

機関番号： 82401
 研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2009～2010
 課題番号： 21780060
 研究課題名(和文)
 ストリゴラクトンによる植物の分枝抑制作用と栄養応答に関する研究
 研究課題名(英文) The relationships between nutrient availability and shoot branching inhibition by strigolactones
 研究代表者
 梅原 三貴久 (UMEHARA MIKIHISA)
 独立行政法人理化学研究所・促進制御研究チーム・研究員
 研究者番号： 30469895

研究成果の概要(和文)： ストリゴラクトン(SL)は、寄生や共生のための根圏情報物質としてだけでなく、植物の分枝を抑制する。しかしながら、なぜ根圏情報物質のSLが、植物の分枝を抑制するのかは不明であった。野生型イネでは、リンなどの無機栄養が欠乏すると、SLが増加して分げつが抑制されたが、SL関連突然変異体ではその抑制効果は観察されなかった。したがって、SLはリン酸欠乏に適応するためのシグナル物質として機能すると考えられる。

研究成果の概要(英文)： Strigolactones (SLs) function as a plant hormone that inhibits shoot branching as well as communication signals for symbiosis and parasitism in the rhizosphere. However, why SL contributes to both the communication signal and phytohormone action has been unknown. In this study, tiller bud outgrowth in wild-type rice seedlings is inhibited, while root 2'-epi-5-deoxystrigol (epi-5DS) levels are elevated, in response to decreasing Pi concentrations in the media, but not in the SL-deficient and -insensitive mutants. These results suggest that SL plays an important role in the adaptation to Pi deficiency

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード： ストリゴラクトン、イネ、LC/MS-MS、腋芽の生長、リン酸欠乏、カロテノイド酸化開裂酵素、分げつ、

1. 研究開始当初の背景

植物の分枝は、古くからオーキシシンとサイ

トカイニンという2種類の植物ホルモンによって制御されると考えられてきた (Cline, Bot. Rev.

1991, 57, 318-358)。一般的に、頂芽で生産されたオーキシンが求基的に茎を極性輸送して腋芽の伸長を抑制するのに対し、サイトカイニンは腋芽の伸長を促進する作用がある。1990年代半ば以降に入ると、エンドウ、ペチュニア、シロイヌナズナ、イネの分枝過剰突然変異体の解析から、オーキシンやサイトカイニンとは別の第3の分枝制御ホルモンの存在が示唆されていた (Ongaro and Leyser, J. Exp. Bot. 2008, 59, 67-74)。これらの分枝過剰変異体の中には、カロテノイド酸化開裂酵素7または8 (CCD7または CCD8) の欠損変異体が含まれることから、このホルモンはカロテノイドの酸化開裂産物に由来する物質であることが示唆されていた。しかしながら、その化学物質本体は長年不明のままであった。

一方、ストリゴラクトン (SL) は、さまざまな植物の根から分泌されるテルペノイド化合物群で、根圏においてストライガやオロバンキなどの根寄生植物の発芽を刺激し (Bouwmeester et al., 2003, Curr. Opin. Plant Biol. 6, 358-364)、またアーバスキュラー菌根菌 (AM 菌) という植物の根に共生してリンなどの無機栄養を供給する菌群の菌糸の分枝を促進する物質として作用する (Akiyama et al., 2005, Nature 435, 824-827)。カロテノイドの生合成阻害剤や突然変異体を用いた実験から、SL はカロテノイド開裂産物から合成されることが示唆されていた (Matussova et al., 2005, Plant Physiol. 139, 920-934)。したがって、SL 生合成を担う CCD の同定が待たれていた。

CCD はシロイヌナズナやイネのゲノム解析から、大きく6種類の遺伝子に分類される (Bouwmeester et al. 2007, Trends Plant Sci. 12, 224-230)。これらの CCD 6種類のうちのいずれかが、SL 生産に関与すると考えられたが、研究開始当初、腋芽伸長抑制ホルモンに関わる CCD7 と CCD8 についてはまだ解析が行われていなかった。最近、我々の研究室とフランスのグループが、それぞれエンドウ、シロイヌナズナ、イネの分枝過剰突然変異体を用いて、SL あるいはその下流の代謝物が第3の分枝制御ホルモンであることを突き止めた (Gomez-Roldan et al., Nature 455, 189-194, 2008, Umehara et al., 2008, Nature 455, 195-200)。

これまで、根圏の異種生物間シグナル物質として働く SL と植物体地上部の分枝制御ホルモンは、その作用が全く異なることから別々のシグナル物質として考えられ、それぞれ独自に研究が進められてきた。そのため、現時点において「なぜ根圏のシグナル物質である SL が植物体地上部の腋芽伸長をも制御しているのか」という課題が残されていた。SL の生産量は、無機栄養 (特にリン酸) が

欠乏すると劇的に増加する (Yoneyama et al. 2007a, Planta 225, 1031-1038; 2008b, Planta 227, 125-132)。これは AM 菌を活発化させて栄養を供給してもらう宿主植物の生存戦略のひとつであると考えられる。AM 菌は土壌中に広く分布しており、陸上植物の約80%と共生関係を形成する。貧栄養環境下で、植物が分枝を活発にすることは生育コストとして非効率的である。したがって、SL は根圏において AM 菌の共生を促すとともに、地下部の栄養状態を地上部に伝えて腋芽の伸長を決定する役割を担うと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、SL の定量分析が可能で、分枝過剰突然変異体があり、その分枝過剰の表現型が比較的早く観察できるイネを中心に用いて、腋芽の伸長、無機栄養 (特にリン酸)、SL 内生量の3者の関係に注目し、「なぜ根圏情報物質である SL が、植物の分枝抑制作用を示すのか」、その生理学的意義の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 研究に用いた材料

イネの野生型シオカリ、F-box タンパク質欠損変異体 *d3*、CCD8 欠損変異体 *d10* の種子は、東京大学経塚淳子先生から分与して頂いたものを増殖して使用した。また、SL 合成アナログである GR24 は、宇都宮大学米山弘一先生から分与して頂いた。SL 分析で使用した 2'-*epi*-5-deoxystri-gol (*epi*5DS) の標準品およびその d_1 標識内部標準物質は大阪府立大学秋山康紀先生から分与いただいた。さらに、AM 菌接種試験で使用した *Glomus intraradices* の胞子は、理化学研究所植物科学研究センター白須賢先生から分与頂いた。

(2) イネの水耕栽培

イネの種子を70%エタノールで洗浄し、2.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液で滅菌した後、2日間28°C暗所で吸水させた。発芽した種子を0.6%寒天で固化した培地に移植し、25°C5日間16h/8hの長日条件下 ($150-200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で前培養を行った。生育の揃った実生を水耕液に移植し、さらに同じ条件で7-14日間培養した。固形培地および水耕液の組成は、Kamachi et al. 1991, Plant Physiol. 96, 411-417に記載されているものを使用した。このとき、水耕液中のリン酸など無機栄養塩の濃度を変えて、イネの分けつがどのように影響を受けるか観察した。また、水耕液や植物体を回収し、SL 分析に供試した。

(3) SL 処理

SL 合成アナログである GR24 は、アセトンストックを調製し、使用するまで-80°Cで保存した。水耕栽培時に適当な濃度になるように水耕液に添加

した。

(4) SL 分析

水耕液、根、地上部の3カ所について、*epi5DS* の定量分析を行った。水耕液はまず酢酸エチルで溶媒分画を行い、酢酸エチル相を回収、濃縮後、Waters のシリカ (1 ml) カートリッジカラムで精製した。ヘキサン：酢酸エチル (85 : 15) で洗浄し、ヘキサン：酢酸エチル (65 : 35) で溶出した。

根および地上部はアセトン中で破碎し、そのろ液を濃縮後、酢酸エチルによる溶媒分画をおこなった。酢酸エチル相を回収、濃縮後、Waters の HLB (3 ml) で精製した。20%アセトンで洗浄し、50%アセトンで溶出した。その後、シリカ (1 ml) カートリッジカラムで精製した。ヘキサン：酢酸エチル (85 : 15) で洗浄し、ヘキサン：酢酸エチル (65 : 35) で溶出した。各分析サンプルは、50%アセトニトリル水溶液に溶かし、質量分析装置 (LC/MS-MS) を用いて SL の定量分析を行った。

(5) SL 関連遺伝子の発現解析

根の RNA は QIAGEN の RNeasy Maxi kit を使って抽出し、RNeasy Mini kit で濃縮した。地上部の RNA は RNeasy Plant Mini kit で抽出した。cDNA 合成は QIAGEN の QuantiTect Reverse Transcription kit を用いて行った。qRT-PCR は QuantiTect Probe PCR kit を用い、ABI PRISM 7700 で行った。遺伝子発現解析のコントロール遺伝子にはユビキチンを用いた。

(6) AM 菌根菌の接種実験

播種後 1 週間目のイネをバーミキュライト移植し、(2) の水耕液を定期的に与えながら栽培した。移植の際、*G. intraradices* の孢子 800 spores/tube となるように処理した。継続的に観察し、播種後 5 週間目のイネの根を採取した。採取した根を 10%KOH で処理した後、トリパンプルーで染色し、AM 菌の菌根形成率を計測した。また、AM 菌共生の有無の差が分げつおよび SL 生産にどのような影響を及ぼすか調査した。

4. 研究成果

(1) リン酸欠乏下で栽培したイネの分げつ数と SL 生産の相関

イネの水耕栽培系を用いて、リン酸欠乏環境下のイネにおける SL の生産量と分枝かれ制御との関係を調査した。その結果、水耕液中のリン酸濃度を減らすと、それに応答し、SL の内生量は増加し、分げつが抑制された (図)。すなわち、SL 生産と分枝の間に負の相関が認められた。一方、SL の変異体 *d3*、

d10 の分げつは、野生型の分枝かれが抑制される低リン酸環境においても抑制されなかった。これは、SL の生産がリン酸飢餓に応答して生産され、内生 SL が植物の腋芽伸長を抑制している可能性を示唆している。

次に、リン酸濃度を変えたときの SL 応答性を SL 生合成変異体の *d10* を使って調べた。GR24 による分げつ抑制の程度はリン酸の有無でそれほど大きく変化しなかったことから、分げつの制御は SL の感受性より生産量に依存すると考えられる。

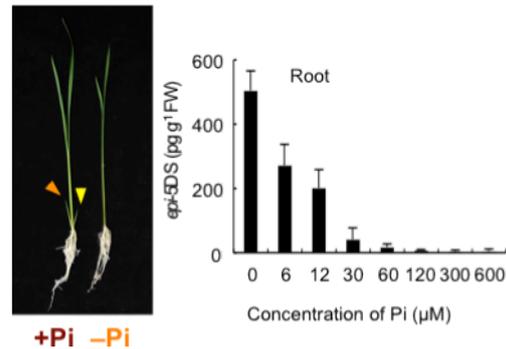


図 リン酸欠乏時のイネの分げつと SL 生産量

(2) 植物体地上部における SL 分析

リン酸濃度を変えて栽培したイネの野生型シオカリの地上部の内生 SL を LC/MS-MS で分析したところ、根に比べて極めて少なかった。リン酸欠乏条件下で栽培したイネから検出されたものの、10 pg gFW⁻¹ 未満と推定される。一方、F-box タンパク質に欠損をもつ *d3* 変異体では内生 SL が定量でき、野生型より SL が蓄積していることがわかった。また、根ほどではないが、リン酸が欠乏すると、内生量が増加する傾向が認められた。

(3) SL 関連遺伝子の発現解析

リン酸欠乏下で栽培したイネは分げつが強く抑制されるが、リン酸を供給するとイネは分げつを開始する。このとき、SL 内生量と SL 生合成遺伝子の発現は低下すると予想した。そこで、リン酸を供給した直後、1 日目、2 日目の SL 生産量と SL 関連遺伝子の発現を継続的に調査し、どの SL 関連遺伝子が SL 生産に大きく貢献しているのか調べた。

SL 内生量は、リン酸を供給すると、1 日以内に低下することが明らかとなった。このとき、SL 関連遺伝子 (*D3*, *D10*, *D14*, *D17*, *D27* および *OsMAX1*) の遺伝子発現を調べたところ、SL 生合成に関わる *D10*, *D17*, *D27* はリン酸を供給すると、1 日以内に発現量が劇的に低下した。また、イネには *MAX1* ホモログが 5 つあるが、このうち *Os01g0700900* と *Os02g0221900* の 2 つの遺伝子がリン酸を供給すると、*D10*, *D17*, *D27* と同様、1 日以内に発現量が劇的に低下した。これらの結果は、複数の SL

生合成関連遺伝子がリン酸濃度の変化に応答して変動することを示している。一方、SLの下流で働く *D14* の発現量は、リン酸を供給する増加した。 *D3* はリン酸濃度の多少に関わらず、遺伝子発現の変化が認められなかった。これまでの結果を考え合わせると、リン酸欠乏時の枝分かれ抑制には根における内生 SL の増加が大きな影響をもつと考えられる。

(4) AM 菌接種時のイネの分けつと SL 生産

G intraradices をイネに接種し、リン酸が覆いと来と少ないときの生育の違いを継時的に観察し、分けつ数の調査、SL 分析を行った。今回の結果では AM 菌を接種しても生育や分けつの数に差が認められず、SL 生産量に関しては、AM 菌を接種すると増加する傾向が認められた。イネでは AM 菌の菌根形成率が低いことが影響しているのかもしれない。一方で、トマトに AM 菌を接種すると SL 生産量が低下するという報告があり (López-Ráez et al. 2011, J. Plant Physiol. 168, 294-297)、もう少しデータを吟味する必要がある。

(5) リン酸以外の無機栄養欠乏に対する SL 生産

窒素、カリウム、硫黄、マグネシウム、カルシウム、鉄が欠乏した水耕液でイネを栽培したところ、窒素、硫黄欠乏下で SL の内生量が増加し、反対にカルシウム欠乏下では SL 生産が低下し、分けつの伸長が観察された。これらの結果から、SL 生産と枝分かれ、周辺環境の無機栄養量に強い相関があることが示された。窒素、リン、硫黄はいずれも AM 菌が植物に供給できる無機栄養で、これらの栄養欠乏時には植物が AM 菌に依存している部分が少なくないのではないかと考えている。

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 2 件)

1) Mikihisa Umehara, Atsushi Hanada, Hiroshi Magome, Noriko Takeda-Kamiya, Shinjiro Yamaguchi, Contribution of strigolactones to the inhibition of tiller bud outgrowth under phosphate deficiency in rice, Plant and Cell Physiology 51, 1118-1126 (2010), 査読有

2) 梅原三貴久 宿主植物におけるストリゴラクトンの生理作用—最近の知見から 植物の生長調節 45, 104-111 (2010), 査読無

[学会発表] (計 3 件)

1) 梅原三貴久, 植物の枝分かれを抑制する新しいホルモン、ストリゴラクトンに関する研究、第 28 回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム、2010 年 9 月 2-3 日、仙台

2) Mikihisa Umehara, Relationships between shoot branching inhibition and strigolactone production under phosphorus deficiency, ICAR2010, 2010 年 6 月 6-10 日, Yokohama, Japan

3) Mikihisa Umehara, Strigolactones play a role in regulating shoot branching in response to phosphorus deficiency, Terpnnet2009, 2009 年 5 月 25-29 日, Tokyo, Japan

[図書] (計 1 件)

1) 梅原三貴久, 経塚淳子, 山口信次郎, ストリゴラクトン: 腋芽の伸長を制御する新しい植物ホルモン、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 pp. 148-153 共立出版 (2010)

[その他]

1) ホームページ

<http://labs.psc.riken.jp/cgdr/index.html>

2) 受賞 日本植物細胞分子生物学会奨励賞
「植物の枝分かれを抑制する新しいホルモン、ストリゴラクトンに関する研究」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅原 三貴久 (UMEHARA MIKIHISA)

独立行政法人理化学研究所・促進制御研究チーム・研究員

30469895