

平成23年4月27日現在

機関番号： 82401

研究種目： 基盤研究(B)

研究期間： 2007~2010

課題番号： 19380069

研究課題名(和文) ブラシノステロイドの生合成・代謝ならびに情報伝達機構の解明

研究課題名(英文) Studies on biosynthesis, metabolism and signal transduction of brassinosteroids

研究代表者

藤岡 昭三 (FUJIOKA SHOZO)

独立行政法人理化学研究所・中野生体膜研究室・副主任研究員

研究者番号： 60165355

研究成果の概要(和文)：ブラシノステロイド(BR)生合成の早い段階で2位の水酸化が起こる新規生合成経路の存在を明らかにするとともに、BRの不活性化代謝に関わるUGT73C6やイネCYP734Asの新たな機能を解明した。BIN2とは別のサブグループに属するASK0はBRのシグナル伝達において負の制御因子として機能していることを明らかにした。さらに、BR関連変異体の解析を通して、BR生合成を正に制御する転写因子(TCP1, CESTA等)を同定した。

研究成果の概要(英文)： This study established a novel pathway via early C-2 hydroxylation in brassinosteroid (BR) biosynthesis as well as new functions of UGT73C6 and rice CYP734As in BR catabolism. ASK0 overexpressors displayed a *bri1*-like phenotype, and accumulated high levels of BRs. ASK0 was shown to function as a negative regulator in BR signaling. Through the analysis of BR-related mutants such as *tcp1-1D* and *ces-D*, we identified TCP1 and CESTA as transcription factors that positively regulate BR biosynthesis.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2007年度 | 4,500,000 | 1,350,000 | 5,850,000 |
| 2008年度 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |
| 2009年度 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |
| 2010年度 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |
| 年度 | | | |
| 総計 | 15,000,000 | 4,500,000 | 19,500,000 |

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：ブラシノステロイド、生合成、代謝、シロイヌナズナ、イネ、転写因子、シグナル伝達、生合成調節

1. 研究開始当初の背景

代表者らは、ブラシノステロイド(BR)の生合成が全くわかっていなかった1980年代後半からBR

生合成経路の解明研究に着手し、生合成経路の大筋(Fujioka and Yokota, *Annu. Rev. Plant Biol.* 2003)を世界で初めて明らかにし

た。BR 生合成欠損変異体や BR 非感受性変異体の解析を通して、BR は植物の生長に必須の役割を果たしていることが明確となり、90 年代後半に植物ホルモンとして認知されるようになった。これまでに数多くの知見が得られたが、BR の生合成・代謝やその調節機構、BR の受容やシグナル伝達機構に関して、依然数多くの課題が山積している。BR の生合成に関しては、BR の生合成・代謝経路上で未解明のままになっている重要なステップや経路上の位置づけが不明のままになっている BR が多数存在する。また、新規 BR 生合成・代謝変異体やシグナル伝達に関わっていると予想される変異体は数多く得られているが、それらの機能解析はあまり進んでいない。代表者は、国内外の研究グループとの共同研究を展開し、本研究開始当初の段階で、新規 BR 変異体の有力候補の縛り込みに成功していた。これらの BR 関連変異体の解析を進めることによって、未解明のままになっている BR 生合成・代謝やその調節因子、さらには新規シグナル伝達因子の解明が期待された。

2. 研究の目的

本研究では、生物有機化学、分子遺伝学、分子生物学的手法を駆使して、未解明のBRの研究課題に挑戦する。とりわけ、新規BR生合成・代謝経路の解明を進めるとともに、BR関連変異体の解析を通して、新規BRシグナル伝達因子の同定、生合成調節に関わる転写因子を幾つか同定することを具体的な達成目標として研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) BR の生合成経路に関する研究

代表者らが見出した BR (これまでに明らかにしてきた生合成経路上にのらない新規 BR を数種の植物から発見) の生合成経路上の位置づけを確定するため以下の実験を実施する。

新規 BR の生合成前駆体である可能性が高い重水素標識体をシロイヌナズナ実生に投与した後、代謝物を抽出・精製し、最終的に GC-MS で分析する。予想した生合成前駆体の重水素標識体が実際に新規重水素標識 BR に変換された場合には、引き続き、新規 BR の重水素標識体を用いた代謝実験を行うことにより、新規 BR の代謝物を同定し、新規 BR の生合成経路上の位置づけを明らかにする。さらに、新規経路が明らかになった場合には、シロイヌナズナ以外の数種の植物 (ニチニチソウ、マングビーン等) を用いて、同様の代謝実験を行い、植物界で普遍的に機能しているか否か検証する。

(2) イネの CYP85A の機能解析

これまでに植物界で見出されている BR のなかで最も活性が高い BR は brassinolide (BL) である。しかしながら、BL はイネを含む多くの植物種で

検出されていない。内生 BL が検出されているシロイヌナズナやトマトでは、CYP85 遺伝子は 2 コピー存在する。しかも、その一方は 6-deoxocastasterone (6-deoxoCS) から castasterone (CS) への 6 位酸化酵素として機能しているだけでなく、CS から BL への酸化を触媒する BL 合成活性を有することが明らかにされている。一方、イネの CYP85A 遺伝子は 1 コピーだけである。イネ CYP85 の酵素化学的な特性を詳しく調べることで、イネでは CS から BL への変換活性がないために内生 BL が検出できない可能性について検討する。

(3) BR の不活性化代謝経路に関する研究

シロイヌナズナの CYP734A1 (BAS1) は BR の 26 位を水酸化することによって BR を不活性化することを既に明らかにした。イネでは CYP734A のホモログが幾つか存在するが、それらの機能は不明のままである。まず、それらの過剰発現体の内生 BR を精査することにより、BR の不活性化に関わっているか否か検討する。過剰発現体の中で矮性を示し、内生 BR レベルが野生型に比べ、有意に減少していることが判明したラインについて、より詳細に、イネ CYP734A の機能解析を進める。

BR の不活性化代謝に関しては、CYP734A 以外に、これまでに BR の 23 位のグルコシル化を触媒する UGT73C5 を見出しているが、BR のグルコシル化を触媒すると考えられる UGT は他にも幾つか想定される。それらの UGT 過剰発現体が矮性を示す場合には、その UGT も不活性化代謝に関わっている可能性が高い。まず、内生 BR の分析を行うことで、不活性化代謝に関わる BR を特定するとともに、それらの BR の代謝実験を行い、代謝物を LC-MS で詳細に解析する。

(4) 新規 BR シグナル伝達因子の解明研究

BR のシグナル伝達における負の制御因子である BIN2 のホモログがシロイヌナズナには 10 個存在する。BIN2 以外のホモログについて、過剰発現体の BR 応答性や内生 BR レベルを精査することにより、BR のシグナル伝達に関わっているか否か解析を進める。

また、イネのラミナジョイント屈曲が著しい変異体やシロイヌナズナの activation-tagged *br1* suppressor の解析を通して、新たなシグナル伝達因子を追究する。

(5) BR の生合成を正に制御する因子の同定

BR のシグナル伝達には、転写因子として実体が明らかにされている BES1 や BZR1 以

外にも多数の未知の転写因子の介在が予想される。これまでの研究から BR 生合成調節との関連が示唆される転写因子に関わると予想している変異体が得られており、それらの変異体の生化学的、分子生物学的解析を通して BR の恒常性維持のメカニズムを解明する。

(6) BR とオーキシンのクロストーク

BR とオーキシンのクロストークはよく知られているが、その分子機構は不明な点が多い。オーキシンが BR 生合成に及ぼす影響を詳細に解析することにより、BR 生合成におけるオーキシンのクロストークの実体を明らかにする。

4. 研究成果

(1) BR の新規生合成経路に関する研究

シロイヌナズナ実生に重水素標識 BR 生合成前駆体を投与し代謝物を GC-MS で詳細に解析した結果、BR 生合成の早い段階で 2 位の水酸化が起こる新規生合成経路の存在を明らかにすることに成功した。また、この新規生合成経路が他の植物種においても機能しているか否かを精査した結果、ニチニチソウ、マングビーンをはじめ検討したすべての植物種において、この経路の存在が明らかとなり、植物界で普遍的に機能している重要な経路であることが示唆された。さらに、3-*epi*-6-deoxocathasterone は検討したすべての植物種で 6-deoxyphasterol へ変換されることも明らかとなり、従来考えられてきた生合成経路よりも、さらに複雑なネットワークを形成していることが判明した。

(2) イネの CYP85A の機能解析

イネ CYP85A の機能解析を行った結果、イネ CYP85A は 6 位酸化酵素として機能しているだけで、BL 合成活性を示さないことがわかった。イネではこれまで内生 BL が検出されていないが、これは、イネ CYP85A に BL 合成活性がないことに起因すると考えられる。従って、イネの活性型 BR は CS である可能性が高いことが示唆された。

(3) BR の不活性化代謝経路に関する研究

イネの CYP734A ホモログの過剰発現体は矮性を示すとともに、内生 BR 量が野生型に比べ減少していることを見出した。イネ CYP734A は BR の 26 位に水酸基を導入するだけでなく、アルデヒドを経てカルボン酸へと 3 段階の酸化を触媒していることが明らかとなった。

これまでに BR の 23 位のグルコシル化を触媒する UGT73C5 を見出しているが、BR のグルコシル化を触媒すると考えられる新たな UGT73C6 を見出した。この UGT を過剰発現させると UGT73C5 の過剰発現体と同様に BR 欠損の表現

型を示した。過剰発現体やノックアウトの解析を通して、この UGT73C6 も BR の 23 位のグルコシル化に関与していることを見出した。

(4) 新規 BR シグナル伝達因子の解明研究

GSK3/shaggy-like kinase である BIN2 は BR のシグナル伝達における負の制御因子として知られているが、シロイヌナズナには BIN2 のホモログが多数存在する。BIN2 とは別のサブグループに属する ASK0 の過剰発現体は、*bri1* 様の矮性形質を示すとともに *bri1* と同様に活性型 BR を異常に蓄積していることを見出した。また、ASK0 は BR のシグナル伝達において負の制御因子として機能し、転写因子である BEH2、BES1 等をターゲットとする新規因子であることを明らかにした。

BR のシグナル伝達に関与する転写因子として BES1 や BZR1 等が知られているが、ほかに多数の転写因子の介在が示唆されている。イネのラミナジョイント屈曲が著しい変異体やシロイヌナズナの activation-tagged *bri1* suppressor の解析の結果、それらの原因遺伝子のコードするタンパク質は bHLH モチーフを有しているが、DNA 結合に必要な塩基性領域を欠く、非 DNA 結合タンパク質ファミリーに属する転写因子であることがわかった。これらの変異体では BR のシグナルは増大しているが、内生 BR レベルは野生型とほぼ同等であった。

(5) BR の生合成を正に制御する因子の同定

これまでの研究で、BR の不活性化代謝や BR 生合成のフィードバック阻害については重要な知見が得られているが、BR 生合成を正に制御する因子に関しては、ほとんどわかっていなかった。BR 関連変異体の中で生合成調節との関わりが強く示唆された変異体について重点的に解析を進めた。*tcp1-1D* 変異体は、シロイヌナズナの *bri1-5* のアクティベーションタギングラインの中から *bri1-5* suppressor として得られた。この変異体の解析の結果、bHLH 型転写因子である TCP1 は BR 生合成の鍵酵素をコードする *DWF4* 遺伝子の発現を正に制御する因子として機能していることを明らかにした。また、シロイヌナズナのアクティベーションタギングのラインから得られた *cesta-D* 変異体 (BRI1 や DWF4 の過剰発現体に似た表現型を示す) の解析から、CESTA も bHLH 型の転写因子であり、既に報告されている転写因子である BEE1 と相互作用することによって BR 生合成遺伝子の発現を正に制御していることを

見出した。さらに、イネの *RAVL1* は B3 DNA 結合ドメインを持つ転写因子であり、BR 受容体や幾つかの BR 生合成遺伝子の発現を活性化することによって BR の恒常性維持に深く関わっていることが示唆された。

(6) BR とオーキシンのクロストーク

シロイヌナズナを用いてオーキシシンと BR のクロストークを検討した結果、オーキシシンは BR 生合成の律速酵素遺伝子である *DWF4* の顕著な発現上昇や内生 BR レベルの増加を引き起こすことを見出した。*BZR1* の *DWF4* プロモーターへの結合をオーキシシンが阻害することで、BR の生合成が促進されることが明らかとなった。

以上のように、本研究により、新規 BR 生合成経路、新規 BR 不活性化代謝経路、新規 BR シグナル伝達因子 (*ASK0*)、これまでほとんどわかっていなかった BR 生合成を制御する重要な転写因子 (*TCP1*、*CESTA*、*RAVL1*) 等を、国内外のグループとの共同研究を通して明らかにすることができた。

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 16 件)

① Tomoaki Sakamoto, Ayami Kawabe, Asako Tokida-Segawa, Bun-ichi Shimizu, Suguru Takatsuto, Yukihisa Shimada, Shozo Fujioka, Masaharu Mizutani : Rice CYP734As function as multisubstrate and multifunctional enzymes in brassinosteroid catabolism. *Plant J.* in press 査読有

② Yuhee Chung, Puna M. Maharjan, Oksun Lee, Shozo Fujioka, Suyoun Jang, Bokyung Kim, Suguru Takatsuto, Masafumi Tsujimoto, Hobang Kim, Seoae Cho, Taesung Park, Hyunwoo Cho, Ildoo Hwang, Sunghwa Choe : Auxin stimulates *DWARF4* expression and brassinosteroid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* in press 査読有

③ Sigrid Husar, Franz Berthiller, Shozo Fujioka, Wilfried Rozhon, Mamoon Khan, Florian Kalaivanan, Luisa Elias, Gillian S. Higgins, Yi Li, Rainer Schuhmacher, Rudolf Krska, Hideharu Seto, Fabian E. Vaistij, Dianna Bowles, Brigitte Poppenberger : Overexpression of the *UGT73C6* alters brassinosteroid glucoside formation in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* 11: 51 (2011) 査読有

④ Brigitte Poppenberger, Wilfried Rozhon, Mamoon Khan, Sigrid Husar, Gerhard Adam, Christian Luschnig, Shozo Fujioka, Tobias Sieberer : *CESTA*, a positive regulator of brassinosteroid biosynthesis.

EMBO J. 30: 1149-1161 (2011) 査読有

⑤ Youssef Belkhadir, Amanda Durbak, Michael Wierzba, Robert J. Schmitz, Andrea Aguirre, Rene Michel, Scott Rowe, Shozo Fujioka, Frans E. Tax : Intragenic suppression of a trafficking-defective brassinosteroid receptor mutant in *Arabidopsis*. *Genetics* 185: 1283-1296 (2010) 査読有

⑥ Byoung Il Je, Hai Long Piao, Soon Ju Park, Sung Han Park, Chul Min Kim, Yuan Hu Xuan, Su Hyun Park, Jin Huang, Yang Do Choi, Gynheung An, Hann Ling Wong, Shozo Fujioka, Min-Chul Kim, Ko Shimamoto, Chang-deok Han : *RAV-Like1* maintains brassinosteroid homeostasis via the coordinated activation of *BR1* and biosynthetic genes in rice. *Plant Cell* 22: 1777-1791 (2010) 査読有

⑦ Francine Carland, Shozo Fujioka, Timothy Nelson : The sterol methyltransferases *SMT1*, *SMT2*, and *SMT3* influence *Arabidopsis* development through nonbrassinosteroid products. *Plant Physiol.* 153: 741-756 (2010) 査読有

⑧ Zhongxin Guo, Shozo Fujioka, Elison B. Blancaflor, Sen Miao, Xiaoping Gou, Jia Li : *TCP1* modulates brassinosteroid biosynthesis by regulating the expression of the key biosynthetic gene *DWARF4* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 22: 1161-1173 (2010) 査読有

⑨ Wilfried Rozhon, Juliane Mayerhofer, Elena Petutschnig, Shozo Fujioka, Claudia Jonak : *ASK0*, a group-III *Arabidopsis* GSK3, functions in the brassinosteroid signalling pathway. *Plant J.* 62: 215-223 (2010) 査読有

⑩ Ho Yong Chung, Shozo Fujioka, Sunghwa Choe, Soyoun Lee, Youn Hyung Lee, Nam In Baek, In Sik Chung : Simultaneous suppression of three genes related to brassinosteroid (BR) biosynthesis altered campesterol and BR contents, and led to a dwarf phenotype in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* 29: 397-402 (2010) 査読有

⑪ Hao Wang, Yongyou Zhu, Shozo Fujioka, Tadao Asami, Jiayang Li, Jianming Li : Regulation of *Arabidopsis* brassinosteroid signaling by atypical basic helix-loop-helix proteins. *Plant Cell* 21: 3781-3791 (2009) 査読有

⑫ Li-Ying Zhang, Ming-Yi Bai, Jinxia Wu, Jia-Ying Zhu, Hao Wang, Zhiguo Zhang, Wenfei

Wang, Yu Sun, Jun Zhao, Xuehui Sun, Hongjuan Yang, Yunyuan Xu, Soo-Hwan Kim, Shozo Fujioka, Wen-Hui Lin, Kang Chong, Tiegang Lu, Zhi-Yong Wang : Antagonistic HLH/bHLH transcription factors mediate brassinosteroid regulation of cell elongation and plant development in rice and *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21: 3767-3780 (2009) 査読有

⑬ Jianwei Pan, Shozo Fujioka, Jianling Peng, Jianghua Chen, Guangming Li, Rujin Chen : The E3 ubiquitin ligase SCF^{TIR1/AFB} and membrane sterols play key roles in auxin regulation of endocytosis, recycling, and plasma membrane accumulation of the auxin efflux transporter PIN2 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21: 568-580 (2009) 査読有

⑭ Katsuyuki Oki, Noriko Inaba, Kanako Kitagawa, Shozo Fujioka, Hidemi Kitano, Yukiko Fujisawa, Hisaharu Kato, Yukimoto Iwasaki : Function of the α subunit of rice heterotrimeric G protein in brassinosteroid signaling. *Plant Cell Physiol.* 50: 161-172 (2009) 査読有

⑮ Chuan-yin Wu, Anthony Trieu, Parthiban Radhakrishnan, Shing F. Kwok, Sam Harris, Ke Zhang, Jiulin Wang, Jianmin Wan, Huqu Zhai, Suguru Takatsuto, Shogo Matsumoto, Shozo Fujioka, Kenneth A. Feldmann, Roger I. Pennell : Brassinosteroids regulate grain filling in rice. *Plant Cell* 20: 2130-2145 (2008) 査読有

⑯ Bo Kyung Kim, Shozo Fujioka, Suguru Takatsuto, Masafumi Tsujimoto, Sunghwa Choe : Castasterone is a likely end product of brassinosteroid biosynthetic pathway in rice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374: 614-619 (2008) 査読有

[学会発表] (計 22 件)

① 中川仁、田中惇訓、七夕高也、藤岡昭三、森昌樹 : イネ *SHORT GRAIN 1* 遺伝子による器官サイズ制御へのBRシグナルの関与、植物化学調節学会第 45 回大会、2010/11/2、神戸

② 山上あゆみ、齊藤知恵子、中澤美紀、松井南、作田正明、藤岡昭三、中野明彦、浅見忠男、中野雄司 : ブラシノステロイド情報伝達突然変異体 *bil4* の原因遺伝子の細胞伸長における機能解析、植物化学調節学会第 45 回大会、2010/11/2、神戸

③ Mamoona Khan, Wilfried Rozhon, Sigrid Husar, Gerhard Adam, Christian Luschnig, Shozo Fujioka, Tobias Sieberer, Brigitte Poppenberger : CESTA, a positive regulator of brassinosteroid biosynthesis. *Plant Biology* 2010, 2010/7/28-8/4, Montreal, Canada

④ 坂本知昭、藤岡昭三 : オーキシンはイネのブ

ラシノステロイド感受性を高める、第 51 回日本植物生理学会年会、2010/3/18、熊本

⑤ 中村郁子、藤岡昭三、辻本雅文、松岡信、吉田茂男、木下俊則、瀬戸秀春、中野雄司 : イネとシロイヌナズナで異なる活性を示す合成ブラシノステロイドの解析、第 51 回日本植物生理学会年会、2010/3/18、熊本

⑥ Lisa Beste, Nurun Nahar, Kerstin Dalman, Shozo Fujioka, Lisbeth Jonsson, Paresh Dutta, Folke Sitbon : Synthesis of hydroxylated sterols in transgenic *Arabidopsis* plants alters growth and steroid metabolism. *Plant Biology* 2009, 2009/7/18-22, Honolulu, Hawaii

⑦ 水谷正治、川邊綾美、清水文一、嶋田幸久、藤岡昭三、坂本知昭 : 新規ブラシノステロイド不活性化経路の解明、第 50 回日本植物生理学会年会、2009/3/22、名古屋

⑧ 坂本知昭、藤岡昭三、北野英己、松岡信 : 新規ブラシノステロイド情報伝達因子の単離、第 49 回日本植物生理学会年会、2008/3/22、札幌

⑨ 隠岐勝幸、稲葉規子、北川佳名子、藤岡昭三、北野英己、藤澤由紀子、加藤久晴、岩崎行玄 : ブラシノステロイド応答におけるイネ 3 量体Gタンパク質 α サブユニットの機能解析、第 49 回日本植物生理学会年会、2008/3/22、札幌

⑩ Bo Kyung Kim, Shozo Fujioka, Suguru Takatsuto, Masafumi Tsujimoto, Sunghwa Choe : Functional analysis of rice CYP85. IPGSA 19th Meeting, 2007/7/21-25, Puerto Vallarta, Mexico

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤岡 昭三 (FUJIOKA SHOZO)

独立行政法人理化学研究所・中野生体膜研究室・副主任研究員
60165355

(2) 連携研究者

瀬戸 秀春 (SETO HIDEHARU)

独立行政法人理化学研究所・中野生体膜研究室・専任研究員
40175419

嶋田 幸久 (SHIMADA YUKIHISA)

独立行政法人理化学研究所・ゲノム機能統合化研究チームチームリーダー
30300875