

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19077

研究課題名（和文）女性ホルモン・プロゲステロンの植物における機能発現機構の存在証明と分子機構の解明

研究課題名（英文）Research for molecular functions of plant endogenous progesteron in plant growth

研究代表者

中野 雄司（Nakano, Takeshi）

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：30281653

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ステロイドホルモンは、4員環構造のステロイド骨格を持ち進化的に動物から植物まで進化的に幅広く保存される生理活性化合物の総称である。申請者らは、アラビドプシス、イネ、トマトなど広い植物種に植物ホルモンと同レベル濃度で動物の女性ホルモンプロゲステロンが内生することを明らかにした。さらに、近年明らかにされた動物の7回膜貫通型プロゲステロン受容体の植物における相同性遺伝子を発見した。本研究では、この植物プロゲステロン受容体候補の解析により、植物におけるプロゲステロンの活性発現機構、および、生理活性化合物としてのプロゲステロンの動物から植物までの進化的保存性について解明を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物におけるプロゲステロンは核内に局在する転写因子型受容体に結合し、妊娠の維持など女性ホルモンとしての機能発現に重要な役割について広く解明が進められてきたが、植物ゲノムには存在しないと考えられている。近年、哺乳類の細胞膜7回貫通型タンパク質ファミリーの中からプロゲステロン受容体が同定され、卵細胞や神経細胞において機能している可能性が示された。その結果より申請者らは、アラビドプシス全ゲノム配列において、植物におけるプロゲステロン受容体相同性遺伝子を同定し、機能解明を進めた。本研究は植物における未知の新しい生理活性物質およびその受容機構の発見という高い学術的意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Progesterone, a mammalian steroid hormone, controls key female reproductive events from ovulation to implantation and pregnancy maintenance. Though the function of progesterone in plant had not been revealed, we suggested that it functions to promote plant growth. In addition to its functions through well-analyzed progesterone receptors as ligand-dependent transcription factors, progesterone has been predicted to participate in rapid signaling events that occur independently of transcriptional regulation. Three membrane progesterone receptors were initially cloned from fish ovaries and subsequently identified in a variety of species, including human and mouse. We found that the membrane progesterone receptors belong to a larger family of proteins that is highly conserved from Arabidopsis to higher plants, and we identified a highly homologous cDNA. In this research, we analyzed the molecular functions of the membrane progesterone receptor in a plant species.

研究分野：植物化学生物学

キーワード：ケミカルバイオロジー 植物プロゲステロン ステロイドホルモン 受容体 成長

### 1. 研究開始当初の背景

1979年に植物におけるステロイド化合物としてブラシノステロイドが発見され、さらに1996年に1回膜貫通型のブラシノステロイド受容体BRI1が同定されたが、植物ブラシノステロイド研究者の中では、動物においてステロイドホルモンの受容体として数多くの研究がある核内受容体の相同性遺伝子が、2000年に全ゲノム解読が完了したアラビドプシスゲノム上には存在しなかったことは進化的に興味深いと考えられてきた。この状況下で、申請者らは動物においては黄体ホルモンとして働くプロゲステロンが植物体内に内生されることを発見した。さらに、プロゲステロン処理した植物は胚軸が伸長する活性を持つことも明らかとしたが、この植物において内生するプロゲステロンが確かに植物において生理活性を持つことを証明するためには、植物におけるプロゲステロン受容体の同定が重要かつ必須であると考えてきた。

一方、2003年に動物のステロイドホルモンにおいても、核内受容体以外にも、細胞膜上受容体mPRが発見され、核内受容体が卵成熟を主に制御することに対して、mPRは神経細胞分化や記憶などの機能においても重要な働きを果たしていることが明らかにされ始めている。応募者は、この動物ステロイドホルモン研究においても新しいプロゲステロン受容体mPRにおいては植物ゲノム上に相同性遺伝子が存在するのではないかと着想し、探索を行った結果、5つの相同性遺伝子を発見した。

### 2. 研究の目的

ステロイドホルモンは、4員環構造のステロイド骨格を持つ生理活性化合物の総称であり、動物における性ホルモンである男性ホルモン・テストステロン、女性ホルモン・プロゲステロンなど、昆虫においては脱皮ホルモンであるエクダイソン、植物においては葉や茎の伸長制御と葉緑体制御を行うブラシノステロイドが、それぞれの生物種固有の働きを担っていると考えられてきた。そのような状況下において、申請者らは、プロゲステロン内部標準物質を用いたGC-MS解析を進め、アラビドプシス、イネ、トマトなど広い植物種に植物ホルモンと同レベル濃度でプロゲステロンが内生することを明らかにした(図1)。さらに、近年明らかにされた動物の7回膜貫通型プロゲステロン受容体mPRの植物における相同性遺伝子を発見した。本研究は、この植物プロゲステロン受容体候補AmPRの解析により、植物におけるプロゲステロンの活性発現機構を明らかとすること、プロゲステロンの動物から植物までの進化的保存性について解明することを目指す。

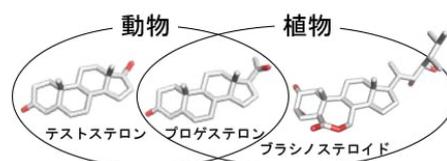


図1. 植物も動物の女性ホルモン・プロゲステロンを内生するが、機能は未知である

### 3. 研究の方法

動物におけるプロゲステロンは核内に局在する転写因子型受容体PRに結合し、妊娠の維持など女性ホルモンとしての機能発現に重要な役割について広く解明が進められてきた。植物において全ゲノム解読が終了した種は増えているが、現時点でこの核内受容体PRの相同遺伝子は植物ゲノムには存在しないと考えられている。そのような状況下、2003年に哺乳類の細胞膜7回貫通型タンパク質ファミリーの中からプロゲステロン受容体mPRが同定され、卵細胞や神経細胞において機能している可能性が示された。その結果より申請者らは、アラビドプシス全ゲノム配列において、植物におけるプロゲステロン受容体mPR相同性遺伝子AmPR1~5を同定した。さらに植物細胞において発現させた

AmPR1-GFPタンパク質複合体を用いて、このAmPR1タンパク質が<sup>3</sup>H標識プロゲステロンと結合活性を持つことも明らかとした。本研究では、申請者らが先に同定した植物に内生するプロゲステロンの植物における生理機能の発現機構を明らかとするため、このAmPR1~5の植物における機能解明を進める。

#### 4. 研究成果

##### (1) 胚軸伸長解析

AmPR1について遺伝子破壊植物を同定し、形態観察を進めた。その結果、野生型アラビドプシスに対するプロゲステロン処理によって胚軸が110%程度伸長促進されるのに対して、AmPR1-KO株はプロゲステロンにより伸長促進されないという結果が得られた。これはAmPR1がプロゲステロンの感知に関わっている可能性を示唆していると考えられた。さらに、このAmPR1-KO株は、他の遺伝子破壊株に比べて最も明瞭なプロゲステロン不感受性形態を示したため、本研究では、このAmPR1を中心に解析を進めた。

特に植物体を用いた解析では、より詳しい形態観察を目指し、AmPR1と他のAmPR2~5との二重破壊植物、AmPR1高発現植物を作成し、破壊株の胚軸におけるプロゲステロン不感受性、高発現株における高感受性などの解析を進めた結果、多重変異体において、単独変異体よりも強い胚軸伸長のプロゲステロン非感受性が認められた。この結果、これらの受容体候補タンパク質が、機能分担をし冗長的に植物胚軸成長を制御している可能性を示唆すると考えられた。

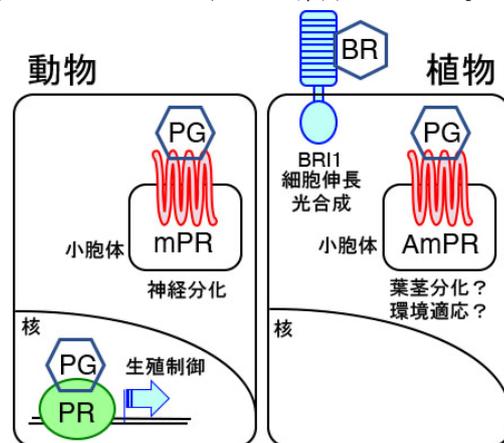


図2. 7回膜貫通型プロゲステロン受容体は動物と植物の間に進化的に保存されている  
PG: プロゲステロン、BR: ブラシノステロイド

##### (2) 葉成長解析

AmPR1とAmPR2, AmPR3, AmPR4, AmPR5の遺伝子欠損変異体について、多重変異体を作成し、そのホモ破壊株の確定を進めた。これらの取得は無事終了し、特に、AmPR1xAmPR2, AmPR1xAmPR3, の葉形態が、野生型よりも小さくなる傾向があることが確認出来た。さらに、植物体にプロゲステロン処理を施した場合、野生型が葉面積増大を示すことに対して、AmPR1xAmPR2, AmPR1xAmPR3 多重変異体においては、プロゲステロン不感受性を示す傾向が確認された。これらの結果は、AmPRファミリーが植物の葉成長においてもプロゲステロン受容体として機能している可能性を支持するものと考えられた。

##### (3) 遺伝子発現解析

発芽4日目の幼植物に対して、プロゲステロン処理を行い、発現変動する遺伝子についてマイクロアレイ解析を行なった。今後は、それらで得られたプロゲステロン応答性マーカー遺伝子数種類は、受容体破壊株にプロゲステロン処理をした際に、プロゲステロン応答性が低下していることが明らかとなった。これらの結果は、受容体の下流にこの介してこれらのプロゲステロン応答性マーカー遺伝子の遺伝子発現制御が行われている可能性、即ち、受容体下流にプロゲステロンのシグナル伝達機構が存在している可能性が示唆されたと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kumazawa Minoru, Nishide Hiroyo, Nagao Ryo, Inoue Kashino Natsuko, Shen Jian Ren, Nakano Takeshi, Uchiyama Ikuo, Kashino Yasuhiro, Ifuku Kentaro	4. 巻 174
2. 論文標題 Molecular phylogeny of fucoxanthin chlorophyll <i>a</i> / <i>c</i> proteins from <i>Chaetoceros gracilis</i> and Lhcq/Lhcf diversity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiologia Plantarum	6. 最初と最後の頁 e13598-603
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ppl.13598	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Bolortuya Byambajav, Kawabata Shintaro, Yamagami Ayumi, Davaapurev Bekh-Ochir, Takahashi Fuminori, Inoue Komaki, Kanatani Asaka, Mochida Keiichi, Kumazawa Minoru, Ifuku Kentaro, Jigjidsuren Sodnomdarjaa, Battogtokh Tugsjargal, Udval Gombosuren, Shinozaki Kazuo, Asami Tadao, Batkhuu Javzan, Nakano Takeshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Transcriptome Analysis of <i>Chloris virgata</i> , Which Shows the Fastest Germination and Growth in the Major Mongolian Grassland Plant	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 684987-96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2021.684987	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Nosaki Shohei, Mitsuda Nobutaka, Sakamoto Shingo, Kusubayashi Kazuki, Yamagami Ayumi, Xu Yuqun, Bui Thi Bao Chau, Terada Tohru, Miura Kenji, Nakano Takeshi, Tanokura Masaru, Miyakawa Takuya	4. 巻 8
2. 論文標題 Brassinosteroid-induced gene repression requires specific and tight promoter binding of BIL1/BZR1 via DNA shape readout	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 1440 ~ 1452
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41477-022-01289-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hasegawa Reika, Fujita Kenjiro, Tanaka Yuichiro, Takasaki Hironori, Ikeda Miho, Yamagami Ayumi, Mitsuda Nobutaka, Nakano Takeshi, Ohme-Takagi Masaru	4. 巻 39
2. 論文標題 Arabidopsis zinc finger homeodomain transcription factor BRASSINOSTEROID-RELATED HOMEODOMAIN 2 acts as a positive regulator of brassinosteroid response	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 185 ~ 189
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.22.0115a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa Reika, Arakawa Tomoki, Fujita Kenjiro, Tanaka Yuichiro, Ookawa Zen, Sakamoto Shingo, Takasaki Hironori, Ikeda Miho, Yamagami Ayumi, Mitsuda Nobutaka, Nakano Takeshi, Ohme-Takagi Masaru	4. 巻 39
2. 論文標題 Arabidopsis homeobox-leucine zipper transcription factor BRASSINOSTEROID-RELATED HOMEBOX 3 regulates leaf greenness by suppressing BR signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 209 ~ 214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.22.0128a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tachibana Ryo, Yamagami Ayumi, Miyagi Shino, Nakazawa Miki, Matsui Minami, Sakuta Masaaki, Tanaka Ryouichi, Asami Tadao, Nakano Takeshi	4. 巻 86
2. 論文標題 BRZ-INSENSITIVE-PALE GREEN 1 is encoded by chlorophyll biosynthesis enzyme gene that functions in the downstream of brassinosteroid signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1041-1048
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大坊りら、山上あゆみ、上林綾加、嶋田勢津子、飯野真由美、岡本真由美、小林瞬、松井昭憲、清水功雄、寛雄介、嶋田幸久、作田正明、浅見忠雄、横田孝雄、中野雄司
2. 発表標題 植物プロゲステロン受容体候補AmPR1の機能解析と高温・塩ストレス耐性機構
3. 学会等名 第56回植物化学調節学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大坊りら、山上あゆみ、上林綾加、嶋田勢津子、飯野真由美、岡本真由美、小林瞬、松井昭憲、清水功雄、寛雄介、嶋田幸久、作田正明、浅見忠雄、横田孝雄、中野雄司
2. 発表標題 植物プロゲステロン受容体候補AmPR1の植物成長及び環境ストレス耐性における分子機能の解析
3. 学会等名 第63回植物生理学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------