

ストリゴラクトンの生合成および信号伝達メカニズムの解明

明治大学農学部 瀬戸 義哉

はじめに

ストリゴラクトン (以下SL) は、今から約50年前に、アフリカ等の地域で甚大な農業被害をもたらす根寄生植物の発芽を誘導する宿主側の因子として初めて単離・構造決定された。その後、宿主にとって不利に作用する分子をなぜ生産・放出するのか、という点について大きな疑問であったが、2005年に、SLは植物と共生する微生物であるアーバスキュラー菌根菌との共生シグナルとして機能することが明らかになった。さらに、2008年には植物地上部の枝分かれを制御する未知のホルモン分子の実体としてSLが再度発見されることとなり¹⁾、これを機に天然物化学から植物生理学に至る幅広い分野の研究者が参画する一つの大きな研究領域を形成することとなった。著者は、ホルモンとしての作用が見出された翌年である2009年より、本領域に参画する機会を頂き、長い間未解明であったSL生合成経路の解明に加え、信号伝達メカニズムを解明する研究に携わってきた。以下にそれぞれの研究について紹介する。

1. ストリゴラクトンの生合成経路の解明

2008年にSLが地上部枝分かれを制御する植物ホルモン分子であることを見出された際に、それまで枝分かれ過剰突然変異体として知られていた変異体の幾つかは、SLを生合成することが出来ない変異体であることが明らかになった。これらの変異体は、カロテノイド酸化開裂型酵素であるCCD7, CCD8を欠損しており、SLがカロテノイド由来する分子であることが強く示唆された。さらに、2009年には、鉄含有型機能未知酵素であるD27がSLの生合成に関与することに加え、シロイヌナズナで見出されていたシトクロムP450の一種であるCYP711Aの欠損変異体である*max1*も、SL生合成変異体であることが明らかになった。すなわち、この時点で、上記四つの酵素がSLの生合成に関与することが明らかになった。2012年に、ドイツの研究グループはこれらのうちCCD7, CCD8, D27をカロテノイドと反応させることにより、三つの酵素が連続的に作用することで、SLと類似した骨格を有するカーラクトン (以下CL) と名付けられた分子が生成することを報告した²⁾。この際、完全に機能が未知であったD27は、カロテノイドの9位異性化を可逆的に触媒することが示された。CLはSLとの構造類似性からも、生合成における中間体分子であることが予想されたものの、直接的な証明はなされていなかった。そこで、著者らは、化学合成によって調製した、安定同位体標識CLを用いることで、CLがSLの前駆体であるか否かについて検証を行った。まずは、標識CLをイネのSL欠損変異体に投与することにより、植物内でSL分子の一つである4-デオキシオロパンコールへと変換されることを明らかにした。さらに、標識CLを内部標準として用いたLC-MS/MS分析により、イネとシロイヌナズナの植物抽出液より、CLを内生分子として

検出・同定することに成功した。これらの結果により、CLがSLの生合成中間体であることを直接的に証明することに成功した³⁾。さらに、上記*max1*変異体においては、野生型と比較して、顕著にCLの内生量が増加することを見出した。本結果は、CLがMAX1の直接の基質である可能性を示唆していたため、この点について検討を行った。共同研究者である宇都宮大学の野村崇人准教授らの研究により、組み換えMAX1がCLの19位を3段階酸化し、生成物としてカーラクトン酸 (以下CLA) を与えることが明らかになった。さらに、著者らは標識CLの投与実験により、本変換反応が、植物体内で、MAX1依存的に起こることを証明し、MAX1がCLからCLAへの変換を担う酵素であることを明らかにした。さらに、CLAのメチルエステル誘導体がシロイヌナズナにおける新規SLとして存在することも見出した。興味深いことに、本分子は、詳細を後述するSL受容体タンパク質であるAtD14と直接相互作用可能であることも明らかにした⁴⁾。以上の研究により、CL, CLAをSL生合成中間体として同定するとともに、その後の生合成経路の一端を解明することに成功した。

2. ストリゴラクトン受容体の機能解析

2008年にSLのホルモン作用が発見された際に、植物ホルモンの信号伝達でよくみられるF-boxタンパク質の欠損変異体であるイネの*d3*ならびに、シロイヌナズナの*max2*変異体は、いずれもSL非感受性変異体であることが明らかとなった。すなわち、SLの信号伝達においても、他のホルモンで見られるようなリプレッサータンパク質のホルモン依存的なユビキチン化とそれに伴う分解というメカニズムが関与することが示唆された。さらに、2009年には、新たなSL非感受性変異体としてイネの*d14*が見出された。*d14*変異体においては、SLの内生量が野生型と比較して過剰に蓄積していることに加え、原因遺伝子は、ジベレリンの受容体と同じ α/β -hydrolaseファミリーのタンパク質をコードしており、D14がSL受容体である可能性が示唆された。一方で、ジベレリンの受容体においては、本

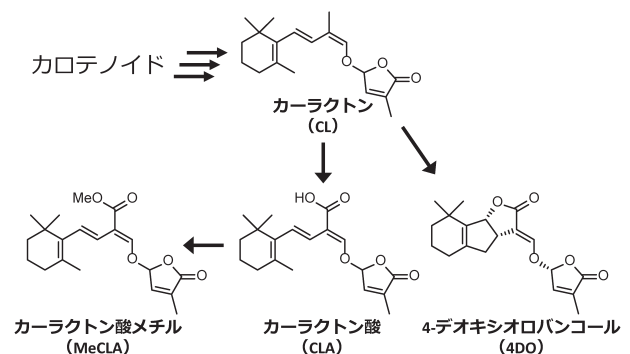


図1. 著者らが明らかにしたSLの生合成経路

ファミリーのタンパク質が加水分解反応を触媒するために必要な三つ組み残基の一つである His が Val に置換しており、酵素機能は有しておらず、ジベレリンに対する受容体としてのみ機能することが明らかになっていたのに対し、D14においては、必要な三つ組み残基が保存されていた。このことから、D14に関しては、SL受容体として機能する可能性に加えて、SLを代謝し活性型ホルモンへと変換する生合成酵素である可能性も考えられた。その後、2013年に、中国のグループが、信号伝達を負に制御する因子、すなわち、リプレッサーとして機能し得る新たな因子として、イネの *d53* 変異体の原因遺伝子がコードするタンパク質を同定した。D53は、SL依存的にD14と複合体を形成することに加え、SL処理により、上記のF-box依存的にプロテアソーム経路にて分解されることが明らかになり、これらの結果から、D14がSL受容体として機能すると考えられるようになった。一方で、D14はSLに対して加水分解活性を有することも報告され、加水分解作用と信号伝達との関係性について様々な議論がなされるようになった。その中において、SLの加水分解産物がD14のポケット中に残ることで、D14が信号伝達における活性型となる、というモデルや、加水分解途中でD14とSL分子の間で形成される共有結合中間体が、ホルモン信号伝達には必須であるというようなモデル等も報告された。

そのような中、著者らは、D14とSLの試験管内での相互作用を詳細に解析した。Differential Scanning Fluorimetry (DSF)法は、タンパク質の熱変性温度の変化を指標に、タンパク質と低分子間の相互作用を評価可能な手法であるが、本手法により、D14とSLの相互作用を詳細に解析した。その結果、D14の熱変性温度は活性型のSL存在下において低下し、活性のないアナログ分子存在下では変性温度の低下は起きないことを見出した。この結果を受けて、D14によるSLの加水分解と、DSF法によるD14の熱変性温度変化を経時的に解析した結果、熱変性温度の変化は、基質であるSLの減少に伴い低下していくことが明らかとなり、少なくともD14の変性温度の低下を引き起こしている本体は、基質であるSLそのものであることが明らかになった。さらに、三つ組み残基に点変異を導入した変異型受容体の機能解析を行った結果、酵素活性が顕著に低下したD218A変異体が、シロイヌナズナの *d14* 変異体の表現型を相補することを見出した。これらの結果から、D14はSL分子そのものと相互作用することにより信号伝達可能な状態へと変化する、すなわち、D14によるSLの加水分解は、信号伝達そのものには必要ではないというモデルを提唱した。また、D14によるSLの加水分解は、信号伝達後にSL分子を分解し、不活性化するための機構であることを示唆する結果も得ており、図2にまとめたような信号伝達モデルを提唱するに至った。すなわち、D14はSL分子そのものを受容することにより、

信号伝達可能な状態へと変化する。この際、触媒三つ組み残基の一つである Asp を含むループ領域が構造変化することで、一時的に酵素機能が失われる。これにより信号伝達における他の因子と複合体を形成し、リプレッサーの分解に伴って信号が伝達される。その後、D14の構造が基に戻ることで、酵素機能が回復し、SL分子を加水分解し不活性化する、つまり、D14はSLの受容体不活性化を担う多機能なタンパク質であるというモデルを提唱した⁵⁾。

おわりに

上記の通り、著者は、これまで長い間不明であったSLの生合成経路の一端を解明するとともに、加水分解酵素型の受容体であるD14が、SLの受容と不活性化を担うという新たなモデルを提唱するに至った。このような信号伝達モデルは、他の植物ホルモンではみられない新規性の高いものである。一方で、現在も信号伝達メカニズムについては議論が続いており、今後さらに研究が進展することで、より明確に信号伝達メカニズムが解明されることが期待される。2008年に植物ホルモンとしての機能が発見されて以降、SL研究分野は急速に進展している。著者は、非常に良いタイミングで本分野に参画する機会を頂いたことにより、上記のような重要な発見に貢献することが出来たことを大変感謝している。今後も本分野の進展に貢献できるように研究活動に精進したい。

(引用文献)

- 1) Umehara, M. et al, *Nature* **455**, 195–200 (2008)
- 2) Alder, A. et al, *Science* **335**, 1348–1351 (2012)
- 3) Seto, Y., Sado, A., Asami, K., et al, *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, 1640–1645 (2014)
- 4) Abe, S., Sado, A., Tanaka, K., et al, *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, 18084–18089 (2014)
- 5) Seto, Y., Yasui, R. et al, *Nat Commun* **10**, 191 (2019)

謝辞 本研究成果の大部分は、著者が理化学研究所植物科学研究センター、東北大学大学院生命科学研究所在籍時に、山口信次郎先生(現京都大学化学研究所教授)の研究室にて行われたものです。非常に興味深い研究テーマを頂き、ご指導ご鞭撻を賜りました山口先生にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。また、共同研究者として大変お世話になりました、大阪府立大学・秋山康紀先生、宇都宮大学・米山功一先生(現同名誉教授)、同・野村崇人先生、東北大学大学院生命科学研究所・経塚淳子先生に心よりお礼申し上げます。また、東北大学生命科学研究科大学院生として本研究に共に取り組んでくれた安井令博士(現第一三共株式会社)に心からお礼申し上げます。著者は北海道大学大学院農学院にて博士の学位を取得しました。学生時代にお世話になり、著者に研究の面白さを教えて頂いた吉原照彦先生、鍋田憲助先生、松浦英幸先生、高橋公咲先生(現東京農業大学教授)に心からお礼申し上げます。また、理化学研究所、東北大学でお世話になった先生方、研究員、学生、スタッフの方々にも心よりお礼申し上げます。著者は2018年より現所属である明治大学農学部へ異動し、新たな研究室を立ち上げるに至りました。明治大学異動後に大変お世話になっている本学農学部農芸化学科の先生方や研究室の学生の皆様にも心よりお礼申し上げます。最後に、本奨励賞にご推薦頂きました日本農芸化学会関東支部支部長で東京農業大学教授の松島芳隆先生に心よりお礼申し上げます。

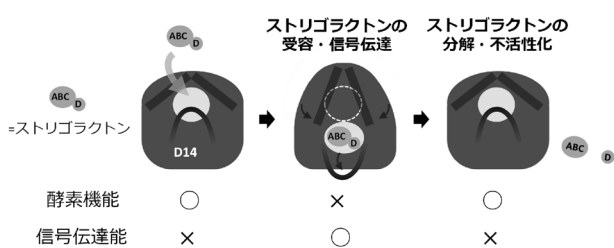


図2. 著者らが提唱したD14によるSL信号伝達メカニズム