

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成24年5月7日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23657043

研究課題名（和文） 植物の新規シトクロムP450依存成長シグナルの探索

研究課題名（英文） Screening for a novel cytochrome P450-dependent growth factor in plants

研究代表者

山口 信次郎（YAMAGUCHI SHINJIRO）

東北大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：10332298

研究成果の概要（和文）：

器官サイズが低下した突然変異体の解析から、シトクロム P450 酵素である CYP78A により合成され、器官の大きさを制御する新たなホルモン様物質の存在が示唆されている。本研究では、ヒメツリガネゴケの CYP78A 二重破壊株を用いて、培養液中からこれらの表現型を回復させる物質の同定を目指した。また、既知植物ホルモンの定量分析から、CYP78A は、内生および培養液中に放出されるオーキシンとサイトカイニン量に影響を与えることが示された。

研究成果の概要（英文）：

We looked for compounds in culture media of *Physcomitrella patens* that are able to restore the growth defect of the *cyp78a* double mutant. Analysis of known plant hormones showed that CYP78As affect auxin and cytokinin levels in plants and media.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：植物科学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：植物、生理活性、発生・分化、有機化学、農林水産物

1. 研究開始当初の背景

植物の器官の大きさは、作物の収量や品質を直接左右する重要な形質であり、さまざまな内的、外的因子によって制御されている。近年、器官サイズが低下したイネとシロイヌナズナの突然変異体の解析から、機能未知のシトクロム P450 酵素である CYP78A により合成され、器官の大きさを制御する新たな低分子シグナル（ホルモン様物質）の存在が示唆されている。しかしながら、同物質の化学的本体は明らかにされていない。また、既知の植物ホルモン類と CYP78A 依存シグナルとの関係についてもいくつかの報告があるが、決定的な証拠は得られていない。

シロイヌナズナとイネの CYP78A 欠損変異体は、葉間期 (plastochron) が短くなり、葉、花、種子などの器官が小さくなる。表現型の詳細な解析から、*cyp78a* 変異体においては器官原基に

おける細胞分裂が野生型よりも短期間で停止することが示された。一方、*CYP78A5* 過剰発現体においては、器官の成長速度は野生型と変わらないが、細胞増殖期間が延長されていることにより成長が持続し、最終的な器官サイズが大きくなる。つまり、一定期間に作られる器官の数は減少するが、個々の器官のサイズが大きくなる。また、シロイヌナズナの *CYP78A9* の発現量が高まったアクティベーションタグラインでは、単為結果（受粉しなくても果実が成長すること）が引き起こされる。これらの表現型は、CYP78A 酵素によって生成する低分子化合物またはその下流代謝産物に起因すると推定されるが、これまでの研究から *cyp78a* 変異体の表現型は、既知の植物ホルモン量の変化が直接の原因ではないことが示唆されている。また、いくつかの CYP78A 組換え酵素は、*in vitro* で C12 飽和脂肪酸であるラウリン酸の ω -水酸化を触媒することが

報告されている。しかし、同じ反応を触媒すると報告されている P450 酵素が他にも複数存在すること、*cyp78a* 変異体の表現型は ω -ヒドロキシラウリン酸の投与によっては回復しないことなどから、同物質が CYP78A の生体内での真の酵素生成物、すなわち器官サイズを制御する低分子シグナル関連物質、であるとは考えにくい。申請者らの過去の実験においても、 ω -ヒドロキシラウリン酸はイネ、シロイヌナズナ、ヒメツリガネゴケの *cyp78a* 変異体の表現型を相補しなかった。

シロイヌナズナの *cyp78a5* 変異体を特定の細胞のみで相補する（特定の細胞のみで野生型 *CYP78A* を発現する）キメラ植物を用いた実験から、CYP78A に由来する低分子シグナル物質（以後、CYP78A シグナル）の作用は細胞非自立的であり、花における各器官間のみならず、一つの花序（inflorescence）における異なる花同士でも伝達されることが示唆されている。例えば、花卉や雄しべで *CYP78A* を過剰発現すると、がくも巨大化する。しかしながら、CYP78A シグナルは、地上部全体に移動することはなく、例えばロゼット葉のみで *CYP78A5* を発現しても花には影響しない。

CYP78A 遺伝子は、コケ植物を含む陸上植物に広く存在し、ヒメツリガネゴケには2つの *CYP78A* 遺伝子（*CYP78A27* と *CYP78A28*）が存在する。コケ植物における *CYP78A* 遺伝子ファミリーの役割は不明であった。筆者らは最近これらの遺伝子の破壊株を作出し、*cyp78a27* および *cyp78a28* 両遺伝子が破壊された *cyp78a* 二重変異体においては、原系体の成長が顕著に抑制され野生型と比較して明らかに小さなコロニーを形成すること、茎葉体への分化がほとんど起こらないことを明らかにしている。一方、*CYP78A* 過剰発現株においては、原系体の成長は正常であったが、茎葉体への分化が遅延する傾向が見られた。

2. 研究の目的

本研究では、ヒメツリガネゴケの *cyp78a* 二重変異体の表現型を様々な条件で観察し、野生型や *CYP78A* 過剰発現株の培養液中や抽出物中に *cyp78a* 二重変異体の表現型を回復させる物質を見出すことを目的とした。また、既知の植物ホルモン類と CYP78A との関連性を明らかにするため、二重変異体や過剰発現体における植物ホルモン類の内生量および培養培地への分泌量を定量した。

3. 研究の方法

ヒメツリガネゴケは寒天培地および液体培

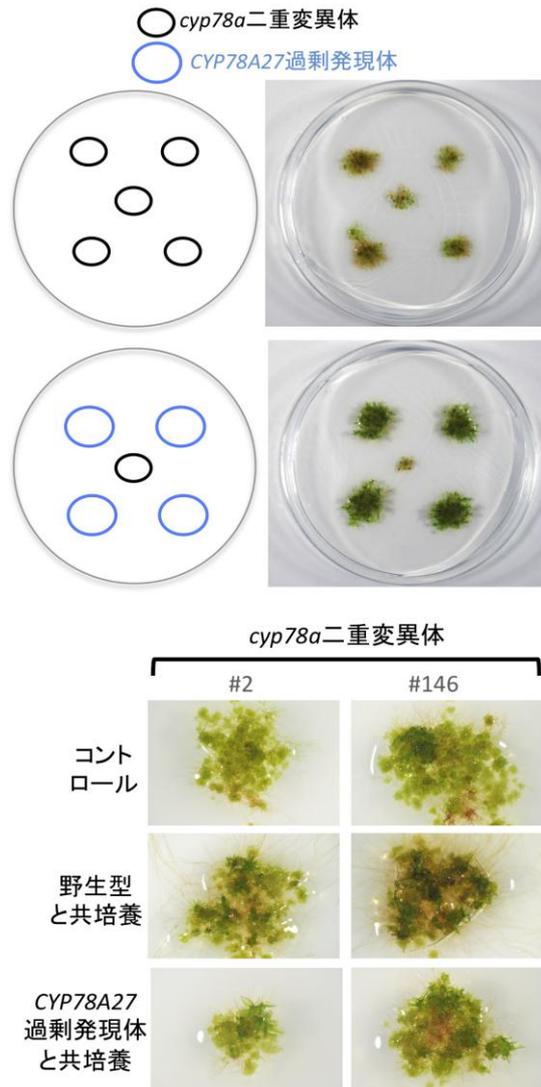


図1 共培養の茎葉体分化への影響

地で培養した。野生型および *CYP78A* 過剰発現体においては、CYP78A シグナルは正常または過剰に生産されていると考えられる。また、ヒメツリガネゴケは、オーキシン（インドール-3-酢酸）やサイトカイニン、ストリゴラクトン、ジベレリン中間体（*ent*-カウレン）など多くの植物ホルモン類を培養液中に分泌していることが知られている。そこで、本研究では *cyp78a* 二重変異体の表現型が野生型および *CYP78A* 過剰発現体との共培養によって回復するかどうかを検討した。また、野生型および *CYP78A* 過剰発現体の培養培地を *cyp78a* 二重変異体に投与し、表現型が相補されるかどうかを調べた。また、これらの植物体の抽出物を逆相クロマトグラフィーで分画後、各精製画分を *cyp78a* に投与し、表現型を観察した。

次に、*cyp78a* 二重変異体や *CYP78A* 過剰発現体における既知植物ホルモンの定量分析

を行なうため、これらの原系体を液体培養した。原系体および培養培地を回収・抽出後、内部標準物質を添加し、固相抽出法により植物ホルモン類を含む精製画分を得た。これを液体クロマトグラフ-質量分析装置 (LC-MS/MS) に供し、植物ホルモン類の定量分析を行なった。また、定量的 RT-PCR 法により、野生型の培養時における *CYP78A27* および *CYP78A28* の遺伝子発現を調べた。

4. 研究成果

(1) *cyp78a* 二重変異体においては、原系体の成長抑制とともに、茎葉体の形成不全が観察される。この際、本来茎葉体に分化すると思われる細胞群がカルス状の構造体を形成する。これらの表現型は、CYP78A シグナルの欠損によるものであると考えられる。一方、野生型においては同シグナル物質が正常に、CYP78A 過剰発現体においては過剰に生産されていると考えられる。そこで、これらの植物との共培養により、*cyp78a* 二重変異体の表現型が緩和されるかどうかを検討した (図 1)。その結果、*cyp78a* 二重変異体のみを培養した寒天培地上では、茎葉体への分化が観察されなかったのに対し、*cyp78a* 二重変異体の周囲に野生型または *CYP78A* 過剰変異体を混植した場合には、不完全な茎葉体の形成が認められた。以上の結果は、CYP78A シグナルを生産するヒメツリガネゴケとの混植により、*cyp78a* 二重変異体の表現型が部分的に相補されることを意味している。また、この結果は CYP78A シグナルが他の植物ホルモン類と同様に、培地に放出される可能性を示唆している。

次に、CYP78A シグナルが培地中に放出されている可能性をさらに検討するため、CYP78A シグナルを生産すると予想される野生型および *CYP78A* 過剰発現体を生育させた培地の一部を *cyp78a* 二重変異体に投与する実験を行なった。具体的には、約 1 ヶ月間培養した野生型および *CYP78A* 過剰発現体のコロニーから約 1 cm 離れた寒天培地を 5 mm 角に切り取り、*cyp78a* 二重変異体を植え継ぎ後、1 cm 離れた位置に置いた (図 2)。約 1 ヶ月半培養後、コロニーを観察したところ、野生型 (WT) および *CYP78A27* 過剰発現体を培養後の寒天培地を置床した場合に、*cyp78a* 二重変異体において茎葉体への部分的な分化が観察された (図 2 において矢じりで示してある)。しかしながら、完全な茎葉体の形成は認められず、またコロニーによっては部分的な茎葉体の

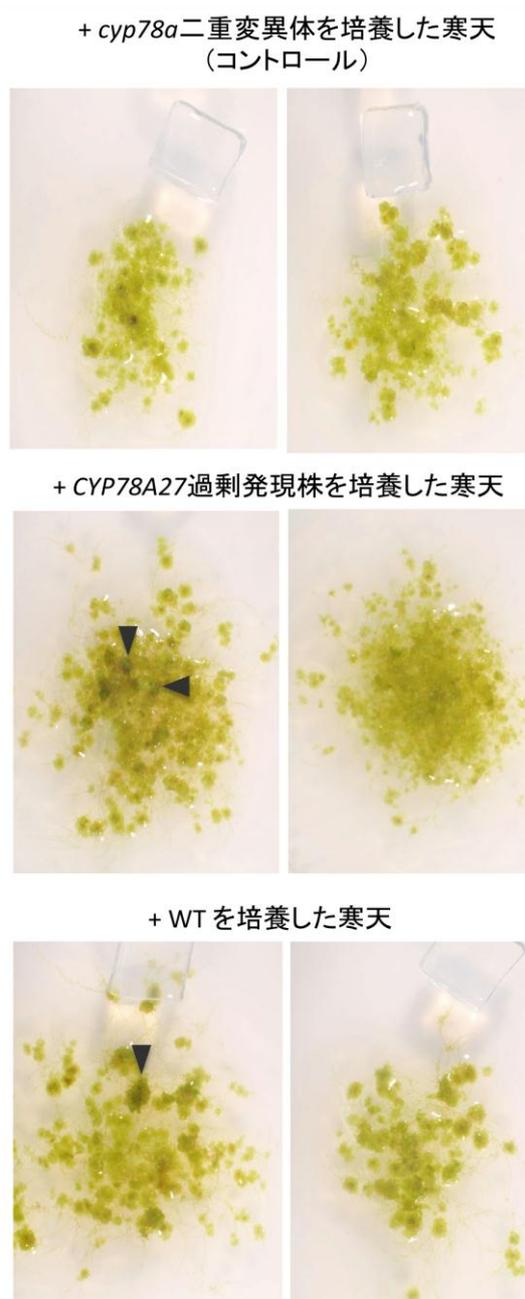


図2 培地添加の茎葉体分化への影響

分化が認められない場合もあった。

図 1 および図 2 に示した結果から、野生型および *CYP78A* 過剰発現体の培養培地中に CYP78A シグナルが存在する可能性が示唆された。そこで、これらを液体培養し、より多くの培養培地を回収後、*cyp78a* 二重変異体に投与した。しかしながら、再現性よく *cyp78a* 二重変異体の茎葉体形成を誘導する培養条件を見出すには至らなかった。

(2) イネやシロイヌナズナの *cyp78a* 変異体を用いた研究から、CYP78A は既知の植物ホルモンの生合成・代謝に直接関与する可能性は低いと考えられている。しかしながら、イネや

シロイヌナズナの *cyp78a* 変異体の植物ホルモン定量データは、限られた生育ステージや組織のみから得られており、CYP78A と既知植物ホルモン類との関連性については明確な結論が得られているとは言えない。

本研究では、ヒメツリガネゴケにおいてこの点を明らかにするため、野生型、*CYP78A* 過剰発現体、*cyp78a* 二重変異体における植物ホルモンの定量分析を行なった。内生および培養液中の植物ホルモンを定量したところ、オーキシシン（インドール-3-酢酸）、アブシジン酸、サイトカイニン類の培地中での濃度がいずれも高いことが明らかになった。また、*CYP78A* はオーキシシンやサイトカイニンの培地への放出量を変化させる可能性が示唆された。例えば、インドール-3-酢酸の内生量は、*cyp78a* 二重変異体で最も高かったのに対し、培地中の濃度が最も高かったのは *CYP78A* 過剰発現体であった。以上の結果から、*CYP78A* は既知植物ホルモン類に影響を与えることが示された。

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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 信次郎 (YAMAGUCHI SHINJIRO)

東北大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号: 10332298

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: