

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07102

研究課題名(和文) 寄生植物ストライガにおけるストリゴラクトンシグナル伝達機構の分子進化に関する研究

研究課題名(英文) Molecular evolution of strigolactone signaling in the parasitic plant *Striga hermonthica*

研究代表者

土屋 雄一郎 (Tsuchiya, Yuichiro)

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・特任准教授

研究者番号：00442989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物ホルモンであるストリゴラクトンは、寄生植物であるストライガの発芽を刺激するホストファクターである一方、宿主植物内では枝分かれの制御等様々な発生理に関わる。本研究では、シロイヌナズナでのHYPOSENSITIVE TO LIGHT/KARRIKIN INSENSITIVE2 (HTL/KAI2) を介したSL応答と、ストライガの発芽を刺激する機構の関連性を、光シグナル伝達のと相互作用の観点から探った。低分子化合物プローブを用いたアプローチより、シロイヌナズナとストライガではともに、HTL/KAI2を介した経路でSLシグナルを伝えることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Strigolactones (SLs) function as plant hormone that regulate various developmental processes including suppression of shoot branching. On the other hands, seed germination of a parasitic plant *Striga hermonthica* is stimulated by SLs exuded by host roots. In this study, we investigated the relationship between these two functions based on the genetic interaction of HYPOSENSITIVE TO LIGHT/KARRIKIN INSENSITIVE2 (HTL/KAI2)-mediated SL signaling pathway and light signaling pathway in *Arabidopsis*. We showed that HTL/KAI2 interact with SUPPRESSOR OF PHYA1 (SPA1), a negative regulator of light signaling, in SL-dependent manner, and this interaction lead SPA1 protein to degradation in planta. We transferred the knowledge to *Striga* with the discovery of small molecule antagonist of HTL/KAI2 that also inhibit SL-dependent germination of *Striga*. These results suggest that the evolution of SL pathway took place with its interaction with light signaling pathway in the parasitic plant.

研究分野：植物ケミカルバイオロジー

キーワード：ストリゴラクトン シグナル伝達 寄生植物 ストライガ

1. 研究開始当初の背景

寄生植物は、エネルギーを生産する方面ではなく、他の植物から栄養を搾取することに特化したユニークな植物である。ハマウツボ科の寄生植物であるストライガは、アフリカの穀物生産に深刻な被害を与える有害植物として知られている。ストライガの寄生は、まず近くに宿主植物がいることを認識して種子発芽し、ホストの根に向かって根を伸張させた後、吸器とよばれる器官を根の先端に形成してホストの根に侵入することで達成される。ストライガの種子は土中で数十年も生きている一方、ごく小さく貯蔵物質もほとんど持たないため、発芽から2週間以内にホストに寄生できないと枯死する。このことから、寄生関係を構築する一連のステップの中でも、最も重要なのは、ホストの近くで発芽するという一番最初のステップと考えられる。これを担うのはストリゴラクトン (SL) と呼ばれる低分子化合物であり、ホスト植物が根から土中に放出するごく微量の SL を認識してストライガが発芽を起こすことが知られている。しかし、ストライガでは遺伝学解析が不可能であるため、そのシグナル伝達を解明する試みはこれまで一切なされていなかった。一方、SL が植物ホルモンとして非寄生植物の生長を制御することが明らかとなり、遺伝学を用いたシグナル伝達の解明が進められ、ヒドロラーゼ様タンパク質 D14 が SL を受容し、F-box タンパク質 MORE AXILALLY GROWTH2 (MAX2) を介して、シャペロン様タンパク質 D53 を分解することでシグナルが伝わると考えられていた。こういった背景の中、本研究室は、ケミカルジェネティクスを用いて独自の方向性より研究を進めており、その過程で、SL がモデル植物であるシロイヌナズナが発芽を刺激することを発見し、D14 のホモログである *HYPOSENSITIVE TO LIGHT/KARRIKIN INSENSITIVE2* (*HTL/KAI2*) および MAX2 を介した光シグナル伝達とのクロストークによりシグナルを伝えるモデルを提唱していた (Tsuchiya et al., Nat. Chem. Biol. 2010; Toh et al., Chem. Biol. 2014)。一方、ストライガでは、*HTL/KAI2* 遺伝子のコピー数が少なくとも 11 個へと増加していることが明らかとなった (*ShHTL1*~*ShHTL11*)。しかし、これら *ShHTL* 遺伝子群が SL 受容体の機能を持ち、発芽を制御する因子であるかは不明であり、下流の因子やシグナル伝達の機構もわかっていなかった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、まずシロイヌナズナにおいて、*HTL/KAI2* と光シグナル伝達がどのような機構でクロストークするかをタンパク質-タンパク質相互作用のネットワークの観点から解明し、ストライガのオルソログにおけるタンパク質-タンパク質相互作用のネッ

トワークとの相違点と類似点を探ることで、*HTL/KAI2* を介した発芽制御機構の進化を解明することを目的として研究を行なった。

3. 研究の方法

(1) 光シグナル伝達に関わる因子と

HTL/KAI2 の相互作用の解析：*HTL/KAI2* タンパク質と光シグナル伝達因子 (*COP1*, *SPA1*, *CRY1*, *HY5*) とのタンパク質-タンパク質相互作用を、酵母 2 ハイブリッド法により解析した。35S::GUS-*SPA1* コンストラクトを発現するシロイヌナズナ形質転換株を作成し、GR24 の *SPA1* タンパク質の分解作用を GUS 染色により観察した。

(2) *HTL/KAI2* と *ShHTL* のアンタゴニストの探索：光シグナル伝達の負の制御因子である *COP1* を過剰発現させたライン

(35S::*COP1*-GUS) で見られる胚軸の伸長を人工 SL である GR24 で抑制できることが明らかとなり、そこにさらにライブラリー化合物を加えることで GR24 の作用を抑圧する化合物のスクリーニングを行なった。引き続き、*rac*-GR24 による発芽刺激作用に対する抑制効果を検証した。発見した化合物と SL 受容体との相互作用は、intrinsic fluorescence assay 法、また蛍光プローブであるヨシムラクトンを用いた競合試験により検証した。抑圧作用がストライガでも見られるかを、GR24 での発芽促進作用の抑制効果を観察することで行なった。

4. 研究成果

(1) *HTL/KAI2* 経路と光シグナル伝達のクロストーク：

遺伝学解析より、GR24 ラセミ体混合物 (*rac*-GR24) は *HTL/KAI2* 経路を活性化し、その下流で光シグナルを負に制御する因子である *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS1* (*COP1*) および *SUPPRESSOR OF PHYTOCHROME1* (*SPA1*) を抑制することが示唆されていた。すなわち、*htl-3* 突然変異株では、光シグナル伝達に欠損を生じた変異株で観察される胚軸の伸長が観察される。逆に、*cop1* 突然変異下部では暗所においても胚軸伸長が起こらないが、*htl-1 cop1* 二重変異株では *cop1* の表現型が観察された。*rac*-GR24 を与えることで *COP1* が核から細胞質に移行するメカニズムが提唱されていた。そこで、*HTL/KAI2* と光シグナル伝達に関わる因子との直接的なタンパク質-タンパク質相互作用を検証することで、*HTL* の光シグナル伝達への作用点の同定を試みた。酵母 2 ハイブリッド法による解析では、*HTL/KAI2* タンパク質は *SPA1* と SL 依存的に相互作用すること、また *COP1* および *CRY1* 青色光受容体とは SL 非依存的に相互作用することを見出した。*COP1* および *CRY1* と恒常的なタンパク質-タンパク質相互作用する意義は現在のところ不明であるが、他の植物ホルモンで見られるように、リガンド依存的な相互作用はシグナル伝達を

活性化する重要なステップと考えられる。具体的には、HTL/KAI2 タンパク質は、MAX2 を介して、SL 依存的に SPA1 タンパク質をユビキチン/プロテアソーム経路で分解することで SL シグナルを伝える仮説が考えられた。そこで、植物細胞内での SL 依存的な SPA1 との相互作用のシロイヌナズナ細胞内での機能を確認するため、35S::GUS-SPA1 コンストラクトによる構成的発現ラインを作成し、rac-GR24 の SPA1 タンパク質の安定性における作用を GUS 活性を指標に観察した。その結果、仮説通り、GR24 を与えたものでは GUS 活性の消失が見られた。すなわち、GR24 を与えることで SPA1 タンパク質が分解され、下流が活性化するモデルが想定された。では、この HTL-SPA1 の相互作用は、ストライガにおいても保存されているのだろうか。これを調べるため、SL シグナル伝達および光シグナル伝達に関わるシロイヌナズナ遺伝子のストライガにおけるホモログ遺伝子群

(ShHTL1-ShHTL12, ShCRY1, ShCRY2, ShCOP1A, ShCOP1B, ShSPA1, ShSPA2, ShSPA3 および ShHY5) をクローニングし、その網羅的タンパク質-タンパク質相互作用を酵母 2 ハイブリッド法により解析した。興味深いことに、シロイヌナズナとストライガで共通に見られる相互作用に加え、ストライガで新たに生じた相互作用、あるいはストライガでは消失した相互作用といった組み合わせが存在することも明らかとなった。特筆すべきは、ストライガで 11 個に増幅した ShHTL 遺伝子群の間での相互作用が観察され、ホモあるいはヘテロ二量体化を伴う SL シグナル伝達機構の存在が示唆された。一方、シロイヌナズナ HTL 遺伝子ではホモダイマーの形成は見られなかったことから、ストライガの進化の過程で起こった HTL 遺伝子のコピー数の増加に伴い、二量体化する機能が獲得されたと考えられる。さらに、シロイヌナズナでは HY5 遺伝子は COP1 の下流で働く転写因子であり、HTL/KAI2 タンパク質との相互作用は観察されなかったが、ShHTL1 では ShCOP1 との相互作用が消失し、ShHY5 との相互作用が新たに出現したことも明らかとなった。すなわち、光-SL 相互作用を支える遺伝的相互作用ネットワークに大きなリワイアリングが起こっていることが明らかとなった。他の植物に栄養を頼る寄生植物では、非寄生植物と比較して光に対する応答の生理的意義は小さい。それに置き換わり、SL が光シグナル経路を改変することで宿主が放出する SL に応答して発芽する機構を進化させたのではないかと考えられる。

(2) SL 受容体のアンタゴニストの探索：上記研究より、シロイヌナズナでは、rac-GR24 による発芽誘導の光シグナル伝達への作用点は、COP1/SPA1 であることが明らかとなった。すなわち、HTL/KAI2 と COP1 の SL 日依存的タンパク質-タンパク質相互作用、および、SPA との SL 依存的相互作用を開始、

タンパク質の分解や核から細胞質への移行を介して発芽を誘導すると考えられた。一方、胚軸の伸張も発芽と同様光によって制御されるプロセスであり、負の制御因子である COP1 を過剰に発現する株では胚軸の徒長が見られる。そして、rac-GR24 は 35S::COP1-GUS で観察される胚軸の伸長を抑制することができる。この表現系に着目し、GR24 の効果を抑圧する化合物をケミカルライブラリーより探索することで、HTL/KAI2 タンパク質の競合阻害剤を同定できると考えた。そこで、4,182 個の人工化合物からなるケミカルライブラリーを用い、胚軸伸張を指標としたスクリーニングをおこなった。さらに、二次スクリーニングで、rac-GR24 による発芽促進作用を抑圧する活性を持つものへと絞り込みを行った。その結果、構造の多様な 7 個の化合物を得ることができた。そのうち、最も強い効果が見られた化合物 (soporidine ; SOP) についてさらに解析を進め、この化合物が HTL/KAI2 を標的することを生化学的に証明した。すなわち、SOP は HTL/KAI2 の競合阻害剤であることが明らかとなった。興味深いことに、SOP は rac-GR24 によるシロイヌナズナでの発芽促進作用を阻害するだけでなく、ストライガにおいても発芽阻害作用を発揮した。すなわち、AtHTL のみならず、ShHTL タンパク質に対しても競合阻害することができると考えられた。SOP と ShHTL タンパク質との相互作用を生化学的に解析したところ、実際に ShHTL7 に結合することが明らかとなった。以上より、SOP はシロイヌナズナおよびストライガの HTL/KAI2 タンパク質の機能を競合的に阻害する分子であることが明らかとなった。本研究成果によるケミカルジェネティクス解析は、ShHTL 遺伝子群がストライガにおける SL 受容体であることを機能レベルで初めて証明したものである。

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)

(査読あり) Holbrook-Smith D, Toh S, Tsuchiya Y, McCourt P. (2016) Small-molecule antagonists of germination of the parasitic plant *Striga hermonthica*. *Nature Chemical Biology* 12(9):724-9. doi: 10.1038/nchembio.2129.

(査読あり) 土屋 雄一郎、寄生植物ストライガにおけるストリゴラクトンの受容機構 (2017) 植物の成長調節 52:63-69.

[学会発表](計 6 件)

Tsuchiya, Y. Chemical Biology to combat against a parasitic plant Striga 5th Annual South Asia Biosafety

Conference (SABC). Bangalore, India, September, 2017.

土屋雄一郎、寄生植物ストライガの撲滅に向けた化学と生物の融合研究．天然物化学談話会．熱川．7月、2017．

土屋 雄一郎、寄生植物ストライガの発芽を制御する人工アゴニストの開発．日本農芸化学会．京都．3月、2017．

Yuichiro, Tsuchiya, Development of suicide germination molecule for a parasitic plant Striga. *2nd International Congress on Strigolactones*. Turin, Italy. March 2017.

土屋 雄一郎、寄生植物ストライガの発芽を制御する人工アゴニストの開発．植物生理学会年会．鹿児島．3月、2017．

Yuichiro Tsuchiya, Probing strigolactone receptors in *Striga hermonthica* with fluorescence. *International conference on plant growth substances (IPGSA)*. Toronto, Canada. June, 2016.

Duncan Holbrook-Smith
藤 茂雄 (TOH, Shigeo)

〔図書〕(計2件)

萩原伸也、吉村柁彦、土屋雄一郎、木下俊則、伊丹健一郎．魔女の呪いを解く分子-寄生植物“ストライガ”の発芽を制御する分子を開発(2016)．化学71(5):35-39．

土屋雄一郎．植物ホルモン・ストリゴラクトンをめぐる生物戦略(2016)．理科通信 サイエンスネット(数研出版) 57号:2-5．

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.itbm.nagoya-u.ac.jp/ja/membe/me/y-tsuchiya/>

6．研究組織

(1)研究代表者

土屋 雄一郎 (TSUCHIYA, Yuichiro)
名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所・特任准教授
研究者番号:00442989

(2)研究分担者

なし()

(3)連携研究者

なし()

(4)研究協力者

Peter McCourt