

## 植物成長促進ホルモンの新たな活性化経路を発見 ～イネをはじめ作物の収穫向上への応用に期待～

### 【本研究のポイント】

- ・植物成長促進ホルモンの1つサイトカイニン<sup>注1)</sup>の新たな活性化経路を発見
- ・活性化酵素 CPN1<sup>注2)</sup>は細胞壁空間に存在し根から輸送された前駆体<sup>注3)</sup>を活性化
- ・イネの穂形成などに重要な役割を果たすことから収量向上への応用が期待できる

### 【研究概要】

国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学大学院生命農学研究科の榊原 均 教授、小嶋 美紀子 博士後期課程学生(社会人コース)、名古屋大学生物機能開発利用研究センターの保浦 徳昇 特任准教授らの研究グループは、国立研究開発法人理化学研究所 環境資源科学研究センター(CSR)の岩瀬 哲 上級研究員、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構の矢野 昌裕 シニアエグゼクティブリサーチャー、国立大学法人 岡山大学 資源植物科学研究所の山本 敏央教授との共同研究で、植物成長促進ホルモンの1つサイトカイニンの新たな活性化経路を発見しました。

サイトカイニンは窒素栄養に応じた植物成長促進やイネの穂形成など、植物生産に関わる非常に重要な植物ホルモンです。これまでその生合成は細胞内で行われると考えられてきましたが、本研究で、同定したサイトカイニン活性化酵素タンパク質 CPN1 が葉の細胞壁空間(アポプラスト)に存在し、細胞内とは別の代謝経路により、根から輸送されてくる前駆体を活性型に変換していることを明らかにしました。また、CPN1 の機能を失ったイネ変異体では、葉でのサイトカイニン情報伝達が正常に行われなくなり、穂のサイズも小さくなることが分かりました。

CPN1遺伝子の利用により、人為的にサイトカイニン作用を調節することが可能になることから、イネをはじめとした作物の収量向上への応用が期待されます。

本研究成果は、2023年8月29日(日本時間)付アメリカ科学アカデミー紀要「Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America」オンライン版に掲載されました。

## 【研究背景と内容】

植物ホルモンは発芽から成長、開花、結実に至る植物の一生の様々な過程において、その調節にはたらく情報分子として重要な役割を果たしています。人類は育種技術により様々な品種を創り出してきましたが、それらの中には植物ホルモンの作用が関与しているものも少なくありません。例えば 20 世紀半ばにイネやコムギの生産性を倍増させた「緑の革命」<sup>注 4)</sup>の原因遺伝子は、ジベレリンという植物を徒長させる作用を持つ植物ホルモンの生合成や、情報伝達に関わる遺伝子座に起こった自然突然変異が選抜され利用されたものです。また 2005 年には、イネの籾数を増加させる遺伝子座として *Gn1a* が発見され、その実体はサイトカイニンという植物ホルモンの分解酵素遺伝子への突然変異であることが明らかにされています。そこで、農業形質に関わる遺伝子を探索する新たなアプローチとして、イネ体内の植物ホルモン濃度に影響を与える量的遺伝子座(QTL <sup>注 5)</sup>)を見つけ出し、その原因を解明した上で農業的な有用性を検証する研究を行いました。

ササニシキとハバタキという性質の異なる品種を交配して作成された、染色体断片置換系統群(chromosome segment substitution lines, CSSLs)<sup>注 6)</sup>の幼苗を用いて主要な植物ホルモンの内生量の網羅的解析をしたところ、サイトカイニンのリボシド<sup>注 7)</sup>派生体の濃度に強い影響を与える QTL が第5染色体上に検出されました(図1)。そこで、この QTL の原因遺伝子の絞り込みを行ったところ、その原因遺伝子は酵素をコードしており、その構造はプリン代謝に関わるリボシダーゼに類似していることが分かりました。次に、この遺伝子にコードされるタンパク質を、大腸菌を利用して大量調製し酵素的性質を調べたところ、サイトカイニンのリボシド前駆体からリボースを外し、活性型に変換する活性を持つことが明らかになりました。そこでこの遺伝子を CPN1(cytokinin purine riboside nucleosidase 1)と名づけました。

サイトカイニンの生合成経路については榊原教授らの研究グループにより、LOG と呼ばれる酵素が活性化反応を担っていることが 15 年ほど前に明らかにされていましたが、CPN1 はそれとは異なる中間代謝化合物を基質にして活性型分子を作り出す酵素であることが分かりました(図2)。実は 40 年以上前に、この酵素の存在を示唆する論文が1報だけ報告されたものの、その実体は解明されないままであったのですが、その酵素遺伝子を同定することができたわけです。

興味深いことに、CPN1 は細胞内ではなくアポプラスト<sup>注 8)</sup>、具体的には細胞壁空間に存在することが分かりました。これまで、サイトカイニンをはじめとする植物ホルモンの生合成経路は、全て細胞内にあると考えられてきたため、この発見は意外でした。細胞外に存在する意味を調べるために、CPN1 遺伝子にトランスポゾン<sup>注 9)</sup>が挿入されて機能が破壊されたイネを準備し、その切取り葉の切り口から、サイトカイニンのリボシド前駆体を与えた時のサイトカイニン応答性遺伝子の発現誘導への影響を解析しました。すると、変異株では、リボシド前駆体を与えた時の遺伝子発現応答が正常株に比べ減弱していました。同様の減弱効果は、イネ苗の根に窒素栄養を投与した時に起こる葉でのサイトカイニン応答性遺伝子の発現でも見られました。サイトカイニンは、窒素栄養の供給に応答して生合成が促進されるホルモンであり、活性の強いトランスゼアチンは主に根で合成され、リボシド前駆体の形態で道管<sup>注 10)</sup>を通じて地上部に輸送され作用することから、この結果は根

から運ばれたりリボシド前駆体の活性型への変換反応が弱まったために起こったことだと解釈できます(図3)。

次にこの遺伝子の有用性を検証するために、上述のトランスポゾン挿入変異株を用いて名古屋大学の東郷圃場で形質調査を行ったところ、変異体では稈の長さ(草丈)が短くなり、穂の発達も十分に起こらないことが分かりました(図4)。

### 【成果の意義】

今回の研究により、サイトカニンには細胞内での生合成経路に加え、細胞外で前駆体から活性型分子を作り出す経路があることが明らかになりました。これは植物ホルモンの生合成経路の概念を、細胞内から細胞外にまで拡張する学術的意義を持ちます。また、サイトカニンは、根から吸収し同化した窒素栄養を成長促進に結びつける重要な役割を持っています。CPN1 は、根から道管を介して輸送されてきたサイトカニン前駆体の活性化に関わり、イネの穂形成などに影響を与えることから、将来的にはこの遺伝子の機能を調節することにより、窒素栄養を植物成長や籾数などの農業形質にうまく結びつける育種への応用が期待できます。

本研究は、農水省『新農業展開ゲノムプロジェクト』(NVR0004)および科研費(17H06473, 19H00931, 21F21765)の支援を受けて行われたものです。

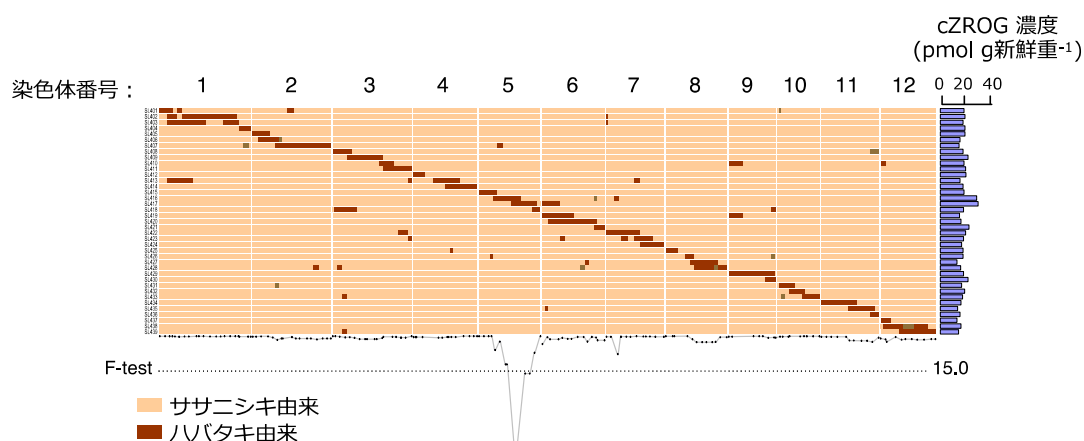


図1. ササニシキ×ハバタキの CSSL におけるサイトカニンリボシド派生体 (cZROG) 内生濃度に影響を与える QTL ピークの検出  
第5染色体上に強いピークが検出された。cZROG: シスゼアチンリボシド-O-グルコシド

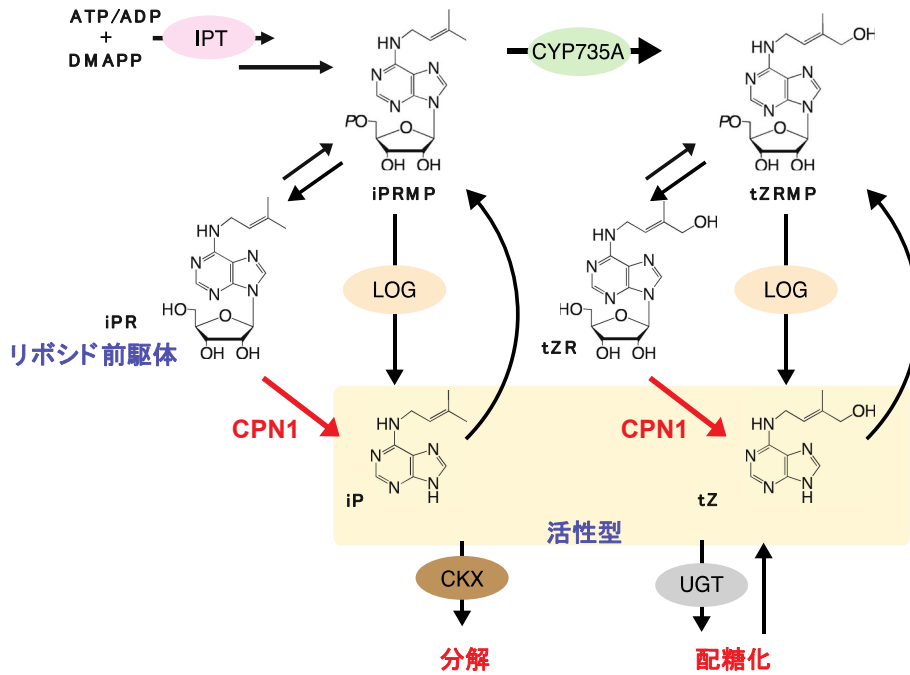


図2. サイトカイニン生成経路

今回の研究でリボシド前駆体から活性型を生み出す赤矢印の経路の存在が明らかとなった。iP: イソペンテニルアデニン, tZ: トランスゼアチン, iPR: iP リボシド, tZR: tZ リボシド, iPRMP: iP 5' --リン酸, tZRMP: tZ 5' --リン酸

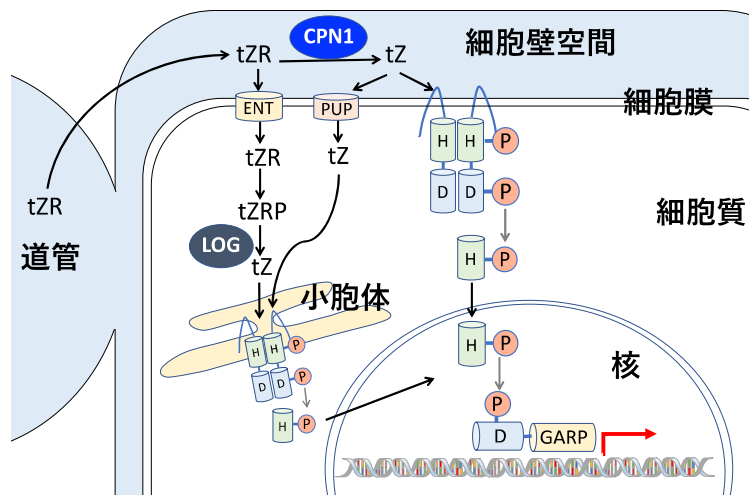


図3. 細胞壁空間における CPN1 の役割

根からリボシド前駆体(tZR)の形で運ばれたサイトカイニンの一部は細胞壁空間で CPN1 によって活性型(tZ)に変換され、細胞膜上に存在する受容体に認識される。それ以外は ENT や PUP と呼ばれる輸送により細胞内に取り込まれ、前駆体は LOG によって活性型に変換される。

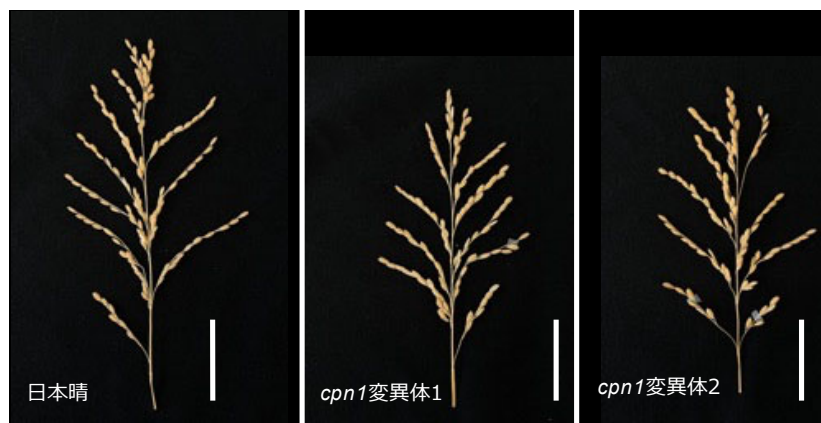


図4.日本晴と *cpn1* 変異体間での穂形態の比較

日本晴に比べ *cpn1* 変異体では穂の発達が十分でなく小さくなった。スケールバーは 5 cm。

### 【用語説明】

注 1) サイトカイニン(cytokinin):

植物のシュートや腋芽の成長促進、葉の老化抑制、イネの穂形成などに関与する植物ホルモン。窒素栄養の供給に应答して生合成が促進される。活性の強いトランスゼアチンは主に根で合成され、リボシド前駆体の形態で道管を通じて地上部に輸送され作用する。

注 2) 活性化酵素 CPN1:

Cytokinin/purine riboside nucleosidase<sub>1</sub>。既知のサイトカイニン活性化酵素 LOG とは異なる基質(リボシド前駆体)から活性型を生み出す(図2参照)。

注 3) 前駆体:

ある化合物について、それが生成される前段階の化合物のこと。

注4) 緑の革命(green revolution):

1940~1960年代にかけて、草丈が低くなるが穂の長さへの影響が少ない形質(半矮性)をイネやコムギに付与することで、化学肥料を投与しても倒伏しにくい品種が作出され、穀物の大量増産が達成されたこと。緑の革命に大きく貢献したノーマン・ボーローグは1970年にノーベル平和賞を受賞している。

注5) QTL(quantitative trait locus):

量的形質遺伝子座。草丈や粒数などの量的形質に影響を与える染色体上の DNA 領域。花の色など1つもしくは少数の遺伝子の作用によって決定される形質(質的形質)とは異なり、草丈や粒数、そして代謝物の蓄積量など数量で表現される形質を量的形質と呼ぶ。一般的に量的形質は非常に多くの遺伝子の作用の総和として観察される。

注 6) 染色体断片置換系統群(chromosome segment substitution lines, CSSLs):

2種類の系統(A, B)を親株として交配し、それを片方の親株(A)に対して戻し交配する

ことにより、系統ごとに A の染色体の一部が B の染色体断片に置換された系統群を指す。イネではさまざまな系統の組み合わせで CSSLs が作成されており、実験系統リソースとして活用されている。

注 7)リボシド:

リボースが付加した配糖体。サイトカイニンの1つトランスゼアチンのリボシドは細胞間や器官間を移動する際の輸送型として知られている。

注 8)アポプラスト(apoplast):

植物体内における細胞外空間の中で、水溶液で満たされた領域の総称。細胞膜の内側の空間を表すシンプラストとは対になる概念である。アポプラストは植物体内の水やそれに溶解するさまざまな物質の移動空間として重要な役割を果たしている。

注 9)トランスポゾン:

ゲノム上の位置を転移することができる塩基配列断片領域。DNA 断片が転移するタイプと、DNA から RNA への転写とさらに DNA への逆転写の過程を経るタイプ(レトロトランスポゾン)がある。イネでは日本晴品種に *Tos17* と呼ばれるレトロトランスポズンをランダムに転移させた研究用リソースが農業生物資源研究所(現 農業・食品産業技術総合研究機構)により開発されており、広く研究に活用されている。

注 10)道管:

植物体内における物質輸送を担う内部組織で、主に水と無機養分、植物ホルモンの運搬を担う。蒸散流や根圧が運搬の駆動力となる。

**【論文情報】**

雑誌名:Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)

論文タイトル:A cell wall-localized cytokinin/purine riboside nucleosidase is involved in apoplastic cytokinin metabolism in *Oryza sativa*

著者:Mikiko Kojima(本学大学院生(社会人博士後期課程, 研究当時)), Nobue Makita, Kazuki Miyata(本学大学院生), Mika Yoshino(本学大学院生), Akira Iwase, Miwa Ohashi(本学研究員(研究当時)), Alicia Surjana(本学大学院生(研究当時)), Toru Kudo, Noriko Takeda-Kamiya, Kiminori Toyooka, Akio Miyao, Hirohiko Hirochika, Tsuyu Ando, Ayahiko Shomura, Masahiro Yano, Toshio Yamamoto, Tokunori Hobo(本学教員), Hitoshi Sakakibara(本学教員)

DOI: 10.1073/pnas.2217708120

URL: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.2217708120>