

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07093

研究課題名(和文) ストリゴラクトン生合成経路から分岐する真の枝分かれ抑制ホルモン

研究課題名(英文) Study on a shoot branching inhibiting hormone derived from strigolactone biosynthesis pathway

研究代表者

野村 崇人(Nomura, Takahito)

宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・准教授

研究者番号：60373346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ストリゴラクトン(SL)は根圏における根寄生植物(寄生して養水分を奪う植物)とアーバスキュラー菌根菌(共生してリン酸を供給する菌類)の宿主認識シグナルとして働く。また、植物体内では枝分かれを抑制する植物ホルモンとして機能している。農業生産において重要な生理作用をもつSLであるが、その生合成経路の全貌は明らかにされていない。本研究では、SL生合成酵素であるMAX1とLBOの機能について解析した。その結果、植物には、MAX1とLBOに導かれる2環性SL誘導体の生合成経路が存在することが示された。

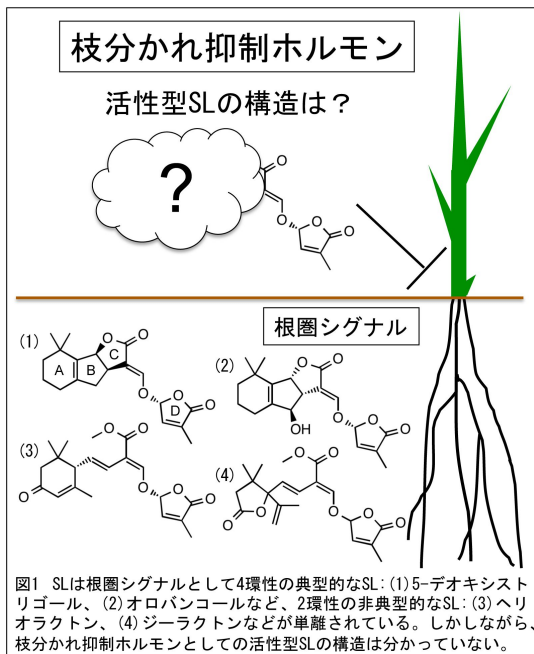
研究成果の概要(英文)：Strigolactones (SLs) function as host recognition signals for root parasitic plants and symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere and as plant hormones regulating shoot branching in plants. In spite of such important physiological functions in agricultural production, its biosynthetic pathway has not been elucidated. In this study, the functions of SL biosynthetic enzymes MAX1 and LBO were analyzed. As a result, it has been shown that a biosynthetic pathway for two-ring SL derivatives led by MAX1 and LBO exists in plants.

研究分野：生物制御科学

キーワード：植物ホルモン ストリゴラクトン 生合成 酵素 P450

## 1. 研究開始当初の背景

植物の枝分かれは、花や種子の数さらに質に影響するため、作物の生産性と深く関わる。その制御(抑制)には、ストリゴラクトン(SL)と呼ばれる内生の植物ホルモンが関与する。(Umehara et al., Nature, 455: 195-200, 2008)。SLは根圏におけるアレロケミカルとしても機能している。陸上植物の約八割がリン酸の吸収を助けてくれるアーバスキュラー菌根菌(AM菌)と共生しているが、SLはその菌系の分岐を誘導して共生を促進している。(Akiyama et al. Nature, 435: 824-827, 2005)。さらに、根寄生雑草のストライガやオロバンキは宿主の根から浸出するSLを認識して発芽して寄生する(Xie et al., Annu. Rev. Phytopathol., 48: 93-117, 2010)。そのような農業生産上重要な生理作用をもつSLであるが、その生合成経路については未だ全貌は明らかにされていない。SLは根寄生植物の種子発芽活性を指標にして、これまでに20種類を超える化合物が単離・構造決定されている。それらはA、B環とC環のラクトン構造を母核にして、D環のメチルプテノライドがエノールエーテル結合している構造を基本骨格としており、A環かB環における水酸基やアセチル基の有無による違いがある(図1)。興味深いことに、構造活性相関において、AM菌の菌系分岐活性と根寄生植物の発芽活性においてはABCD環のいずれも活性向上に必要であるのに対して、宿主植物の枝分かれ抑制活性にはABC環の構造は必須ではないことが知られている(Boyer FD et al., Plant Physiol., 159: 1524-1544, 2012)。現在までに、いずれの化学構造体が植物体内で枝分かれ抑制の活性本体として機能しているのか解っていない。



## 2. 研究の目的

これまでに研究代表者は、SLの生合成経路

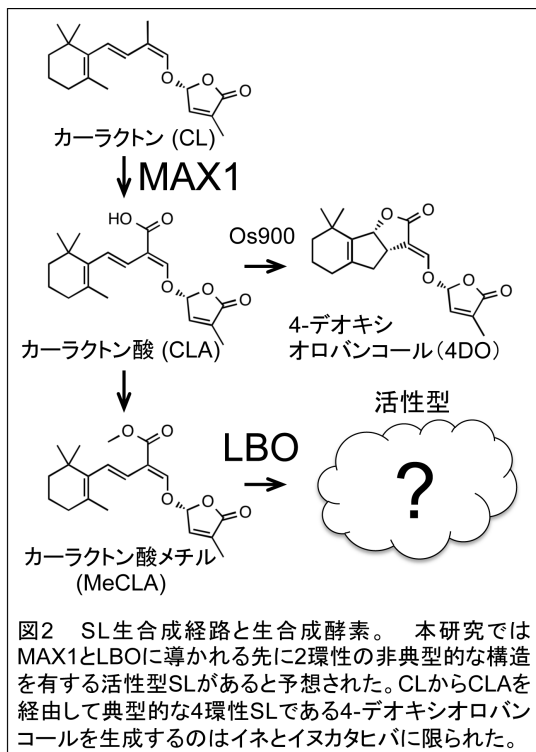
で働くシトクロム P450 酵素である MAX1 の機能を世界に先駆けて明らかにした (Abe et al., PNAS, 111: 18084-18089, 2014)。MAX1 は SL 前駆物質カーラクトン (CL) の C-19 位をカルボキシ基まで酸化してカーラクトン酸 (CLA) を生成する酵素であった (図 2)。そのメチルエステル体 (MeCLA) は推定 SL 受容体 AtD14 と直接相互作用することも明らかにした。それらの結果から、完全な SL 骨格を有しない CL 誘導体が枝分かれ抑制ホルモンの活性体として機能している可能性を示した。本研究では、枝分かれ抑制ホルモンの活性体の化学構造とその生合成経路の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

植物に保存された共通の SL 生合成経路を解明するため、様々な植物種の MAX1 ホモログの酵素機能を調べた。イネ、トウモロコシ、トマト、ポプラ、ストライガ、イヌカタヒバから MAX1 ホモログ遺伝子をクローニングして、酵母を用いてタンパク質を発現させた。P450 酵素が局在するミクロソーム画分を調製して、基質として CL 等をインキュベートし、代謝物を LC-MS/MS を用いて分析した。シロイヌナズナの新規 SL 生合成酵素の LBO タンパク質の機能解析には、大腸菌発現系を用いた。LBO は His タグ融合タンパク質として発現させ、カラム精製した。基質として CL 誘導体とインキュベートして代謝物を LC-MS/MS を用いて分析した。

## 4. 研究成果

酵母で発現させたイネ、トウモロコシ、トマト、ポプラ、ストライガの MAX1 タンパク質による CL の変換を調べた結果、それらすべてからシロイヌナズナの MAX1 と同様に CLA の生成が確認された。これにより根寄生植物ストライガは自身でも SL 中間体である CLA の生合成能をもつことが明らかとなった。一方、CL から 4 環性の SL 基本骨格をもつ 4-deoxyorobanchol (4DO) への変換は、5 つあるイネの MAX1 ホモログのうち Os900 のみで確認された (図 2)。Os900 による CL から 4DO への変換は既に報告されているが、本研究において、他の MAX1 ホモログと同様に Os900 は CL から CLA も生成することが明らかとなった。また、Os900 に CLA を基質として与えると 4DO へ変換することも明らかとなった。しかしながら、他の MAX1 ホモログに CLA を与えても 4DO への変換は認められなかった。したがって、SL 生合成経路における MAX1 の基本的な触媒反応は CL から CLA への変換であると考えられた。さらに、Os900 に関しては、CL の代謝物を探索した結果、18-hydroxyCLA と推定される代謝物が検出された。その推定代謝物は、シロイヌナズナの MAX1 による CL 代謝物には検出されないことから 18-hydroxyCLA は CLA から 4DO への環化反応の中間体であると考えられた (Yoneyama



また、MAX1の機能について進化的な考察を行うために、維管束植物として最も初期に分岐したヒカゲノカズラ植物であるイヌカタヒバのMAX1の酵素機能を調べた。その結果、イヌカタヒバのMAX1ホモログはイネOs900と同じようにCLを4DOに変換する機能があることが明らかとなった。このことから、種子植物とヒカゲノカズラ植物の共通祖先のMAX1の機能はCLから4DOを生産する機能だったと推測された。また、イヌカタヒバの根浸出液からも4DOが検出されたことから、進化初期の維管束植物において4DOは重要な根圏シグナルだったのではないかと推測された (Yoneyama et al., New Phytologist, 218: 1522-1533, 2018 )

一方、協同研究者のChristine Beveridge教授 (オーストラリアクイーンズランド大)らのグループによってMAX1の下流で働く新規SL生合成酵素遺伝子LBOが単離された。2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼであるLBOタンパク質を大腸菌において発現させ、代謝実験を行った。その結果、LBOはMeCLAを基質として、16 Daが付加された代謝物を生成することを明らかにした (図2)。シロイヌナズナにおいてLBO遺伝子の欠陥は枝分かれの増加を引き起こすことから、LBOは枝分かれ抑制ホルモンとして非典型的な二環性SLの生合成酵素であると考えられる。(Brewer et al., PNAS, 113: 6301-6306, 2016 )

これらの研究成果により、MAX1とLBOに導かれる非典型的なSL生合成経路を明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6件)

Yoneyama K., Mori N., Stao T., Yoda A., Xie X., Okamoto M., Iwanaga M., Ohnishi T., Nishiwaki H., Asami T., Yokota T., Akiyama K., Yoneyama K., Nomura T. Conversion of carlactone to carlactonic acid is a conserved function of MAX1 homologs in strigolactone biosynthesis. New Phytologist, 218: 1522-1533, 2018. (査読有) DOI: 10.1111/nph.15055

Yoneyama K., Xie X., Yoneyama K., Kisugi T., Nomura T., Nakatani Y., Akiyama K., McErlean C.S.P. Which are Major Players, Canonical or Non-Canonical Strigolactones? J. Exp. Bot., 69: 2231-2239, 2018. (査読有) DOI: 10.1093/jxb/ery090

Xie X., Kisugi T., Yoneyama K., Nomura T., Akiyama K., Uchida K., Yokota T., McErlean C.S.P., Yoneyama K. Methyl zealactonate, a novel germination stimulant for root 1 parasitic weeds produced by maize. J. Pestic. Sci., 42: 58-61, 2017. (査読有) DOI: 10.1584/jpestics.D16-103

Brewer P.B., Yoneyama K., Filardo F., Meyers E., Scaffidi A., Frickey T., Akiyama K., Seto Y., Dun E.A., Cremer J.E., Kerr S.C., Waters M.T., Flematti G.R., Mason M.G., Weiller G., Yamaguchi S., Nomura T., Smith S.M., Yoneyama K., Beveridge C.A. LATERAL BRANCHING OXIDOREDUCTASE acts in the final stages of strigolactone biosynthesis in Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 113: 6301-6306, 2016. (査読有) DOI: 10.1073/pnas.1601729113

Xie X., Yoneyama K., Kisugi T., Nomura T., Akiyama K., Asami T., Yoneyama K. Structure- and stereospecific transport of strigolactones from roots to shoots. J. Pestic. Sci., 41: 55-58, 2016. (査読有) DOI: 10.1584/jpestics.D16-009

Xie X., Yoneyama K., Kisugi T., Nomura T., Akiyama K., Asami T., Yoneyama K. Strigolactones are transported from roots to shoots, although not through the xylem. J. Pestic. Sci., 40: 214-216, 2015. (査読有) DOI: 10.1584/jpestics.D15-045

[学会発表] (計 39件)

野村崇人、米山香織、佐藤智康、依田彬義、謝 肖男、森 愛美、秋山康紀、岡田憲典、

横田孝雄、米山弘一、ストリゴラクトン生合成における MAX1 酵素の進化、第 59 回日本植物生理学会、2018 年

米山香織、秋山康紀、森 愛美、謝 肖男、山内 聡、西脇 寿、米山弘一、野村崇人、水酸化カーラクトン誘導体はストリゴラクトン生合成における MAX1 と LBO の基質候補である、第 59 回日本植物生理学会、2018 年

依田彬義、佐藤智康、米山香織、謝 肖男、森 愛美、秋山康紀、横田孝雄、米山弘一、野村崇人、シダ植物におけるストリゴラクトン生合成、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年

野上香奈、米山香織、野村崇人、米山弘一、秋山康紀、トマトのソラナコール生合成における芳香環形成経路、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年

森 愛美、米山香織、謝 肖男、野村崇人、米山弘一、秋山康紀、ミヤコグサ 5DS 生合成における MAX1 下流経路の解析、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年

伊藤晋作、川田紘二郎、新井美乃里、佐藤美咲、久家滉太、佐々木康幸、野村崇人、浅見忠男、矢嶋俊介、新規ストリゴラクトン生合成阻害剤の探索、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年

下野 叡、松下明真、米山香織、岡本昌憲、野村崇人、米山弘一、謝 肖男、ポプラの根浸出物に含まれるストリゴラクトンの同定および構造解析、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年

佐藤智康、米山香織、森 愛美、謝 肖男、秋山康紀、米山弘一、野村崇人、イヌカタヒバ MAX1 の酵素機能、植物化学調節学会第 52 回大会、2017 年

依田彬義、謝 肖男、米山香織、横田孝雄、米山弘一、野村崇人、シダ植物が生産するストリゴラクトン、植物化学調節学会第 52 回大会、2017 年

米山香織、秋山康紀、森 愛美、謝 肖男、米山弘一、野村崇人、シロイヌナズナにおける内生ストリゴラクトンの同定、植物化学調節学会第 52 回大会、2017 年

町田真、謝肖男、米山弘一、野村崇人、米山香織、ストリゴラクトン分泌における隣接植物の影響、植物化学調節学会第 52 回大会、2017 年

謝 肖男、米山香織、岡本昌憲、野村崇人、

米山弘一、イオンモビリティ MS を用いたストリゴラクトンの立体異性体の分析、植物化学調節学会第 52 回大会、2017 年

野上香奈、米山香織、野村崇人、米山弘一、秋山康紀、トマトにおけるソラナコール型カーラクトン類の変換、植物化学調節学会第 52 回大会、2017 年

森 愛美、米山香織、謝 肖男、野村崇人、米山弘一、秋山康紀、ミヤコグサ 5DS 生合成における MAX1 下流経路の解析、植物化学調節学会第 52 回大会、2017 年

松下明真、松田一彦、野村崇人、米山弘一、謝 肖男、キク科植物が生産する新奇ストリゴラクトンの探索、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年

佐藤智康、米山香織、森 愛美、齋藤睦美、謝 肖男、秋山康紀、米山弘一、野村崇人、ストリゴラクトン生合成における MAX1 ホモログの機能解析、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年

依田彬義、米山香織、森 愛実、Philip Brewer、謝 肖男、Christine Beveridge、秋山康紀、米山弘一、野村崇人、ストリゴラクトン生合成における LBO ホモログの機能解析、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年

森 愛美、米山香織、謝 肖男、野村崇人、米山弘一、秋山康紀、ミヤコグサのストリゴラクトン生合成における新規 MAX1 産物の同定、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年

野上香奈、米山香織、野村崇人、米山弘一、秋山康紀、ソラナコール型カーラクトン類のトマト MAX1 および LBO による変換、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年

野村崇人、米山香織、森 愛実、謝 肖男、秋山康紀、米山弘一、MAX1 と LBO により導かれるストリゴラクトン生合成経路、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年

①Yoneyama K., Xie X., Yoneyama K., Nomura T., Akiyama K., McErlean C.S.P., Distribution of canonical and non canonical strigolactones in the plant kingdom、第 2 回国際ストリゴラクトン会議、2017 年

②Yoneyama K., Brewer P.B., Akiyama K., Xie X., Beveridge C., Yoneyama K., Nomura T., Biochemical characterization of lateral branching oxidoreductase involved in strigolactone biosynthesis、

第2回国際ストリゴラクトン会議、2017年

- ⑳Nomura T., Yoneyama K., Mori N., Sato T., Xie X., Yamaguchi S., Akiyama K., Yoneyama K., Biochemical characterization of MAX1 orthologs involved in strigolactone biosynthesis, 第2回国際ストリゴラクトン会議、2017年
- ㉑Yoda A., Yoneyama K., Mori N., Saito M., Xie X., Saint Germain A., Rameau C., Beveridge C., Akiyama K., Yoneyama K., Nomura T., Biochemical characterization of PsMAX1 and PsLBO in *Pisum sativum*, 第2回国際ストリゴラクトン会議、2017年
- ㉒Yoneyama Y., Brewer P., Akiyama K., Yoda A., Xie X., Seto Y., Yamaguchi S., Beveridge C., Yoneyama K., Nomura T., Biochemical characterization of 2-oxoglutarate dependent dioxygenase LBO involved in strigolactone biosynthesis, 第58回日本植物生理学会、2017年
- ㉓米山香織、Philip Brewer、秋山康紀、依田彬義、謝 肖男、瀬戸義哉、山口信次郎、Christine Beveridge、米山弘一、野村崇人、シロイヌナズナにおける新奇ストリゴラクトン生合成酵素 LBO の機能解析、植物化学調節学会第51回大会、2016年
- ㉔米山香織、森 愛実、秋山康紀、佐藤智康、齋藤睦美、謝 肖男、米山弘一、野村崇人、ストリゴラクトン生合成酵素 MAX1 の機能多様性、植物化学調節学会第51回大会、2016年
- ㉕森 愛実、謝 肖男、米山香織、野村崇人、米山弘一、秋山康紀、ミヤコグサにおけるMAX1の下流で働く新規ストリゴール型ストリゴラクトン生合成酵素の存在、植物化学調節学会第51回大会、2016年
- ㉖Nomura T., Biochemical Characterization of More Axillary Growth in Strigolactone Biosynthesis, 第22回国際植物生長物質会議、2016年
- ㉗Yoneyama K., Akiyama K., McErlean C., Xie X., Yoneyama K., Nomura T., Are non-canonical strigolactones major players?, 第22回国際植物生長物質会議、2016年
- ㉘Yoneyama K., Akiyama K., Brewer P., Beveridge C., Seto Y., Yamaguchi S., Xie X., Yoneyama K., Nomura T., Biochemical characterization of LATERAL BRANCHING OXIDOREDUCTASE involving strigolactone

biosynthesis in Arabidopsis, 第22回国際植物生長物質会議、2016年

- ㉙Yoneyama K., Yoneyama K., Nomura T., Effects of phosphate and other plant hormones on strigolactone production, 第22回国際植物生長物質会議、2016年
- ㉚謝 肖男、松下明真、米山香織、内田健一、横田孝雄、野村崇人、秋山康紀、米山弘一、ミヤコグサが生産する新規ストリゴラクトンの探索、日本農芸化学会2016年度大会、2016年
- ㉛森 愛実、米山香織、謝 肖男、野村崇人、米山弘一、秋山康紀、A環が水酸化されたCLのMAX1酵素及び植物による変換産物の解析、日本農芸化学会2016年度大会、2016年
- ㉜米山香織、米山弘一、野村崇人、イネのストリゴラクトン生産におけるリンとサイトカニンの影響、日本農芸化学会2016年度大会、2016年
- ㉝米山香織、森 愛実、謝 肖男、来生貴也、大西利幸、李 偉強、吉田聡子、白須 賢、山口信次郎、秋山康紀、米山弘一、野村崇人、ストリゴラクトン生成におけるMAX1酵素の機能的多様性、第57回日本植物生理学会、2016年
- ㉞米山香織、森 愛実、李 偉強、謝 肖男、瀬戸義哉、吉田聡子、白須 賢、秋山康紀、山口信次郎、米山弘一、野村崇人、ストライガMAX1の機能解析、植物化学調節学会第50回大会、2015年
- ㉟森 愛実、謝 肖男、野村崇人、米山弘一、秋山康紀、ストリーゴール型ストリゴラクトン生産植物であるミヤコグサ及びワタのMAX1酵素の機能解析、植物化学調節学会第50回大会、2015年
- ㊱山口 慎、米山弘一、野村崇人、謝 肖男、シダ植物イヌカタヒバが生産するストリゴラクトンの探索、植物化学調節学会第50回大会、2015年

〔その他〕  
プレスリリース 植物の枝分かれ抑制ホルモンをつくる酵素を発見 2016年5月17日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 崇人 (NOMURA, Takahito)  
宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・准教授  
研究者番号：60373346