

研究終了報告書

「ストリゴラクトン生産・分泌制御を介したアーバスキュラー菌根菌利用技術の開発」

研究期間： 2017 年 10 月～2021 年 3 月

(新型コロナウイルス感染症の影響を受け 2021 年 9 月まで延長)

研究者： 米山 香織

1. 研究のねらい

多量必須元素の一つであり、植物の健全な生育に必要な不可欠であるリンは、土壌に固定されやすく、植物はつねにリン酸欠乏状態に曝されている。そのような自然条件に適応するため、土壌中に張り巡らせた菌糸を通して宿主植物のリン酸吸収を助けるアーバスキュラー菌根菌 (AM 菌) との共生は、約 4.5 億年前の植物の陸上への進出と同時に始まったとされ、現在では陸上植物の 8 割から 9 割が AM 菌と共生している。AM 共生によるリン酸獲得向上による植物の生育促進は良く知られており、実際にイスラエルの研究グループは、作物苗を移植する際に高密度の AM 菌を処理することにより効率的に感染・共生させ、初期生育を著しく促進させることに成功している。また AM 共生は植物の栄養獲得を助けるだけではなく、耐病性や耐干性などの環境ストレス耐性の増強にも貢献するため、AM 共生の促進は、安定的な植物生産性の向上にもつながる。

植物の根から分泌されるストリゴラクトン (SL) は、植物体内では地上部・地下部の形態形成を制御する植物ホルモンとして作用し、根圏ではアーバスキュラー菌根 (AM) 菌との共生開始シグナルとして作用する。SL 生合成欠損変異体では AM 共生率が顕著に低下するが、合成 SL 誘導体である GR24 の処理により、AM 共生率は回復する。このことは、SL 生合成・分泌を促進することによって AM 応答性の増大が可能であることを明示している。

これまでに、AM 菌の宿主植物では、共通してリン酸欠乏条件下で SL 生産・分泌が促進されることを明らかにし、更に、それぞれ異なる化学構造の SL を分泌する植物を混植すると、単植と比べて SL の分泌が促進される現象を見出した。このような混植による SL の分泌促進は、自他認識反応と考えられるが、その詳細は不明である。一方、混植による作物の生育促進・抑制は、フィールドにおいて多数報告があるが、その科学的原因は不明である。また、AM 菌の群衆構造は、隣接する植物の影響を受けるという報告はあるが、AM 菌の群衆構造を決定する要因も不明である。そこで本研究では、SL を介した自他認識反応メカニズムの解明をめざすとともに、実際のフィールド条件下で混植を行い、SL 分泌促進の有無、AM 共生への影響等を調査した。

2. 研究成果

(1) 概要

ストリゴラクトン (SL) の生産・分泌は、リン酸や窒素等の無機養分、オーキシシンやサイトカイニン (Yoneyama et al., *Front. Plant Sci.*, 2020) のような植物ホルモンの影響を受けるが、その詳細な制御メカニズムは明らかになっていない。本課題では主に、SL 生合成・受容体・シグナル伝達の変異体が存在するイネ (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) を使って、SL の生産・分泌について詳細に調べた。その結果、少なくともイネは、SL の根圏濃度を感知し、SL の受

容シグナル伝達を介して(フィードバック制御と考えられる)、SL 生合成・分泌を厳密に調整していることを明らかにした。また、合成 SL である GR24 を与えると、SL 生産・分泌が有意に促進されることを確認し、植物は自身が生産していない SL に反応し、自身の SL 生産・分泌を調節することを確認した。さらに、フィールド条件で混植による生育促進の報告があるダイズとトウモロコシを室内でポット栽培したところ、ダイズとの混植により、トウモロコシの SL 分泌が促進されることを示すことができた。

SL はごく微量にしか生産・分泌されず、精製過程で容易に分解するという化学的不安定さから極めて扱いにくく、土壌からの SL の検出は報告されていない。本課題では、根圏土壌からの SL の検出を初めて成功した。そして、実際のフィールド条件下では、SL が予想以上に拡散していることを明らかにすることができた。

新型コロナウイルス感染症の影響を受け 6 ヶ月間研究期間を延長し、ダイズとトウモロコシの単植/混植の圃場試験を実施し、RNA-seq および AM 菌の群衆構造解析を行なった。

(2) 詳細

研究テーマ A 「SL を介した自他認識反応メカニズムの解明」

混植による SL 分泌促進ではなく、単植では SL 分泌抑制が起きている可能性が考えられたため、イネを水耕栽培し、隣接密度に対する SL 生産・分泌の応答について検討した。WT のイネは、1, 2, 3 個体と個体数を変えて培養しても、培養液中の SL 濃度が一定となった。すなわち培養個体数が増えると、1 個体あたりの SL 分泌量が低下することがわかった (Fig.1A)。この時、異なる培養個体数間で、根の内生 SL 含量に差は認められなかった (Fig.1B)。また、1 個体培養の根と比較すると、3 個体培養の根の SL 生合成遺伝子の発現は低下し、受容

体遺伝子の発現は増加していた (Fig.1C)。一方、SL 受容変異体である *d14* では、培養個体数が増加しても、1 個体あたりの SL 分泌量の有意な低下は認められなかった。次に、WT において培養液量や培養時間が

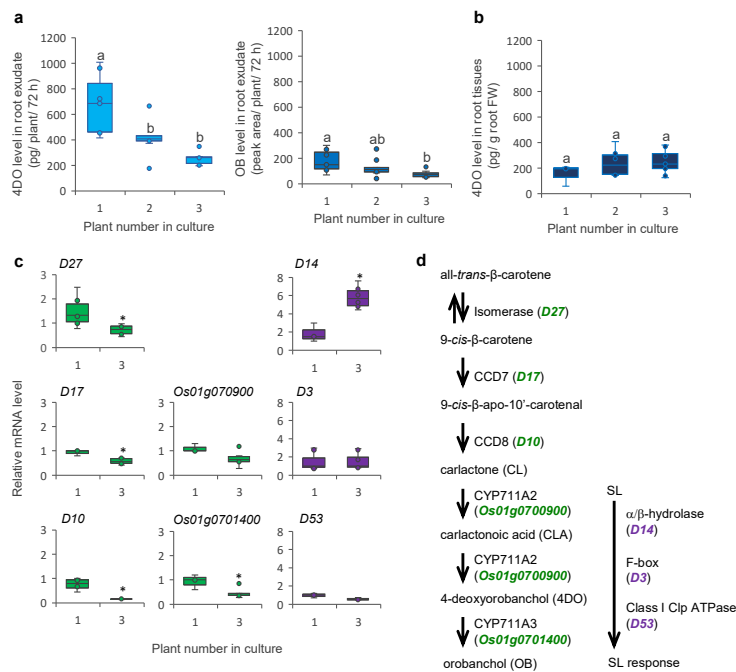


Figure 1: Crowding alters strigolactone synthesis and exudation

SL 分泌に与える影響を検討した。培養液量が 2 倍に増えると、培養液量あたりの SL 分泌量は 2 倍に増加した。しかし、24 時間から 48 時間、72 時間と培養時間を長くしても、培養液量あたりの SL 分泌量は一定であった。さらに、日本晴と SL 生合成遺伝子欠損である *d17* 変異体と混植すると、1 個体あたりの SL 分泌量の有意な低下は起こらなかった。これらの結果から、少なくともイネは、SL の根圏濃度を感知し、SL の受容シグナル伝達を介して、SL 生合成・分泌を厳密に調整している可能性が強く示唆された。

4 つの立体異性体が存在する合成 SL のイネへの投与実験を行ったところ、2 つの GR24 が SL 分泌および根の内生量を増加させた。GR24 の SL 分泌促進は、SL 生合成を負に制御するリン酸との共処理でも認められ、特に根の内生量を増加させた。さらに、WT だけでなく SL 受容シグナル伝達変異体である *d14* 及び *d3* 変異体の SL 分泌・内生量も増加させた。すなわち、異なる化学構造の SL を分泌する植物同士の混植による SL 分泌促進には、SL 受容シグナル伝達は関与していないことが示唆された。

研究テーマ B 「フィールド条件下での混植が作物の SL 生産・分泌に与える影響の調査」

まず室内において、フィールド条件で混植による生育促進の報告があるダイズとトウモロコシを、圃場土を詰めたポットで混植あるいは単植栽培した。混植開始をしてから約 1 週間後は、単植と混植で SL 分泌量に差は認められなかった。一方、2 週間以降は、反復数が少なく、ばらつきが大きいため有意差はないものの、ダイズと混植したトウモロコシの SL 分泌量は、1 個体のトウモロコシ栽培区よりも増加傾向であった(Fig.2)。テーマ A では、培養個体数の増加で 1 個体あたりの SL 分泌量がフィードバック制御により低下することを示したが、ここでは 2 個体培養での低下は認められなかった。イネを土耕栽培し培養個体数が SL 分泌に与える影響を時系列で調べた結果、生育前半は培養個体数の影響は認められないが、後半は、水耕の時と同様に、土耕でも培養個体数の増加と共に 1 個体あたりの SL 分泌低下は認められる。そのため今回の条件では、2 個体培養の単植は、まだ SL 合成・分泌に影響を与えない時期であった可能性が考えられた。

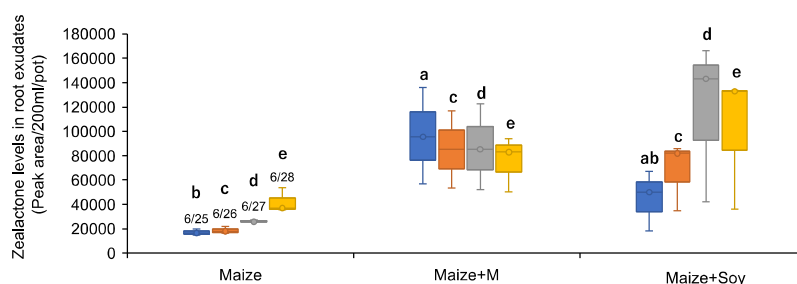


Figure 2: Co-culture with soy enhances strigolactone exudation in maize

2018 年度の圃場試験は異常気象で失敗に終わった。2019 年度は、京都大学および愛媛大学の圃場にて、ダイズとトウモロコシの混植・単植栽培を行い、実際に根圏土壌から SL の検出に成功した。その結果、土壌中では、予想以上に SL が拡散していることが確認され、面積が限られた狭い圃場では、単植と混植を明確に分離することは不可能であることが示唆された。2020 年度はコロナ禍の影響により京都大で圃場試験を行うことができなかった。

新型コロナウイルス感染症の影響を受け 6 ヶ月間研究期間を延長し、2021 年夏に、愛媛大学の広大な寄付圃場にて、ダイズとトウモロコシの単植/混植の圃場試験を行なった。トウモロコシと混植したダイズの根圏土壌からは、トウモロコシが分泌する SL が検出され、また、地上部の枝分かれ抑制が認められた。2019 年の結果の再現性を確認することができ、かつ、広大な圃場の利用により、単植、混植の影響を明確に調べることができた。

研究テーマ C 「AM 応答性/地上部枝分かれ/SL 生産・分泌の関連性の解明」

SL の枝分かれ抑制活性に多少優劣はあるものの、基本的にどのような SL を外から与えても抑制効果は認められる。これまで根寄生雑草の発芽誘導及び AM 菌の菌糸分岐誘導活性を指標に植物の根滲出液から約 30 種類の SL が単離構造決定されているが、地上部枝分かれ抑制活性本体は不明のままである。そこで本研究では、地上部枝分かれ抑制活性本体の単離構造決定を目指した。トウモロコシ、トマトなどの主要な作物において SL 生合成遺伝子の機能解析を進めた(Yoneyama et al. *New Phytol.* 2018)。また、シロイヌナズナにおいては、根からではなく初めて地上部から SL を検出することができ、地上部枝分かれ抑制活性本体の前駆体を構造決定することができた(Yoneyama et al. *Plant Direct.* 2020)。

AM 接種効果及び地上部の枝分かれ表現形が異なるダイズ品種が生産・分泌する SL の同定・定量を行ったところ、品種間差で SL 分泌量に明らかな差は認められたが、AM 応答性の能力の差と、分泌する SL 量には相関関係がないことが明らかとなった。

3. 今後の展開

本さがけ研究を通して、植物は根圏のストリゴラクトン濃度を感知し、ストリゴラクトン受容体を介したフィードバックにより、その生合成・分泌を厳密に制御している可能性を明らかにすることができた。また、異なる化学構造のストリゴラクトンを分泌する植物の混植によるストリゴラクトン分泌の促進は、このフィードバック制御だけでは説明できない可能性が示唆された。さらに、これまで根あるいは根滲出液でのみからしか同定されたことがない SL を地上部から検出可能であることを示すことができた。今後は、トランスクリプトーム解析などにより、SL のフィードバック制御を含めた分子メカニズムの詳細を明らかにする。また、地上部枝分かれ抑制活性本体を特定したい。これらの成果から、植物・植物間および植物・微生物間の相互作用、枝分かれの制御による植物の地上部の形態形成の仕組みに関する重要な知見だけでなく、共生の計画的な促進による作物生産性の飛躍的向上および枝分かれの制御による作物の地上部形態の最適化による生産性の増大技術の提供につなげたい。

4. 自己評価

さがけ研究開始と愛媛大学の助教として赴任したのがほぼ同時であり、まず取り組まなければいけなかったことは、実験設備が全くない研究室の立ち上げであった。さがけの研究費を最大限に利用し、生物有機化学実験を行う上で必要不可欠な環境を整えることができた。本課題に関して議論をする相手もない中、さがけメンバー、アドバイザー、研究総括からのアドバイスや交流は精神的に大きな励みにもなった。頂いたアドバイスのおかげで上記の研究成果を得られることができたものの、ストリゴラクトンを介した自他認識反応メカニズムの解明、フィールド条件下での混植が作物の SL 生産・分泌に与える影響の解明、および AM 応答性/地

上部枝分かれ/SL 生産・分泌の関連性の解明には至らなかった。それでも、今後、これらの解明を達せられる土台は作成することができたため、目標達成に向けて邁進する。

ストリゴラクトンは、持続可能な農業生産を効率的に行う上で重要なファクターの一つであるにもかかわらず、化学的に不安定で微量にしか生産・分泌されないことから、農業生産への応用研究、特にフィールドでの活用は疑問視されていた。そのような中、本課題を通して、根圏土壌からのストリゴラクトン検出に成功し、フィールド条件下で予想以上に拡散していることを見出すことができた。これらの成果は、本さきがけフィールド植物制御の目標である「フィールドにおける植物の生命現象の制御に向けた次世代基盤技術の創出」に貢献できると考えられる。今後の展開に期待してほしい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:6件

1. **Yoneyama K**, Mori N, Sato T, Yoda A, et al. Conversion of carlactonoic acid is a conserved function of MAX1 homologs in strigolactone biosynthesis. *New Phytologist*. 2018, 218(4), 1522-1533

シロイヌナズナ、イネだけでなく、トマト、トウモロコシ、ポプラ、イヌカタヒバを含む様々な植物における、ストリゴラクトン生合成遺伝子 *MAX1* (*More Axillary Growth 1*) の酵素機能を調べ、共通して、SL 骨格を持つ carlactone から carlactonoic acid への変換を触媒することがわかった。また *MAX1* の機能が、典型的 SL の一つである 4-deoxyorobanchol の生成を決定していることを明らかにした。

2. **Yoneyama K***, Xie X, Nomura T, Yoneyama K. Do phosphate and cytokinin interact to regulate strigolactone biosynthesis or act independently? *Frontiers in Plant Science*. 2020, 11, Article 438, 1-9 *Corresponding

典型的植物ホルモンの一つであるサイトカイニン(CK)は、地上部枝分かれを促進する。一方、ストリゴラクトン(SL)は、枝分かれを抑制する。そこでイネを用いて CK が SL の生産・分泌に与える影響を調べたところ、CK は SL 生合成・分泌を負に制御することが明らかとなった。リン酸も SL 生合成・分泌を負に制御するが、CK とリン酸は独立して SL 生合成を制御していることがわかった。

3. **Yoneyama K***, Akiyama K, Brewer P, Mori N, et al. Hydroxyl carlactone derivatives are predominant strigolactones in Arabidopsis. *Plant Direct*. 2020, 4, 1-14 *Corresponding

シロイヌナズナの新奇 SL 生合成遺伝子 *LBO* (*Lateral Branching Oxidoreductase*) の酵素機能を調べ、*LBO* は methyl carlactonoate から hydroxymethyl carlactonoate への変換を触媒していることを明らかにし、トマト、トウモロコシ、ソルガムの *LBO* ホモログでも同様の変換が行われることを確認した。また、シロイヌナズナでは、hydroxy carlactone 類縁体が主要な SL であることを示した。

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件(特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Yoneyama K. How do strigolactones ameliorate nutrient deficiencies in plants? Engineering Plants for Agriculture. 2019. pp. 211-226. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology (著書)
2. 米山香織. シロイヌナズナの地上部枝分かれ抑制活性本体を追う. アグリバイオ. 2019年3月号.(雑誌)
3. Yoneyama K., Yoda A, Xie X, Nomura T, Yoneyama K. Do rice plants sense SLs exuded in the rhizosphere to regulate SL production? The 23rd International Conferences on Plant Growth Substances. 2019年7月3日(招待講演)
4. Yoneyama K. How are strigolactone production and exudation regulated in rice plants? International Symposium on the Future Direction of Plant Science by Young Researchers. 2019年12月17日(招待講演)
5. Yoneyama K. Regulation mechanism of strigolactone production/exudation in rice plants. Workshop on strigolactone and root parasitic plant. 2019年12月19日(招待講演)
6. Yoneyama K and Brewer P. Strigolactones, how are they synthesized to regulate plant growth and development? Current Opinion in Plant Biology. 2021. 63: 102072 *コロナ延長時の成果
7. 米山香織. ストリゴラクトン生合成経路と地上部枝分かれ抑制活性本体の解明. 日本農薬学会誌. 2021. 46 (2). 177-178 *コロナ延長時の成果
8. 米山香織. 根圏に分泌されるストリゴラクトンの新たな機能とその分泌制御メカニズム. 日本植物学会第85回大会. 2021年9月21日(招待講演) *コロナ延長時の成果