

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2017～2021

課題番号：17H06474

研究課題名（和文）幹細胞新生のタイミングを制御する分子機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms for the timing of the production of stem cells in plants

研究代表者

山口 信次郎（Yamaguchi, Shinjiro）

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：10332298

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 61,700,000円

研究成果の概要（和文）：イネやシロイヌナズナの突然変異体の解析から、葉が作られるタイミングを制御する未知の低分子シグナル分子の存在が示唆されていた。シロイヌナズナの変異体は器官サイズが低下した変異体としても解析されていた。本研究では、当シグナル分子の実体を解明するための実験系を確立した。また、ヒメツリガネゴケを用いた研究から当シグナル分子の作用には植物ホルモンであるオーキシンやサイトカイニンの分布または量の変化が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、陸上植物において共通して存在することが示唆されている未知の低分子シグナル分子を植物抽出物中から追跡する手法を確立した。今後、同手法を用いてさらに精製を進めることにより、目的物質の同定が期待される。当シグナル分子は器官サイズに影響を与えるため、農業において重要な役割を果たすと考えられ、有用植物の生産性の増大に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Analysis of rice and Arabidopsis mutants suggested the presence of an unknown small signaling molecule that regulates the timing of leaf production. The Arabidopsis mutant was also studied as mutants with reduced organ size. In this study, we established an experimental system to elucidate the identity of this signaling molecule. In addition, a study using the *Physcomitrium patens* moss suggested that changes in the distribution and/or amount of the plant hormones auxin and cytokinin are involved in the action of this signaling molecule.

研究分野：植物生化学

キーワード：シグナル分子 植物 器官サイズ 植物ホルモン 植物多能性幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物の永続的な生命力を支える重要な要因として、幹細胞が多能性を失うこと無く維持されるという点と、発生様式にみられるモジュール性が挙げられる。植物の地上部は、ファイトマーと呼ばれる葉、茎、腋芽からなる基本単位が連結して成長する。葉の付け根の腋芽には幹細胞が存在し、これを起点に枝が成長し、新たな器官が生成する。ファイトマーに存在する腋芽の幹細胞は一定のタイミングで生み出されるが、その仕組みについてはよく分かっていなかった。

(2) 植物ホルモンをはじめとする低分子シグナルは植物の成長・分化や環境応答に重要な役割を果たす。シトクロム P450 はこれらの低分子シグナルの生合成や不活性化の多くのステップに関与しているファミリーである。シトクロム P450 の CYP78A と呼ばれるサブファミリーに属する酵素が欠損したイネやシロイヌナズナの変異体においては、葉が作られるタイミングが早くなっており、腋芽幹細胞の新生のタイミングが早くなっていると考えられた。

(3) 筆者らは以前に、腋芽の成長抑制に働く植物ホルモンとして「ストリゴラクトン」を同定した。本研究開始当初においては、その生合成の概要については明らかになりつつあったものの、生合成経路の全体像については明らかではなかった。また、ストリゴラクトン受容体の候補タンパク質は分子遺伝学的解析から明らかにされていたが、その受容機構についての詳細は明らかではなかった。本課題では CYP78A と並行してストリゴラクトンについても研究を行った。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、腋芽幹細胞の新生のタイミングを制御する分子機構を明らかにするため、シトクロム P450 である CYP78A によって生合成あるいは代謝される低分子シグナル (CYP78 シグナル) の同定を目指した。

(2) ヒメツリガネゴケの CYP78A 欠損変異体や過剰発現体の解析から、CYP78 シグナルと幹細胞新生との関係を明らかにすること、また CYP78 シグナルと既知の植物ホルモンとの関係性を明らかにすることを目的とした。

(3) ストリゴラクトンの新たな生合成酵素遺伝子を同定するとともに、ストリゴラクトン受容体 DWARF14 (D14) によるストリゴラクトン受容メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) CYP78 シグナルの同定を目指して、2つの方法を並行して試みた。一つ目の方法として、シロイヌナズナの *cyp78a5* 変異体にステロイド誘導性プロモーターの制御下で CYP78A5 を発現する形質転換シロイヌナズナを作出した。これを用いて、CYP78A5 の発現誘導後短時間で変動する代謝産物を LC-MS を用いて探索した。もう一つの方法として、まず、シロイヌナズナ茎頂部において CYP78 シグナルによって発現量が大きく変動する遺伝子を RNA seq 解析により複数同定した。次に、これらのシロイヌナズナの遺伝子の発現を指標として、ヒメツリガネゴケの抽出物を分画後、CYP78 シグナルが含まれると予想される画分を追跡した。

(2) ヒメツリガネゴケの CYP78A 欠損変異体 (*cyp78a27 cyp78a28* 二重変異体) および CYP78A 過剰発現体の原系体や茎葉体の表現型を観察した。また、LC-MS/MS を用いて植物ホルモン (オーキシン、サイトカイニン、アブシシン酸) の内生量および培地中の濃度を定量した。

(3) ゲノム科学的方法等により、新たなストリゴラクトン生合成酵素遺伝子の同定を行った。また、ストリゴラクトンの受容体である D14 の受容メカニズムを解析するため、生化学および遺伝学的な実験を行った。実験材料としてはイネとシロイヌナズナを用いた。

4. 研究成果

(1) CYP78A5 の発現誘導後短時間で再現性よく変動する代謝産物を同定するには至らなかった。一つの原因として、網羅的代謝産物解析 (メタボロミクス) の感度や分離能、網羅性が十分ではなかった可能性が考えられる。また、根においてはステロイド誘導性プロモーターが期待通りに機能したが、地上部においてはステロイド (エストラジオール) 処理後も CYP78A5 の発現誘導は観察されなかった。この理由については不明である。

(2) マーカー遺伝子の発現を指標として CYP78 シグナルを精製するため、CYP78A 依存的に発現量が変動する遺伝子群を RNA seq 解析により同定した。材料はイネの茎頂部をレーザーマイクロダイセクションで切り出したもの、シロイヌナズナの茎頂部付近を実体顕微鏡下切り出したものを用いた。イネとシロイヌナズナで共通して CYP78A 依存的に発現量が大きく変化する

遺伝子をマーカー遺伝子とすることを計画していたが、そのような遺伝子は見出されなかったため、シロイヌナズナの野生型と *cyp78a5 cyp78a7* 二重変異体で発現量の差が大きい遺伝子をマーカー遺伝子として用いた。植物抽出物はヒメツリガネゴケの *CYP78A28* 過剰発現体を材料に用いた。ヒメツリガネゴケの *CYP78A28* 遺伝子は、シロイヌナズナの *cyp78a5* 変異体の表現型を相補できることが確認されたことから、両酵素は同じ機能をもつことが示唆された。ヒメツリガネゴケ原系体のメタノール抽出物を液-液分配により分画したところ、一つの画分をシロイヌナズナの *cyp78a5 cyp78a7* 二重変異体に投与した場合に、マーカー遺伝子の発現量を野生型レベルに回復させることが明らかになった。次に、活性の見られた画分を陰イオン交換カラムで分画したところ、酸性画分に活性が認められた。以上の結果から、マーカー遺伝子の発現を指標とした植物抽出物の精製は *CYP78* シグナルの単離に向けて有効な方法と考えられ、今後さらに精製を進めていく予定である。

(3) ヒメツリガネゴケにおける *CYP78A* と幹細胞新生の関係性に関する知見を得るため、原系体の側枝の枝分かれの表現型を観察した。原系体においては頂端細胞が幹細胞であり、枝分かれには幹細胞新生を伴う。観察の結果、*cyp78a* 二重変異体においては枝分かれが減少すること、逆に *CYP78A* 過剰発現体では、枝分かれが増加することが明らかになった。原系体の枝分かれはオーキシンによって負に制御されていることが知られている。そこで、オーキシン(インドール-3-酢酸)の内生量および培地における濃度を定量した。その結果、*cyp78a* 二重変異体においてはインドール-3-酢酸の内生量が有意に高まっていることが示された。一方、*CYP78A* 過剰発現体の培地においては野生型と比較してインドール-3-酢酸の濃度が高まっていることが明らかになった。以上の結果から、*CYP78* シグナルはオーキシンの輸送(分布)に影響を及ぼすことが示唆された。

(4) 当研究室の先行研究により、ヒメツリガネゴケの *cyp78a* 二重変異体は正常な茎葉体を分化することができず、茎葉体がカルス状の細胞の塊になってしまうことが示されていた。この表現型はサイトカニンを培地に加えた場合に観察されることが報告されており、実際にサイトカニンを添加した培地で生育した野生型の茎葉体は、*cyp78a* 二重変異体と同様にカルス状の細胞塊を形成した。そこでサイトカニンの定量分析を行ったところ、*cyp78a* 二重変異体の培地でサイトカニン(イソペンテニルアデニン)の含量が増加していることが分かった。これらの結果から、*CYP78* シグナルはサイトカニンの量または分布の変化を介して茎葉体の分化に影響を及ぼすことが示唆された。

(5) ゲノム情報や遺伝子発現解析から、ストリゴラクトンの構造多様性に寄与する新たな酵素を複数同定した。また、遺伝学的解析から同定されていた機能未知酵素の酵素機能を明らかにした。さらに、ストリゴラクトン受容体 D14 の作用メカニズムについて、新たなモデルを提唱した。D14 は加水分解酵素様タンパク質であり、実際にストリゴラクトンを試験管内で加水分解する。筆者らは、加水分解能をほとんど喪失した変異型 D14 が、植物体内(イネとシロイヌナズナ)でストリゴラクトン信号を伝達できることを明らかにした。この結果は、ストリゴラクトン信号伝達に加水分解は必須ではないことを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mashiguchi Kiyoshi, Seto Yoshiya, Onozuka Yuta, Suzuki Sarina, Takemoto Kiyoko, Wang Yanting, Dong Lemeng, Asami Kei, Noda Ryota, Kisugi Takaya, Kitaoka Naoki, Akiyama Kohki, Bouwmeester Harro, Yamaguchi Shinjiro	4. 巻 119
2. 論文標題 A carlactonoic acid methyltransferase that contributes to the inhibition of shoot branching in <i>Arabidopsis</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2111565119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoda Akiyoshi, Mori Narumi, Akiyama Kohki, Kikuchi Mayu, Xie Xiaonan, Miura Kenji, Yoneyama Kaori, Sato Izawa Kanna, Yamaguchi Shinjiro, Yoneyama Koichi, Nelson David C., Nomura Takahito	4. 巻 232
2. 論文標題 Strigolactone biosynthesis catalyzed by cytochrome P450 and sulfotransferase in sorghum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 1999 ~ 2010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.17737	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Mashiguchi Kiyoshi, Seto Yoshiya, Yamaguchi Shinjiro	4. 巻 105
2. 論文標題 Strigolactone biosynthesis, transport and perception	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 335 ~ 350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tbj.15059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuroha Takeshi, Nagai Keisuke, Gamuyao Rico, Wang Diane R., Furuta Tomoyuki, Mashiguchi Kiyoshi, Seto Yoshiya, Yamaguchi Shinjiro, Kojima Mikiko, Sakakibara Hitoshi, Ohme-Takagi Masaru, Yokoyama Ryusuke, Nishitani Kazuhiko, Mochizuki Toshihiro, Tamiya Gen, McCouch Susan R., Ashikari Motoyuki	4. 巻 361
2. 論文標題 Ethylene-gibberellin signaling underlies adaptation of rice to periodic flooding	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 181 ~ 186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aat1577	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Seto Yoshiya, Yasui Rei, Kameoka Hiromu, Tamiru Muluneh, Sakurada Akane, Hirano Rena, Kisugi Takaya, Hanada Atsushi, Umehara Mikiyoshi, Seo Eunjoo, Akiyama Kohki, Burke Jason, Takeda-Kamiya Noriko, Li Weiqiang, Hirano Yoshinori, Hakoshima Toshio, Mashiguchi Kiyoshi, Noel Joseph P., Kyojuka Junko, Yamaguchi Shinjiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Strigolactone perception and deactivation by a hydrolase receptor DWARF14	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-08124-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yasui Rei, Seto Yoshiya, Ito Shinsaku, Kawada Kojiro, Itto-Nakama Kaori, Mashiguchi Kiyoshi, Yamaguchi Shinjiro	4. 巻 29
2. 論文標題 Chemical screening of novel strigolactone agonists that specifically interact with DWARF14 protein	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 938 ~ 942
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2019.01.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Shinjiro Yamaguchi
2. 発表標題 Strigolactone biosynthesis and transport
3. 学会等名 The 3rd International Congress on Strigolactones (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹元廣大、増口潔、山口信次郎
2. 発表標題 ヒメツリガネゴケにおける CYP78A の機能とオーキシンの関係性
3. 学会等名 植物化学調節学会第55回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shinjiro Yamaguchi
2. 発表標題 Strigolactone biosynthesis in Arabidopsis and rice
3. 学会等名 The 23rd International Conference on Plant Growth Substances (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamaguchi Shinjiro
2. 発表標題 Strigolactone biosynthesis and action
3. 学会等名 2018 International Conference of the Korean Society of Plant Biologists (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamaguchi Shinjiro
2. 発表標題 Strigolactone biosynthesis in rice
3. 学会等名 16th International Symposium on Rice Functional Genomics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口信次郎
2. 発表標題 ストリゴラクトン：カロテノイド由来の植物ホルモン
3. 学会等名 日本農芸化学会 東北・北海道合同支部大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamaguchi Shinjiro
2. 発表標題 Mechanisms for the timing of the stem cell production in plants
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口信次郎
2. 発表標題 化学と生物学の融合的アプローチによる植物ホルモンの分子機構の解析
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安井令、瀬戸義哉、来生貴也、秋山康紀、増口潔、山口信次郎
2. 発表標題 シロイヌナズナのDWARF14によるストリゴラクトンの受容と加水分解の経時的な解析
3. 学会等名 植物化学調節学会第52回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>新学術領域研究「植物多能性幹細胞」 http://www.plant-stem-cells.jp/ 京都大学化学研究所 生体触媒化学研究領域 https://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~plant/index.html</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	増口 潔 (Mashiguchi Kiyoshi)		
研究協力者	桒原 健一郎 (Hibara Kenichiro)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関