

第1章 序論

植物は土壌から無機栄養素を吸収して成長する独立栄養生物である。土壌中の栄養素は、降雨による流出や連作などさまざまな原因によって欠乏する。植物は固着性のため、貧栄養環境に適応できなければ、ライフサイクルを完結できずに枯死する。植物の貧栄養環境に対する適応は、いろいろな植物ホルモンによって制御される。

ストリゴラクトン (strigolactone: SL) は、アーバスキュラー菌根菌 (arbuscular mycorrhizal fungi: AM 菌) の菌糸分岐を誘導することで、AM 菌と宿主植物との共生関係を強固にする。AM 菌は、宿主植物と相利共生を行う土壌微生物である。さらに、枝分かれが過剰な突然変異体の解析から、SL が枝分かれを抑制する植物ホルモンとして役割を担うことが明らかとなった。その後、SL によって枝分かれの抑制以外にも茎の二次成長の促進、葉の伸長成長促進、葉の老化促進、葉の角度 (lamina joint (LJ) の角度) を抑制することが明らかとなった。つまり、SL は根から放出されるアレロケミカルとしての役割と植物ホルモンとしての役割の2つの機能を持つ。

イネの canonical な SL の生合成は、 β -carotene *cis-trans* 異性化酵素をコードする *DWARF27* (*D27*) によって、all-*trans*- β -carotene が 9-*cis*- β -carotene に異性化されることから始まる。D27 の次ステップは、2 種類の carotenoid cleavage dioxygenase (CCD) によって反応が触媒される。CCD7 は、9-*cis*- β -carotene を 9-*cis*- β -apo-10'-carotenal に変換し、CCD8 は、9-*cis*- β -apo-10'-carotenal を SL 前駆体 carlactone (CL) に変換する。この all-*trans*- β -carotene から、9-*cis*- β -carotene、9-*cis*- β -apo-10'-carotenal を介した CL までの酵素反応は、D27、CCD7、CCD8 によって連続的に行われる。CYP711A2 をコードする *Os900* によって CL から carlactonoic acid を経由して 4-deoxyorobanchol (4DO) へと変換され、CYP711A3 をコードする *Os1400* によって 4DO から orobanchol へ変換される。4DO や orobanchol の他に、現在までに 20 種類以上の多様な SL が単離されている。SL の受容体タンパク質は、 α/β -ハイドロラーゼファミリーに分類される D14 である。SL を受容した D14 は、SL を分解するとともに、SCF^{MAX2/D3} と相互作用する。D14-SCF^{MAX2/D3} 複合体は、リプレッサーの SMAXs/D53 をユビキチン修飾し、ユビキチン化された SMAXs/D53 は 26S プロテアソームで分解される。これによって SL 応答遺伝子の発現が起こる。

SL は栄養欠乏に応答してその産生量が増加し、枝分かれを抑制や葉の老化促進を誘導する。このことは、光合成を行うソース器官の葉から光合成産物を貯蔵するシンク器官の種子へ栄養の転流が行われる際に SL が関与する可能性を示唆している。実際、SL 関連の変異体では胚乳細胞のサイズが小さくなることで種子サイズが小さくなる。しかしながら、SL がなぜソース器官の葉の形態形成をも制御するのか、その生理学的な意義については不明である。栄養欠乏条件で増加する SL は、その環境への適応に重要な役割をもつと考えられる。本研究では、SL 関連の変異体が多数単離されており、世界 3 大穀物の 1 つであるイネ (*Oryza sativa*) を研究対象に、どの栄養欠乏環境下で SL を必要とするのか、また増加した SL の生理学的な役割を明らかにすることを目的にした。

第2章 栄養欠乏に応答したストリゴラクトンの産生量の解析

緒言

植物が栄養欠乏に曝されると、その環境に応答して SL 産生量が変化する。栄養欠乏の中でも特に、窒素欠乏 (-N)、リン酸欠乏 (-P) において SL 産生量が著しく増加する。-N 条件で栽培されたイネは、根における SL 生合成遺伝子の *D17*, *D10*, *Os900* の発現量が亢進する。SL 生合成遺伝子 *D27* の遺伝子発現量は +N, -N 間で変動しない。一方、-P 条件で栽培されたイネでは、*D27*, *D17*, *D10*, *Os900* の遺伝子発現量が根で亢進する。SL 産生量を増加させるための -N, -P の認識は地上部で行われ、地上部から根へと輸送される SL 生合成促進シグナルが存在すると予想されている。-N, -P 条件における SL 産生量の研究が進む一方、-N, -P 以外の栄養元素の欠乏に対する SL 産生量に関しては、その知見は依然乏しい。SL を産生することで、その栄養欠乏条件に適応している可能性を考慮すると、-N, -P 条件以外の栄養欠乏条件でも SL を産生している可能性は高い。本章では、必須多量栄養欠乏における SL 産生量の分析と遺伝子発現解析を詳細に行うことで、イネがどのような環境条件において SL を必要とするのかを明らかにした。

実験結果

イネ品種シオカリの実生を栄養十分条件 (control), -N, -P の他に、カリウム欠乏 (-K)、硫黄欠乏 (-S)、カルシウム欠乏 (-Ca)、マグネシウム欠乏 (-Mg) または鉄欠乏 (-Fe) で 7 日間栽培したときの SL 産生量を調べた。イネ品種シオカリは、内生 SL として 4DO を産生する。control の 4DO 産生量に比べて、-N, -P, -S 条件における 4DO 産生量が増加した。特に、-P 条件の 4DO 産生量が著しく増加した。-S 条件における 4DO 産生量がどの遺伝子によって制御されているのかを調べるために、SL 関連遺伝子の遺伝子発現量を qRT-PCR を用いて調べた結果、SL 生合成遺伝子 *D27* が -S 条件で高発現しており、S を施肥することでその転写量は約 1/5 にまで減少した。この *D27* の遺伝子発現の変動は 4DO 産生量と類似した変動パターンを示した。その他の SL 生合成遺伝子である *D17*, *D10*, *OsMAX1* ホモログの *Os900*, *Os1400* では +S と -S 条件で有意な差は認められなかった。

イネのどこの組織が -S を認識しているのかを調べるために、イネの根を 2 つに分け、両方の根を硫黄が十分に含まれる水耕液に浸す条件 (+S/+S) と、片方の根を +S に、もう一方の根を -S に浸す条件 (+S/-S)、両方の根を -S の水耕液に浸す条件 (-S/-S) でそれぞれ栽培した。+S/+S ならびに +S/-S の 4DO 産生量は大きな差は認められなかった。一方、-S/-S では 4DO 産生量が著しく増加した。+S/+S の総硫黄含量は、両方の根で同程度であった。+S/-S の総硫黄含量は、+S 側の根は、+S/+S と同程度であり、-S 側の根は、その半分程度であった。-S/-S の総硫黄含量は、両方の根で +S/+S の半分以下であった。地上部の総硫黄含量は、+S/+S, +S/-S, -S/-S の順に減少した。スクロースは植物の光合成産物であるだけでなく、地上部から根へ輸送されるシグナル分子の 1 つである。そこで、SL 産生量を調節するシグナル分子が、スクロースであるか検証するために、スクロース処理が -N, -P, -S 条件における SL 産生に与える影響を調査した。-N 条件のイネに 0.1 mM のスクロースを処理すると、根における 4DO 産生量が未処理の 1/43 程度まで低下した。-P 条件で生育するイネに 0.1 mM のスクロースを処理すると、未処理の 2/3 程度まで低下した。-N ならびに -P 条件において、0.01, 1 mM スクロース処理区でも 4DO 産生量が減少する傾向にあったが、有意差は認められなかった。-S 条件で生育するイネに 0.01 mM のスクロースを処理すると、未処理の約 1/2 程度まで 4DO 産生量が低下した。

さらに、-N, -P ならびに -S 条件を組み合わせると SL 産生量が変動するのか調べるために、control, -N, -P, -S, -NP, -NS, -PS, -NPS 条件における 4DO の産生量を定量した。その結果、

根滲出量は-P で最も多く、次いで、-NP, -NS, -PS, -NPS 条件で多かった。-N, -S 条件では、control より多かったが、-P と組み合わせた条件よりは少なかった。根内生量は、-P 条件において最も多く、-N, -S, -NP, -NS, -PS, -NPS 条件は同程度の内生量であった。

考察

-N, -P, -K, -S, -Ca, -Mg および-Fe 条件に応答したイネの SL 産生量を調査した。その結果、-N, -P の他にも-S 条件でも SL 産生量が増加することを明らかにした。-S 条件における SL 産生量の増加は、品種シオカリだけでなく、品種日本晴でも確認された。SL 関連遺伝子の発現解析を行った結果、-S 条件で *D27* 遺伝子が高発現していた。また *D27* の発現パターンが 4DO 産生量のパターンと類似していた。すなわち、-S 条件では *D27* の発現量の亢進によって SL 産生量が増加していることが考えられる。シロイヌナズナのマイクロアレイ解析の結果を参照すると、-S 条件で生育させたシロイヌナズナでも *AtD27* の発現量が増加しており、その他の SL 生合成遺伝子の発現は、-S 条件でほとんど変動していなかった。少なくとも、イネならびにシロイヌナズナにおいて-S 条件で *D27* が重要な役割を担っていると考えられる。また、根分け法の実験結果から、+S/-S のうち、-S 側の根の総硫黄含量が低下していたにも関わらず、4DO 産生量が増加しなかったことから、SL 産生量を増加させるための-S シグナルは、地上部で認識されることが考えられる。先行研究より、-N, -P の認識も地上部で行われることが報告されている。これらの知見から、地上部からの何らかのシグナルによって SL 産生量が増加すると予想される。-N 条件、-P 条件では 0.1 mM スクロース処理で、-S 条件では 0.01 mM スクロース処理で SL 産生量が低下した。糖は SL 情報伝達を抑制することで SL 感度を低下させ、枝分かれを増加させることや SL による葉の老化促進作用はグルコース処理によって回避されることが知られる。これらの知見から、糖は SL と拮抗した作用をもつと考えられる。SL 産生量の変化には少なくとも地上部からの糖シグナルが関与しており、栄養欠乏条件下では、糖濃度が低下することで SL 産生量の増加につながることが予想される。

-N, -P, -S 条件における遺伝子発現解析の結果を比較すると、-P 条件ではすべての SL 生合成遺伝子の発現量が著しく亢進した。一方、-N 条件と-S 条件では、*D27* 発現量の亢進が共通しており、*D17*, *Os900* の発現量は-P 条件と比較すると少なかった。このことから、-N, -S 条件では共通した制御が作用しているのかもしれない。-P 条件ではすべての SL 生合成遺伝子の発現量が亢進し、-S 条件では *D27* の発現量が著しく亢進するため、-P と-S を組み合わせた-PS 条件では SL 産生量が著しく増加すると予想した。しかし、実際には-PS 条件において SL 産生量が増加することは認められなかった。この結果は、栄養欠乏条件の組み合わせと SL 産生量に相加相乗的な効果はないことを示している。

第3章 ストリゴラクトンによって制御される植物の形態

緒言

植物は、周辺の環境の変化に応答して形態形成を柔軟に変化させる。一般に、栄養欠乏によって誘導される形態形成の変化には、成長の遅延、葉の黄化や果実の質の低下などがある。-N や-P 条件に応答して増加した SL によって、枝分かれが抑制と葉の老化の促進が誘導される。これらの形態形成の変化に加えて、葉の角度の増加は SL によって抑制する。葉の角度は、植物の受光量を決定づける形質の 1 つで、光合成効率にも影響する。葉の角度は、イネの葉身と葉鞘の付け根部分の葉節部の LJ の角度を測定することで定義される。この LJ の角度の制御には、転写因子 SPXs

(*Syg1/Pho81/XPR1*), *BC1* (*BU1-like1-complex*), 植物ホルモンのブラシノステロイドが関与する。枝分かれの制御では, *SL* とブラシノステロイドの相互作用が報告されている。そのため, *LJ* の角度制御においても, 同様に相互作用する可能性が想定される。そこで, 分げつ数, 葉の老化と *LJ* の角度の 3 つの形態に着目して研究を進めた。 $-S$ 条件が *SL* 産生量を増加させることから, $-S$ における分げつ数と葉の老化を測定した。また, $-N$, $-P$, $-S$ 条件で産生量が増加した *SL* が *LJ* の角度を制御するのかを検証し, *LJ* 関連遺伝子の発現解析, ブラシノステロイドの定量分析を行った。

実験結果

$-S$ 条件で増加する *SL* の生理学的役割を明らかにするために, 野生型のイネ, *SL* 生合成欠損変異体 *d27*, *d10*, *SL* 情報伝達欠損変異体 *d14* を $+S$ もしくは $-S$ 条件の水耕液で栽培して分げつ数およびクロロフィル含量を示す *SPAD* を測定した。野生型を $+S$ 条件で栽培すると, 分げつ数は日数経過と共に増加した。一方, $-S$ 条件で栽培すると, 分げつの伸長は全く観察されなかった。 $+S$ 条件で栽培した *d10*, *d14*, *d27* の分げつ数は, 野生型よりも多かった。 $-S$ 条件で栽培した *d10*, *d14* の分げつの伸長は観察されたが, その数は $+S$ の 1/2 程度であった。 $-S$ 条件で栽培した *d27* の分げつの伸長は観察されたが, その数は $+S$ 条件の 1/3 程度に減少した。 $-S$ 条件における *d27* の分げつ数は, 他の *SL* 変異体 *d10*, *d14* の 1/2 以下と顕著に減少した。 $+S$ 条件で栽培した時と比べて $-S$ 条件で栽培した野生型の *SPAD* は, 17%程度減少していた。一方, $-S$ 条件で栽培した *d10* の *SPAD* は, $+S$ 条件で栽培した時とほぼ同程度であり, *d14* の *SPAD* は, 約 5%減少した。 $-S$ 条件で栽培した *d27* の *SPAD* は, $+S$ 条件で栽培した時の約 10%減少していた。系統間で比較すると, $-S$ 条件で栽培した野生型の *SPAD* が最も低かった。*d27* の *SPAD* は, 他の *SL* 変異体 *d10*, *d14* と比べて約 15%減少していた。通常, *SL* 変異体は, 枝分かれの増加や葉の老化遅延などの表現型を系統が異なっても同様に示す。 $-S$ 条件で栽培した *d27* の分げつ数, *SPAD* は著しく減少したが, $-P$ 条件で栽培した *d27* の分げつ数, *SPAD* は control と同程度であった。

SL 変異体の第 2 葉の *LJ* の角度は, 野生型の 3 倍程度大きかった。*SL* 合成アナログの *GR24* を 20 μ M で処理した場合, 野生型および *SL* 生合成変異体の *LJ* 角度は未処理時の約 1/5 であった。一方, *SL* 情報伝達欠損変異体では *GR24* 処理による *LJ* の角度の変化はなかった。これらの結果より, *SL* が *LJ* の角度を制御することが示唆された。そこで, 既知の *LJ* の角度を制御する因子への *SL* の影響を調査した。まず, *SPXs*, *BCI* と *SL* との関係を調べるために, $-N$, $-P$, $-S$ 条件で栽培したシオカリの第 2 葉 *LJ* における遺伝子発現解析を行った。*BCI* ならびに *SPX1* の遺伝子発現量は, 供試した全ての条件において control との有意差が認められなかった。 $-N$, $-S$ 条件における *SPX2* の発現量は, 栄養欠乏条件で栽培して 1 日目には control の約 5.5 倍亢進したが, その次の日には control と同程度にまで減少した。次に, *LJ* の角度制御において *SL* とブラシノステロイドとが相互作用するのかを検証するために, ブラシノステロイド生合成阻害剤のブラシナゾール (*BRZ*) を *SL* 変異体の *LJ* に処理した。その結果, シオカリ, *SL* 変異体ともに *BRZ* 濃度依存的に *LJ* の角度が減少した。次に, 20 μ M *GR24* と 1 μ M ブラシノライドの影響を評価した。シオカリの *LJ* の角度は, *GR24* 処理区では未処理の約 1/3 に減少し, ブラシノライド処理区では未処理の約 2.2 倍に増加し, *GR24* とブラシノステロイドの同時処理では未処理の約 1/2 に減少した。*LJ* の内生ブラシノステロイド, カスタステロンを定量分析した結果, 野生型と *SL* 変異体との間で有意な差は認められなかった。カスタステロン産生量について $-N$, $-P$, $-S$ 条件に対する応答性を調べた結果, control, $-N$, $-P$ 条件ではほぼ同程度であった。一方, $-S$ 条件におけるカスタステロン産生量は, 増加する傾向にあっ

たが、有意差は認められなかった。次に、-N, -P, -S 条件において増加した SL が葉の角度を制御する生理学的な意義を明らかにするために、第 2 葉の LJ における過酸化水素 (H_2O_2) 含量を分析した。催芽後 9 日目における H_2O_2 含量は、control と -P 条件でほぼ同程度であった。一方、-N と -S 条件では有意に減少していた。催芽後 20 日目における H_2O_2 含量は、control, -N, -S 条件で同程度であり、有意差は認められなかった。一方、-P 条件の H_2O_2 含量は、control と比べて有意に増加していた。

SL 産生量は -N, -P, -S 条件に応答して増加する。そこで、野生型と SL 変異体を -N, -P, -K, -S, -Ca, -Mg 条件で栽培して LJ 角度を測定した結果、-N, -P, -S 条件で栽培すると LJ 角度が control の半分程度に小さくなり、その他の栄養欠乏における LJ 角度は control と変化しなかった。-N, -P, -S 条件における LJ で SL 生合成遺伝子の発現解析を行った結果、-P 条件において、供試したすべての SL 生合成遺伝子の発現量は増加した。-N 条件では *D10*, *Os900*, -S 条件では *D17*, *D10*, *Os900*, *Os1400* で発現量の亢進が認められた。LJ の角度におけるイネ品種の多様性を調べるために、イネ品種シオカリ、日本晴、農林 8 号、カサラスを栽培した結果、LJ の角度はシオカリが最も小さく、日本晴、農林 8 号、カサラスはほぼ同程度で、シオカリの 2.5 倍程度であった。日本晴、農林 8 号から単離された SL 変異体の LJ の角度は、それぞれの野生型と同程度であった。-N, -P, -S 条件で栽培したイネ品種日本晴における葉身屈曲の応答を調べた結果、-N, -P 条件において control の約 1/2 に減少したのに対し、-S 条件で栽培した日本晴の LJ の角度は control と同程度であった。

考察

-S 条件で生育するイネは、分げつが生じず、葉は黄化するなどの S 欠乏症が観察される。この S 欠乏症は、SL の生理作用である枝分かれの抑制と葉の老化促進の効果と類似している。そこで本章では、-S 条件で増加する SL の生理作用を明らかにするために、-S 条件における分げつ数と葉の老化に着目した。-S 条件で栽培した野生型の分げつ数と SPAD は減少したが、*d10*, *d14* の分げつは、+S 条件の約 1/2 程度維持しており、分げつの伸長が確認された。また、-S 条件で栽培した *d10*, *d14* の SPAD は、-S の影響を大きくは受けなかった。この結果から、イネの S 欠乏の症状である分げつの減少と葉の老化促進は、SL によって制御されていることを示している。

既知の LJ の角度を制御する因子と SL の関係を調査した結果、催芽後 7 日目の *SPX2* のみ -N, -S 条件に応答した遺伝子発現が見られたものの、SL 関連遺伝子の変動する催芽後 9 日目における遺伝子発現量は、control と同程度であった。この結果より、-N, -S 条件で *SPXs* の発現は SL シグナルよりも先に変動することと、*SPXs*, *BCI* と SL 関連遺伝子は共発現していないことが分かった。*SPXs* ならびに *BCI* と SL による LJ の角度制御は、独立していると考えられる。10 μM BRZ 処理区の SL 変異体では、LJ の角度は小さくなるものの野生型よりも大きな角度を維持していた。そのため、SL 変異体の LJ ではブラシノステロイドが蓄積していると予想した。ところが、ブラシノステロイド産生量を野生型と SL 変異体とで比較すると、有意差は認められなかった。これらの結果より、少なくとも SL シグナルがブラシノステロイド産生量に影響しないことが明らかとなった。GR24 とブラシノステロイドを LJ に直接処理すると、LJ の角度は GR24 を単独で処理した時とほぼ同程度であった。この結果より、ブラシノステロイドの下流で SL が LJ の角度を制御していることが分かった。-N, -P, -S 条件に応答した LJ の角度の変化は、SL 産生量の変化によって制御され、SL による LJ の角度の制御においてブラシノステロイド生合成経路とは相互作用はしないと考えられ

る。催芽後 9 日目における H_2O_2 含量は, -N, -S 条件で減少していた。一方で, SL 産生量が増加する -P では control と有意な差は認められなかった。これらの結果から, 栄養欠乏条件で葉の角度が小さくことによって, H_2O_2 含量を低下させている可能性はあるが, SL の生理作用は影響していないことが考えられる。

イネの品種シオカリを必須多量栄養欠乏条件で栽培すると, -N, -P, -S 条件でのみ葉の角度が小さくなり, LJ における SL 生合成遺伝子遺伝子の発現量が亢進していた。このことから, -N, -P, -S 条件において LJ の角度が減少するのは, LJ で産生されている SL が制御していると考えられる。ただし, 根で産生された SL が LJ に輸送され, 作用している可能性も考えられる。LJ の角度におけるイネ品種間差を調べると, 日本晴, 農林 8 号, カラサスはシオカリの 2 倍も大きい LJ の角度であった。栄養十分条件では SL 生合成遺伝子の発現量が低いので, LJ の角度は大きくなる。一方で, -N, -P 条件において SL 生合成遺伝子の発現量が亢進し, 内生 SL 量が増加することが予想されるため, LJ の角度は小さくなる。

第 4 章 総合考察

植物のストレス応答における研究の主たる最終目標点は, 生物ストレスと非生物ストレスの両者に対して高い耐性を示す作物を開発することである。そのためには, 植物がどのようにしてストレスを感知して, どのようにして適応するのかを明らかにする必要がある。当該研究において, N, P だけでなく, S の濃度を地上部で感知したイネが, 根の SL 産生量を増加させることを明らかにした。地上部からのシグナルとして, スクロース含量の低下が SL 産生量の増加につながると考えられる。-S 条件において SL 生合成遺伝子の *D27* の発現量が増加していた。*D27* の遺伝子発現は, *NODULATION SIGNALING PATHWAYS* (*NSPs*) によって亢進する。*NSPs* の遺伝子発現は, AM 菌が放出するキチンオリゴ糖によって誘導される。すなわち, -S 条件において SL 産生量が高まり, AM 菌との共生を行うことで, 土壌中の S を効率よく回収し, *NSPs* の遺伝子発現が亢進することで, より強固に AM 菌と共生できるようになると考えられる。さらに, -N, -P, -S 条件で増加した SL によって分げつが抑制され, 葉の老化が促進され, 直立葉になることを明らかにした。これは, 限られた栄養の浪費を防ぐために分げつを抑制している。その際に, 葉が強光ストレスにさらされないように葉の角度を小さくすることで, 光合成する期間を長く保つと考えられるが, SL 生理作用と H_2O_2 含量の減少は関与していないことを明らかにした。そして最終的には, 転流を促すために葉の老化を促進すると考えられる。