

学 位 論 文 要 旨

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

Study on the molecular mechanisms of catabolic regulation of indole-3-acetic acid in
Arabidopsis

生物生産科学専攻 生物制御科学大講座

田中 慧太

インドール-3-酢酸 (IAA) は、胚発生、器官形成、環境応答など植物の生活環の様々な局面で中心的な働きを担うオーキシンである。植物は生合成、輸送、代謝を介して IAA の細胞内濃度を調節し、生長や分化を制御すると考えられている。これまでに植物ではアミド化、グルコシル化、メチル化、酸化を触媒する複数の IAA 代謝酵素が同定されているが、それらの使い分けや生理的役割についてはこれまで殆ど解明されていない。

シロイヌナズナにおいて、IAA は酵素的な酸化を受けて 2-oxindole-3-acetic acid (OxIAA) に変換された後、グルコシル化を受けて 1-O-(2-oxindol-3-ylacetyl)- β -D-glucose (OxIAA-Glc) を生じることが知られている。この経路 (OxIAA 経路) はシロイヌナズナの主要な IAA 代謝経路の一つと考えられているが、本経路に関わる酵素はまだ同定されていない。本研究では、代謝による IAA 濃度調節機構の全容解明を目的として、IAA 酸化酵素の探索、OxIAA グルコシル転移酵素の探索とその同定、およびその酵素機能の解析を行った。

第 1 章では出芽酵母の Auxin-inducible degron system を応用したスクリーニング系を構築し、OxIAA 経路の第一段階を触媒する IAA 酸化酵素を探索した。シロイヌナズナの花芽から精製した mRNA を材料に cDNA ライブラリーを作成し、スクリーニングに使用した。複数の陽性クローンを獲得したが、最終的に標的酵素の同定には至らなかった。

第 2 章では、出芽酵母を使用して OxIAA 経路の第 2 段階を触媒する OxIAA グルコシル化酵素のスクリーニングを行った。IAA やインドール-3-酪酸のグルコシル化を触媒する UDP-依存型配糖体化酵素 (UGT) が報告されていることから、同様の酵素が OxIAA のグルコシル化にも関与すると予想し、シロイヌナズナの UGT ファミリーのグループ L に属する 13 種類の酵素をスクリーニングした。その結果から、OxIAA グルコシル化酵素を

コードする候補遺伝子として *UGT74D1* を選抜した。

第 3 章では、*UGT74D1* の酵素活性を確かめるために、大腸菌を用いて調製した GST 融合タンパク質を用いて酵素活性試験を行なった。その結果、GST-*UGT74D1* が OxIAA のグルコシル化を触媒することが確認された。また、*UGT74D1* は *in vitro* で IAA のグルコシル化も触媒することが報告されていたため、OxIAA と IAA に対する GST-*UGT74D1* の反応速度を解析したところ、この酵素は OxIAA に対してより高い触媒効率を示した。

第 4 章では、植物体内における *UGT74D1* の活性を確かめるために、*ugt74d1* 欠損変異体シロイヌナズナの IAA, OxIAA, OxIAA-Glc の内生量を分析した。その結果、この変異体の OxIAA 内生量は野生型株の約 2.5 倍に増加し、OxIAA-Glc 内生量は野生型株の 85% 程度減少していた。さらに、*UGT74D1* と高い相同性を持つ *UGT74E1* と *UGT74E2* の遺伝子欠損変異体もそれぞれ分析したが、これらの変異体の OxIAA, OxIAA-Glc の内生量には有意な差が認められなかった。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化酵素であると結論した。

第 5 章では、*UGT74D1* の IAA 濃度調節への寄与を調べるために、 β -エストラジオール (EST) 誘導型の *UGT74D1* 過剰発現体を作成した。EST 処理により *UGT74D1* 遺伝子の発現を誘導した実生では OxIAA-Glc 内生量が対象区に比べて約 13% 増加したことから、*UGT74D1* がシロイヌナズナで OxIAA グルコシル化に寄与する可能性が支持された。また、*UGT74D1* 遺伝子の発現誘導により実生の根が顕著な重力応答異常を示した。IAA 処理によって根の重力応答異常が回復したことから、*UGT74D1* はシロイヌナズナの根において IAA 濃度調節に寄与することが示された。

第 6 章では、GH3 ファミリーが触媒するアミド化による IAA 代謝経路と OxIAA 経路の役割を調べるために、GH3 遺伝子ファミリーと *UGT74D1* 遺伝子の IAA 応答性を比較した。オーキシン早期応答遺伝子として知られる GH3 遺伝子の発現が IAA により短時間で強く誘導されたのに対し、*UGT74D1* の発現レベルは IAA 処理後も僅かな変化しか示さなかった。この結果、両者はシロイヌナズナの IAA 代謝調節機構において異なる役割をもつと考えられた。

これらの結果から、*UGT74D1* は OxIAA 経路のグルコシル化酵素としてシロイヌナズナの IAA 濃度維持に重要な役割を果たすことが示唆された。今後、シロイヌナズナにおける *UGT74D1* 遺伝子の詳細な発現パターンの解析や IAA 酸化酵素の同定、複数の IAA 代謝物の一斉分析などが、オーキシンによる植物の成長・分化制御機構を理解する上で重要な研究課題になると考えられる。