

「植物ホルモンの不思議」

～植物成長ホルモンの生合成について～
(植物ホルモンの農業への利用)

理化学研究所 名誉研究員

神谷勇治



1975年 3月	東京大学大学院農学系研究科 農芸化学 (農学博士)
1975年 4月	理研・農薬合成第3 研究員
1980年-82年	ドイツゲッチンゲン大学植物生理研究所
1991年10月	理研・国際フロンティア・ホルモン機能チームリーダー
2000年10月	理研・植物科学研究センター・グループディレクター
2013年 4月	理研・環境資源科学研究センター・コーディネーター
2020年 3月	理研 退職

- ジベレリン生合成経路とその制御機構の解明
- 植物体内ホルモンの高感度一斉分析システムの開発
- オーキシン生合成経路と「70年間の謎」の解明

リケジョ女子高校 植物ホルモン組メンバー



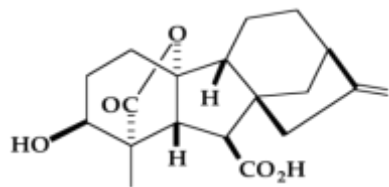


植物ホルモン擬人化まとめ



大木 真 **地部れりん** アブシンさん ジャスモンさん 巣鳥護楽人
西渡海忍 恵知恋 武良詩乃 ふろりん すとまじえん

植物ホルモンの化学構造 (ペプチドを除く)



GA₄ (Gibberellin)

TP Sun, Shinjiro Yamaguchi

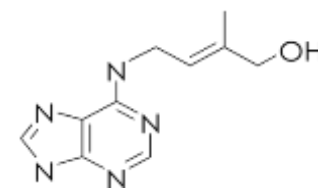
Plant Cell 2001, 04, 06, 07, 08, 09
PNAS 2011, Plant J. 2004



tomato

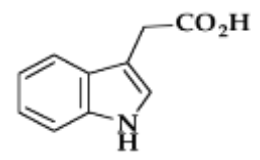
rice

Arabidopsis



t-Zeatin (c-Zeatin)

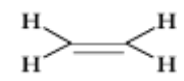
Hitoshi Sakakibara PNAS 2005



IAA (Auxin)

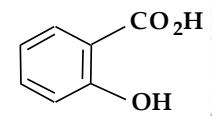
Hiroyuki Kasahara, Sakai Tatsuya

Plant Cell 2000, 12: PNAS 2009, 11



Ethylene

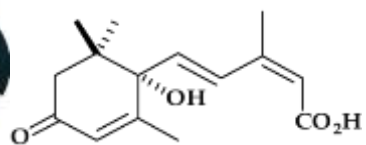
Mikio Nakzono
Plant Cell Physiol. 2007



Salicylic acid

Ken Shirasu

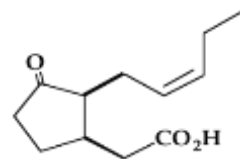
Plant Cell 2009, 12



ABA

Eiji Nambara, Mitsunori Seo

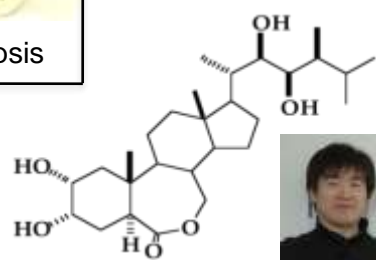
EMBO J. 2004; Plant Cell 2000, 08:
PNAS 2000, 09, 12; Plant J. 2005, 06



Jasmonic acid

Akihiro Suzuki

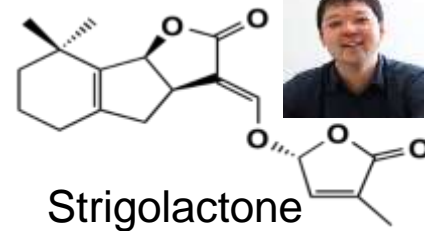
PNAS 2011



Brassinolide

Takahito Nomura

JBC 2005; PLoS One 2011
Science Signaling 2011



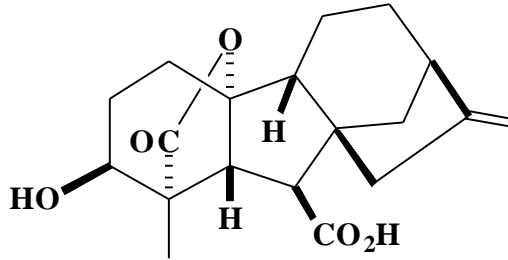
Strigolactone

Shinjiro Yamaguchi
Yuichiro Tsuchiya

Nature 2008;
Nature Chem. Biol. 2010



古典的な成長ホルモン

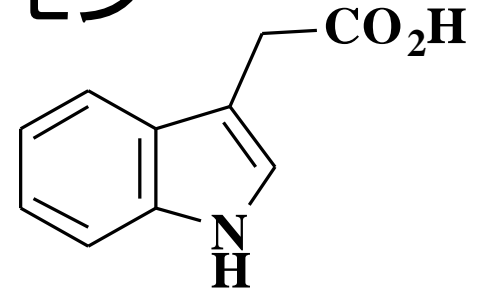


GA₄ (ジベレリン)

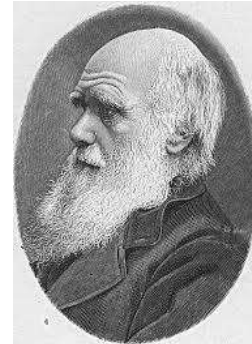


1926年黒沢栄一 イネの馬鹿苗病

種子発芽の促進、
茎葉の伸長成長の促進、
花芽形成・開花の促進、
単為結実の誘導など



**IAA (オーキシン)
インドール3酢酸**



1880年ダーウィン 光屈性

光屈性、重力屈性
頂芽優勢、
器官形成、
カルス形成

私は天然物有機化学を志す者として、理研でジベレリンの研究をすることに運命的な出会いを感じていました。



The office where Eiichi Kurosawa discovered a toxin of *Gibberella fujikuroi* 96 years ago.



馬鹿苗病の苗



台湾大学の門、第八帝国大学として建てられたものが、そのまま利用されている

ジベレリンが欠損すると矮化する



ジベレリンが農業で利用されている一例

Dr. Steve Swainの好意による



摘花

果実の肥大

種無しブドウ

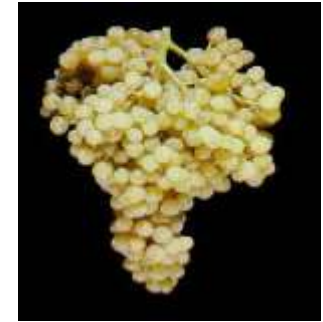
-GA



-GA



-GA



+GA



+GA



+GA

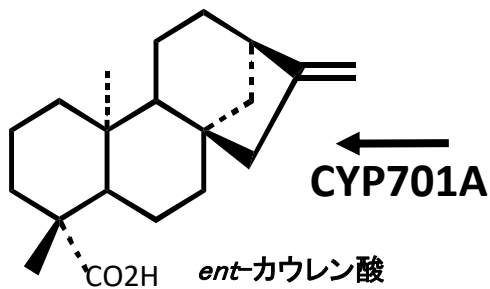
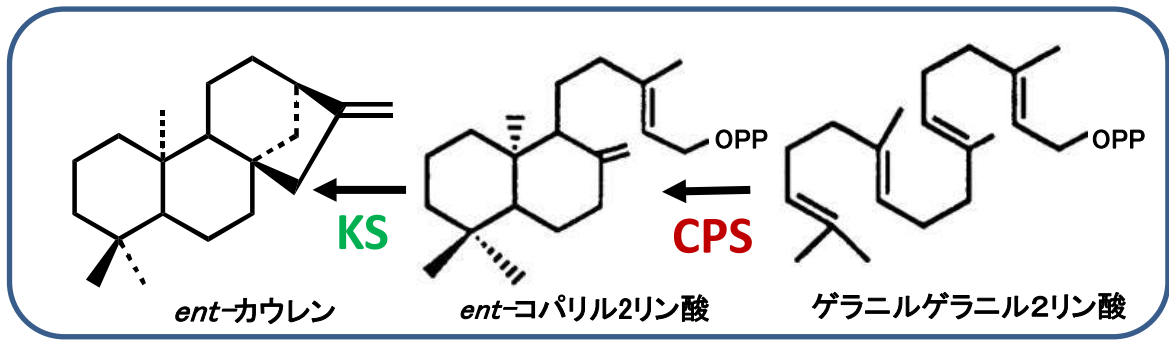
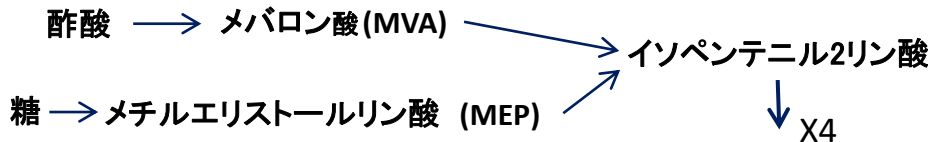


GAs are used commercially to increase fruit size in table grapes and to regulate citrus flowering and rind maturation

これ以外にも種子の発芽促進、花卉の開花促進など多方面に利用されている

①

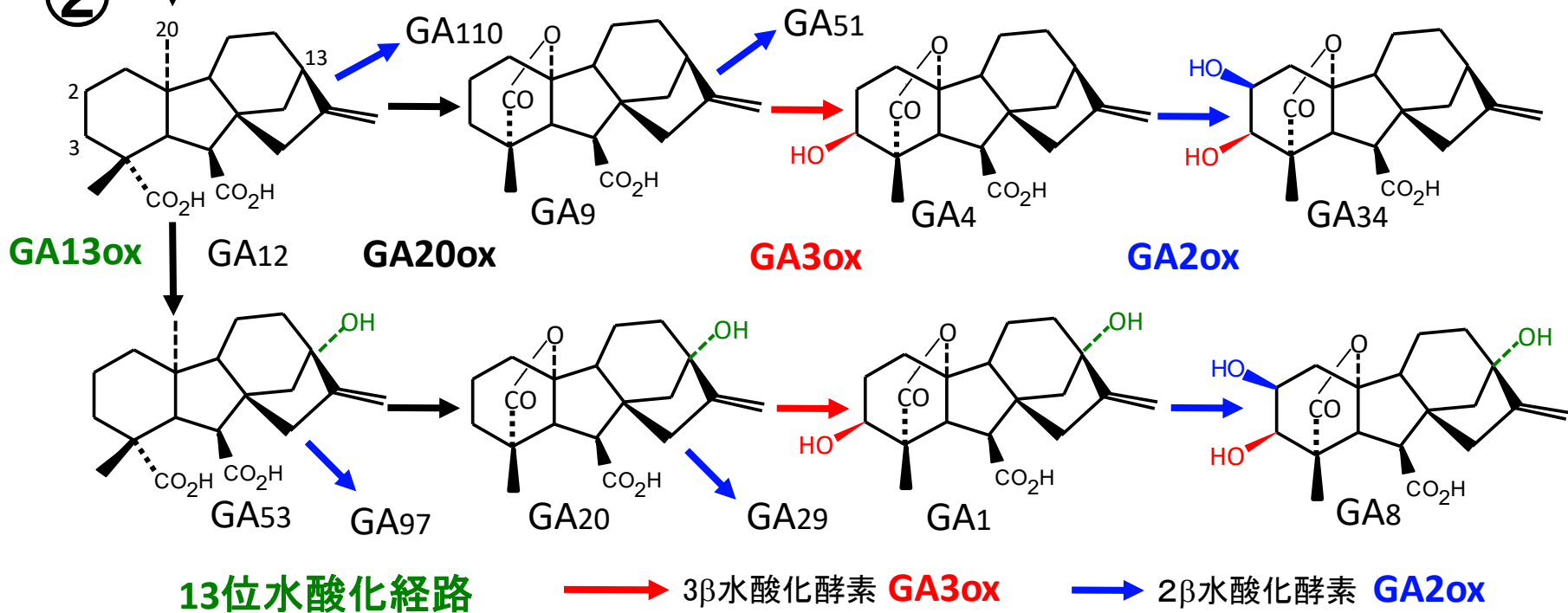
GAの生合成経路



CYP88A

②

13位非水酸化経路



ジベレリン生合成能のあるセルフリー系の調整

マメ科の未熟種子から酵素系の調整

カボチャ、エンドウ、インゲンの未熟種子を用いてカウレン、 GA_1 , GA_4 の生合成



郭尚珠博士

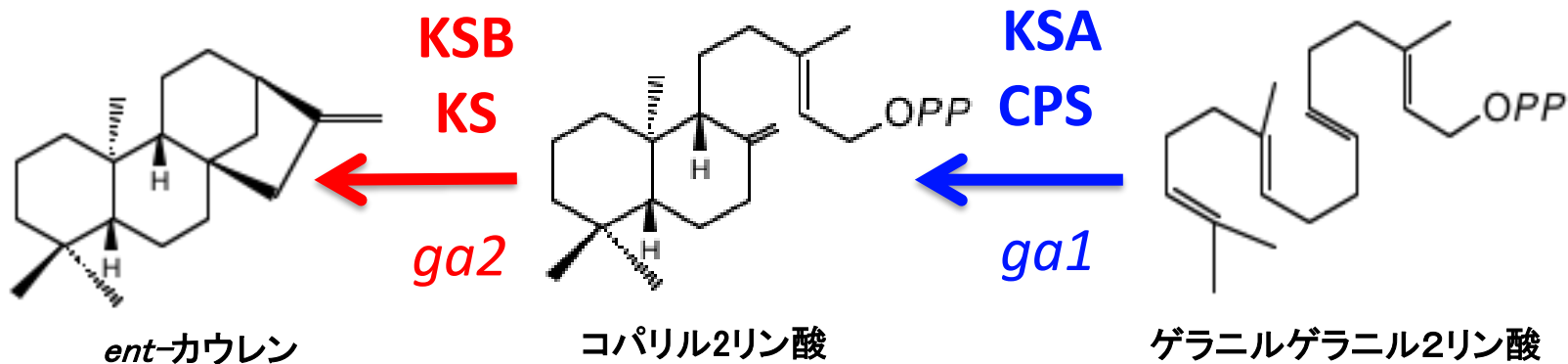
高橋政弘君

玉川大学の学生さん



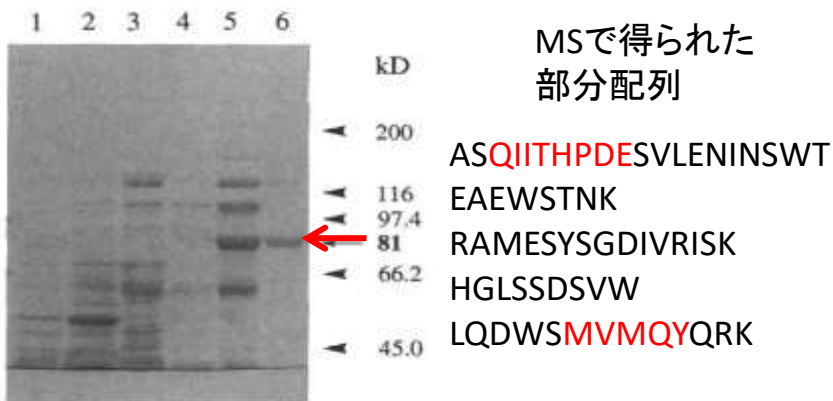
Kamiya & Graebe (1983) *Phytochemistry*

植物のent-カウレンの生合成



精製酵素から遺伝子単離へ

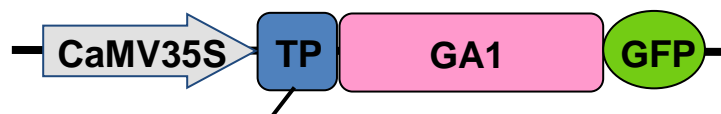
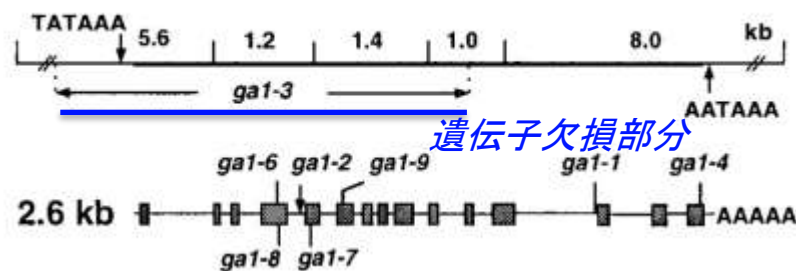
カボチャの胚乳から酵素を精製
 アミノ酸配列からRT-PCR
 ライブラリーから全長cDNA取得



酵素反応 50mM リン酸緩衝液 pH 8.0
 基質³H-CPP MgCl₂, DTT
 30°C 30分 反応後 ヘキサン抽出

突然変異体から遺伝子単離へ

シロイヌナズナの矮性突然変異体
 遺伝子欠損の*ga1-3*から全長cDNA取得

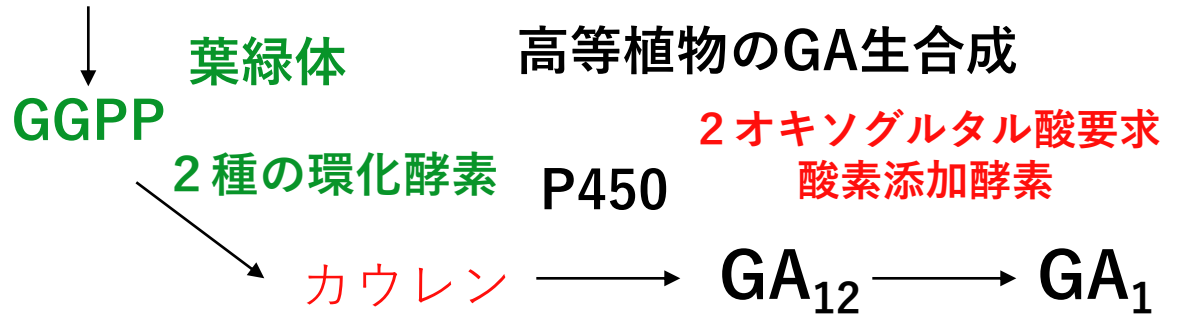


色素体への標的配列 (約10 kD)あり
 葉緑体への移動をGFPで確認

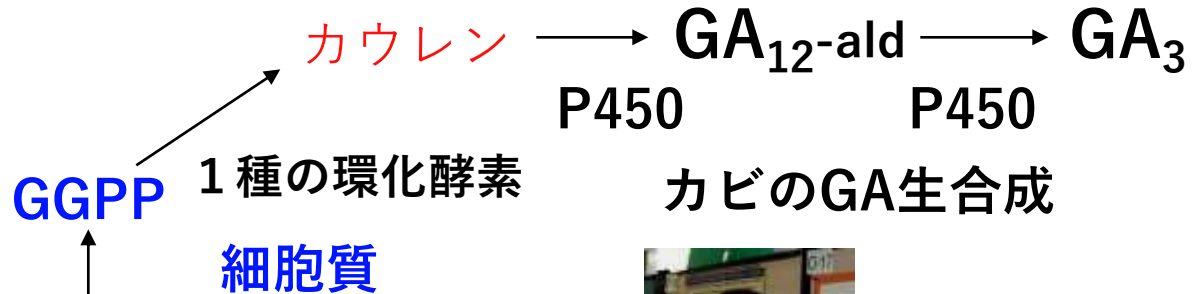
植物とカビのGA合成酵素は大きく異なることを発見



MEP経路 (メチルエリスリトールリン酸)



Kasahara et al. (2002). *J. Biol. Chem*



MVA経路 (メバロン酸)



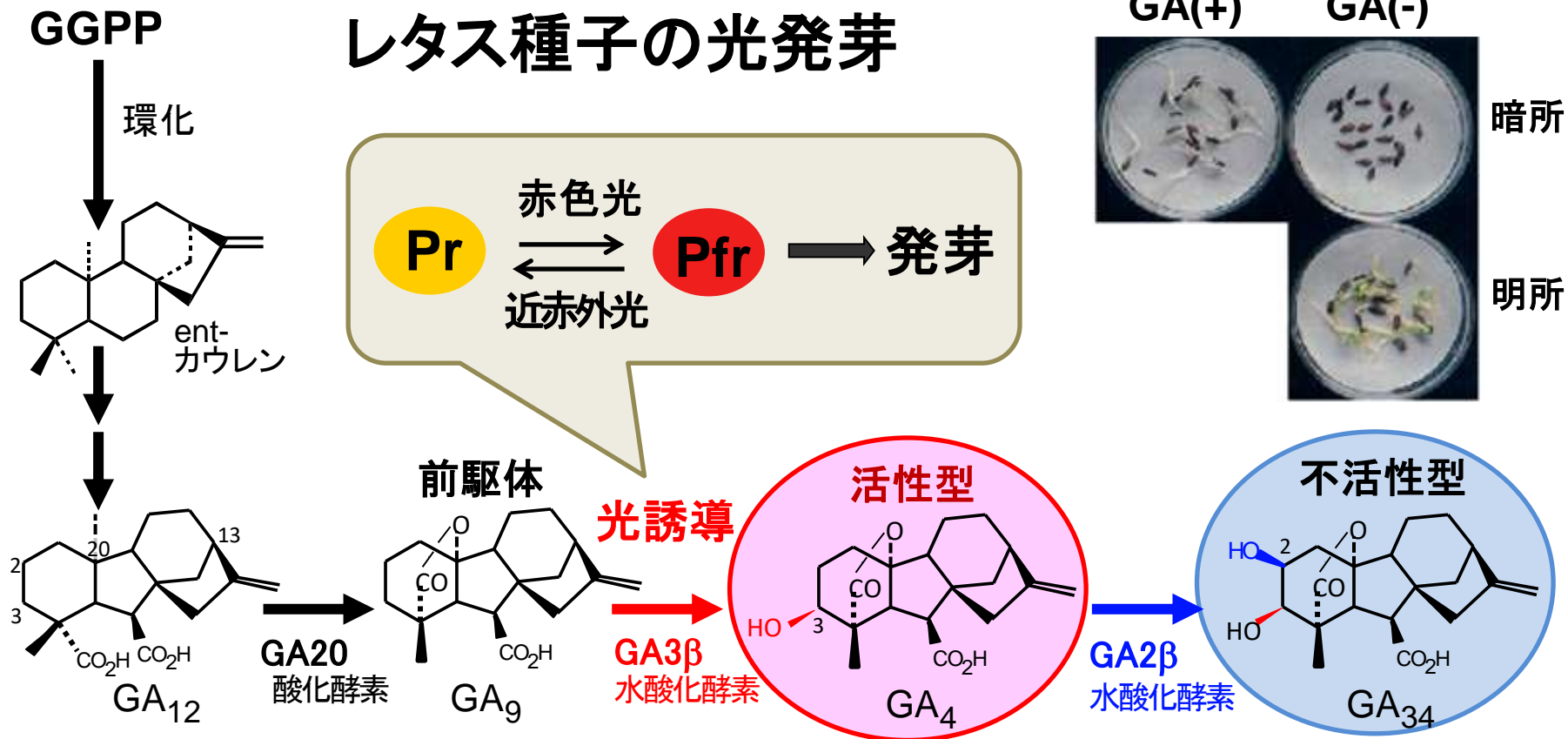
川出洋博士

Kawaide et al. (2000). *J. Biol. Chem*

カビは植物とは全く独立にGA合成経路を進化させた

GA合成経路とその制御機構の解明

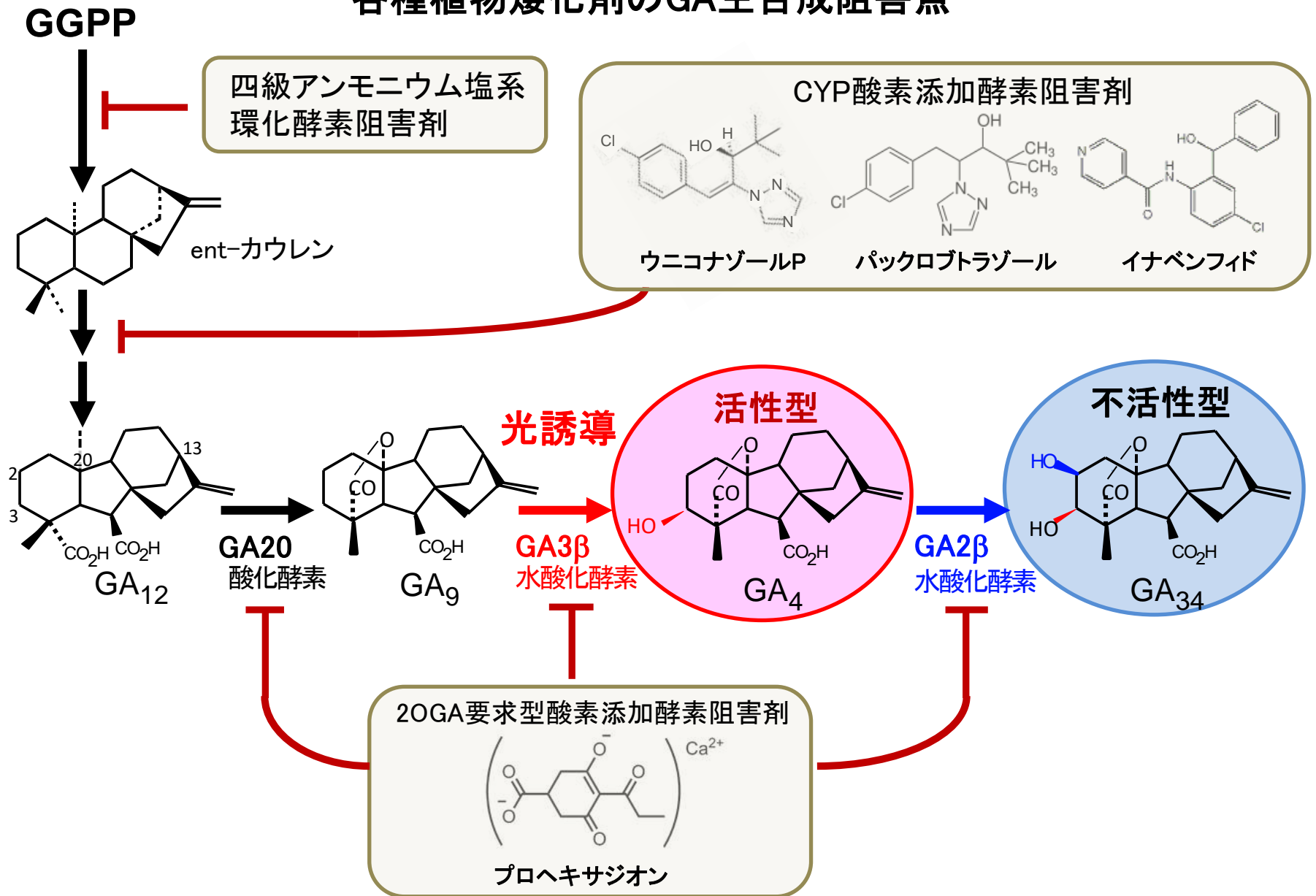
レタス種子の光発芽



- フィトクロムを介して活性型ジベレリンの生成に関わる **3β 水酸化酵素** が光で誘導されて発芽する
- 活性型ジベレリンの量は引き続き誘導される **2β 水酸化酵素** による不活化でさらに調節される

① GA合成経路とその制御機構の解明

各種植物矮化剤のGA合成阻害点



矮化剤の畑地での利用

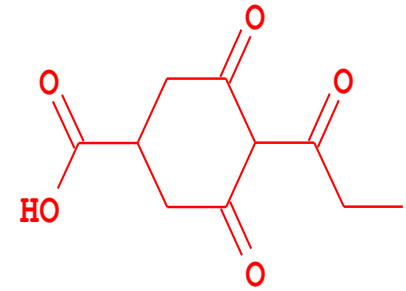
冬小麦



処理区

未処理区

欧州では小麦は80%、大麦は60%が矮化处理されている。矮化剤は品種に依らず、生長に応じて必要な時期に処理できる長所がある。



プロヘキサジオン

穀物の生産において倒伏防止は重要な課題である。倒伏は収量の低下と過剰な労働が必要になる。



処理区

大麦

未処理区

Dr. Wilhelm Rademacherの好意による

矮化剤(プロヘキサジオン)は果樹にも効果的で抗菌作用も示す

トウモロコシの苗に処理、健苗育成

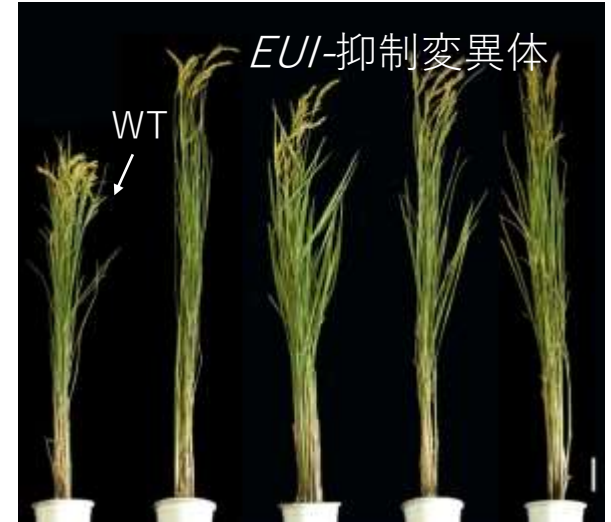
リンゴの木に処理、矮化して品質収量が向上



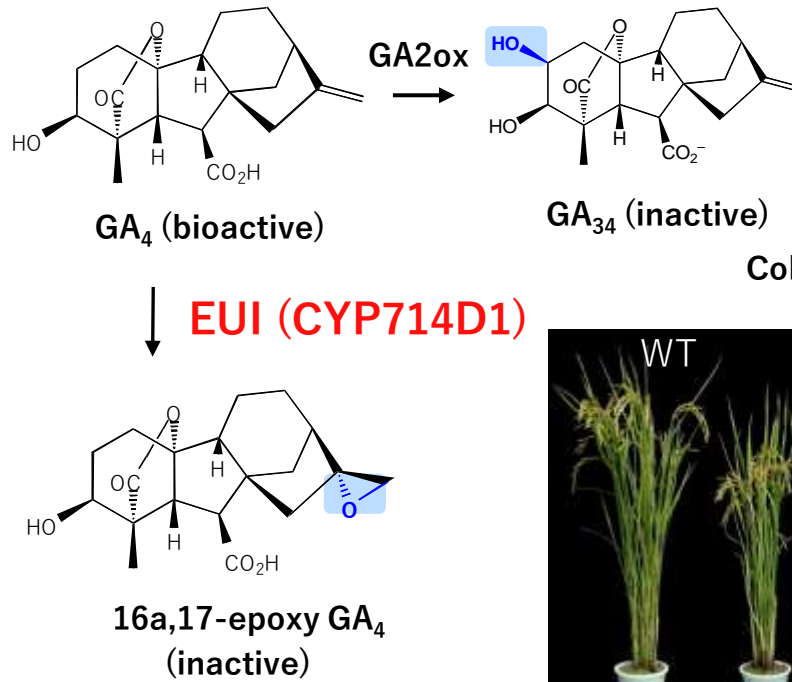
Dr. W. Rademacher (BASF)の好意による

ハイブリッドライスの作出に利用されているイネの *EUI* 遺伝子の機能がGAの不活性化機構であることを発見

- *eui* 突然変異体: 活性型のGAが高濃度で蓄積している.
- *EUI* はP450 酸素添加酵素で CYP714 family.
- *EUI* はエポキシ化によりGAを不活性化する.



Collaboration with Zuhua He lab (中国科学技術院)



雄性不稔のイネの出穂を促進するために *eui* は中国で広く利用されている

メチル転移酵素によるGAの新しい不活性化機構の発見

シロイヌナズナ



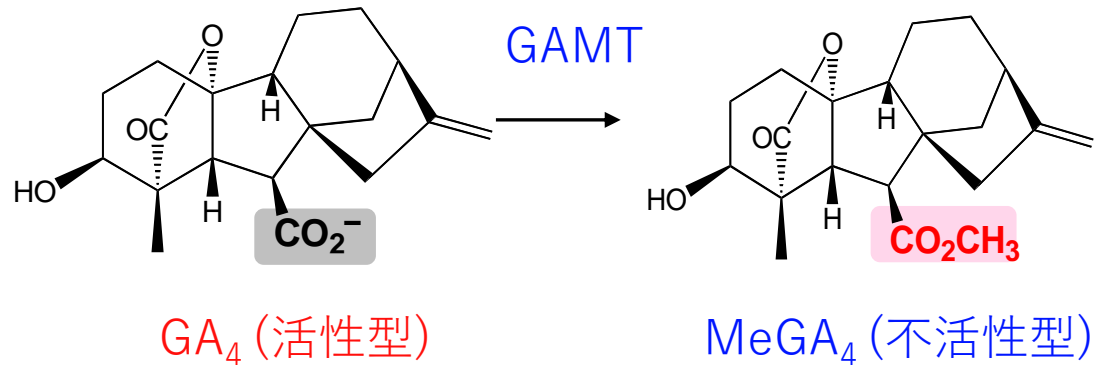
- GAMT1と GAMT2 は **メチル基転移酵素**
- GAMTを**過剰発現**すると矮化する。
- 外から活性型 GAを与えると矮性は回復する。

35S-GAMT1

このメチル基転移酵素は**種子の分化過程**で働いているが今まではその存在が知られていなかった

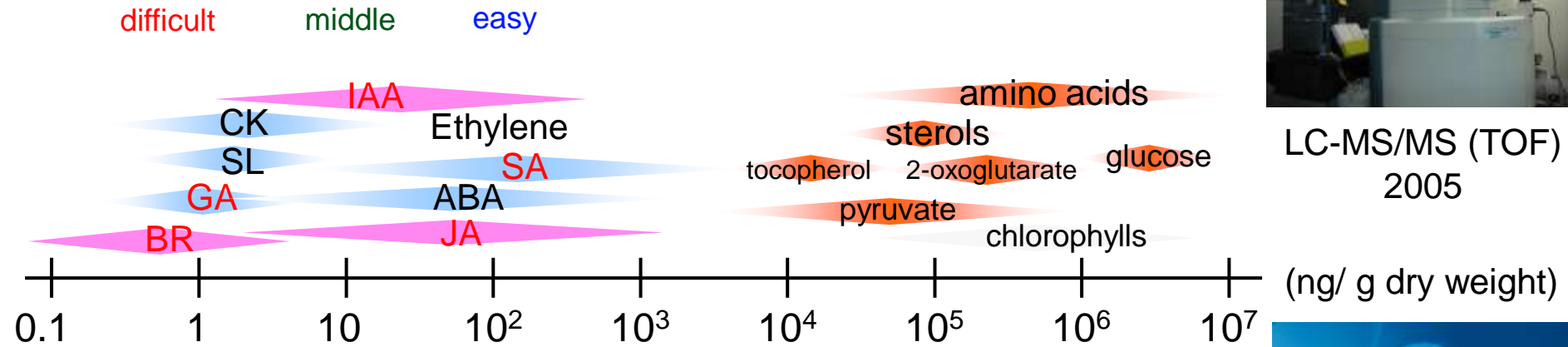


ペチュニア



種子の生長調節剤の開発の可能性

植物ホルモンの高感度一斉分析システムの開発



LC-MS/MS (TOF)
2005



LC-MS/MS (TQ)
2007



CE-MS-TOF
2011

Low abundance

Metabolom analysis

LC-MS: GA, JA, ABA, IAA, BS, CK, SA, SL, ACC, (peptides)

GC-MS: GA, JA, ABA, IAA, BS, SA

Thermal desorption GC-MS : (JA-Me, SA-Me etc.) from 2011

GC-FID: Ethylene

CE-MS: ACC

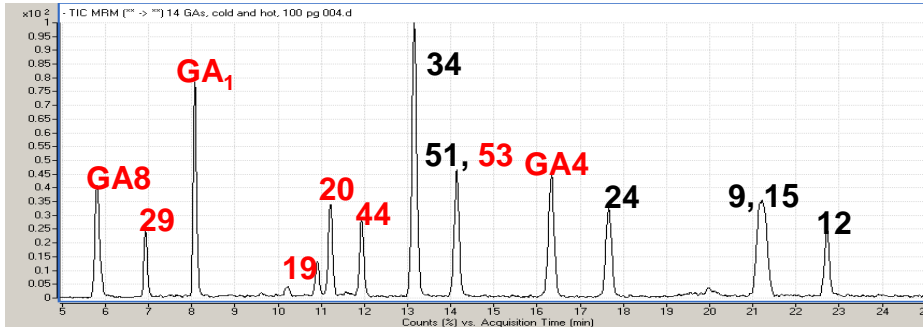
di- or tri-peptides, polar ionic intermediates

②植物体内ホルモンの高感度一斉分析システムの開発

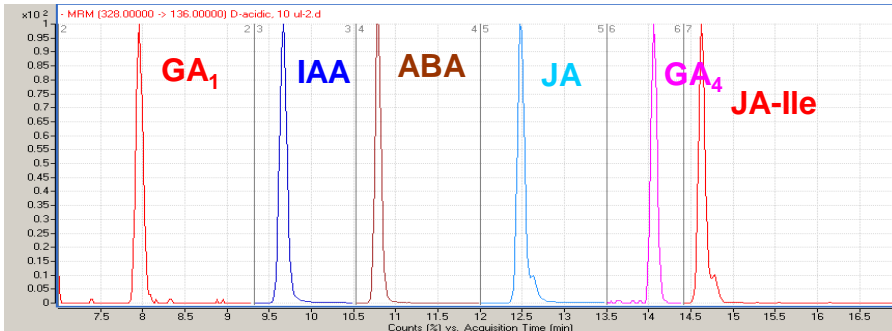
GAにとどまらず各種微量生理活性物質の一斉定量分析システムを開発整備

- 高速液体クロマトグラフによる効率的分離
- 飛行時間型と四重極型の2種の質量分析計を組み合わせた微量精密分析
- 同位体標識内部標準による回収率の確認

GAの一斉分析例

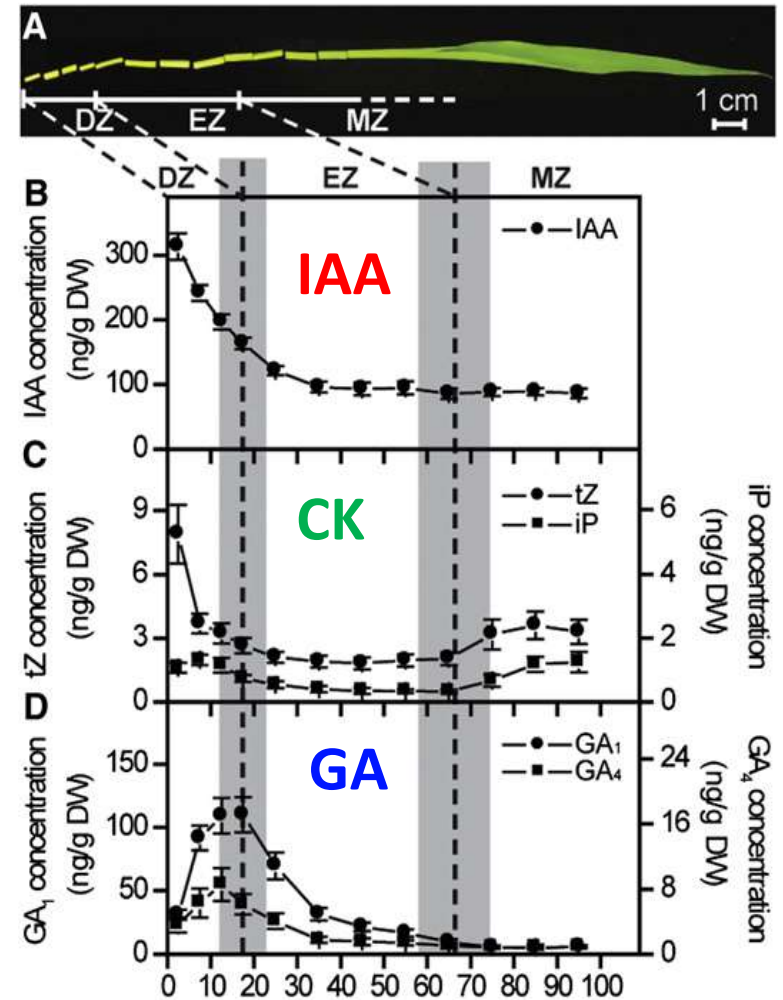


JA, IAA, ABA, GAの分析例



トウモロコシ第4葉中のホルモン分布

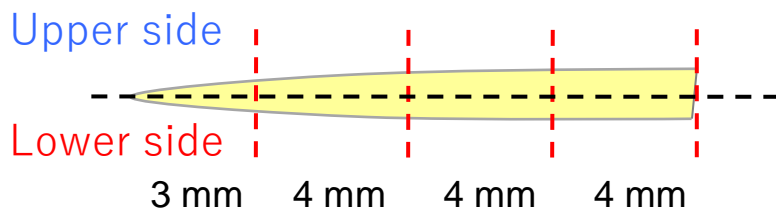
DZ:分裂ゾーン, EZ:伸長ゾーン, MZ:成熟ゾーン



PAA はトウモロコシの幼葉鞘でIAA と同様に濃度偏差分布を示す

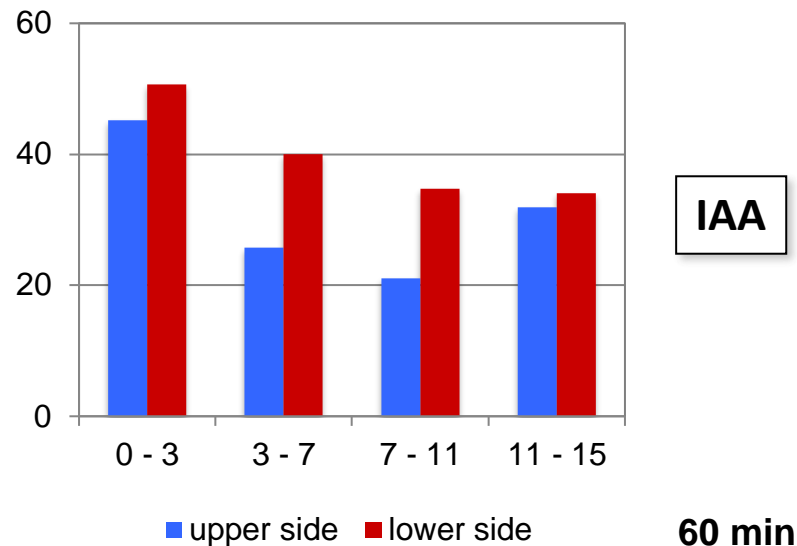


Zea maize (honey bantam)

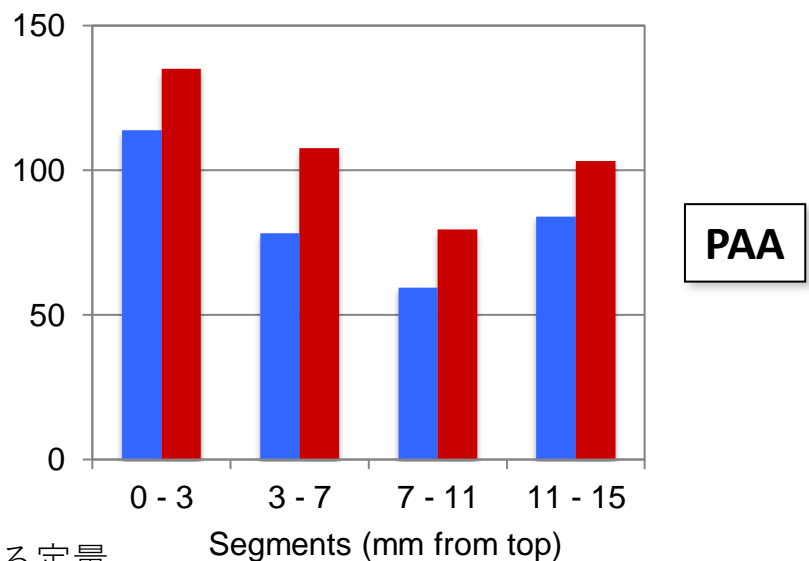


Tanaka

LC-MS/MSによる定量



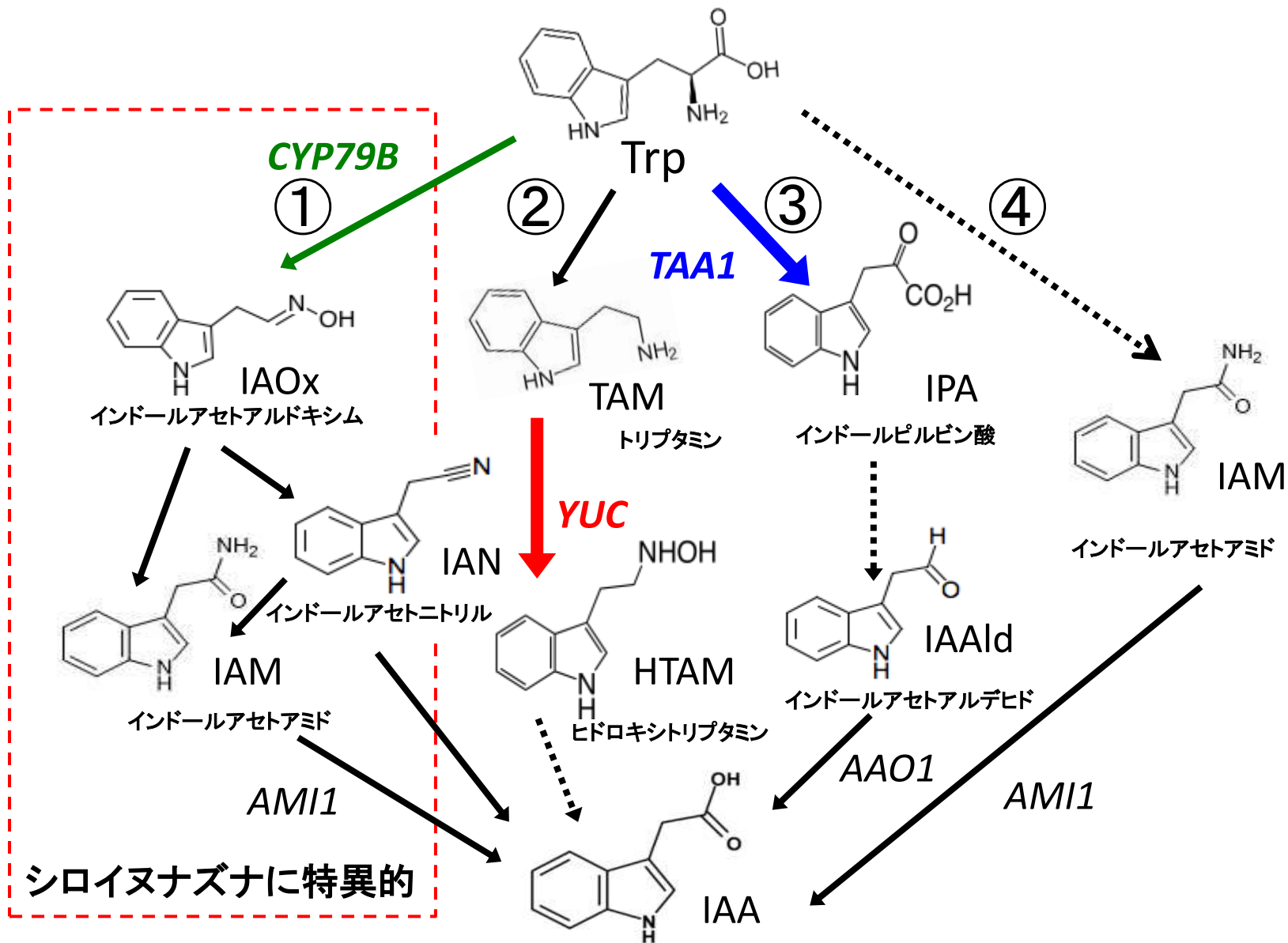
60 min



PAA

Segments (mm from top)

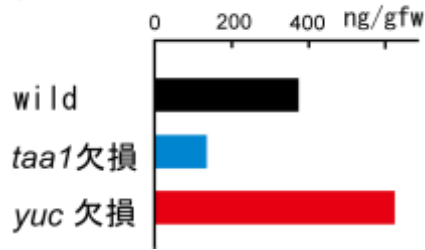
提唱されていた4種類のオーキシン生合成経路



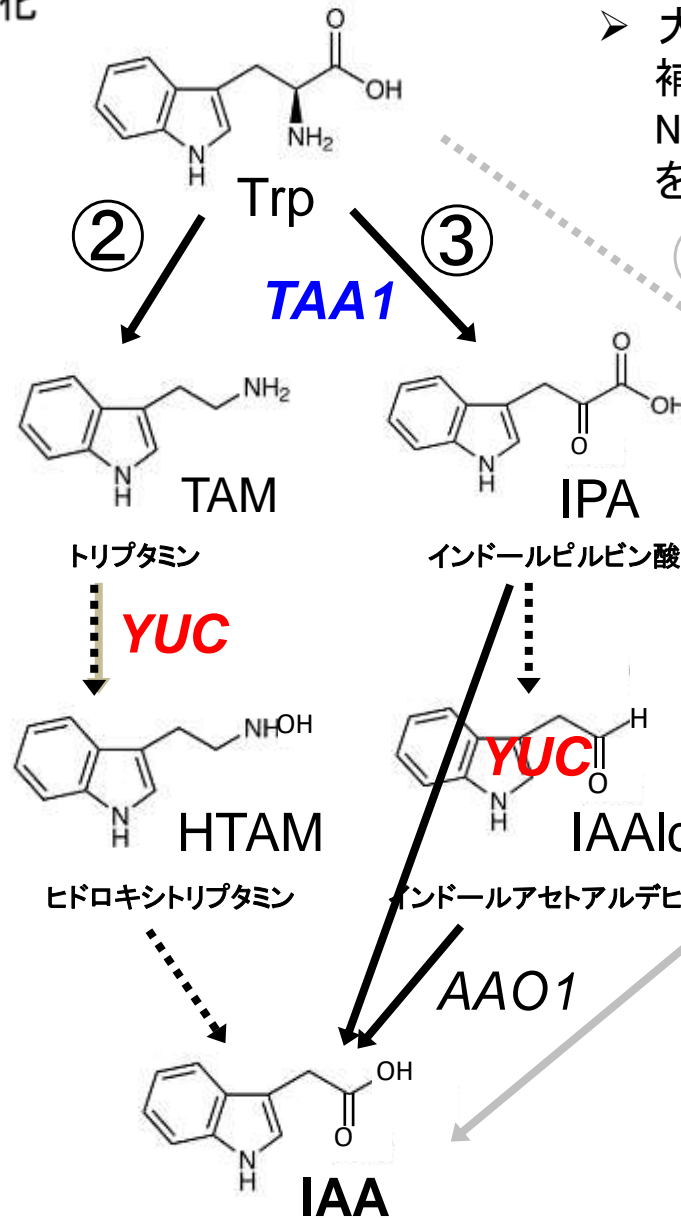
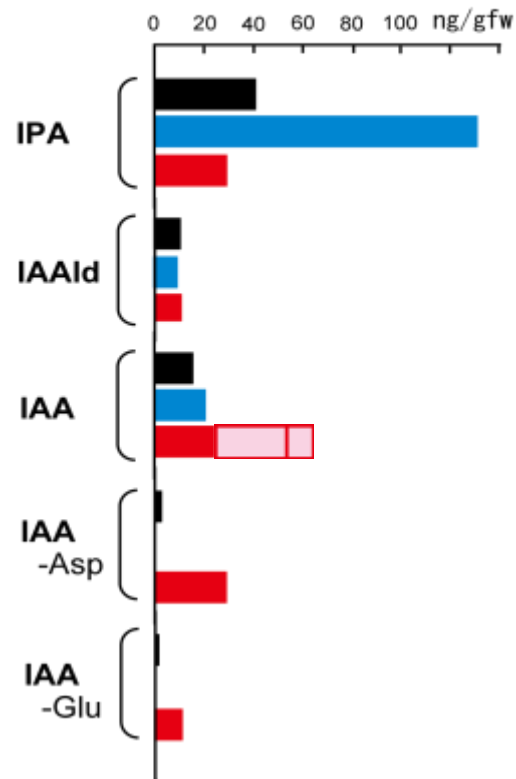
←..... 不明の反応 ① IAox経路 ② YUC経路 ③ TAA1経路 ④ 微生物の経路

③ IAA合成経路と「オーキシンの謎」の解明

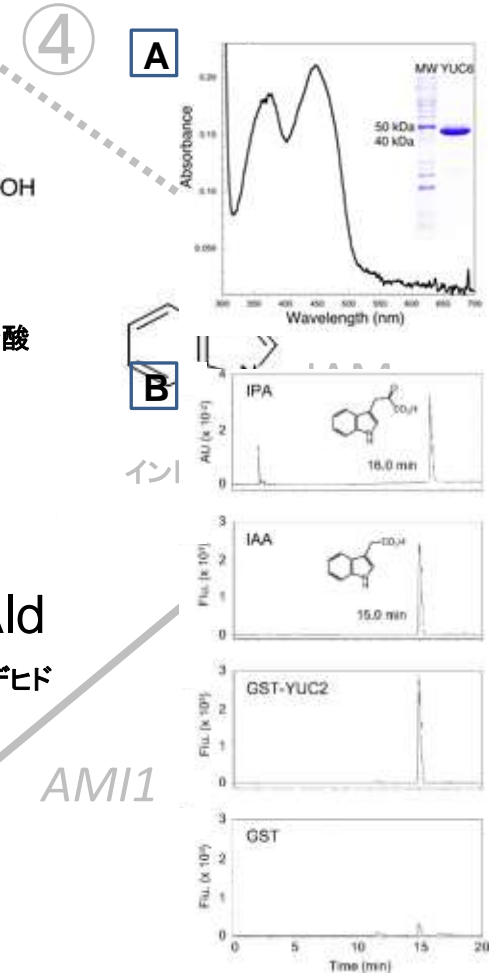
欠損変異による IPA 内生量の変化



過剰発現変異による各種中間体内生量の変化 (■ wild, ■ taa1, ■ yuc6)



大腸菌で発現させた YUC は補酵素として FAD を有し (A) NADPH と O₂ 存在下に IPA を IAA に変換する (B)



IAAの生合成に関わる酵素の性質

TAA1 (vs Trp)

$K_m = 290 \mu\text{M}$

$V_{\text{max}} = 12.9 \text{ mM min}^{-1}$

$\Rightarrow K_{\text{cat}} = 115 \text{ min}^{-1}$

Tao et al. (2008) *Cell*

GST-YUC2

$K_m = 31 \mu\text{M}$

$K_{\text{cat}} = 1.0 \text{ min}^{-1}$

Mashiguchi et al. (2011)
PNAS

OsGH3-8 (vs IAA)

$K_m = 187 \text{ mM}$

$K_{\text{cat}} = 22.1 \text{ min}^{-1}$

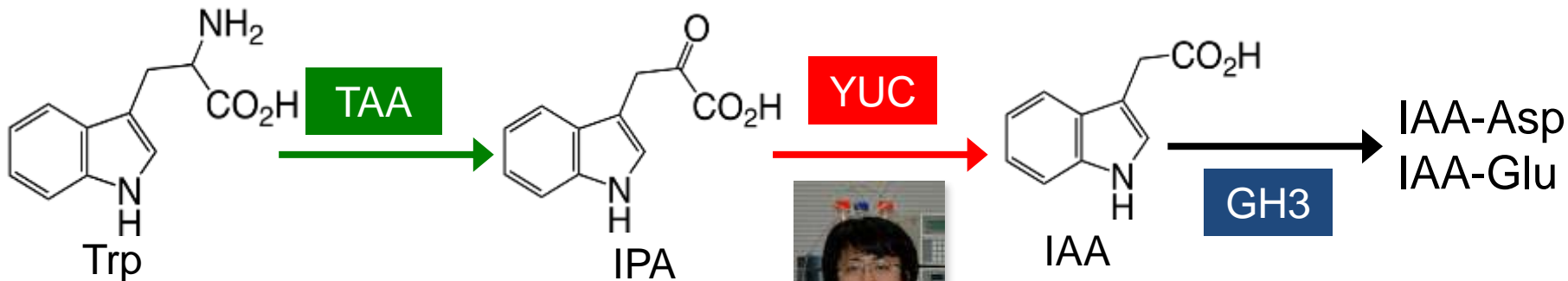
Chen et al. (2010) *JBC*

Affinity
Speed

Low
Fast

High
Slow

Low
Middle

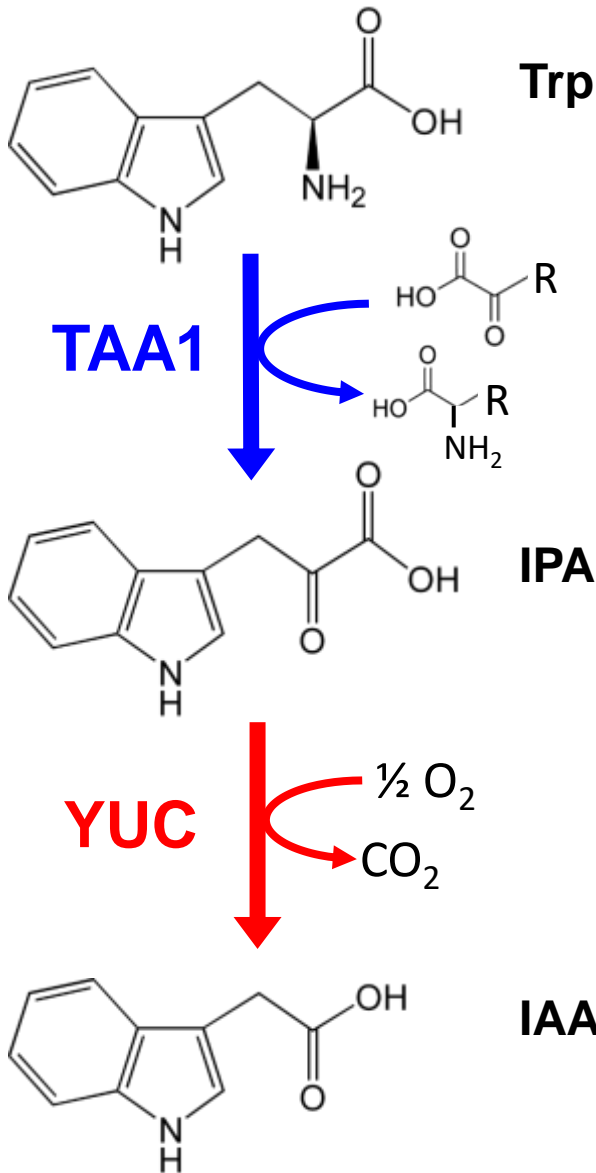


Mashiguchi

YUC酵素はフラビンモノオキシゲナーゼ

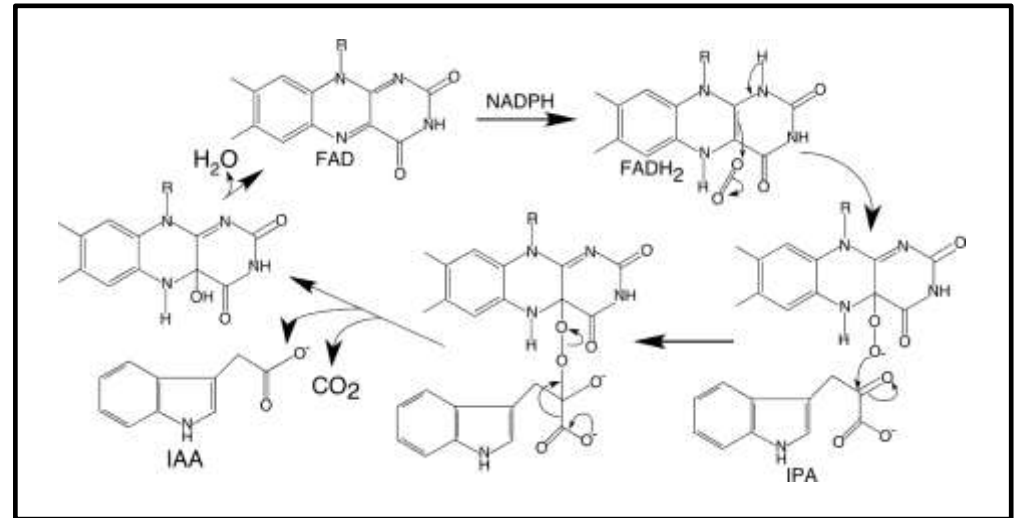
Mashiguchi et al. *PNAS* 2011

③ IAA合成経路と「オーキシンの謎」の解明



YUC; 新しいフラビンモノオキシゲナーゼ

植物から見出された最初のフラビンモノオキシゲナーゼで、NADPH と O_2 の存在下にインドール-3-ピルビン酸を酸化脱炭酸してインドール-3-酢酸を生成する



YUC フラビンモノオキシゲナーゼの触媒機構

「オーキシンの謎」の答えは
単純で普遍的

要 約

GA生合成経路とその制御機構の解明

- 高等植物とカビのGA生合成経路の解明、鍵酵素と主要酵素遺伝子の単離
- GA活性化と不活性化機構の解明

植物体内ホルモンの高感度一斉分析システムの開発

- 高感度機器分析システムによる各種ホルモンの局在性の解析

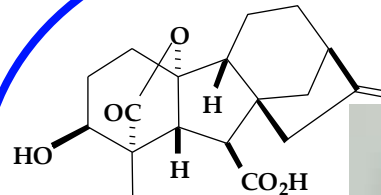
IAA生合成経路と「オーキシンの謎」の解明

- YUC酵素の機能はインドールピルビン酸の酸化的脱炭酸酵素である
- IAAの主要生合成経路はTAAとYUCによる2段階の経路よりなる

植物ホルモノーム解析（ホルモンの一斉解析）

高感度LC-MS/MSの分析でホルモン相互の関連が見える

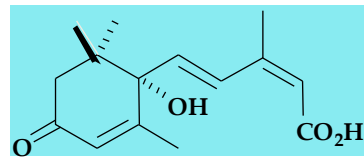
種子の休眠、
発芽



ジベレリン



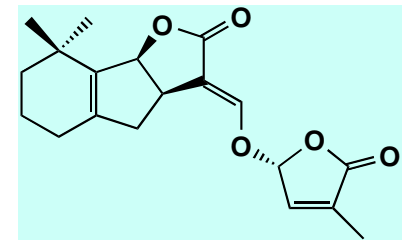
サイトカイニン
オーキシシン
ジャスモン酸
エチレン
サリチル酸



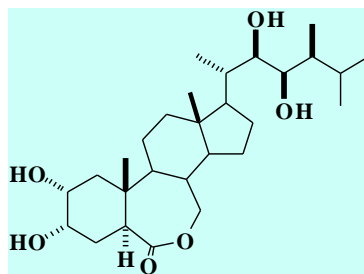
アブシシン酸

矮性
果実肥大

分げつ矮性



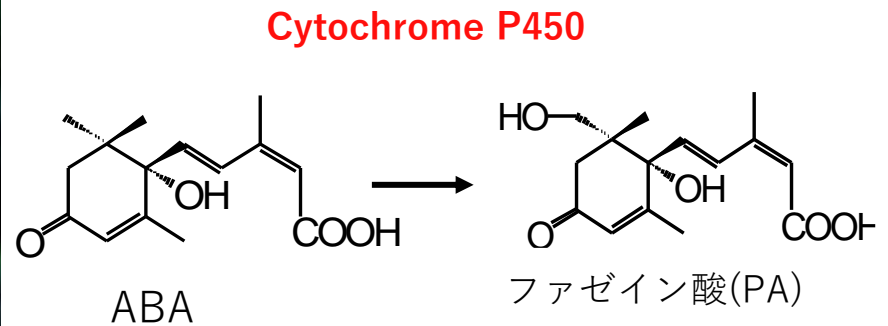
ストリゴラクトン



ブラシノステロイド



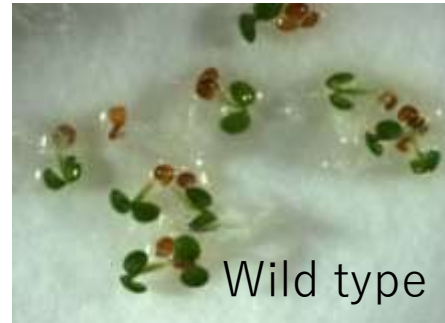
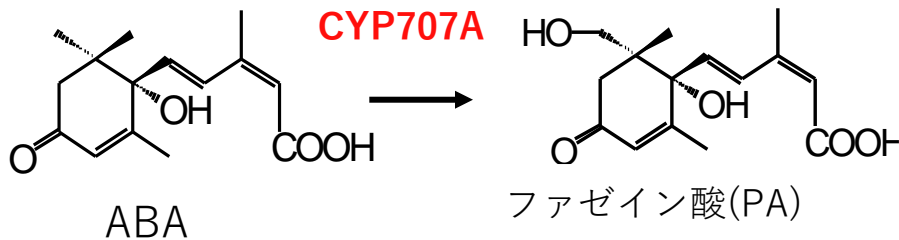
小麦のABA生合成欠損による穂発芽



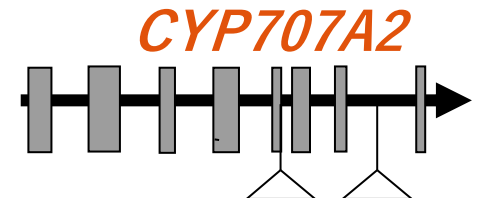
ABA が無いと休眠しないで穂で発芽してしまう

アブシジン酸の不活性化酵素遺伝子の単離

吸水により乾燥ストレスが減少すると強く誘導される



種子の休眠強化



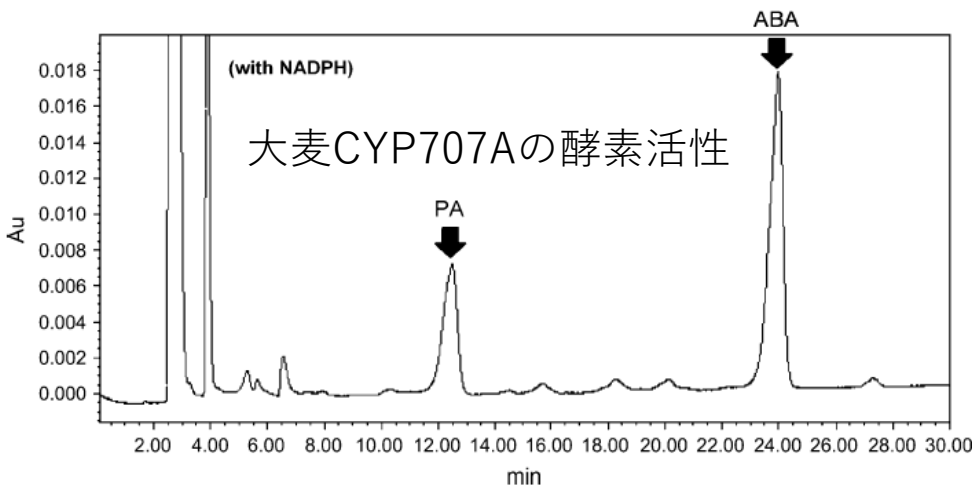
Kushiro et al. (2004) *EMBO J.*

a2-1 *a2-2*

cyp707a2 欠損突然変異体の種は休眠が深い

麦類の穂発芽抑制に有望な遺伝子

ABA が種子に蓄積する



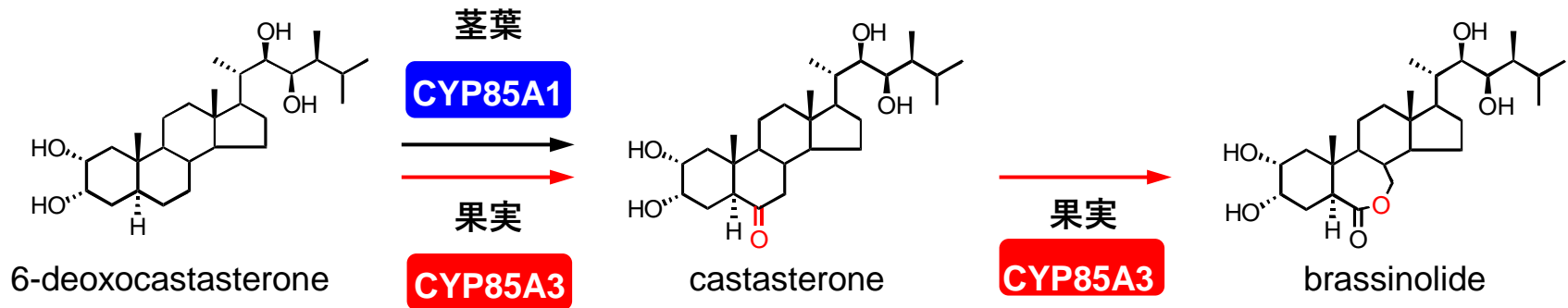
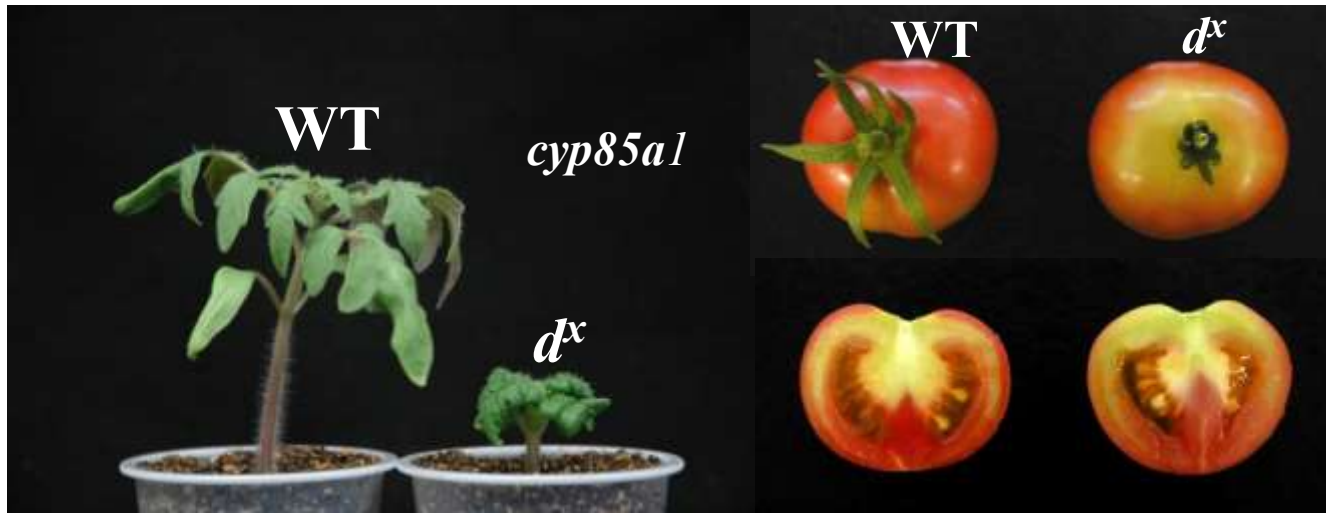
Chono et al. (2006) *J. Exp. Bot.* (農水 作物研との共同研究)

穂発芽による品質低下



正常なライ麦粉を使用 穂発芽粒が混入した粉を使用

ブラシノステロイド生合成酵素遺伝子を トマトからクローニング



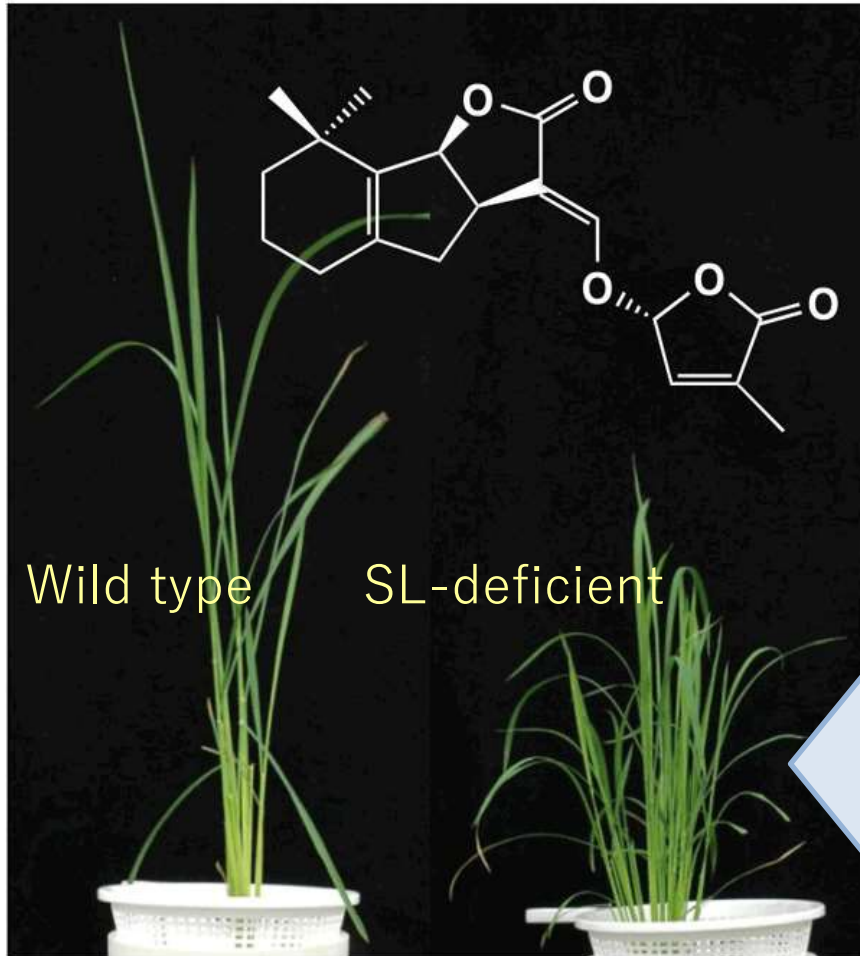
果実に特異的なCYP85A3遺伝子により**トマト**の草丈が矮化しても果実は正常

Bishop et al. (1999) *Proc. Nat. Acad. Sci, USA* Nomura et al. (2006) *J. Biol. Chem.*



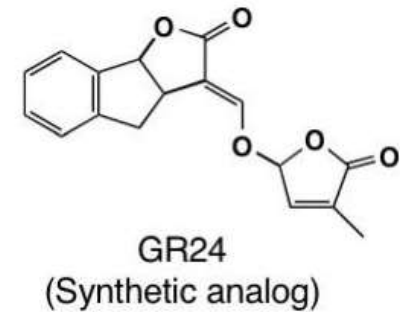
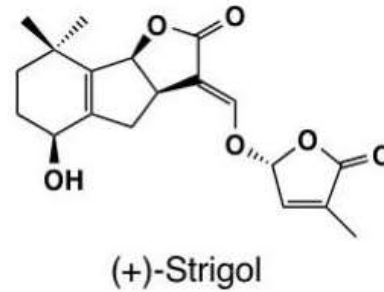
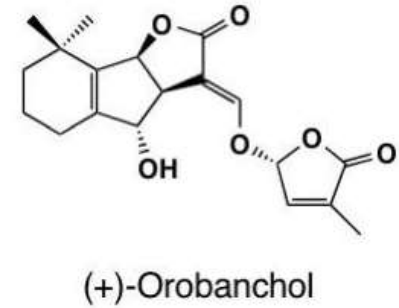
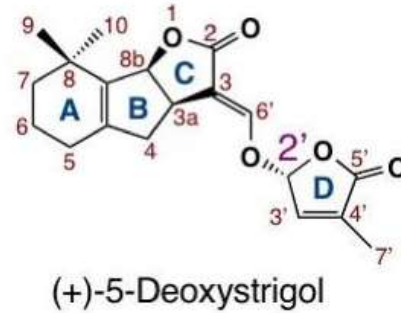
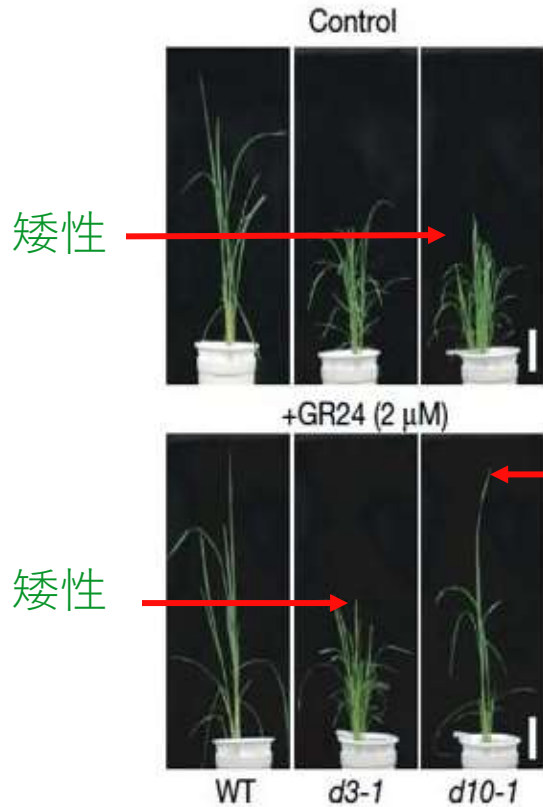
果実サイズが正常な**矮性トマト**の作出の可能性

Strigolactones inhibit shoot branching



In mutant plants unable to make SLs, many more shoot branches grow out

ストリゴラクトンは植物の枝分かれや細胞伸長を抑制する新しい植物内生のホルモンである。分げつにより矮化する。



分げつ矮性

分げつ生長調節剤としての可能性がある

*d10*は生合成、*d3*は情報伝達の突然変異体

Members in Growth Regulation Group (2013)

Researchers

Hiroyuki Kasahara, Hiroshi Magome, Yusuke Jikumaru, Kiyoshi Mashiguchi

Mikihisa Umehara (SPD> Yamaguchi's Lab), Makoto Tokuda (SPD), Atsuko Kinoshita (SPD)

Technical staffs and Assistant

Mai Sugiyama, Yumiko Takebayashi

Noriki Takeda, Ayako Sato

Graduate Student

Keita Tanaka

Bart Rymen (VIB) (2009.9-2010.1)

Satoko Sugawara (2007.4-2009.3)

Visiting Scientist

Yunde Zhao (2011.6-2011.8)

Peter Hedden (2010.10-2010.12)

Theo Lange (2008. 2-2008.4)

Patricia Leon (2008.4-2008.6)

Henrik Stoz (2008.7-2009.3)



Training Program for Hormone Analysis

K. Svyatna (08.9-08.11), B. Rymen (09.9-10.1), H. Stoz (08.7-09.3), T. Lange (2 m), P. Leon (2 m)

T. Desaki (3d), A. Robert-Setaniahtz (7d), R. Kato (5d), N. Kawakami's lab (3 students , 7d),

K. Matsukura (3d), N. Endo (6d), T. Matsumoto (7d) and many others

Thank you very much for working with me for many years at RIKEN.



NPO法人 川崎寺子屋食堂

こどもの貧困と空腹に立ち向かう

- HOME
- 団体概要
- 活動内容
- お問い合わせ
- ボランティア募集
- ご寄付のお願い
- ブログ
- ログイン



オンライン授業と食材配付会を実施しています。

子どもたちに未来と希望を！