

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657024

研究課題名(和文) ストリゴラクトンに類似の新規ホルモン様物質に関する研究

研究課題名(英文) Studies on a strigolactone-related new hormone-like compound

研究代表者

山口 信次郎 (Yamaguchi, Shinjiro)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：10332298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円、(間接経費) 900,000 円

研究成果の概要(和文)：カリキンは植物が燃焼した際の煙に含まれる物質で、山火事後に休眠覚醒する植物の発芽誘導物質として発見された。カリキンは、シロイヌナズナをはじめとする様々な植物の種子発芽を促進する。これまでの研究から、カリキンは、 α -ヒドロラーゼファミリータンパク質であるD14LIKEを介して働くこと、植物はカリキンに類似の新規ホルモン様物質をもつことが示唆されている。本研究では、D14LIKE経路の詳しい解析を行うため、d14like変異体に表現型が類似した新たな変異体を複数単離した。

研究成果の概要(英文)：Karrikins are butenolide-containing compounds that are produced by burning vegetation. They were discovered by their ability to induce germination of plant seeds of which dormancy is broken after a forest fire. Karrikins induce germination of various plants including Arabidopsis. Studies have suggested that karrikins act through D14LIKE, an α , β -hydrolase family protein, and that plants have a karrikin-related new plant hormone-like compound. In this study, we have isolated new mutants that resemble the d14like mutant in appearance in order to study the D14LIKE pathway in detail.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：植物ホルモン 成長生理

1. 研究開始当初の背景

シロイヌナズナの *max1*~*max4* 変異体は、いずれも顕著な枝分かれ過剰性を示し、MAX1~MAX4 はストリゴラクトンが関与する同一の枝分かれ抑制経路で機能すると考えられる。しかしながら、これらのうち F-box タンパク質に欠陥をもつ *max2* は、他の *max* 変異体には観察されない胚軸の徒長、発芽能の低下といった表現型も観察される。同様に、MAX2 オルソログであるイネ *D3* が欠損した *d3* 変異体の暗所芽生えでは、他のストリゴラクトン欠損 *d* 変異体には見られないメソコチルの異常な伸長が認められる。一方、*1*-ヒドロラーゼファミリーに属するイネ *D14* の欠損変異体は、*d3* と同じようにストリゴラクトン非感受性であるが、ストリゴラクトン生合成変異体 (*d10*, *d17*) と同等の表現型を示す。筆者らは、シロイヌナズナ *d14* 変異体を TILLING により取得し、*max* と同等の枝分かれ過剰性を示すストリゴラクトン非感受性変異体であること、*max2* とは異なり胚軸伸長や種子発芽は正常であることを明らかにした。また *d14* のロゼット葉の形態は *max2* ではなく *max1, 3, 4* に酷似している。

以上のように、F-box タンパク質変異体である *max2/d3* の枝分かれ過剰性以外の表現型は、他の *max/d* 変異体と異なっている。筆者は、*D14* と高い相同性を示す *1*-ヒドロラーゼファミリーのタンパク質である「D14LIKE」が、*max2* で特徴的にみられる表現型に関与する可能性を見出した。イネとシロイヌナズナは、ともに *D14* と *D14LIKE* サブファミリーに属する遺伝子をもつ。シロイヌナズナ *d14like* 変異体の枝分かれは正常であるが、*max2* と同様に胚軸が徒長し、発芽能が大きく低下している。*d14 d14like* 二重変異体を作成したところ、ロゼット葉の形態を含めて *max2* と酷似した表現型を示すことが明らかになった。以上の結果から、*D14* と *D14LIKE* はいずれも MAX2 経路で働き、それぞれ異なる表現型の制御に関わると推定される。*D14* と *D14LIKE* はいずれも *1*-ヒドロラーゼファミリーのタンパク質であり (ジベレリン受容体 *GID1* も同じファミリーに属する) 加水分解酵素あるいは結合タンパク質として何らかの低分子化合物と直接相互作用する可能性が高い。

カリキンは、ストリゴラクトンと同様にメチルテトラヒドロ骨格をもつ化合物で、植物の燃焼 (自然界においては山火事) によって化学的に生成する。その生成メカニズムは解明されていないが、植物自身が生合成するかどうかは不明である。最近の研究から、山火事後に休眠覚醒する種子以外にも、シロイヌナズナを含む多くの植物がカリキンに反応できることが明らかになりつつある。したがって、植物はそもそもカリキン類似化合物を成長調節物質としてもっており、山火事後に煙 (カリキン) に反応して覚醒する休眠種子は、外界のカリキンに対する感受性や依存性

を進化させた結果なのではないか、という仮説も提唱されている。

筆者らは、シロイヌナズナおよびイネのストリゴラクトン関連変異体を解析する過程で、ストリゴラクトン非感受性変異体である *max2/d3* (F-box タンパク質が欠損している) がストリゴラクトン以外のシグナル伝達にも関わることを見出した。特に、ストリゴラクトン経路で働く *D14* とその類似遺伝子である *D14LIKE* の逆遺伝学的解析から、*max2* 変異体の枝分かれ過剰性には *D14* が関与するのに対して、*max2* の発芽能の低下や胚軸の徒長には *D14LIKE* が関与することを明らかにしている。さらに、*D14* 遺伝子は *d14like* 変異体の表現型を相補できず、同様に *D14LIKE* を導入しても *d14* の枝分かれ過剰性は相補されないことから、両者は異なる機能をもつと考えられる。

しかしながら、我々は以前の研究において、シロイヌナズナの発芽・初期成長過程において高濃度のストリゴラクトン処理によって *D14LIKE* 経路が活性化される (発芽が促進され、胚軸が短くなる) ことも見出している。また、最近 *max2* がカリキンに反応できない変異体として単離された。以上の結果から、*D14LIKE* 経路で働く低分子シグナルはストリゴラクトンと似て非なる低分子、あるいはカリキン類似分子である可能性が示唆されている。ただし、ストリゴラクトンと似て非なる低分子の一つであるカリキンは、イネ、根寄生植物種子 (ストライガ)、アーバスキュラー菌根菌に高濃度で与えた場合にもストリゴラクトンとしての活性はゼロであった。

2. 研究の目的

枝分かれ過剰変異体の解析は、その原因となるホルモン (= ストリゴラクトン) の発現に繋がったが、これが達成された 1 つの理由は、ホルモン欠損 (生合成) 変異体と非感受性 (受容・情報伝達) 変異体の双方が単離・解析されていたことである。*D14LIKE* 経路で働く仮想ホルモンの本体を明らかにするには、その欠損変異体 (生合成変異体) を単離することが重要である。

本研究では、*D14LIKE* 経路で働く新しい低分子シグナルに関する知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) カリキンが *D14LIKE* 経路で働く可能性を追究するため、シロイヌナズナにおけるカリキンの種子発芽、胚軸伸長に対する作用が、*d14like* 変異体において低減されているかどうか (*d14like* 変異体がカリキン低感受性であるかどうか) を検討した。この際、ストリゴラクトン経路との関係も考慮し、野生型と *d14like* 変異体の比較のみならず、*d14* と *d14 d14like* 二重変異体との比較も行った。

(2) カリキン関連物質がシロイヌナズナに存在するかどうかを調べた。シロイヌナズナ

の根および地上部をアセトンで抽出し、逆相カートリッジカラム、シリカゲルカートリッジカラムで精製した。精製画分を液体クロマトグラフ-質量分析装置 (LC-ESI-MS/MS) で分析した。

(3) *d14like* 変異体と表現型が類似した変異体の収集を行った。まず、胚軸の徒長を指標として変異源処理したシロイヌナズナ M_2 集団から候補となる変異体を選抜し、ロゼット葉の形態 (葉柄の徒長など) で更なる選抜を行った。

(4) 得られた変異体の遺伝学的解析を行った。選抜した変異体を野生型に戻し交配し、遺伝様式を解析した。また、*d14like* のアリルであるかどうかを検討するため、*d14like* 変異体との交配を行った。

4. 研究成果

(1) カリキンが D14LIKE 経路で機能する可能性を検討するため、*d14like* 変異体がカリキン低感受性であるかどうかを調べた。その結果、カリキンの投与により野生型の胚軸は短くなったのに対し、*d14like* 変異体は投与したカリキンに全く反応しなかった。この結果は、シロイヌナズナのカリキン応答に D14LIKE が関与することを示している。

(2) カリキンがシロイヌナズナの内生物質として存在するかどうかを調べるため、まずカリキンの分析法を確立した。シロイヌナズナの抽出液中に一定量のカリキンを添加し、カリキンが回収されるような精製法を確立した。最終的なカリキンの同定は、LC-ESI-MS/MS により行った。次に、カリキンを添加せずに、シロイヌナズナ芽生えの抽出液を精製後、LC-MS/MS 分析を行ったところ、カリキンはまったく検出されなかった。以上のように、カリキンが植物の内生物質であることを支持する結果は得られなかった。

(3) D14LIKE 経路で働くホルモン様物質が欠損した変異体を取得するため、*d14like* と表現型が類似した突然変異体を収集した。胚軸および葉柄の徒長を指標に約 120,000 の M_2 種子をスクリーニングした結果、*d14like* と表現型が酷似した 10 個の新たな変異体を得た。図 1 に得られた変異体の例を示す。相補試験の結果、これらのうち 5 つは、*d14like* 変異体のアリルであることが示された。

(4) 相補試験の結果、新たな変異体 (*d14like* のアリルでないもの) であることが明らかになったラインを用いて、カリキンに対する応答性を調べた。図 2 に示すように、これまでに得られた少なくとも 3 つの変異体は、カリキンに反応して胚軸が短くなることが示された。同じ条件で、*d14like* 変異体はカリキンに対して非感受性であった。以上の結果から、新たに得られた 3 つの変異体は、D14LIKE 経路で働くホルモン様物質の欠損変異体の有力な候補であると考えられる。

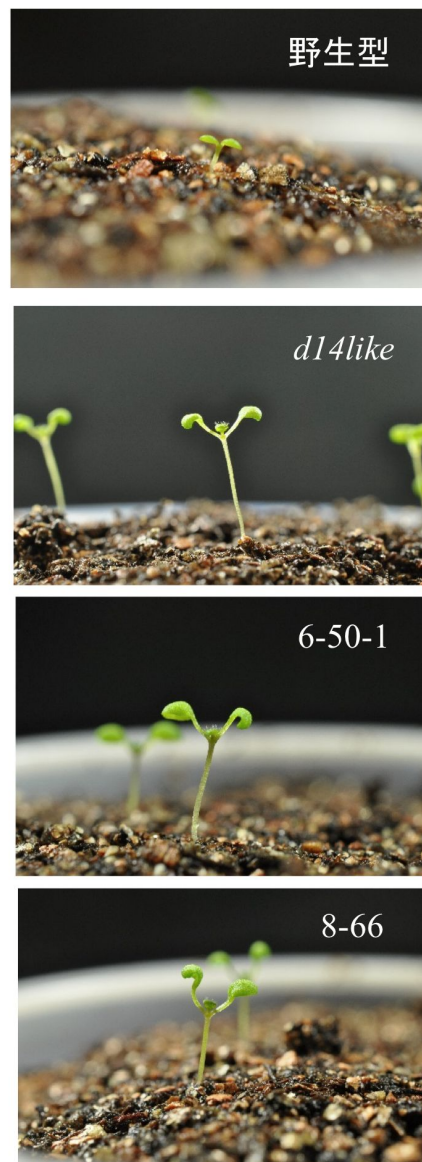


図1 得られた変異体の例

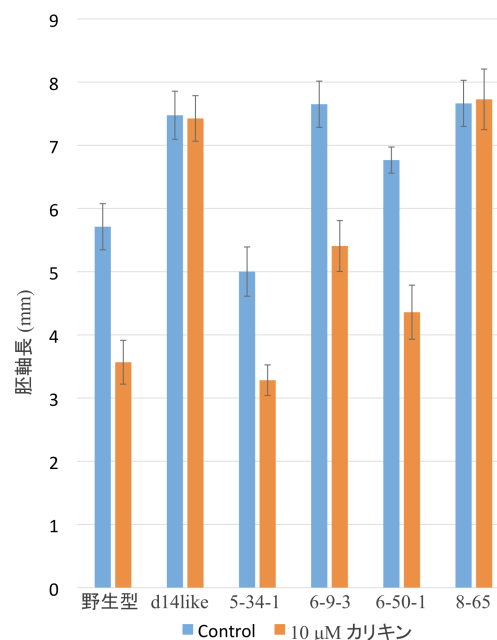


図2 カリキンによる胚軸伸長抑制活性

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)

Seto Y, Kameoka H, Yamaguchi S, Kyojuka J. Recent advances in strigolactone research: chemical and biological aspects. Plant Cell Physiol., 査読有, 53 巻 1843-1853, 2012 年
DOI: 10.1093/pcp/pcs142

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 信次郎 (YAMAGUCHI, SHINJIRO)
東北大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号：10332298

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし