

令和 5 年 5 月 20 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02925

研究課題名(和文) 菌根共生を制御するKAI2受容体リガンドの同定とその共生制御機構の解明

研究課題名(英文) Isolation and identification of a yet-unknown plant hormone, KAI2 ligand, from Lotus japonicus

研究代表者

秋山 康紀 (Akiyama, Kohki)

大阪公立大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：20285307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：KAI2リガンド(KAI2 ligand, KL)は、KAI2受容体を活性化する未知の植物ホルモンの仮称であり、発芽や葉・根の形態形成、アーバスキュラー菌根菌との共生など多様な役割を担う。本研究では、ミヤコグサkai2a変異体からDLK2遺伝子発現を指標としたバイオアッセイにより分取HPLCにより精製を進め、KL候補を2つのピークにまで絞り込んだ。そのうちの1つは酵母ツーハイブリッドアッセイにおいてKAI2aとSMA1の相互作用を誘導したことからKL本体であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界の複数のグループが10年以上にわたりKLの同定を試みているが、これまでに単離されていない。本研究において、同定までは至らなかったものの、ピークの特定にまで漕ぎ着けたことは大きな進歩である。精製過程において、KL活性がどの画分にも見られなくなる状況に何度も陥ったことから、KLは化学的に不安定であり、且つ、トリッキーなクロマト挙動を示すことが分かった。今後、さらにKLの化学的性状に関する理解を深め、障壁を克服することでKL同定は達成されると見込まれる。KLは、植物のストレス耐性や菌根共生に関与するので、その研究成果は新たな植物生産技術や成長調節物質の開発に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：The KAI2 ligand (KL) is a provisional name for an elusive plant hormone that activates the KARRIKIN-INSENSITIVE2 (KAI2) receptors and plays crucial roles in various plant processes such as germination, leaf and root development, as well as symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi. In this study, we conducted chromatographic purification of KL from the Lotus japonicus kai2a mutant using a bioassay that utilized DLK2 gene expression as a marker in germinating seeds of L. japonicus. As a result, we identified two peaks as candidates for KL. One of these peaks was found to induce the interaction between LjKAI2a and LjSMA1 in a yeast two-hybrid assay, suggesting its identity as the KL molecule.

研究分野：天然物化学・生物有機化学

キーワード：KAI2リガンド カリキン ストリゴラクトン 植物ホルモン アーバスキュラー菌根菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

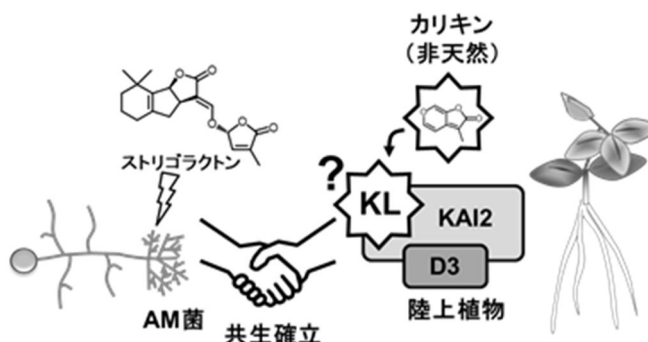
1. 研究開始当初の背景

AM 菌は根の皮層細胞内に樹枝状体(arbuscule)と呼ばれる栄養交換器官を形成することからその名が付けられている。AM 菌は根の外に伸ばした菌糸で土壤中のリン酸や窒素、ミネラルを吸収し、樹枝状体を介して宿主植物に与え、自らは植物から糖や脂質などの有機炭素を受け取る。AM 菌のルーツは古く、植物が陸上に進出した約 4 億 6 千万年前のオルドビス紀とされる。無機栄養素が極めて限られた陸上で植物が生存していくのに、AM 菌は絶対的な役割を果たしてきたと考えられている。AM 菌は単独ではほとんど生育できず、次世代の胞子も形成できない絶対共生菌である。よって、AM 菌にとっても植物との共生は生存し子孫を残すのに絶対に必要である。こうして陸上植物の進化を支える形で AM 菌は生存し続け、現在では AM 菌との共生は 70% 以上もの陸上植物に見られ、自然生態系や農業における植物の生育に極めて重要な役割を果たしている。21 世紀の地球レベルの環境問題に対処しつつ、人類への食糧供給を維持するための環境負荷の低い次世代の栽培体系の一つとして AM 菌の活用研究が世界的に活発化している。

AM 菌は植物の根から分泌されるストリゴラクトン(strigolactone, SL) を共生シグナルとして感知し、根への感染・共生機構を活性化する。SL はストライガやオロバンキなどの根寄生植物の種子発芽を刺激する寄生シグナルとして同定されていたが、2005 年に我々が AM 菌に対する共生シグナルであることを明らかにした。さらに、我々を含む研究グループは SL がシュートの枝分かれを制御する新規の植物ホルモンであることも明らかにしている。SL はカロテノイドの酸化開裂から生合成されるテルペノイド化合物であり、これまでに天然から約 30 種が同定されている。

植物における SL のシグナル伝達の研究から派生する形で、AM 共生に必須の新たな植物化学因子の存在が最近になって明らかになった。植物の SL の受容体は $\alpha\beta$ 加水分解酵素ファミリーに属する D14 である。D14 が SL と結合すると F-box タンパク質である D3 と複合体を形成する。これにより転写抑制因子が分解され、抑制されていた遺伝子群が発現する。イネ *d14* 変異体に AM 菌を接種すると野生型に比べて感染率が増加する。これは受容体である D14 の変異により SL 生合成における負のフィードバック制御が失われ、SL の生産・分泌量が増加しているためと考えられる。ところが、イネ *d3* 変異体では *d14* 変異体と同様に SL の生産・分泌量が増加しているにもかかわらず、AM 菌の感染共生は強く抑制される。最近、*d3* 変異体に見られる共生異常が SL シグナル系ではなく、D3 を構成要素として共有するもう一つのシグナル系である KAI2/D14LIKE 系の異常に起因することが判明した。KAI2/D14LIKE は D14 とはパラログの関係にある $\alpha\beta$ 加水分解酵素ファミリーに属する受容体タンパク質であり、カリキンを受容する。カリキン依存的に KAI2/D14LIKE は D3 と複合体を形成して下流経路を活性化する。イネ *kai2/d14like* 変異体では *d3* 変異体と同様に AM 菌の感染が強く抑制され、

AM 菌の発芽胞子滲出物に対する転写応答も示さなくなる。カリキンは植物が燃焼した際に生成する非天然の発芽誘導物質であり、植物内生には存在しない。それにも関わらず KAI2 が変異すると植物には種々の表現型異常が現れる。このことから KAI2/D14LIKE に受容される新規の



KAI2リガンド(KL)はAM共生に必須の新規植物内生ホルモン

内生植物ホルモンの存在が示唆され、それは KAI2 リガンド(KAI2 ligand, KL)と呼ばれている。すなわち、KL は SL と同様に AM 共生の初期段階に關与する植物ホルモンということになる。KL はこれまでに単離されておらず、その化学的性状についても全く分かっていない。

SL が植物ホルモンであることが明らかになった当時、植物進化の歴史の中で SL は AM 菌に対する共生シグナルとして誕生したのか、それとも植物ホルモンとして誕生したのかがよく議論された。植物ホルモンは個体の維持に必須なので、当然、ホルモン機能が先なのではないかとされた。すなわち、SL は植物ホルモンとして誕生し、植物が陸上に進出した際に AM 菌が SL をシグナル物質として認識して共生するようになり、さらにその後、SL を寄生シグナルとして発芽する根寄生植物が現れた、というわけである。しかし、最近の比較ゲノミクス解析により、SL 生合成と AM 共生に必要な遺伝子群はコケ植物などの基部陸上植物にすでに存在し、以降の陸上植物すべてに広く保存されているのに対して、D14 遺伝子は種子植物にしか存在しないことが分かった。一方で、KAI2/D14LIKE と D3 遺伝子は車軸藻類や基部陸上植物から種子植物にまで広く保存されている。これらの事実から、SL は AM 共生シグナルとして最初に誕生し、KAI2/D14LIKE の遺伝子重複により種子植物で生じた D14 により受容され、KAI2/D14LIKE シグナル系の下流の D3 をリクルートすることで (AM 共生シグナルとしての機能は維持しつつ) 新たなホルモンとして機能を獲得したと考えることができる。すなわち、AM 共生の起源においては、SL は専らアレロケミカルとして機能しており、植物体内の AM 共生を制御していたホルモンは KL なのではないかということになる。よって、KL の化学的本体を明らかにすることは、AM 共生の進化的起源と共生の分子機構の理解に欠かせない課題である。

2 . 研究の目的

本研究では、未だ世界の誰も単離同定に成功していない KL を植物から精製・単離し、NMR や MS などのスペクトル解析、そして化学合成により調製した標品との比較により KL の化学構造を決定する。これら天然および合成標品を用いて LC-MS/MS による KL の高感度な分析法を開発する。決定した化学構造から KL の生合成の基質となる一次代謝産物や中間体を推定し、それら安定同位体標識化合物のフィーディング実験により KL の主要な生合成経路を解明すると共に、様々な生育条件下や生育段階における植物内生の KL 量を定量して KL の生産調節機構を明らかにする。さらに、AM 菌の植物への感染共生過程における KL の植物内での動態や KL の外部投与による AM 共生への影響などを詳細に解析することにより KL の AM 共生制御の分子機構を解明する。

3 . 研究の方法

KL の AM 共生制御の分子機構の解明を目的として、(1) 植物からの KL を精製・単離し、化学構造を決定する。続いて、(2) KL の主要な生合成経路の特定とその調節機構の解析、(3) AM 菌の植物への感染共生過程における KL の関与の解析を行う。

一般に植物ホルモンは低濃度で活性を示すので生体内に微量しか含まれない。よって、スペクトル解析で構造決定できる十分量を単離するためには、できるだけ内生量が高く、かつ継続的に抽出ソースを調達できる出発材料を選定する必要がある。そこで、本研究では負のフィードバック異常で KL を過剰生産することが期待される *kai2* 変異体を用いることとし、植物種としてはマメ科モデル植物であるミヤコグサ (*Lotus japonicus*) を使う。ミヤコグサは多年草であり、地上部や根を切除採集しても、再び生育するため、年間を通じて抽出ソースを確保できる。KAI2 シ

グナル活性化の評価は、ミヤコグサ発芽種子におけるカリキン誘導性の *D14LIKE2(DLK2)* 遺伝子の発現を qRT-PCR を用いて測定することにより行う (*in vivo* KL アッセイ)。ミヤコグサ *kai2* 変異体抽出物から KL アッセイにおける活性を指標に有機溶媒分画やクロマトグラフィーにより精製を行い、KL 活性物質を単離する。ミヤコグサ発芽種子を用いた *in vivo* アッセイでは、KL だけでなく、その生合成前駆体も活性を示すことが予想される。よって、単離した KL 活性物質について KAI2 と SMAX1 の KL 依存的な相互作用を利用した yeast two-hybrid アッセイを用いて、*in vitro* での KL 活性を評価する (*in vitro* KL アッセイ)。このアッセイでは、KAI2 に受容される物質が存在するときのみ、KAI2 と SMAX1 が結合し、酵母のコロニー生育が見られる。こうして真の内生 KL を単離した後、NMR や MS などのスペクトル解析を行い、化学構造を決定する。結晶性が良い場合は、X 線結晶解析も行って決定した構造を追加検証する。決定した構造に基づいて合成ルートを考案し、KL を化学合成により調製し、天然物とスペクトルデータを照合して構造を確定する。この際、LC-MS/MS での定量分析の内部標準として安定同位体標識 KL も合成する。

4. 研究成果

(1) ミヤコグサ *kai2a* 変異体の成个体抽出物から KL 活性物質の検出

始めに、KL 検出アッセイを構築する際のポジティブコントロールとして用いる KAR₁ を、コウジ酸を出発物質とする 7 段階の反応で合成した。ミヤコグサ野生株の発芽種子を合成 KAR₁ 1 μM で 6 時間処理し、ミヤコグサ DLK2 遺伝子の発現量を qRT-PCR により調べたところ、非処理区の約 4 倍の発現誘導が見られた。次に、ミヤコグサ抽出物について KAI2 シグナル活性化の評価を行った。数カ月間生育させたミヤコグサ *kai2a* 変異体の成个体から根、茎、葉のメタノール抽出物を調製し、DLK2 アッセイに供したところ、茎および根抽出物に有意な発現誘導が見られ、KL 活性物質が含まれることが示された。茎メタノール抽出物について酢酸エチル-水で分配操作を行い、DLK2 アッセイに供したところ、活性は酢酸エチル相に見られた。

(2) ミヤコグサ *kai2a* 変異体の発芽種子抽出物からの KL 活性物質の精製

KAI2 が発芽促進活性を持つことから、KL は植物の生育初期に生産量が多いと期待された。そこで、ミヤコグサ野生型の発芽種子抽出物を DLK2 アッセイに供したところ、推察通り KL 活性が確かめられた。次に、ミヤコグサ *kai2a* 変異体の発芽種子抽出物を同様にアッセイに供した結果、さらに内生量が高いことが分かった (図 1)。そこで、ミヤコグサ *kai2a* 変異体の発芽種子抽出物を KL 抽出ソースとして、活性画分をシリカゲルカラムや HPLC で精製を勧めた結果、KL 候補ピークを 1 つ特定した。

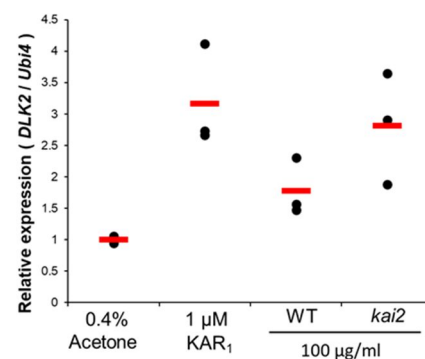


図 1. 野生型 (WT) と *kai2a* 変異体の発芽種子抽出物の DLK2 アッセイ

(3) ミヤコグサ *kai2a* 変異体の根分泌物から KL 活性物質の探索

水耕栽培したミヤコグサ *kai2a* 変異体の根分泌物からも KL 活性が確認された。そこで、ミヤコグサ *kai2a* 変異体の根分泌物を KL ソースとして KL 活性分子の精製を試みた。シリカゲルカラムや HPLC 精製をした結果、KL 候補ピークを 2 つ特定した。そのうちの片方は、(2) で特定した KL 候補ピークと同じであった。

(4) Yeast two-hybrid アッセイを用いた 2 つの KL 候補ピークの *in vitro* KL 活性評価

ミヤコグサ KAI2a と SMAX1 の KL 依存的な相互作用を利用した yeast two-hybrid (Y2H) アッセイによる *in vitro* での KL 活性評価系の構築を行った。Clontech 社の Matchmaker™ Gold 酵母ツーハイブリッド (Y2H) システムを用い、2 つのタンパク質が相互作用したときに転写活性化されるレポーター遺伝子 (HIS1、ADE1) の栄養要求性をもって、リガンド依存的相互作用の検出を行った。KAR₁ および合成ストリゴラクトンである 4 つの GR24 光学異性体を用いた予備実験では、*rac*-GR24 と GR24^{ent-5DS} で強い相互作用が見られた。GR24^{5DS} も中程度の陽性を示した。GR24^{4DO} でも弱い相互作用が検出されたが、KAR₁ と GR24^{ent-4DO} では相互作用は検出されなかった。同じ GR24 化合物を用いて *in vivo* 系の DLK2 アッセイを行ったところ、Y2H と同様の結果が得られたことから、ミヤコグサ KAI2a は GR24^{ent-5DS} に対して高い選好性を示すことが示唆された。続いて、ミヤコグサ根分泌物で特定した 2 つの KL 候補ピークについて、Y2H アッセイを行ったところ、早く溶出される方のピーク (KL1) では相互作用は見られなかったが、遅く溶出される方のピーク (KL2) では相互作用が検出された (図 2)。前者は、KL 前駆体であり、後者は KL 本体と思われる。

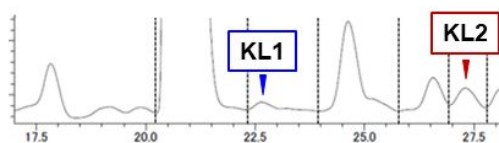


図 2. 2 つの KL 候補ピーク

今後、2 つの KL 候補ピークについて構造解析に十分な量を単離し、構造解析を行う予定である。

< 引用文献 >

- Akiyama K、 Matsuzaki K、 Hayashi H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **435**, 824–827 (2005).
- Umehara M、 Hanada A、 Yoshida S、 Akiyama K、 Arite T、 Takeda-Kamiya N、 Magome H、 Kamiya Y、 Shirasu K、 Yoneyama K、 Kyojuka J、 Yamaguchi S. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455**, 195–200 (2008).
- Yoshida S、 Kameoka H、 Tempo M、 Akiyama K、 Umehara M、 Yamaguchi S、 Hayashi H、 Kyojuka J、 Shirasu K. The D3 F-box protein is a key component in host strigolactone responses essential for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.*, **196**, 1208–1216 (2012).
- Gutjahr C、 Gobbato E、 Choi J、 Riemann M、 Johnston MG、 Summers W、 Carbonnel S、 Mansfield C、 Yang SY、 Nadal M、 Acosta I、 Takano M、 Jiao WB、 Schneeberger K、 Kelly KA、 Paszkowski U. Rice perception of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi requires the karrikin receptor complex. *Science* **350**, 1521–1524 (2015).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鍋嶋武郁、秋山康紀
2. 発表標題 ミヤコグサ内生KAI2リガンドの検出と部分精製
3. 学会等名 植物化学調節学会第55回大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------