

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：12201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780116

研究課題名（和文）ブラシノステロイド生合成酵素の種実生産における役割と系統発生

研究課題名（英文）The role of brassinosteroid biosynthesis enzymes in reproductive growth and their phylogeny

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

研究成果の概要（和文）：ブラシノステロイド（BR）は植物の伸長生長に必須のステロイドホルモンである。BRの投与はイネなどの穀物に対して顕著な増収効果があることから、BRは生殖器官の発達に重要な役割を果たしていると考えられているが、その分子メカニズムの解明は進んでいない。本研究では、研究代表者が明らかにしたBR合成酵素を解析することにより、重要作物の果実生産におけるBRの役割の解明を試みた。さらに、BR合成酵素が様々な植物種においてどのように進化してきたのかについても追究した。

研究成果の概要（英文）：Brassinosteroid (BR) is an essential steroid hormone for plant growth. Since exogenous applications of BR show an increased yield in crops, BR is thought to play an important role in reproductive organs of plants. However, little is known about its molecular mechanism in the reproductive growth. In this study, I tried to clarify the role of BR in fruit productions and also investigated how BR biosynthesis enzymes have been evolved in plants.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：植物ホルモン・ブラシノステロイド・生殖生長・進化

## 1. 研究開始当初の背景

ブラシノステロイド（BR）は植物の伸長生長に必須のステロイドホルモンである。その中でも、カスタステロンとブラシノライドは高い活性をもつ活性型のBRである。BRの農業への応用は1980年代に盛んに研究され、コムギやイネなどの穀物に対する顕著な増

収効果があることが明らかにされている。また、カスタステロンやブラシノライドは花粉や種子などの生殖器官に多く含まれることも知られている。このように、カスタステロンやブラシノライドが生殖器官の発達に重要な役割を果たしていることは明らかであるが、その仕組みについては解明されていない。

い。

1999年、研究代表者らは、トマトの極矮性変異体 *dwarf* の原因遺伝子 *Dwarf* を単離した。この遺伝子にコードされていたのはシトクロム P450 酵素の CYP85A1 であり、この酵素は6-デオキシカステステロンから活性型 BR であるカステステロンへの酸化変換を触媒するカステステロン合成酵素であることを明らかにした(図1)。しかしながら、*dwarf* 変異体は矮性ながらその果実は野生型と同じ大きさになる。そこで、内生 BR を調べたところ、*dwarf* 変異体の果実では多量のブラシノライドが合成されていることを発見した。2005年、トマト *dwarf* 変異体の果実では、シトクロム P450 酵素 CYP85A3 をコードする遺伝子が発現しており、この酵素が6-デオキシカステステロン→カステステロン→ブラシノライドの連続反応を行うことを明らかにした(図1)。本酵素は永く不明であったブラシノライド合成酵素として初めて発見されたものである。

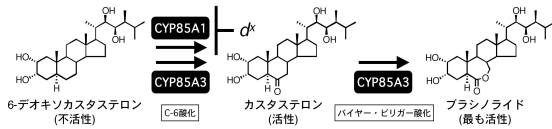


図1 BR 生合成における活性化段階と酵素

## 2. 研究の目的

本研究では、ブラシノライド合成酵素の種実生産における利用を追究した。そのため、トマトにブラシノライド合成酵素遺伝子 *CYP85A3* を過剰発現させて、ブラシノライド生産の高進により果実形成に影響が起きるかについて追究した。また、後述のようにイネのゲノムにはブラシノライド合成酵素遺伝子は存在しない。不思議なことに、イネはブラシノライドの外部投与には強く反応する。ブラシノライドを生合成しないイネがブラシノライドを強く認識できることは合理的でない。このことから、作業仮説として、野生イネではブラシノライドを合成していたが、栽培・選抜過程で、例えば葉の立つ系統の選抜などによって(ブラシノライドは顕著に葉身を屈曲させる作用がある)、ブラシノライド合成酵素遺伝子が脱落した可能性が考えられた。内在性のブラシノライドにイネに対する増収効果があるか、また栄養生長期におけるブラシノライドの影響も調べるために、イネのブラシノライド過剰生産体の作出を行うことにした。

カステステロンとブラシノライドが両方とも活性型であることは、研究代表者らにより分子遺伝学的実験から証明されている。し

たがって、カステステロン合成酵素とブラシノライド合成酵素などの CYP85A 酵素は、BR 活性化酵素ということになる。これら CYP85A 酵素の分子系統樹を図2に示す。これより、トマトとシロイヌナズナにおいては、カステステロン合成酵素とブラシノライド合成酵素は種の分化後に分岐してきたことが明らかである。一方、イネにはカステステロン合成酵素しか存在しない。そこで、本研究では BR と植物進化との関係も追究するために、他の植物のカステステロン合成酵素あるいはブラシノライド合成酵素の酵素機能を解析するとともに、内生 BR を分析した。

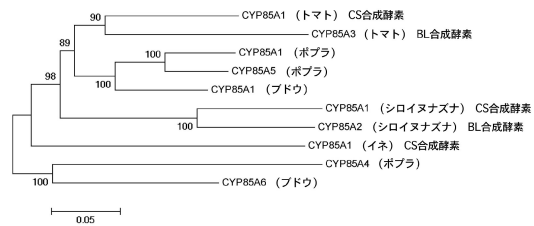


図2 BR 活性化酵素の分子系統樹

CS: カステステロン、BL: ブラシノライド

## 3. 研究の方法

カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターによるトマトのブラシノライド合成酵素 *CYP85A3* 遺伝子の過剰発現ベクターを作成し、トマトの正常種(品種: Ailsa Craig) および *dwarf* 変異体に導入し、果実生長に影響が現れるか詳細な観察を行った。また、35S プロモーターによるトマトのブラシノライド合成酵素 *CYP85A3* 遺伝子のイネ用過剰発現ベクターを作成し、イネ(品種: 日本晴)に導入し、実際にブラシノライドが増えるか内生 BR 分析を進めた。それにより、ブラシノライド含量が顕著に増加している個体を選抜したのち、特に種子形成に影響があるかどうか詳細な観察を行った。

他のイネ科植物と同様に、現在までにトウモロコシから検出された活性型 BR はカステステロンのみであり、ブラシノライドが検出された報告はない。一方、トウモロコシ子実は BR の外部投与によりその収量が増加することが知られている。そこで、トウモロコシの *CYP85A* 遺伝子の酵素機能を調べ、イネ科には、カステステロン合成酵素しか存在しないのか、それともブラシノライド合成酵素を持つものもあるのか追求した。さらに、進化的に基部に位置するシダやコケの内生 BR 分析を行い、BR と植物の進化の関係も調べた。

#### 4. 研究成果

ブラシノライド合成酵素遺伝子の過剰発現により、トマトが変異体において矮性が回復した形質転換体が作出された。また、トマト正常種の形質転換体も得られ、それらは非形質転換体と比べて生長が早く、葉が下に垂れる表現型を示した(図3)。一方、形質転換体の果実の生長を観察したが、果実が肥大する等の表現型は認められなかった。さらに、本研究で単離したブラシノライド合成酵素遺伝子のゲノム配列をもとに、そのトマトのCYP85A3変異体をTILLING法により単離したが、果実に異常は認められなかった。しかしながら、トマトの花や果実にブラシノライドを外部投与したところ、果実の催色期までの期間に影響は与えなかったが、その大きさと種子数を増加させる傾向があった。CYP85A3遺伝子の発現部位をRT-PCR法により調べたところ、種子において強い発現が見られ、果肉では発現していないことがわかった。さらに、単為結果によりついた果実ではCYP85A3遺伝子は全く発現していなかった。単為結果は受粉作業の軽減や果実の種無し化などに関連する農業上重要な生理現象であるが、その仕組みは明らかにされていない。本研究はその解明の手がかりとなる可能性がある。



図3 トマト形質転換体  
(左) CYP85A3 過剰発現体、(中)  $\delta$  変異体、  
(右) 正常種

BRによる増収効果は不良環境下における耐ストレス作用にも起因していることも考えられているが、その分子メカニズムも解明されていない。そこで、得られたブラシノライド過剰生産体トマトは非形質転換体に比べて茎葉の生長は早いことから、栄養生長期

におけるブラシノライド過剰生産の効果を調べることにした。BRは様々な生育環境におけるストレスに対して耐性を付与することが知られているが、本研究では塩耐性がブラシノライド過剰生産体で上がっているか調べた。その結果、予想に反してブラシノライド過剰生産体は非形質転換体と比較して塩に弱い傾向を示すことがわかった。これは、ブラシノライドに引き起こされた過剰な細胞伸長が原因で、浸透圧ストレスに対して弱くなったためかもしれない。そこで、ブラシノライド過剰生産トマトに起きた塩障害がナトリウム吸収量に関係しているのか調べるため、その吸収量を原子吸光法により測定した。その結果、ブラシノライド過剰生産トマトのナトリウム吸収量は正常種と同等であった。また、銅や亜鉛過剰土壌でも生育させ、それらの吸収量も調べたが正常種との違いは認められなかった。これまでに、BRの外部投与は重金属吸収を低減させるという報告があるが、内生的にBR含量を増加させた本研究のトマトではそれを支持する結果は得られなかった。

一方、トマトのブラシノライド合成酵素CYP85A3遺伝子を導入したイネにおいて、葉身が顕著に屈曲した形質転換体を得られた。それらについて内生BR分析を行ったところ、実際にブラシノライドを過剰に生産していることが確認された。これまで、ブラシノライドを生産しているイネは発見されていなかったが、当該形質転換体の種子形成に影響は見られなかった。また、イネに関連した研究として、イネのカスタステロン合成酵素CYP85A1は青色光により誘導され、それにより内生カスタステロン含量が増加し、生長することを明らかにした。さらに、イネからBR依存的に葉身屈曲を制御する新しい遺伝子を世界に先駆けて同定することに成功した。

一方、ブラシノライド合成酵素に相同なトウモロコシのCYP85A1酵素を酵母において発現させ、その機能を調べたが、イネと同様にトウモロコシの酵素にはブラシノライド合成能はないことがわかった。このことから、理由は不明だが、イネ科植物は進化の段階でブラシノライドを合成することをやめてしまったと思われる。他の系統発生的な研究に関しては、陸上植物の進化的基部に位置しているコケやシダが種子植物と同様なBRを生産していることを初めて明らかにした。コケやシダにおいてはBR合成酵素遺伝子の保存性が低く、CYP85A遺伝子は存在しない。その様な植物がなぜBRを合成できるか、植物の進化を研究するうえで興味深い知見を提供した。

ブラシノライドは植物体中においてナノモルレベルで存在するホルモンであるため、植物から抽出して応用利用することは現実

的ではない。さらに、ブラシノライドを生産する菌類も発見されていないために、応用利用のブラシノライドは化学合成に頼らざるをえないのが現状である。代表研究者が発見した酵素は、BR 生合成において、活性型 BR を生成する唯一の重要な酵素である（特許取得）。したがって、作物生産におけるブラシノライドおよびその生合成遺伝子の役割の解明を目的とした研究は他に見られないものである。本研究は、遺伝子組換え技術を持ちいて本酵素を大量に生産させ、植物体中の活性 BR 量を大幅に改変できることを証明した。研究対象としたトマトは、ジャガイモ、ピーマンやナスなどと同じ農業上重要なナス科植物であり、我が国の重要作物であるイネを含め、本研究は農作物の生産性向上にむけた応用研究に基盤となる知見を提供した。

#### 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件)

- ① Tanaka A., Nakagawa H., Tomita C., Shimatani Z., Ohtake M., Nomura T., Jiang C.-J., Dubouzet J. G., Kikuchi S., Sekimoto H., Yokota T., Asami T., Kamakura T., Mori M. *BRASSINOSTEROID UPREGULATED 1*, Encoding a Helix-Loop-Helix Protein, is a Novel Gene Involved in Brassinosteroid Signaling and Controls Bending of the Lamina Joint in Rice. *Plant Physiol.*, 151: 669-680 (2009) 査読あり

〔学会発表〕(計8件)

- ① 朝比奈雅志ら、イネのブラシノステロイド生合成遺伝子の発現に対する光の影響、植物化学調節学会第46回大会、2011年11月1-2日、宇都宮大学
- ② Atsunori Tanaka et al., *BR Upregulated 1*, encoding a novel HLH protein, is involved in BR signal transduction and controls bending of the lamina joint in rice, 20th International Conference on Plant Growth Substances, 2010年6月28-7月2日、スペイン・タラゴナ
- ③ Masashi Asahina et al., Effects of light quality on the expression of brassinosteroid biosynthesis gene in rice seedling, 20th International Conference on Plant Growth Substances, 2010年6月28-7月2日、スペイン・タラゴナ
- ④ Takahito Nomura et al., Endogenous

steroid hormones in *Physcomitrella patens*, 21st International Conference on Arabidopsis Research, 2010年6月6-10日、パシフィコ横浜

- ⑤ 田中惇訓ら、*bHLH*型転写因子をコードするイネの2種のブラシノステロイド誘導性遺伝子の機能解析、第51回日本植物生理学会、2010年3月18-21日、熊本大学
- ⑥ 朝比奈雅志ら、イネのブラシノステロイド生合成遺伝子の発現に対する光の影響、第51回日本植物生理学会、2010年3月18-21日、熊本大学
- ⑦ 野村崇人ら、ヒメツリガネゴケが生産するステロイドホルモン、植物化学調節学会第44回大会、2009年10月29-30日、東北大学
- ⑧ 横田孝雄ら、シダ植物に含まれるブラシノステロイドとその特徴、植物化学調節学会第44回大会、2009年10月29-30日、東北大学

〔図書〕(計1件)

- ① 野村崇人、横田孝雄、講談社、新しい植物ホルモンの科学 第2版、pp.114-135 (2010)

〔産業財産権〕

○取得状況(計1件)

名称：ブラシノライド合成酵素

発明者：野村崇人 他5名

権利者：理化学研究所

種類：特許

番号：特許第4621468号

取得年月日：2010年11月5日

国内外の別：国内

#### 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

(2) 研究協力者

Gerard Bishop

イギリス・ロンドン大学・准教授

森 昌樹 (MORI MASAKI)

農業生物資源研究所・主任研究員

研究者番号：50192779