

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450144

研究課題名(和文) ストリゴラクトンの新規生合成・代謝酵素遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of new biosynthetic and metabolic genes on strigolactones

研究代表者

梅原 三貴久 (Umehara, Mikihiisa)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：30469895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ストリゴラクトン(SL)は、カロテンから作られる。その反応には、カロテンイソメラーゼ、カロテノイド酸化開裂酵素CCD7およびCCD8、チトクロムP450のCYP711Aが関与する。多くの植物はリン酸欠乏あるいは窒素欠乏に応答してSLを根で過剰に産生する。本研究では、これらの栄養欠乏に加えて硫黄欠乏でSLが増加することを発見した。硫黄欠乏では、カロテンイソメラーゼをコードするD27遺伝子が強く発現したことでSLが増加した。

研究成果の概要(英文)：Strigolactones (SLs) are derived from beta-carotene. Beta-carotene isomerase, carotenoid cleavage dioxygenase (CCD) 7, CCD8, and cytochrome P450 are involved in SL biosynthesis. Plant roots can highly produce SLs in response to phosphorus and/or nitrogen deficiencies. In addition to the nutrient deficiencies, this study demonstrated that sulfur deficiency stimulated SL production in plant roots. The increased SL level is due to marked expression of D27 that encodes b-carotene isomerase.

研究分野：植物生理学

キーワード：ストリゴラクトン 枝分かれ 葉の老化 LC-MS/MS イネ

1. 研究開始当初の背景

(1) ストリゴラクトン (SL) の生合成経路

SL は、もともと寄生や共生のための根圏シグナル物質として植物の根滲出液から単離された (Cook et al. 1966; Akiyama et al. 2005)。その後、2008 年に我々とフランスの研究グループは SL が植物の枝分かれを抑制することを明らかにし、植物においても生理作用を示す生理活性物質であることを報告した (Gomez-Roldan et al. 2008, Umehara et al. 2008)。SL は、β カロテンから作られると考えられており、β カロテンイソメラーゼ (D27)、カロテノイド酸化開裂酵素 (carotenoid cleavage dioxygenase) CCD7 (D17/MAX3)、CCD8 (D10/MAX4) の作用で中間体 carlactone が作られる (図 1)。その後、CCD の下流でシトクロム P450 のひとつ CYP711A 単独あるいは他の酸化酵素とともに作用して、SL が作られると考えられている (Alder et al. 2012; 図 1)。SL はこれまでに十数種類知られており、そのバリエーションを構成する基本骨格は、5-deoxystrigol (5DS) である。例えば、5DS が水酸化されることで strigol や orobanchol が作られ、orobanchol の 7 位の炭素が酸化することで 7-oxo-orobanchol が作られると予想される (Xie et al. 2013; 図 1)。これらの反応を行うためには、シトクロム P450 や 2 オキシグルタル酸依存的酸化酵素などの酸化反応を触媒する酵素がまだ複数必要であると考えられる。図 1 で挙げた SL 経路はほんの 1 例であり、実際にはまだ十数種類の SL が見つかっている。これまでの研究から、生合成経路の上流についてはかなり明らかにされているが、SL 生合成の下流のステップあるいは代謝経路についてはいまだ未解明であった。

(2) 栄養飢餓に応答して生産される SL

リン酸や窒素が欠乏すると、植物の内生 SL が増加する (Yoneyama et al. 2007a, 2007b, Umehara et al. 2008)。そこで、リン酸や窒素の濃度を変えたとき、SL 生合成に関与する CCD7、CCD8 と CYP711A、D27 の遺伝子のうち、どの遺伝子が応答するかリアルタイム PCR で調べた (Umehara et al. 2010; 未発表データ)。その結果、SL 生合成遺伝子は、いずれもリン酸あるいは窒素欠乏に応答して発現量が増加し、内生 SL の変動パターンと同じ挙動を示した。これらの結果から、SL 関連遺伝子の発現は、リン酸や窒素の欠乏に共通して応答する可能性が高いと考えた。そこで、リン酸欠乏に応答して発現量が増加する遺伝子、窒素欠乏に応答して発現量が増加する遺伝子をイネのマイクロアレイで網羅的に解析した結果、リン酸欠乏で発現が 2 倍以上増加する遺伝子が 816 個、窒素欠乏で発現が 2 倍以上増加する遺伝子が 1653 個、両方の欠乏に応答する遺伝子が 179 個存在していた (図 2)。両方の欠乏に応答する 179 の遺伝子群には、MAX1 ホモログを含むシトクロム

P450 が 5 個、2 オキシグルタル酸依存的酸化酵素が 1 個含まれていた。本研究では、酸化反応に関わる遺伝子の機能をもとに、SL 生合成あるいは代謝に関わる新規遺伝子を同定することを目的として研究を開始した。

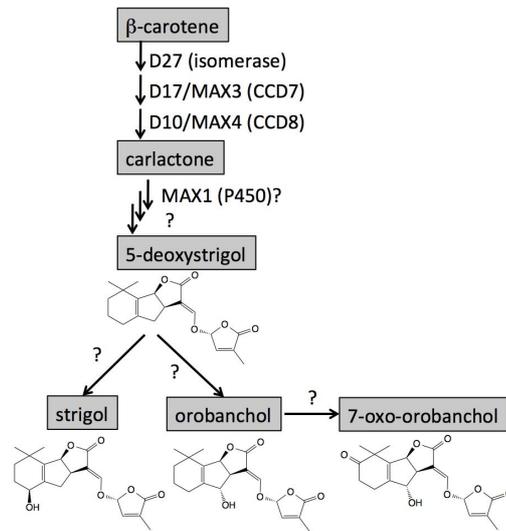


図 1 SL 生合成経路

2. 研究の目的

ストリゴラクトン (SL) は、β カロテンから作られる。その反応には、β カロテンイソメラーゼ、カロテノイド酸化開裂酵素 (carotenoid cleavage dioxygenase) CCD7 および CCD8、シトクロム P450 の CYP711A が関わる。天然型 SL は、これまでに十数種類単離されているが、それらがどのように合成されるのかは未だ不明である。SL の基本骨格となる分子は 4-deoxyorobanchol (4DO) で、strigol や orobanchol、7-oxo-orobancholなどは 5DS が酸化されて作られると予想される。これまでの研究で、植物はリン酸欠乏や窒素欠乏に応答してさまざまな SL を過剰に生産することが知られている。そこで、リン酸・窒素両方の欠乏に応答して発現が増加する遺伝子のうち、酸化に関わる機能未知な遺伝子群からシトクロム P450 を中心に SL 生合成・代謝遺伝子を探索したが、研究期間中に MAX1 の機能解明に関する論文 (Abe et al. 2014; Zhang et al. 2014) や新規 SL 生合成遺伝子 LBO に関する論文 (Brewer et al. 2016) が報告された。これにより、SL 生合成の基本経路がほぼ明らかになった。そこで、研究計画を途中で見直し、別の必須栄養元素が欠乏したとき、SL 生合成にどのような影響を及ぼすか、SL 生合成遺伝子の発現の挙動を調査した。

3. 研究の方法

(1) イネにおけるシトクロム P450 阻害剤 ウニコナゾール P 処理

SL は、寝寄生植物の発芽や枝分かれを制御することが知られている。これまでに、様々な化学構造をもつ SL が発見されており、イネでは 4-deoxyorobanchol (4DO) や orobanchol

などの SL が産生される。4DO は SL の基本骨格であり、4DO からどのようにしてさまざまな化学構造を持つ SL へと代謝されるのかは不明である。そこで、4DO の 4 位が水酸化された orobanchol に着目した。4DO から orobanchol への代謝にはシトクロム P450 (CYP711A3) が関与している。シトクロム P450 の阻害剤の中に、ジベレリン (GA) 生合成阻害剤ウニコナゾール P が知られている。本研究では、ウニコナゾール P をイネに処理することで、内生 SL 量がどのように変動するか、高速液体クロマトグラフィータンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて調べた。

### (2) 必須栄養元素を欠乏させて栽培したイネの SL 分析

植物は窒素欠乏やリン酸欠乏に反応して SL 産生量を増加させる。しかしながら、他の栄養元素に対する反応はほとんどよくわかっていない。そこで、イネを窒素、リン酸、カリウム、硫黄、マグネシウム、カルシウム、鉄を欠乏させた水耕液で栽培し、内生 SL の 4DO を LC-MS/MS で定量した。

### (3) S 欠乏条件下で栽培したイネの SL 関連遺伝子の発現解析

SL 関連遺伝子の発現解析を行うために、S 欠乏水耕液で 7 日間栽培し、7 日目に S 有り (+S) 無し (-S) の水耕液に移植した。移植前 (0 日目) 移植後 1 日目、2 日目の根を回収し、液体窒素で凍結後、RNA を抽出、逆転写反応後、qRT-PCR で SL 関連遺伝子発現量を調査した。SL 生合成遺伝子の *D27*、*D10*、*D17*、*OsMAX1* ホモログ、*Os900*、*Os1400*、*Os1500*、*Os2100*、*OS5600*、SL 情報伝達遺伝子の *D14*、*D3* について発現の変化を調査した。

### (4) S 欠乏条件下で栽培した野生型イネと *d* 変異体の表現型

S を含む水耕液 (+S) と S 欠乏させた水耕液 (-S) で野生型イネと *d* 変異体をそれぞれ栽培し、葉のクロロシスの程度を葉緑素計で測定し、分けつ数を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) SL 産生におけるシトクロム P450 阻害剤の影響

水耕液にウニコナゾール P を投与してイネを栽培した。水耕液ではウニコナゾール P  $1 \times 10^{-9}$  M、 $1 \times 10^{-8}$  M で 4DO と orobanchol の量が増加した。ウニコナゾール P  $1 \times 10^{-6}$  M で処理すると、orobanchol が減少し、4DO の蓄積が認められた。根でも同様に、ウニコナゾール P  $1 \times 10^{-9}$  M、 $1 \times 10^{-8}$  M で 4DO は増加したが、orobanchol は水耕液に比べて少なかった。GA3 とウニコナゾール P を同時に添加した水耕液では、SL は検出されなかった。GA3 を処理することで水耕液中の SL 量が減少したことから、GA が SL 量を調節している可能性がある。ウニコナゾール P  $1 \times 10^{-9}$  M、 $1 \times 10^{-8}$  M

で SL が増加したことは、GA 量が減少したことで SL 量が増加したと考えられる。高濃度で処理したウニコナゾール P ( $1 \times 10^{-6}$  M) が orobanchol 量を減少させ、4DO が蓄積したことから、ウニコナゾール P がシトクロム P450 (CYP711A3) を阻害したと考えられる。

### (2) 硫黄欠乏条件下では、*D27* の高発現によって SL 産生量が増加する

硫黄欠乏条件下においても 4DO の産生量が増加することを初めて発見した。植物にとって硫黄は必須栄養元素の 1 つで、硫黄源として硫酸イオン (S) を吸収する。S 欠乏条件下で栽培した植物は枝分かれが減少し、葉が黄化する。そこで、S 欠乏条件下で SL 産生量が増加する原因を明らかにするために、S 欠乏条件下で栽培したイネの 4DO 産生量および SL 関連遺伝子の発現量を調べた。

イネを水耕液の S 濃度を変えて 7 日間栽培し、水耕液および根の 4DO を定量した結果、S 濃度が増加するにしたがって 4DO 量は減少した。SL 関連遺伝子の発現解析を行うために、S 欠乏水耕液で 7 日間栽培し、7 日目に S 有り (+S) 無し (-S) の水耕液に移植した。根を回収し、液体窒素で凍結後、RNA を抽出、逆転写反応後、qRT-PCR で SL 関連遺伝子発現量を調査した。その結果、SL 生合成遺伝子 *D27* の発現が -S で著しく増加し、+S で減少した (図 2)。他の SL 生合成遺伝子の発現は +S と -S で変化が認められなかった (図 2)。一方、SL 情報伝達遺伝子 *D3* と *D14* の発現は逆に -S で減少し、+S で増加した (図 2)。

さらに、リン酸欠乏 (-P) 窒素欠乏 (-N) と -S を組み合わせる複数の栄養欠乏条件下で栽培したときの 4DO 産生量を調べた。-N、-P、-S、-NP、-NS、-PS、-NPS でそれぞれ 7 日間栽培し、8 日目に 4DO を定量した。その結果、-P で著しく 4DO が増加したが、他の栄養欠乏が組み合わせると、その 4DO の増加

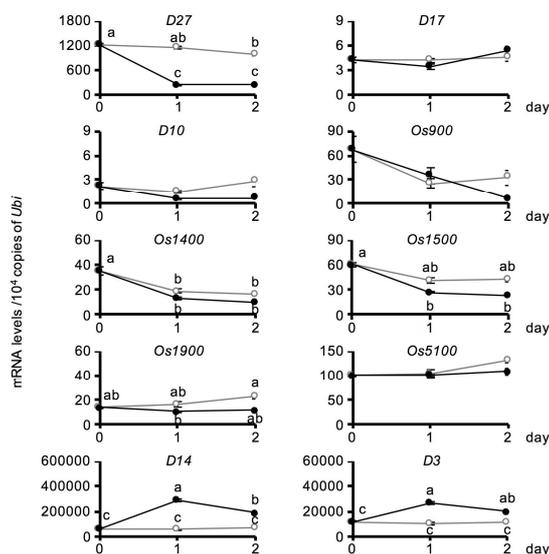


図 2 SL 関連遺伝子の発現解析

黒の実線は +S 条件を灰色の実線は -S 条件をそれぞれ示す。

は認められなくなった。4DO の産生に関して、複数の栄養欠乏による相加・相乗効果は認められなかった。現在、-P で著しく増加した SL が、他の栄養欠乏と組み合わせると SL 関連遺伝子の発現がどのように変化するかを調査している。

### (3) S 欠乏条件下で栽培した *d27* の表現型

S 欠乏条件下で、植物は枝分かれを抑制し、葉でクロロシスが観察される。また、SL はイネの分げつを抑制し、葉の老化を促進する作用がある。そこで、S 欠乏条件下で観察される枝分かれ抑制およびクロロシスが、増加した SL によるものかどうかを調査した。その結果、野生型を S 欠乏条件下で栽培すると、分げつの伸長が著しく阻害され、葉の黄化が観察された。一方、SL 変異体の *d10* や *d14* を S 欠乏条件下で栽培すると、同様に分げつの伸長が著しく阻害され、葉の黄化が観察されたが、その阻害や黄化の程度は野生型より少なかった。したがって、S 欠乏条件下で増加した SL が、部分的にイネの分げつ伸長を抑制し、葉の老化を促進させていると考えられる。ただし、*d10* や *d14* 変異体においても S 欠乏条件下で栽培すると分げつの抑制やクロロシスが認められたことから、S 欠乏条件下で増加した SL の影響は限定的なものであると考えられる。

先の実験で、S 欠乏で内生 SL 量が増加したのは、*D27* 遺伝子が高発現したためであることが明らかとなった。そこで、*d27* 変異体を S 欠乏条件下で栽培するとどのような症状を示すか調査した。その結果、S 欠乏条件下で栽培した *d27* の分げつの数は、他の *d* 変異体より少なくなり、クロロフィル含量は野生型および他の *d* 変異体よりも少なかった。これらの結果は、*D27* 遺伝子が S 欠乏応答遺伝子であり、植物が S 欠乏環境に適応するために必要であること示唆している。*D27* は SL 生合成の最初のステップを触媒するカロテノイドイソメラーゼをコードしているが、その産物が SL 生合成だけでなく、SL 以外の生理活性物質を産生する上でも重要な役割を持つ可能性を示唆している。

### 引用文献

- 1) Abe et al. (2014) *PNAS* 111, 18084-18089
- 2) Akiyama et al. (2005) *Nature* 435, 824-827
- 3) Alder et al. (2012) *Science* 335, 1348-1351
- 4) Brewer et al. (2016) *PNAS* 113, 6301-6306
- 5) Cook et al. (1966) *Science* 154, 1189-1190
- 6) Gomez-Roldan et al. (2008) *Nature* 455, 189-194
- 7) Nelson (2009) *Human Genomics* 4, 59-65
- 8) Umehara et al. (2008) *Nature* 455, 195-200
- 9) Umehara et al. (2010) *Plant Cell Physiol.* 51, 1118-1126
- 10) Yoneyama et al. (2007a) *Planta* 225, 1031-1038
- 11) Yoneyama et al. (2007b) *Planta* 225, 227:

125-132

- 12) Xie et al. (2010) *Ann. Rev. Phytopathol.* 48, 93-117
- 13) Zhang et al. (2014) *Nature Chem. Biol.* 10, 1028-1033

### 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 4 件)

Shinsaku Ito, Daichi Yamagami, Mikihisa Umehara, Atsushi Hanada, Satoko Yoshida, Yasuyuki Sasaki, Shunsuke Yajima, Junko Kyojuka, Miyako Ueguchi-Tanaka, Makoto Matsuoka, Ken Shirasu, Shinjiro Yamaguchi, Tadao Asami (2017) Regulation of strigolactone biosynthesis by gibberellin signaling. *Plant Physiol.* In press (査読有) DOI: <https://dx.doi.org/10.1104/pp.17.00301>

Mikihisa Umehara, Mengmeng Cao, Kohki Akiyama, Tomoki Akatsu, Yoshiya Seto, Atsushi Hanada, Weiqiang Li, Noriko Takeda-Kamiya, Yu Morimoto, Shinjiro Yamaguchi (2015) Structural requirements of strigolactones for shoot branching inhibition in rice and Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 56, 1059-1072 (査読有) DOI: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv028>

Yusuke Yamada, Mikihisa Umehara (2015) Possible roles of strigolactones during leaf senescence. *Plants* 4: 664-677 (査読有) DOI: 10.3390/plants4030664

Yusuke Yamada, Soya Furusawa, Seiji Nagasaka, Koichiro Shimomura, Shinjiro Yamaguchi, Mikihisa Umehara (2014) Strigolactone signaling regulates rice leaf senescence in response to a phosphate deficiency. *Planta* 240, 399-408 (査読有) DOI: 10.1007/s00425-014-2096-0

#### [学会発表](計 4 件)

進藤真登、中村華子、山田雄介、下村講一郎、山口信次郎、梅原三貴久．硫酸欠乏条件下で栽培したイネの SL 産生量．植物化学調節学会第 51 回大会(高知 2016.10.28-30、高知大学(高知県南国市))

進藤真登、中村華子、山田雄介、下村講一郎、梅原三貴久．硫酸欠乏条件下において *D27* の高発現に伴ってストリゴラクトンが増加する．日本植物細胞分子生物学会 第 34 回大会(2016.9. 1-3、信州大学(長野県上田市))

梅原三貴久．ストリゴラクトンを介した植物の栄養応答．第 2 回 植物の栄養

研究会 (2016.9.2-3、名古屋大学 (愛知県名古屋市))

Masato Shindo, Hanako Nakamura, Yusuke Yamada, Koichiro Shimomura, Mikihisa Umehara Sulfate deficiency stimulates strigolactone production in rice. IPGSA conference 2016. (2016.6.21-6.25, Toronto (カナダ))

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

東洋大学生命科学部応用生物科学科 植物細胞工学研究室

[http://www2.toyo.ac.jp/~umehara/plant\\_biotechnology/Welcome.html](http://www2.toyo.ac.jp/~umehara/plant_biotechnology/Welcome.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梅原 三貴久 (UMEHARA, Mikihisa)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：30469895

### (2) 連携研究者

水谷 正治 (MIZUTANI, Masaharu)

神戸大学・農学研究科・准教授

研究者番号：60303898