

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：12201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780109

研究課題名(和文)植物における動物ステロイドホルモンの生合成と性分化制御の解明

研究課題名(英文)Studies on the regulations of animal steroid biosynthesis and sex differentiation in plants

研究代表者

野村 崇人(Nomura, Takahito)

宇都宮大学・雑草科学研究センター・准教授

研究者番号：60373346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：植物から動物ステロイドが検出されるが、植物におけるその生合成経路と生理作用は明らかにされていない。本研究では、モデル植物であるシロイヌナズナの内生動物ステロイドの分析を行うことにより、動物ステロイド生合成は植物ホルモンのアブシジン酸に制御されている可能性を見出した。また、花において動物ステロイドのプロゲステロンの含量が高かった。さらに、雄株と雌株が分かれるアスパラガスでは、雄株よりも雌株の方がプロゲステロンの含量が高かった。これらのことから、動物ステロイドと植物の生殖生長との関連性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Animal steroids are detected from plants, but the biosynthesis pathway and physiological function of animal steroids in plants has been unknown. In this study, I analyzed endogenous animal steroids in the model plant Arabidopsis. The results suggested the possibility that the biosynthesis of animal steroids is regulated by abscisic acid, a plant hormone. The endogenous level of progesterone, an animal steroid, was higher in flowers than that in other tissues. Furthermore, I analyzed endogenous animal steroids in the dioecious plant asparagus and found that the endogenous level of progesterone was higher in female plants than that in male plants. These results suggested that animal steroids might regulate the reproductive growth of plants.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物有機化学

キーワード：ステロイド 植物 生殖生長

1. 研究開始当初の背景

ステロイドホルモンは生物界に広く分布し、水カビでは造精器誘導ホルモンであるアンセリジオール、昆虫では脱皮ホルモンのエクジステロイド、植物では成長ホルモンのブラシノステロイド、動物では性ホルモンのエストラジオールやテストステロン、そしてニューロステロイドなどがつくられる。ニューロステロイドは脳自身がつくるステロイドホルモンで、脳における神経回路の調節や精神活動に重要な役割を担っている。その代表的なものは、プロゲステロン(図1、黄体ホルモンとしても知られ、性ホルモンの前駆体でもある)とその還元的代謝物などである。1920年代から、植物から動物の性ステロイドやプロゲステロン等の同定の報告がある。しかしながら、その初期の同定は主にバイオアッセイにより行われており、二次代謝物を豊富に含む植物においては、その同定に疑問符が付いていた。さらに、その存在が示唆されてから90年以上も経っているが、植物における動物ステロイドの生合成経路と存在理由(生理作用)は明らかにされていない。

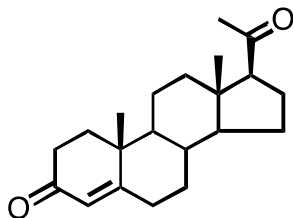


図1 プロゲステロンの構造

2. 研究の目的

研究代表者らは、モデル植物のシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)やイネ(*Oryza sativa*)のゲノム中にヒトのプロゲステロン受容体と相同の遺伝子が複数個あり、また、プロゲステロンはこれら植物ばかりでなく広範な種子植物が合成することをGC-MSを用いた機器分析により証明した(Lino et al., *Phytochemistry*, 2007, 68: 1664-1673)。この研究が引き金となってその還元的代謝物であるニューロステロイド類を分析したところ、コケやシダ含む広範な植物がその合成を行うことが明らかになった。このことは、プロゲステロンをはじめとするニューロステロイド類は動物界と植物界を超えて機能

するステロイドであることを暗示している。

そこで、本研究では、(1)変異体による逆遺伝学的研究手法を用いて植物における動物ステロイドの生合成経路の解明、さらに、(2)動物ステロイドの植物における生理機能(特に性分化に関連があるのか)の解明を目的に研究を行った。

3. 研究の方法

シロイヌナズナやイネなどのゲノム中に動物のステロイド生合成酵素遺伝子に相同性の高い遺伝子は存在しない。しかしながら、強心配糖体(ステロイド配糖体)を生産する植物のジギタリス(*Digitalis purpurea*)において、プレグネノロンからイソプロゲステロンへの合成酵素3 β -HSDがすでに同定されている。これはヒトの3 β -HSDとは分類上異なる酵素であることが分かっている(Finsterbusch et al., *Planta*, 1999, 209: 478-486)。興味深いことに、ジギタリス3 β -HSD遺伝子に相同性が高いものに、シロイヌナズナのABA2遺伝子がある。ABA2酵素はアブシシン酸合成酵素であり、キサントキシンからアブシシンアルデヒドへの変換を触媒する(Cheng et al., *Plant Cell*, 2002, 14: 2723-2743)。その構造変換はプレグネノロンからプロゲステロンへの構造変換に似ていることから、同一ファミリー酵素の中に3 β -HSDがある可能性は高いと考えられた。さらに興味深いことに、同一ファミリー酵素のなかにはトウモロコシのTASSELSEED2(TS2)がある。TS2遺伝子に欠陥をもつトウモロコシは雄花が雌花化する表現型をしめし、TS2はジャスモン酸の生合成酵素であることが示唆されている(Acosta et al., *Science*, 2009, 323: 262-265)。そこで、(1)の研究として、モデル植物のシロイヌナズナがもつジギタリス3 β -HSD類似遺伝子(*AtHSD1*)が動物ステロイド生合成に関連があるのか調べることにした。そのため、*AtHSD1*遺伝子のT-DNA挿入変異体をアメリカのシロイヌナズナバイオリソースセンター(ABRC)から入手して、LC-MS/MSを用いた機器分析により内生動物ステロイドの定量を行った。また、シロイヌナズナの茎葉、花や

角果（果実）などの器官別に内生動物ステロイドを分析した。

（２）の研究としては、雄花と雌花が別々の個体につく雌雄異株植物の内生動物ステロイドを分析した。雌雄異株植物には性染色体があり性分化が制御されていると考えられているが、雌雄を決定するマスター遺伝子は同定されていない（Matsunaga, *Genes Genet. Syst.*, 2006, 81: 219-226）。これまでに、外部投与実験により既知の植物ホルモンが雌雄決定に関わっているという報告がある（Chailakhyan and Khryanin, *Planta*, 1978, 142: 207-210）。しかしながら、雌雄異種植物であるハウレンソウの雄株と雌株の内生植物ホルモンを分析したところ、既知の植物ホルモン含量に雄雌の差はなかった。一方、動物ステロイドは植物の雌雄分化に関与していることも示されているが（Gawienowski et al., *Phytochemistry*, 1971, 10: 2033-2034）植物の性分化と内生動物ステロイドを詳細に分析した報告はない。そこで、雌雄異株植物のハウレンソウとアスパラガスの雄株と雌株それぞれの内生動物ステロイド分析を行い、その含量に差異があるか調べた。

４．研究成果

（１）の研究結果に関しては、シロイヌナズナの *AtHSD1* 遺伝子に T-DNA が挿入されたホモ変異体二系統 (*Athsd1-1*, *Athsd1-2*) と正常種 (WT) の間で、内生プロゲステロン量に大きな差は認められなかった。このことから、*AtHSD1* 遺伝子はプロゲステロン合成酵素 (3 β -HSD) 遺伝子ではないと考えられた。しかしながら、シロイヌナズナのゲノムの中に、プロゲステロン合成酵素遺伝子は複数存在し、それらが *AtHSD1* 遺伝子の欠陥を補っている可能性も否定できない。プロゲステロンの生理作用は分かっていないが、実際に *Athsd1* 変異体の表現型は、WT との違いが認められなかった。*AtHSD1* 遺伝子に類似した遺伝子は、シロイヌナズナには５つ存在するので、それらがプロゲステロン合成能をもっている可能性が考えられる。*AtHSD1* 遺伝子にコードされるタンパク質がプロゲステロン合

成酵素であるかを確認するためには、大腸菌等でタンパク質を発現させて、プレグネノロンからプロゲステロンへの変換実験を行う必要がある。

AtHSD1 遺伝子の機能の比較のため、*AtHSD1* 遺伝子に類似した *ABA2* 遺伝子に欠陥をもつ *aba2-2* 変異体の内生動物ステロイド分析も行った。*ABA2* 遺伝子はアブシジン酸合成酵素をコードしており、*aba2-2* 変異体はアブシジン酸欠損変異体である。分析の結果、*aba2-2* 変異体の内生プロゲステロンは WT と比べて増加している傾向が見られた。この結果は、*ABA2* にはプロゲステロン合成能は無いことも示しているが、一方で、アブシジン酸によりプロゲステロンの生合成が制御されている可能性が考えられた。*aba2-2* 変異体はアブシジン酸欠損のため、気孔の閉鎖が低下しており、乾燥ストレスに曝されている。そのため、WT と比べると生育も悪く、そのようなストレスにプロゲステロン生合成が関係している可能性が考えられた。

シロイヌナズナ WT の器官別の内生プロゲステロン含量は、花が一番高く、ロゼット葉は低かった。その差は約５倍も花の方が高かった。このことから、プロゲステロンが生殖生長に関与している可能性が示唆された。また、角果では、花に比べて内生量が半分ほどに低下しており、花茎と同様なレベルであった。したがって、生殖生長において、受精もしくは性分化の段階に動物ステロイドが関与している可能性が考えられた。上記の変異体の分析は地上部全体を用いて行ったが、花のみを採取して分析を行うと、変異体と WT の間に大きな差が認められるかもしれない。（２）の研究結果としては、花芽が分化する前のハウレンソウやアスパラガスにおいて雌雄形態に明確な差はないが、それぞれの雄のマーカー遺伝子は知られており、それらの遺伝子を PCR で増幅して雌雄判別を行い分析材料とした。ハウレンソウは、生殖生長と栄養条件の関係も調べるために、貧栄養や過剰栄養条件で育てた材料を分析したが栄養条件による動物ステロイド生産への影響は認められなかった。また、本生育条件では動物ステロイドの生産量は低く、雌雄における動

物ステロイド含量の差異を確認することはできなかった。一方、アスパラガスの内生ブロゲステロン含量は雌株の方が雄株より、一回目の分析で約5割高く、二回目の分析では約2割高かった。分析には花芽がついた若い茎葉部(雌雄差はない段階)を用いた。アスパラガスの雌雄分化と動物ステロイドの関係を議論するには、さらに、花芽が分化する前の茎葉部や、花部のみを分析する必要がある。また、動物ステロイドの投与実験を行い、雌雄分化などの表現型に変化が現れるのか確認が必要である。

本研究は植物における動物ステロイドの生理機能を解明するための基礎的でありながら、多くの未知なるものへの発展性を包含するチャレンジングなものであった。そして、動物と植物の領域を超えた極めて独創的な研究課題であり、本研究成果は植物生理学のみならず、生物学全般の学術的発展に大きく寄与し、生物の多様性と進化の理解に資する知見が得られたと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

- 1) Masashi Asahina, Yuji Tamaki, Tomoaki Sakamoto, Kyomi Shibata, Takahito Nomura, Takao Yokota, Blue light-promoted rice leaf bending and unrolling are due to up-regulated brassinosteroid biosynthesis genes accompanied by accumulation of castasterone. *Phytochemistry*, 査読有, (2014) *in press*.

〔学会発表〕(計 3件)

- 1) 西尾佳樹、軸丸裕介、関本均、神谷勇治、横田孝雄、野村崇人、雌雄異株植物ホウレンソウの内生植物ホルモン分析、第55回日本植物生理学会、2014年3月18~20日、富山大学
- 2) Takahito Nomura, Masaki Mori, Tetsuo Kushiro, Shinjiro Yamaguchi, Takao Yokota, Gerard Bishop, Brassinolide is not essential for plant growth?, 1st International Brassinosteroid Conference, 2012年6月27~29日、スペイン・バルセロナ
- 3) Masashi Asahina, Takahito Nomura,

Kyomi Shibata, Takao Yokota, Effects of light quality on the gene expression of brassinosteroid biosynthesis in rice seedling, 1st International Brassinosteroid Conference, 2012年6月27~29日、スペイン・バルセロナ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 崇人 (NOMURA Takahito)
宇都宮大学・雑草科学研究センター・
准教授
研究者番号: 60373346