

加水分解酵素型受容体 HTL 経路で働く新規植物ホルモンに関する研究

Studies on a novel plant hormone that works in a hydrolase type receptor HTL (日本農芸化学会推薦)

代表研究者 明治大学 瀬戸 義哉 Meiji University Yoshiya SETO
協同研究者 岡山理科大学 福井 康祐 Okayama University of Science Kosuke FUKUI

Strigolactones (SLs) were originally characterized to be root derived signals for parasitic and symbiotic interactions, yet are now well known to be endogenous hormones that regulate shoot branching. D14, which is a member of α/β hydrolase super family, was characterized to be the SL receptor in plants. There is a closely related homolog of D14, which is called to be HTL/KAI2 in Arabidopsis. HTL/KAI2 was identified as a receptor of smoke-derived germination inducer, Karrikin (KAR). However, KARs are not endogenously occurring in plant tissues, and also *htl/kai2* knockout mutant shows longer hypocotyl phenotype. Thus, it is thought to be that there is an unidentified hormone that is working in the HTL/KAI2 pathway. In this study, we focused on HTL in a model basal plant, *Marchantia polymorpha* (MpHTL). Toward identification of the endogenous ligand of MpHTL, we first tried to identify a synthetic agonist that can specifically interact with MpHTL. Moreover, we tried to establish an efficient bioassay method to identify the endogenous ligand molecule using MpHTL and its signaling partner protein.

研究目的

ストリゴラクトン（以下 SL）は寄生と共生を制御する化学シグナルとして知られていた化合物であったが、2008年に第三の作用として、植物の枝分かれを制御する内生のホルモン分子として機能することが明らかとなった。SLがホルモンとして見出されて以降、その生合成や信号伝達メカニズムに関する研究が飛躍的に進展し、その全容が明らかとなりつつある。SLは加水分解酵素に属する受容体 D14 に受容されることで機能する。D14には相同性の高いパラログが存在し、シロイヌナズナにおいては HTL/KAI2（以下 HTL）と呼ばれている。HTLは煙由来の発芽誘導分子であるカリキン（KAR）の受容体として見出されたが、KARは植物の内生分子としては含まれておらず、かつ、興味深いことに、シロイヌナズナにおける本遺伝子の欠損変異体の解析から、本経路は発芽や胚軸伸長など、光形態形成において重要な役割を担うことが示唆されて

いる（Fig. 1）。また、D14との相同性等から、HTL経路で働く未知の新規植物ホルモンが存在することが示唆されているものの、

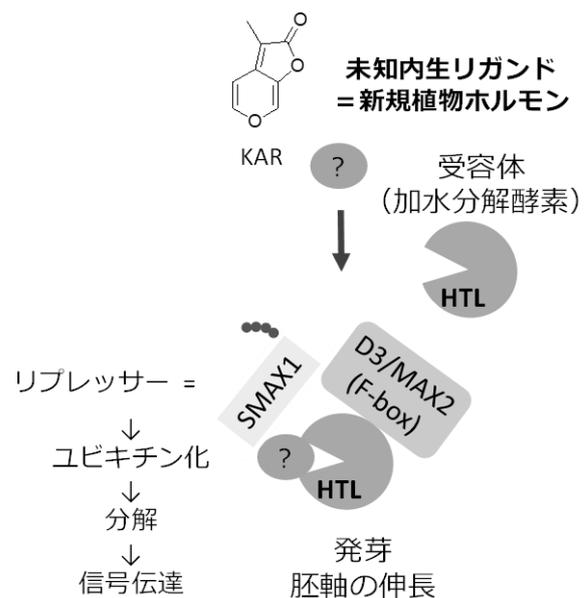


Fig.1. The signaling mechanism of HTL pathway. Upon the perception of KAR or unidentified ligand molecule by HTL, HTL forms a signaling complex with SMAX1 (repressor) and D3/MAX2 (F-box).

現在までに同定には至っていない。本研究では、HTL 経路で働く新規ホルモンの同定に向け、主に基部植物であるゼニゴケを用い、本経路で作用するアゴニストの探索や、ホルモン探索に有効な生物検定系の構築を行うことを目的とした。

研究経過

代表者は、以前にゼニゴケの HTL について結晶構造解析を行っており、既に報告されているシロイヌナズナの HTL と比較すると、ポケットの形や大きさに違いがあることを見出している。さらに、ゼニゴケの HTL はシロイヌナズナの *htl* 欠損変異体に導入した際に、その表現型を相補しないことが報告されていた。表現型が相補しない理由として、内生のリガンド化学構造が異なるということが一つの可能性として考えられたため、この点について詳細に検討することとした。ゼニゴケの HTL については、特異的に作用するアゴニスト分子については報告されていなかったことから、まずは、ゼニゴケ HTL に作用するアゴニストを探索することとした。共同研究者の福井は、以前に SL 受容体である D14 や、シロイヌナズナの HTL に作用する人工アゴニストとしてデブロン類を報告している (参考文献 1,2)。デブロンは、種々の置換基を有するフェノール化合物と、ストリゴラクトンに特徴的なメチルブテノライド環をエーテル結合で連結させた化合物であり、置換基を変えることで、多種多様な分子を合成することが可能である。そこで、デブロンの中に、ゼニゴケ HTL と相互作用可能な分子が存在すると考え、合成デブロン約 50 種類の中からスクリーニング試験を行った。スクリーニングには、タンパク質熱変性

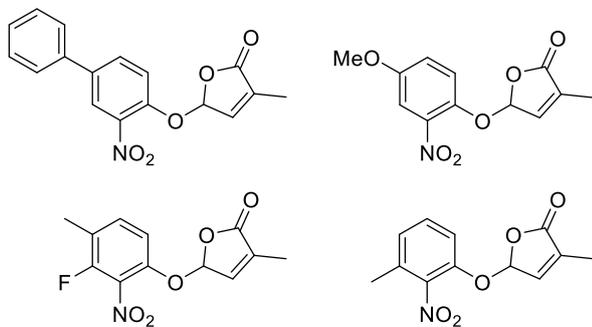
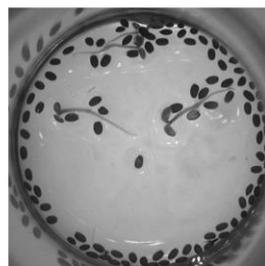


Fig. 2. Chemical structures of debranonones that can interact with MpHTL.

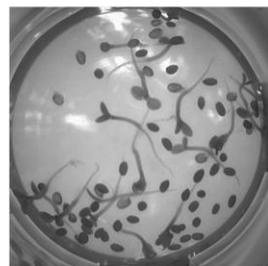
温度の変化により低分子との相互作用を評価可能な手法である Differential Scanning Fluorimetry 法 (DSF 法) を用いた。その結果、ゼニゴケ HTL と作用可能なデブロンを幾つか見出すことに成功した (Fig. 2)。

続いて、ゼニゴケの HTL をシロイヌナズナの *htl* 変異体にて発現させた形質転換体を作成した。本形質転換体においては、過去の報告の通りに、表現型の相補は見られなかった。これが、内生リガンドが異なることに起因する場合、上記のゼニゴケ HTL に作用するデブロンを与えた際には表現型が相補されると考え、添加試験を行った。シロイヌナズナにおいては、30°C を超える高温条件においてはその発芽が著しく阻害される。一方で、高温条件下で SL アナログである GR24 (ラセミ体) を添加すると、発芽阻害が回復することが報告されている (参考文献 1)。さらに、この際には、GR24 のラセミ体のうち、天然

WT (Col-0)



control

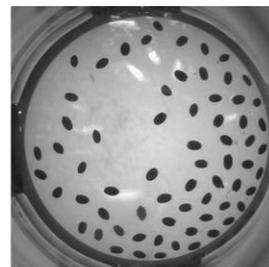


MpHTLアゴニスト
5 μM

htl/35S:MpHTL



control



MpHTLアゴニスト
5 μM

Fig. 3. Germination assay using *Arabidopsis* WT (Col-0) and the transgenic line expressing *MpHTL* in the *htl* mutant background. Thermoinhibition of the WT seed germination was rescued by the MpHTL agonist. However, the germination of the transgenic plants expressing *MpHTL* was not rescued by the agonist treatment.

に存在する SL とは逆の立体化学を有する異性体が、HTL 経路に作用することによって発芽阻害が回復することが知られている。よって、この実験系を利用して、MpHTL を導入したシロイヌナズナ形質転換体種子が、本研究で見出した MpHTL アゴニスト依存的に発芽するか否かを検証した。その結果、アゴニストの投与によっても発芽阻害の回復は見られなかった (Fig. 3)。

上記の結果から、MpHTL 導入によってシロイヌナズナの *htl* 変異体の表現型が相補されなかった原因としては、内生リガンドの化学構造の相違によるのではなく、ゼニゴケの HTL がシロイヌナズナにおける下流伝達因子とうまく相互作用することが出来ないことによるという可能性が考えられた。シロイヌナズナの HTL の信号伝達経路においては、リプレッサータンパクとして SMAX1 が同定されており、さらに、SMAX1 のユビキチン化に関与する因子として、F-box タンパク質である MAX2 が同定されている。よって、この点を明らかにするために、ゼニゴケ HTL とシロイヌナズナにおける下流伝達因子である SMAX1 との相互作用を、酵母ツーハイブリッド法を用いて調べることにした。こちらについては、現在実験を進行中である。

また、内生リガンドを探索するためのバイオアッセイ系を構築する目的で、ゼニゴケの HTL とゼニゴケの SMAX1 オルソログを用いた酵母ツーハイブリッド系を構築することとした。こちらについても現在実験を進行中である。本実験においては、まずは、MpHTL と MpSMAX1 を発現した酵母に対して、本研究で見出されたアゴニスト分子を添加することにより、両者の相互作用が誘導されるか否かを明らかにする。そのうえで、ゼニゴケの植物体抽出物等を添加することで両者の相互作用が誘導されれば、内生リガンドを探索する際の検定に用いることが可能であると考えている。

続いて、本経路の信号が過剰に流れた際に、ゼニゴケの生育にどのような影響が及ぼされるのかを明らかにするために、見出した上記のアゴニスト分子をゼニゴケの野生型、ならびに CRISPR-CAS9 法でノックアウトした欠損変異株に投与する試験を行った。変異株については、東北大学経塚淳子教授が作成したものを分与頂いた。その結果、アゴニスト分子は、*mphtl* 欠損変異体、野生型いずれに対しても、1 μ M の濃度で生育阻害的に働くことが明らかとな

った。この際、*mphtl* は、野生型と比べると、アゴニスト分子に対して耐性の表現型を示した。そもそも、*mphtl* 欠損変異体では、葉状体が小さくなることに加え、葉状体が培地に対して立ち上がるような表現型を示しており (参考文献 2)、光に対する応答に異常が見られたような表現型を示している。今後、得られたアゴニストの投与濃度をさらに低くするなどして、本経路がゼニゴケの生育に及ぼす影響についてより詳細に調べていく必要がある。

考察

本研究にて、D14 や HTL に対するアゴニスト分子が同定されているデブロン類の中からゼニゴケ HTL に作用可能な分子を見出すことに成功した。一方で、得られたアゴニスト分子を利用しても、MpHTL を発現させたシロイヌナズナ組み換え体における表現型の相補が見られなかったことから、表現型が相補しなかった要因は、内生リガンドの化学構造が異なるということよりも、下流の信号伝達因子との相互作用に問題がある、という可能性が高い。この点については、上記の通り、今後酵母ツーハイブリッド法を用いて検証を行う予定である。また、ゼニゴケ HTL とシロイヌナズナやその他、高等植物の HTL と配列を比較した結果、SMAX1 との相互作用に関与すると予想される領域に、ゼニゴケでは 1 アミノ酸の置換が見られることを見出している。よって、このアミノ酸をシロイヌナズナ型に変異させることにより、シロイヌナズナ *htl* 変異体の表現型を相補できる可能性がある。HTL において、SMAX1 との相互作用に重要な領域に関してはこれまで全く報告がないため、この点についても今後調べていく予定である。

本研究で見出したアゴニスト分子の投与試験においては、顕著な生育阻害作用が見出された。この作用は、*mphtl* 変異体に対してもみられているため、同定したアゴニスト分子は何かしらの副作用が強い可能性も考えられる。最近、SL 類に特徴的な部分構造であるメチルブテノライド環のメチル基を除去することにより、SL 関連分子が HTL 経路に働く際の特異性をより高めることが出来ることが報告された (参考文献 5)。よって、今回見出された MpHTL アゴニストとなるデブロンについても、メチル基を除去したタイプの化合物を既に合成しており、本化合物を用いることにより、MpHTL に対する特異性が

より高まることが期待される。メチル基除去型の化合物を用いて、ゼニゴケに投与した際の影響についてもより詳細に検討していきたい。

以上のように、内生ホルモンの同定には至らなかったものの、内生ホルモンの探索の際にも有効となるであろう、ゼニゴケ HTL に作用するアゴニスト分子の同定に成功するとともに、本分子を利用したことで、ゼニゴケ HTL がシロイヌナズナの *htl* を相補出来ない理由について、下流信号伝達因子との相互作用に問題があるということが強く示唆された。

引用文献

- (1) Fukui K., et al, New branching inhibitors and their potential as strigolactone mimics in rice, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21 (16) 4905-4908, 2011
- (2) Fukui K., et al, Synthetic agonist of HTL/KAI2 shows potent stimulating activity for Arabidopsis seed germination, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 29 (17) 2487-2492, 2019
- (3) Toh S. et al, Thermoinhibition uncovers a role for strigolactones in Arabidopsis seed germination, *Plant Cell Physiology*, 53 (1), 107-117, 2012

(4) Mizuno Y., et al, Major components of the KARRIKIN INSENSITIVE2-dependent signaling pathway are conserved in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *The Plant Cell*, in press

(5) Yao J., et al, Desmethyl butenolides are optimal ligands for karrikin receptor proteins. *New Phytologist*, 230 (3), 1003-1016, 2021

誌上发表

1. Takeuchi J, Fukui K., Seto Y., Takaoka Y., Okamoto M., Ligand-receptor interactions in plant hormone signaling. *The Plant Journal*, 105 (2) 290-306, 2021
2. Mashiguchi K*, Seto Y*, Yamaguchi S., Strigolactone biosynthesis, transport, and perception. *The Plant Journal*, 105 (2) 335-350, 2021 (*=co-first author)
3. 瀬戸義哉、山口信次郎、ストリゴラクトンの受容：加水分解の役割は？ 植物の生長調節、55、110-115、2020
4. 安井令、瀬戸義哉、山口信次郎、植物のストリゴラクトン信号伝達メカニズム、化学と生物、58：673-680、2021