



日本農芸化学会 関東支部 2017年度 第3回 支部例会

「微生物・植物の機能とメカニズムに迫る-細胞・物質・ゲノム・遺伝子」

講演要旨集

2017年12月16日(土)

東京大学農学部

主催 公益社団法人 日本農芸化学会 関東支部

日本農芸化学会 関東支部 2017年度 第3回 支部例会

「微生物・植物の機能とメカニズムに迫る-細胞・物質・ゲノム・遺伝子」

プログラム

＜受賞講演・招待講演＞

13:00 開会

13:05 2017年度日本農芸化学会功績賞

微生物ゲノムの解読と機能解析

吉川 博文 (東京農業大学 応用生物科学部)

13:55 招待講演

酵母研究が解き明かすオートファジーの生理機能と代謝変化

川俣 朋子 (東京工業大学 科学技術創成研究院)

14:25 2017年度農芸化学奨励賞

糸状菌の先端生長における極性制御機構の解析

竹下 典男 (筑波大学 生命環境系)

14:55 休憩

15:15 招待講演

植物の自他識別機構における細胞応答反応の可視化とモデル化

藤井 壮太 (東京大学 大学院農学生命科学研究科)

15:45 2017年度農芸化学研究企画賞

ゲノム編集による果実成熟制御の解明と高品質果実の作出

伊藤 康博 (農研機構 食品研究部門)

16:15 休憩

16:25 2017年度日本農芸化学会賞

植物ホルモン機能の化学的制御とその応用に関する研究

浅見 忠男 (東京大学 大学院農学生命科学研究科)

17:15 閉会

＜懇親会＞

17:30 アブルボア2F ※事前申込制

微生物ゲノムの解読と機能解析

～次世代シーケンサーが拓く微生物研究の新展開～

吉川 博文

東京農業大学 応用生命科学部

1. 次世代シーケンサーを用いた微生物の新規研究法

革新的超高速シーケンサーの登場に際し、筆者はいち早くその有効性を認め、2008 年、東京農大生物資源ゲノム解析センターの設立に尽力した。本センターの運用に関しては、農学分野を中心とした多くの研究者との共同研究に発展させることが出来た。主な解析目的は、リシーケンス（変異解析）、*de novo*（新規ゲノム）解析、RNA-seq（発現解析）であり、特に開設当初は微生物ゲノム解析のノウハウを蓄積した。微生物育種に関してはまず研究室保存株の配列を決定し、それを元に変異株を取得することを提唱してきた。例えば、それまで曖昧な表現型の違いとして黙認してきた様々な研究室保存株間の違いを白日の下に晒すことになった。枯草菌ゲノム計画の際に各研究室に分譲した株を、20 年後に再度取り寄せて比較したところ、ゲノム全体で 1~7 ヶ所の変異が見られた。保存形態の情報から冷凍保存中は安定なこと、植継ぎを繰り返すことで変異が蓄積することを確認した。また、遺伝マーカーをほとんど用いてこなかったシアノバクテリアについては、系統保存株の配列と株譲渡の歴史からミニ進化系統樹を作成した。一方、ショートリード型の次世代シーケンサー（NGS）では試料中のゲノム量に比例してリード深度（本数）が深まる原理から、対数増殖期のゲノムを使えば複製起点 (Ori) が予測できるのではないかという次世代型な

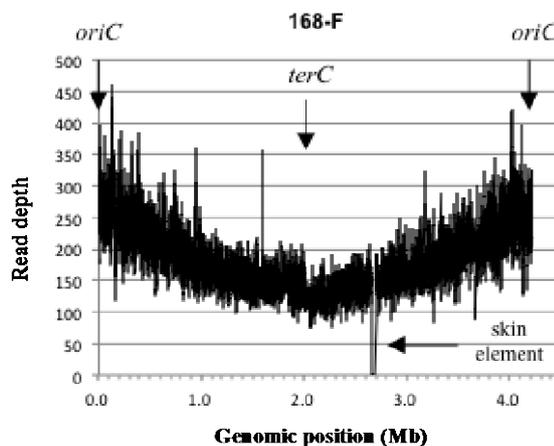


図 1. 枯草菌 168 株のリード深度プロット。対数増殖期の細胞から抽出した DNA を使用。Ori 近傍のゲノム量は Ter 近傍の約 2 倍の存在比を示している。

らではの方法を着想した (図 1)。

2. 光依存 DnaA 非依存 DNA 複製系の発見

上述の原理を複製起点が不明なことで知られるシアノバクテリアに適用したところ、興味深い事実を見出した。シアノバクテリアは光合成研究の対象として多くの研究がなされてきたが、ゲノムの複製や分配、細胞分裂といった基本的生命現象の解析はほとんど行われてこなかった。淡水性シアノバクテリアはゲノムを複数コピー持つことが大きな特徴であるが、我々はこの点に興味を持ち、NGS を活用した遺伝的解析等によりいくつかの興味深い結果を得た。すなわち、複数のコピーはゲノム毎、細胞毎に非同調的に複製されており、その開始は光合成電子伝達系に依存して細胞分裂前の **Lag phase** に複製し、増殖・分裂と共にコピー数を減らしていくこと、さらに別の種では複製起点が一定でなく、しかも原核生物で普遍的に必要な **DnaA** に依存しない複製開始をするという事実である。

Synechococcus elongatus は *oriC* から複製するが、**DnaA** の *oriC* への結合が光依存的な制御によっている。また *dnaA* の欠失した株を得ることが出来、その株はなんと共存するプラスミドが染色体に組み込まれ、その複製開始機構を利用するという生存戦略を取っていた。一方、*Synechocystis*、*Anabaena* の *dnaA* 欠損株は通常の生育、複製活性を示し、**DnaA** はもはや必須ではなくなっていた。そこで野生株において複製開始点を探索した結果、*oriC* と思われる領域に検出されないばかりか、他のどの領域にも検出されなかった。この結果は、複製開始点の複数性、非同調性を示しており、他のバクテリアとは異なる特異的な複製開始機構であることが示唆された。シアノバクテリアの祖先が共生進化したと考えられている植物の葉緑体においても *dnaA* は保存されておらず、謎である葉緑体の複製機構を解く大きな鍵になると考えている。

3. 必須機能から探る細胞機能のネットワーク解析

枯草菌ポストゲノムプロジェクトとして、酵母ツーハイブリッドを用いたタンパク質間相互作用の網羅的解析を行ったが、脂質合成系の必須遺伝子 *plsX* の相互作用解析から見えてきたいくつかのネットワークについて紹介する。*plsX* は脂肪酸、リン脂質両系統の元に位置する生育に必須のアシル基転移酵素をコードしているが、その温度感受性株を取得し、さらに抑圧変異株を多数取得した。従来のマッピング法では1つの抑圧変異同定に何ヶ月も要したが、NGS の登場により、数十の変異を1週間程度で同定できるようになった。このように微生物遺伝学の常套手段は、NGS の登場で飛躍的に効率化するとともに、これまでマッピング法がなかった多くの微生物にも遺伝学を可能にした。

(1) 栄養状態に応じた細胞増殖・分裂の制御機構

第1に我々は PlsX が FtsA 始めいくつかの細胞分裂関連因子と相互作用を示したことから、細胞分裂への関与を解析した。*plsX* の温度感受性変異株は細胞分裂が異常になり、細胞がフィラメント化するが、局在を調べると PlsX は FtsZ や FtsA 同様、分裂隔壁に局在した。両者の階層性を詳細に調べた結果、PlsX は FtsA よりも上位にあることがわかり、脂質合成系が細胞分裂装置を支配していることを明らかにした。さらに、別の抑圧変異解析から、中央代謝系 PTS 酵素との相互作用が明らかになった。PTS 系はグルコース等の栄養感知システムであるから、この3者の構成するネットワークは、栄養状態に応じて細胞の増殖・分裂を制御するシステムであると考えられる。

(2) リボソームタンパク質の関与する新規 SigD レギュロン制御機構

plsX の抑圧変異がリボソームタンパク質遺伝子 *rpsK* (S11)、および *rpsU* (S21) にマップされたものがあつた。S11 および S21 はリボソームの最外殻に位置し、最後にアセンブリーされるサブユニットであるため興味深く思われ、更なる解析を行った。*plsX* の温度感受性は確かに *rpsK* あるいは *rpsU* の変異で抑圧されるが、これらの変異は同時に運動性を失っていた。詳細な解析の結果、これらのリボソームサブユニットは運動性を支配する SigD レギュロンの制御に関わっていることが明らかになった。SigD レギュロンは栄養増殖後期において細胞の増殖相変換に重要な働きをしており、鞭毛形成等により栄養を求めて泳ぎ出す運動性を支配している。その SigD レギュロンの制御に新しくリボソームのサブユニットが関与していることを見出したわけであるが、翻訳装置の一サブユニットがこのような制御機構を持っていることは非常にユニークであり興味深い。ただし本解析では *plsX* との関連性は明らかになっていない。

(3) 必須二成分制御系 WalR/WalK の必須性に関する解析

二成分制御系は枯草菌に約 30 組あるが、その中で WalR/WalK は唯一の必須遺伝子ペアであり、病原菌を含む多くのグラム陽性細菌に共通して存在することから創薬のターゲットとしても多くの研究がなされてきた。しかし、なぜこの二成分制御系が生育に必須であるのかという点については明確な答えが得られていない。細胞の形を決めているペプチドグリカンの合成は、細胞の伸長に伴い重合と切断をバランス良く協調させるメカニズムであり、綿密な制御機構が必要であることが伺える。すなわちエンドペプチダーゼによる切断とペニシリン結合タンパク質 (PBP) 等による重合反応のバランスが重要である。我々はこの点から、枯草菌に存在する 2 種類のエンドペプチダーゼ *LytE* と *CwlO* に着目した。この 2 者の二重欠損は致死になり、その活性は *IseA* と *PdaC* によって制御されている。*WalR/WalK* は *cwlO*, *lytE* の発現を正に、また *iseA*, *pdaC* の発現を負に制御していることから、この両エンドペプチダーゼの活性をバランス良く

調節しているのではないかと考えた。センサーキナーゼ **WalK** を制御している *walH/walI* の破壊株は温度感受性を示したので、その抑圧変異株を取得してマッピングを行ったところ、*lytE* と *walK* の構造遺伝子に同定された。したがって **WalR/WalK** の異常な活性化が温度感受性の原因と考えられ、上記仮説を支持していると考えた。さらに必須の *lytE*, *cwlO* を人工的に誘導する系を作り、これらの抑制因子である *iseA*, *pdaC* を欠損させた条件を作ってやると *walR/walK* の必須性を回避することが可能になった。以上のことからやはり **WalR/WalK** の必須性は生長環境に応じて、エンドペプチダーゼ (**LytE**, **CwlO**) とその阻害因子 (**IseA**, **PdaC**) の発現を調節してペプチドグリカン合成を協調させることであると結論づけた。

以上、本研究において明らかになった **PlsX** を中心としたネットワークを図 2 にまとめた。まだ不明な部分も多いものの、細胞機能を俯瞰的に見るネットワーク解析の重要性を示唆出来たと考えている。

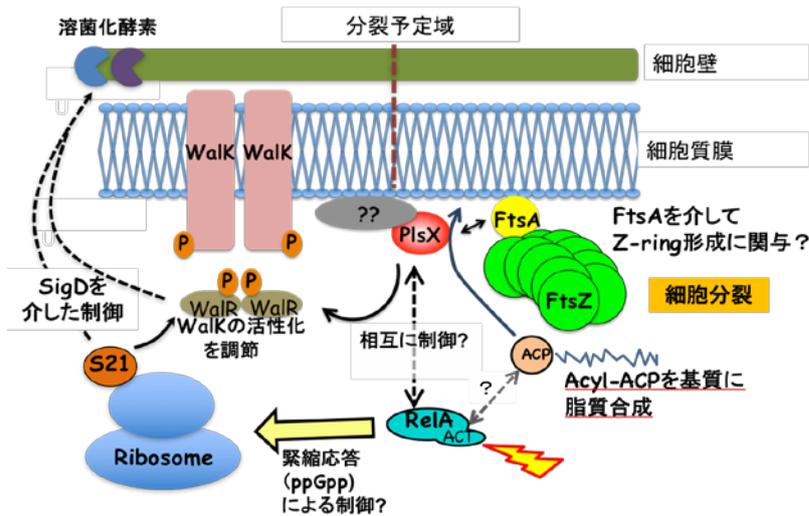


図 2. 細胞増殖に関与する PlsX の機能

New frontier of microbiology driven by next generation sequencer

Hirofumi Yoshikawa

(Department of Bioscience, Tokyo University of Agriculture)

招待講演

酵母研究が解き明かすオートファジーの生理機能と代謝変化

川俣 朋子

東京工業大学 科学技術創成研究院

オートファジーは真核生物に保存された分解内の異化システムである。オートファジーが誘導されると、隔離膜が細胞質成分を取り囲み、完成したオートファゴソームは液胞・リソソームと融合し、液胞・リソソーム内の加水分解酵素群により分解される。タンパク質やオルガネラは速やかに異化され、代謝変動を引き起こすと考えられている。これまでオートファジーはタンパク質分解システムとして広く認知されており、結果として生じるアミノ酸は栄養素として再利用されることが示されている。一方、タンパク質以外について、例えば糖、核酸、(膜)脂質は、分解様式と分解産物、再利用過程や代謝への影響については、ほとんど解明されていない。オートファジーの生理機能を真に理解するには、タンパク質分解の枠を超えた研究も必要となる。私達は現在、遺伝学・生化学的解析が優れた酵母の系を利用することで、オートファジーがどのような生理条件下で誘導され、結果としてタンパク質・核酸・脂質やそれらの複合体がどのような機構で分解されるかを解明することを目指して研究を進めている。近年、我々はメタボローム解析を通じて、オートファジーにより核酸である RNA が段階的に分解される過程を明らかにすることに成功し、オートファジーは細胞内の主要な RNA 分解経路の一つであることを示した。オートファジーにより液胞に運ばれた RNA (主としてリボソームに含まれる rRNA と推測される) は、RNase である Rny1,ヌクレオチダーゼ Pho8,ヌクレオチダーゼ Pnp1/Urh1 により段階的に分解され、RNA→3'-NMP (ヌクレオチド) →ヌクレオシド→塩基となる。ピリミジン塩基は最終的にはウラシル、プリン塩基はキサンチン、ヒポキサンチンに代謝され、そのほとんどが細胞外に放出されることが明らかとなった。オートファジーの変異体や *rny1* 変異体では、これらの変化が全く観察されなかった。以上、メタボローム解析と酵母遺伝学を組み合わせることにより、オートファジーによる RNA 分解の全体像が初めて明らかになった。

さらに、最近我々は細胞内の微量金属、特に亜鉛と鉄のリサイクルにオートファジーが機能することも明らかにしており、オートファジーと代謝についての最新的话题を提供したい。

(関連文献)

Huang H, Kawamata T, Horie T, Tsugawa H, Nakayama Y, Ohsumi Y, Fukusaki E (2015) Bulk RNA degradation by nitrogen starvation-induced autophagy in yeast. *EMBO J.* 34, 154-168.

Horie T, Kawamata T, Matsunami M, Ohsumi Y (2017) Recycling of iron via autophagy is critical for the transition from glycolytic to respiratory growth. *J. Biol. Chem.* 292, 8533-8543.

Kawamata T, Horie T, Matsunami M, Sasaki M, Ohsumi Y (2017) Zinc starvation induces autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.* 292, 8520-8530.

Physiological and metabolic functions of autophagy revealed by yeast research

Tomoko Kawamata-HORIE

(Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology)

糸状菌の先端生長における極性制御機構の解析

竹下 典男

筑波大学・生命環境系

糸状菌の菌糸細胞は、極性を菌糸の先端に維持することで先端生長を行うことから、細胞極性と形態形成に関わる基礎研究の材料として適している(図 1A)。また、糸状菌の動植物に対する病原性やその高い酵素分泌能は菌糸状の形態と密接に関連していることから、糸状菌の菌糸状の形態を支える先端生長の機構を理解することは、糸状菌が関わる動植物への病害防除、醸造・発酵、抗生物質・有用酵素生産などの諸産業に貢献する(図 1B)。糸状菌の菌糸の先端生長のために必要な膜脂質やタンパク質は、菌糸先端への分泌小胞の輸送と先端でのエキソサイトーシスにより、先端の形質膜に供給される。菌糸先端への長距離の膜輸送には微小管が、先端でのエキソサイトーシスにはアクチンケーブルが、必要である(図 1C)。

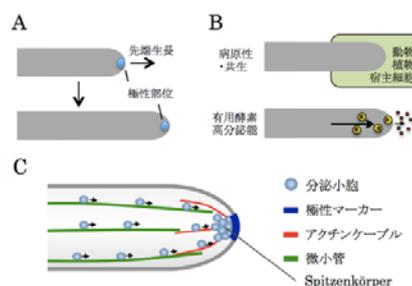


図1. (A) 糸状菌の菌糸の先端生長 (B) 糸状菌の菌糸形態の重要性 (C) 菌糸の先端生長の機構

1) 極性マーカーによる極性制御

極性マーカータンパク質 **TeaA** (細胞質)、**TeaR** (膜結合性) が、菌糸先端に局在し、菌糸の伸長方向を制御する機構が示された(図 2A)。**TeaA** は、微小管の伸長により菌糸先端へ輸送され、形質膜に局在する **TeaR** (膜結合性の **TeaA receptor**) との結合を介して、相互依存的に菌糸先端に局在化する。菌糸先端の **TeaA** は、間接的にアクチンケーブルを重合するフォーミンの局在を制御する。これら極性マーカーの遺伝子破壊株では、結果的にエキソサイトーシス部位が正常に制御されなくなり、菌糸が曲がって生長する(図 2B) (Takeshita *et al.*, MBoC 2008)。糸状菌が真っ直ぐに伸長する微小管の特性を利用して、位置情報を菌糸先端の極性マーカーに伝達し、菌糸の伸長方向を制御するという極性維持機構を示している。また、極性マーカーが微小管の重合を制御し、極性の焦点化、即ち **Spitzenkörper** の形成に関わることが示された (Takeshita *et al.*, J Cell Sci 2013)。

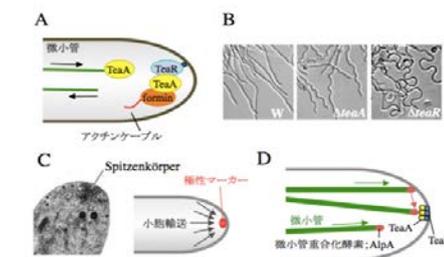


図2. (A) 極性マーカー(TeaA, TeaR)の機能 (B) 極性マーカーの遺伝子破壊株 (C) Spitzenkörperと極性マーカーの集中した局在化 (D) 微小管の収束のための重合化制御

2) 極性維持とエキソサイトーシスの超解像イメージング

糸状菌の高分泌能は、菌糸先端での活発なエキソサイトーシスに依存する。エキソサイトーシスによって菌糸先端の形質膜に新たな膜が大量に供給されるにもかかわらず、膜結合性の極性マーカーTeaR が拡散せずに極性部位に維持される機構を、超解像顕微鏡を用いた解析で見出した(図 3A)。その結果、TeaR の一時的な集合(120 nm) と拡散が観察され、微小管に依存した極性部位の形成とアクチンケーブルに依存したエキソサイトーシスが交互に繰り返して起こることによって、極性マーカーが菌糸先端に維持される機構を発見した(図 3B) (Ishitsuka *et al.*, Science Adv 2015)。

3) 一時的な Ca^{2+} の流入により同調される段階的生長

菌糸の伸長速度が一定ではなく、増減の振幅が見られた。 Ca^{2+} の細胞内濃度を蛍光マーカーにより可視化し、経時的に測定したところ、一時的な Ca^{2+} の流入が周期的に起きた。そして、アクチンの重合とエキソサイトーシスが一時的な Ca^{2+} の流入により同調して制御されることで、一連の段階が協調的に進行する先端生長の動的機構が示された(図 4) (Takeshita *et al.*, PNAS 2017)。

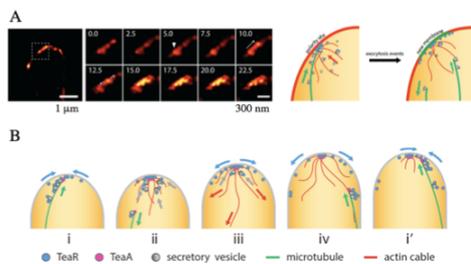


図3. (A) 超解像顕微鏡による極性マーカーTeaRの動態 (B) 一時的な極性の確立を繰り返すことで極性を維持するモデル (Transient polarity assembly model)

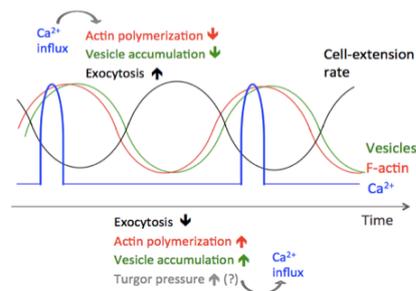


図4. 一時的な Ca^{2+} の流入により同調されるアクチン重合、エキソサイトーシスと菌糸生長

Polarity maintenance in fungal tip growth

Norio Takeshita

(Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

招待講演

植物の自他識別機構における細胞応答反応の可視化とモデル化

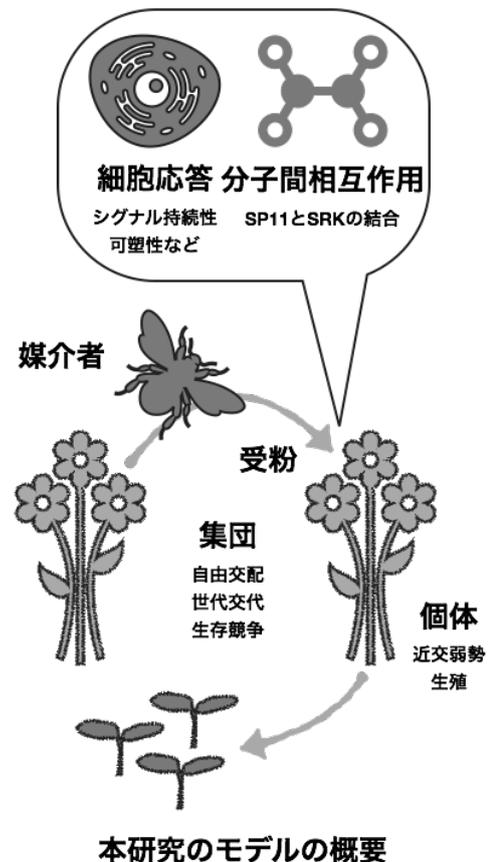
藤井 壮太

東京大学 大学院農学生命科学研究科

植物は動けないため、ユニークな生理応答機構を確立してきた。特に、生殖についてはポリネーターに依存するため、集団の中の自己と非自己、あるいは良い花粉と悪い花粉、を識別する独特なしくみを組み上げてきた。その最たる例が自家不和合性である。これは自己と非自己の花粉を雌蕊が識別することで、自家受精を避ける仕組みである。地球上の半数程度の植物が自家不和合性であると見積もられている。この性質は性と同じく、集団において遺伝的多様性が保たれるために重要な役割を果たす。花粉の運搬を媒介者に委ね一見静的な植物が、近交弱勢を避けるべく能動的にパートナーを選択しているのである。一方、自家不和合性はパートナーを限定してしまうため、繁殖の保障と常に天秤にかけている。すなわち自家不和合性を通じて植物の個体間における駆け引きと繁殖のジレンマが垣間見える。アブラナ科植物の場合、SP11 と呼ばれる花粉リガンド因子と、SRK と呼ばれる雌蕊受容体キナーゼ因子が直接的かつ特異的に結合することで、自己と非自己を識別していることがわかっている (Takayama et al *Nature* 2001)。両因子は *S* と呼ばれる遺伝子座に密接に連鎖してコードされており、そのハプロタイプ性が自他識別を可能にしている。

従って我々は生物がどのように多様化し、その過程において分子や細胞がどのように振る舞うのかを自家不和合性から学ぶことができる。この現象は生物学における優れたモデルであり、生化学、細胞生物学、進化生物学など異なる教鞭を積んだ研究者を惹きつけている。それにも関わらず、分野横断的なアプローチで自家不和合性を捉える試みはこれまでになされてこなかった。

そこで我々はミクロとマクロの世界を連結するモデルを構築するため、生理実験と情



報科学を組み合わせて自家不和合性を研究することを開始した。まず、ライブイメージングを用いて自家不和合性反応時の細胞生理応答の可視化を行なった。遺伝子コードの蛍光プローブによってカルシウム、pH、アクチンなどを計測し、一細胞での自己認識応答反応の動態を観察した。その一方、分子、細胞、個体など異なる次元のオブジェクトを組み込み、自家不和合性を再現するバーチャル植物集団をコンピューター上でモデル化した(図)。この集団を用いて自由交配を行い、世代交代させ、生存競争に晒すことで進化のスケールで自家不和合性がどのように多様化するのかをシミュレーションした。SP11 と SRK 分子の結合強度や、ライブイメージング解析から得られた細胞応答の制約などをパラメーターとしてこの植物集団モデルに当てはめ、進化に与えるインパクトの解明を行なった。本講演ではこれらの戦略の末、植物の自家不和合性システムについてわかってきたことと、現在我々が行なっている試みについて紹介したい。

Visualization and modeling of cellular responses during self/non-self discrimination in plants

Sota Fujii

(Graduate School of Agriculture and Life Sciences, The University of Tokyo)

ゲノム編集による果実成熟制御の解明と高品質果実の作出

伊藤 康博

農研機構 食品研究部門

果実類は成熟開始と共に、鮮やかな色素の蓄積や、甘味や酸味の割合の大きな変化、華やかな芳香成分の発生や、さらには果肉の軟化等、多様でドラマティックな変化が生じる。これらの変化は極めて同調性高く進行するが、これは関連する代謝経路の遺伝子発現が同時に大きく変化することを意味しており、その発現制御の仕組みは興味深い現象と言える。

トマトでは 1960 年代に成熟が全く進まない変異 *rin* (*ripening inhibitor*)が見出された。この変異果実は、成熟誘導ホルモンであるエチレンの生産上昇が全く見られず、それに伴い着色や軟化等の成熟に伴う現象が全く起こらない。*rin* 変異体のこの明確な成熟抑制形質は、正常型の鮮やかな成熟パターンの比較対照として優れた材料であり、ありとあらゆる成熟研究において世界中で用いられ、*RIN* を中心とした成熟制御モデルが確立されてきた。すなわち、*MADS* ボックス転写因子をコードする *RIN* は、エチレンよりも早い段階での成熟開始に必須の因子であり、またその前提として、*rin* は機能を完全に失ったヌル変異であるという考えを、誰もが疑うことなく信じ、現在に至っている。

一方で発表者は、*rin* 変異がヌル変異ではなく、積極的に成熟を抑制する因子への変異ではないかと考えた。その根拠として、*RIN* が転写のアクチベーターとして機能するのに対し、*rin* 変異遺伝子から生じるタンパク質はリプレッサーに変化している可能性がその配列から予想され、実際に生化学的試験でも確かめられたためである。

そこで *CRISPR/Cas9* 法により *RIN* 遺伝子のノックアウト変異体を作成したところ、ノックアウト果実はわずかであるが確かに赤色色素を蓄積し、成熟の開始が認められた。次に *rin* 変異体において、やはり *CRISPR/Cas9* 法を適用し *rin* 変異遺伝子の不活性化を試みた。その結果、野生型のノックアウト変異体とほぼ同様の果実の形質を示し、わずかながら赤くなって成熟の開始が認められた。

以上の結果から、(1) *rin* 変異はヌル変異ではなく、転写抑制機能(リプレッサー機能)を獲得した機能獲得型(*gain-of-function*)変異である、(2) *RIN* は完全に成熟するためには必須の遺伝子であるが、成熟の開始には必ずしも必要ではない、ということが明らかになった。これらの事実は、これまで *rin* 変異体を用いて蓄積してきた成熟研究のデータを根本的に見直すことを迫る結果であると思われる。

一方、RIN のノックアウトとは別に、転写活性化ドメインを含む C 末端領域の手前にストップコドンを生じる変異体も作出した。予想外なことに、この変異体はオレンジ色を呈しながら、*rin* 変異体並みの優れた日持ち性を示した。また先には触れなかったが、ノックアウト変異果実は異常に早い軟化進行が認められる(図 1)。一遺伝子から派生した、*rin* 変異、ノックアウト変異、C 末端欠失変異の三者三様の全く異なるフェノタイプは、成熟研究を行う上で世界的にも例をみない極めてユニークな材料であり、これらの比較により成熟制御の真相を明らかにしていきたい。

	野生型	① <i>rin</i> 変異型	② ノックアウト	③ C末端短縮型
日持ち性	±	+++	—	+++
カロテノイド蓄積	+++	—	+	++
成熟開始後 2ヶ月 (室温貯蔵)				

図 1. RIN 遺伝子の各種変異による成熟パターンの違い

(関連文献)

Ito Y, Nishizawa-Yokoi A, Endo M, Mikami M, Toki S (2015) CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the *RIN* locus that regulates tomato fruit ripening. *Biochem Biophys Res Commun* 467 (1):76-82.

Ito Y, Nishizawa-Yokoi A, Endo M, Mikami M, Shima Y, Nakamura N, Kotake-Nara E, Kawasaki S, Toki S (2017) Re-evaluation of the *rin* mutation and the role of *RIN* in the induction of tomato ripening. *Nature Plants* 3 (11):866-874.

Studies on tomato ripening regulation and improvement of fruit quality using a genome editing technique

Yasuhiro Ito

(Division of Food Biotechnology, Food Research Institute, NARO)

2017 年度日本農芸化学会賞 受賞講演

植物ホルモン機能の化学的制御とその応用に関する研究

浅見忠男

東京大学 大学院農学生命科学研究科

はじめに

植物ホルモン機能を利用した農業技術の成果として、穀物の矮性ジベレリン (GA) 変異体を倒伏防止や窒素肥料投与技術へと応用し、発展途上国の穀物生産量を著しく高めた「緑の革命」が知られている。現在ではこの遺伝学的制御に加えて GA 生合成阻害剤による GA 機能の化学的制御も穀物生産性向上に大きく貢献しており、植物ホルモン機能の制御による農業生産性向上可能な新技術創出への期待は大きい。申請者は農業生産性の向上に関わる単独かつ直接的な植物ホルモン機能制御のみならず植物ホルモン間クロストークを利用した機能制御に注目し、その化学的制御法の開発と生理学・遺伝学に加えて実用面での応用を目指してきた。以下、創製した化合物とその植物科学への応用について植物ホルモンごとに説明する。続いて創製した制御剤の実用化への方策について特にストリゴラクトン (SL) を中心に述べる。

1. 植物ホルモン機能制御剤の創製と植物科学への応用

1-1. ブラシノステロイド

ブラシノステロイド (BR) は植物に対して生長促進的に効果を示す。BR の機能や情報伝達因子の解明が十分でない時期に、特異的 BR 生合成阻害剤 (Brz) を創出し、その作用部位が DWF4 (チトクローム P450) であることを明らかにした。Brz の生理学・生化学への応用は、生合成経路における触媒部位が不確定であった BR 生合成遺伝子の機能を明確にできただけでなく、モデル植物以外へと Brz を応用することで新しい BR 機能の発見へとつながった。特に Brz の活用により BR が有する植物病害抵抗性を付与する効果やワタ繊維発達促進効果が明確になったことは、その後の病害研究やワタ育種へ大きな影響を与えた。また申請者らが単離した複数の Brz 抵抗性シロイヌナズナ変異体は、その後の BZR1/BIL1、BES1 等の多数の BR 情報伝達因子の同定と機能の解明ならびに応用に結びついたことにより、阻害剤の植物遺伝学への応用の有効性を示す大きな契機となった。現在 Brz は試薬として販売され、植物研究の標準物質として時に文献引用無しで広く用いられている。

1-2. アブシシン酸

アブシジン酸 (ABA) は主としてストレス抵抗性を植物に付与する効果を示す。カロテノイドは ABA 生合成の出発物質であるために、その生合成を標的とする既存の ABA 生合成阻害剤は、植物の白化作用という望ましくない副作用を有していた。そこで白化作用を示さない ABA 生合成阻害剤創出のために、ABA 生合成の律速段階であるカロテノイド開裂酵素を標的とする化合物の設計・合成ならびにスクリーニングを行い、ABA 特異的生合成阻害剤であるアバミンならびにアバミン SG を見出した。この化合物は、現在でも唯一の副作用が見られない特異的 ABA 生合成阻害剤であり、この化合物の利用により未知 ABA 機能が解明された。例えば根粒菌の感染や植物の病害抵抗性の発現に ABA が関与していることを、この化合物の利用により鮮やかに示すことができた。

1-3. ストリゴラクトン

上記研究基盤を用い、2008 年に新植物ホルモンとして見出されたストリゴラクトン (SL) 制御剤の創製を行った。SL は植物ホルモン作用である 枝分かれ (イネ科では 分けつ) 抑制作用以外にも、AM 菌との共生促進作用や根寄生雑草種子の発芽を促進し寄生を促すことで農作物に多大な被害を生じさせる作用を示す物質であるために、その化学的制御法は応用展開の可能性が高い重要な研究対象であると考えた。まず SL 生合成経路に存在するチトクローム P450 を標的として想定した阻害剤開発を行い、トリアゾール系 SL 生合成阻害剤 Stz (TIS108) を見出した。Stz は nM レベルでイネ中の SL 濃度を検出限界以下に低下させる強力な阻害剤であった。しかしその強力な SL 濃度低下作用にもかかわらず植物種によってはまったく枝分かれを誘導しないことから、生体内で生合成される SL 関連分子種による機能の違いを明確にできる可能性を秘めた化合物であり、作用部位とあわせこの点については今後の検討課題である。この生合成阻害剤創製過程で、ジベレリン (GA) がイネ中の SL 生合成を抑制すること、にもかかわらず分けつを抑制することを見出した。特に枝分かれの抑制効果は野生型のみならず SL 生合成変異体や情報伝達変異体においても観察された。この SL-GA 間の生理レベルでのクロストークの発見は GA の応用展開の可能性を広げたが、この点については後述する。この発見以前に GA 欠損変異体での分けつの増加が報告されていたため、分子レベルでの SL-GA 間クロストークの解明によりこの生理現象が説明できると予想した。そこで SL と GA 情報伝達因子間の相互作用について検討を行い、SL 受容体 D14 と GA 情報伝達因子である SLN1 の SL 依存的な相互作用を見出すことができた。現在のところ、SL 依存的な D14 の結合により成長抑制因子としての SLN1 の機能が抑制を受け、その結果分けつ抑制的な生理現象が起きるというモデルを想定している。

さらにイネ SL 受容体 D14 の阻害剤開発を行い、インシリコスクリーニングにより競争的に受容体 D14 に結合する阻害剤 2MN と、動物の $\alpha\beta$ -加水分解酵阻害

剤に着想を得て設計・合成展開により受容体 D14 に共有結合しイネに多分げつ形態を誘導する阻害剤 KOK1094 を見出した。両化合物の類縁体中には、根寄生雑草の発芽阻害活性を示す化合物も存在していたので、分げつ誘導と発芽阻害の各活性を個別に高める方向で合成展開を行っている。

続いて阻害剤と併用することで自在な SL 制御を可能とする SL アゴニストの生合理的な創製を目指し、天然型 SL 類より高活性かつ安価に一段階合成が可能な SL アゴニスト 4BD を見出した。4BD は現在ではイネ試験における標準物質として広く利用され実用化も検討されているが、イネ分げつ抑制特異的な化合物であり、根寄生雑草 *Striga* 種子発芽促進活性は著しく弱い。そこでこの理由について検討を行う目的で、SL 作用機構と受容体リガンド複合体構造の追究を行った。その結果、D14 は SL 加水分解活性を示すユニークな受容体であること、三次元構造の解析により SL の D 環が加水分解により生じる D-OH が D14 との複合体を形成することが明らかとなり、SL 分解で生じる D-OH が活性本体であると結論した。この結論はその後他グループによる D-OH-D14-D3 複合体結晶構造の報告により裏付けられた。この知見を総合し、加水分解により D-OH を生じる化合物は SL 活性を持つとの発想に基づき多数の SL アゴニストの合成と活性評価を行った結果、D 環構造を含み *Striga* 種子発芽促進活性が高い活性化合物群を見出した。

2. 植物ホルモン機能制御剤の農業への応用を目指して

これまで創製してきた植物ホルモン機能制御剤は植物科学の進展には貢献できたと考えており、間接的には農業技術開発への貢献もできたのかもしれない。しかしながらより直接的な農業への貢献を目指し、現在では化合物の実用性に着目した展開もいくつか行っている。その中で現在最も活発におこなっている取り組みを紹介したい。

2-1. ストリゴラクトン機能制御剤

創製した制御剤を用いて、アフリカで穀物生産上の大きな問題になっている根寄生雑草被害の低減可能性を検討している。*Striga* を用いたポット試験の結果、生合成阻害剤である Stz は宿主の分げつに影響を与えずに根寄生雑草の被害を抑制できた。これは Stz の分げつ促進活性を示さない性質によるところが大きい。また、SL アゴニストである TIT01 は宿主が存在しない条件で根寄生雑草種子の自殺発芽を誘導し根寄生雑草被害を軽減できることが明らかとなった。アフリカでのフィールド試験を実施準備中である。

2-2. ジベレリン

SL-GA 間クロストークを利用した根寄生雑草被害を軽減可能な活性化合物の創製にも取り組んだ。GA による SL 生合成抑制現象の発見により、GA 処理による *Striga* 種子発芽誘導の抑制が可能であるが、GA は高価なため土壌処理への

応用は実用的でない。そこで代替できる GA アゴニストを探索した結果、安価に合成可能で SL 生合成抑制効果を示す AC94377 並びに 67ID を見出した。AC94377 は複数の GA 受容体を有するシロイヌナズナにおいて受容体選択的に作用することを明らかとした。

2-3. エチレンミミック

SL アゴニストは自殺発芽促進剤としての実用化が期待できるものの、加水分解により D-OH を生成する構造を有するために環境中で不安定なことも明らかとなった。一方でエチレンが根寄生雑草種子発芽促進活性を示す事が報告されているが、エチレンを利用した技術はコストが高くアフリカでの普及は難しい。そこで環境安定型自殺発芽誘導剤を開発するためにエチレンの *Striga* 種子発芽促進活性に着目した新規化合物の探索と構造展開を行い、安価に合成可能でエチレン受容体に作用して *Striga* 発芽促進効果を示す KUT15 を創出した。現在これら化合物と SL アゴニストを併用した制御法についても応用可能性について検討中である。

おわりに

植物ホルモン制御剤の創製は、先人達の植物ホルモン研究の成果を利用したいわば「巨人の肩に乗る」研究とも言える。制御剤の利用により新しい生物学的知見を見いだすことはできたが、この点がきがりであった。現在は新しい植物普遍的な生理活性物質の探索と性状解析にも力を入れている。研究室の伝統を引き継いで、今後も植物ホルモン研究を継続していきたい。

Chemical regulation of plant hormone functions and its application to Agriculture

Tadao Asami

(Graduate School of Agricultural Life Sciences, The University of Tokyo)

JSBBA KANTO

日本農芸化学会関東支部2017年度第3回支部例会 講演要旨集
2017年12月16日 発行
発行者 公益社団法人 日本農芸化学会関東支部

連絡先

〒113-8657

東京都文京区弥生1-1-1

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻

丸山 潤一