

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月1日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21603005

研究課題名（和文） 植物の運動・光屈性を制御する鍵化学物質の活性発現機構の解明

研究課題名（英文） Study on Mechanism of Key Substances involved in Plant Movement, Phototropism

研究代表者

繁森 英幸（SHIGEMORI HIDEYUKI）

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：70202108

研究成果の概要（和文）：植物の光屈性のメカニズムとして、青色光誘導性成長抑制物質が光側で生成され、光側の成長が抑制されることによって屈曲するという、Bruinsma-Hasegawa 説が新たに提唱された。本研究では、青色光誘導性成長抑制物質として見出したRaphanusanin（ダイコンから）およびDIMBOA（トウモロコシから）を用いて、これらの物質を芽生えに投与することにより、投与側の $H_2O_2$ 産生ならびにリグニン化が促進されることを見出した。以上の結果から、青色光誘導性成長抑制物質が光屈性を引き起こすことを証明した。

研究成果の概要（英文）： We have hitherto reported evidence that the differential flank growth that causes phototropic curvature is regulated by blue light-induced growth inhibitors (Bruinsma-Hasegawa theory). In this study, we report that blue light promoted the accumulation of  $H_2O_2$  and subsequent lignification in the illuminated sides and in the Raphanusanin or DIMBOA applied halves of seedlings of *Raphanus sativus* L. or *Zea mays* L., respectively. Therefore, these specific blue light-induced growth inhibitors regulated phototropism of plants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：天然物化学

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：光屈性・Bruinsma-Hasegawa 説・Cholodny-Went 説・光屈性制御物質・トウモロコシ・ダイコン・DIMBOA・Raphanusanin

## 1. 研究開始当初の背景

植物の“運動”のうち、進化論で著名な C. Darwin (1880 年) に始まり多くの生物学者が最も注目し研究の対象としたものが“光屈性”である。光屈性のメカニズムは近年まで Cholodny-Went 説 (1937 年) で説明されてきた。しかし、最近連携研究者である長谷川らを中心とした国際共同研究によって、光側と影側組織においてオーキシンの不等分布がないことが機器分析により証明され、さらに光側で増量される成長抑制物質が光屈性に関わるという Bruinsma-Hasegawa 説 (1990 年) が提唱された。国内外における光屈性に関する研究は、元々化学物質の同定や合成が不得手な生物学者とりわけ植物生理学者によってなされてきたこともあり、分子レベルからの研究といってもオランダの有機化学者 F. Kögl が人尿から発見し、その後植物ホルモンと認定されたオーキシンや様々な突然変異株を用いた遺伝子レベルからの研究に止まっている。光屈性を真に制御する化学物質の同定・合成などの研究は、申請者らを中心とした筑波大学と国内では慶應大学 (Yamamura) ならびに大阪府立大学 (Ueda and Miyamoto) との共同研究、国外ではイギリスの York 大学 (Firn and Digby)、ドイツの Freiburg 大学 (Weiler and Feyerabend) やオランダの Wageningen 大学 (Bruinsma and Knecht) との国際共同研究が世界をリードしている。

これまで申請者らは光側組織で生成される成長抑制物質 (光屈性制御物質) として、ダイコン芽生えから raphanusanins や 4-MTBI、トウモロコシ芽生えから benz-oxazinoids、エンバク芽生えから uridine、シロイヌナズナ芽生えから 3-indolylacetonitrile、ヒマワリ芽生えから caprolactam、8-epixanthatin や helian を単離・構造決定してきた。また、これらの物質が光屈性刺激によって短時間で光側組織で生成されることやこれらの物質を芽生えの片側に投与し人為的に濃度勾配をつくった時、投与側に屈曲することも明らかにしてきた。更に光屈性鍵化学物質のうち、raphanusanins と benz-oxazinoids の生合成経路を調べた結果、myrosinase や  $\beta$

-glucosidase の遺伝子発現や酵素活性が光照射で短時間で高められ、不活性型の MTBG や DIMBOA-glucoside から糖が切り出され、活性型の raphanusanins や benz-oxazinoids が生成されることも明らかにした。

しかし、これらの光屈性制御物質が光側組織で生成された後の分子機構については全く不明であり、残念ながら光屈性の全容を分子レベルから解明するまでには至っていない。

## 2. 研究の目的

本研究では Bruinsma-Hasegawa 説に基づき、光屈性を制御する生理活性物質の活性発現の分子機構を解明することを目的に以下の研究を行う。

1) 光屈性制御物質の活性発現部位を調べるための化合物の合成、2) 光屈性制御物質の活性発現における酵素の作用メカニズムの解明、3) 光屈性鍵化学物質のターゲットとなる遺伝子の解明、4) 光屈性制御物質による細胞伸長抑制のメカニズムの解明等である。光屈性刺激の感受から始まり、最終的に観察される光側組織の細胞の伸長抑制、光方向への屈曲といった一連の機序について生物有機化学、分子生物学や細胞生理化学的手法を用いて、分子レベルから解明することを目指す。

## 3. 研究の方法

(1) ダイコンの光屈性制御物質の前駆体である 4-Methylthio-3-butenyl glucosinolate (MTBG) (1) の全合成

1,4-Butanediol (3) の片方の水酸基を TBDMS 基で保護し、PCC 酸化によりアルデヒド体 5 へと誘導した。化合物 5 をヒドロキシルアミンでオキシム化し、さらに NCS でクロル化した。得られた化合物 7 に 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranose を反応させ、脱保護の後に Dess-Martin 酸化により、アルデヒド体 2 へと誘導した。得られた化合物 2 と triphenylphosphonium thiomethylmethylyde との Wittig 反応により化合物 11 を合成し、ヒドラジンをを用いてオキシムのアセチル基を選択的に脱保護して化合物 12 を得た。クロロスルホン酸を用いて化合物 12 のオキシムの水酸基を硫酸エステル化した後、グルコ

ースのアセチル基を脱保護して目的とする MTBG (1) を合成した。

## (2) 植物の培養

### ①ダイコン芽生え

ダイコン (桜島大根) 種子は室温 (暗所) で1時間程度吸水させた後、湿らせたバーミキュライト上に播種した (25°C)。その後暗所で4日間培養した。実験の約24時間前に緑色安全光の下で湿らせたバーミキュライトの入った小型シートリングケースに植え替えを行い、最終的に4日齢の芽生え (下胚軸の長さが約4.0 cm) を実験に供した。

### ②トウモロコシ芽生え

トウモロコシ種子は流水中で12時間吸水 (暗所) 後、湿らせたバーミキュライト上に播種した (室温 25°C)。その後24時間赤色光 (0.3  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) 下で培養し、更に暗所で2日間培養した。実験の約24時間前に緑色安全光の下で湿らせたバーミキュライトの入った小型シートリングケースに植え替えを行い、最終的に4日齢の芽生え (幼葉鞘の長さが3.5~4.0 cm) を実験に供した。なお、*bx1* 変異株は Maize Genetics Cooperation Stock Centerより入手した。

## (3) 光屈性刺激

光屈性実験用の光源として、青色LED光あるいは白色蛍光灯をスリット状の青色アクリル製フィルター (パラガラス、クラレ) で分光して得られた青色光 (0.05  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) を用いた。光屈性刺激はスリットが芽生えの先端部とほぼ同じ高さになるように調節して与えた。屈曲角度はカメラで一定時間毎のインターバル撮影により記録し、撮影画像を基に測定した。

## (4) 化合物の投与

一定量のラノリンを小型シャーレに量りとり、各濃度に有機溶媒で調製した化合物を加え温めながら混合させた。コントロールとして等量の溶媒だけを混合したラノリンペーストを用意した。緑色安全光下で爪楊枝を用い、ダイコン芽生えの場合はフック直下から2cmの幅で、トウモロコシ芽生えの場合は幼葉鞘と中胚軸とのジャンクションのより上の2cmに片側投与した。

## (5) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の局在部位の可視化

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の局在部位の可視化については、過去に報告されているTissue print法を用いた (Schopfer et al., Plant Physiol., 1994)。ニトロセルロース膜 (Hybond-C Extra、アマ

シヤム社) は10%デンプン水溶液 (w/v) に終濃度が0.5 Mになるようヨウ化カリウムを加えて調製したKI-starch反応液に浸し、ドライヤーで乾燥させた。ヨウ化カリウムの酸化による影響を最小限に抑えるため、ニトロセルロース膜は2時間以内に使用した。これらの操作は緑色安全光下で行った。青色光照射または化合物を投与した芽生えの屈曲部位をそれぞれカミソリで切り出し、切断面を均等な圧力でニトロセルロース膜に約60秒間押しつけた。60分程度ニトロセルロース膜を暗所・室温に放置した後、実体顕微鏡で観察し、画像を記録した。

## (6) リグニンの局在部位の可視化

リグニンの局在部位の可視化については、フロログルシノール - 塩酸による染色法を用いた (Pomar et al., Protoplasma, 2002)。染色液はフロログルシノールを99.5%エタノールおよび10.1 M塩酸 (25/75, v/v) を用いて終濃度1%フロログルシノール - 塩酸液 (w/v) になるよう調製した。青色光照射または化合物を投与した芽生えからカミソリを用いて屈曲部位の薄切片を作成し、直ちにフロログルシノール - 塩酸染色液に浸し、10分間染色を行った。これらの操作は全て緑色安全光下にて行った。染色後、H<sub>2</sub>Oを数滴たらしたスライドガラスに切片を乗せ、光学顕微鏡で観察を行い、画像を記録した。

## (7) Raphanusanin誘導性遺伝子のライブラリーの作成およびクローニング

常法に従って単離したRaphanusaninをラノリンにまぶし、4日齢のダイコン黄化芽生えの胚軸 (フック下2cm) に片側投与した。一定時間後に胚軸を切り出し、液体窒素中で凍結させた。サブトラクション法による遺伝子ライブラリーの作成は使用したキット

(PCR-select cDNA subtraction kit、クローンテック社) の説明書に従って行った。Raphanusanin処理および青色光照射による遺伝子発現プロファイリングはリアルタイムPCR法を用いて行った。

## 4. 研究成果

(1) ダイコンの光屈性制御物質の前駆体である4-Methylthio-3-butenyl glucosinolate (MTBG) (1) の全合成

1,4-Butanediol (3) を出発原料とし、アルデヒド体5へと誘導した。化合物5をオキシム化、クロル化し、化合物7を得た。化合物7をチオグルコシル化してアルデヒド体2に誘導した。得られた化合物2を Wittig 反応

により化合物 11 を合成し、選択的脱保護し、硫酸エステル化し、目的とする MTBG (1) を 12 行程で合成した。MTBG の全合成を初めて達成することに成功した。

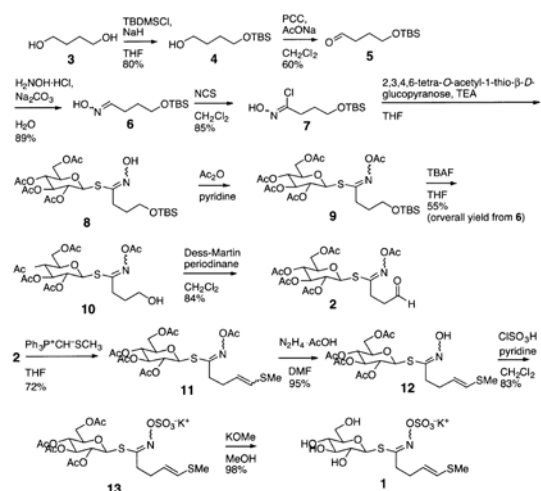


図 1. MTBG (1) の全合成スキーム

## (2) 光屈性刺激にともなう過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) およびリグニンの蓄積

ダイコン芽生えを材料にして、光屈性刺激によって誘導される光照射側の成長抑制の原因の一つとして考えられている細胞の一時的な硬直化 (cell wall stiffness) について詳細な検討を行った。ダイコン芽生えの光屈性を誘導する最適な光エネルギー量 (青色光) を検討し、その光エネルギー条件下で経時的にダイコン芽生えの下胚軸をサンプリングし、過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) およびリグニン量のカイネティクスを調べた。

ダイコン芽生えの屈曲角度の経時変化と光照射側組織における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> およびリグニンの蓄積量を比較・検討したところ、両パラメーター共に屈曲開始時期に先立ち、増加していることが確認された。続いて、光屈性刺激にともなう H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> およびリグニンが光照射側組織で蓄積する様子を可視化するため、先ず H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の蓄積について Tissue-printing 法および生体染色法 (DAB 染色) を用いて検討した。Tissue-printing 法では光屈性刺激を与えてから 30 分後には光側組織で H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 由来のシグナルが観察された。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の蓄積はその後、60 分、90 分後まで観察されたが、120 分後には明瞭なシグナルが確認できなかった。生体染色法については検出感度の問題もあり、光照射側ならびに影側組織における明瞭な差異は観察できなかった。一方、リグニンの蓄積については胚軸の薄切片を調製し、フロログルシノール-塩酸により染色したプレパラートを顕微鏡下で観察した。リグニンの蓄積に

ともなうシグナルは光照射側組織の隣り合う細胞同士の接合部位で観察された。特に強いシグナルが皮層部位で確認された。これらの結果はトウモロコシ芽生えにおける H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> およびリグニン量の定量実験で得られた知見と一致しており、光屈性刺激によって cell wall stiffness が誘導され、その結果光照射側組織の成長抑制が引き起こされるというメカニズムは植物普遍的なものである可能性が示唆された。

## (3) 光屈性制御物質投与による応答

光屈性刺激にともない、光照射側組織において H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> およびリグニンの蓄積が確認されたことから、次にミロシナーゼ-グルコシノレート・システムによって生成するイソチオシアネートの一種、4-MTBI およびその代謝物である Raphanusanin をダイコン芽生えの片側に投与し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> およびリグニン蓄積のカイネティクスを調べた。なお、投与量は内生の 4-MTBI および Raphanusanin を基に決定した。その結果、片側投与開始から 30 分後には投与側組織で H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 由来のシグナルが観察された。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の蓄積はその後、60 分、90 分後まで観察された。シグナルは光屈性刺激と比較してより強く観察された。一方、リグニンの蓄積についても光屈性刺激の場合と同様の方法で調べたところ、投与側組織でシグナルが観察された。これらの結果は光屈性刺激に応答して光照射側組織で生成した 4-MTBI およびその代謝物である Raphanusanin が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> およびリグニンの蓄積を誘導している可能性を強く示唆している。

一方、トウモロコシ芽生えにおける光屈性刺激、ならびにベンゾキサゾリノンの一種・DIMBOA を片側投与した際の幼葉鞘における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> およびリグニン蓄積の可視化実験を行った。その結果、ダイコン下胚軸で観察された場合と同様に、光屈性刺激にともない光照射側組織で一過的な H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 由来のシグナルが観察された (図 2)。

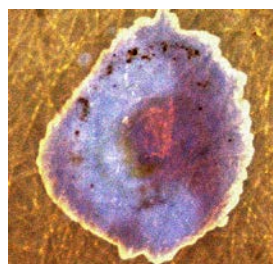


図 2. 青色光による H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の蓄積 (右側から青色光を照射)

また、リグニンの蓄積についても光屈性刺激によって光照射側組織でシグナルが観察された。さらに、リグニン由来のシグナルはDIMBOA処理を行った場合においても投与側組織で観察された。また、後述する*bx1* 変異株においても光屈性刺激後にH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>およびリグニン蓄積の可視化実験を行った。その結果、両パラメーター共に光照射側組織で非常に弱いシグナルしか観察されなかった。以上の結果より、光屈性刺激に反応してトウモロコシ芽生えの光照射側組織で生成したベンゾキサジノイドがH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>およびリグニンの蓄積にともなうcell wall stiffnessを誘導することが示唆された (図3)。

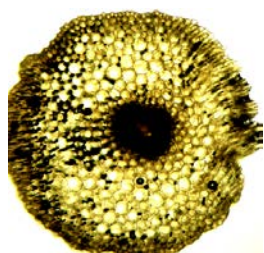


図3. 青色光によるリグニンの蓄積  
(左側から青色光を照射)

#### (4) ベンゾキサジノイド欠損トウモロコシ芽生えにおける光屈性反応

先行研究からトウモロコシ芽生えにおいて、光屈性制御物質生成に関わる重要な加水分解酵素である DIMBOA-glucosidase の阻害剤をあらかじめ植物体に取り込ませておくと、その後の光屈性反応が顕著に抑制されることを報告した。しかし、阻害剤実験はターゲット酵素以外への影響も否定できない。そこで、トウモロコシ *bx1* 変異株 (インドール化合物由来の DIMBOA 生成能欠損体を用いて光屈性反応を調べ、同時に行った野生株の反応と比較・検討を行った。

光屈性刺激開始から約4時間後に屈曲の様子を観察してみると、予想に反して *bx1* 変異株も正常な光屈性反応を示していた。しかし、光屈性反応のカイネティクスを詳細に分析したところ、野生型の芽生えでは照射開始60分以内に明瞭な屈曲を示したが、その時点で *bx1* 変異株はほとんど屈曲していなかった。しかし *bx1* 変異株ではその後90分から120分後にかけて屈曲が観察され、およそ180分後には野生型とほぼ同程度の屈曲を示した。以上の結果から光屈性制御物質の役割として、光屈性は二相性の反応によって制御されており、光屈性制御物質はそのうちの初期応答反応で重要な役割を担っており、その後は従来から報告されているような植物ホルモ

ン・オーキシンの偏差分布により制御されている可能性が示唆された。

#### (5) Raphanusanin誘導性遺伝子の探索

Raphanusaninの生理作用メカニズムを分子レベルで明らかにする目的で、サブトラクション法を用いたRaphanusanin誘導性遺伝子のライブラリーの作成、およびスクリーニングを行った。作成したライブラリーからクローニングされた遺伝子の多く(55%)は植物の防御応答に関連するものであった。主なものとしてトランスポーター、加水分解酵素、プロテイン・キナーゼおよびシグナル伝達因子が確認された。また、クローニングされた88種類のRaphanusanin誘導性遺伝子のうち、様々な機能を有する50個の遺伝子を選抜して、その発現プロファイルを調べたところ、44個の遺伝子はRaphanusanin処理によって発現が誘導され、4個は抑制されていた。更にRaphanusanin処理によって発現が強く誘導された33個の遺伝子のうち、25個の遺伝子については様々な光エネルギー量の青色光照射(光屈性刺激)によっても同様に発現の誘導が見られた。今回の光屈性制御物質であるRaphanusaninによって制御される遺伝子群の網羅的解析によって、光屈性の初期応答と生体防御応答は一部クロストークしている可能性が遺伝子レベルからも明らかにされた。

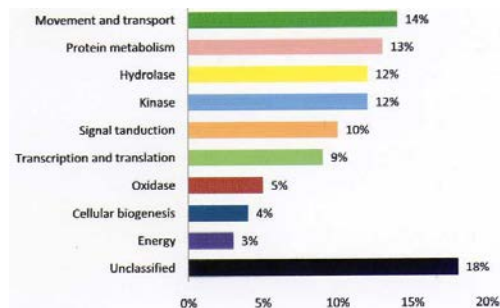


図4. Raphanusanin処理によって発現が誘導された遺伝子タイプ

#### (6) まとめ

本研究で得られた結果は、光屈性のメカニズムにおける Bruinsma-Hasegawa 説を支持している結果であり、学術的に重要な意義があるものである。

#### 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33件)

① F. Seshimoto, S. W. Hong, H. Nakajyo,

and H. Shigemori, "New antibacterial polyacetylenes from sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings", *Heterocycles*, **83**, 1067-1076 (2011). (有)

- ② H. Nakajyo, Y. Hisamatsu, N. Goto, K. Yamada, K. Hasegawa, and H. Shigemori, "Structure-activity relationships on senescence-promoting effect of arabidopsides from *Arabidopsis thaliana*", *Heterocycles*, **83**, 57-62 (2011). (有)
- ③ T. Hasegawa, Wai Wai Thet Tin, H. Shigemori, T. Otomatsu, K. Hirose, K. Miyamoto, J. Ueda, and K. Hasegawa, "Isolation and identification of a gravity-induced growth inhibitor in etiolated radish hypocotyls", *Heterocycles*, **81**, 2763-2770 (2010). (有)
- ④ Moehninsi, K. Miura, H. Nakajyo, K. Yamada, K. Hasegawa, and H. Shigemori, "Comparative transcriptional profiling-based identification of raphanusanin-inducible genes", *BMC Plant Biology*, **10**, 111-127 (2010). (有)
- ⑤ T. Wai Wai, H. Hayashi, T. Otomatsu, K. Hirose, K. Hasegawa, and H. Shigemori, "Structure-activity relationships of natural occurring plant growth-inhibiting substance caprolactam and its related compounds", *Heterocycles*, **78**, 2439-2442 (2009). (有)
- ⑥ S. Yamazoe, K. Hasegawa, and H. Shigemori, "First total synthesis of 4-methylthio-3-butenyl glucosinolate", *Biosci. Biotech. Biochem.*, **73**, 785-787 (2009). (有)
- ⑦ T. Wai Wai, H. Hayashi, T. Otomatsu, K. Hirose, K. Hasegawa, and H. Shigemori, "Caprolactam, an inhibitory allelochemical exuded from germinating buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) seeds", *Heterocycles*, **78**, 1217-1222 (2009). (有)

[学会発表] (計 28 件)

- ① 山田小須弥, Riffat JABEEN, 長谷川剛, 長谷川宏司, 繁森英幸 青色光照射によって誘導される cell-wall stiffness と光屈性との関連性 植物化学調節学会第 46 回大会、2011 年 11 月 1-2 日、宇都宮
- ② 牧野讓、中城治之、山田小須弥、長谷川宏司、繁森英幸、カラシナ (*Brassica juncea*) 芽生えの光屈性制御物質の探索、新規素材探索研究会、2011 年 6 月 10 日、横浜
- ③ Kosumi Yamada, Taeko Narisawa, Moehninsi, Haruyuki Nakajyo, Tsuyoshi Hasegawa, Koji Hasegawa, Hideyuki

Shigemori The role of isothiocyanate and its derivatives in the blue light-induced growth inhibition of radish hypocotyls. 8<sup>th</sup> International Workshop Sulfur Metabolism in Higher Plants, November 22-27, 2010, Australia

- ④ 成澤多恵子、山田小須弥、モーニンスイー、中城治之、長谷川剛、長谷川宏司、繁森英幸 ダイコン下胚軸の光屈性におけるイソチオシアネートの役割 植物化学調節学会第 4 5 回大会、2010 年 11 月 1-2 日、神戸
- ⑤ 繁森英幸、植物の生活環に関わる生理活性物質の構造と機能、日本化学会第 90 春季年会 ナカニシシンポジウム、2010 年 3 月 26 日、大阪
- ⑥ Moehninsi, Kosumi Yamada, Kenji Miura, Hideyuki Shigemori Identification and characterization of raphanusanin-induced genes in etiolated radish hypocotyls. 第 51 回日本植物生理学会年会、2010 年 3 月 18-21 日、熊本

[図書] (計 2 件)

- ① 繁森英幸：“第六章 頂芽優勢”、「最新植物生理化学」(長谷川宏司、広瀬克利編著)、大学教育出版、pp. 183-203, 2011.
- ② 繁森英幸：“博士教えて下さいー植物の不思議ー”(長谷川宏司、広瀬克利編著)、大学教育出版、pp. 10-12, 67-72, 76-78, 118-120, 164-165, 2009.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

繁森 英幸 (SHIGEMORI HIDEYUKI)  
筑波大学・生命環境系・教授  
研究者番号：70202108

### (2) 研究分担者

山田 小須弥 (YAMADA KOSUMI)  
筑波大学・生命環境系・准教授  
研究者番号：70292521

### (3) 連携研究者

長谷川 宏司 (HASEGAWA KOJI)  
筑波大学・名誉教授  
研究者番号：70094167