

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H02892

研究課題名（和文）非古典的ストリゴラクトン生合成に関与するシトクロムP450酵素ファミリーの解析

研究課題名（英文）Investigation of non-canonical strigolactone biosynthesis in rice

研究代表者

増口 潔（Mashiguchi, Kiyoshi）

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：00569725

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,900,000円

研究成果の概要（和文）：カロテノイド由来の植物分子であるストリゴラクトンは、根圏ではアーバスキュラ菌根菌や根寄生植物に対するアレロケミカル、植物体内では枝分かれや老化などを制御する植物ホルモンとして多面的に機能する。これまでに様々な植物から四環性ストリゴラクトンが単離・同定されてきたが、最近になって非四環性ストリゴラクトンも存在することが明らかになりつつある。本研究では、四環性ストリゴラクトンを生合成することが知られていた栽培イネ（ジャポニカ亜種）より見出したシトクロムP450酸化酵素が、新規な非四環性ストリゴラクトン生合成酵素であ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

農業上の主要作物である栽培イネ（ジャポニカ亜種）において、新規なストリゴラクトン生合成酵素を発見するとともに、本酵素がこれまで不明だった非四環性ストリゴラクトンの生合成に重要な役割を果たすことを明らかにした。

本成果を契機に、イネをモデル植物として四環性と非四環性の各ストリゴラクトン分子種の根圏アレロケミカルや植物ホルモンとしての生理的役割の解明が進むと考えられる。また、他の植物種における本酵素ホモログの解析を行うことで、新たな非四環性ストリゴラクトンが明らかになる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The carotenoid-derived strigolactones (SLs) are a class of plant hormones that regulate various developmental processes such as shoot branching and senescence. They also have multiple roles as allelochemicals against arbuscular mycorrhizal fungi and root parasitic plants in the rhizosphere. Natural SLs are structurally divided into canonical SLs and non-canonical SLs with tetracyclic and non-tetracyclic structures, respectively.

It has been reported that canonical SLs, such as 4-deoxyorobanchol and orobanchol, are biosynthesized in rice. In this study, we identified a cytochrome P450 monooxygenase that plays an important role in the production of non-canonical SLs in rice.

研究分野：植物生化学

キーワード：植物ホルモン ストリゴラクトン 生合成 イネ

1. 研究開始当初の背景

ストリゴラクトンは、1960年代に根寄生植物の種子発芽誘導物質としてワタから単離されたストリゴール(図1)とその類縁体の総称である。さらに2000年代になって、ストリゴラクトンが植物共生菌であるアーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐を誘導することや、植物の枝分かれなどを制御することが示された。すなわちストリゴラクトンは、根圏ではアレロケミカル、植物体内では植物ホルモンとして多面的に機能する生理活性分子である。

ストリゴラクトンの化学構造は多様である。最初に発見されたストリゴールをはじめとして、これまで様々な植物からA環からD環までを有する四環性のストリゴラクトンが同定されてきた(図1)。一方、2014年以降、ヘリオラクトン(ヒマワリ)、ジラクトン(トウモロコシ)、アベナオール(カラスムギ)といった、D環のみが保存されているストリゴラクトン(非四環性ストリゴラクトン)が様々な植物種から報告されていた(図1)。しかし、研究開始当初において、非四環性ストリゴラクトンの生合成機構はほぼ未解明であった。

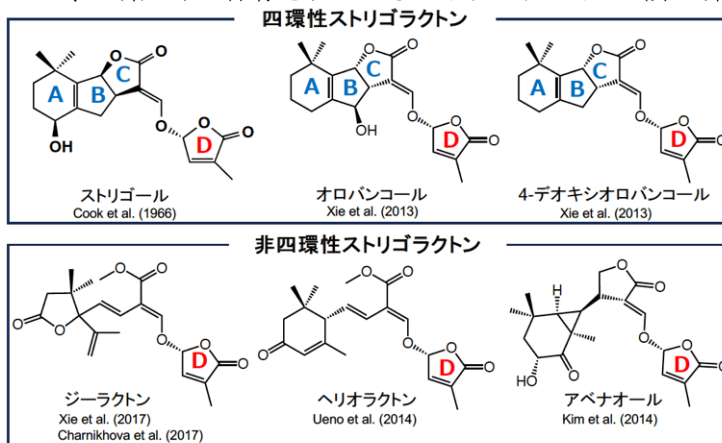


図1. ストリゴラクトンの化学構造

2. 研究の目的

本研究では、予備研究の中で栽培イネのジャポニカ亜種より見出し、非四環性ストリゴラクトンの生合成に関与する可能性が高いシトクロムP450酸化酵素(P450)を足がかりにして、非四環性ストリゴラクトン類が、植物体内でどのように生合成され、どのような機能を有するかという点を追究し、ストリゴラクトンの生合成と代謝に新しい知見を加えることを目的とした。

本研究で研究対象にするイネでは、P450であるCYP711Aサブファミリーに属するCYP711A2とCYP711A3によって、生合成中間体であるカーラクトン酸から2種の四環性ストリゴラクトン(4-デオキシオロバンコールとオロバンコール)が生合成されることが2014年に報告されていたものの、イネの非四環性ストリゴラクトンについては未解明であった(図2)。そのため、イネの非四環性ストリゴラクトン生合成酵素を明らかにすることによって、将来的に四環性ストリゴラクトンと非四環性ストリゴラクトンの生理的役割の解明が進むと考えられた。

3. 研究の方法

(1) 酵母を用いて上記のP450を異種発現させ、組換え酵素が局在するミクロソーム画分を精製し、ストリゴラクトン関連化合物を基質とした酵素反応試験を行った。

(2) イネの水耕液や植物体抽出物を固相抽出カラムなどで精製後、液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)を用いて分析することで、方法(1)で見られた酵素反応産物が実際に植物内生に存在するかを検討した。

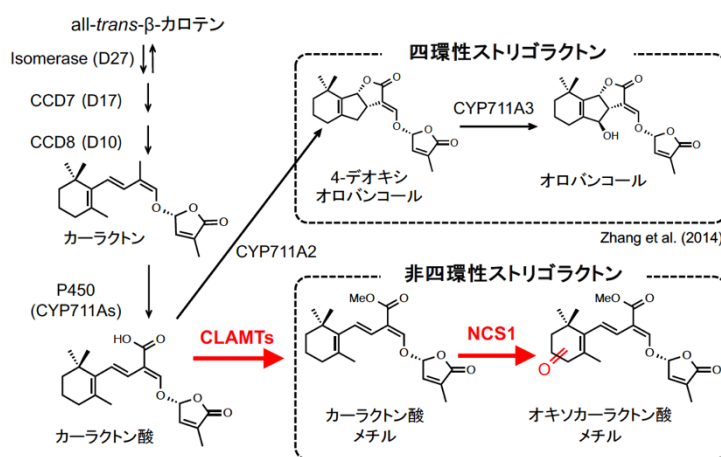


図2. イネのストリゴラクトン生合成経路(本研究で解明した部分を含む)

(3) P450遺伝子の破壊株をCRISPR/Cas9によって作出し、方法(1)で見られた酵素反応産物の内生量をLC-MS/MSを用いて調査した。また、シロイヌナズナを用いてP450遺伝子の過剰発現株を作製した。

(4) 双子葉モデル植物のシロイヌナズナにおける当該P450ホモログについて、組換え酵素を用いた酵素反応試験と過剰発現株の作製を行った。

4. 研究成果

(1) P450の組換え酵素を調製し、ストリゴラクトン関連化合物に対する酵素活性を検証した

ところ、本酵素タンパク質はストリゴラクトン生合成中間体であるカーラクトンや活性型ストリゴラクトンの 1 つと考えられているカーラクトン酸メチルを、それぞれ複数の代謝産物へと変換した。一方、カーラクトン酸に対する反応性は低いことが明らかとなった。

(2) LC-MS/MS 分析において、成果 (1) でカーラクトン酸メチルを基質にした場合の酵素反応産物の 1 つ (化合物 1) が、イネ (野生型) の水耕液から明瞭に検出された一方、ストリゴラクトン欠損変異体 *d17* の水耕液からは検出されなかった (図 3)。また、イネの根抽出物からは、化合物 1 だけではなく、カーラクトンとカーラクトン酸メチルを基質に見られた他の代謝産物 (それぞれ化合物 2 と化合物 3 とする) も検出された。なお、化合物 3 はストリゴラクトン生合成が恒常的に活性化しているストリゴラクトン受容体欠損変異体 *d14* の水耕液では明瞭に検出された。

次に、大阪公立大学・秋山康紀教授との共同研究により入手した合成標品との比較解析を行なった結果、化合物 1 はオキシカーラクトン酸メチル、化合物 3 は水酸化カーラクトン酸メチルと LC-MS/MS における保持時間とフラグメントイオンパターンが一致することが明らかとなった。そのため、当該 P450 を NCS1 (Non-canonical strigolactone synthase1) と命名した (図 2)。NCS1 はカーラクトン酸メチルを 2 段階酸化することでオキシカーラクトン酸メチルを合成する酵素であり、水酸化カーラクトン酸メチルはその酵素反応中間体であることが予想された。

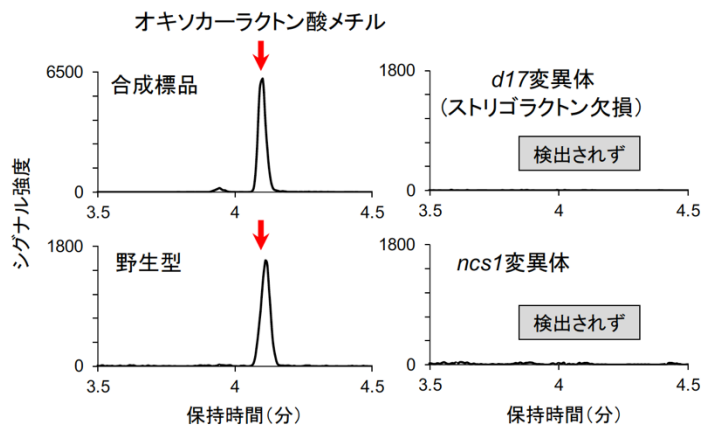


図3. イネの根抽出液を用いたオキシカーラクトン酸メチルの定性分析

(3) CRISPR/Cas9 を用いて *NCS1* 破壊株 2 ラインを作製し、Cas9 遺伝子が除去されたホモ変異体を選抜した。*NCS1* 破壊株の水耕液や根抽出物を分析したところ、成果 (2) の化合物 1~3 は検出されなかった (図 3)。このことから、*NCS1* はイネにおけるオキシカーラクトン酸メチルや水酸化カーラクトン酸メチルの生合成に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

次に *NCS1* 破壊株の表現型解析を行なった。その結果、野生型と比較して、分げつ数や根の成長に大きな違いは観察されず、オキシカーラクトン酸メチルや水酸化カーラクトン酸メチルが植物ホルモンとして機能していないことが示唆された。しかし、*NCS1* 破壊株の根では *NCS1* の基質であるカーラクトン酸メチルだけではなく、四環性ストリゴラクトンである 4-デオキシオロバンコールが有意に蓄積しており、これらの化合物がオキシカーラクトン酸メチルや水酸化カーラクトン酸メチルの欠損を相補した可能性も考えられる。オキシカーラクトン酸メチルや水酸化カーラクトン酸メチルの植物ホルモン活性の有無については今後さらなる検証が必要である。

一方、カーラクトン酸からカーラクトン酸メチルへの変換酵素であり、非四環性ストリゴラクトンの生合成に重要であるカーラクトン酸メチル化酵素 (CLAMT) の機能解析を進め、シロイヌナズナでは CLAMT が枝分かれ抑制ホルモンの生合成に必要であることを研究期間中に論文発表した (Mashiguchi et al. 2022)。このシロイヌナズナにおいて、*NCS1* 遺伝子を異種的に過剰発現させた場合、野生型と比較して枝分かれ数が増加した。シロイヌナズナでは四環性ストリゴラクトンは存在しないと考えられており、*NCS1* の過剰発現により活性型の 1 つであると考えられているカーラクトン酸メチル量が減少したことが枝分かれ増加の原因であることが示唆された。すなわちオキシカーラクトン酸メチルや水酸化カーラクトン酸メチルの植物ホルモン活性 (枝分かれ抑制活性) はカーラクトン酸メチルよりも弱い可能性が考えられるが、本仮説についても今後の検証が必要である。

(4) シロイヌナズナにも *NCS1* のホモログが複数存在する。酵母を用いてこれらの組換え酵素を異種発現させ、粗酵素液を用いてストリゴラクトン関連化合物を基質とした酵素反応試験を行ったが、いずれの粗酵素液にも明瞭な変換活性は認められなかった。

次に、これらの酵素遺伝子をシロイヌナズナで過剰発現させたところ、これらのうち 1 種の過剰発現体の独立した複数ラインにおいて、野生型と比較して枝分かれ数が減少することが明らかとなった。今後、本酵素の酵素活性を再検証するとともに、過剰発現体におけるストリゴラクトン関連化合物の定量を行うことで、本酵素がストリゴラクトン代謝に関与しているのか明らかにする必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5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 Kodama K, Rich MK, Yoda A, Shimazaki S, Xie X, Akiyama K, Mizuno Y, Komatsu A, Luo Y, Suzuki H, Kameoka H, Libourel C, Keller J, Sakakibara K, Nishiyama T, Nakagawa T, Mashiguchi K, Uchida K, Yoneyama K, Tanaka Y, Yamaguchi S, Shimamura M, Delaux PM, Nomura T, Kyojuka J	4. 巻 13
2. 論文標題 An ancestral function of strigolactones as symbiotic rhizosphere signals	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3974
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-31708-3	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 増口潔, 瀬戸義哉, 山口信次郎	4. 巻 80 (6)
2. 論文標題 植物の枝分かれ調節ホルモン生成における鍵酵素の発見	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 480 - 482
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 Mashiguchi Kiyoshi, Seto Yoshiya, Onozuka Yuta, Suzuki Sarina, Takemoto Kiyoko, Wang Yanting, Dong Lemeng, Asami Kei, Noda Ryota, Kisugi Takaya, Kitaoka Naoki, Akiyama Kohki, Bouwmeester Harro, Yamaguchi Shinjiro	4. 巻 119
2. 論文標題 A carlactonoic acid methyltransferase that contributes to the inhibition of shoot branching in Arabidopsis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 e2111565119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2111565119	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 Mashiguchi Kiyoshi, Seto Yoshiya, Yamaguchi Shinjiro	4. 巻 105
2. 論文標題 Strigolactone biosynthesis, transport and perception	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 335 - 350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.15059	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 増口潔, 櫻井優姫, 北岡直樹, 山口信次郎
2. 発表標題 イネにおけるカーラクトン酸メチル基転移酵素の機能解析
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 増口潔, 小林峻大, 北岡直樹, 谷口浩規, 橋田丈徳, 徳永浩樹, 経塚淳子, 秋山康紀, 山口信次郎
2. 発表標題 イネにおける非典型的ストリゴラクトン生合成酵素の機能解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mashiguchi K, Morita R, Tanaka K, Kameoka H, Kyojuka J, Seto Y, Yamaguchi S
2. 発表標題 Activation of strigolactone biosynthesis by the DWARF14-LIKE pathway in rice
3. 学会等名 PacifiChem 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹本貴世子, 鈴木紗理奈, 野田涼太, 増口潔, 山口信次郎
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるCLAMTとLBOが関与するストリゴラクトン生合成の解析
3. 学会等名 植物化学調節学会第55回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林峻大, 北岡直樹, 森愛美, 橋田丈徳, 徳永浩樹, 経塚淳子, 秋山康紀, 増口潔, 山口信次郎
2. 発表標題 イネにおける新規ストリゴラクトン生合成酵素の機能解析
3. 学会等名 植物化学調節学会第54回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増口潔, 森田諒, 田中海, 亀岡啓, 経塚淳子, 瀬戸義哉, 山口信次郎
2. 発表標題 DWARF14-LIKE経路はストリゴラクトン生合成を制御する
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

所属研究室ホームページ https://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~plant/index.html 研究成果の紹介ページ https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2022-03-30-0

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
研究協力者	秋山 康紀 (Akiyama Kohki)	大阪公立大学・大学院農学研究科・教授 (24405)	

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			
オランダ	University of Amsterdam			