

令和元年5月28日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18560

研究課題名(和文)シロイヌナズナにおける新奇ストリゴラクトン生合成遺伝子の機能解析

研究課題名(英文)Function of novel strigolactone biosynthesis genes in Arabidopsis

研究代表者

米山 香織 (Yoneyama, Kaori)

愛媛大学・農学研究科・助教

研究者番号：20769997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、植物の地上部枝分れ抑制ホルモンであるストリゴラクトン(SL)の生合成経路及び活性本体の解明を目的に、シロイヌナズナにおける新奇SL生合成遺伝子の機能解析を行った。2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼであるLBOにおいて、lbo変異体では、SL中間体が蓄積していること、大腸菌を用いてLBOタンパク質を発現させ、LBOの酵素機能などを明らかにし、PNASに掲載された。更に、トウモロコシ、トマト、樹木モデル植物であるポプラ、下等モデル植物であるシダにおいて、LBOの上流で作用するMAX1ホモログの酵素機能を明らかにし、New Phytologistに掲載された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、SL生合成経路の全貌の解明に重要な知見を提供することができた。今後は、その地上部枝分れ活性本体の解明により、代謝物の構造を元に、植物の地上部形態制御のための新たな農業資材の開発などにもつながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Strigolactone (SL) is a shoot branching inhibitory plant hormone. The objective of this study is to elucidate the SL biosynthetic pathway and active shoot branching inhibitor by clarifying the function of novel SL biosynthetic genes. We reported that carlactone (CL) and methyl carlactonoate (MeCLA), SL intermediates accumulate in Arabidopsis lbo mutants and MeCLA is consumed as a substrate and [MeCLA+16 Da] compound is produced by recombinant LBO protein expressed in *E. coli* in PNAS paper (Brewer et al. 2016). Then, we found that [MeCLA+16 Da] is hydroxyMeCLA and exists in Arabidopsis SL insensitive mutants of Atd14 and not in lbo mutants (Yoneyama et al. in preparation). We also reported the function of MAX1 homologs, working upstream of LBO, in important major crops, model tree poplar and model lower plant fern in New Phytologist (Yoneyama et al. 2018).

研究分野：植物制御化学

キーワード：ストリゴラクトン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界の農業生産に深刻な被害を与えている根寄生植物の発芽刺激物質として単離・構造決定されてきたストリゴラクトン (SL) は、アーバスキュラー菌根菌 (AM 菌) の菌糸分岐誘導物質 = AM 菌と共生を開始するためのシグナル物質でもある (Akiyama et al., Nature 435: 824-827, 2005)。AM 菌は宿主植物にリンなどの無機養分を供給する重要な共生菌である。一方、植物体内では、SL あるいはその代謝物は地上部枝分れを制御する植物ホルモンとして作用する (Umehara et al., Nature 455: 195-200, 2008)。その後、SL は、根の形態制御、光形態形成、根粒菌-マメ科植物の相互作用、二次生長の制御や一般の植物の種子発芽にも関与していることが次々と報告されている (Seto et al., PCP 53:1843-1853, 2012)。このように SL は植物の生長生理に極めて重要な二次代謝産物であるが、SL の生合成経路の全貌は明らかになっていない。

SL 生合成酵素遺伝子として、カロテノイドイソメラーゼの *D27*、カロテノイド酸化開裂酵素である *MAX3* (*CCD7*) および *MAX4* (*CCD8*)、シトクロム P450 をコードしている *MAX1* (*CYP711A*) が報告されている。これらの遺伝子の欠陥変異体は、シロイヌナズナ、イネ、エンドウなどにおいて正常種 (WT) と比べて地上部の過剰な枝分れを示す。国外の研究グループによって、*D27*、*MAX3*、*MAX4* 酵素の連続的な反応により β -カロテンからカーラクトン (CL) と呼ばれる SL 生合成中間体が生成することが明らかにされた (Alder et al., Science 335: 1348-1351, 2012)。その後、申請者のグループは、*MAX1* は CL を酸化してカーラクトン酸 (CLA) を生成する酵素であることを明らかにした (Abe et al. PNAS 111: 18084-18089, 2014)。

クイーンズランド大学 (オーストラリア) の Christine Beveridge 教授の研究グループは、シロイヌナズナにおいて SL 生合成遺伝子と共発現している遺伝子を探索し、2-オキシグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼをコードしている *LATERAL BRANCHING OXIDOREDUCTASE* (*LBO*) を新奇 SL 生合成関連遺伝子として単離した。一方、植物における SL の内生量は極微量であり、化学的にも不安定な化合物であることから、その取り扱いには難しい。SL の研究は海外との競争が激しいが、シロイヌナズナの植物体から、CL および CL 誘導体 (CLA, MeCLA など) の同定が可能な研究グループは、申請者のグループおよび共同研究を行っている東北大学のグループに限られている。申請者は、特別研究員として Beveridge 教授の研究室に所属して以来、*LBO* の機能解明のための共同研究を行っており、酵素化学的な解析を担当することとなった。

2. 研究の目的

本研究は、シロイヌナズナにおける SL 生合成関連遺伝子 *LBO* の機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

LBO タンパク質の大量培養系の確立

構造決定が可能な量の *LBO* 代謝物を得るために、すでに確立した *LBO* タンパク質の大腸菌発現系 (可溶性酵素である *LBO* タンパク質を可溶性画分に発現できている) を、大量の酵素タンパク質画分を調製できる系に展開した。すでに、細胞膜酵素消化法よりも超音波処理の方が酵素活性の高い *LBO* タンパク質が得られるという結果を得ていた。しかし、当時使用していた遺伝子組換え体専用の閉鎖型超音波破碎装置は、一度に破碎できる最大量が 1.8 mL と限られており実験効率が悪かった。そこで、H27 年度に設置された高圧式細胞破碎装置 (一度に最大 15 mL の破碎が可能) を使って細胞を破碎して、可溶性粗酵素画分を遠心分離により得る方法を確立した。

LBO 代謝物の構造決定

粗酵素画分に基質候補の MeCLA および補酵素因子の二オキシグルタル酸、鉄、アスコルビン酸を加えて、28℃ で 2 時間培養する方法を確立した。酢酸エチルを用いて抽出して、硫酸ナトリウムで脱水後、窒素ガスを吹きつけて濃縮した。*LBO* は酸化酵素と推定されることから、*LBO* 代謝物は酸素原子が付加された構造を有すると想定されたため、MeCLA を基質とした場合の分子量を推定して、LC-MS/MS の Multiple Reaction Monitoring (MRM) で酸化代謝物 (水酸化体、アルデヒド体、カルボキシル体等) の探索を行った。また、*LBO* 代謝物が構造的に不安定であることも予想されたため、アセチル化やメチル化などで誘導体化を試みるとともに、誘導体化の有無により構造を推定した。構造推定には、LC-MS/MS のプロダクトイオンキャンなども行った。大量に調製した酵素画分を用いて反応を繰り返して、推定代謝物が大量に得られたら (目安として 500 μ g 以上) シリカゲルクロマトグラフィー、HPLC など、これまで CL 類縁体の構造決定などの過程で用いてきた方法で精製し、NMR により構造決定をめざした。

4. 研究成果

シロイヌナズナの *lbo* 変異体では、CL および MeCLA が蓄積していたことから、*LBO* は CL あるいは MeCLA を基質として代謝物を生成している可能性が示唆された。*LBO* タンパク質の大腸菌発現系では、MeCLA を基質として消化していることを確認し、*LBO* は、MeCLA から [MeCLA+16 Da]

という代謝物を 2-オキソグルタル酸依存的に生成することをまず明らかにした。これらの研究成果に関しては、クイーンズランド大学との共同研究として PNAS に掲載された (Brewer et al. 2016)。その後、代謝実験を繰り返し、NMR を使った構造決定をめざしたが、構造的に不安定であるため構造解析にまでいたらなかった。そこで、重水素ラベル体を使った投与実験により間接的に構造決定をめざしたところ、[MeCLA+16 Da]は、hydroxyMeCLA であることが明らかとなった。この hydroxyMeCLA は植物内生として存在することを確認した。これらの結果に関しては、現在、投稿論文を準備中である (Yoneyama et al. in preparation)。

トウモロコシ、トマト、樹木モデル植物であるポプラ、下等モデル植物であるシダにおいて、LBO の上流で作用する、MAX1 ホモログの機能解析を行った。その結果、MAX1 の機能は、植物種を超えて高く保存されていることを明らかにし、投稿論文をまとめ、New Phytologist に掲載された (Yoneyama et al. 2018)。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Regulation of biosynthesis, perception, and functions of strigolactones for promoting arbuscular mycorrhizal symbiosis and managing root parasitic weeds. Yoneyama K, Xie X, Yoneyama K, Nomura T, Takahashi I, Asami T, Mori N, Akiyama K, Kusajima M, Makashita H. Pest Management Science. in press. 10.1002/ps.5401
2. Lotuslactone, a non-canonical strigolactone from *Lotus japonicus*. Xie X, Mori N, Yoneyama K, Nomura T, Uchida K, Yoneyama K, Akiyama K. Phytochemistry, 157: 200-205, 2019, 10.1016/j.phytochem.2018.10.034
3. Low Infection of *Phelipanche aegyptiaca* in Micro-Tom Mutants Deficient in CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 8. Hasegawa S, Tsutsumi T, Fukushima S, Okabe Y, Saito J, Katayama M, Shindo M, Yamada Y, Shimomura K, Yoneyama K, Akiyama K, Aoki K, Ariizumi T, Ezura H, Yamaguchi S, Umehara M. International journal of molecular sciences. 19: 9, 2018, 10.3390/ijms19092645
4. Conversion of carlactone to carlactonoic acid is a conserved function of MAX1 homologs in strigolactone biosynthesis. Yoneyama K, Mori N, Sato T, Yoda A, Xie X, Okamoto M, Iwanaga M, Ohnishi T, Nishiwaki H, Asami T, Yokota T, Akiyama K, Yoneyama K, Nomura T. The New phytologist, 218: 1522-1533, 2018, 10.1111/nph.15055
5. Which are the major players, canonical or non-canonical strigolactones? Yoneyama K, Xie X, Yoneyama K, Kisugi T, Nomura T, Nakatani Y, Akiyama K, McErlean CSP, Journal of experimental botany, 69: 2231-2239, 2018, 10.1093/jxb/ery090
6. Methyl zealactonoate, a novel germination stimulant for root parasitic weeds produced by maize. Xie X, Kisugi T, Yoneyama K, Nomura T, Akiyama K, Uchida K, Yokota T, McErlean C. S. P., Yoneyama K. JOURNAL OF PESTICIDE SCIENCE, 42: 1-2, 2017, 10.1584/jpestics.D16-103
7. LATERAL BRANCHING OXIDOREDUCTASE acts in the final stages of strigolactone biosynthesis in *Arabidopsis*. Brewer PB, Yoneyama K, Filardo F, Meyers E, Scaffidi A, Frickey T, Akiyama K, Seto Y, Dun EA, Cremer JE, Kerr SC, Waters MT, Flematti GR, Mason MG, Weiller G, Yamaguchi S, Nomura T, Smith SM, Yoneyama K, Beveridge CA, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 113: 6301-6306, 2016, 10.1073/pnas.1601729113
8. Structure and stereospecific transport of strigolactones from roots to shoots, Xie X, Yoneyama K, Kisugi T, Nomura T, Akiyama K, Asami T, Yoneyama K. JOURNAL OF PESTICIDE SCIENCE, 41: 55-58, 2016, 10.1584/jpestics.D16-009

〔学会発表〕(計 7 件)

(国内)

1. ストリゴラクトン生合成酵素 LBO の機能解析. 米山香織, 秋山康紀, 高島岬, 依田彬義, 米山弘一, 野村崇人, 植物化学調節学会, 2018 年 10 月, 札幌
2. Hydroxycarlactone derivatives are potential substrates for MAX1 and LBO in strigolactone biosynthesis. YONEYAMA K, AKIYAMA K, MORI M, XIE X, YAMAUCHI S, NISHIWAKI H, YONEYAMA K, NOMURA T, 日本植物生理学会年会, 2018 年 3 月, 札幌
3. シロイヌナズナにおける内生ストリゴラクトンの同定. 米山香織, 秋山康紀, 森愛美, 謝肖男, 米山弘一, 野村崇人, 植物化学調節学会, 2017 年 10 月, 鹿児島
4. ストリゴラクトン生合成酵素 MAX1 の機能多様性. 米山香織, 森愛美, 秋山康紀, 佐藤智康, 齋藤睦美, 謝肖男, 米山弘一, 野村崇人, 植物化学調節学会, 2016 年 10 月, 高知
5. 新奇ストリゴラクトン生合成遺伝子 LBO の機能解析. 米山香織, Philip Brewer, 秋山康紀, 謝肖男, Christine Beveridge, 米山弘一, 野村崇人, 植物化学調節学会, 2016 年 10 月, 高知

(国外)

1. Biochemical characterization of lateral branching oxidoreductase involved in strigolactone biosynthesis. Kaori Yoneyama, Phillip Brewer, Kohki Akiyama, Xionan Xie, Christine Beveridge, Koichi Yoneyama, Takahito Nomura. Strigolactone conference, March, 2017, Italy
2. Biochemical characterization of lateral branching oxidoreductase involving strigolactone biosynthesis in *Arabidopsis*. Kaori Yoneyama, Phillip Brewer, Kohki Akiyama, Xionan Xie, Christine Beveridge, Koichi Yoneyama, Takahito Nomura. IPGSA, July, 2016, Canada

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。