

# 研 究 報 告 書

## 「ブラシノステロイド情報伝達による発生と自然免疫制御の分子機構」

研究期間：平成 19 年 10 月～平成 23 年 3 月

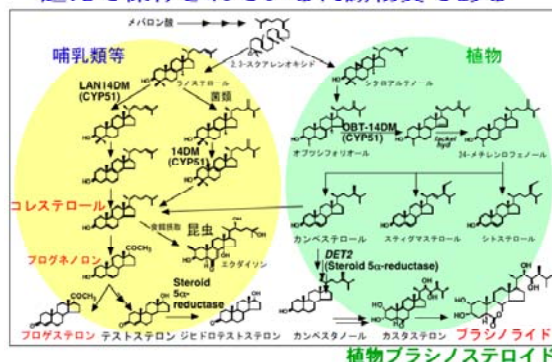
研究者：中野 雄司

### 1. 研究のねらい

ステロイドホルモンは生物の種を越えて広く保存される代謝物質である。個々の生物種においては、独自の生理活性化合物とそれを用いた各生物種の生体制御を行う機構には多種多様な仕組みがあるが、それらの中でも、ステロイドホルモンは多くの生物の種を越え広く進化的に保存される希有な生理活性化合物ともいえる。ステロイドホルモンは生物の成長に促進的に働くという点に関しては、多くの生物種に共通な普遍性を持ち、それと同時に、哺乳類における妊娠や生殖の制御、昆虫における脱皮の制御など各生物種に固有の活性も併せ持つという両面性が見られる点ももう一つの希有な点ではないかと考えられる。生命の進化の過程において、哺乳類や両生類、昆虫類よりも古くから地球上に存在した植物においても、ブラシノステロイドと総称される化合物が存在し、植物生長の促進という他種生物と共通の活性と共に、植物独自の細胞内小器官である葉緑体における光合成活性の制御という植物独自の活性を持っていることが植物生理学的解析により明らかとされてきた。

ステロイドホルモンは代謝産物としてのステロイド化合物の保存性に加え、代謝産物の合成酵素において、動物から植物まで進化的に保存されている酵素群が明らかにされているが、細胞内のシグナル伝達経路においては受容体を含め動物・植物間に保存される因子は見つかっていない。しかしながら、本研究申請の開始当時に幾つか得られていた新規なブラシノステロイド情報伝達遺伝子候補群は、動物の自然免疫の情報伝達因子に類似したものが幾つも含まれていた。植物におけるこれらの遺伝子群は、主に分子遺伝学的手法によって得て来たもの、いわば無作為に単離してきた遺伝子であり、この類似性は偶然ではなく必然ではないのかと考え、本研究を構想した。

ステロイド化合物は多細胞生物の種間を越えて保存されている代謝物質である



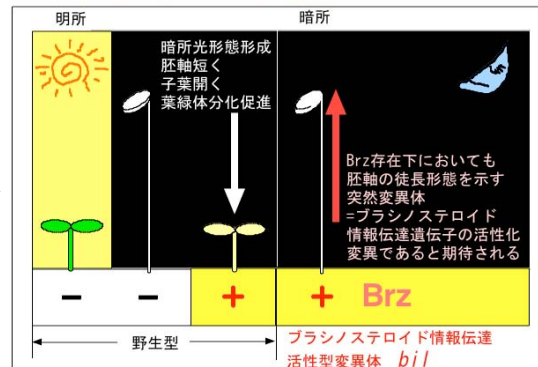
本研究では、これらの候補遺伝子群について、植物ブラシノステロイド情報伝達経路を担う新規な機能遺伝子であることを確定することを第一の目的とした。さらに、植物においてブラシノステロイドは植物発生に関わる分子メカニズムやその機能遺伝子の単離は試みられつつあったが、植物自然免疫との関わりについては、植物生理学的知見以外に、機能分担遺伝子同定や分子メカニズムについては知見が非常に少なかった。そこで、本研究で新規植物ブラシノステロイド情報伝達遺伝子としての確定を行った後、これらの遺伝子群が、植物において、発生と自然免疫の双方の制御を行っている共制御機構を担う可能性の検証とその分子メカニズムの解明を第2の目的とした。さらに、これらの知見に基づいた知見により、植物ブラシノステロイドが哺乳類においても生理活性を持つ可能性も考察されるため、その検証を第3の目的とした。これらの研究により得られる知見を統合的に考察することにより、ステロイドホルモンのシグナル伝達機構について、植物を基点としつつ、哺乳類をはじめとする他種生物種も視野に入れ、その分子機能の生物種間における進化的保存性について、総体的な考察を得ることを目指して本研究を開始した。

### 2. 研究成果

#### 2-1 植物ケミカルバイオロジーによる新規ブラシノステロイド情報伝達遺伝子群の探索

具体的な研究展開としては、理化学研究所において創製されたブラシノステロイド生合成酵素である P450 酸化酵素 DWF4 の特異的阻害剤 Brz を用い、この Brz を実験植物アラビドプシスに適用する植物ケミカルジェネティクス研究を試みた。この実験植物は、暗所で発芽した場合、通常条件下では胚軸が徒長した「もやし様」の形態を示すが、Brz によりブラシノステロイド欠損状態になると、胚軸が短化し子葉が開く、あたかも光条件下で発芽したかのような形態「暗所光形態形成」を示す。この所 Brz 存在下において、胚軸伸長を示す変異体を単離し得れば、その変異体はブラシノステロイド情報伝達経路の活性化した変異体であると着想し、その形態変化を指標にして網羅的な大規模スクリーニングを実施した。その結果、Brz 耐性突然変異体 *bil* (*Brz-insensitive long hypocotyl*) を多く単離し、その変異原因遺伝子として数種類の遺伝子の同定、単離を行った。その結果、現在までに、本研究開始当初に同定していた bHLH 型値転写因子 *BIL1/BZR1* に続き、数種類の *bil* 遺伝子候補を特定した。

### ブラシノステロイド情報伝達変異 *bil* (*Brz-insensitive long hypocotyl*) のスクリーニング戦略



## 2-2 新規ブラシノステロイド情報伝達遺伝子群の機能解析

### 2-2-1 Brz 耐性の胚軸徒長型変異体 *bil5*(*Brz-insensitive-long hypocotyl5*)

*bil1* 変異体の次に強い形質の変異体として得られた *bil5* 変異体は、暗所 Brz 存在下の発芽期において野生型の約 2 倍の胚軸徒長形質を示し、成熟個体はロゼッタ葉の細長形態での縮小化、花茎の短化と細化を伴う細矮性 slender dwarf 形質を示した。また、組織観察の結果、*bil5* では維管束数の増加と、維管束形成細胞数の減少、ロゼッタ葉の柵状組織の発達阻害が観察された。この *bil5* 変異体について、第一染色体の fine mapping により推定された約 80kbp 領域内の 17 の ORF 及びその上下流約 1 kbp 全てについて塩基配列の解析を行ったが、塩基配列上の変異は認められなかった。しかし、続いて、メチル化感受性制限酵素を用いたサザン解析、バイサルフェートシーケンシング解析を行い、*bil5* 変異ゲノム脱メチル化変異とそれに起因する新規相同 2 遺伝子の発現増加を確認した。この 2 種の高発現株の二重形質転換体を作成した所、*bil5* に類似の Brz 胚軸伸長形質と成熟期の *bil5* 様の細矮性 slender dwarf 様の特徴的な矮性形質が再現された。よって、当遺伝子のエピジェネティック変異が *bil5* 変異の原因遺伝子であると確定した。

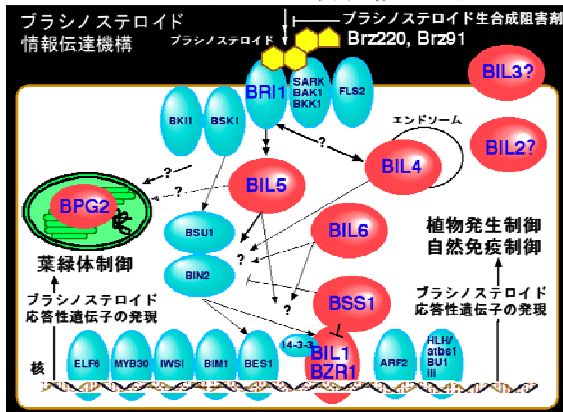
*bil5* 変異体を受容体 *bri1* 変異体の矮性形質を回復させること、ブラシノステロイド情報伝達の主要転写因子である BES1 がブラシノステロイド処理により脱リン酸化されるのに対して、*bil5* 変異体ではブラシノステロイド無処理状態でも BES1 が脱リン酸化状態である等の結果を得て、*BIL5* がブラシノステロイド情報伝達の主要経路の重要機能を担う遺伝子であることを明らかとした。さらに、病原性細菌 *Pseudomonas syringae* pv.DC3000 の接種試験を行った所、*bil5* 変異体において野生型の約 30 倍の病害抵抗性が検出された。これらのことより *BIL5* 遺伝子はブラシノステロイドによる発生と自然免疫の双方のシグナリングの要となる主要遺伝子であると考察された。今後、発生と自然免疫の制御バランス等、詳細な機能解明を進める予定である。

### 2-2-2 Brz 耐性の胚軸徒長型変異体 *bil4*(*Brz-insensitive-long hypocotyl4*)

*bil5* と同様条件において、アラビドプシスのアクティベーションタギング変異ラインのスクリーニングを行い、*bil5* に類似の Brz 耐性を示す半優性変異体 *bil4* を選抜した。これらは *bil5*

と同傾向のロゼッタ葉の細小化と花茎の短化に基づく細矮性 *slender dwarf* 様の形質を示した。この *bil4* 変異原因候補遺伝子は7回膜貫通ドメインを持つ新規タンパク質であることが、高発現型形質転換体の示す暗所 Brz 存在下の胚軸徒長 *bil* 形質により確認された。続いて、*BIL4::GFP* 形質転換体の根端分裂組織近傍細胞の解析によって、発芽初期に細胞内の小胞体様のドット状構造体および液胞膜上に局在する性質を持つことが明らかになった。さらに *BIL4 promoter::GUS* 形質転換体の解析により、*BIL4* 遺伝子の発現は、発芽1〜3日目の初期胚軸および初期根に発現が認められ、成長後は茎長の発生初期の幼ロゼッタ葉およびロゼッタ葉基部の托葉、主根および側根の根端分裂組織の直上細胞など、分裂組織と、細胞伸長の極初期細胞に限定的に発現し、各々の細胞が伸長中期に達する時期には発現シグナルは検出限界以下まで低下する特徴的な発現パターンを示すことが明らかとなった。この *BIL4* タンパク質は、細胞伸長初期にエンドソームに、中期には液胞膜へ局在する。さらに、植物自然免疫のマーカー遺伝子 *PR1, PR5* 遺伝子の発現が *BIL4* 遺伝子高発現形質転換体で活性化されたことより、*BIL4* 遺伝子もブラシノステロイドによる発生と自然免疫の重要遺伝子である可能性が示唆された。*BIL4* タンパク質は、植物種のみでなく、ヒトやマウスでも相同性の高い遺伝子が存在することが確認されているが、どの生物種でも研究例のない機能未解明の遺伝子であり、今後、研究をより一層深めて行きたいと考えている。

#### ブラシノステロイド情報伝達因子による植物の発生と自然免疫の共制御機構が確認された



#### 2-2-3 Brz 高感受性の胚軸矮化型変異体 *bss1* (*Brz-sensitive-short hypocotyl*)

*bil* 変異体とは逆意に、暗所下通常条件下では野生型と同様の徒長胚軸ながら、暗所 Brz 存在下では野生型より矮化し、さらに生殖成長期にはほぼ花茎が認められない極端な茎軸伸長阻害形態を示す半優性変異体 *bss1* (*Brz-sensitive-short hypocotyl*) を単離した。この *bss1* 変異候補遺伝子として、哺乳類の自然免疫系の調節に関わる *ikB* (アイカッパービー) と相同性を持つ遺伝子を同定した。哺乳類における *ikB* はタンパク質と相互作用するアンキリンドメインを持ち転写因子 *NFκB* と結合することによって、細胞内シグナルを核内に伝える因子である。*BSS1* 遺伝子においても、転写因子 *BIL1* との関わりについて更に詳細に解明を進めた所、Y2H 解析によって、*BSS1* タンパク質は、本研究の第一例として単離したブラシノステロイド情報伝達経路上の主要転写因子である bHLH タンパク質 *BIL1/BZR1* と直接的に相互作用することが確認された。*BIL1/BZR1* タンパク質のブラシノステロイド情報伝達機構における重要性を指摘する報告は年々増えており、その制御因子としての *BSS1* タンパク質の分子機能の解析を平行し進めて行きたいと考えている。

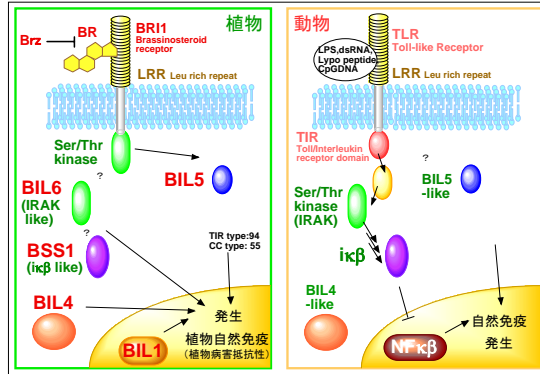
一方、この *bss1* 変異体において、*BSS1* 遺伝子の隣接遺伝子の高発現株は、逆に胚軸伸長形質を示し *BIL6* と命名した。*BIL6* 遺伝子は、哺乳類自然免疫系で *TRL* と *ikB* の間に位置するリン酸化酵素 *IRAK* と相同性が高く、更に植物において、*PR1, PR5* 遺伝子の発現が *BIL6* 高発現形質転換体で活性化されていたことから、植物自然免疫との関わりが示唆された。隣接遺伝子が情報伝達経路上で正逆の生理機能を持つことは、機能遺伝子がゲノム上でクラスターを形成するという希少な可能性を示唆するとも考えられるため、今後は両遺伝子の活性を比較しつつ研究を進めたい。

#### 2-3 植物ブラシノステロイドの哺乳類における生理機能



上記に代表される植物ブラシノステロイド情報伝達 BIL 遺伝子群は、動物に類縁遺伝子が相同遺伝子が存在することが多く、さらに、その数種は特に哺乳類の自然免疫のシグナル伝達経路上に認められる遺伝子であった。これらの知見に着想を得て、植物ブラシノステロイドが動物においても生理活性を持つ可能性があるのではないかと、との考察に至った。植物ブラシノステロイドは、ほぼ全ての植物／野菜に含有されているものであり、食餌として哺乳類に摂取された後、哺乳類に対する生理制御活性を持ちながら、現時点迄、その方向性でブラシノステロイド機能について研究が行われて来なかったことが、学術的に知られて来なかったことに起因するという観点である。この考察に基づく試行により、少なくともヒトの 9 種類のガン細胞に対して *in vitro* での抗ガン活性を持つ事、*in vivo* でもマウス皮膚に移植したガン細胞の抑制活性を持つ事が明らかになった。さらに、哺乳類の自然免疫制御のブラシノステロイドが関与する予備的な知見も得られた。

植物情報伝達経路と哺乳類遺伝子の進化的保存性の可能性に基づき、哺乳類におけるブラシノステロイドの生理活性を検証する。



### 3. 今後の展開

得られた研究成果の内、植物に関する研究で得られた知見は、特許出願も行っており、植物バイオマス増産や植物バイオマスでの物質生産に貢献し得る部分が多くあり、現在、国家レベル・地球レベルでの課題とされる低炭素社会の実現へ向けた実用化研究への活用を行っていきたいと考えている。

得られた研究成果の内、ブラシノステロイドの哺乳類における活性については、特許出願も行っており、健康食品や医薬シーズとしての応用展開が出来ればと考えている。

植物と動物との進化的保存性に関して得られた成果は、次なる検証も継続して準備中である。本研究の成果を礎に、今後は、分子レベルでの詳細な検証を行い、発展・深化させて行きたい。

### 4. 自己評価

研究申請当初に志したテーマの内、植物ブラシノステロイド情報伝達経路で重要な役割を果たす新規遺伝子候補数種を確定すること、それらが少なくとも植物においては発生と自然免疫の共制御機能を持つ可能性を示すことについては一定の成果が得られたと考えている。

発展的に目指した、これらの遺伝子が植物と動物間で進化的に保存されている可能性の検証については、現時点では研究途上となり、現時点で区切りとなるような段階での結論までは到達出来なかった。しかし、生理活性解析レベルでの研究では、仮説を支持する可能性を示す結果も得られた、と考察出来るのではないかと考えられる。

### 5. 研究総括の見解

ブラシノステロイドの情報伝達経路の解明を目指し、ブラシノステロイド生合成阻害剤存在下で胚軸伸長できる変異体を作製、解析し、Bil4、Bil5、Bss1 遺伝子を同定し、機能を解析した。これら遺伝子はどれも植物の自然免疫に関与する可能性が示され、これら遺伝子の類縁遺伝子が動物にも存在し、TLR 経路との類似性が示された。植物の自然免疫系に関するオリジナルな成果として評価できる。ブラシノステロイドの免疫増強作用の検討がマウスで行われ、増強作用が示されつつある。この化合物はアジュバントとして利用できる可能性があり、今後の更なる検討を期待する。

## 6. 主要な研究成果リスト

### (1) 主要論文(原著論文)5報

1.	Iino M, Nomura T, Tamaki Y, Yamada Y, Yoneyama K, Takeuchi Y, Mori M, Asami T, <u>Nakano T</u> , Yokota T. (2007) Progesterone: Its occurrence in plants and involvement in plant growth. <i>Phytochemistry</i> , 68, 1664–1673
2.	Goda H, Sasaki E, Akiyama K, Maruyama–Nakashita A, Nakabayashi K, Li W, Ogawa M, Yamauchi Y, Preston J, Aoki K, Kiba T, Takatsuto S, Fujioka S, Asami T, <u>Nakano T</u> , Kato H, Mizuno T, Sakakibara H, Yamaguchi S, Nambara E, Kamiya Y, Takahashi H, Hirai MY, Sakurai T, Shinozaki K, Saito K, Yoshida S, Shimada Y. (2008) The AtGenExpress hormone- and chemical-treatment data set: Experimental design, data evaluation, model data analysis, and data access. <i>Plant J</i> 55(3):526–42
3.	Yamagami, A., Nakazawa, M., Matsui, M., Tsujimoto, M., Sakuta, M., Asami, T., and <u>Nakano, T.</u> : (2009) Chemical genetics reveal the novel transmembrane protein BIL4, which mediates plant cell elongation on brassinosteroid signaling. <i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> , 73, 415–421
4.	Nakamura A, Fujioka S, Takatsuto S, Tsujimoto M, Kitano H, Yoshida S, Asami T, <u>Nakano T.</u> (2009) Involvement of C-22-hydroxylated brassinosteroids in auxin-induced lamina joint bending in rice. <i>Plant Cell Physiol.</i> 50(9):1627–35
5.	Komatsu, T., Kawaide, H., Saito, C., Yamagami, A., Shimada, S., Nakazawa, M., Matsui, M., Nakano, A., Tsujimoto, M., Natsume, M., Abe, H., Asami T., <u>Nakano, T.</u> : (2010) The chloroplast protein BPG2 functions in brassinosteroid-mediated posttranscriptional accumulation of chloroplast rRNA, <i>Plant J</i> , 61(3): 409–422

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 4 件

### (3) その他

#### 学会発表

1. 中野雄司、山上あゆみ、嶋田勢津子、Joanne Chory、浅見忠男「化学遺伝学による新規ブラシノステロイド情報伝達因子の解明」第 45 回植物化学シンポジウム、2008 年 11 月(東京)
2. 中野雄司、山上あゆみ、嶋田勢津子、Joanne Chory、浅見忠男「植物ステロイドホルモン・ブラシノステロイド生合成阻害剤を用いた植物ケミカルバイオロジー研究」日本農芸化学会 2009 年度大会・シンポジウム、2009 年 3 月(福岡)
3. 中野雄司「植物ステロイドホルモン・ブラシノステロイドのケミカルバイオロジー研究」第 149 回日本獣医学会学術集会・教育シンポジウム、2010 年 3 月(東京)
4. 中野雄司、山上あゆみ、嶋田勢津子、Joanne Chory、浅見忠男「ブラシノステロイド研究の新しい展開を切り拓くケミカルバイオロジー研究」第 74 回 日本植物学会・シンポジウム、2010 年 9 月(名古屋)

#### 著作物

1. 中野雄司(共著)(2008) 入門ケミカルバイオロジー、オーム社、入門ケミカルバイオロジー編集委員会編
2. 中野雄司(2008)ブラシノステロイド作用の分子機構、遺伝, vol.62, No.2, 51–56
3. 中野雄司、浅見忠男、植物機能有用物質・遺伝子・形質の探索と応用を目指した植物ケミカルバイオロジー研究—植物ステロイドホルモン制御剤による光合成司令塔遺伝子の発見、ブレインテクノニュース、139、1–7 (2010)
4. 中野雄司、浅見忠男、植物機能制御剤の探索・創製と生理学、化学生物学への応

用:ブラシノステロイド、化学と生物、48、(2010)

新聞発表

1. 「司令塔遺伝子を発見、食料増産など貢献期待」化学工業日報(2009年12月15日)
2. 「光合成の司令塔遺伝子」朝日新聞(2010年1月15日)