

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780117

研究課題名(和文)植物の光感受性を制御する新規ホルモン様物質の探索

研究課題名(英文) Identification of a novel plant hormone-like compound that regulates light sensitivity of plant

研究代表者

瀬戸 義哉 (SETO, YOSHIYA)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：40620282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、シロイヌナズナの胚軸伸長や種子発芽に関与するD14LIKEタンパク質のリガンド、すなわち新たな植物ホルモン様物質の同定を目指した。目的とする化合物の同定には至らなかったが、化合物探索に重要と考えられる生物検定系を構築することが出来た。すなわち、D14LIKEタンパク質とそのパートナータンパクと考えられるSMAX1タンパク質を用いた酵母ツーハイブリット系の構築に成功した。また、胚軸伸長抑制作用があることが報告されたストリゴラクトンについて、種々立体異性体を用いた構造活性相関研究を行い、D14LIKEタンパク質を介したストリゴラクトンの作用には立体特異性がないことを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：In this research work, I focused on D14LIKE protein which is an alpha/beta-fold-hydrolase protein involved in hypocotyl elongation and seed germination in Arabidopsis. We tried to identify the endogenous ligand for this protein, and established a yeast two hybrid system using D14LIKE and its possible partner protein, SMAX1. This system can be used as a bioassay method to find the D14LIKE ligand. Strigolactone (SL) is a plant hormone that regulates shoot branching, and D14 protein, a closely related homolog of D14LIKE, acts as a possible receptor for SL. SL was also reported to inhibit hypocotyl elongation of Arabidopsis, thus I carried out structure activity relationship study using optically purified stereoisomers of SL. As a result we found that there is no stereo-specificity for the D14LIKE-dependent effect of SL, suggesting that SL itself is not the endogenous ligand for the D14LIKE pathway.

研究分野：天然物化学

キーワード：D14LIKE 胚軸伸長 カリキン SMAX1 立体特異性 ストリゴラクトン

1. 研究開始当初の背景

2008年に新たな植物ホルモンとしてストリゴラクトンが見出され、その受容体候補タンパク質としてイネのストリゴラクトン非感受性変異体である *dwarf14* (*d14*) の原因遺伝子がコードする加水分解酵素ファミリータンパク質が見出されている。D14にはパラログのファミリーとしてD14LIKEと呼ばれるファミリータンパク質が存在している。シロイヌナズナの *d14like* 変異体は胚軸の徒長や発芽の遅延など、いずれも光に対する感受性と関係があると思われる表現型を示し、これらの表現型は *d14* 変異体では観察されない。D14がストリゴラクトンの受容体として機能することを考慮すると、D14LIKEタンパク質も何かしらの低分子化合物の受容体として機能する可能性が考えられた。また、煙から見出された種子発芽促進物質であるカリキンに対する非感受性変異体としてシロイヌナズナの *d14like* 変異体が単離されており、D14LIKEタンパク質は外部から投与されたカリキンの受容体として働く可能性が考えられた。

2. 研究の目的

上記の背景のもと、本研究では、カリキンとD14LIKEタンパク質の相互作用を明らかにすることに加え、D14LIKEの植物内生のリガンドを探索することを最終的な目的とした。内生リガンドの探索のためには、本経路のホルモンを生合成することのできない変異体を獲得することが有効であると考え、そのような変異体の探索を行うこととした。

また、研究開始後に、ストリゴラクトンがシロイヌナズナの胚軸伸長を抑制する作用も有していることが明らかとなったため、ストリゴラクトンがD14LIKEのリガンドとしても機能する可能性が考えられた。一方で、本結果については詳細な解析がなされておらず、特にストリゴラクトンが有する立体異性体を単一分取したものではなく、ラセミ体としての投与実験しかなされていなかった。そこで、ストリゴラクトンがシロイヌナズナの胚軸伸長を抑制する作用について、特にストリゴラクトンの立体化学に着目して詳細な解析を行うことにより、本作用についての知見を深めることも目的とした。

3. 研究の方法

(1)D14LIKEとカリキンの相互作用については、大腸菌にて発現させた組換えタンパク質を用い、試験管内での相互作用(結合試験)を行った。また、新たに報告されたD14LIKE経路の負の制御因子と考えられるSMAX1との相互作用を酵母ツーハイブリッドの系を用いて解析した。

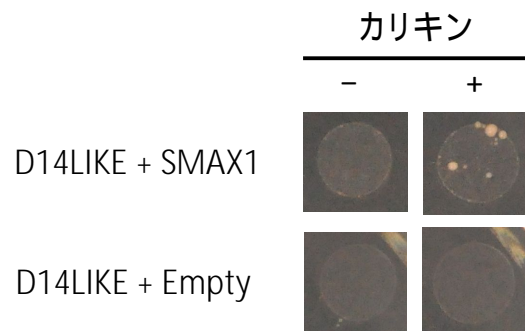
(2)内生ホルモンの探索に向けて、シロイヌナズナの *d14like* 変異体と表現型が酷似した新たな変異体の探索を試みた。特に、これ

らの変異体の中からカリキンに対して感受性のあるものを選抜することで、内生ホルモンの生合成遺伝子が欠損した変異体の探索を目指した。

(3)ストリゴラクトンを外部から投与した際は、D14経路だけでなくD14LIKE経路も介して、胚軸伸長の抑制が見られるという報告がなされたため、このことについても更なる追及を行った。具体的には、ストリゴラクトンの様々な立体異性体を投与し立体特異性を調べる実験を行った。ストリゴラクトンの立体異性体のうち、植物ホルモンとして枝分かれ抑制活性を有するものは、D環(2'位)の立体配置がR型を有する化合物であることを申請者のグループが明らかにしている。ストリゴラクトンがD14LIKE経路に作用する際にも同様の特異性があるか否かを検証することで、ストリゴラクトンによるシロイヌナズナの胚軸伸長抑制について新たな知見が得られるとともに、内生のリガンドを探索するうえでの重要な情報が得られるものと考え、実験を行った。

4. 研究成果

(1)D14LIKEとカリキンの相互作用については、奈良先端大との共同研究による成果として、等温滴定法により、直接的な相互作用を検出することに成功した。また、D14LIKE経路における負の制御因子として近年新たにSMAX1タンパク質が見出されている。D14LIKEがSMAX1タンパク質と相互作用するか否かについては明らかとなっていなかったが、酵母ツーハイブリッド法を用いた試験により、D14LIKEがカリキン依存的にSMAX1タンパク質と弱く相互作用することを明らかにした(下図)。



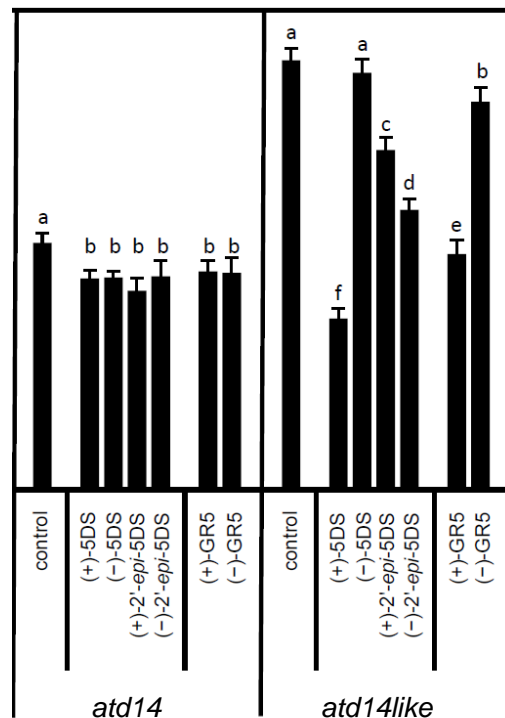
申請者のグループ以外の研究によっても、D14LIKEとカリキンが直積的に相互作用することが報告されたため、カリキンはD14LIKEタンパク質によって受容されることによって、種子発芽を誘導する等の生理活性を示すと考えられる。また、その際にD14LIKEタンパク質がカリキン依存的にSMAX1タンパク質と相互作用することによって、ホルモン信号が伝達すると予想される。イネにおけるストリゴラクトンの信号伝達においては、SMAX1のホモログであるD53

タンパク質が、ストリゴラクトン依存的に D14 と相互作用した後に、F-box タンパク質依存的にプロテアソーム経路によって分解されることが報告されている。すなわち、ストリゴラクトン非存在下では信号を抑制している D53 が、ストリゴラクトン依存的に分解されることが本ホルモンの信号伝達における一つの重要なイベントであることが明らかとなっている。このことを踏まえると SMAX1 は D14LIKE と相互作用後に分解される可能性が考えられるため、今後はそういった点に着目した解析も必要となると考えられる。

(2) EMS で処理したシロイヌナズナの種子集団より、*d14like* 変異体と表現型が酷似する変異体のスクリーニングを実施した。約 12 万粒の種子のスクリーニングを行い、その結果、*d14like* 変異体と酷似した変異体を約 20 ライン獲得することに成功したものの、それらの変異体の多くは *d14like* 変異体の新たなアリルであった。また、*d14like* 変異体に加えて、本経路の下流で働く F-box タンパク質である MAX2 をコードする遺伝子の変異体の新たなアリルも得られた。しかしながら、獲得した変異体の中には、生合成変異体と思われる変異体は含まれていなかった。一方で、新たに獲得した *d14like* 変異体については、シークエンス解析を行い、その多くはアミノ酸の点変異を伴う変異体であることを見出した。すなわち、D14LIKE タンパク質の機能に重要と思われるアミノ酸を複数同定することが出来たと考えられる。新たな *d14like* 変異体アリルを獲得出来たことから、スクリーニング自体に問題があったわけではないと考えられるため、生合成変異体を獲得することが出来なかった理由として、生合成遺伝子がいずれも多コピーで存在しており、遺伝子の冗長性がある可能性が推測される。生合成変異体を獲得するという目的が達成できなかったという意味で、当初の目的を達成することは出来なかったが、先に記載した、D14LIKE と SMAX1 タンパク質の酵母ツーハイブリッド系を構築することが出来たということは、内生のリガンドを探索するために最も重要なアッセイ法を構築することが出来たという意味でも、重要な成果であると考えられる。

(3) シロイヌナズナにおいては、ストリゴラクトンを外部から添加した際に、胚軸伸長が抑制されるということが報告された。その際、*d14* 変異体、もしくは *d14like* 変異体に投与すると、いずれも胚軸の伸長が抑制されるが、一方で *d14 d14like* 二重変異体は非感受性になる。すなわち、胚軸伸長制御においては外部から投与したストリゴラクトンが D14、D14LIKE いずれの経路によっても受容されて機能することが考えられた。このことから、D14LIKE の内生のリガンド候補の

一つとしてストリゴラクトンが考えられた。そこで、この可能性について、詳細に検討することを目的に、ストリゴラクトンの立体異性体を用いて、胚軸伸長抑制試験を行った。ストリゴラクトンが D14 経路を介して枝分かれを抑制する際には、ストリゴラクトンの立体異性体のうち、プテノライド環の配座を決定する 2'位の立体配置が R型であるものが、より強い生理活性を有することを申請者らのグループが明らかとして来ていた。そこで、まず、D14 が機能することが可能な、*d14like* 変異体を用いて、ストリゴラクトンの立体異性体の投与実験を行ったところ、枝分かれ抑制の際と同じように、2'位が R の立体異性体が、より強い胚軸伸長抑制活性を有していることが明らかとなった ((+)-5DS, (-)-2'-*epi*-5DS, (+)-GR5, 下図参照)。一方で、D14LIKE が機能することのできる *d14* 変異体を用いて同様の試験を行うと、興味深いことにいずれの立体異性体も、ほぼ同程度に胚軸伸長を抑制することが明らかとなった (下図)。これらの結果から、D14LIKE 経路にストリゴラクトンが作用する際には立体特異性がないということが明らかとなり、ストリゴラクトンそのものが D14LIKE 経路の内生のリガンドとして作用する可能性は低いと考えられた。また、一つの可能性として、ストリゴラクトンを外部投与した際には、ストリゴラクトンの代謝産物、もしくは分解物等が D14LIKE 経路に作用している可能性も考えられる。いずれにせよ、D14LIKE 経路とストリゴラクトンの関係について新たな知見を加えることが出来たと考えられる。



以上のように、当初目的としていた D14LIKE の内生のリガンドを探索し同定するという最終目標には到達することが出来なかったものの、煙から見出されたカリキンと D14LIKE の直接的な相互作用を明らかにできたことなど、一定の成果を得ることが出来た。先に記載した通り、今後は D14LIKE と SMAX1 を利用した酵母ツーハイブリッド系を用いることで、両者の結合を誘導する低分子化合物を植物の抽出物等から探索するという方法によって、内生リガンドの同定を引き続き目指していきたいと考えている。

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 6 件)

Mikihiisa Umehara, Mengmeng Cao, Kohki Akiyama, Tomoki Akatsu, Yoshiya Seto, Atsushi Hanada, Li Weiqiang, Noriko Takeda-Kamiya, Yu Morimoto, Shinjiro Yamaguchi, Structural requirements of strigolactones for shoot branching inhibition in rice and Arabidopsis, *Plant Cell Physiol.*, in press 査読有
doi: 10.1093/pcp/pcv028

Yoshiya Seto, and Shinjiro Yamaguchi, Strigolactone biosynthesis and perception, *Current Opinion in Plant Biology*, Vol. 21, pp. 1-6 (2014) 査読有
doi: 10.1016/j.pbi.2014.06.001.

Megumi Kagiya, Yoshinori Hirano, Tomoyuki Mori, Sun-Yong Kim, Junko Kyojuka, Yoshiya Seto, Shinjiro Yamaguchi, and Toshio Hakoshima, Structures of D14 and D14L in the strigolactone and karrikin signaling pathway. *Genes to Cells*, Vol. 18, pp. 147-160 (2013) 査読有
doi: 10.1111/gtc.12025

Yoshiya Seto, Hiromu Kameoka, Shinjiro Yamaguchi, and Junko Kyojuka, Recent advances in strigolactone research: chemical and biological aspects, *Plant Cell Physiol.*, Vol. 53, pp. 1843-1853 (2012) 査読有
doi: 10.1093/pcp/pcs142.

[学会発表](計 12 件)

瀬戸義哉、浅見慶、太田彩恵子、田中海、佐渡愛香、秋山康紀、阿部聡子、野村崇人、山口信次郎、シロイヌナズナにおけるカーラクトン酸メチルの同定、およびその枝分かれ抑制活性に関する研究、第 56 回日本植物生理学会(東京農業大学、東京、2015 年 3 月 16 日~18 日)

安井令、瀬戸義哉、笠原博幸、山口信次郎、ケミカルスクリーニングによる D14 を標的とする新規ストリゴラクトンアゴニストの探索、第 56 回日本植物生理学会(東京農業大学、東京、2015 年 3 月 16 日~18 日)

Yoshiya Seto, Rei Yasui, Hiroyuki Kasahara, Shinjiro Yamaguchi, Chemical screening of novel strigolactone agonists that target D14 protein, 1st international congress on strigolactones (2015 年 3 月 1 日~6 日, Wageningen, Netherland)

瀬戸義哉、ストリゴラクトンの生合成と動態、日本育種学会 125 回講演会、育種学と農学のこれからを考える 27(東北大学、仙台、2014 年 3 月 22 日)

Yoshiya Seto, Biochemical function of DWARF14, an α/β -fold hydrolase, in the strigolactone pathway. The 38th Naito Conference on Molecule-based biological systems (シャトラーゼガトーキングダム札幌、札幌 2014 年 10 月 7 日~10 日、)

瀬戸義哉、ストリゴラクトンの生合成と動態、日本農芸化学会北海道支部・東北支部「若手の会」(定山溪ビューホテル、札幌、2014 年 9 月 23 日~24 日)

[図書](計 2 件)

瀬戸義哉、山口信次郎、秋山康紀、ストリゴラクトンの生合成中間体カーラクトンの発見、バイオサイエンスとインダストリー、72 巻, pp. 315-316 (2014)

山田雄介、梅原三貴久、瀬戸義哉、ストリゴラクトンの多様な生理作用と生合成、植物の生長調節, 48 巻, pp. 148-153 (2013)

6. 研究組織

(1)研究代表者

瀬戸 義哉 (SETO, Yoshiya)

東北大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：40620282