

平成22年 5月25日現在

研究種目：基盤研究（A）  
 研究期間：2006～2009  
 課題番号：18208010  
 研究課題名（和文） ストリゴラクトン生合成・分泌の分子機構とその調節による寄生・共生の制御  
 研究課題名（英文） Molecular mechanisms of biosynthesis and exudation of strigolactones and their manipulation for regulation of parasitism and symbiosis  
 研究代表者  
 米山 弘一（YONEYAMA KOICHI）  
 宇都宮大学・雑草科学研究センター・教授  
 研究者番号：00114174

研究成果の概要（和文）：植物の根から分泌されるストリゴラクトンは、一方では、農作物に大きな被害を与える根寄生雑草種子の寄生を、他方では、有用な共生菌であるアーバスキュラー菌根菌（AM 菌）の共生を誘導する。そこでストリゴラクトン生合成と分泌の分子機構を解明し、それらの調節によって寄生と共生を制御することを目的として研究を行った。その結果、①数種類の新規ストリゴラクトンの化学構造、②ストリゴラクトンの生産・分泌に対する植物栄養素の影響、③ストリゴラクトンの寄生雑草種子発芽および AM 菌菌糸分岐における構造活性相関、④根寄生雑草の宿主植物への侵入、寄生における宿主植物との相互作用 を明らかにした。また、イネの地上部枝分かれ（分げつ）過剰変異体の解析から、それらがストリゴラクトンの生合成およびシグナル伝達の欠損突然変異体であり、ストリゴラクトンはカロテノイドから生合成されることが、植物体内では枝分かれを抑制する植物ホルモンとして働いていることが分かった。

研究成果の概要（英文）：Strigolactones exuded from plant roots elicit seed germination of root parasitic plants and induce hyphal branching of symbiotic arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. Therefore, strigolactones function as host recognition signals for both parasitism and symbiosis. Studies were conducted to understand molecular mechanisms of strigolactone biosynthesis and exudation. Through the studies, 1) several novel strigolactones were isolated and their structures determined, 2) effects of nutrients on strigolactone production and exudation were clarified, 3) structure-activity relationships of strigolactones in germination stimulation of root parasitic weed seeds and in induction of hyphal branching of AM fungi were elucidated, and 4) interactions between root parasitic plants with their compatible and incompatible host plants were examined. In addition, excessive branching mutants of rice plants were found to be the deficit either in biosynthesis or signal transduction of strigolactones, demonstrating that strigolactones are a novel class of plant hormones inhibiting shoot branching.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	16,000,000	4,800,000	20,800,000
2007年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2008年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2009年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
年度			
総計	36,700,000	11,010,000	47,710,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：根寄生雑草、アーバスキュラー菌根菌、ストリゴラクトン、発芽刺激物質、菌糸分岐誘導物質、枝分かれ、植物ホルモン、カロテノイド

### 1. 研究開始当初の背景

植物の根から土壤中に放出される化学物質（二次代謝産物）は、根の近傍（根圏）に生息する生物（微生物、動物、植物）によって、共生あるいは寄生の宿主認識シグナルとして利用されている。これらの化学物質の中でも特に、世界的に重要な強害雑草であり有効な防除法が確立されていない根寄生雑草の種子発芽を特異的に誘導する発芽刺激物質ストリゴラクトンは、内生共生菌であるアーバスキュラー菌根(AM)菌の宿主認識シグナル(菌糸分岐誘導物質 **Branching Factor, BF**)でもある。すなわち、根寄生雑草は、植物が共生AM菌のために分泌したBFを宿主の（生きた）根を探知するための情報として利用している。陸上植物のおよそ80%が菌根菌と共生しており、菌根菌は植物から光合成産物などを受け取る代わりに土壤からリン酸を吸収して植物に与える。また、植物と植物を菌糸のネットワークによってつなぐことによって植物間での栄養供給を可能とし、植物生態系の多様性の維持に大きく貢献している。

このようにストリゴラクトンの機能と役割の重要性は認識されていたが、ストリゴラクトンは植物からの分泌量が極めて少量であり、かつ非常に不安定であることから、多くの類縁体が構造未定のまま残されている。また、発芽刺激活性とAM菌菌糸分岐における構造活性相関も不明である。さらに、ストリゴラクトンの生合成経路やその調節機構に関する情報も極めて乏しい。

### 2. 研究の目的

本研究では、植物種によって多種多様であるストリゴラクトン＝根寄生雑草の発芽刺激物質およびAM菌菌糸分岐誘導物質の、(1)単離・構造決定、(2)温度、光、栄養条件など、生産・分泌量変動要因の解析、(3)生合成・分泌経路の解明を通じて、生合成・分泌の調節システムの構築を目指した。その成果は、宿主植物の非存在下で種子を強制的に発芽させるという「自殺発芽の誘導」による根寄生雑草の効果的な制御と、菌根菌との共生の促進・効率化による植物生産性の飛躍的向上へとつながるものと期待される。

本研究の成果は、植物-微生物間および植物-植物間の相互作用に関する重要な知見と、一方では共生の計画的な促進による植物生産性の飛躍的向上および劣悪環境地のファイトレ

メディエーションの効率化と、他方では有効な防除法のない世界最大の強害雑草である根寄生雑草による被害を回避するための新たな戦略を提供する。数十年以内に到来すると予想されている重大な食糧危機を防ぐためにも、環境不良地域における植物生産性の向上と、発展途上国の農業に壊滅的な被害を与えている根寄生雑草の効果的な回避法あるいは防除法の確立は、極めて重要なかつ緊急に解決すべき世界的課題である。

### 3. 研究の方法

(1)ストリゴラクトンの単離・構造決定では、各種の植物を水耕栽培し、水耕液に分泌されるストリゴラクトンを溶媒抽出あるいは活性炭に吸着させて集めた。発芽刺激活性を指標に活性物質を精製し、各種機器分析によって構造を決定した。単離した新規ストリゴラクトンについては、各種根寄生雑草種子に対する発芽刺激活性とAM菌の菌糸分岐活性を検定し、構造活性相関を解析した。

(2)温度、光、栄養条件など、生産・分泌量変動要因の解析は、それぞれ異なった条件下で生育させた植物が分泌するストリゴラクトンを定量した。特に影響の大きかった栄養条件について詳細に解析した。

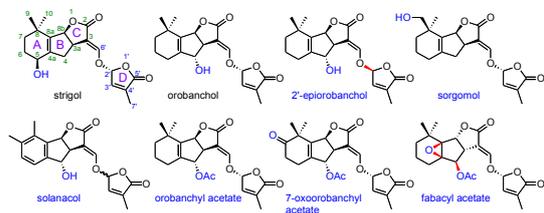
(3)生合成・分泌経路の解析では、ストリゴラクトンがカロテノイドから生合成されることが推定されているため、カロテノイド生合成阻害剤や生合成欠損ミュータントを用いてストリゴラクトン分泌量の変動を解析した。

以上に加えて、根寄生雑草が宿主植物の根に侵入し寄生を確立するまでの過程における宿主植物との相互作用を、根寄生雑草と非宿主植物の相互作用と比較することによって詳細に解析した。

### 4. 研究成果

(1)新規ストリゴラクトンの単離と構造解析  
各種植物の根浸出液から6種類の新規ストリゴラクトンを単離し、構造を決定した。また、既知のストリゴラクトンを含めた天然ストリゴラクトンのヤセウツボ種子に対する発芽刺激活性を検定し、構造活性相関を解析した。その結果、ストリゴラクトンのヤセウツボ種子に対する発芽刺激活性は、AB環に水酸基を有する比較的親水性の **orobanchol** などが高く、疎水性の **5-deoxystrigol (5DS)** では低下する傾向であった。また、AB環に複数の水

酸基が導入されるなど、化学的安定性が低下すると活性も低下した。なお、供試した天然ストリゴラクトン間で発芽活性に 100 倍程度の差があったが、すべて 100 nM で 80%以上の発芽を誘導し、合成類縁体である GR24 より 100 倍程度高活性であった。



## (2) AM 菌の菌糸分岐誘導活性における構造活性相関の解析

ストリゴラクトンの AM 菌の菌糸分岐誘導活性について検定した。その結果、A 環モノヒドロキシ化体である (+)-sorgomol は (+)-strigol と同様に、(+)-5DS に比べて 30 倍程度活性が低下していたことから、A 環への極性基の導入は AM 菌に対する活性を弱めることが分かった。しかし、(+)-orobanchol と (+)-2'-epiorobanchol では共に 1 pg/disc とこれまで調べた中で最も強い活性を示したことから、4 $\alpha$ -水酸基は AM 菌活性を強め、それは 2'(S)体において顕著であることが分かった。(+)-orobanchyl acetate, (+)-7-oxo-orobanchyl acetate, (-)-fabacyl acetate はすべて 10 pg/disc で活性を示したことから、2'(R)型ストリゴラクトンは総じて強い活性を示し、AB 縮合部二重結合のエポキシ化や 7 位のオキシ化は活性を低下させないことが分かった。

The minimum effective concentrations (MECs) of tested compounds for hyphal branching-inducing activity in *Gigaspora margarita*

Compound	MEC (pg/disc) <sup>a</sup>
(+)-5DS	3
(-)-ent-5DS	30
(+)-2'-epi-5DS	30
(-)-ent-2'-epi-5DS	3
(+)-Orobanchol	1
(+)-2'-Epiorobanchol	1
(+)-Strigol	100
(+)-Sorgomol	100
(+)-Orobanchyl acetate	10
(+)-7-Oxo-orobanchyl acetate	10
(-)-Fabacyl acetate	10
(±)-Sorgolactone	<30

<sup>a</sup> determined by serial 10-fold dilutions.

## (3) 植物栄養素がストリゴラクトン生産と分泌に及ぼす影響の解析

植物栄養条件がストリゴラクトン生産・分泌に及ぼす影響を解析した結果、根粒菌と共生するマメ科植物ではリン酸欠乏下でのみ生産・分泌が促進されたのに対して、根粒菌と共生しないイネ科植物、キク科植物では、リン酸欠乏だけではなく、窒素欠乏条件でも促進された。一方、AM 菌と共生しない植物では、栄養条件の影響は認められなかった。すなわち、植物の栄養獲得戦略とストリゴラクトン生産・分泌とが良く対応していることが

分かった。

適切な施肥および全身獲得抵抗性を誘導する薬剤の利用による根寄生雑草オロバンキの制御あるいは寄生回避を、室内および温室内実験で確認した後、オーストラリアの根寄生雑草 (*Orobanche ramosa*) 汚染地帯での小規模な圃場試験によって実証を試みた。しかし、異常気象と試験開始時期の遅れから、期待した結果は得られなかった。今後、根寄生雑草の圃場試験に十分な実績を有する海外研究者との共同研究を進める予定である。

## (4) 根寄生植物と宿主および非宿主植物の相互作用の解析

宿主植物による根寄生植物の認識機構の解明を目的として、親和性の関係にあるオロバンキ (*Orobanche aegyptiaca*) および非親和性の関係にあるストライガ (*Striga hermonthica*) に対するミヤコグサの応答を分子レベルで解析した。cDNA サブトラクション法によりオロバンキの寄生およびストライガの接触に対して発現量が増加する遺伝子群 (*LjOa*, *LjSh*) を単離した。*LjOa* にはジャスモン酸の生合成に関与する遺伝子が特異的に含まれていたほか、根粒形成に関わる遺伝子が多く認められた。*Split-root system* を用いた実験により、傷害ストレスのシグナルはオロバンキの寄生した近傍だけでなくミヤコグサ個体全体に伝達されていることが確認された。いくつかの遺伝子の発現パターンがオロバンキ寄生根と根粒菌接種根で類似していたことより、ミヤコグサはオロバンキを共生者として認識していることが示唆された。一方、*LjSh* にはファイトアレキシン vestitol の生合成に関わる複数の遺伝子が特異的に含まれた。Vestitol の生合成に関与する酵素タンパク質をコードする 22 遺伝子の大半が、オロバンキ寄生根と比較し、ストライガ接触根で有意に高い発現を示した。高分解能質量分析により、ストライガが接触したミヤコグサ幼植物の分泌物に特異的に含まれる成分の分子式が vestitol と一致する C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub> であると判明した。Vestitol 標品を単離し、そのクロマトグラフィーでの挙動および EI-MS での開裂パターンも一致したことから、ストライガに接触されたミヤコグサ根における vestitol の生産、分泌が証明された。加えて、蛍光顕微鏡観察によりストライガの接触した近傍で vestitol 標品と同様の蛍光が強く検出されたことから、vestitol の分泌はストライガに対するミヤコグサの防御応答と推測された。Vestitol は濃度依存的にオロバンキ種子の発芽を阻害したが、ストライガ種子の発芽には顕著な影響を及ぼさなかった。しかし、高濃度の vestitol はストライガ発芽種子に対して幼根の成育阻害ならびに黒化を引き起こした。以上から、非親和性ストライガに対するミヤコグサの抵抗性反応

に vestitol が関与することが強く示唆された。

#### (5) ストリゴラクトンの植物ホルモン作用の発見

AM 菌と植物の共生は 4.6 億年前に開始されたとされ、陸上植物の 80%以上が AM 菌と共生する。すなわち大部分の植物が AM 菌の宿主認識シグナルであるストリゴラクトンを生産・分泌していることは理にかなっているが、アブラナ科のシロイヌナズナ、アカザ科のハウレンソウ、マメ科植物であるがプロテオイド根という特殊な形態の根を発達させるホワイトルーピンなど AM 菌と共生しない植物もストリゴラクトンを生産・分泌していることが分かった。このことはストリゴラクトンがそれを分泌する植物自身の成長や分化に重要な生理的役割を担っている可能性を示唆している。

10 年ほど以前から、地上部の枝分かれ過剰変異体がエンドウ、ペチュニア、イネで報告されていた。その変異遺伝子の解析から、カロテノイドの酸化開裂反応によって生成する植物ホルモンの存在が示唆されていた。接木実験などから、この植物ホルモンは地下部で生成された後、接木部位を通過して地上部に移動し、脇芽の成長を抑制すると考えられていたが、その実体は不明であった。

ストリゴラクトンの生合成経路は不明であったが、カロテノイドの酸化開裂によって生合成されるという説が有力視されていた。実際にアカクロバーおよびトウモロコシでは、カロテノイド生合成阻害剤のフルリドン投与するとストリゴラクトン分泌量が顕著に低下した。これらの結果を総合すると、ストリゴラクトンが植物ホルモンの本体である可能性が示唆された。

そこで、イネの生合成およびシグナル伝達系欠損変異体 (*d10*, *d17*, *d3*) のストリゴラクトン(2'-*epi*-5DS)内生量を定量したところ、生合成変異体である *d10* では野生型に比較してストリゴラクトンの内生量が顕著に低下しているのに対して、シグナル伝達系欠損変異体 *d3* では、増加していた。さらに、*d10* にストリゴラクトンを投与するとその表現型が回復した。これらの結果から、ストリゴラクトンあるいはその代謝物が、枝分かれを抑制する植物ホルモンであることが明らかとなった。

以上のように、本研究を通してストリゴラクトンの化学、生理作用、生合成などについて多くの研究成果が得られたが、研究開始当初の目標としたストリゴラクトン生合成と分泌の分子機構の解明に関しては道半ばである。ストリゴラクトンが枝分かれ抑制ホルモンの活性本体であるのか否かも今後の研究を待たねばならない。また、ストリゴラクトンの新たな生理活性に関する報告が出始めており、

新しい局面からのアプローチによるブレークスルーが期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 23 件) すべて査読有り

- ① Kim, H. I., Xie, X., Kim, H. S., Chun, J. C., Yoneyama, K., Nomura, T., Takeuchi, Y., Yoneyama, K. Structure-activity relationship of naturally occurring strigolactones in *Orobancha minor* seed germination stimulation. *J. Pestic. Sci.*: in press.
- ② Yoneyama, K., Awad, A.A., Xie, X., Yoneyama, K., Takeuchi, Y. Strigolactones as germination stimulants for root parasitic plants. *Plant Cell Physiol.*: in press.
- ③ Kubo, M., Ueda, H., Park, P., Kawaguchi, M., Sugimoto, Y. Reactions of *Lotus japonicus* ecotypes and mutants to root parasitic plants. *J. Plant Physiol.* **166**: 353–362 (2009).
- ④ Yoneyama, K., Xie, X., Yoneyama, K., Takeuchi, Y. Strigolactones; structures and biological activities. *Pest Manag. Sci.* **65**: 467–470 (2009).
- ⑤ Yoneyama, K., Xie, X., Sekimoto, H., Takeuchi, Y., Ogasawara, S., Akiyama, K., Hayashi, H., Yoneyama, K. Strigolactones, host recognition signals for root parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi, from Fabaceae plants. *New Phytol.* **179**: 484–494 (2008).
- ⑥ Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S., Akiyama, K., Arite, T., Takeda-Kamiya, N., Magome, H., Kamiya, Y., Shirasu, K., Yoneyama, K., Kyozuka, J., Yamaguchi, S. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455**: 195–200 (2008).
- ⑦ Xie, X., Yoneyama, K., Kusumoto, D., Yamada, Y., Takeuchi, Y., Sugimoto, Y., Yoneyama, K. Sorgomol, germination stimulant for root parasitic plants, produced by *Sorghum bicolor*. *Tetrahedron Lett.* **49**: 2066–2068 (2008).
- ⑧ Yoneyama, K., Xie, X., Kusumoto, D., Sekimoto, H., Sugimoto, Y., Takeuchi, Y., Yoneyama, K. Nitrogen deficiency as well as phosphorus deficiency in sorghum promotes the production and exudation of 5-deoxystrigol, the host recognition signal for arbuscular mycorrhizal fungi and root parasites. *Planta* **227**: 125–132 (2007).

[学会発表] (計 79 件)

- ① 謝 肖男、原田裕大、竹内安智、米山弘一 新規ストリゴラクトン fabacol の単離および構造決定 日本農芸化学会 2010年3月

- ② Yoneyama K., Xie X, Yoneyama K, Takeuchi Y. Strigolactones as a new plant growth regulator. MARCO Symposium 2009, Challenges for Agro-Environmental Research in Monsoon Asia, Tsukuba, 5–7 October, 2009.
- ③ Yoneyama K, Takeuchi Y., Yokota T., Kanampiu F, Yoneyama K., Nomura T. Qualitative and quantitative differences in strigolactone exudation between *Striga* tolerant and susceptible maize cultivars. 10<sup>th</sup> World Congress on Parasitic Plants, Kusadasi, Turkey, 8–12 June, 2009.
- ④ Yoneyama K., Xie X, Yoneyama K, Takeuchi Y. Strigolactones, structure, activity, and regulation of production. OECD-CRP: Managing Parasitic Weeds: Integrating Science and Practice. OECD-CRP: Biological Resource Management for Sustainable Agricultural Systems, Ostuni, Italy, 21–26 September, 2008.
- ⑤ Yoneyama K., Xie X, Yoneyama K, Takeuchi Y. Characterization of strigolactones, plant derived signals for symbiosis and parasitism. 5<sup>th</sup> International Weed Science Congress, Vancouver, Canada, 23–27 June, 2008.

[図書] (計 3 件)

- ① Yoneyama, K., Natsume, M. (2010) Allelochemicals for plant-plant and plant-microbe interactions. In “Comprehensive Natural Products II. Chemistry and Biology”. Vol. 4, ed. Mander, L. and Lui, H. -W. Elsevier, Oxford, pp. 539–561.
- ② 米山香織, 謝 肖男, 米山弘一 (2009) ストリゴラクトンを利用する根寄生植物 植物のシグナル伝達 分子と応答 柿本辰男, 高山誠司, 福田裕穂, 松岡 信 編 共立出版 pp. 165–171.
- ③ 米山弘一, 米山香織 (2009) 第 5 章 発芽と土壤中化学物質 「発芽生物学」 pp. 105–122.

[その他]

ホームページ

[Http://www.wsc.mine.utsunomiya-u.ac.jp](http://www.wsc.mine.utsunomiya-u.ac.jp)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

米山 弘一 (YONEYAMA KOICHI)  
宇都宮大学・雑草科学研究センター・教授  
研究者番号：00114174

### (2) 研究分担者

竹内 安智 (TAKEUCHI YASUTOMO)  
宇都宮大学・雑草科学研究センター・名誉教授  
研究者番号：90008003

関本 均 (SEKIMOTO HITOSHI)  
宇都宮大学・農学部・教授  
研究者番号：10261819

横田 孝雄 (YOKOTA TAKAO)  
帝京大学・理工学部・教授  
研究者番号：40011986

杉本 幸裕 (SUGIMOTO YUKIHIRO)  
神戸大学・農学部・教授  
研究者番号：10243411

秋山 康紀 (AKIYAMA KOHKI)  
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授  
研究者番号：90008003

野村 崇人 (NOMURA TAKAHITO)  
宇都宮大学・雑草科学研究センター・准教授  
研究者番号：60373346

## 謝辞

本研究の共同研究者としてご参加頂いた研究分担者の方々、海外共同研究者 (Dr. D. M. Joel, Dr. Y. Goldwasser, Prof. H. Bouwmeester, Dr. C. Rameau) および研究支援者 (楠本 大博士、米山香織博士) に深く感謝致します。