

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H00931

研究課題名(和文)植物病原菌が作り出す新奇サイトカイニンの構造および生合成経路と機能の解明

研究課題名(英文)Elucidation of structure and function of novel cytokinins produced by phytopathogen

研究代表者

榊原 均 (Sakakibara, Hitoshi)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：20242852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,800,000円

研究成果の概要(和文)：Rhodococcus fascians感染による病症原因であるFAS遺伝子群が作り出す新奇サイトカイニン(CK)様分子の構造と作用機作の解明を目指して研究を進めた。その結果、FAS2, FAS3, FAS5によるプレニル側鎖への修飾と、それに続くFAS1反応により合成されることを明らかにした。さらに新奇CK様分子候補2種(NC)について解析を行った結果、NCは植物由来CKに比べCK応答遺伝子の誘導効果は低く、受容体に対する親和性も低いものの、グリーンカルス誘導活性は高いこと、そして少なくともその作用の一部はAHK4を介して作用することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、植物成長調節において重要な役割を果たすサイトカイニンの、側鎖構造の多様性による「質的」な作用調節の一端を解明するものである。また、この物質の作用機構の解明はFASオペロンを持つ病原菌の感染被害の抑制法開発につながることから、農学へのインパクトも高い。

研究成果の概要(英文)：We have studied the structure and mode of action of novel cytokinin (CK)-like molecules produced by the FAS gene cluster, which is the cause of a leafy gall formation caused by infection with Rhodococcus fascians, a phytopathogen. We found that CK-like molecules are synthesized by modification of the prenyl side chains by some FAS enzymes, followed by the FAS1 reaction. Furthermore, analysis of two novel CK-like molecules (NCs) revealed that NCs are less effective than plant-derived CKs in induction of CK-responsive genes and have lower affinity for their receptors, but have higher green callus-inducing activity, and that at least part of their action is mediated by AHK.

研究分野：植物生化学

キーワード：サイトカイニン 植物病原菌 leafy gall Rhodococcus fascians

1. 研究開始当初の背景

植物ホルモンの1つであるサイトカイニンの作用は、濃度変化による「量的」な調節と側鎖構造の多様性による「質的」な調節により、その強さと制御形質が規定される。土壌放線菌である *Rhodococcus fascians* は植物に感染すると leafy gall と呼ばれる奇形腫瘍形成や帯化を起こす。この病原菌感染による病症発生の原因は FAS オペロン (*FAS1* - *FAS6* にコードされる一連の酵素遺伝子) であることが明らかにされているが、この遺伝子群により作り出される化合物の構造とその機能についてはほとんどわかっていなかった。研究代表者のグループは FAS オペロン近傍の *MT1*, *MT2* 遺伝子も関与することで複雑な側鎖修飾鎖を持つ新奇サイトカイニン様分子を合成する傍証を得たが[1]、その分子構造と機能については未解明であった。

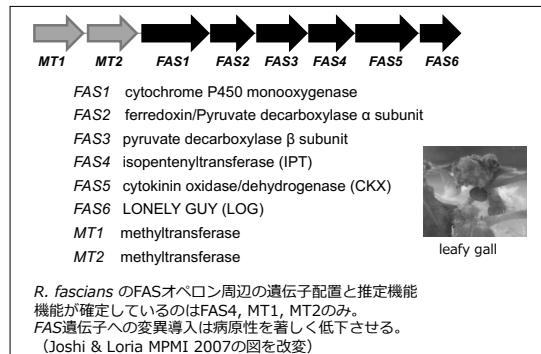
2. 研究の目的

本研究では、*R. fascians* が産生する新奇構造のサイトカイニン様分子の構造とその生合成経路を明らかにし、この分子の機能を解明することで、植物病原菌が作り出す高度に修飾されたサイトカイニン様分子の作用機作とその生理的役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)植物病原菌 *R. fascians* の FAS 遺伝子クラスター (*FAS* オペロン及び *MT1*, *MT2*) が作り出す新奇サイトカイニン様分子 (Novel Cytokinin, NC) の構造とその生合成経路の解明

FAS 遺伝子クラスター (*FAS1* - *FAS6*, *MT1*, *MT2*) の大腸菌発現系を利用し、その培養上清に含まれるサイトカイニン様分子群の質量分析を行った。遺伝子クラスターの様々な組合せの発現系を作ることによって各遺伝子の役割を推察した。質量分析については研究分担者の小嶋が高分解能 LC-MS を用いたフラグメント解析などで NC 化合物の性状について基礎的な情報を収集した。また、精製タグ (His-tag) を付加した各 FAS 酵素タンパク質を大腸菌で大量発現・精製し、*in vitro* で反応性を検証した。反応生成物を大量調製し、研究分担者の西川が NMR 分析することで NC の構造を決定した。



(2)新奇サイトカイニン様分子の宿主植物体内での作用機作

構造決定された NC について研究分担者の西川が有機合成を行い、その物質を用いてサイトカイニン活性の検定を行った。シロイヌナズナへの投与によるマーカー遺伝子 (*Type-A ARR*) の発現誘導解析や出芽酵母を用いたアッセイ系など、複数の評価系を用いて既知のサイトカイニンとの活性の強さを比較した。また、NC で処理した時のトランスクリプトーム変化を RNAseq により解析することで NC の作用について知見を得た。

4. 研究成果

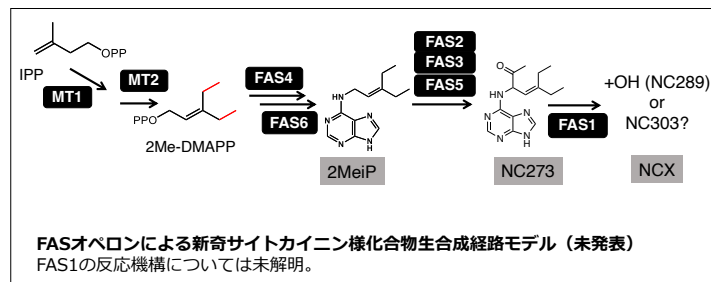
(1)植物病原菌 *R. fascians* の FAS 遺伝子クラスターが作り出す新奇サイトカイニン様分子の構造とその生合成経路の解明

大腸菌内で *FAS1*~*6* および *MT1*, *MT2* を様々な組合せで発現させ、その培養上清中に検出されるサイトカイニン様化合物ピークを詳細に解析した結果、FAS2, FAS3, FAS5 の 3 つの酵素に

よりプレニル側鎖にアセチル基が付加されることが明らかになった。さらに *in vitro* での酵素による反応生成物 (NC273) と有機合成化合物の NMR 分析での一致から構造を特定した。

上述の大腸菌での発現系による産物の解析では、*FAS* 遺伝子クラスターすべてを発現させたものと *FAS1* 遺伝子を除いたものとの間に検出ピークに違いを見出せなかったが、ヘテロ発現系であることから *FAS1* の機能が大腸菌発現系では十分に発揮されていないと考え、*in vitro* の系を用いることで *FAS1* (CYP450) の機能同定を進めた。

In vitro で基質化合物 NC273 と組換え *FAS1* 酵素タンパク質を反応させ、生成物の検出を行ったところ、NC289R と命名した化合物が検出された。そこでこの物質を酵素的に大量調製し、NMR 分析により構造の推定を行なった。そして有機合成によりこの物質を合成し、NMR 分析により構造同一性を確認した。さらに *R. fascians* を感染させたタバコからも NC273 および NC289R が検出されたことから、NC273 および NC289R が *R. fascians* が作り出す新奇サイトカイニン様分子であると結論づけた。ただし、*R. fascians* を感染させたタバコから検出された NC289R の蓄積量が中間代謝物である NC273 よりも少量であったことから、*in vitro* での反応生成物をさらに詳細に解析した結果、NC289R は最終産物である可能性は低く、*FAS1* は複数反応を触媒することで *m/z* 304 の化合物を生成する可能性が高いことが明らかとなった。*In vitro* での NC303 の大量調製を試みたが、反応のスケールアップ効率が上がらず NMR 解析に十分な量を確保することはできなかった。ただし Orbitrap を用いた精密質量分析により NC303 の組成式を予測することができた。



(2)新奇サイトカイニン様分子の宿主植物体内での作用機作

FAS 遺伝子クラスターが作り出す新奇サイトカイニン様分子の作用を明らかにするために、シロイヌナズナを用いてサイトカイニン誘導性マーカー遺伝子 (*ARR5* など) の発現誘導効果を調べた。その結果、NC273 は植物内在性のトランスゼアチンに比べ、*ARR5* 遺伝子発現誘導に必要な濃度は約十倍高く、NC289R はさらに高かった。さらにサイトカイニン受容体 *AHK4* を発現させた *sln1* 変異出芽酵母を用いたアッセイ法においても、トランスゼアチンに比べ NC273, NC289R の受容体への親和性は著しく低いことが示唆された。一方でシロイヌナズナの胚軸を用いたグリーンカルスアッセイにおいては、トランスゼアチンに比べ NC273の方がカルス誘導およびカルスからのシュート誘導効果が高く、さらに高濃度処理区におけるカルス誘導抑制効果は低いという興味深い結果が得られた。

NC273 処理による強いグリーンカルス誘導作用の作用点の情報を得るため、サイトカイニン受容体の変異株を用いてグリーンカルス誘導実験を行った。その結果、*ahk2ahk3* の二重変異体では野生型に比べ大きな違いは見られなかったものの、*ahk4* 変異体ではグリーンカルス誘導およびカルスからのシュート誘導が著しく阻害された。このことから NC273 は *AHK4* を介した情報伝達経路に作用していることが示唆された。また、NC273 処理によるトランスクリプトーム解析を行ったところ、その変動パターンから NC273 は植物体に少なくともサイトカイニン作用を及ぼしていること、細胞壁生合成や細胞分裂関連遺伝子の発現レベルを上昇させることが明らかになった。

以上の結果から、*R. fascians* は NC273 などの側鎖過修飾のサイトカイニン様分子を合成し、少なくともその作用の一部は AHK4 を介して leafy gall 形成誘導を引き起こしていることが示唆された。一方で *FAS* 遺伝子クラスターが合成する化合物の完全同定には至らなかった。ただし、これは FAS1 酵素の特徴的な触媒反応によるものであり、今後最終生成物の構造を明らかにすることで新奇の P450 酵素触媒反応の発見につながることを期待できる。*ARR* 遺伝子発現誘導や受容体への親和性が低いにも関わらず、サイトカイニン受容体 AHK4 を介して作用をしていることから、今後は NC の作用点についてさらに詳細に解析を進めることが必要である。

参考文献

- [1] Radhika, V, Ueda N, Tsuboi, Y, Kojima M, Kikuchi, J, Kudo T. and Sakakibara H. (2015) Methylated cytokinins from the phytopathogen *Rhodococcus fascians* mimic plant hormone. *Plant Physiol.* 169: 1118-1126.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tabata Ryo, Kamiya Takehiro, Imoto Shunpei, Tamura Hana, Ikuta Kumiko, Tabata Michika, Hirayama Tasuku, Tsukagoshi Hironaka, Tanoi Keitaro, Suzuki Takamasa, Hachiya Takushi, Sakakibara Hitoshi	4. 巻 63
2. 論文標題 Systemic Regulation of Iron Acquisition by Arabidopsis in Environments with Heterogeneous Iron Distributions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 842 ~ 854
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcac049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Perez Alonso Marta Marina, Guerrero Galan Carmen, Gonzalez Ortega Villaizan Adrian, Ortiz Garcia Paloma, Scholz Sandra S., Ramos Patricio, Sakakibara Hitoshi, Kiba Takatoshi, Ludwig Muller Jutta, Krapp Anne, Oelmuller Ralf, Vicente Carbajosa Jesus, Pollmann Stephan	4. 巻 45
2. 論文標題 The calcium sensor CBL7 is required for Serendipita indica induced growth stimulation in Arabidopsis thaliana, controlling defense against the endophyte and K+ homeostasis in the symbiosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant, Cell & Environment	6. 最初と最後の頁 3367 ~ 3382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pce.14420	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Umeda Masaaki, Ikeuchi Momoko, Ishikawa Masaki, Ito Toshiro, Nishihama Ryuichi, Kyojuka Junko, Torii Keiko U., Satake Akiko, Goshima Gohta, Sakakibara Hitoshi	4. 巻 106
2. 論文標題 Plant stem cell research is uncovering the secrets of longevity and persistent growth	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 326 ~ 335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tbj.15184	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakakibara Hitoshi	4. 巻 105
2. 論文標題 Cytokinin biosynthesis and transport for systemic nitrogen signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 421 ~ 430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tbj.15011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohtaka Kinuka, Yoshida Akiko, Kakei Yusuke, Fukui Kosuke, Kojima Mikiko, Takebayashi Yumiko, Yano Kanako, Imanishi Shunsuke, Sakakibara Hitoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Difference Between Day and Night Temperatures Affects Stem Elongation in Tomato (<i>Solanum lycopersicum</i>) Seedlings via Regulation of Gibberellin and Auxin Synthesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 577235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.577235	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hitoshi Sakakibara	4. 巻 54
2. 論文標題 Quantitative and qualitative tuning of cytokinin actions for plant growth regulation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 植物の生長調節	6. 最初と最後の頁 137-142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Muszynski Michael G., Moss-Taylor Lindsay, Chudalayandi Sivanandan, Cahill James, Del Valle-Echevarria Angel R., Alvarez-Castro Ignacio, Petefish Abby, Sakakibara Hitoshi, Krivosheev Dmitry M., Lomin Sergey N., Romanov Georgy A., Thamocharan Subbiah, Dam Thao, Li Bailin, Brugi?re Norbert	4. 巻 32
2. 論文標題 The Maize Hairy Sheath Frayed1 (Hsf1) Mutation Alters Leaf Patterning through Increased Cytokinin Signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 1501 ~ 1518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1105/tpc.19.00677	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Aki Shiori S, Mikami Tatsuya, Naramoto Satoshi, Nishihama Ryuichi, Ishizaki Kimitsune, Kojima Mikiko, Takebayashi Yumiko, Sakakibara Hitoshi, Kyojuka Junko, Kohchi Takayuki, Umeda Masaaki	4. 巻 60
2. 論文標題 Cytokinin Signaling Is Essential for Organ Formation in <i>Marchantia polymorpha</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1842 ~ 1854
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz100	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 宮田和輝、Alicia Surjana、小嶋美紀子、幸木謙典、西川俊夫、榊原均
2. 発表標題 fas遺伝子群が作り出す新奇サイトカイニンに関する研究
3. 学会等名 日本植物学会 第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮田和輝、吉野実花、Alicia Surjana、小嶋美紀子、幸木謙典、西川俊夫、榊原均
2. 発表標題 Leafy gall形成を引き起こす植物病原菌が合成するサイトカイニン様化合物の構造と生合成経路の解明
3. 学会等名 第64回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉野 実花、Alicia Surjana、小嶋 美紀子、幸木 謙典、西川 俊夫、榊原 均
2. 発表標題 Rhodococcus fasciansが作り出す新奇サイトカイニンの構造と機能の解明
3. 学会等名 日本植物学会 第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 榊原均
2. 発表標題 植物成長制御におけるサイトカイニン生合成と作用調節機構の研究
3. 学会等名 第64回 日本植物生理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 榊原均
2. 発表標題 植物ホルモン作用による植物成長調節のしくみ
3. 学会等名 グリーンDX プラズマコンソーシアム「アグリ・バイオ分野における基礎講座」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 榊原均
2. 発表標題 植物ホルモン生合成・シグナル伝達の理解からバイオマス生産向上へ
3. 学会等名 連続公開シンポジウム「SDGs達成に向けた農芸化学の挑戦」第4回 植物科学から持続可能な農業生産・ものづくりへ(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hitoshi Sakakibara
2. 発表標題 Importance of cytokinin biosynthesis and translocation in shoot apical meristem
3. 学会等名 日本植物学会大84回大会シンポジウム「Cell fate regulation via cell-cell communication」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sakakibara, H.
2. 発表標題 Structural variation of cytokinin controls the action specificity
3. 学会等名 The 23rd International Conference on Plant Growth Substances (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakakibara, H.
2. 発表標題 Importance of Structural Variation of Cytokinins for the Action Specificity in Plant Growth and Development
3. 学会等名 SERB workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakakibara, H.
2. 発表標題 Understanding plant optimized behavior in response to nitrogen nutrition
3. 学会等名 The 4th International Symposium on the Nitrogen Nutrition of Plants (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakakibara, H
2. 発表標題 Importance of structural variation of cytokinins for the action specificity in plant growth and development
3. 学会等名 Frontiers in plant environmental response research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Surjana, A., Takahata, M., Ueda, N., Kojima, M., Kouki, K., Nishikawa, T., Sakakibara, H.
2. 発表標題 Characterization of biosynthesis pathway and function of novel cytokinins produced by Rhodococcus fascians
3. 学会等名 The 23rd International Conference on Plant Growth Substances (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 牧野周、渡辺正夫、村井耕二、榎原均	4. 発行年 2022年
2. 出版社 講談社	5. 総ページ数 272
3. 書名 エッセンシャル植物生理学 農学系のための基礎	

〔産業財産権〕

〔その他〕

植物情報分子研究室HP https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~ck/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小嶋 美紀子 (小嶋美紀子) (Kojima Mikiko) (10634678)	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・専門技術員 (82401)	
研究分担者	西川 俊夫 (Nishikawa Toshio) (90208158)	名古屋大学・生命農学研究科・教授 (13901)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	工藤 卓二 (Kudo Takuji)	理化学研究所・バイオリソース研究センター・専任研究員 (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
スペイン	マドリッド工科大学			