

# 高等植物におけるインドール酢酸生合成

鶴崎 健一

## Biosynthesis of Indole-3-Acetic Acid in Higher Plants

Ken-ichi TSURUSAKI

### 要 旨

本研究は植物ホルモンであるオーキシンの生合成経路の解明を目的としたものである。植物に内在するオーキシシンとしてインドール酢酸が知られているが、トリプトファンと似た単純な構造の物質であるにも関わらず、未だに生合成経路が解明されていない。本研究では細胞外空間であるアポプラストがインドール酢酸生合成にどのような役割を果たすのか、また、根に特有な生合成経路の解明に焦点を当て、インドール酢酸生合成の前駆物質、量的な制御について調べた。本論文は4章から構成されている。

#### [第1章] (序論)

オーキシシンは世界で初めて発見された植物ホルモンであり、その起源は1880年のダーウィンの屈光性の実験にさかのぼることができる。植物の天然オーキシシンとしては、1931年に発見されたインドール酢酸 (IAA) が知られている。IAAは構造がトリプトファン (Trp) に似た比較的単純な構造をしている物質であるが、植物体内への存在量がきわめて少なく、不安定であるために、その生合成経路は未だに解明されていない。一般的にIAAはトリプトファンを出発物質として複数の生合成経路が考えられているが、いずれの経路も決め手がなく高等植物に普遍的な経路は示されていない。最近、Trp生合成能の低いトウモロコシの実験から、IAAはTrpから生合成されないとの報告もある。本論文では、IAA生合成経路の解明とその制御部位を検討するために、次の3つの系を用いた。(1) IAA生合成の少ないオオムギ突然変異 [第2章第1節・第2節]、(2) カボチャ下胚軸のアポプラストとシンプラストでのIAA濃度の比較 [第2章第3節]、(3) カボチャの根でのIAA生合成の前駆物質の検索 [第3章第1節・第2節]。

#### [第2章]

第1節では、1987年に提唱されたTrpからのIAA生合成経路の仮説である、L-TrpがD-Trpに変換された後に、IAAが生合成されるという経路について検討した。IAAの内在量が少ないために矮性を示すオオムギの幼葉鞘の切片にD-Trpを投与すると、矮性系統、正常系統ともL-Trpよりも伸長を促進した。また、D-Trpを投与することで両系統の切片内のIAA量が増加した。しかし、前駆物質として存在すべき量の内在D-Trpが検出されず、IAAへの変換に関与していると考えられる酵素のTrpラセマーゼやD-Trpアミノトランスフェラーゼも精製できなかった。D-Trpを経由する経路には

否定的な報告も多く、IAA生合成へのTrpの関与は否定されなかったが、D-Trp経由の経路は植物のIAA生合成に関与している可能性が低いと考えられる。

第2節では、第1節でTrpがIAA生合成に関与するかどうかははっきりしなかったので、次にIAA生合成の直前の前駆物質が何か検討することにした。IAAの直前の前駆物質の候補としてインドールアセトアルデヒド (IAAld)、インドールアセトニトリル (IAN)、インドールアセトアミド (IAM) が知られている。これらの物質が、オオムギ幼葉鞘の粗酵素標品でIAAに変換されるかどうか、矮性系統と正常系統で差があるかどうかを調べた。その結果、10,000×gで遠心した上清部分の可溶性画分ではIAAldとIANはIAAに変換されたが、IAMは変換されなかった。また、IAAldあるいはIANのIAAへの変換の比活性は矮性系統と正常系統の間で差が見られなかった。そのため、可溶性画分のIAAldあるいはIANをIAAに変換する活性は、矮性系統でIAA量が少ない原因ではないことが示された。IAMはIAAに変換されなかったため、オオムギ幼葉鞘ではIAAの生合成に関与していない可能性が示された。遠心後の沈殿部分である細胞壁画分では、IAAldをIAAに変換する活性が見られ、その活性は矮性系統の方が正常系統よりも低いことが示された。したがって、細胞壁画分、すなわち、アポプラスト (細胞膜の外側) に見られる矮性系統のIAAldをIAAに変換する活性の低いことが、矮性系統のIAAの内性量の低い原因である可能性が示された。また、成長中のオオムギ幼葉鞘の細胞の外側のアポプラストでIAAldを経由してIAAが生合成されている可能性が示された。

もし、IAAがアポプラストで生合成されるとすると、IAAは細胞の外側から植物の成長に効果を与えている可能性がある。また、IAAの受容体が原形質膜の外側に存在していることも報告されている。細胞の外からIAAが作用しているとなると、IAAは細胞の外側に局在している可能性がある。そこで第3節では、カボチャの下胚軸の成長帯を用いてアポプラストと細胞内部のシンプラスト中のそれぞれのIAA濃度を測定した。その結果、成長帯でのIAA濃度は、アポプラストの方がシンプラストよりも高く、またアポプラストでのIAA濃度は生理的に伸長促進効果の高い範囲で存在することが分かった。IAA生合成活性がアポプラスト中に存在し、さらに成長帯でアポプラスト中のIAA濃度が高いことから、IAAの前駆物質が自己分泌機構によりアポプラスト中へ放出され、その後IAAに変換されて細胞伸長を引き起こす可能性が示された。

### [第3章]

第1節では、根で特有のIAA生合成があるかどうかを調べるために、カボチャの根の粗酵素標品にアブラナ科の植物でIAAの前駆物質の可能性が示されている、N-ヒドロキシトリプトファン (N-OH-Trp) を用いて、IAA生合成活性とIAA生合成の中間体を検索し、その生成量を比較した。その結果、主に4種類のインドール化合物が検出され、N-OH-Trpからインドールアセトアルドキシムを経由してIAAldあるいはIANを介してIAAが生合成されている可能性が示された。また、IAAldを直接検出することが困難なために、IAAldをトラップする試薬として亜硫酸水素ナトリウムを用いた実験から、IANよりもIAAldがより直接的にIAAの生合成に関与している可能性が示された。この結果から、カボチャの根においても、IAAldがIAAの直接的な前駆物質である可能性が示された。

また、カボチャの根の粗酵素標品にはIAAld、IANだけでなく、微生物で知られているIAMをIAAに変換する活性が存在することも示された。そこで第2節では、カボチャの根の内性IAMの定性と、IAMをIAAに変換するアミドヒドロラーゼの精製を行った。カボチャの根は無菌的に培養して実験に用いた。その結果、IAMはGC-MSで同定され、カボチャの根に存在することが示された。また、アミドヒドロラーゼを48倍まで部分精製して、微生物由来の酵素と比較すると、Km値、最

適pHなど性質が異なっており、異なった酵素であることが分かった。これらのことから、IAMもカボチャの根でIAA生成の前駆物質の一つである可能性が示された。

#### [第4章] (総合考察)

本研究では、IAA生成へのTrpの関与は解明できなかったが、高等植物のIAAの生合成には様々な経路が存在している可能性を示した。オオムギ幼葉鞘とカボチャの根を用いた研究から、IAA生成の直前の前駆物質としてIAAldが重要であり、IAA生成の植物普遍の前駆物質である可能性を示した。さらに、IAMを経由する経路など、植物共通の経路として考えることはできないが、IAAldを経由する経路以外のIAA生成のバイパスが存在する可能性も示した。

また、本研究では、初めてIAAldからIAAに変換するアルデヒド酸化酵素がアポプラストに存在する可能性を示した。さらに、初めてアポプラストとシンプラストに含まれるIAAの量を別々に測定し、成長帯のアポプラストでIAA濃度が高いことを示した。これらの結果から、IAA生成にはアポプラストが大きな役割を果たし、植物においても動物同様の自己分泌機構を持っている可能性を初めて示した。