

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21370023

研究課題名（和文） 単子葉植物におけるシスゼアチンの代謝システムと生理機能の解明

研究課題名（英文） Study on metabolic system and function of *cis*-zeatin in monocots

研究代表者

榑原 均 (SAKAKIBARA HITOSHI)

独立行政法人理化学研究所・生産機能研究グループ・グループディレクター

研究者番号：20242852

研究成果の概要（和文）：

イネにおいてシスゼアチン(cZ)はトランスゼアチンと同様の濃度で主根伸長阻害効果を持ち、サイトカイニン応答性遺伝子の発現も誘導することを示した。また、3種のcZ配糖化酵素遺伝子をイネから同定し、この過剰発現体の解析からイネの正常な成長にcZ活性が重要な役割を持つことを明らかにした。さらにサイトカイニンの受容体の少なくとも一部は細胞膜ではなく小胞体膜に存在することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We have demonstrated that cZ inhibits seminal root elongation and to up-regulates cytokinin-inducible genes, and its activities were comparable to those of tZ. We identified three rice cZ-O-glucosyltransferases and found that their overexpressors exhibited short shoot phenotypes, delay of leaf senescence, and decrease in crown root number. These results strongly suggest that cZ activity has a physiological impact on growth and development in rice. We demonstrated that a part of cytokinin receptors are localized in endoplasmic reticulum membrane.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2011年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：イネ、サイトカイニン、配糖化、受容体、生長制御

1. 研究開始当初の背景

サイトカイニンは植物細胞の分裂と分化の制御に加え、葉の老化や頂芽優性、シンクサイズの調節やストレス耐性など、農学的見地からも重要な植物ホルモンである。サイトカイニンはアデニン環の6位の窒素原子にプレニル側鎖が縮合した構造を持つが、側鎖構造に多様性があり、イソペンテニルアデニン

(iP)、トランスゼアチン(tZ)、シスゼアチン(cZ)、ジヒドロゼアチン(DZ)などが知られている。

近年のシロイヌナズナのサイトカイニン受容体研究の知見から、iPとtZは高活性サイトカイニンとして機能するものの、cZについてはごく低活性、もしくは不活性型であると理解されてきた。またcZは、シロイヌナ

ズナにおける内生量もごく少ないことから、これまでほとんど注目されてこなかった。しかし最近の研究から、イネやトウモロコシなどの単子葉植物では、サイトカイニン内生量の90%程度をcZ型のサイトカイニンが占めることや、トウモロコシのサイトカイニン受容体の中にはcZを認識するものも報告されたことから、cZはイネ科単子葉植物では何らかの生理的役割をもつと推測された。シロイヌナズナにおいてはtRNAの修飾に関わるtRNA-IPT機能欠失変異体でcZが消失することから、tRNA修飾塩基由来であり、tZとの相互変換はほとんどないと理解されているが、イネ、トウモロコシにおけるcZ蓄積量はシロイヌナズナの100倍程度に及ぶことから、tRNA修飾塩基由来だけでは説明が困難である。つまり、イネ科植物のcZ代謝系には未知の部分が隠されていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究課題では未だその生理機能が理解されていないサイトカイニン分子種であるシス型ゼアチン(cZ)に注目し、その代謝システムを明らかにするとともに、側鎖構造の多様性を持つ生理的意義に迫ることを目的とした。単子葉モデル植物としてイネを用い、cZの生合成経路を明らかにする。また、イネとトウモロコシのサイトカイニン受容体の解析により、cZを認識する受容体とその細胞内局在を明らかにする。さらにすでに機能を同定しつつあるcZ配糖化酵素cZOGT発現を改変した形質転換イネ植物体の詳細な解析により、cZが持つ生理機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) cZ代謝システム解析

cZのイネ細胞内での代謝動態については、安定同位体ラベルされたcZRとtZRをそれぞれ独自に合成し、投与後の代謝物の変換と蓄積様式を調べることでtZ-cZ間での変換経路の有無や、cZの配糖化に関する知見を得る。

(2) cZのサイトカイニン活性検討

イネにおけるcZのサイトカイニン活性検討については、主根長への影響を指標に解析をする。またサイトカイニン誘導性遺伝子の発現への効果をtZ等と比較する。

(3) cZOGTの機能解析

cZの不活化に働くと予想されるO-glucosyltransferase遺伝子(cZOGT)を同定し、その発現様式や酵素機能を明らかにする。また、それらの過剰発現形質転換イネを作成し、表現型の解析を行う。

(4) サイトカイニン受容体解析

イネのサイトカイニン受容体については、酵母のsln1変異体の機能相補テストを利用し、サイトカイニン分子種のリガンド指向性を調べる。細胞内局在性についてはイネと近縁

で、より細胞内局在解析を行いやすいトウモロコシを材料にして解析を行う。

4. 研究成果

(1) cZ代謝システム解析

^{15}N および ^{13}C ラベルしたtZRとcZRを合成・精製し、別々にイネ幼苗の根から吸収させ、その1h後の代謝変換を質量分析計を用いて解析したところ、cZ型→tZ型分子種の変換は極めて微小であった。このことは少なくともこの生育ステージではcZがtZの実質的な供給源になる可能性は低いことを示唆している。一方、tZRを吸収させた時の主要な蓄積代謝物はヌクレオチド体やN-配糖体であったのに対し、cZRを吸収させた時はO-配糖体であった。このことはtZとcZの細胞内での代謝経路に違いがあることを示唆している。

(2) cZのサイトカイニン活性検討

cZがサイトカイニンとして意味のある活性を持つか否かを、イネ幼苗根の伸長阻害効果を指標に検討した。その結果、対照としたシロイヌナズナではtZと比較し、cZの阻害効果は有意に低かったが、イネではtZと同程度の阻害効果を示した(図1)。

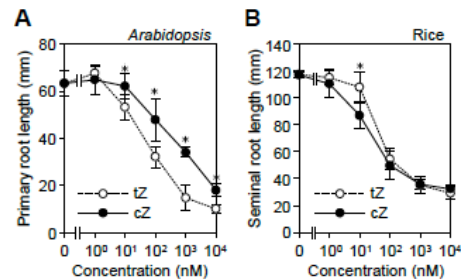


図1 シロイヌナズナ(A)とイネ(B)の主根伸長へのサイトカイニンの阻害効果

サイトカイニン誘導性遺伝子として知られるType-A *OsRR*遺伝子発現のtZとcZへの応答も同程度であった(図2)。cZ代謝システムの解析結果と考え合わせた結果、少なくともイネではcZが活性型サイトカイニンとして機能すると結論づけた。

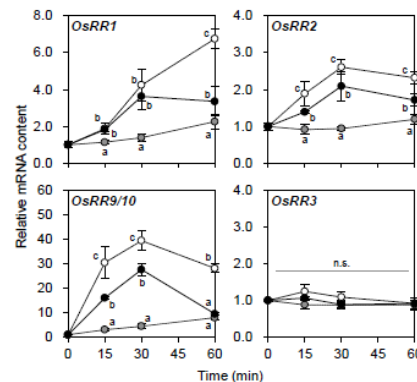


図2 サイトカイニン誘導性 *OsRR1*, *OsRR2*, *OsRR9/10* のtZ (○), cZ (●) に対する応答発現様式

(3) cZOGT の機能解析

イネから3つの *cZ-O*-glucosyltransferase 遺伝子 (*cZOGT1*, Os04g0556500; *cZOGT2*, Os04g0556600; *cZOGT3*, Os04g0565400) を同定した。*cZOGT3* は tZ に対しても弱い反応性を持つが、*cZOGT1*, *cZOGT2* は tZ を基質とせず、さらに cZR に対し反応性を示した(表1)。これは、配糖化は活性型つまり塩基型に対してのみ起こると考えられてきた認識を覆すものであり興味深い。

Symbol	Substrate	K_m (μM)	V_{max} ($\text{pmol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$)	K_{cat} / K_m ($\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$)
cZOGT1	cis-zeatin	330	578	9.6×10^4
	cis-zeatin-riboside	95	264	1.5×10^5
cZOGT2	cis-zeatin	124	172	7.6×10^4
	cis-zeatin-riboside	177	263	8.2×10^4
cZOGT3	cis-zeatin	196	980	2.8×10^5

表1 cZOGT の酵素特性のまとめ

cZOGT をアクチンプロモーター制御下で過剰発現させた形質転換イネを作成したところ、*cZOGT1*, *cZOGT2* の過剰発現イネは地上部が矮化した(図3)。葉鞘と葉身ともに対照に比べ短くなり、その原因の少なくとも一部は細胞長の減少にあった。*cZ* 代謝を改変することで顕著な表現型が見られたことは、*cZ* 配糖化がイネの生長制御に重要な役割を果たしていることを示唆するものである。

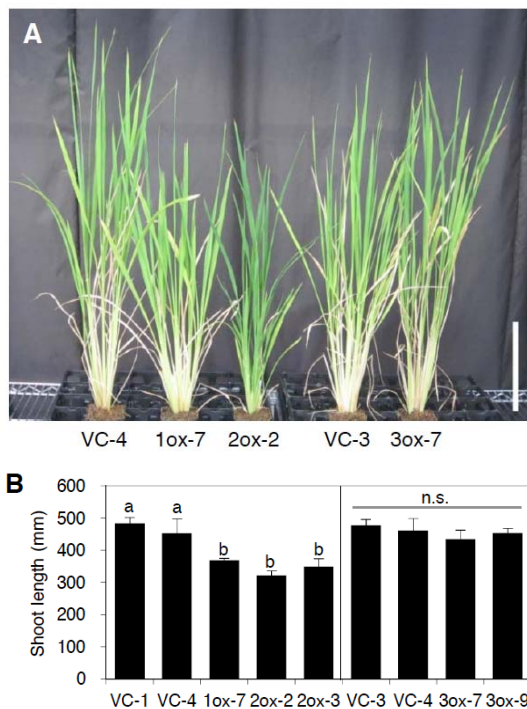


図3 *cZOGT* 過剰発現体のシュート長の比較 (A) 播種後89日目の写真 (B) シュート長の比較 VC, コントロール; 1ox, *cZOGT1* 過剰発現体; 2ox, *cZOGT2* 過剰発現体; 3ox, *cZOGT3* 過剰発現体

これら過剰発現体の表現型をさらに詳しく解析した結果、*cZOGT1*, *cZOGT2*, *cZOGT3* 過剰発現株では冠根数が減少、*cZOGT1*, *cZOGT2* 過剰発現株では老化が遅延するなどの表現型が観察された。過剰発現体の独立したラインを用いてマイクロアレイ解析を行い、過剰発現体において発現レベルの変化した遺伝子の全体像の把握を試みたが、この表現型を説明しうる注目すべき遺伝子は見いだせなかった。

(4) サイトカイニン受容体解析

イネのサイトカイニン受容体の1つ *OsHK6* について出芽酵母 *sIn1* 変異体のアッセイ系を用いサイトカイニン分子種に対する応答性の違いを解析した。その結果、*OsHK6* は iP, tZ, cZ いずれに対しても応答性を示した(図4)。この知見はイネにおいて *cZ* は活性型サイトカイニンとして機能するというこれまでの結果を支持していた。

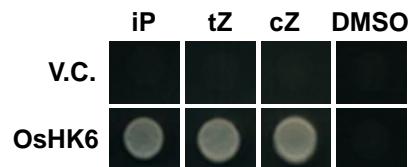


図4 *OsHK6* のサイトカイニンに対する応答性の比較 V.C., ベクターコントロール; DMSO, -サイトカイニン。

さらにサイトカイニン受容体の細胞内局在場所についてトウモロコシを材料に解析を進めた。トウモロコシサイトカイニン受容体 *ZmHK1* に対する単クローナル抗体を作成し、細胞区画分析法を用いて解析した結果、*ZmHK1* の大部分は細胞膜ではなく、小胞体(ER)に存在していることが明らかとなった(図5)。

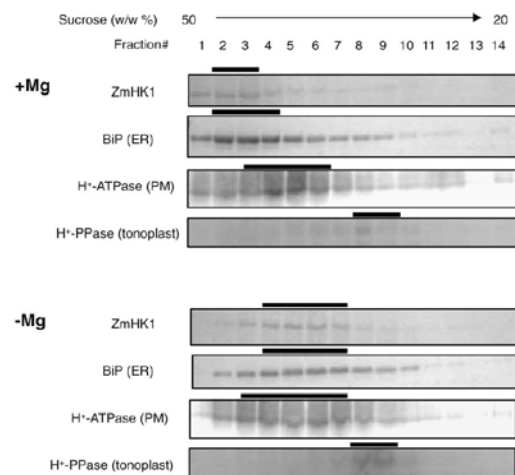


図5 トウモロコシ サイトカイニン受容体 *ZmHK1* の細胞内局在場所の解析 BiP, ER局在マーカー; H-ATPase, 細胞膜局在マーカー; H-PPase, 液胞膜局在マーカー

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 9 件)

- ① Kudo, T., Makita, N., Kojima, M. and Sakakibara, H. (2012) Cytokinin activity of *cis*-zeatin and phenotypic alterations induced by over-expression of *cis*-zeatin-*O*-glucosyltransferase in rice. *Plant Physiol.* Accepted. 査読有
- ② Tokunaga, H., Kojima, M., Kuroha, T., Ishida, T., Sugimoto, K., Kiba, T. and Sakakibara, H. (2012) Arabidopsis lonely guy (LOG) multiple mutants reveal a central role of the LOG-dependent pathway in cytokinin activation. *Plant J.* 69: 355-365. 査読有
- ③ Wang, J., Ma, X.-M., Kojima, M., Sakakibara, H. and Hou, B.-K. (2011) *N*-Glucosyltransferase UGT76C2 is involved in cytokinin homeostasis and cytokinin response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 52: 2200-2213. 査読有
- ④ Lomin, S. N., Yonekura-Sakakibara, K., Romanov, G. A. and Sakakibara, H. (2011) Ligand-binding properties and subcellular localization of maize cytokinin receptors. *J. Exp. Bot.* 62: 5149-5159. 査読有
- ⑤ Kiba, T., Kudo, T., Kojima, M. and Sakakibara, H. (2011) Hormonal control of nitrogen acquisition: Roles of auxin, abscisic acid and cytokinin. *J. Exp. Bot.* 62: 1399-1409. 査読有
- ⑥ Kudo, T., Kiba, T. and Sakakibara, H. (2010) Metabolism and long-distance translocation of cytokinin. *J. Integr. Plant Biol.* 52: 53-60. 査読有
- ⑦ Kamada-Nobusada, T. and Sakakibara, H. (2009) Molecular basis for cytokinin biosynthesis. *Phytochemistry* 70: 444-449. 査読有
- ⑧ Kuroha, T., Tokunaga, H., Kojima, M., Ueda, N., Ishida, T., Nagawa, S., Fukuda, H., Sugimoto, K. and Sakakibara, H. (2009) Functional analyses of *LONELY GUY* cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21: 3152-3169. 査読有
- ⑨ Kojima, M., Kamada-Nobusada, T., Komatsu, H., Takei, K., Kuroha, T., Mizutani, M., Ashikari, M., Ueguchi-Tanaka, M., Matsuoka, M., Suzuki, K. and Sakakibara, H. (2009) Highly-sensitive and high-throughput analysis of plant hormones using MS-probe modification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry: an application for hormone profiling in *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol.* 50: 1201-1214. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① 工藤徹、榎田庸絵、小嶋美紀子、榎原均. イネにおけるシスゼアチンのサイトカイニン活性. 第 84 回日本生化学会大会. 2011/9/23. 京都市
- ② Hitoshi Sakakibara. Structural variation of cytokinin and its biological importance. **International Symposium on Plant Productivity.** 2010/10/26, Peterborough, Canada
- ③ Hitoshi Sakakibara. Nitrogen-dependent regulation of cytokinin metabolism. **Nitrogen 2010.** 2010/7/28, Inuyama, Japan
- ④ Hitoshi Sakakibara. Regulation of cytokinin action in plants: Biological importance of side-chain variation. **20th International Conference on Plant Growth Substances.** 2010/6/28, Tarragona, Spain
- ⑤ Hitoshi Sakakibara. Cytokinin biosynthesis pathway and its regulation: How do plants regulate their growth and development by cytokinin actions? **International Conference on Biological Science Faculty of Biology Universitas Gadjah Mada 2009.** 2009/10/17, Yog Yakarta, Indonesia
- ⑥ Hitoshi Sakakibara. Cytokinin biosynthesis pathway: Not as simple as it looks. **Auxins and Cytokinins Plant Development 3rd International Symposium.** 2009/7/11, Prague, Czech
- ⑦ Hitoshi Sakakibara. Regulation of cytokinin biosynthesis integrating root and shoot responses to nitrogen supply. **Plant Vascular Biology and Agriculture 2009.** 2009/6/22, Chongqing, China

〔図書〕（計1件）

- ① Kiba, T. and Sakakibara, H. (2010)
Role of cytokinin in the regulation of
plant development. *Plant
Developmental Biology -
Biotechnological Perspectives: Vol.
2*, E-C. Pua and M. R. Davey (eds.), pp
237-254.

〔その他〕

ホームページ等

<http://labs.psc.riken.jp/brt/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榊原 均 (SAKAKIBARA HITOSHI)

独立行政法人理化学研究所・生産機能研究グ
ループ・グループディレクター

研究者番号：20242852

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

工藤 徹 (KUDO TORU)

独立行政法人理化学研究所・生産機能研究グ
ループ・特別研究員

小嶋 美紀子 (KOJIMA MIKIKO)

独立行政法人理化学研究所・生産機能研究グ
ループ・技師

槇田 庸絵 (MAKITA NOBUE)

独立行政法人理化学研究所・生産機能研究グ
ループ・テクニカルスタッフ