考慮すべき点である。化合物の水溶性が配糖体化によって上昇する例はこれまでに多数報告されている。たとえば、植物色素のアントシアニジンは、配糖体化されてアントシアニンとなり液胞に蓄積される。このことから、植物はグルコシル化を介して不要なオーキシンを液胞や細胞外に排出している可能性が考えられる。Ronocha らの報告によると、液胞内の IAA-Glc 濃度は、IAA, OxIAA, IAA-アミノ酸結合体の濃度に比べて著しく高い (Ronocha *et al.* 2013)。OxIAA-Glc の濃度も液胞内で高い可能性がある。各代謝物の細胞内での分布を詳しく解析する手法の確立も、IAA 代謝経路の研究における今後の課題である。



**Fig. 25** *UGT74D1* と *GH3.2*, *GH3.3*, *GH3.5* のオーキシン応答性の解析.

MS 平板培地で 1 週間栽培した Col-0 野生型株の実生を, 1  $\mu$ M IAA を含む培地に移して栽培を続けた. IAA を含む培地上で栽培した時間 (Time) を上部に示す.



## 総括

### 本研究の成果

オーキシンは、胚発生や器官形成、環境応答、生殖生長に至る様々な生理現象において重要な役割を果たす植物ホルモンであることから、その生合成・輸送・代謝を介した濃度調節機構を解明することは植物の生長制御を理解する上で極めて重要性が高い。また、オーキシンは発根や単為結実の促進などにより作物の増収に寄与することから、その濃度調節機構に関する研究は農業的にも大きな意義を持つ。本研究では、代謝を介した IAA 濃度調節機構の解明を目的として、主要な IAA 代謝経路の一つである OxIAA 経路に関わる酵素を探索した。

第1章では、出芽酵母の AID system を応用したスクリーニング系によりシロイヌナズナの IAA 酸化酵素を探索した。現時点で標的酵素は得られていないが、本スクリーニングを継続することにより標的酵素を同定できる可能性はある。

第2章ではシロイヌナズナにおいて OxIAA のグルコシル化を触媒する UGT を探索した。シロイヌナズナの UGT Group L に属する UGT 遺伝子を酵母で発現させ、OxIAA を含む培地で振とう培養した。培地の代謝物を LC-MS/MS で分析した結果、UGT74D1 を発現した酵母が OxIAA-Glc を生成することを発見した。

そこで、第3章では大腸菌を用いて GST-UGT74D1 を調製し、*in vitro* で UGT74D1 の酵素活性を調べた。その結果、GST-UGT74D1 が UDP-グルコース依存的に OxIAA を OxIAA-Glc に変換することを確認した。本酵素は IAA も基質として認識したが、OxIAA と IAA に対する反応速度パラメータから OxIAA に対してより高い触媒効率を示すことが分かった。

第4章では、シロイヌナズナの OxIAA 経路における UGT74D1 の役割を確かめるために *ugt74d1* 欠損変異体の IAA 代謝物を分析した。その結果、シロイヌナズナに蓄積する OxIAA-Glc の大部分が UGT74D1 による OxIAA のグルコシル化を経て生成することが強く示唆された。一方、OxIAA-Glc の生成において、UGT74D1 と相同性が高い UGT74E1 と UGT74E2 の寄与は低いと考えられた。

第5章では *UGT74D1* の過剰発現体を作成し、本遺伝子の生理機能を調べた。*UGT74D1* の発現誘導によって OxIAA-Glc の内生量は有意に上昇したことから、第2-4章で示唆された本酵素の活性が裏付けられた。また、*UGT74D1* 過剰発現体の根は重力応答の異常を示し、またこれが IAA の共処理により回復したことから、UGT74D1 がシロイヌナズナのオーキシン濃度調節に寄与していることが示唆された。

第6章においては、オーキシン濃度調節における既知の代謝遺伝子との役割の違いを調べるために、シロイヌナズナにおける *GH3* と *UGT74D1* の IAA 応答性を比較した。*GH3* は IAA に早期応答して発現レベルが著しく上昇したのに対し、*UGT74D1* は僅かな変化しか示さなかった。IAA 処理後の *GH3* と *UGT74D1* の異なる遺伝子発現パターンと IAA 代謝物量の変動パターンから、OxIAA 経路は恒常的に IAA 濃度を維持する一方、*GH3* 経路は急速な IAA の増加により活性化される代謝経路だと予想された。

これまで、OxIAA 経路の重要性は代謝物の分析により推測されてきたが、その主要酵素が同定されたことにより、本経路の生理的役割の解明が今後さらに進むと期待される。

## 今後の展望

本研究において、シロイヌナズナの主要な IAA 代謝経路である OxIAA 経路の OxIAA グルコシル転移酵素 *UGT74D1* を同定した (Tanaka *et al.* 2014)。本研究と時を同じくして、2013 年 10 月に Zhao らは葯が非開裂性で単為結実するイネ突然変異体の原因遺伝子として、IAA を OxIAA に酸化する新規の 2-オキソグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼをコードする *DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION (DAO)* 遺伝子を同定した。この機能を欠損した変異体は開花期に内穎花と外穎花が開かず、葯が開裂しない。子房は生長して単為結実するが、その内部はデンプンの代わりに高スクロースの液体で満たされる。葯の IAA 内生量が *dao* 変異体は野生型株よりも高いこと、野生型株に IAA を処理すると単為結実が誘導されること、さらに *OsYUCCA1* 過剰発現体が *dao* 変異体と同様の表現型を示すことなどから、*dao* 変異体で観察される表現型は、小穂における IAA 量の異常な増加によるものであると報告された (Zhao *et al.* 2013)。これらの結果は、OxIAA 経路がイネの生殖器官において重要な役割をもつことを示唆している。さらに、2013 年 10 月には Pěncík らによって、OxIAA がシロイヌナズナの根における主要な IAA 分解物であり、またオーキシン活性をほぼ失った代謝物であることが改めて示された。これら 2013 年に 3 グループからほぼ同時に発表された研究により、OxIAA 経路が植物の主要な IAA 代謝経路であることが明らかになった。今後、*DAO* や *UGT74D1* の欠損変異体や遺伝子発現パターンの解析を通して、OxIAA 経路がどのような生理的役割をもつのか明らかになると予想される。また、OxIAA 経路を含め、これまでに明らかになった複数のオーキシン代謝経路が植物でどのように使い分けられているのかを解明することが重要な研究課題になると考えられる。

最近、Ihimaru らはイネの収量に関わる遺伝子 *THOUSAND-GRAIN WEIGHT 6*

(*TGW6*) の機能を解析し, *TGW6* が新規の IAA-Glc 加水分解酵素であることを突き止めた. *TGW6* タンパク質を欠損すると, 各組織で IAA の供給が減少し, 結果的に胚乳細胞の増加や転流速度の上昇など多面的な効果が誘導されて粒長と粒重が上昇する (Ishimaru *et al.* 2013). このことは, IAA のグルコシル化が植物の生殖器官において重要な調節機能をもつことを示唆している. *TGW6* や前述の *DAO* はイネにおいて同定されたが, シロイヌナズナをはじめ他の植物では未だ相同遺伝子が同定されていない. 植物種によっては *TGW6* や *DAO* とは異なる代謝酵素が同じ反応を触媒する可能性もある. IAA 代謝経路の全容を解明するため, これらが植物に広く保存された代謝遺伝子であるのか検討することも重要である.

## 参考文献

- Bak, S., Beisson, F., Bishop, G., Hamberger, B., Höfer, R., Paquette, S. and Werck-Reichhart, D.** (2011) Cytochromes p450. *Arabidopsis book*, **9**, e0144.
- Barbez, E., Kubeš, M., Rolčík, J., Beziat, C., Pěňčík, A., Wang, B., Rosquete, M.R., Zhu, J., Dobrev, P.I., Lee, Y., Zažímalová, E., Petrášek, J., Geisler, M., Friml, J. and Kleine-Vehn, J.** (2012) A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants. *Nature*, **485**, 119-122.
- Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G. and Friml, J.** (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, **115**, 591-602.
- Bowles, D., Isayenkova, J., Lim, E.K. and Poppenberger, B.** (2005) Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Curr Opin Plant Biol*, **8**, 254-263.
- Caputi, L., Malnoy, M., Goremykin, V., Nikiforova, S. and Martens, S.** (2012) A genome-wide phylogenetic reconstruction of family 1 UDP-glycosyltransferases revealed the expansion of the family during the adaptation of plants to life on land. *Plant J*, **69**, 1030-1042.
- Catalá, C., Östin, A., Chamarro, J., Sandberg, G. and Crozier, A.** (1992) Metabolism of Indole-3-Acetic Acid by Pericarp Discs from Immature and Mature Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Plant Physiol*, **100**, 1457-1463.
- Chamarro, J., Östin, A. and Sandberg, G.** (2001) Metabolism of indole-3-acetic acid by orange (*Citrus sinensis*) flavedo tissue during fruit development. *Phytochemistry*, **57**, 179-187.
- Cheng, Y., Dai, X. and Zhao, Y.** (2006) Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, **20**, 1790-1799.
- Cheng, Y., Dai, X. and Zhao, Y.** (2007) Auxin synthesized by the YUCCA flavin

monooxygenases is essential for embryogenesis and leaf formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **19**, 2430-2439.

**Cohen, J.D. and Bandurski, R.S.** (1982) Chemistry and Physiology of the Bound Auxins. *Annu Rev Plant Phys*, **33**, 403-430.

**Curtis, M.D. and Grossniklaus, U.** (2003) A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol*, **133**, 462-469.

**Darwin, C.** (1880) The power of movement in plants. John Murray, London.

**Dean, J.V. and Delaney, S.P.** (2008) Metabolism of salicylic acid in wild-type, *ugt74f1* and *ugt74f2* glucosyltransferase mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant*, **132**, 417-425.

**Dempsey, D.A., Vlot, A.C., Wildermuth, M.C. and Klessig, D.F.** (2011) Salicylic acid biosynthesis and metabolism. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists*, **9**, e0156.

**Denancé, N., Sánchez-Vallet, A., Goffner, D. and Molina, A.** (2013) Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Frontiers in plant science*, **4**, 155.

**Dharmasiri, N., Dharmasiri, S. and Estelle, M.** (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, **435**, 441-445.

**Ding, Z.J., Wang, B.J., Moreno, I., Dupláková, N., Simon, S., Carraro, N., Reemmer, J., Pěňčík, A., Chen, X., Tejos, R., Skůpa, P., Pollmann, S., Mravec, J., Petrášek, J., Zažímalová, E., Honys, D., Rolčík, J., Murphy, A., Orellana, A., Geisler, M. and Friml, J.** (2012) ER-localized auxin transporter PIN8 regulates auxin homeostasis and male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Nat Commun*, **3**.

**Douglas, C.M., Foor, F., Marrinan, J.A., Morin, N., Nielsen, J.B., Dahl, A.M., Mazur, P., Baginsky, W., Li, W., el-Sherbeini, M., Clemas, J.A., Mandala,**

- S.M., Frommer, B.R. and Kurtz, M.B.** (1994) The *Saccharomyces cerevisiae* *FKS1* (*ETG1*) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3- $\beta$ -D-glucan synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 12907-12911.
- Ernstsen, A., Sandberg, G. and Lundstrom, K.** (1987) Identification of oxindole-3-acetic acid, and metabolic conversion of indole-3-acetic-acid to oxindole-3-acetic acid in *Pinus sylvestris* seeds. *Planta*, **172**, 47-52.
- Franklin, K.A., Lee, S.H., Patel, D., Kumar, S.V., Spartz, A.K., Gu, C., Ye, S., Yu, P., Breen, G., Cohen, J.D., Wigge, P.A. and Gray, W.M.** (2011) PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature. *Proc Natl Acad Sci USA*, **108**, 20231-20235.
- Gachon, C.M., Langlois-Meurinne, M. and Saindrenan, P.** (2005) Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends Plant Sci*, **10**, 542-549.
- Gray, W.M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O. and Estelle, M.** (2001) Auxin regulates SCF<sup>TIR1</sup>-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature*, **414**, 271-276.
- Hagen, G. and Guilfoyle, T.J.** (1985) Rapid induction of selective transcription by auxins. *Molecular and cellular biology*, **5**, 1197-1203.
- Hasegawa, M., Nakajima, M., Takeda, K., Yamaguchi, I. and Murofushi, N.** (1994) A Novel Gibberellin Glucoside, 16- $\alpha$ ,17-dihydroxy-16,17-dihydrogibberellin A<sub>4</sub>-17-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, from rice anthers. *Phytochemistry*, **37**, 629-634.
- Ishimaru, K., Hirotsu, N., Madoka, Y., Murakami, N., Hara, N., Onodera, H., Kashiwagi, T., Ujiie, K., Shimizu, B., Onishi, A., Miyagawa, H. and Katoh, E.** (2013) Loss of function of the IAA-glucose hydrolase gene *TGW6* enhances rice grain weight and increases yield. *Nature genetics*, **45**, 707-711.
- Iyer, M., Slovin, J.P., Epstein, E. and Cohen, J.D.** (2005) Transgenic tomato plants with a modified ability to synthesize indole-3-acetyl- $\beta$ -1-O-D-glucose. *J Plant*

*Growth Regul*, **24**, 142-152.

- Jackson, R.G., Kowalczyk, M., Li, Y., Higgins, G., Ross, J., Sandberg, G. and Bowles, D.J.** (2002) Over-expression of an *Arabidopsis* gene encoding a glucosyltransferase of indole-3-acetic acid: phenotypic characterisation of transgenic lines. *Plant J*, **32**, 573-583.
- Jackson, R.G., Lim, E.K., Li, Y., Kowalczyk, M., Sandberg, G., Hoggett, J., Ashford, D.A. and Bowles, D.J.** (2001) Identification and biochemical characterization of an *Arabidopsis* indole-3-acetic acid glucosyltransferase. *J Biol Chem*, **276**, 4350-4356.
- Jakubowska, A. and Kowalczyk, S.** (2005) A specific enzyme hydrolyzing 6-*O*(4-*O*)-indole-3-ylacetyl-  $\beta$  -D-glucose in immature kernels of *Zea mays*. *Journal of plant physiology*, **162**, 207-213.
- Jin, S.H., Ma, X.M., Han, P., Wang, B., Sun, Y.G., Zhang, G.Z., Li, Y.J. and Hou, B.K.** (2013) UGT74D1 is a novel auxin glycosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, **8**, e61705.
- Kai, K., Horita, J., Wakasa, K. and Miyagawa, H.** (2007) Three oxidative metabolites of indole-3-acetic acid from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, **68**, 1651-1663.
- Kanno, Y., Hanada, A., Chiba, Y., Ichikawa, T., Nakazawa, M., Matsui, M., Koshihara, T., Kamiya, Y. and Seo, M.** (2012) Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 9653-9658.
- Kepinski, S. and Leyser, O.** (2005) The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, **435**, 446-451.
- Korasick, D.A., Enders, T.A. and Strader, L.C.** (2013) Auxin biosynthesis and storage forms. *J Exp Bot*, **64**, 2541-2555.
- Kowalczyk, S. and Bandurski, R.S.** (1990) Isomerization of 1-*O*-indol-3-ylacetyl-  $\beta$

-D-glucose. Enzymatic hydrolysis of 1-*O*, 4-*O*, and 6-*O*-indol-3-ylacetyl-  $\beta$ -D-glucose and the enzymatic synthesis of indole-3-acetyl glycerol by a hormone metabolizing complex. *Plant Physiol*, **94**, 4-12.

**Kushiro, T., Okamoto, M., Nakabayashi, K., Yamagishi, K., Kitamura, S., Asami, T., Hirai, N., Koshiba, T., Kamiya, Y. and Nambara, E.** (2004) The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO J*, **23**, 1647-1656.

**Lee, K.H., Piao, H.L., Kim, H.Y., Choi, S.M., Jiang, F., Hartung, W., Hwang, I., Kwak, J.M., Lee, I.J. and Hwang, I.** (2006) Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell*, **126**, 1109-1120.

**Lesage, G. and Bussey, H.** (2006) Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev. : MMBR*, **70**, 317-343.

**Leznicki, A.J. and Bandurski, R.S.** (1988a) Enzymic synthesis of indole-3-acetyl-1-*O*-  $\beta$ -D-glucose. I. Partial purification and characterization of the enzyme from *Zea mays*. *Plant Physiol*, **88**, 1474-1480.

**Leznicki, A.J. and Bandurski, R.S.** (1988b) Enzymic synthesis of indole-3-acetyl-1-*O*-  $\beta$ -D-glucose. II. Metabolic characteristics of the enzyme. *Plant Physiol*, **88**, 1481-1485.

**Li, Y., Baldauf, S., Lim, E.K. and Bowles, D.J.** (2001) Phylogenetic analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, **276**, 4338-4343.

**Lim, E.K., Doucet, C.J., Li, Y., Elias, L., Worrall, D., Spencer, S.P., Ross, J. and Bowles, D.J.** (2002) The activity of *Arabidopsis* glycosyltransferases toward salicylic acid, 4-hydroxybenzoic acid, and other benzoates. *J Biol Chem*, **277**, 586-592.

**Lim, E.K. and Bowles, D.J.** (2004) A class of plant glycosyltransferases involved in cellular homeostasis. *EMBO J*, **23**, 2915-2922.



- Ljung, K., Östin, A., Lioussanne, L. and Sandberg, G.** (2001) Developmental regulation of indole-3-acetic acid turnover in Scots pine seedlings. *Plant Physiol*, **125**, 464-475.
- Ljung, K.** (2013) Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, **140**, 943-950.
- 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., Kamiya, Y. and Kasahara, H.** (2011) The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **108**, 18512-18517.
- Michalczyk, L. and Bandurski, R.S.** (1982) Enzymic synthesis of 1-*O*-indol-3-ylacetyl- $\beta$ -D-glucose and indol-3-ylacetyl-*myo*-inositol. *Biochem J*, **207**, 273-281.
- Milo, R. and Last, R.L.** (2012) Achieving diversity in the face of constraints: lessons from metabolism. *Science*, **336**, 1663-1667.
- Mizutani, M. and Ohta, D.** (2010) Diversification of P450 genes during land plant evolution. *Annu Rev Plant Biol*, **61**, 291-315.
- Mravec, J., Skůpa, P., Bailly, A., Hoyerová, K., Křeček, P., Bielach, A., Petrášek, J., Zhang, J., Gaykova, V., Stierhof, Y.D., Dobrev, P.I., Schwarzerová, K., Rolčík, J., Seifertová, D., Luschnig, C., Benková, E., Zažímalová, E., Geisler, M. and Friml, J.** (2009) Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature*, **459**, 1136-1140.
- Nakazawa, M., Yabe, N., Ichikawa, T., Yamamoto, Y.Y., Yoshizumi, T., Hasunuma, K. and Matsui, M.** (2001) *DFL1*, an auxin-responsive *GH3* gene homologue, negatively regulates shoot cell elongation and lateral root formation, and positively regulates the light response of hypocotyl length. *Plant J*, **25**, 213-221.

- Nishimura, K., Fukagawa, T., Takisawa, H., Kakimoto, T. and Kanemaki, M.** (2009) An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells. *Nature methods*, **6**, 917-922.
- Normanly, J.** (1997) Auxin metabolism. *Physiol Plantarum*, **100**, 431-442.
- Noutoshi, Y., Okazaki, M., Kida, T., Nishina, Y., Morishita, Y., Ogawa, T., Suzuki, H., Shibata, D., Jikumaru, Y., Hanada, A., Kamiya, Y. and Shirasu, K.** (2012) Novel plant immune-priming compounds identified via high-throughput chemical screening target salicylic acid glucosyltransferases in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **24**, 3795-3804.
- Novák, O., Hényková, E., Sairanen, I., Kowalczyk, M., Pospíšil, T. and Ljung, K.** (2012) Tissue-specific profiling of the *Arabidopsis thaliana* auxin metabolome. *Plant J*, **72**, 523-536.
- Oka, T. and Jigami, Y.** (2006) Reconstruction of *de novo* pathway for synthesis of UDP-glucuronic acid and UDP-xylose from intrinsic UDP-glucose in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J*, **273**, 2645-2657.
- Osmani, S.A., Bak, S. and Møller, B.L.** (2009) Substrate specificity of plant UDP-dependent glycosyltransferases predicted from crystal structures and homology modeling. *Phytochemistry*, **70**, 325-347.
- Östin, A., Kowalczyk, M., Bhalerao, R.P. and Sandberg, G.** (1998) Metabolism of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **118**, 285-296.
- Park, J.E., Park, J.Y., Kim, Y.S., Staswick, P.E., Jeon, J., Yun, J., Kim, S.Y., Kim, J., Lee, Y.H. and Park, C.M.** (2007) GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, **282**, 10036-10046.
- Pěňčík, A., Simonovik, B., Petersson, S.V., Henyková, E., Simon, S., Greenham, K., Zhang, Y., Kowalczyk, M., Estelle, M., Zažímalová, E., Novák, O., Sandberg, G. and Ljung, K.** (2013) Regulation of auxin homeostasis and gradients in *Arabidopsis* roots through the formation of the indole-3-acetic acid

catabolite 2-oxindole-3-acetic acid. *Plant Cell*.

- Petrášek, J., Mravec, J., Bouchard, R., Blakeslee, J.J., Abas, M., Seifertová, D., Wiśniewska, J., Tadele, Z., Kubeš, M., Čovanová, M., Dhonukshe, P., Skůpa, P., Benková, E., Perry, L., Křeček, P., Lee, O.R., Fink, G.R., Geisler, M., Murphy, A.S., Luschnig, C., Zažímalová, E. and Friml, J.** (2006) PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science*, **312**, 914-918.
- Priest, D.M., Jackson, R.G., Ashford, D.A., Abrams, S.R. and Bowles, D.J.** (2005) The use of abscisic acid analogues to analyse the substrate selectivity of UGT71B6, a UDP-glycosyltransferase of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS lett*, **579**, 4454-4458.
- Ranocha, P., Dima, O., Nagy, R., Felten, J., Corratgé-Faillie, C., Novák, O., Morreel, K., Lacombe, B., Martinez, Y., Pfrunder, S., Jin, X., Renou, J.P., Thibaud, J.B., Ljung, K., Fischer, U., Martinoia, E., Boerjan, W. and Goffner, D.** (2013) *Arabidopsis* WAT1 is a vacuolar auxin transport facilitator required for auxin homeostasis. *Nat Commun*, **4**, 2625.
- Rawat, R., Schwartz, J., Jones, M.A., Sairanen, I., Cheng, Y., Andersson, C.R., Zhao, Y., Ljung, K. and Harmer, S.L.** (2009) REVEILLE1, a Myb-like transcription factor, integrates the circadian clock and auxin pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, **106**, 16883-16888.
- Reinecke, D.M. and Bandurski, R.S.** (1983) Oxindole-3-acetic Acid, an Indole-3-acetic Acid Catabolite in *Zea mays*. *Plant Physiol*, **71**, 211-213.
- Reinecke, D.M. and Bandurski, R.S.** (1988) Oxidation of indole-3-acetic acid to oxindole-3-acetic acid by an enzyme preparation from *Zea mays*. *Plant Physiol*, **86**, 868-872.
- Riov, J. and Bangerth, F.** (1992) Metabolism of auxin in tomato fruit tissue - formation of high-molecular-weight conjugates of oxindole-3-acetic acid via the oxidation of indole-3-acetylaspartic acid. *Plant Physiol*, **100**, 1396-1402.

- Ross, J., Li, Y., Lim, E. and Bowles, D.J.** (2001) Higher plant glycosyltransferases. *Genome Biol*, **2**, REVIEWS3004.
- Sairanen, I., Novák, O., Pěňčík, A., Ikeda, Y., Jones, B., Sandberg, G. and Ljung, K.** (2012) Soluble carbohydrates regulate auxin biosynthesis via PIF Proteins in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **24**, 4907-4916.
- Sakai, T. and Haga, K.** (2012) Molecular genetic analysis of phototropism in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, **53**, 1517-1534.
- Sauer, M., Robert, S. and Kleine-Vehn, J.** (2013) Auxin: simply complicated. *J Exp Bot*, **64**, 2565-2577.
- Schomburg, F.M., Bizzell, C.M., Lee, D.J., Zeevaart, J.A. and Amasino, R.M.** (2003) Overexpression of a novel class of gibberellin 2-oxidases decreases gibberellin levels and creates dwarf plants. *Plant Cell*, **15**, 151-163.
- Staswick, P.E. Tiryaki, I. and Rowe, M. L.** (2002) Jasmonate Response locus *JAR1* and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell*, **14**, 1405-1415.
- Staswick, P.E., Serban, B., Rowe, M., Tiryaki, I., Maldonado, M.T., Maldonado, M.C. and Suza, W.** (2005) Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell*, **17**, 616-627.
- Staswick, P.E. and Tiryaki, I.** (2004) The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**, 2117-2127.
- Stepanova, A.N., Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L.M., Xie, D.Y., Dolezal, K., Schlereth, A., Jürgens, G. and Alonso, J.M.** (2008) *TAA1*-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell*, **133**, 177-191.
- Stepanova, A.N., Yun, J., Robles, L.M., Novak, O., He, W., Guo, H., Ljung, K. and Alonso, J.M.** (2011) The *Arabidopsis* YUCCA1 flavin monooxygenase

functions in the indole-3-pyruvic acid branch of auxin biosynthesis. *Plant Cell*, **23**, 3961-3973.

**Sugawara, S., Hishiyama, S., Jikumaru, Y., Hanada, A., Nishimura, T., Koshiba, T., Zhao, Y., Kamiya, Y. and Kasahara, H.** (2009) Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **106**, 5430-5435.

**Sun, J., Qi, L., Li, Y., Chu, J. and Li, C.** (2012) PIF4-mediated activation of *YUCCA8* expression integrates temperature into the auxin pathway in regulating *Arabidopsis* hypocotyl growth. *PLoS Genet*, **8**, e1002594.

**Szerszen, J. B., Szczyglowski, K. and Bandurski, R. S.** (1994) *iaglu*, a gene from *Zea mays* involved in conjugation of growth hormone indole-3-acetic acid. *Science*, **265**, 1699-1701

**Sztejn, A.E., Cohen, J.D., de la Fuente, I.G. and Cooke, T.J.** (1999) Auxin metabolism in mosses and liverworts. *Am J Bot*, **86**, 1544-1555.

**Takase, T., Nakazawa, M., Ishikawa, A., Kawashima, M., Ichikawa, T., Takahashi, N., Shimada, H., Manabe, K. and Matsui, M.** (2004) *ydk1-D*, an auxin-responsive *GH3* mutant that is involved in hypocotyl and root elongation. *Plant J*, **37**, 471-483.

**Takase, T., Nakazawa, M., Ishikawa, A., Manabe, K. and Matsui, M.** (2003) *DFL2*, a new member of the *Arabidopsis GH3* gene family, is involved in red light-specific hypocotyl elongation. *Plant Cell Physiol*, **44**, 1071-1080.

**Tam, Y.Y., Epstein, E. and Normanly, J.** (2000) Characterization of auxin conjugates in *Arabidopsis*. Low steady-state levels of indole-3-acetyl-aspartate, indole-3-acetyl-glutamate, and indole-3-acetyl-glucose. *Plant Physiol*, **123**, 589-596.

**Tan, X., Calderon-Villalobos, L.I., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C.V., Estelle, M. and Zheng, N.** (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature*, **446**, 640-645.

- Tanaka, K., Hayashi, K., Natsume, M., Kamiya, Y., Sakakibara, H., Kawaide, H. and Kasahara, H.** (2014) UGT74D1 catalyzes the glucosylation of 2-oxindole-3-acetic acid in the auxin metabolic pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, **55**, 218-228.
- Tao, Y., Ferrer, J.L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F., Long, J.A., Li, L., Moreno, J.E., Bowman, M.E., Ivans, L.J., Cheng, Y., Lim, J., Zhao, Y., Ballaré, C.L., Sandberg, G., Noel, J.P. and Chory, J.** (2008) Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell*, **133**, 164-176.
- Thomas, S.G., Phillips, A.L. and Hedden, P.** (1999) Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2- oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 4698-4703.
- Tognetti, V.B., Van Aken, O., Morreel, K., Vandenbroucke, K., van de Cotte, B., De Clercq, I., Chiwocha, S., Fenske, R., Prinsen, E., Boerjan, W., Genty, B., Stubbs, K.A., Inzé, D. and Van Breusegem, F.** (2010) Perturbation of indole-3-butyric acid homeostasis by the UDP-glucosyltransferase *UGT74E2* modulates *Arabidopsis* architecture and water stress tolerance. *Plant Cell*, **22**, 2660-2679.
- Vanneste, S. and Friml, J.** (2009) Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell*, **136**, 1005-1016.
- von Saint Paul, V., Zhang, W., Kanawati, B., Geist, B., Faus-Kessler, T., Schmitt-Kopplin, P. and Schäffner, A.R.** (2011) The *Arabidopsis* glucosyltransferase UGT76B1 conjugates isoleucic acid and modulates plant defense and senescence. *Plant Cell*, **23**, 4124-4145.
- Won, C., Shen, X., Mashiguchi, K., Zheng, Z., Dai, X., Cheng, Y., Kasahara, H., Kamiya, Y., Chory, J. and Zhao, Y.** (2011) Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF *ARABIDOPSIS* and YUCCAs in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **108**, 18518-18523.

- Woodward, A.W. and Bartel, B.** (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot*, **95**, 707-735.
- Wright, R.M., Hagen, G. and Guilfoyle, T.** (1987) An auxin-induced polypeptide in dicotyledonous plants. *Plant Mol Biol*, **9**, 625-634.
- Yamada, M., Greenham, K., Prigge, M.J., Jensen, P.J. and Estelle, M.** (2009) The *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE2* gene is required for auxin synthesis and diverse aspects of plant development. *Plant Physiol*, **151**, 168-179.
- Yonekura-Sakakibara, K. and Hanada, K.** (2011) An evolutionary view of functional diversity in family 1 glycosyltransferases. *Plant J*, **66**, 182-193.
- Yonekura-Sakakibara, K. and Saito, K.** (2009) Functional genomics for plant natural product biosynthesis. *Nat Prod Rep*, **26**, 1466-1487.
- Zhao, Y.** (2010) Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu Rev Plant Biol*, **61**, 49-64.
- Zhao, Y., Hull, A.K., Gupta, N.R., Goss, K.A., Alonso, J., Ecker, J.R., Normanly, J., Chory, J. and Celenza, J.L.** (2002) Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes Dev*, **16**, 3100-3112.
- Zhao, Z., Zhang, Y., Liu, X., Zhang, X., Liu, S., Yu, X., Ren, Y., Zheng, X., Zhou, K., Jiang, L., Guo, X., Gai, Y., Wu, C., Zhai, H., Wang, H. and Wan, J.** (2013) A role for a dioxygenase in auxin metabolism and reproductive development in rice. *Dev cell*, **27**, 113-122.

小柴共一・神谷勇治・勝見允行 (2006) 『植物ホルモンの分子細胞生物学 —生長・分化・環境応答の制御機構』講談社

## 略語表

略語	原形
EST	$\beta$ -estradiol
GH3	GRETCHEN HAGEN 3
GST	glutathione <i>S</i> -transferase
IAA	indole-3-acetic acid
IAA-Asp	IAA-aspartate
IAA-Glc	1- <i>O</i> -(indol-3-ylacetyl)- $\beta$ -D-glucose
IAA-Glu	IAA-glutamate
IBA	indole-3-butylic acid
IBA-Glc	1- <i>O</i> -(indol-3-ylbutanoyl)- $\beta$ -D-glucose
LC-ESI-MS/MS	liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry
MS	Murashige and Skoog
MS/MS	tandem mass spectrometry
OxIAA	2-oxindole-3-acetic acid
OxIAA-Glc	1- <i>O</i> -(2-oxindol-3-ylacetyl)- $\beta$ -D-glucose
RT-PCR	reverse transcription-PCR
UGT	UDP-glycosyltransferase



## 謝辞

研究成果の発表の場と論文執筆の機会を賜りました東京農工大学大学院農学研究院 夏目雅裕教授に深く感謝致します。ならびに、本研究に対し終始変わらぬご指導ご教示を頂いた東京農工大学大学院農学研究院 川出洋准教授に深く感謝いたします。また、多くのご支援を頂いた宇都宮大学雑草科学研究センター 米山弘一教授に厚く謝意を申し述べます。さらに、ご指導とご審査の労を頂きました茨城大学農学部 鈴木義人教授、東京農工大学大学院農学研究院 寺岡徹教授に深謝いたします。そして、本研究の全行程にわたって、丁寧なご指導と厳しいご鞭撻と暖かい励ましを頂きました理化学研究所環境資源科学研究センター 笠原博幸上級研究員に心から感謝申し上げます。

本研究に使用した内部標準化合物をご恵与いただいたことに加え、多大なご助言をいただいた岡山理科大学理学部 林謙一郎教授に厚くお礼申し上げます。また、ベクターpMDC7をご提供いただいたロックフェラー大学 Nam-Hai Chua 教授に深謝いたします。

本研究の遂行にあたり、多岐にわたる援助を頂戴した理化学研究所 神谷勇治コーディネーターと、理化学研究所環境資源科学研究センター 榊原均グループディレクターに深くお礼申し上げます。理化学研究所環境資源科学研究センター 増口潔基礎科学特別研究員からは、研究活動のみならず、人生についてたいへん多くのことを教わりました。心から感謝いたします。ならびに、機器分析について多くの助言を頂いた竹林裕美子テクニカルスタッフ、作業にご協力いただいた井出紋研究補助員をはじめ、理化学研究所環境資源科学研究センターの皆様にも深くお礼申し上げます。また、いつも暖かく接してくれた東京農工大学生物制御化学研究室の皆様にも感謝いたします。

本研究の一部は日本学術振興会特別研究員奨励費（課題番号 25・6665）の助成のもと遂行しました。ここに感謝の意を表します。

最後になりましたが、私生活面で刺激と励ましを貰った友人達と、生活の全てにおいて最大限の支援をいただいた家族に、心から感謝しております。