

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24114010

研究課題名(和文)細胞外空間を經由する植物ホルモン動態と機能に関する研究

研究課題名(英文)Studies on the movement and functions of plant hormones in the space outside the cell

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) 45,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、植物細胞外空間の低分子信号物質の移動経路としての役割を明らかにすることを目的とした。特に、植物ホルモンとアレロケミカルの機能を併せ持つストリゴラクトンに焦点を当てた。まず、カーラクトンと呼ばれるカロテノイド由来の化合物がストリゴラクトン合成中間体であること、カーラクトンはシロイヌナズナにおいてカーラクトン酸に変換されることを明らかにした。次に、カーラクトン酸のモノヒドロキシ体が種々の植物の道管液中(植物細胞外空間)に存在することを見出した。以上の結果から、カーラクトン酸のモノヒドロキシ体はストリゴラクトンの移動形態の一つであると推定される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed at elucidating the roles of the space outside of the cell as a route for the movement of low-molecular-weight signaling molecules. In particular, we focused on strigolactones, which act as plant hormones and also as allelochemicals. We found that carotenoid-derived carlactone is an intermediate of strigolactone biosynthesis, and that carlactone is then converted to carlactonoic acid in Arabidopsis. We also found that a hydroxylated carlactonoic acid was detected in the xylem sap in various plant species. These results suggested that the hydroxylated carlactonoic acid might be a mobile form in the strigolactone biosynthetic pathway.

研究分野：植物化学

キーワード：植物ホルモン 植物細胞壁 ストリゴラクトン 植物細胞外空間

1. 研究開始当初の背景

植物細胞外空間（アポプラスト）は、多様な高分子群から成る複雑系である細胞壁が存在する空間であるばかりでなく、種々の機能性低分子の移動経路としても重要な働きを担っていると考えられる。植物ホルモンをはじめとする低分子シグナルの一部も、細胞外空間を経由し器官間シグナルとして長距離輸送されたり、植物体外へ分泌されて他の生物に働きかけたりすると考えられる。

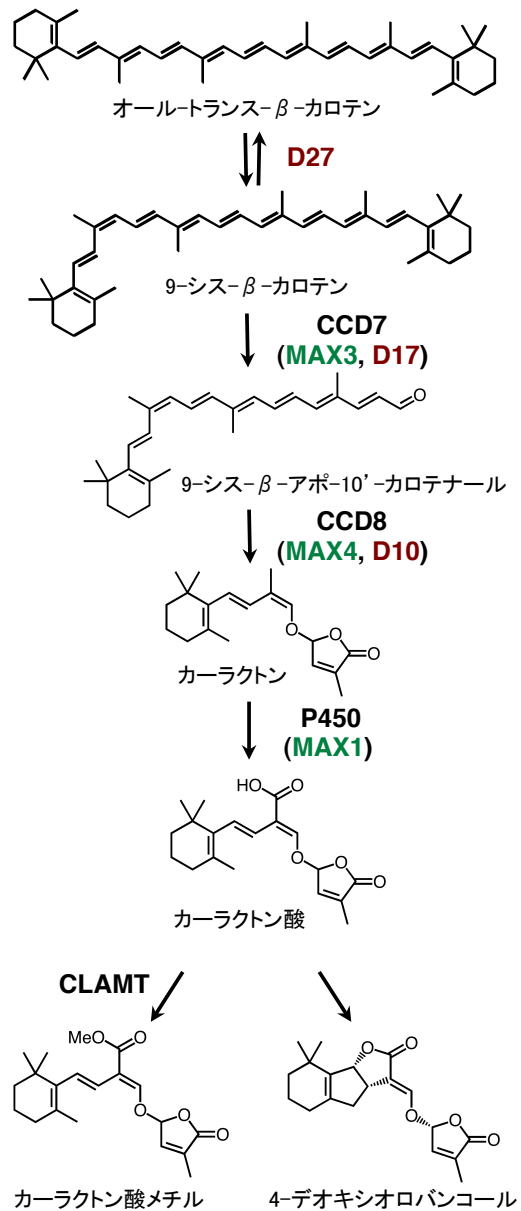
本研究で着目するストリゴラクトンは、4つの環をもつテルペノイド化合物であり、もともと根寄生植物の種子発芽を極めて低い濃度で促進する物質として、植物の根の滲出液中から発見された。その後、ストリゴラクトンは、植物の無機栄養吸収を助けるアーバスキュラー菌根菌との共生に関わる化学シグナルとして同定された。以上の発見から、ストリゴラクトンは根から根圏に分泌され、アレロケミカルとして他の生物との相互作用に関わることが明らかになった。しかしながら、ストリゴラクトンの植物自身における役割は不明であった。

その後の研究により、ストリゴラクトンは内生のホルモンとして地上部の枝分かれの抑制等に働くことが明らかになった。この新しい枝分かれ抑制ホルモンの存在は、枝分かれが過剰に形成されるシロイヌナズナの *more axillary growth (max)* 等の突然変異体の解析からその存在が示唆されていた。同様の枝分かれ過剰変異体として、イネの分げつ矮性 *dwarf (d)* 変異体が挙げられる。これらの枝分かれ過剰変異体は、ストリゴラクトンの生合成またはストリゴラクトンに対する応答に欠陥を有していることが現在では明らかにされている。

枝分かれ過剰変異体を用いた接ぎ木実験から、枝分かれを抑制するシグナル分子が根から地上部に移動することが示唆されていた。この移動性のシグナル分子は、現在ではストリゴラクトンあるいはストリゴラクトン関連物質であると考えられている。この際、ストリゴラクトンは道管（アポプラスト）を経由して長距離輸送されると予想されており、実際に道管液中からストリゴラクトンが検出されたとする報告もある。しかし、当実験結果は再現できないとの報告もあり、この点については更なる検討が必要な状況にあった。一方、ストリゴラクトン欠損変異体同士の接ぎ木実験から、ストリゴラクトン生合成中間体が根から地上部へ移動することが示唆されていた。しかしながら、その実態については明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、ストリゴラクトンやストリゴラクトン関連物質の細胞外空間を介した移動について明らかにすることを目的とした。ストリゴラクトンは主に根で生産され、根圏に分泌されてアーバスキュラー菌根菌との共



ストリゴラクトンの生合成経路

生シグナルとして働くとともに、地上部へ移行して枝分かれを抑制するホルモンとして働く。ストリゴラクトンの分泌や生体内での移動に関わる因子はこれまでほとんど明らかにされていない。

3. 研究の方法

(1) ストリゴラクトンおよびストリゴラクトン生合成中間体の動態解析：ストリゴラクトンは植物体内に低濃度で存在し、化学的に不安定であることから、その生体内での動態を精密に解析することは容易ではない。そこで、高感度質量分析装置（LC-MS/MS）を用いて各種ストリゴラクトンの精製法および分析法の改良に取り組みつつ、研究を進めた。また、ストリゴラクトンの生合成経路は研究開始時点ではほとんど解明されていなかった。そこで、生合成中間体の同定および定量分析法の開発を並行して行った。

(2) ストリゴラクトン受容体複合体をセンサーとして用いる輸送体の機能スクリーニング：ストリゴラクトンは細胞内から細胞外空間に移行し、長距離輸送されると予想される。また、根圏に分泌される際にも細胞外空間への移行がまず必要となる。そこで、酵母ツーハイブリッド法において受容体センサーを利用した輸送体の機能スクリーニングを試みた。並行して、植物ホルモン輸送体が複数存在する ABC トランスポーターの特定のファミリーの挿入変異体を網羅的に取得し、道管液中のストリゴラクトン関連化合物量が低下した変異体を探索した。

(3) ストリゴラクトンの根圏への分泌に影響を与えるケミカルの探索：ストリゴラクトンの根圏への分泌経路は不明である。ストリゴラクトンの根圏への分泌に影響を与える因子を同定するため、ケミカルライブラリー (HitFinder10k, Maybridge) 由来の化合物をイネの水耕栽培系に投与し、ストリゴラクトン分泌量を定量した。

(4) ストリゴラクトン動態に及ぼすアーバスキュラー菌根菌側の共生因子の影響：近年、アーバスキュラー菌根菌側の共生因子 (リポキトオリゴ糖：Myc factor) が同定された。菌側の共生因子が、植物側の共生因子であるストリゴラクトンの動態にどのような影響を与えるのかを解析した。

4. 研究成果

(1) イネとシロイヌナズナにおいて、カーラクトンが内生のストリゴラクトン生合成中間体であることを証明した。次に、シロイヌナズナにおいて、カーラクトンはシトクロム P450 酸化酵素である MAX1 依存的にカーラクトン酸に変換されることを明らかにした。また、シロイヌナズナの *max1* 変異体にはカーラクトンが野生型の数百倍蓄積していることを見出した。

様々な植物の道管液中に含まれるストリゴラクトン関連物質を質量分析装置により精査した。四環性のストリゴラクトンは道管液中からは検出されなかった。一方、質量分析装置を用いてストリゴラクトン関連化合物の共通の部分構造 (D 環部分) に由来する特徴的な開裂イオンを指標に網羅的な化合物探索を行ったところ、カーラクトンのモノヒドロキシ体と推定される化合物が種々の植物の道管液中に検出された。様々な位置が水酸化されたカーラクトン酸モノヒドロキシ体の合成標品との比較により、水酸基の位置を決定した。以上の結果から、カーラクトン酸のモノヒドロキシ体はストリゴラクトンの移動形態の一つであると推定される。

(2) 受容体複合体をセンサーとして用いる輸送体の機能スクリーニングからは、ストリゴラクトン輸送体の候補は得られなかった。一方、ABC トランスポーターの特定のサブファミリーの逆遺伝学的解析から、道管液中のカーラクトン酸モノヒドロキシ体の量が低

下した変異体を 2 種得ることができた。

(3) ケミカルライブラリーから約 5,000 の化合物をスクリーニングし、イネの水耕栽培において水耕液中のストリゴラクトン量を顕著に低下させる化合物を 18 種得た。これらの化合物はいずれも根の内生ストリゴラクトン量も低下させたことから、分泌阻害剤ではなく生合成阻害剤であると考えられた。生合成中間体の定量分析結果から、これらのケミカルはカロテノイド生合成阻害剤、カーラクトン以前の生合成段階の阻害剤、およびカーラクトン以降の生合成段階の阻害剤に分類されることが明らかになった。

(4) アーバスキュラー菌根菌側の共生因子であるリポキトオリゴ糖は、ストリゴラクトンの生産量に顕著な影響を及ぼさなかった。

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 5 件)

① Brewer PB, Yoneyama K, Filardo F, Meyers E, Scaffidi A, Frickey T, Akiyama K, Seto Y, Dun EA, Cremer JE, Kerr SC, Waters MT, Flematti GR, Mason MG, Weiller G, Yamaguchi S, Nomura T, Smith SM, Yoneyama K, Beveridge CA. LATERAL BRANCHING OXIDOREDUCTASE acts in the final stages of strigolactone biosynthesis in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci USA, 査読有, 113 巻 6301-6306, 2016 年

DOI: 10.1073/pnas.1601729113

② Umehara M, Cao M, Akiyama K, Akatsu T, Seto Y, Hanada A, Li W, Takeda-Kamiya N, Morimoto Y, Yamaguchi S. Structural requirements of strigolactones for shoot branching inhibition in rice and Arabidopsis. Plant Cell Physiol, 査読有, 56 巻 1059-1072. 2015 年

DOI: 10.1093/pcp/pcv028

③ Abe S, Sado A, Tanaka K, Kisugi T, Asami K, Ota S, Kim HI, Yoneyama K, Xie X, Ohnishi T, Seto Y, Yamaguchi S, Akiyama K, Yoneyama K, Nomura T. Carlactone is converted to carlactonoic acid by MAX1 in Arabidopsis and its methyl ester can directly interact with AtD14 in vitro. Proc Natl Acad Sci USA, 査読有, 111 巻 18084-18089, 2014 年

DOI: 10.1073/pnas.1410801111

④ Seto Y, Yamaguchi S. Strigolactone biosynthesis and perception. Curr Opin Plant Biol, 査読有, 21 巻 1-6, 2014 年

DOI: 10.1016/j.pbi.2014.06.001

⑤ Seto Y, Sado A, Asami K, Hanada A, Umehara M, Akiyama K, Yamaguchi S. Carlactone is an endogenous biosynthetic precursor for strigolactones. Proc Natl Acad Sci USA, 査読有, 111 巻, 1640-1645, 2014 年

[学会発表] (計 12 件)

① Yamaguchi S, Strigolactone biosynthesis and its regulation, 2nd International Congress on Strigolactones, March 29, 2017, Turin (Italy)

② 山口信次郎, ストリゴラクトンの生合成と制御、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 19 日、京都女子大学 (京都府・京都市)

③ Yuta Onozuka, Naoki Kitaoka, Takaya Kisugi, Kohki Akiyama, Kiyoshi Mashiguchi, Yoshiya Seto, Shinjiro Yamaguchi, Identification of carlactonoic acid methyltransferase in Arabidopsis, 22nd International Conference on Plant Growth Substances, June 23, 2016, Toronto (Canada)

④ Yamaguchi S, Strigolactone biosynthesis and action in rice and Arabidopsis, 22nd International Conference on Plant Growth Substances, June 21, 2016, Toronto (Canada)

⑤ 田中海、瀬戸義哉、亀岡啓、経塚淳子、山口信次郎、ストリゴラクトンの非天然型立体異性体はイネの内生ストリゴラクトン量を増加させる、植物化学調節学会 第 50 回大会、2015 年 10 月 24 日、東京大学 (東京)

⑥ 小野塚祐太、北岡直樹、来生貴也、秋山康紀、瀬戸義哉、山口信次郎、カーラクトン酸メチル化酵素の同定、植物化学調節学会 第 50 回大会、2015 年 10 月 24 日、東京大学 (東京)

⑦ 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、及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、2015 年 3 月 18 日、東京農業大学 (東京)

⑧ Yamaguchi S, Identification of endogenous biosynthetic precursors for strigolactones in rice and Arabidopsis, 1st International Congress on Strigolactones, March 2, 2015, Wageningen (the Netherlands)

⑨ 田中海、佐渡愛香、浅見慶、瀬戸義哉、秋山康紀、山口信次郎、ストリゴラクトン生合成中間体 carlactonoic acid の同定、植物化学調節学会 第 49 回大会、2014 年 10 月 18 日、京都大学 (京都府・京都市)

⑩ 浅見慶、佐渡愛香、来生貴也、花田篤志、瀬戸義哉、秋山康紀、山口信次郎、シロイヌナズナにおけるカーラクトンの動態、植物化学調節学会 第 49 回大会、2014 年 10 月 18 日、京都大学 (京都府・京都市)

⑪ 山口信次郎、ストリゴラクトンの動態と機能、第 55 回日本植物生理学会年会、2014 年 3 月 18 日、富山大学 (富山県・富山市)

⑫ 浅見慶、佐渡愛香、花田篤志、瀬戸義哉、秋山康紀、山口信次郎、ストリゴラクトン生合成におけるカーラクトンの関与、植物化学調節学会 第 48 回大会、2013 年 10 月 31 日、新潟大学 (新潟県・新潟市)

[図書] (計 1 件)

① 増口潔、山口信次郎、新しい植物ホルモンの科学 第 3 版、第 11 章 ストリゴラクトン (148-160 頁)、2016 年、講談社

[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
活性分子動態分野ホームページ
<http://labo.lifesci.tohoku.ac.jp/biomol/index.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

増口 潔 (MASHIGUCHI, Kiyoshi)
東北大学・生命科学研究科・助教
研究者番号：00569725