

令和 6 年 9 月 20 日現在

機関番号：12401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2020～2023

課題番号：19KK0395

研究課題名（和文）植物におけるストリゴラクトン生合成及びその調節機構の解明

研究課題名（英文）Strigolactone biosynthesis and its regulation mechanism in plant

研究代表者

米山 香織（Yoneyama, Kaori）

埼玉大学・研究機構・准教授

研究者番号：20769997

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,700,000円

渡航期間： 11ヶ月

研究成果の概要（和文）：ストリゴラクトン(SL)は、植物の生長・分化を制御する、農業生産においても注目度が高い、極めて重要な二次代謝産物である。これまでにシロイヌナズナのSL生合成経路において最も下流で作用しているLBO (LATERAL BRANCHING OXIDOREDUCTASE) の酵素機能などを明らかにしてきた。本課題では、LBOのクレードに近接する4つの遺伝子にコードされている、機能未知であるジオキシゲナーゼのノックアウトラインをCRISPR/Cas9により作成、地上部枝分れ表現型を精査し、地上部枝分かれに関与する新奇SL生合成遺伝子の単離に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

地上部枝分かれ制御は作物の質的・量的制限に直結する農業生産上重要な形質の一つであるが、その制御メカニズムはほとんど明らかにされていない。本課題成果は、地上部枝分かれ抑制活性本体の単離構造決定につながるものであり、SL生合成経路の全貌およびその調節メカニズムの解明という学術的意義だけでなく、SL生産制御を介した画期的な農業技術の確立という社会的意義を与えるものである。

研究成果の概要（英文）：Strigolactone (SL) is one of important secondary metabolites which regulate plant growth and development. We have previously demonstrated that enzymatic function of Arabidopsis LBO (LATERAL BRANCHING OXIDOREDUCTASE) acting downstream of SL biosynthetic pathway. In the present project, we generated four knockout lines of dioxygenase encoded by genes closed to the LBO clade and examined their shoot branching phenotypes.

研究分野：植物制御化学

キーワード：ストリゴラクトン シロイヌナズナ

## 1. 研究開始当初の背景

ストリゴラクトン(SL)は、2008年に、植物の地上部枝分かれを抑制する新奇植物ホルモンとして報告された。その後 SL は、根の形態形成、二次成長、葉の老化促進など、植物の生長・分化に深く関与していることが明らかとなり、SL 研究の重要性はますます高まっている。一方、根から分泌された SL は、土壌根圏で有用微生物であるアーバスキュラー菌根菌(AM 菌)の共生開始シグナルとして働くと共に、世界の農業生産に甚大な被害を与えている根寄生雑草の共生開始シグナル(根寄生雑草種子の発芽は SL によって誘導される)として機能している。

多くの研究者が SL に興味を抱き、その重要性を認識しているものの、SL は化学的に不安定で植物の生産・分泌量も極めて微量であるため、その生合成経路、生合成・分泌調節メカニズムの詳細には不明な点が多い。また、現在でも植物ホルモンの活性本体は特定されていない。AM 菌の宿主植物では、養分欠乏、特にリン酸欠乏条件下で AM 菌の宿主認識シグナルである SL の生産・分泌が飛躍的に促進される。一方、AM 菌の非宿主植物であるシロイヌナズナでは、養分欠乏条件下でも SL の生産・分泌は変動しないと考えられているが、シロイヌナズナの主要な SL が、ABC 環構造をもたない不安定な非典型的 SL であるため化学分析が難しく、詳細な解析は行われていない。

シロイヌナズナの SL 生合成酵素遺伝子として、カロテノイドイソメラーゼをコードする AtD27、カロテノイド酸化開裂酵素をコードする MAX3 (CCD7)および MAX4 (CCD8)、シトクローム P450 をコードする MAX1 (CYP711A1) が報告されている。これらの遺伝子の欠損変異体は、野生種と比べて地上部の過剰な枝分かれを示す。国外の研究グループによって、AtD27、MAX3、MAX4 酵素の連続的な反応により、 $\beta$ -カロテンから SL 生合成中間体であるカーラクトン(CL)が生成することが示された。申請者が参画したグループでは、MAX1 は CL を酸化してカーラクトン酸(CLA)を生成する酵素であることを明らかにした。更に、シロイヌナズナだけでなく、トマト、トウモロコシ、ポプラ、イヌカタヒバなどの MAX1 ホモログにおいても、CL から CLA への変換反応が高く保存されていることを報告した。オーストラリア・クイーンズランド大学の Christine Beveridge 教授の研究グループは、シロイヌナズナにおいて SL 生合成遺伝子と共発現している遺伝子を探索し、2-オキシグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼをコードしている LATERAL BRANCHING OXIDOREDUCTASE (LBO)を新奇 SL 生合成関連遺伝子として単離した。申請者は、特別研究員として Beveridge 教授の研究室に所属して以来、LBO の機能解明のための共同研究を行っている。シロイヌナズナの *lbo* 欠損変異体を用いた接木実験により、LBO は MAX1 の下流で作用することがわかった。更に申請者は、*lbo* 変異体では、CL とカーラクトン酸メチル(MeCLA)が蓄積しており、大腸菌発現系において LBO タンパク質は、MeCLA を基質として[MeCLA+16 Da]の代謝物を生成していることを明らかにした。その後、各種機器分析を用いて、この LBO 代謝物はカーラクトン酸ヒドロキシメチル(1'-HO-MeCLA)であること、また、特筆すべき点として、1'-HO-MeCLA は、シロイヌナズナの内生物質として根部だけではなく地上部基部に存在することを明らかにした。これまで SL の同定は根部でのみ行われてきたが、地上部基部にも存在し、シロイヌナズナの場合は根と地上部基部で内生 SL 量に差が認められないことを示した。しかしながら、1'-HO-MeCLA の化学的不安定性から現時点では有機合成が不可能であり、その地上部枝分かれ抑制活性を調べるには至らなかった。1'-HO-MeCLA は植物内生 SL として存在するが、その反応性の高さから、更に、(未知の)酵素の作用によって枝分かれ抑制活性本体が生成される可能性が考えられた。

そのような中、米国カリフォルニア大学の David Nelson 准教授から、新奇 SL 生合成遺伝子の可能性があるジオキシゲナーゼの存在を教示された。Nelson 准教授は、植物遺伝学が専門であり、分子生物学的解析に造詣が深い。SL の受容・シグナル伝達機構解明について世界的にも著名な研究者の一人である。しかしながら、申請者が得意とする酵素化学的解析および内生 SL を調べる技術はない。SL の研究は海外との競争が激しい。特に、SL の生合成経路の解明のためには、分子生物学、植物生理学、生物有機化学、合成化学など多岐にわたる専門分野を総合する必要があり、国内外の複数の研究グループの共同研究として進められている。すなわち、SL 生合成およびその調節機構の解明に関する研究を飛躍的に発展させるためには、特に生物有機化学的手法を得意とする申請者と、最先端の分子生物学的手法に優れ、基課題研究の発展性の方向を教示して頂いた Nelson 准教授との国際共同研究の推進が強く求められた。

## 2. 研究の目的

本国際共同研究の課題では、シロイヌナズナの SL 生合成経路の全貌解明をめざし、シロイヌナズナにおける新奇ジオキシゲナーゼの酵素機能を明らかにすること目的として行なった。

## 3. 研究の方法

(1)シロイヌナズナのストリゴラクトンは特に化学的に不安定で、また生成量も微量であることからその生合成制御メカニズムが全く明らかにされていない。そこで養分欠乏条件を第一の候補として、シロイヌナズナの SL 生合成を促進する条件を見出すため、窒素欠乏がシロイヌナズナの SL 生合成に与える影響を精査した。

(2)前述したように、シロイヌナズナの地上部枝分かれ抑制活性本体の生成には、LBO 以外の酵素が関与している可能性が示唆された。そこで新奇ジオキシゲナーゼの酵素機能を明らかにするため、これまでに LBO で行った方法と同様に、これら新奇ジオキシゲナーゼの大腸菌発現系

を構築し、代謝実験を行った。

(3)米国(UC Riverside)では、CRISPR/Cas9 を用いて、ジオキシゲナーゼ欠損変異体を作成し、表現型を調査すると共に、粗抽出物サンプルを調製して持ち帰り、日本で内生 SL を精査した。

#### 4. 研究成果

(1)窒素欠乏条件下で培養した Col-0 の地上部基部及び根の、SL 生合成・受容シグナル伝達遺伝子の 1 日の発現量変化を調べたところ、全体的に窒素欠乏処理でほぼ全ての SL 生合成遺伝子の発現量増加が認められた。その時間軸での変化は各遺伝子、発現部位で異なったが、ほぼ全ての遺伝子発現は朝の時間帯に高まっていた。この SL 生合成遺伝子の発現量と内生 SL 含量の変化を比較するため、SL 検出を試みたが、本条件ではどのサンプルからも SL は検出限界以下であった。そこで次に、長期的に窒素欠乏で培養した Col-0 の地上部基部及び根の、SL 生合成・受容シグナル伝達遺伝子の発現量変化を、主茎発生前、地上部枝分かれ発生前、地上部枝分かれ表現型明確直後の 3 回で調べた。その結果、明確な SL 生合成発現遺伝子の顕著な増加は、地上部枝分かれ表現型明確直後に認められた。SL 内生量は、主茎発生前、地上部枝分かれ発生前では検出限界以下のサンプルが多かったが、地上部枝分かれ表現型明確直後のサンプル方は安定的に SL を検出することができることが明らかになった。

(2)新奇ジオキシゲナーゼの大腸菌発現系を構築し、CL, CLA, MeCLA を基質として与えて代謝実験を行ったところ、これらの基質は消費されないことを確認した。しかし、冷凍保存していた MeCLA が全て分解してしまい供給源の確保ができず、より詳細な解析を進めることができなかった。しかし 2023 年度に異動した埼玉大学で、無細胞翻訳系を用いたタンパク質合成をメインテーマとして取り組んでいる戸澤先生との共同研究で、CL, CLA, MeCLA の効率良い合成方法に取りかかり、CL の大量合成まで確立することができた。

(3)米国(UC Riverside)では、4 つの変異体を得て、地上部枝分かれ表現型を確認することができただけでなく、トマトなどで報告がある新奇 SL 生合成遺伝子 CYP722C の evolutionary predecessor である CYP722A は、CLA から 16-OH-CLA への変換に関与することを明らかにすることができた。さらに、ストリゴラクトンの生合成・分泌調節メカニズムの解明につながる実験系において得られた RNA-seq データのドライ解析を進め、次の研究発展につながる技法を獲得する事ができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 9件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Vinde MH, Cao D, Chesterfield RJ, Yoneyama K*, Gumulya Y, Thomson RES, Matila T, Ebert BE, Beveridge CA, Vickers CE, Gillam EMJ	4. 巻 235
2. 論文標題 Ancestral sequence reconstruction of the CYP711 family reveals functional divergence in strigolactone biosynthetic enzymes associated with gene duplication events in monocot grasses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 New Phytol	6. 最初と最後の頁 1900-1912
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.18285	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 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 P, Nomura T, Kyojuka J	4. 巻 13
2. 論文標題 Ancestral function of strigolactones as symbiotic rhizosphere signals	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nat. Commun	6. 最初と最後の頁 1-15
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 -
1. 著者名 Wheeldon CD, Hamon-Josse M, Lund H, Yoneyama K*, Bennett T	4. 巻 32
2. 論文標題 Environmental strigolactone drives early growth responses to neighbouring plants and soil volume in pea	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Curr. Biol	6. 最初と最後の頁 3593-3600
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2022.06.063	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 Yoneyama K*, Xie X, Nomura T, Yoneyama K, Bennett T	4. 巻 32
2. 論文標題 Supra-organismal regulation of strigolactone exudation and plant development in rice in response to rhizospheric cues	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Curr. Biol	6. 最初と最後の頁 3601-3608
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2022.06.047	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 該当する

1. 著者名 Cao D, Barbier F, Yoneyama K *, Beveridge CA	4. 巻 12
2. 論文標題 Extraction and Quantification of Plant Hormones and RNA from Pea Axillary Buds	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bio-protocol	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.605069	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 Yoda Akiyoshi, Mori Narumi, Akiyama Kohki, Kikuchi Mayu, Xie Xiaonan, Miura Kenji, Yoneyama Kaori, Sato Izawa Kanna, Yamaguchi Shinjiro, Yoneyama Koichi, Nelson David C., Nomura Takahito	4. 巻 232
2. 論文標題 Strigolactone biosynthesis catalyzed by cytochrome P450 and sulfotransferase in sorghum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 1999 ~ 2010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.17737	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 Yoneyama Kaori, Brewer Philip B	4. 巻 63
2. 論文標題 Strigolactones, how are they synthesized to regulate plant growth and development?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Opinion in Plant Biology	6. 最初と最後の頁 102072 ~ 102072
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pbi.2021.102072	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 Miura Hinako, Ochi Ryota, Nishiwaki Hisashi, Yamauchi Satoshi, Xie Xiaonan, Nakamura Hidemitsu, Yoneyama Koichi, Yoneyama Kaori	4. 巻 11
2. 論文標題 Germination Stimulant Activity of Isothiocyanates on <i>Phelipanche</i> spp.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 606 ~ 606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants11050606	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 Ochi Ryota, Yoneyama Kaori, Nishiwaki Hisashi, Yamauchi Satoshi	4. 巻 86
2. 論文標題 Structure activity relationship of the aromatic moiety of 6-substituted 5,6-dihydro-2H-pyran-2-one to find the novel compound showing higher plant growth inhibitory activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 165 ~ 169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab185	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 米山 香織	4. 巻 46
2. 論文標題 ストリゴラクトン生合成経路と地上部枝分かれ抑制活性本体の解明-地上部枝分かれ抑制活性本体を追え-	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 農業学会誌	6. 最初と最後の頁 177 ~ 178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1584/jpestics.W21-16	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 Yoneyama Kaori, Xie Xiaonan, Nomura Takahito, Yoneyama Koichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Do Phosphate and Cytokinin Interact to Regulate Strigolactone Biosynthesis or Act Independently?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.00438	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 Yoneyama Kaori, Akiyama Kohki, Brewer Philip B., Mori Narumi, Kawano Kawada Miyuki, Haruta Shinsuke, Nishiwaki Hisashi, Yamauchi Satoshi, Xie Xiaonan, Umehara Mikiyama, Beveridge Christine A., Yoneyama Koichi, Nomura Takahito	4. 巻 4
2. 論文標題 Hydroxyl carlactone derivatives are predominant strigolactones in Arabidopsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Direct	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pld3.219	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 該当する

1. 著者名 Yoneyama K, Bennett T	4. 巻 77
2. 論文標題 Whispers in the dark: Signals regulating underground plant-plant interactions	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Curr Opin Plant Biol	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pbi.2023.102456	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 該当する

1. 著者名 Yoda A, Xie X, Yoneyama K, Miura K, McErlean C, Nomura T	4. 巻 64
2. 論文標題 A stereoselective strigolactone biosynthesis catalyzed by a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase in sorghum	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol	6. 最初と最後の頁 1034-1045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcad060	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 該当する

1. 著者名 米山香織	4. 巻 58
2. 論文標題 植物間コミュニケーションにおけるストリゴラク톤の新しい機能	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 植物の生長調節	6. 最初と最後の頁 100-104
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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 米山香織
2. 発表標題 ストリゴラク톤生産・分泌の環境応答
3. 学会等名 日本植物生理学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米山香織
2. 発表標題 根圏に分泌されるストリゴラクトンの新たな機能とその分泌制御メカニズム
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kaori Yoneyama
2. 発表標題 The Possibility of Strigolactones for Plant-Plant Communication
3. 学会等名 3rd International Congress on Strigolactones（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kaori Yoneyama
2. 発表標題 Strigolactones, how are they synthesized to regulate plant growth and development?
3. 学会等名 IRN France-Japan Frontiers in Plant Biology on “Photosynthesis and Metabolism”（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦妃奈子、米山香織
2. 発表標題 イソチオシアネートによる根寄生雑草の発芽刺激活性
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本・中四国・関西支部 2021年度合同大会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 Kaori Yoneyama
2. 発表標題 Regulation of strigolactone biosynthesis/exudation
3. 学会等名 The 24th International Conference on Plant Growth Substances (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 米山香織
2. 発表標題 ストリゴラクトンを介した植物間の根圏コミュニケーション
3. 学会等名 日本植物学会第87回大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 下田萌乃、Tom Bennett、米山香織
2. 発表標題 トリゴラクトンを介したポット容量認識
3. 学会等名 植物化学調節学会第58回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 崎岡莉子、黒瀬凌、米山香織
2. 発表標題 養分条件がシロイヌナズナのストリゴラクトン生合成に与える影響
3. 学会等名 植物化学調節学会第58回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井上舞子、Philip Brewer、謝肖男、黒岩風、戸澤謙、米山香織
2. 発表標題 ストリゴラクトン生合成に関するオオムギLB0の機能解析
3. 学会等名 植物化学調節学会第58回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 米山香織
2. 発表標題 植物-植物コミュニケーションを利用した作物の耐性強化を目指して
3. 学会等名 令和5年度日本学術会議公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ネルソン デイビッド  (Nelson David)	カリフォルニア大学リバーサイド校・Botany and Plant Sciences Dept・Associate Professor	

	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
その他の研究協力者	ベネット トム  (Bennett Tom)	リーズ大学・School of Biology・Associate Professor	

6. 研究組織（つづき）

	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
その他の研究協力者	ブリューアー フィリップ  (Brewer Phillip)	アデレード大学・Waite research institute・senior postdoc	

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			
米国	University of California, Riverside			
英国	University of Leeds			
オーストラリア	University of Adelaid			