

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：32663

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780061

研究課題名(和文)窒素欠乏で増加するストリゴラクトン生産の制御機構

研究課題名(英文)Regulatory mechanism of strigolactone production under nitrogen deficiency

研究代表者

梅原 三貴久(Umehara, Mikihisa)

東洋大学・生命科学部・准教授

研究者番号：30469895

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)：イネは窒素欠乏にตอบสนองしてSLを増加させることを確認した。また、qRT-PCRによるSL関連遺伝子の発現解析から、D10、D17、D27、OsMAX1など多くの生合成遺伝子の発現量が窒素欠乏条件で高かったのに対し、D3やD14など情報伝達遺伝子では窒素欠乏による発現量の増加は認められなかった。イネは窒素欠乏条件に対して、自身のSLへの感度を上げるのではなく、生産量を増やすことでตอบสนองしていると考えられる。さらに、SL生合成遺伝子と連動した変動パターンを示す遺伝子を絞り込み、SLの新規生合成遺伝子や代謝関連遺伝子を見つけるためにマイクロアレイ解析を行った。

研究成果の概要(英文)：SL analysis by LC-MS/MS showed that SL levels elevated in response to nitrogen deficiency in rice. SL-related gene expression analysis by qRT-PCR demonstrated that SL biosynthetic genes (D10, D17, D27, and OsMAX1s) highly expressed under nitrogen deficiency, but not SL signal transduction genes (D3 and D14). We propose that rice does not change the sensitivity of SL perception but increases SL production in response to nitrogen deficiency. In addition, we performed microarray to find new SL biosynthetic and metabolism genes, and screened genes that showed the expression pattern similar to SL-biosynthetic genes.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：ストリゴラクトン 窒素欠乏 イネ LC-MS/MS 生合成 マイクロアレイ

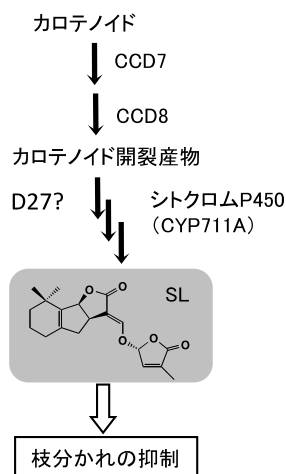
1. 研究開始当初の背景

(1) ストリゴラクトンの生理作用

ストリゴラクトン (SL) は、もともと根寄生植物の種子発芽刺激物質として宿主植物の根滲出液から単離された。その後、アーバスキュラー菌根菌 (AM 菌) の菌糸分岐誘導物質として再発見された。しばらく SL は根圏情報物質として認識されていたが、2008 年、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、宿主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。最近では、植物の種子発芽や胚軸伸長にも関わることが報告され、SL は新しいタイプの植物ホルモンとして認識されつつある。現在までに、多くの植物が SL を生産することが確認され、報告された SL の種類も十種類を超える。SL 生産の制御は、「根寄生植物の防除」、「AM 菌共生による無機栄養のサポート」、「収量に影響する枝分かれ制御」など農業や園芸分野において重要と考えられる。

(2) SL 生合成経路

シロイヌナズナの *more axillary growth (max)*、エンドウの *ramosus (rms)*、ペチュニアの *decreased apical dominance (dad)*、イネの *dwarf (d)* は枝分かれ過剰突然変異体として知られていたが、我々の研究によって SL 関連突然変異体であることが明らかとなった。SL 生合成には 2 種類のカロテノイド酸化開裂酵素 (carotenoid cleavage dioxygenase) CCD7 と CCD8 が関与する (図 1)。また、枝分かれ過剰突然変異体の接ぎ木実験から、CCD の下流でシトクロム P450 のひとつ CYP711A が働くことが示唆されている (図 1)。また、イネの D27 遺伝子は鉄を取り込む新規タンパク質をコードし、SL 生合成に関わる。この遺伝子は多くの植物で保存されているが、その機能は不明で、反応段階のどこに位置するかはわかっていない。現在までに、4 種類の遺伝子が SL 生合成関連遺伝子として同定されているが、SL の複雑な構造を



作り上げるためには、さらにいくつかの酵素が必要と予想される。別の枝分かれ過剰突然変異体の解析が進み、新しい SL 生合成関連遺伝子が登場する可能性はあるが、今のところその候補となる変異体は見つかっていない。

(3) 栄養飢餓にตอบสนองして生産される SL

リン酸が欠乏すると多くの植物で共通して内生 SL が増加する。そこで、リン酸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ตอบสนองするかリアルタイム PCR で調べた。その結果、SL 生合成遺伝子は、いずれもリン酸濃度の変化にตอบสนองして共発現しており、内生 SL の変動パターンと同じ挙動を示すことが明らかとなった。さらに、ソルガムやイネはリン酸だけでなく、窒素欠乏にもตอบสนองして内生 SL が増加する。しかしながら、窒素欠乏時の SL 生産量の挙動と SL 生合成遺伝子の変動パターンについてはまだよくわかっていない。窒素栄養が増えると内生サイトカイニン含量が増加し、枝分かれも増加することなど枝分かれにおける窒素栄養の影響は古くから知られている。この窒素欠乏ตอบสนองに、SL がどのように関わっているのか、リン酸欠乏時の応答と異なるのか不明であった。

2. 研究の目的

ストリゴラクトン (SL) は、根圏において寄生や共生の根圏情報物質として機能するだけでなく、植物の枝分かれや胚軸伸長などに関わるホルモンとして作用する。植物はリン酸や窒素などの無機栄養が欠乏すると SL を過剰に生産し、逆に栄養が豊富だとその生産を抑える。イネでは、リン酸欠乏時の SL 増加と、枝分かれ抑制効果に強い相関が認められたが、窒素欠乏時における枝分かれ抑制と内生 SL 量との関係は不明である。本研究では、1) イネを窒素欠乏で栽培して分げつの数と SL との相関を明らかにし、2) マイクロアレイ解析からリン酸欠乏および窒素欠乏の両方にตอบสนองする遺伝子群から、新しい SL 関連遺伝子を探索することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) イネの水耕栽培系を用いた窒素飢餓応答と分げつの相関

イネでは、リン酸だけでなく、窒素飢餓にもตอบสนองして内生 SL が増加する。すでに、リン

酸欠乏時の SL 増加と、枝分かれ抑制効果に強い相関が認められることは報告したが、窒素欠乏時における枝分かれ抑制と内生 SL 量との関係はまだ明らかになっていない。野生型、分枝過剰変異体 *d3* (F-box タンパク質欠損変異体、SL 非感受性を示す) および *d10* (SL 生合成欠損変異体、SL 投与で表現型が回復する) の実生を用いて、水耕液の総窒素濃度を変化させたときの SL 生産量、分げつの数と長さ、シュート長と根長、S/R 比 (Shoot/Root ratio) に注目し、窒素栄養、SL、分げつ伸長に関する相互関係について調査を行った。SL 関連突然変異体は、シオカリバクグランドと日本晴バクグランドの 2 品種で存在する。前者は 2'-*epi*-5-deoxystrigol が検出され、後者は 2'-*epi*-5-deoxystrigol と 2'-*epi*-orobanchol が検出される。これらの SL の分析は、質量分析計 LC-MS/MS を用いて定量する。1 週間寒天培地で前培養を行い、生育が揃った個体をさまざまな窒素濃度の水耕液で栽培する。野生型イネでは、水耕液中の窒素含量を低下させると、それに応じて SL が増加し、それによって分げつの伸長が抑制されることが予想される。

#### (2) 窒素栄養の違いと SL 生合成

水耕液に含まれる窒素栄養には、アンモニウムイオン ( $\text{NH}_4^+$ ) と硝酸イオン ( $\text{NO}_3^-$ ) の 2 タイプある。ソルガムでは、総窒素の減少が SL 生産を増加させ、どちらか片方のイオンが欠如しても SL 生産量には影響しないが、イネの SL 生産においてどちらの窒素欠乏がより影響するのかがまだわかっていない。栽培イネは、還元的な土壌である水田で生育し、一般的に無機態窒素のアンモニウムイオンを好んで吸収してその生育に利用している。吸収されたアンモニウムイオンはグルタミン合成酵素とグルタミン酸合成酵素によって同化される。したがって、イネではアンモニウムイオン濃度の影響は高いと予想している。通常の水耕液では、硝酸アンモニウム ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) を使用しているが、このうちアンモニウムイオンをナトリウムイオンに置き換えた硝酸ナトリウム ( $\text{NaNO}_3$ )、硝酸イオンを塩化物イオンに置き換えた塩化アンモニウム ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) を使って窒素態の違いが SL 生産に影響するか検証した。

#### (3) SL 関連遺伝子の発現解析

イネの SL 生合成に関わる遺伝子には、カロテノイド酸化開裂酵素 *CCD7* をコードする *D17*、*CCD8* をコードする *D10*、機能未知の *D27* がある。これらの他に、チトクロム P450 酸素原子添加酵素 *CYP711A* が SL 生合成に関与することがわかっているが、イネではこの遺伝子のホモログが 5 つ (*Os01g0700900*, *Os01g0701400*, *Os01g071500*, *Os02g0221900*, *Os06g0565100*) 存在する。シグナル伝達など

SL の下流で機能する遺伝子には、F-box タンパク質をコードする *D3*、 $\alpha/\beta$ -hydrolase をコードする *D14*、TCP ファミリーに属する転写因子の *FCI* がある。野生型イネを窒素欠乏 (N-) の水耕液で 1 週間栽培した後、半数は新鮮な N- の水耕液で栽培を継続する。残り半数は、窒素を多く含む (N+) 水耕液にイネを移植して栽培した。このとき、両者の遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で調べ、LC-MS/MS 分析で定量した内生 SL 量の変動パターンと比較した。

#### (4) SL 以外の植物ホルモン含量の変動

植物の枝分かれには、SL 以外にオーキシンやサイトカイニンの影響を強く受ける。特に、サイトカイニンは窒素施肥の影響を強く受け、窒素栄養が増えると内生サイトカイニン含量が増加する。そこで、平成 24 年度に実施した (3) SL 関連遺伝子の発現解析で行った実験条件と同じ条件で、indole-3-acetic acid、*trans*-zeatin、isopentenyladenine などの植物ホルモンの定量分析を LC-MS/MS を用いて行った。

#### (5) マイクロアレイによる窒素濃度の変化にตอบสนองする遺伝子群の網羅的な解析

平成 24 年度に実施した (3) SL 関連遺伝子の発現解析で行った実験条件と同じ条件で、マイクロアレイ解析を行った。N- で発現量が増加し、N+ で発現が減少する遺伝子群のうち、内生 SL と遺伝子発現の変動パターンが近い酵素遺伝子群を階層クラスタリングによって絞り込んだ。すでに、リン酸欠乏にตอบสนองしたマイクロアレイ解析も行っている。そこで、リン酸および窒素欠乏の両方にตอบสนองする遺伝子をピックアップし、リアルタイム PCR で再度発現解析を行った。窒素とリン酸の 2 種類の変化に対して共通して内生 SL 量の変化と同じパターンを示す遺伝子があるとすれば、SL 生合成に関連した重要な役割をもつ遺伝子と期待される。

#### (6) 新しい SL 生合成遺伝子の同定

上記、(5) マイクロアレイによる窒素濃度の変化にตอบสนองする遺伝子群の網羅的な解析から絞り込まれた遺伝子が欠損した変異体をミュータントパネル *Tos17* (<http://tos.nias.affrc.go.jp/>) で探索してそれらを手にする。SL 関連変異体であれば、枝分かれが多くなると予想される。表現型リストをみると、現時点で分げつが多い表現型を示すものが 111 種類挙がっている。実際、*d3-2* や *d3-X* (SL 関連の F-box タンパク質欠損変異体) や *d10-2* (*CCD8* 欠損変異体) はその中に含まれており、*Tos17* から入手可能である。また、

同時にシロイヌナズナでも絞り込んだ遺伝子の T-DNA 挿入変異株を Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) から入手する。入手した変異体の枝分かれの数を評価し、内生 SL の LC-MS/MS 分析や SL 処理に対する応答性について調査した。

#### 4. 研究成果

本研究では、イネの窒素欠乏応答に注目し、窒素欠乏条件下で SL が増加する分子メカニズムについて調査した。まず、平成 24 年度に窒素欠乏条件下で野生型イネと SL 生合成・情報伝達欠損変異体 (*d* 変異体) がどのような表現型を示すか調査した。窒素濃度が低下するにつれて分げつ数が減少した。この窒素欠乏条件下における分げつ数の減少は、*d* 変異体でも観察された。また、枝分かれだけでなく、リン酸欠乏および窒素欠乏時の葉の老化における影響についても調査し、少なくともリン酸欠乏時に SL を介して葉の老化を調節していることを明らかにした。LC-MS/MS による SL 分析を行い、イネの SL が窒素欠乏に反応して増加することを確認した。また、同じ実験条件下で栽培したイネの qRT-PCR による SL 関連遺伝子の発現解析から、*D10*、*D17*、*D27*、など多くの SL 生合成遺伝子の発現量が窒素欠乏条件下 (-N) で高かった。イネの *OsMAX1* ホモログは 5 つ報告されているが、5 つのうち、*Os01g071500* は窒素欠乏に反応して発現量が増加した。ところが、*D3*、*D14* など SL 情報伝達遺伝子では窒素欠乏による発現量の増加は認められなかった。イネは、窒素欠乏条件下では自身の SL への感度を上げるのではなく、SL の生産量を上げることで反応していると考えられる。さらに、イネの品種、シオカリとニホンバレの幼苗をそれぞれリン酸欠乏 (-P)、-N、アンモニア態窒素欠乏 (-NH<sub>4</sub>)、硝酸態窒素欠乏 (-NO<sub>3</sub>) の水耕液に 10 日間栽培し、水耕液中の SL 分析を行った結果、ニホンバレでは各窒素欠乏条件下で SL 滲出量が増加した。このとき、各処理区の間では有意な差は認められなかった。一方、シオカリでは -NO<sub>3</sub> では SL の増加が認められず、-NH<sub>4</sub> と -N で増加が認められた。品種によって窒素欠乏に対する応答が異なっていた。

平成 25 年度には、まず SL 以外の植物ホルモンの定量を LC-MS/MS を用いて行った。SL と相互作用して枝分かれや葉の老化に関わるオーキシンやサイトカイニンの内生量を本学に設置されている ABSciex 社の 3200Q-Trap で分析した。その結果、イネの *d* 変異体では、オーキシン含量が高く、窒素欠乏条件下ではサイトカイニン含量が著しく低下していた。また、野生型のシオカリを窒素欠乏条件下、あるいは窒素を施肥して栽培し、それぞれの根から RNA を抽出し、窒素欠乏に反応する遺伝子の発現をマイクロアレイで網羅的に調査した (図 2)。SL 生合成

遺伝子と同様、窒素欠乏で発現量が高く、窒素施肥で遺伝子発現が低下する遺伝子を選択スクリーニングした。その結果、fold change が 2 倍以上差を示したものが 1653 遺伝子存在した。リン酸欠乏に反応して発現量が増加する遺伝子のうち、fold change が 2 倍以上のものは 816 遺伝子存在し、両条件に共通して反応する遺伝子が 179 遺伝子存在した (図 2)。この中から、チトクロム P450 と 2-オキソグルタル酸依存的酸化酵素について注目し、それらの遺伝子が欠損した変異体を mutant panel Tos17 で探索して入手した。SL に関連する可能性のある遺伝子の候補として分げつ数の数を調査したが、分げつ数が過剰な系統は得られなかった。現在、ABRC から候補遺伝子に欠損をもった T-DNA 挿入系統を受領し、枝分かれの数や背丈など表現型の評価を行っているところである。

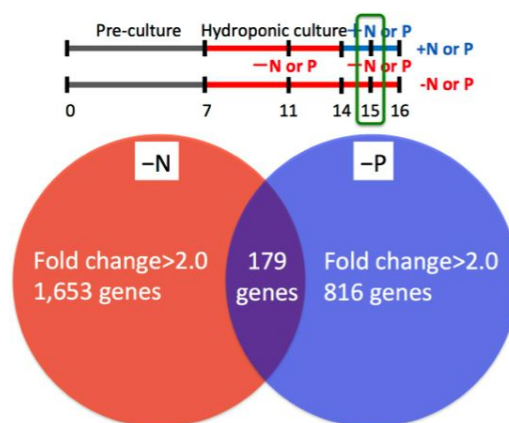


図 2 マイクロアレイによる栄養欠乏遺伝子の探索

#### 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)

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* in press 査読有

Yoshiya Seto, Aika Sado, Kei Asami, Atsushi Hanada, Mikihisa Umehara, Kohki Akiyama, Shinjiro Yamaguchi (2014) Carlactone is an endogenous biosynthetic precursor for strigolactones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 1640-1645 査読有

山田雄介、梅原三貴久、瀬戸義哉 (2013) 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, 148-153 査読無

Shinsaku Ito, Mikihisa Umehara, Atsushi Hanada, Shinjiro Yamaguchi, Tadao Asami

(2013) Effects of strigolactone-biosynthesis inhibitor TIS108 on Arabidopsis. *Plant Signal. Behav.* 8, e24193 査読有

〔学会発表〕(計2件)

菊池沙安、梅原三貴久 栄養欠乏にตอบสนองする新規ストリゴラクトン関連遺伝子の探索、第31回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム、2013年9月10-12日、北海道大学(北海道・札幌)

菊池沙安、梅原三貴久 窒素欠乏にตอบสนองして変動するストリゴラクトン関連遺伝子の発現解析、日本育種学会第123回講演会、2013年3月27-28日、東京農業大学(東京・世田谷)

〔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/Top.html](http://www2.toyo.ac.jp/~umehara/plant_biotechnology/Top.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・准教授

研究者番号：30469895

(2)研究分担者(0)

(3)連携研究者(0)