

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14714

研究課題名(和文)植物成長促進化合物PPGの機能発現機構の解明

研究課題名(英文)Molecular function of a novel compound to promote plant growth

研究代表者

中野 雄司 (Nakano, Takeshi)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・専任研究員

研究者番号：30281653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物の成長や形態を制御する新規化合物の探索を目的とした植物ケミカルバイオロジー研究によって、発芽種子に植物カルス(細胞塊)誘導を生じるFPXを発見した。さらに、植物細胞内でFPXから代謝されて生じる化合物PPGが、植物の葉・茎・根について、形態を異常にすることなく、成長を促進させる活性を持つことを発見した。植物成長制御を行う生理活性化合物としては、植物ホルモン類が知られるが、PPGの化学構造は、既知の天然および合成植物ホルモンのいずれとも全く異なっている。さらに、PPGのターゲットタンパク質の探索の結果、有力候補として3種類のタンパク質を同定に成功した。

研究成果の概要(英文)：To clarify unknown molecular mechanism of plant growth, we started to screen novel compound that positively regulate plant growth from RIKEN Chemical Library NPDepo. The long-day treatment by FPX caused the callus formation onto the seedling of Arabidopsis. The efficiency of callus formation by FPX was higher than already optimized callus formation condition by auxin and cytokinin. PPG promoted rosette leaf expansion to 200% wider, inflorescence number and lateral root number to 150% higher than non-treated Arabidopsis. Though some growth related plant hormone might change the detail shape of plant organ during the growth promotion by these hormones, PPG treatment did not changed the shape of each organ. Chemical structure of FPX and PPG was totally different with already known plant hormones and synthesized plant growth regulators. These compounds will be useful to reveal the unknown molecular mechanism of plant growth.

研究分野：植物化学生物学

キーワード：ケミカルバイオロジー 植物 分化 発生 成長 遺伝子組換え カルス バイオマス

## 1. 研究開始当初の背景

植物ホルモンの一種であるブラシノステロイドは、植物の成長を促進させる化合物を探索する過程で、ナタネの花粉の内生物質の中から発見された。その後、ブラシノステロイドの生合成や情報伝達の研究は進展してきているが、ブラシノステロイド自体は人工合成や植物体からの精製が高価であるため、農業利用には至らずに現在に至っている。本研究の端緒は、ブラシノステロイドに類似する成長促進化合物を探索するため、NPDepo ケミカルライブラリーから、ブラシノステロイド生合成阻害剤 Brz に耐性を示す人工合成化合物をスクリーニングすることから開始した。

Brz 耐性化合物として単離した化合物 FPX は、長期間植物体を FPX 存在下で成長させると、単剤でカルス誘導を引き起こす新規カルス誘導剤であることが明らかとなった。さらに、FPX は、植物体内で CPA と PPG の 2 種の化合物に代謝されること、カルス誘導の主活性は CPA によって行われ、PPG は CPA によるカルス形成を促進させる活性を持つことが明らかとなった。そこで PPG の植物個体への生理活性を解析したところ、植物体に異常形態を生じさせることなく、葉の面積、茎の分枝、根の側根数、を増加させる活性を持つことが明らかとなった。

既知の天然・合成植物ホルモンは、植物の成長を促進させるものの、その特異的な生理作用によって、少なからず形態異常を併発することがあるが、PPG による形態促進は、ほぼ野生型と同じ形態を保った状態で最終形態のみが増大する点が、大きな特徴である。また、化学的にも、既知の植物ホルモンや合成植物成長促進剤のいずれとも全く異なる化学構造を持っている。このような生理活性や化学構造を持つ物質についての先行研究は一切無く、非常に独創性の高い化合物であると考えられた。

## 2. 研究の目的

植物の形態変化を指標としてケミカルスクリーニング(化合物探索)を行う植物ケミカルバイオロジー研究を遂行する過程で、植物の葉・茎・根について、形態を異常にすることなく、成長を促進させる新規化合物 PPG を発見した。PPG は、植物への適用の報告例は全く無い人工合成化合物であり、動物や微生物での生理作用ターゲット等の分子メカニズムも明らかになっていない。また、植物成長制御を行う生理活性化化合物としては、植物ホルモン類が知られるが、PPG の化学構造は、既知の天然および合成植物ホルモンのいずれとも全く異なっている。本申請は、分子生物学手法、生化学的手法などによって PPG の植物成長における分子機構を明らかにすることにより、植物の未知の成長制御システムを明らかにすると共に、植物バイオマスの増産、食糧増産に向けた新しい基盤技術の開

発を目指す。

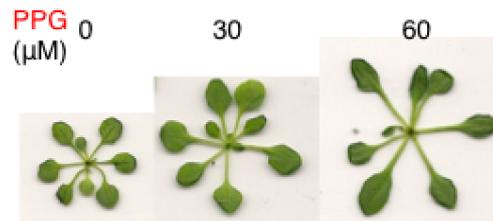
## 3. 研究の方法

PPG は、植物の葉・茎・根について、正常な形態を保ちながら、成長を促進させる新規な生理活性合成化合物である。この生理作用は既存の成長促進活性を持つ植物ホルモン類によって引き起こされる形態変化とも異なる部分があり、PPG によって、全く新規な植物成長促進システムが活性化されている可能性が考察される。本研究では、実験植物のみでなく、実用化植物における成長促進活性、カルス誘導促進活性の詳細な解析を第一に行う。同時に、PPG を結合させたケミカルビーズを作成し、ケミカルビーズと共沈降するタンパク質を同定することを目指すケミカルバイオロジー的アプローチ、PPG によって引き起こされる遺伝子発現を解析することによって作用点を辿る分子生物学的アプローチ、などによって、PPG のターゲットタンパク質(PPG 結合タンパク質)の同定を目指す。タンパク質の同定後は、その詳細な作用機序の解明に着手する。

## 4. 研究成果

### 1. PPG による植物成長促進活性の詳細な解析

アラビドプシス野生株を PPG 存在下で生育させた場合、濃度依存的に、葉の拡大、側根形成の促進、分枝の促進という 3 種の器官に同時に促進傾向の形質を生じさせる。PPG と細胞伸長や細胞分裂との関わりについて、ロゼッタ葉の表皮細胞の詳細な解析を行った結果、細胞伸長や細胞形態には変化はなく、細胞分裂が活性化していることが明らかとなった。



PPGによる葉の拡大促進

### 2. PPG 作用機序のマイクロアレイ法による分子生物学解析

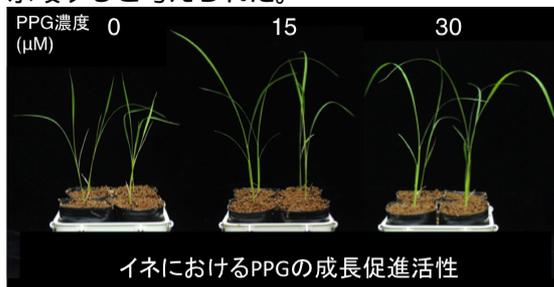
PPG は植物の葉・茎・根の成長を促進させるという明瞭な生理活性を持つ。これらの形態変化を生じさせるには、多くの遺伝子の発現調節が生じていると考えられる。平成 27 年度には、数段階の PPG 濃度、数パターン of 処理時間、における PPG 処理アラビドプシスを育成し、それらから全 RNA を抽出し、マイクロアレイシステムによって解析を行った。既知のアラビドプシスの既存の植物ホルモン刺激によって発現誘導を受ける遺伝子群や、植物の各器官を細かく分類して各々において発現する遺伝子群の遺伝子発現パターンと、PPG による遺伝子発現パターンの比較

によって、PPG 刺激が、既知の成長促進因子と類似する可能性について解析を試みた。

その結果、植物ホルモン関連の発現応答マーカー遺伝子群はほぼ発現変動しないことが明らかとなり、植物ホルモンとの関連性は低いことが考察された。しかし、既知の植物発生において重要とされる遺伝子の数種類は発現上昇が認められ、PPG の機能発現は植物発生の上流域に作用する機序を持つことが考察された。

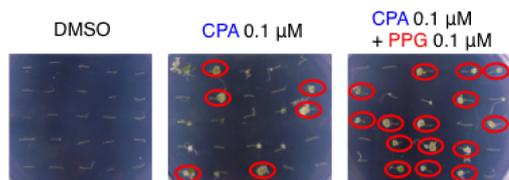
### 3. PPG による植物成長促進活性の実用化植物における解析

PPG の植物成長促進活性は、実験植物アラビドプシスを対象に開始した。その後、実用化植物での効果を解析を目指し、日本国内の重要穀類であるイネにおいても、成長促進活性を解析した。その結果、草丈、葉長などの植物バイオマスのみでなく、種子数、種子収量（重量）共に PPG によって促進されていることが明らかとなった。これらの結果は、PPG が農業において実用化も可能であることを示唆すると考えられた。



### 4. PPG によるカルス誘導活性の実用化植物における解析

PPG は、当初カルス誘導剤 FPX の分解産物として発見された。その後、FPX は CPA と PPG に代謝されること、カルス形成の初期化は CPA が担うものの、PPG が CPA と共存することによってカルス形成が促進されることが、アラビドプシス胚軸を用いた解析によって明らかとなっている。植物の遺伝子組み換え法においては、カルス誘導時の植物にアグロバクテリウムを感染させる系が主流だが、一般的なオーキシシンとサイトカイニンの組み合わせではカルス形成がうまく進まない植物もまだ多く残されており、カルス形成の可否が、遺伝子組み換え植物の広がりへの壁となっている。



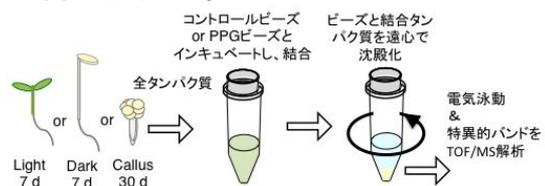
発芽胚軸におけるCPAとPPGによるカルス誘導促進  
そこで、従来の方法では遺伝子組み換えが出来ない植物への組み換え技術の適用を目指し、CPA と PPG によるカルス誘導条件に

ついて、検討を行った。その結果、CPA 存在下において、PPG 濃度依存的にカルス形成が促進されることが明らかとなった。

### 5. PPG ターゲットタンパク質のケミカルビーズ法によるケミカルバイオロジー解析

PPG は植物の形態を歪めることなく成長を促進させる希少な生理活性を持つ化合物である。この生理作用は、PPG のターゲットタンパク質への結合による活性化もしくは阻害、のどちらかによって生じると考察される。PPG の生理作用の特異性より、この PPG ターゲットタンパク質の同定は、植物成長の新たなメカニズムを明らかにする上において非常に重要であると考えられた。

そこで、第一に、光官能基を融合させたアガロースビーズに、PPG 共存下で、紫外線照射を行い、PPG が強固に結合したケミカルビーズ(PPG ビーズ)を作製した。この PPG ビーズと、ネガティブコントロール用にアガロースビーズのみに同様の操作を行ったものを用意し、明所発芽・暗所発芽・カルスなどの諸条件のアラビドプシスの全タンパク質とインキュベートした。このビーズを遠心することによって、沈殿のビーズ画分に結合タンパク質候補を捕捉することが出来ることになると考えた。この画分を電気泳動し、PPG ビーズ画分のみが存在するタンパク質バンドを回収し、TOF-MS 分析を行うという手法を行った。アラビドプシスは全ゲノム解析が終了しているため、正確な分子量が分析出来れば、結合タンパク質候補が同定出来る可能性が高いと考えた。



この研究手法について、10 回以上の条件検討を行い、また、精製する植物試料も明所発芽、暗所発芽、カルス、などのアラビドプシスについて試みた。

その結果、3 種類の候補タンパク質の同定に成功した。

### 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 9 件)

- 1) Ueda, M.\*, Egoshi, S., Dodo, K., Ishimaru, Y., Yamakoshi, H., Nakano, T., Iwashita, T., Tsukiji, S., Sodeoka, M. Bacterial virulent factor affects plant defense through non-jasmonate pathway bypassing dilemma on plant immunity. *ACS Central Science*. May 4 (2017) 10.1021/acscentsci.7b00099 (査読有)

- 2) Thussagunpanit, J., Jutamanee, K., Homvisasevongsa, S., Suksamrarn, A., Yamagami, A., Nakano, T., Asami, T\*. Characterization of synthetic ecdysteroid analogues as functional mimics of brassinosteroids in plant growth. *J Steroid Biochem Mol Biol.* May 4 (2017) 10.1016/j.jsbmb.2017.05.003 (査読有)
- 3) Nakamura, A., Tochio, N., Fujioka, S., Ito, S., Kigawa, T., Shimada, Y., Matsuoka, M., Yoshida, S., Kinoshita, T., Asami, T., Seto, H., Nakano, T.\*. Molecular actions of two synthetic brassinosteroids, iso-carbaBL and 6-deoxoBL, which cause altered physiological activities between *Arabidopsis* and rice. *PLOS ONE.* April 3 (2017) 10.1371/journal.pone.0174015. eCollection2017 (査読有)
- 4) Jiang, K., Otani, M., Shimotakahara, H., Yoon, J-M., Park, S-H., Miyaji, T., Nakano, T., Nakamura, H., Nakajima, M., Asami, T\*. Substituted phthalimide AC94377 is a selective agonist of the gibberellin receptor *GID1*. *Plant Physiology* 173, 825-835 (2016) 10.1104/pp.16.00937. (査読有)
- 5) Thussagunpanit, J., Nagai, Y., Nagae, M., Mashiguchi, K., Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M., Nakano, T., Nakamura, H., Asami, T.\* Involvement of *STH7* in Light-adapted Development in *Arabidopsis thaliana* Promoted by both Strigolactone and Karrikin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 81:292-301. (2016) 10.1080/09168451.2016.1254536(査読有)
- 6) Hasebe, F., Matsuda, K., Shiraishi, T., Futamura, Y., Nakano, T., Tomita, T., Ishigami, K., Taka, H., Mineki, R., Fujimura, T., Osada, H., Kuzuyama, T., Nishiyama, M.\* Amino group carrier protein-mediated secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces*. *Nature Chemical Biology* 12, 967-972. (2016) 10.1038/nchembio.2181 (査読有)
- 7) Shimada, S., Komatsu, T., Yamagami, A., Nakazawa, M., Matsui, M., Kawaide, H., Natsume, M., Osada, H., Asami, T., Nakano, T.\* Formation and dissociation of *BSS1* protein complex regulates plant development via brassinosteroid signaling. *Plant Cell.* 27: 375-90. (2015) 10.1105/tpc.114.131508. (査読有)
- 8) Oh, K.\*, Matsumoto, T., Yamagami, A., Hoshi, T., Nakano, T., Yoshizawa, Y. Fenarimol, a Pyrimidine-Type Fungicide, Inhibits Brassinosteroid Biosynthesis. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 1-5. (2015) 10.3390/ijms160817273. (査読有)
- 9) Oh, K.\*, Matsumoto, T., Yamagami, A., Ogawa, A., Yamada, K., Suzuki, R.,

Sawada, T., Fujioka, S., Yoshizawa, Y., Nakano, T. YCZ-18 Is a New Brassinosteroid Biosynthesis Inhibitor. *PLOS One.* March 20, 2015. (2015) 10.1371/journal.pone.0120812.eCollection 2015 (査読有)

〔学会発表〕(計 6 件)

- 1) T. Nakano. 'Plant chemical biology to increase carbon fixation into plant biomass for application in crops' 27th International Conference of Arabidopsis Research (ICAR) 2016. 2016年6月29日 (Gyeongju, Korea)
- 2) 中野雄司「植物ステロイドホルモン・ブラシノステロイドの植物における有用性と動物との進化的保存性」日本農芸化学会関東支部会例会2016年6月20日 (東京)
- 3) 田中翔太、中野雄司「植物成長促進化合物 PPG 及び新規カルス誘導化合物 FPX のケミカルバイオロジー研究」第 57 回日本植物生理学会年会 2016 年 3 月 18 日 (岩手)
- 4) 中野雄司「新規植物カルス誘導化合物 FPX と新規植物成長促進化合物 PPG の分子機能」BMB2015 分子生物学会・生化学学会合同大会 ワークショップ 2015 年 12 月 5 日 (神戸)
- 5) 田中翔太、中野雄司「新規植物成長促進化合物 PPG の生理作用解析とターゲットタンパク質の探索」植物化学調節学会第 50 回大会 2015 年 10 月 29 日 (東京)
- 6) T. Nakano 'Brassinosteroid negative regulator *BSS1*' 2<sup>nd</sup> International Brassinosteroid Congress. 2015年5月22日 (Wuhan, China)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 4 件)

- 1) 名称: 「植物の成長方法」  
 発明者: 中野雄司、浅見忠男、山上あゆみ、長田裕之  
 権利者: 理化学研究所  
 種類: PCT  
 番号: JP2016-052052  
 出願年月日: 平成 28 年 1 月 25 日  
 国内外の別: 国際
- 2) 名称: 「植物成長促進剤及び植物成長促進法」  
 発明者: 中野雄司、浅見忠男、長田裕之  
 権利者: 理化学研究所  
 種類: PCT  
 番号: JP2015-078454  
 出願年月日: 平成 27 年 10 月 20 日  
 国内外の別: 国際
- 3) 名称: 「植物のバイオマスを増大させる新規遺伝子及びその利用」

発明者：中野雄司、浅見忠男、宮地朋子、山上あゆみ、石川典子  
権利者：理化学研究所  
種類：PCT  
番号：JP2015-078754  
出願年月日：平成 27 年 10 月 9 日  
国内外の別：国際

4) 名称：「カルス誘導剤及びカルス誘導方法」

発明者：中野雄司、浅見忠男、山上あゆみ、長田裕之、大谷美沙都、出村拓  
権利者：理化学研究所  
種類：PCT  
番号：JP2015-065332  
出願年月日：平成 27 年 5 月 28 日  
国内外の別：国際

〔その他〕

ホームページ等

<http://genediscovery.riken.jp>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中野雄司 (NAKANO, Takeshi)  
国立研究開発法人理化学研究所  
・環境資源科学研究センター  
・専任研究員

研究者番号：30281653