

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 28 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23380066

研究課題名(和文) ブラシノステロイドの生合成調節に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the regulation of brassinosteroid biosynthesis

研究代表者

藤岡 昭三 (Fujioka, Shozo)

独立行政法人理化学研究所・長田抗生物質研究室・副主任研究員

研究者番号：60165355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：ブラシノステロイド(BR)の新規生合成経路を明らかにするとともに、活性型BRに至る複雑な生合成経路の中で主要な流れを特定した。また、BR変異体の解析を通して、BRの代謝に関わる幾つかのアシルトランスフェラーゼがBRレベルの調節に深く関わっていることを見出した。さらに、BRの生合成に影響を及ぼす因子について検討した結果、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BIN2の阻害剤が顕著な内生BRレベルの減少を引き起こすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study established novel pathways of brassinosteroid (BR) biosynthesis as well as main paths leading to biologically active BRs. Analyses of BR dwarf mutants revealed that some acyltransferases play important roles in regulating BR levels. Inhibitor of BIN2, a negative regulator in BR signaling, was found to reduce endogenous BR levels.

研究分野：農学

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 阻害剤 シグナル伝達 生合成調節

1. 研究開始当初の背景

1990年代後半にブラシノステロイド(BR)が植物ホルモンとして認知されてからBR研究の進展は著しく、国内外の複数のグループが精力的にBR研究を展開している。研究代表者らは、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、生合成経路の大筋を世界で初めて明らかにした。また、国内外のBR研究グループとの共同研究を広く展開し、生合成やシグナル伝達に関わる様々な変異体の解析を通して、BRの生合成やシグナル伝達に関する重要な知見を提供してきた。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、依然数多くの未解明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が幾つか存在する。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、それらの原因遺伝子の機能解析はあまり進んでいない。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おり、これらのBR関連変異体の解析を進めることによって、BR生合成・代謝やその調節機構、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、BRの生合成経路に関する研究(生合成で残された未解明な重要経路の確定、これまでに明らかにしてきた複雑な網目状の生合成経路の中で主要な経路の同定)、生合成調節に関わる諸因子の解析、生合成・代謝・シグナル伝達に関わるBR変異体の解析を主要課題として、BRの生合成・代謝経路の全容解明と生合成・代謝の調節機構の解明を目指して研究を進めた。

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新規BR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化合物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。野生型だけでなくBR

生合成欠損変異体も有効に活用し、新規BRの生合成経路上の位置づけを明らかにする。また、活性型BRであるcastasterone(CS)やbrassinolide(BL)へ変換される際、どの経路が主要な経路であるかは、重要な課題である。生合成経路上の初期の前駆体である22-hydroxycampesterol(22-OHCR)の重水素標識体を用いた詳細な代謝実験を展開し、生合成経路上のBRに関して、重水素標識が実際にどの程度取り込まれるかを精査することによって、活性型BRに至る複雑なルートの中で、どのルートが主要な経路であるかを検討する。

(2) BR関連変異体の解析

これまでに、シロイヌナズナ、イネ、トウモロコシ等から新規BR関連の候補変異体が幾つか見出されている。新規BR変異体である可能性が高い変異体について解析研究を推進する。まず、内部標準物質を用いたGC/MS法で、内生BRの精密微量分析を行うことにより、BR変異体であるか否かを検証する。BR生合成欠損変異体であることが明らかになった場合には、生合成中間体を用いた回復実験や標識中間体を用いた代謝実験等から、その変異部位を推定する。また、不活性化代謝に関わる変異体である場合には、原因遺伝子の機能解明を目指した研究を展開する。さらに、シグナル伝達や受容に関わる変異体の場合にも、活性型BRの蓄積の有無、バイオアッセイによるBR感受性の検証、原因遺伝子の機能解明研究を進める。

(3) BRの不活性化代謝経路に関する研究

BRの不活性化代謝に関しては、これまでに、活性型BRのC-26位水酸化を触媒するCYP734A、C-23位のグルコシル化を触媒するUGT73C5、UGT73C6等を見出しているが、これらとは異なる遺伝子に変異があると予想される変異体の存在が示唆されている。これらの変異体について、まず、内生BRの精密分析を行うことで、不活性化代謝に関わるBRを特定するとともに、原因遺伝子の機能を明らかにすることにより、新たな代謝経路の可能性について検討する。

(4) 生合成調節に関わる諸因子の解析

植物ホルモンやシグナル伝達の阻害剤とBR生合成調節との関わりに着目して研究を進める。BRのシグナル伝達における負の制御因子であるBIN2(GSK-3/Shaggy-like kinase)の阻害剤が見出されている。BIN2の阻害剤が内生BRレベルにどの程度、影響を及ぼすか、野生型、BR生合成欠損変異体、BR非感受性変異体等を用いて精査する。ま

た、マンノシダーゼの阻害剤が BR 非感受性変異体の形態変化を誘起することから、阻害剤処理濃度に応じて内生 BR レベルの変動が認められるか否か検討する。

(5) BR とオーキシンとのクロストーク

BR とオーキシンと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・シグナル伝達に及ぼす影響を詳細に解析することにより、BR とオーキシンと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を用いて重水素標識 BR 生合成前駆体 22-OHCR の代謝実験を行った結果、22-OHCR から活性型 BR に至る内生 BR とともにそれらの重水素標識の取り込みを検出した。この実験系では、BR 生合成経路のほぼ全容をモニターすることができることから、この系を用いて BR 生合成の主要な流れを特定した。また、22,23-diOHCR から 22,23-diOH-4-en-3-one, 6-deoxo3DT, 6-deoxoTE, 6-deoxoTY への *in vivo* での変換を初めて実証し、生体内での新たな生合成経路の解明に成功した。

(2) BR 関連変異体の解析

トウモロコシの BR 変異体 *na1* の解析

トウモロコシの変異体 *na1* は野生型に比べ草丈が 1/3 程度で、雄小穂に雌蕊が形成される。この変異体の解析を進めた結果、*na1* はシロイヌナズナの *det2* と同様にステロイド 5 α 還元酵素をコードする遺伝子に変異がある BR 生合成欠損変異体であることが判明した。また、この変異体の解析を通して、BR がトウモロコシの性決定に重要な役割を担っていることがはじめて明らかになった。

イネの BR 変異体 *elf1* の解析

BR 欠損の表現型を示すイネ BR 変異体 *elf1* の解析を進めた結果、*elf1* は活性型 BR を蓄積している BR 非感受性変異体であることが判明した。また、ELF1 は E3 コピキチンリガーゼ活性を有していることが明らかになった。

シロイヌナズナの BR 変異体の解析

BR の生合成阻害剤 Brz に抵抗性を示す変異体のスクリーニングで得られた BR の過剰生産株や BR シグナルが恒常的に活性化されていると予想される変異体について解析を進めた。いずれも野生型に比べ、長い胚軸を有し、*gulliver* (*gul*) と命名された。同定され

た 3 つの遺伝子座 *gul1*, *gul2*, *gul3* について解析を進めた。そのうち、*gul3-D* の表現型は BR 生合成の律速生合成遺伝子である *DWF4* の過剰発現に起因しており、内生 BR レベルや BR シグナルとともに恒常的に活性化されていることが明らかとなった。*gul2* は明所で Brz に抵抗性を示す変異体として単離されたが、*gul2* は *phyB* に変異があり、このために生合成阻害剤に対する感受性が低下していることがわかった。*gul1* は明所で Brz の存在下で長い胚軸伸長を示すが、*gul1* はオーキシンのホメオスタシスのモジュレーターである CYP83B1 をコードする遺伝子にミスセンス変異があることが判明した。この変異体では、内生オーキシンの増加とともに BR の生合成前駆体である 22-OHCR の内生レベルが高いことが明らかになった。この変異体の解析を通して、オーキシンと BR のクロストークが、それぞれの生合成酵素レベルでの相互作用を通して機能していることがわかった。

シロイヌナズナの *elg-D/bak1* 変異体は *BRI1* や *DWF4* の過剰発現体に似た表現型を示す。この変異体では、*BRI1* の過剰発現体と同様に BR のシグナルが恒常的に活性化されるとともに、BR 生合成遺伝子の発現が抑制され、実際に内生 BR レベルも顕著に減少していることを見出した。

(3) BR の不活性化代謝経路に関する研究

シロイヌナズナのアクティベーションタグライクの中から BR 欠損の表現型を示す幾つかの変異体 (*bia1-D*, *drl1-D* 等) について解析を進めた。*bia1-D* の内生 BR を精査した結果、活性型 BR を含むほぼすべての内生 BR レベルは野生型に比べ顕著に減少していることを明らかにした。また、*BIA1* は BAHD ファミリーに属するアシルトランスフェラーゼをコードしており、BR のアシル化を通して内生 BR レベルを調節し、BR の恒常性維持に深く関わっていることが判明した。

bia1-D と同様の表現型を示す *drl1-D* 変異体では、6-deoxoTY、6-deoxoCS、TY 等の一部の BR 生合成中間体の内生レベルの低下が認められた。*DRL1* は CoA 依存アシルトランスフェラーゼをコードしており、*DRL1* や *DRL1* のホモログが、BR のエステル化を通して、内生 BR の調節に重要な役割を担っていることが推察された。

(4) 生合成調節に関わる諸因子の解析

BR のシグナル伝達に影響を及ぼす薬剤処理による内生 BR レベルの変動について精査した結果、BR シグナル伝達の負の制御因子である *BIN2* の阻害剤が、野生型、BR 生合成欠損変異体、BR 非感受性変異体のいずれに対しても、処理濃度に応じて顕著な内生レ

ベルの低下を誘起することを見出した。また、マンノシダーゼの阻害剤は BR 非感受性変異体に対してのみ、内生 BR レベルの低下を誘起することが判明した。

(5) BR とオーキシンとのクロストーク

シロイヌナズナやイネを用いて、オーキシンと BR のクロストークを検討した。その結果、オーキシンは BR 生合成酵素遺伝子の発現に影響を及ぼすだけでなく、BR 受容体遺伝子の発現を増加させることにより感受性も高めていることが明らかとなった。

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 1 8 件)

Puna M. Maharjan, Brian P. Dilkes, Shozo Fujioka, Aleš Pěnčík, Karin Ljung, Meike Burow, Barbara A. Halkier, Sunghwa Choe: Arabidopsis *gulliver1/superroot2-7* identifies a metabolic basis for auxin and brassinosteroid synergy. *Plant J.* 80: 797-808 (2014) 査読有
DOI: 10.1111/tpj.12678

Bokyung Kim, Yu Jeong Jeong, Claudia Corvalán, Shozo Fujioka, Seoae Cho, Taesung Park, Sunghwa Choe: Darkness and *gulliver2/phyB* mutation decrease the abundance of phosphorylated BZR1 to activate brassinosteroid signaling in Arabidopsis. *Plant J.* 77: 737-747 (2014) 査読有
DOI: 10.1111/tpj.12423

Jinyeong Cheon, Shozo Fujioka, Brian P. Dilkes, Sunghwa Choe: Brassinosteroids regulate plant growth through distinct signaling pathways in *Selaginella* and Arabidopsis. *PLOS ONE* 8: e81938 (2013) 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0081938

Tomoaki Sakamoto, Hidemi Kitano, Shozo Fujioka: An E3 ubiquitin ligase, ERECT LEAF1, functions in brassinosteroid signaling of rice. *Plant Signaling & Behavior* 8: e27117 (2013) 査読有
DOI: 10.4161/psb.27117

Tomoaki Sakamoto, Shozo Fujioka: Auxins increase expression of the brassinosteroid receptor and brassinosteroid-responsive genes in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior* 8: e23509 (2013) 査読有
DOI: 10.4161/psb.23509

Bokyung Kim, Shozo Fujioka, Mi Kwon,

Jihyun Jeon, Sunghwa Choe: Arabidopsis brassinosteroid-overproducing *gulliver3-D/dwarf4-D* mutants exhibit altered responses to jasmonic acid and pathogen. *Plant Cell Rep.* 32: 1139-1149 (2013) 査読有
DOI: 10.1007/s00299-012-1381-2

Wenjiao Zhu, Haijiao Wang, Shozo Fujioka, Tao Zhou, Hailong Tian, Weisheng Tian, Xuelu Wang: Homeostasis of brassinosteroids regulated by DRL1, a putative acyltransferase in Arabidopsis. *Mol. Plant* 6: 546-558 (2013) 査読有
DOI: 10.1093/mp/sss144

Tomoaki Sakamoto, Yoichi Morinaka, Yoshiaki Inukai, Hidemi Kitano, Shozo Fujioka: Auxin signal transcription factor regulates expression of the brassinosteroid receptor gene in rice. *Plant J.* 73: 676-688 (2013) 査読有
DOI: 10.1111/tpj.12071

Tomoaki Sakamoto, Hidemi Kitano, Shozo Fujioka: Genetic background influences brassinosteroid-related mutant phenotypes in rice. *American Journal of Plant Sciences* 4: 212-221 (2013) 査読有
DOI: 10.4236/ajps.2013.42028

Wilfried Rozhon, Sigrid Husar, Florian Kalaivanan, Mamoona Khan, Markus Idlhammer, Daria Shumilina, Theo Lange, Thomas Hoffmann, Wilfried Schwab, Shozo Fujioka, Brigitte Poppenberger: Genetic variation in plant CYP51s confers resistance against voriconazole, a novel inhibitor of brassinosteroid-dependent sterol biosynthesis. *PLOS ONE* 8: e53650 (2013) 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0053650

Tomoaki Sakamoto, Yoichi Morinaka, Hidemi Kitano, Shozo Fujioka: New alleles of rice *ebisu dwarf (d2)* mutant show both brassinosteroid-deficient and -insensitive phenotypes. *American Journal of Plant Sciences* 3: 1699-1707 (2012) 査読有
DOI: 10.4236/ajps.2012.312208

Yuhee Chung, Vitnary Choe, Shozo Fujioka, Suguru Takatsuto, Muho Han, Jong-Seong Jeon, Youn-Il Park, Kyun Oh Lee, Sunghwa Choe: Constitutive activation of brassinosteroid signaling in the Arabidopsis *elongated-D/bak1* mutant. *Plant Molecular Biology* 80: 489-501 (2012) 査読有
DOI: 10.1007/s11103-012-9963-5

Toshiyuki Ohnishi, Blanka Godza, Bunta Watanabe, Shozo Fujioka, Lidia Hategan, Kouhei Ide, Kiyomi Shibata, Takao Yokota, Miklos

Szekeres, Masaharu Mizutani: CYP90A1/CPD, a brassinosteroid biosynthetic cytochrome P450 of *Arabidopsis*, catalyzes C-3 oxidation. *J. Biol. Chem.* 287: 31551-31560 (2012) 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M112.392720

Tomoaki Sakamoto, Toshiyuki Ohnishi, Shozo Fujioka, Bunta Watanabe, Masaharu Mizutani: Rice CYP90D2 and CYP90D3 catalyze C-23 hydroxylation of brassinosteroids *in vitro*. *Plant Physiol. Biochem.* 58: 220-226 (2012) 査読有
DOI: 10.1016/j.plaphy.2012.07.011

Bokyung Kim, Gysuk Kim, Shozo Fujioka, Suguru Takatsuto, Sunghwa Choe: Overexpression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenases/C-4 decarboxylases causes growth defects possibly due to abnormal auxin transport in *Arabidopsis*. *Molecules and Cells* 34: 77-84 (2012) 査読有
DOI: 10.1007/s10059-012-0102-6

Hyungmin Roh, Cheol Woong Jeong, Shozo Fujioka, Youn Kyung Kim, Sookjin Lee, Ji Hoon Ahn, Yang Do Choi, Jong Seob Lee: Genetic evidence for the reduction of brassinosteroid levels by a BAHD acyltransferase-like protein in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 159: 696-709 (2012) 査読有
DOI: 10.1104/pp.112.197202

17 Thomas Hartwig, George S. Chuck, Shozo Fujioka, Antje Klempien, Renate Weizbauer, Devi Prasad V. Potluri, Sunghwa Choe, Gurmukh S. Johal, Burkhard Schulz: Brassinosteroid control of sex determination in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 19814-19819 (2011) 査読有
DOI: 10.1073/pnas.1108359108

18 Lisa Beste, Nurun Nahar, Kerstin Dalman, Shozo Fujioka, Lisbeth Jonsson, Paresh C. Dutta, Folke Sitbon: Synthesis of hydroxylated sterols in transgenic *Arabidopsis* plants alters growth and steroid metabolism. *Plant Physiol.* 157: 426-440 (2011) 査読有
DOI: 10.1104/pp.110.171199

〔学会発表〕(計14件)

山上あゆみ、中田元基、市川尚斉、松井南、藤岡昭三、長田裕之、久城哲夫、浅見忠男、中野雄司：葉面積拡大を促進する新規ブラシノステロイド情報伝達因子 BIL8 の細胞内機能、第 56 回日本植物生理学会年会、2015/3/17、東京農大、東京

宮地朋子、市川尚斉、松井南、藤岡昭三、長田裕之、浅見忠男、中野雄司：細胞膜-核

間移行によって植物花茎伸長を促進する新規ブラシノステロイド情報伝達因子 BIL7 の機能解析、植物化学調節学会第 49 回大会、2014/10/18-10/19、京都大、京都

中村郁子、藤岡昭三、栃尾尚哉、伊藤晋作、木川隆則、嶋田幸久、松岡信、吉田茂男、木下俊則、浅見忠男、瀬戸秀春、中野雄司：イネとシロイヌナズナで異なる反応を示す合成ブラシノステロイドの解析、日本植物学会第 78 回大会、2014/9/13、明治大、神奈川

山崎千秋、立川巴、藤岡昭三、中村郁子、嶋田幸久：シュートの重力屈性位置決定に対するブラシノステロイドの役割、第 55 回日本植物生理学会年会、2014/3/18、富山大、富山

宮地朋子、市川尚斉、松井南、藤岡昭三、長田裕之、浅見忠男、中野雄司：ブラシノステロイド情報伝達因子 BIL7 の核移行条件と相互作用因子の解析、植物化学調節学会第 48 回大会、2013/10/31-11/1、新潟大、新潟

大西利幸、Blanka Godza、渡辺文太、藤岡昭三、Lidia Hategan、柴田恭美、横田孝雄、Miklos Szekeres、水谷正治：シトクロム P450 酵素 CYP90A1 はブラシノステロイド C-3 位酸化酵素である、植物化学調節学会第 47 回大会、2012/10/27-10/28、山形大、山形

Jinyeong Cheon, Shozo Fujioka, Brian P. Dilkes, Sunghwa Choe: Evolution of brassinosteroid biosynthetic pathways: comparative studies on *Selaginella* and *Arabidopsis*. IPMB 2012, 2012/10/21-10/26, Jeju, South Korea

Tomas Hartwig, George Chuck, Shozo Fujioka, Renate Weizbauer, Satya Chintamanani, Sunghwa Choe, Gurmukh Johal, Burkhard Schulz: Brassinosteroids control sex determination in maize. *Plant Biology* 2011, 2011/8/6-8/10, Minneapolis, USA

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・長田抗生物質研究室・副主任研究員

研究者番号：60165355