

低分子生理活性物質から考える植物学：明らかになってきた新たな機能と分子メカニズム

岡本 昌憲¹, 瀬尾 光範²

¹宇都宮大学 バイオサイエンス教育研究センター
〒321-8505 栃木県宇都宮市峰町 350

²理化学研究所 環境資源科学研究センター
〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22

Plant biology from the perspective of bioactive small molecules: recent advances in the understanding of their new functions and regulatory mechanisms

Masanori Okamoto¹, Mitsunori Seo²

¹ Center for Bioscience Research and Education, Utsunomiya University,
350 Mine-cho, Utsunomiya, Tochigi, 321-8505, Japan

² RIKEN Center for Sustainable Resource Science,
1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa, 230-0045, Japan

Keywords: bioactive small molecules, plant hormones

DOI: 10.24480/bsj-review.13b1.00224

2021年9月に開催された日本植物学会第85回大会(八王子)において、「低分子生理活性物質から考える植物学：明らかになってきた新たな機能と分子メカニズム」と題したシンポジウムを開催した。低分子生理活性物質の代表的な例として、植物ホルモンが挙げられる。植物ホルモンは植物の発生、分化、成長、環境応答など生活環の様々な場面において不可欠な働きをするシグナル分子である。本シンポジウムではその様な分子群に焦点を当て、近年明らかになりつつあるその新たな機能や詳細な分子作用メカニズムについて議論する場を設けたいと考えて企画した。

ここでタイトルに「植物ホルモン」という言葉を用いなかった理由について、簡単に説明したい。その一つは、植物ホルモンの定義が不明瞭になってきている点にある。オーキシン、サイトカイニン、ジベレリン、アブシシン酸、エチレンの5つの分子が古くから植物ホルモンとして認識されており、それはら古典的なホルモン (five classical hormones) とも呼ばれる。これに加え現在では、ブラシノステロイド、ジャスモン酸 (類)、サリチル酸、ストリゴラクトンが植物ホルモンとして教科書に記載され、それらを認識する受容体の実態も明らかになっている。しかしながら、以上の9種のホルモンのなかには、分子構造が異なるものが同一受容体に結合する例や、特定の植物種のみ存在する分子種なども報告されている。さらにはペプチド・タンパク質の中にもいわゆる植物ホルモンとして機能するものが存在する。ペプチド性の活性分子は「ペプチドホルモン」と呼ばれ、FTタンパク質は比較的分子量が大きいことからペプチドホルモンとは区別され「花成ホルモン (フロリゲン)」などといった形で呼ばれることが多いと思うが、そこに明確な決まりはない。こうした中、当シンポジウム

では遺伝子に直接コードされない低分子性の植物ホルモンに研究の対象を限定しなかったことで「低分子生理活性物質」という語を用いることにした。また、2008年にストリゴラクトンが植物ホルモンとして機能することが明らかになったことは記憶に新しいが、今後も植物ホルモンと呼ばれる低分子性の活性分子が増えていくであろうと予想される。だが、「低分子生理活性物質」のうちどの様な要素を持つものが「植物ホルモン」と呼ばれるようになるのであろうか？シンポジウムの終わりにはこの様な点についても議論したいと考え、タイトルにはあえて植物ホルモンという語を用いなかった。

この様に植物ホルモンに対する私たちの認識が変化してきているのは、様々な研究アプローチにより、新たな発見が次々となされていることに起因する。これは低分子性の植物ホルモン・生理活性物質に限定しても言えることである。本総説集では、異なるバックグラウンドを持つ6名の研究者が、それぞれの視点から自身の研究や周囲の研究動向について解説をする。これが様々な角度から植物ホルモンを見つめ直す機会となり、今後の本研究分野の発展に少しでも貢献できれば幸いである。

アブシシン酸の多様な機能

岡本 昌憲¹

¹宇都宮大学 バイオサイエンス教育研究センター
〒321-8505 栃木県宇都宮市峰町 350

Various physiological functions of abscisic acid

Masanori Okamoto¹

¹Center for Bioscience Research and Education, Utsunomiya University,
350 Mine-cho, Utsunomiya, Tochigi 321-8505, Japan

Keywords: abscisic acid, anthocyan, flowering, morphogenesis, root growth

DOI: 10.24480/bsj-review.13b2.00225

1. はじめに

植物ホルモンのアブシシン酸 (ABA) は乾燥ストレス応答, 気孔閉鎖, 種子休眠に主要な役割を果たす。ABA の代謝制御や受容体以降のシグナル伝達経路が明らかにされたことで, 先述した主要な ABA の生理作用を引き起こす分子機構の理解が進んだ。しかし, 他の植物ホルモンにも見られるように ABA の生理作用は多面的である。ABA の主要な生理作用の分子機構については, これまでの解説書や総説を参考にして頂き (浅見 and 柿本 2016; Marion-Poll and Seo 2019; Zhang 2014), ここでは ABA の生理作用としては脇役な部分になるかもしれないが, 植物の生活環における ABA の様々な機能についてスポットを当てて解説したい。

2. ABA による開花制御 (図1参照)

ABA は開花制御に関して対照的な作用を持つ (Shu et al. 2018)。ABA が開花を抑制する場合もあれば, 促進する場合もある。なぜこのように相反する生理作用が存在し, それらがどのように制御されているのかが, 徐々に明らかになってきた。まずは, ABA が開花を遅延することについて説明する。多くの植物種で ABA は開花を抑制することが知られている。ABA を散布することでも開花が遅くなることから (Wang et al. 2013), ABA は開花に対して負に制御するシグナル分子といえる。また, ABA 欠損変異株のシロイヌナズナを土で生育させると野生株よりも早く花が咲き, 一方で ABA を蓄積した変異株は開花が遅い形質を示す。そして, ABA のシグナル因子等 (ABI3, ABI4, ABI5 転写因子) などを過剰発現させたトランスジェニック植物の開花も遅くなる (Kurup et al. 2000; Zhang et al. 2005; Shu et al. 2016; Foyer et al. 2012; Wang et al. 2013)。ABA が増加するこ

とで, ABA のシグナル伝達を介して ABI3, ABI4, ABI5 の転写因子などが開花抑制因子である *FLC* 遺伝子の発現量を高め, 開花スイッチである FT タンパク質や開花制御転写因子 *SOC1* の遺伝子発現を抑制する (Shu et al. 2016; Wang et al. 2013)。また一方で, ABI4 転写因子は, 植物体におけるジベレリン(GA)の量を抑制することで開花を抑制する (Shu et al. 2016)。これらの分子機構によって, ABA は開花抑制に作用すると考えられる。

一方で, ABA が開花を促進する事例も報告されている (Martignago et al. 2020)。植物にとって深刻な乾燥ストレスが訪れる前に開花を早め, 種子を付けることができれば, 植物の生存戦略として有効である。乾燥によって増加した ABA が乾燥逃避のための開花を引き起こす分子シグナルとして作用する報告例がある。乾燥ストレスによって増加した ABA は bZIP 転写因子の ABF3 や ABF4 を活性化するが, *abf3* と *abf4* の 2 重変異株では開花遅延の形質を示す (Hwang et al. 2019; Yoshida et al. 2010)。そのため, この両者の転写因子は開花制御因子を制御することが予想され, *abf3* と *abf4* の 2 重変異株では転写因子 *SOC1* 遺伝子の発現が抑制されていた (Hwang et al., 2019)。ABF3 と ABF4 転写因子は *SOC1* 遺伝子のプロモーターには直接結合はせず, 転写因子 NF-YC と複合体を形成することで, NF-YC 転写因子が *SOC1* 遺伝子のプロモーターに結合する (Hwang et al. 2019)。そして, この複合体は, *SOC1* 遺伝子の転写を促進し, 乾燥逃避のために早期に開花をもたらす。また, 乾燥誘導性の ABA は概日時計の制御因子である GIGANTEA (GI) を介して CONSTANS (CO) をポジティブに制御することで, *FT* 遺伝子の発現を高め, 長日環境下における乾燥ストレス誘導性の開花を引き起こすことも示唆されている (Riboni et al. 2016)。このように, ABA が開花制御に対して異なる ABA シグナル伝達経路を介して対照的な作用を持つ分子機構が示されたものの, どのようにそれらの制御機能が切り替わるのかは, 未だ明確ではない。

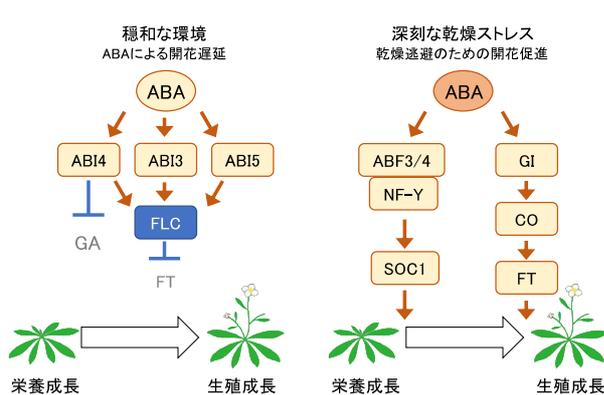


図 1. ABA による開花制御

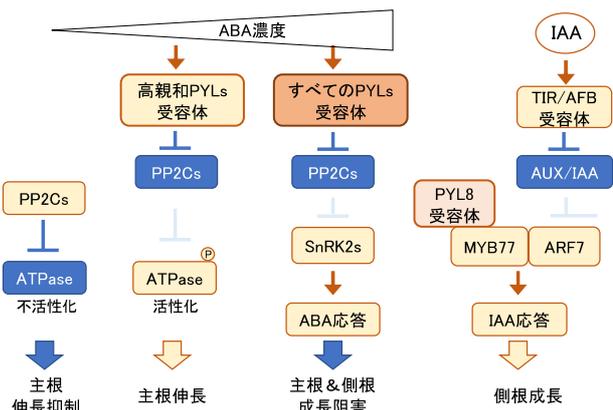


図 2. ABA による根の成長制御

3. ABA による根の成長制御 (図 2 参照)

ABA は根の形態や成長を制御する。低濃度の ABA は主根の成長を促進することが古くから知られていたが, この分子機構はこれまで不明であった (Mc Adam et al. 2016; Saab

et al. 1990; Spollen et al. 2000)。ABA シグナル因子の負の制御因子である 2 型タンパク質脱リン酸化酵素 (PP2C) の多重変異株 (*abi1-2/abi2-2/hab1-1/pp2ca-1* の四重変異株, 以下 *Qabi2-2* 変異株) は, 僅かに ABA 感受性が向上しており, 主根の伸長が野生株に比べて長い形質を示す (Miao et al. 2021)。この形質は低濃度の ABA を野生株に投与したときと同様の形質を示す。細胞伸長に関わる ATP 加水分解酵素(ATPase)の阻害剤を投与することで, 低濃度の ABA 投与や *Qabi2-2* 変異株における根の伸長促進が阻害されることから, 低濃度の ABA は ATPase の活性化を促進していると予想された。実際に, 低濃度の ABA 投与や *Qabi2-2* 変異株の主根の伸長領域領域では, 細胞内からアポプラストへのプロトン流出量が増加しており, ATPase の活性化も起きていた。このことから, オーキシンの生理作用で見られるように, 低濃度の ABA はアポプラストの酸性化を引き起こし, これに伴い細胞壁分解酵素の活性化によって細胞壁が緩み, 細胞伸長が起きていると考えられる。では, どのように ABA シグナル因子が ATPase の活性を制御しているのだろうか? ABA シグナル伝達因子の PP2C のメンバーである ABI1 は ATPase の AHA2 に結合し, AHA2 を脱リン酸化している事が示された。つまり, 低濃度の ABA は高親和性型 ABA 受容体を介して PP2C の活性を抑制する。その結果, ATPase のリン酸化状態が維持され, アポプラストへのプロトン流出量増加による酸性化によって, 根の細胞伸長が起ることが示されている。

一方で, 根における ABA 濃度が高くなると, 主根の伸長阻害が起きる。シロイヌナズナでは, ABA 受容体遺伝子が 14 種類も重複しているが, そのうち主に PYL8 受容体が根の伸長阻害に関わる (Antoni et al. 2013)。*pyl8* 変異株は他の ABA 受容体が機能していても, ABA による主根の伸長阻害が緩和される (Antoni et al. 2013)。興味深いことに PYL8 受容体は他の ABA 受容体とは異なり, ABA によって受容体タンパク質が安定化し, 核内に蓄積する (Belda-Palazon et al. 2018)。PYL8 による ABA シグナル因子群の活性化によって主根の成長阻害を引き起こすと考えられる。また, ABA と側根の関係においては, ABA 濃度が高くなると側根の伸長成長が抑制されるが, *pyl8* 変異株では興味深いことに側根の伸長阻害がさらに強まる (Zhao et al. 2014)。このことから, PYL8 受容体と側根成長に関わる因子との相互作用が示唆された。実際に, PYL8 受容体は転写因子 MYB44, MYB73, MYB77 と ABA 非依存的に結合する。MYB77 転写因子は, オーキシン応答性 *IAA7*, *IAA17*, *IAA19*, *GH3* や *PINI* 遺伝子などのプロモーターに結合し, これら遺伝子の転写を活性化する。この活性化は PYL8 受容体タンパク質と MYB77 転写因子が共発現することで, オーキシン応答性遺伝子の発現が向上することから, PYL8 受容体は側根の成長にポジティブに作用する機能を有することが示されている。ただし, *pyl8* 変異株では IAA の投与によって側根の伸長阻害が緩和する。このことから, MYB77 転写因子は IAA シグナル伝達経路と PYL8 受容体がそれぞれ独立した形で制御されるものと考えられている。しかし, 開花制御と同じように, 根における ABA の濃度変化が起こった場合に, どのように根の伸長促進と成長阻害の制御機構が切り替わるのかは不明なままである。

4. ABAによる地上部の形態形成 (図3参照)

周囲の環境変化に応じて生じる葉の形態と ABA の関わりについては、特に水辺に生息する植物でその作用機構の解明が進められている。チョウジタデ属アカバナ科の *Ludwigia arcuata*, オオバコ科アワゴケ属の *Callitriche palustris* やその他の水草の多くは、水中では水中葉を形成し、葉が水上にあると陸上葉を形成する (Kuwabara et al. 2003; Koga et al. 2021)。一般的に、水中葉は形態的に細く、全体的に柔らかいのにに対して、陸上葉は葉が丸く、茎が太く、しっかりしている。環境に応じて水中葉と陸上葉が可塑的に形成される異形葉性は、植物ホルモンの ABA とエチレンが大きく影響している。水中葉の内生 ABA 量は陸上葉に比べて低い。エチレンは水に溶解難いため、水中で形成される水中葉ではエチレン内生量が強く維持され、水上ではエチレンが大気中に容易に拡散するため、陸上葉ではエチレン内生量が低い。水中に ABA やエチレン作用阻害剤を与えて生育させると、水中であっても陸上葉が形成される (Kuwabara et al. 2003; Koga et al. 2021)。つまり、陸上葉の形成にはエチレン作用の減衰、あるいは ABA 作用が強くなることが必要である。一方で、水中葉の形成には植物種によって制御が異なることが示されている。*Ludwigia arcuata* はエチレンの投与によって、陸上でも水中葉を形成させることができる (Kuwabara et al. 2003)。これに対して、*Callitriche palustris* L. ではエチレンや GA の複合処理によっても水中葉が形成されることがないため、さらにほかの制御因子が必要であることが示唆されている (Koga et al. 2021)。陸上葉では、ABA や他の植物ホルモンが相互作用して、葉の形態や気孔分化に関係する様々な因子がトランスクリプトーム解析から見出されているが、どのようなシグナル伝達経路を介して制御されているのかは明確ではない。

浮きイネやタデ科スイバ属の *Rumex palustris* は、大雨や洪水などによって植物が冠水すると、水中での嫌気環境を回避するために器官の一部を伸長させる (Kende et al. 1998; Voesenek et al. 1997)。この時に相互作用するのも、エチレンと ABA である。水の中ではエチレンは拡散しにくいために、エチレンが植物体内にとどまり濃度が高くなる。その結果、ABA が減少して、GA の内生量が増加することで、浮きイネではシュートが伸長し (Kende et al. 1998)、*Rumex palustris* では葉柄が伸長する (Benschop et al. 2005)。

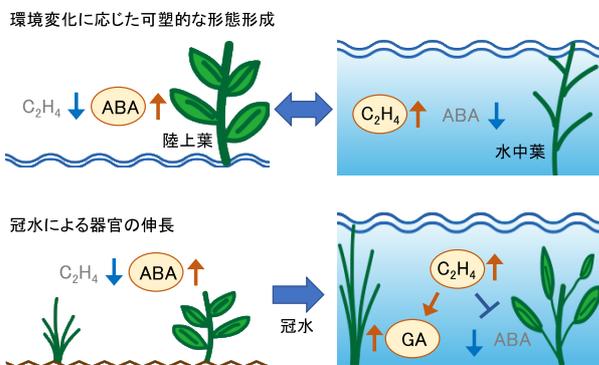


図 3. ABA による地上部の形態形成

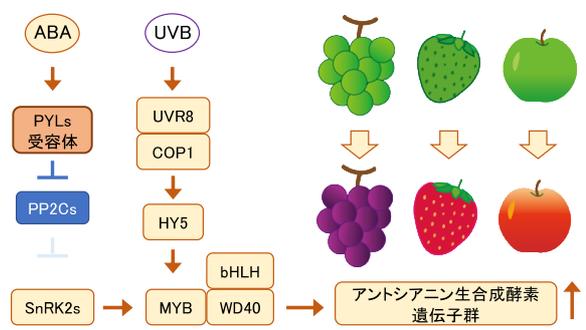


図 4. ABA と色素蓄積

これら両者では、冠水中でも ABA を投与することで器官の伸長が抑制されることや、陸上でもエチレンを投与することで、内生 ABA 量が減少し、器官の伸長が起こることから、双子葉植物と単子葉植物という異なる植物種でも冠水応答で利用されるホルモンは類似している。特に、エチレンに応答して内生 ABA 量が減少する際には、ABA を不活性化する鍵酵素遺伝子 (*CYP707A*) の発現が顕著に上昇することから、エチレンの下流シグナル転写因子が *CYP707A* 遺伝子の発現を制御していると思われる (Saika et al. 2007)。このように環境変化に応じて ABA 量が増加し、他のホルモンとの相互作用によって可塑的に形質を変化させる機能がある。

5. ABA と色素蓄積 (図 4 参照)

イチゴ、ブドウ、リンゴなど多くの果物で、ABA が果皮のアントシアニン蓄積や果実の成熟に関与ことが報告されている (An et al. 2018; Chai et al. 2011; Peppi et al. 2006)。植物がアントシアニンを蓄積する生理的意義は、紫外線をクエンチングする働きや環境ストレスの際に発生する活性酸素に対するスカベンジャー作用を有することで、細胞を保護することである。一方で、園芸的な側面からは、果物の鮮やかな色彩は、品質指標の一部として重要であり、果物の価格に影響する。ブドウでは、果実成熟の際に、内生 ABA 量が急激に増加し、この増加に伴い果皮のアントシアニン蓄積に加えて、糖の蓄積、有機酸の低下、果物の軟化も起こる (Kuhn et al. 2014)。また、果実成熟の際に、外から ABA を投与することでも、果皮のアントシアニン蓄積を促進することができるが、単独投与よりも複数回投与で効果が高い (Koyama et al. 2018)。イチゴでは、ABA 受容体を可食部の花託で部分的にジーンサイレンシングを起こすことで、その部位のアントシアニン蓄積が抑制されることから、アントシアニンの蓄積は ABA 受容体を介して引き起こされる事が示されている (Chai et al. 2011)。ABA 受容体以降のシグナル経路を介して、ABA はアントシアニン生合成の鍵転写因子である MYB 転写因子の遺伝子発現を増加させる。そして MYB 転写因子の発現増加に伴い、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (*PAL*) 遺伝子、カルコンシンターゼ (*CHS*) 遺伝子、フラバノン-3-ジオキシゲナーゼ (*F3H*) 遺伝子、ジヒドロフラボノール還元酵素 (*DFR*) 遺伝子とその下流アントシアニン生合成酵素遺伝子群の発現誘導が起きる (Koyama et al. 2010; Koyama et al. 2018)。しかしながら、果皮におけるアントシアニンの蓄積誘導には紫外線が必須である。紫外線の UVB が UVR8 受容体を介して MYB 転写因子を活性化させ、アントシアニン生合成酵素遺伝子群の発現が高まり、アントシアニンの蓄積が起こる (Zoratti et al. 2014)。ABA が UVB シグナル伝達経路によって誘導されるアントシアニン生合成の制御機構とどのように関わっているのか、その詳細な分子機構の解明が期待される。

6. おわりに

これまで、ABA 生理作用の理解には、遺伝学的な材料が利用できる植物を中心に精力的に行われてきた。次世代シーケンスの出現により、非モデル植物でも分子レベルの解

析が展開できるようになり、研究対象の植物が変わるだけで思いがけない ABA の働きを知ることができる。今回は紹介しなかったが、アフリカで甚大な農業被害をもたらす根寄生雑草のストライガは、乾燥地にもかかわらず ABA の生理機能を低下させている。ABA の感受性を低下させることで、自身の蒸散量が盛んになり、その結果、宿主の根における連結部を介して水の流れを自身に傾かせる。こうして、ストライガは乾燥条件下で宿主から養水分を効率的に奪取する生存戦略を取っている (Fujioka et al. 2019)。このように、今後は、多様な植物がもつユニークな ABA 生理作用の理解が進むのかもしれない。しかしながら、非モデル植物は依然として、遺伝子ノックアウトや遺伝子過剰発現株などの研究材料を容易に用いることはできない。非モデル植物の遺伝子機能を明らかにするために、モデル植物のシロイヌナズナやイネを利用する事はこれまでも行われてきたが、例えば ABA の作用を打ち消す分子ツールである ABA アンタゴニストや ABA 生合成阻害剤などを分子生物学的解析と併用することで (Dejonghe et al. 2018)、分子遺伝学でカバーしきれない部分を補い、新たな ABA の生理作用の発見や分子制御機構を明らかにすることができるだろう。

引用文献

- 浅見忠男, 柿本辰男 (2016) 新しい植物ホルモンの科学 第3版. ISBN 978-4-06-153452-0
- An JP, Yao JF, Xu RR, You CX, Wang XF, Hao YJ. (2018) Apple bZIP transcription factor MdbZIP44 regulates abscisic acid-promoted anthocyanin accumulation. *Plant Cell Environ* 41:2678-2692. doi: 10.1111/pce.13393
- Antoni R, Gonzalez-Guzman M, Rodriguez L, Peirats-Llobet M, Pizzio GA, Fernandez MA, De Winne N, De Jaeger G, Dietrich D, Bennett MJ, Rodriguez PL. (2013) PYRABACTIN RESISTANCE1-LIKE8 plays an important role for the regulation of abscisic acid signaling in root. *Plant Physiol* 161:931-941. doi: 10.1104/pp.112.208678
- Belda-Palazon B, Gonzalez-Garcia MP, Lozano-Juste J, Coego A, Antoni R, Julian J, Peirats-Llobet M, Rodriguez L, Berbel A, Dietrich D, Fernandez MA, Madueno F, Bennett MJ, Rodriguez PL. (2018) PYL8 mediates ABA perception in the root through non-cell-autonomous and ligand-stabilization-based mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 115:e11857-11863. doi: 10.1073/pnas.1815410115
- Benschop JJ, Jackson MB, Guhl K, Vreeburg RA, Croker SJ, Peeters AJ, Voesenek LA. (2005) Contrasting interactions between ethylene and abscisic acid in *Rumex* species differing in submergence tolerance. *Plant J* 44:756-768. doi: 10.1111/j.1365-3113.2005.02563.x.
- Chai YM, Jia HF, Li CL, Dong QH, Shen YY. (2011) FaPYR1 is involved in strawberry fruit ripening. *J Exp Bot* 62:5079-5089. doi: 10.1093/jxb/err207
- Dejonghe W, Okamoto M, Cutler SR. (2018) Small Molecule Probes of ABA Biosynthesis and Signaling. *Plant Cell Physiol* 59:1490-1499. doi: 10.1093/pcp/pcy126
- Foyer CH, Kerchev PI, Hancock RD. (2012) The ABA-INSENSITIVE-4 (ABI4) transcription

- factor links redox, hormone and sugar signaling pathways. *Plant Signal Behav* 7:276-281. doi: 10.4161/psb.18770
- Fujioka H, Samejima H, Suzuki H, Mizutani M, Okamoto M, Sugimoto Y. (2019) Aberrant protein phosphatase 2C leads to abscisic acid insensitivity and high transpiration in parasitic *Striga*. *Nat Plants* 5:258-262. doi: 10.1038/s41477-019-0362-7
- Hwang K, Susila H, Nasim Z, Jung JY, Ahn JH. (2019) Arabidopsis ABF3 and ABF4 Transcription Factors Act with the NF-YC Complex to Regulate SOC1 Expression and Mediate Drought-Accelerated Flowering. *Mol Plant* 12:489-505. doi: 10.1016/j.molp.2019.01.002
- Kende H, van der Knaap E, Cho HT. (1998) Deepwater rice: A model plant to study stem elongation. *Plant Physiol* 118:1105-1110. doi: 10.1104/pp.118.4.1105
- Koga H, Kojima M, Takebayashi Y, Sakakibara H, Tsukaya H. (2021) Identification of the unique molecular framework of heterophylly in the amphibious plant *Callitriche palustris* L. *Plant Cell* 33:3272-3292. doi: 10.1093/plcell/koab192
- Koyama K, Sadamatsu K, Goto-Yamamoto N. (2010) Abscisic acid stimulated ripening and gene expression in berry skins of the Cabernet Sauvignon grape. *Funct Integr Genomics* 10:367-381. doi: 10.1007/s10142-009-0145-8
- Koyama R, Roberto SR, de Souza RT, Borges WFS, Anderson M, Waterhouse AL, Cantu D, Fidelibus MW, Blanco-Ulate B. (2018) Exogenous Abscisic Acid Promotes Anthocyanin Biosynthesis and Increased Expression of Flavonoid Synthesis Genes in *Vitis vinifera* x *Vitis labrusca* Table Grapes in a Subtropical Region. *Front Plant Sci* 9:323. doi: 10.3389/fpls.2018.00323
- Kuhn N, Guan L, Dai ZW, Wu BH, Lauvergeat V, Gomes E, Li SH, Godoy F, Arce-Johnson P, Delrot S. (2014) Berry ripening: recently heard through the grapevine. *J Exp Bot* 65:4543-4559. doi: 10.1093/jxb/ert395
- Kurup S, Jones HD, Holdsworth MJ. (2000) Interactions of the developmental regulator ABI3 with proteins identified from developing Arabidopsis seeds. *Plant J* 21:143-155. doi: 10.1046/j.1365-3113x.2000.00663.x
- Kuwabara A, Ikegami K, Koshihara T, Nagata T. (2003) Effects of ethylene and abscisic acid upon heterophylly in *Ludwigia arcuata* (Onagraceae). *Planta* 217:880-887. doi: 10.1007/s00425-003-1062-z
- Marion-Poll A, Seo M (2019) *Abscisic Acid in Plants*. Academic Press. ISBN 0081026218
- Martignago D, Siemiatkowska B, Lombardi A, Conti L. (2020) Abscisic Acid and Flowering Regulation: Many Targets, Different Places. *Int J Mol Sci* 21. doi: 10.3390/ijms21249700
- McAdam SA, Brodribb TJ, Ross JJ. (2016) Shoot-derived abscisic acid promotes root growth. *Plant Cell Environ* 39:652-659. doi: 10.1111/pce.12669
- Miao R, Yuan W, Wang Y, Garcia-Maquilon I, Dang X, Li Y, Zhang J, Zhu Y, Rodriguez PL, Xu W. (2021) Low ABA concentration promotes root growth and hydrotropism through relief of

- ABA INSENSITIVE 1-mediated inhibition of plasma membrane H(+)-ATPase 2. *Sci Adv* e7. doi: 10.1126/sciadv.abd4113
- Peppi MC, Fidelibus MW, Dokoozlian N. (2006) Abscisic Acid Application Timing and Concentration Affect Firmness, Pigmentation, and Color of Flame Seedless' Grapes. *HortScience* 41:1440-1445. doi: 10.21273/HORTSCI.41.6.1440
- Riboni M, Robustelli Test A, Galbiati M, Tonelli C, Conti L. (2016) ABA-dependent control of GIGANTEA signalling enables drought escape via up-regulation of FLOWERING LOCUS T in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 67:6309-6322. doi: 10.1093/jxb/erw384
- Saab IN, Sharp RE, Pritchard J, Voetberg GS. (1990) Increased endogenous abscisic Acid maintains primary root growth and inhibits shoot growth of maize seedlings at low water potentials. *Plant Physiol* 93:1329-1336. doi: 10.1104/pp.93.4.1329
- Saika H, Okamoto M, Miyoshi K, Kushiro T, Shinoda S, Jikumaru Y, Fujimoto M, Arikawa T, Takahashi H, Ando M et al. (2007) Ethylene promotes submergence-induced expression of OsABA8ox1, a gene that encodes ABA 8'-hydroxylase in rice. *Plant Cell Physiol* 48:287-298. doi: 10.1093/pcp/pcm003
- Shu K, Chen Q, Wu Y, Liu R, Zhang H, Wang S, Tang S, Yang W, Xie Q. (2016) ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 4 negatively regulates flowering through directly promoting *Arabidopsis* FLOWERING LOCUS C transcription. *J Exp Bot* 67:195-205. doi: 10.1093/jxb/erv459
- Shu K, Luo X, Meng Y, Yang W. (2018) Toward a Molecular Understanding of Abscisic Acid Actions in Floral Transition. *Plant Cell Physiol* 59:215-221. doi: 10.1093/pcp/pcy007
- Spollen WG, LeNoble ME, Samuels TD, Bernstein N, Sharp RE. (2000) Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. *Plant Physiol* 122:967-976. doi: 10.1104/pp.122.3.967
- Voesenek L, Vriezen WH, Smekens M, Huitink F, Bogemann GM, Blom C. (1997) Ethylene Sensitivity and Response Sensor Expression in Petioles of *Rumex* Species at Low O₂ and High CO₂ Concentrations. *Plant Physiol* 114:1501-1509. doi: 10.1104/pp.114.4.1501
- Wang Y, Li L, Ye T, Lu Y, Chen X, Wu Y. (2013) The inhibitory effect of ABA on floral transition is mediated by ABI5 in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 64:675-684. doi: 10.1093/jxb/ers361
- Yoshida T, Fujita Y, Sayama H, Kidokoro S, Maruyama K, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2010) AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant J* 61:672-685. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.04092.x
- Zhang D-P (2014) *Abscisic acid: metabolism, transport and signaling*. Springer. ISBN 9401794243. ISBN: 9401794243
- Zhang X, Garreton V, Chua NH. (2005) The AIP2 E3 ligase acts as a novel negative regulator of ABA signaling by promoting ABI3 degradation. *Genes Dev* 19:1532-1543. doi:

10.1101/gad.1318705

- Zhao Y, Xing L, Wang X, Hou YJ, Gao J, Wang P, Duan CG, Zhu X, Zhu JK. (2014) The ABA receptor PYL8 promotes lateral root growth by enhancing MYB77-dependent transcription of auxin-responsive genes. *Sci Signal* 7:ra53. doi: 10.1126/scisignal.2005051
- Zoratti L, Karppinen K, Luengo Escobar A, Haggman H, Jaakola L. (2014) Light-controlled flavonoid biosynthesis in fruits. *Front Plant Sci* 5:534. doi: 10.3389/fpls.2014.00534

構造解析から明らかとなったジベレリン及びオーキシン不活性化酵素の共通した代謝メカニズム

竹原 清日

名古屋大学 生物機能開発利用研究センター
〒464-8601 名古屋市千種区不老町

Common Metabolic Mechanisms of Gibberellin and Auxin Inactivating Enzymes Revealed by Structural Analysis

Sayaka Takehara

Bioscience and Biotechnology Center, Nagoya University,
Furo, Chikusa, Nagoya, Aichi, 464-8601, Japan

Keywords: auxin, gibberellin, plant hormone

DOI: 10.24480/bsj-review.13b3.00226

1. はじめに

環境に応じて動くことができない植物にとって、“成長するのか、もしくはそれを止めるのか”という問題は非常に重要である。植物は成長に適した条件（光、温度、水、養分など）を必要とし、それがなければ成長を止める必要があるからだ。特に大気や土壌の栄養条件や病害や乾燥や光などのストレスに曝露された際、植物は生存のためにさまざまな戦略をとっている。なかでも、一連につながった生合成・代謝経路を制御することは重要で、これにより恒常性と生命の維持を行っている。実際、植物成長ホルモンであるジベレリン（GA）やオーキシン（IAA）量は、生合成および代謝酵素の協調的な転写調節による負のフィードバックまたは正のフィードフォワード機構により一定範囲内に維持されている（Thomas et al. 1999; Yamaguchi 2008）。しかし、タンパク質レベルにおける制御機構に関しては不明な点が多い。最近我々は、イネにおいて GA および IAA 代謝酵素が基質レベルに応じてタンパク質の立体変化を起こし、酵素活性を高めることによって植物ホルモンの恒常性を維持する共通のシステムが存在することを示した。このことは、モノーが提唱したアロステリック制御が植物ホルモンの代謝系に働いていること、さらにその分子メカニズムを新たに提示できたことを意味する。本稿では、これら GA に関する制御を中心に、植物ホルモンの代謝酵素の新たな活性調節機構について、筆者らの最新の知見を織り交ぜながら解説する。

2. ジベレリンとその受容

ジベレリン（GA）は種子発芽、器官の伸長、花芽形成、果実の発達など、植物の多様なプロセスを促進する植物ホルモンの一つである（Thomas et al. 1999）。*ent*-ジベレラン骨格を持つジテルペン化合物で、130 種類を超える化合物が同定されている非常に大きなグループを形

成し、図1に示すように、炭素数20の分子群 (C₂₀-GA) と、炭素を1つ失いラクトン環を1つ持つ分子群 (C₁₉-GA) の2種類が存在する。植物中で生理活性を示すのはC₁₉-GAグループに属し、3β位に水酸基を有するごく一部の形態 (GA₁, GA₃, GA₄, GA₇) に限られ (図1)

(Bömke and Tudzynski 2009; Hedden and Sponsel 2015), その他は前駆体や代謝物質として存在する。GAの研究は、1900年代初頭の日本において、イネの過剰成長や不稔などの病気がカビの感染によるものであったことに端

を發する。その後、この病気は馬鹿苗病と呼ばれる *Gibberella fujikuroi* (現在は *Fusarium fujikuroi* に分類) の分泌物によるものであることが明らかとなり、そこから活性成分である“ジベレリン”という名前が付けられた (Kurosawa 1926; Yabuta and Sumiki 1938; Takahashi et al. 1955; MacMillan and Suter 1958)。2005年にはGAに対して非感受性の矮性変異 (植物の丈が低くなる変異) を起こしたイネの原因遺伝子 *gibberellin insensitive dwarf1* (*GID1*) が単離され、この遺伝子の作るタンパク質 *GID1* がGA分子の受容体 (核内受容体) であることが明らかとなった (Ueguchi-Tanaka et al. 2005)。通常 *GID1* がGAを核内で受容すると、*GID1* とGAシグナル伝達の抑制因子である DELLA タンパク質との相互作用が高まり、ユビキチン/プロテアソーム経路を介して DELLA タンパク質が急速に分解されることにより DELLA が抑制していたGAの作用が顕在化するというものである (Griffiths et al. 2006; Ueguchi-Tanaka et al. 2007)。ついで2008年にX線結晶構造解析により *GID1* の立体構造が明らかになった (Shimada et al. 2008; Murase et al. 2008)。*GID1* 受容体の全体構造は、ホルモン感受性リパーゼ (HSLファミリータンパク質) (Ileperuma et al. 2007) とまったく同じ骨格の構造 (α/β 水解酵素型構造) をしていたが、GA結合部位はリパーゼの活性部位である Ser, His, AspのうちHisがValへと置換されることによってGAの認識に寄与していた。また、*GID1* によるGAの認識は、活性型GAの特徴であるC6位のカルボキシ基とC3位の水酸基との親水性のネットワークや、ジベレラン骨格などを認識する疎水性相互作用など数多くの結合による事も明らかとなった。

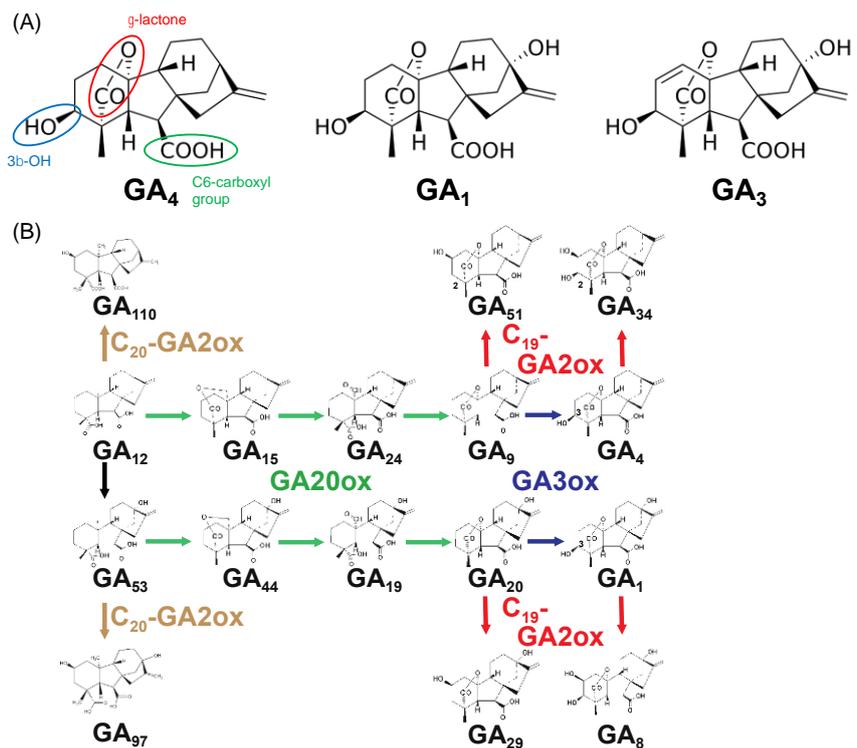


図1 GA生成及び代謝経路

(A) 活性型GAの構造。その特徴は、①6位炭素にカルボン酸がついていること、②3位炭素に水酸基がついていること、③γ-ラクトン環があること、④2位炭素に水酸基がついていないことなどが知られている。

(B) 植物におけるGA生成の最終段階及び代謝経路。

3. GA の生合成と代謝

3-1. GA 生合成酵素

栄養生長期の葉や茎における GA 内生量は、グラム新鮮重量あたり数 pmol 程度 (Hirano et al. 2008) とごく微量でありながら植物に多大な影響を与えていることから、植物体内での生合成は非常に厳密に調節されていると予想される。一般的には GA 生合成経路の後半段階で GA 20-oxidase (GA20ox) および GA 3-oxidase (GA3ox) が働き、これら全ての酵素は 2-オキソグルタル酸依存性酸化酵素 (2ODD) (Yamaguchi 2008; Mitchum et al. 2006; Sun 2008) に属する。GA20ox は GA₉ と GA₂₀ を生成し、その後、GA3ox が GA 生合成の最終段階を触媒してそれぞれ GA₄ および GA₁ に変換する。生合成の最終段階を担う GA3ox は小さなファミリーとして存在しており、シロイヌナズナには 4 つ、イネとオオムギには 2 つのメンバーがあるだけである。シロイヌナズナでは AtGA3ox1 と AtGA3ox2 の 2 つの酵素が、イネでは OsGA3ox2 の 1 つだけが器官の発達に主要な役割を果たしている。OsGA3ox2 遺伝子の機能欠損変異体である *dl8-AD* (*Akibare waisei*), *dl8-Idl8^h* (*housetsu waisei*), *dl8-dy* (*Waito-C*) は、活性型 GA である GA₁ レベルの低下により深刻な矮性の形質を示し、その発現も活性型 GA によってフィードバック制御されていることから、この酵素が触媒するステップは活性型 GA レベルを制御するための重要なステップであることを明確に示している (Itoh et al. 2001)。また、イネのもう一つの酵素 OsGA3ox1 は葯で特異的に発現し、最近花粉の発達に寄与していることが明らかとなった (Kawai et al. 2022)。興味深いことに、OsGA3ox1 は活性型 GA によるフィードバック制御を受けない (Itoh et al. 2001)。

3-2. GA 代謝酵素

GA のホメオスタシスは、植物の適切な成長と発達に不可欠であるため、GA の生合成と代謝の両方により厳密に制御されている。生合成の進化とともに、代謝に関しても活性型 GA のレベルを低下させるいくつかのメカニズムが進化してきた (Varbanova et al. 2007; Gao et al. 2016)。GA の代謝・不活性化過程として、2 位の水酸化や 6 位カルボキシル基に対するメチルエステル化、16, 17 位へのエポキシ化、13 位水酸化など多くの不活性化反応が報告されているが、このうち代表的な GA 代謝は 2-oxidase (GA2ox) と呼ばれる 2ODD が触媒するプロセスで、活性型 GA を 2β-ヒドロキシル化によって不活性化する (Sakamoto et al. 2004)。この酵素は、基質によって大きく 2 つのグループに分けられ、生理活性のある C19-GA とその直前の前駆体を不活性化に変換する C19-GA2ox (Thomas et al. 1999; Hedden and Thomas 2012) と、C20 型の前駆体 GA (GA₁₂ や GA₅₃ など) に作用する C20-GA2ox (Schomburg et al. 2003; Hedden and Thomas 2012) である。シロイヌナズナでは 5 つの C19-GA2ox (AtGA2ox1, AtGA2ox2, AtGA2ox3, AtGA2ox4, AtGA2ox6) と 2 つの C20-GA2ox (AtGA2ox7, AtGA2ox8) が確認されており (Rieu et al. 2008)、イネでは 7 つの C19-GA2ox 遺伝子 (OsGA2ox1, OsGA2ox2, OsGA2ox3, OsGA2ox4, OsGA2ox7, OsGA2ox8, OsGA2ox10) と 3 つの C20-GA2ox (OsGA2ox5, OsGA2ox6, OsGA2ox9) が同定されている (Lo et al. 2008)。C19-GA2ox は裸子植物と被子植物の分岐前に、C20-GA2ox は初期の被子植物に出現し (Yoshida et al. 2020)、GA2ox ファミリーは一気に拡大して組織・器官レベルでの遺伝子発現の特異性やストレスへの応答 (Colebrook et al. 2014)

が可能になった。C19およびC20-GA2oxのコピー数が被子植物で急速に増加していることは、このGA不活性化のネットワークシステムが被子植物の進化にとって重要であるということを示唆している。それと同時に、GA20oxやGA3oxなどのGA合成酵素のコピー数も急速に増加し、結果的に被子植物は活性GAのレベルを絶妙にコントロールする高度なシステムを手に入れたと考えられる。

GA2ox遺伝子の発現レベルは、環境変化や植物ホルモンに応じて変化する。イネでは低温の場合、GA2ox遺伝子の転写を活性化することでGAの不活性化を促進し、種子の発芽を抑制する (Wang et al. 2018)。シロイヌナズナのGA2ox7は、塩濃度が高い場合発現が上昇し、活性GAのレベルが低下する (Magome et al. 2008)。また、GA代謝酵素は外部からのGA₃処理によって有意に発現が上昇する一方、生合成酵素の発現はGAによって低下し、GA生合成阻害剤であるウニコナゾールによって上昇する事が知られており (Thomas et al. 1999)、植物はGAのレベルを負のフィードバックまたは正のフィードフォワード機構により厳密に制御し、様々な環境条件への適応をはかっている。しかし最近、我々のグループはイネのC19型のOsGA2ox3のX線結晶構造を決定し、タンパクレベルでもGAの恒常性を維持するためのアロステリックなフィードフォワード機構がある事を見出したので4項で紹介する。

3-3. GA受容生合成酵素と代謝酵素の構造と進化

GID1の構造解析結果から、真性シダ以降GID1受容体のGA選択性が進化の中で良く保存されていることがわかってきた (Ueguchi-Tanaka et al. 2010; Tanaka et al. 2014)。そのため、GA応答の多様性をシグナル伝達だけで説明することが難しいことも示していた。では、植物はどのようにしてGA応答の多様性を生み出してきたのだろうか。GA3oxはシダ植物の時代に、C19-GA2oxは裸子植物と被子植物の分岐前に、C20-GA2oxは被子植物の初期に、それぞれ異なるグループとして独立に誕生した (Takehara et al. 2020; Yoshida et al. 2020)。このことから、GID1-GA-DELLAシステムがシダの時代に確立された以降も、生合成と代謝系が競い合うように複雑・多様化したことが示唆される。最近、我々のグループはイネのGA生合成酵素OsGA3ox2ならびに代謝酵素OsGA2ox3について、初めてX線結晶構造解析に成功した (Takehara et al. 2020; Kawai et al. 2022)。全体構造は両酵素で似ていたが、OsGA3ox2は単量体であったのに対して、OsGA2ox3は4量体を形成していた (図2A)。また、活性中心の構造に着目すると、補基質である2-オキソグルタル酸と結合するアミノ酸は良く保存されていたが、興味深いことに、基質であるGA (GA3ox2の場合GA₉, GA2ox3の場合GA₄)は上下反対向きに結合しており、そ

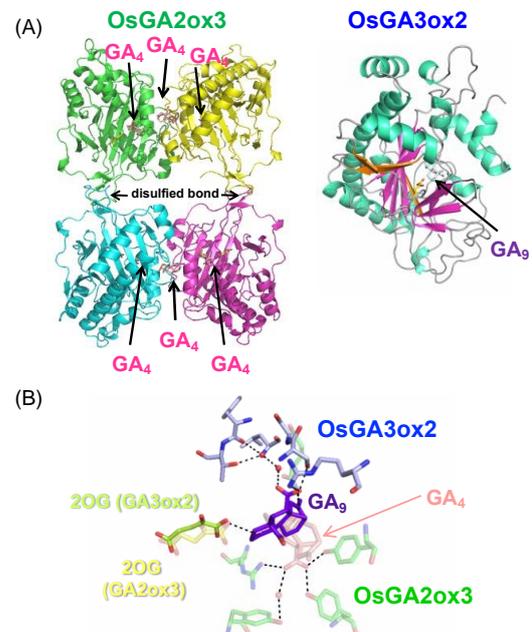


図2 GA生合成及び代謝酵素の構造比較
(A) OsGA2ox3とOsGA3ox2の全体構造。
(B) 活性中心の構造比較。

れぞれ全く異なるわずか数個のアミノ酸が結合している事が分かった (図 2B)。一方, *GID1* 受容体の GA 認識には, 受容体-リガンド結合ポケット周りの 20 個ほどの数多くのアミノ酸が関わっている (Shimada et al. 2008; Yoshida et al. 2018)。GA 応答の多様性に関してこれらのことを考え合わせると, *GID1* 受容体に比べ *GA3ox* や *GA2ox* の基質認識部位における変化によって対応するほうがはるかに易しいという, 今までの進化の知見に沿った結果であった。

4. 植物ホルモン代謝酵素による活性調節機構

最近筆者らは, まだ不明な点が多い植物ホルモン代謝酵素の翻訳後調節について, そのアロステリック制御と恒常性の観点から研究を行った。イネの GA 代謝酵素の中でも茎で主に発現する *OsGA2ox3* を用いて X 線結晶構造解析を行なった結果, 前述のように全体構造は 4 量体を形成しており, 基質である GA_4 がサブユニット分子界面で架橋することにより多量体を形成していることが明らかとなった (Takehara et al. 2020)。さらに, この基質を介した多量体化は基質濃度の増加とともに徐々に進行し, それに伴い酵素活性がシグモイド的に上昇した。この構造変化と活性の増大は, モノーらによって提案されたモデル (Monod et al. 1965) に示されているように, アロステリック制御イベントの典型的なものであった。

さらに, 代謝酵素の詳細な代謝メカニズムを検討するため, 分子動力学 (MD) シミュレーションによる蛋白質のダイナミクスを解析した。MD シミュレーションは, X 線結晶構造解析だけでは捉える事ができない動的過程を原子・分子の動きをコンピュータの中で再現することができる。最近では, 生体試料の構造を三次元でそのまま観察出来るクライオ電子顕微鏡などによっても, 溶液中で動いている生体分子を観察することが可能となってきている。今回の MD シミュレーションにより, *OsGA2ox3* には基質 GA_4 が活性部位とサブユニット界面を行き来するルートがあり, 活性中心を覆うフタのような β -シート (gate と表記) が大きな構造変化を起こすことを見出した。この gate は GA が活性中心にローディングするに従って開き, GA が完全に活性中心に入ると閉じる動きをする事も明らかとなった。さらに, この動的なシステムの本質に迫った結果, GA_4 が低濃度の場合, 酵素はモノマーまたはプロトマー (モノーが定義した用語) として存在し, 定常状態の活性を示している (Monod et al. 1965)。一方, 基質濃度が上昇すると, 酵素は基質 (エフェクター) の助けを借りて徐々に多量体を形成し, 活性ポケットの入り口付近に次の反応に必要な基質を待機させ, gate の開閉や安定化によって酵素活性が上昇することで GA の積極的な代謝が行われ

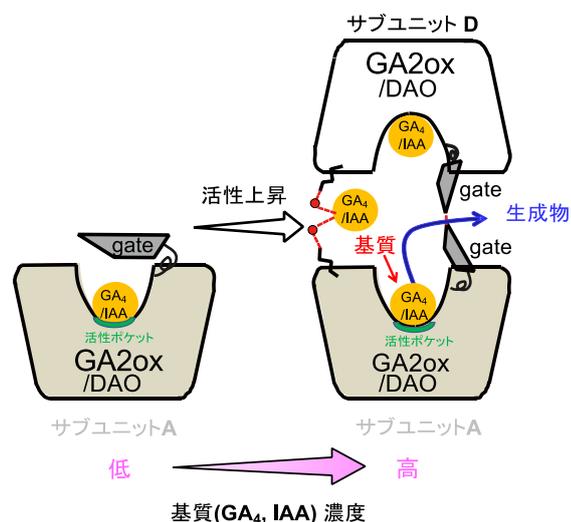


図3. 基質 GA_4 やIAAが多くなると多量体を作り代謝活性を上昇させる機構。多量体になると, 分子間にある GA_4 やIAAが次の反応のための基質として活性ポケットに転がり込むことが可能となり, 反応速度論的に反応性が上昇することが示された。その際, gateと名付けた活性中心を覆う蓋のような構造が開閉することで, 基質 (生成物) が出入りすることも示唆された。

(Takehara et al. 2020 *Nat Commun.* を改変)

るといふ、ホルモンの恒常性を維持するための巧妙なシステムが存在する事が示唆された(図 3)。また、このようなアロステリックな反応性の変化には、C19-GA2ox および C20-GA2ox すべてで保存されている Lys 残基 (OsGA2ox3 における K308) が必須であることも明らかとなり、実際、C20-GA2ox である OsGA2ox6 について調べても GA 依存的な多量体形成を示した。

さらに、同じ 2ODD グループであるオーキシン不活性化酵素 OsDAO に着目した。細胞内のオーキシンの濃度は GA と同様に生合成や代謝が協調して行われ、厳密に制御されている。この OsDAO は、OsGA2ox3 において活性上昇に寄与する K308 にあたるアミノ酸が同じ塩基性アミノ酸 Arg である事から、まず、GA 代謝酵素と同様の代謝メカニズムがあるのかどうかを調べるため X 線結晶構造解析を行った。その結果、OsDAO は基質である IAA がサブユニット分子界面で架橋することにより 2 量体を形成している事を見出した。驚くべき事に OsGA2ox3 と同様に基質レベルに基づいて単量体-多量体スイッチングが起こり、その立体構造変化が活性上昇を引き起こしたことから、これらの代謝酵素には植物ホルモンの恒常性を維持する共通のシステムが存在することが示唆された。また、この DAO について Zhang らは、AtDAO1 (シロイヌナズナの DAO の一つ) による IAA の不活性化は、IAA にアミノ酸を結合させて不活性化体に変換する酵素である GH3.6 よりも 10,000 倍以上低いことを報告している (Zhang and Peer 2017)。実際我々の結果は、高濃度の IAA の下において、OsDAO の二量体での活性が GH3.6 の 4 分の 1 程度であった。これは、DAO による IAA 不活性化システムの生物学的な意味合いについて、さらなる洞察を与えてくれた。つまり、GH3 遺伝子は、植物が被るさまざまな環境変化に対する緊急応答システムとして機能し、外因性の IAA や環境刺激に応答するために最も早く反応する (Zhang and Peer 2017; Mellor et al. 2016) 一方、DAO による不活性化システムは、主に内在的な生物学的イベントに関与している可能性があり、基質のレベルに応じて分子内のメカニズムによって活性を調節することができることを示唆している。したがって、DAO は非常にゆっくりとした速度で、IAA 量を調節しているように思われる。このような効果的な二重の不活性化システムは、連続的に変動する多様な環境条件にさらされる植物にとって、重要であると考えられる。興味深いことに、このような二重の不活性化システムは GA による制御においては観察されず、GA が制御する生物学的事象には迅速な不活性化が必須ではない可能性が示唆された。

5. おわりに

GA の生合成と代謝との関係や受容体は、発生や環境に応じて GA 濃度を調節するメカニズムを考察する上で大きな関連性がある。今回明らかとなった GA ならびにオーキシン代謝酵素によるタンパク質レベルでの巧みな恒常性を維持するシステムが、被子植物の発生過程において同じメカニズムで作られたことは、これらの成長ホルモンを効果的に制御することが植物の様々な環境条件への適応に重要であることを示唆している。その結果として、このエレガントなシステムは間違いなく植物の生存を助け、変動する厳しい環境に対してより良い適応能をもたらしたといえる。しかし、植物ホルモンレベルを制御する分子機構は、様々なフィードバック及びフィードフォワード機構を含む複雑な制御ネットワークによるため、未だ

不明な点も多い。今後、植物ホルモンの生合成、代謝、さらにはその局在化と移動などを合わせて理解する事で植物ホルモン制御の解明につながる事が期待される。

謝辞

本稿で紹介した研究成果は、名古屋大学の山口（田中）美弥子教授のご指導のもと、量子科学技術研究開発機構の桜庭俊研究員、京都大学生存圏研究所森林代謝機能化学研究分野の上上文三特任教授との共同研究により行ったものである。また、これらの研究は、新学術領域研究（16H06464, 16H06468）、科研費（16H0490）の支援を受けて実施した。

引用文献

- Bömke C, Tudzynski B. (2009) Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria. *Phytochemistry* 70: 1876-93. doi: 10.1016/j.phytochem.2009.05.020.
- Colebrook EH, Thomas SG, Phillips AL, Hedden P. (2014) The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *J Exp Biol* 217: 67-75. doi: 10.1242/jeb.089938.
- Gao S, Fang J, Xu F, Wang W, Chu C. (2016) Rice HOX12 regulates panicle exertion by directly modulating the expression of ELONGATED UPPERMOST INTERNODE1. *Plant Cell* 28: 680-695. doi: 10.1105/tpc.15.01021.
- Griffiths J, Murase K, Rieu I, Zentella R, Zhang ZL, Powers SJ, Gong F, Phillips AL, Hedden P, Sun TP et. al. (2006) Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. *Plant Cell* 18: 3399-414. doi: 10.1105/tpc.106.047415.
- Hedden P, Sponsel V. (2015) A Century of Gibberellin Research. *J Plant Growth Regul* 34: 740-60. doi: 10.1007/s00344-015-9546-1.
- Hedden P, Thomas SG. (2012) Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem J* 15: 11-25. doi: 10.1042/BJ20120245.
- Hirano K, Aya K, Hobo T, Sakakibara H, Kojima M, Shim RA, Hasegawa Y, Ueguchi-Tanaka M, Matsuoka M. (2008) Comprehensive transcriptome analysis of phytohormone biosynthesis and signaling genes in microspore/pollen and tapetum of rice. *Plant Cell Physiol* 49: 1429-50. doi: 10.1093/pcp/pcn123.
- Ileperuma NR, Marshall SD, Squire CJ, Baker HM, Oakeshott JG, Russell RJ, Plummer KM, Newcomb RD, Baker EN. (2007) High-resolution crystal structure of plant carboxylesterase AeCXE1, from *Actinidia eriantha*, and its complex with a high-affinity inhibitor paraoxon. *Biochemistry* 46: 1851-1859. doi: 10.1021/bi062046w.
- Itoh H, Ueguchi-Tanaka, M, Sentoku N, Kitano H, Matsuoka M, Kobayashi M. (2001) Cloning and functional analysis of two gibberellin 3 beta -hydroxylase genes that are differently expressed during the growth of rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8909-8914. doi: 10.1073/pnas.141239398.
- Kawai K, Takehara S, Kashio T, Morii M, Sugihara A, Yoshimura H, Ito A, Hattori M, Toda Y, Kojima M et al. (2022) Evolutionary alterations in gene expression and enzymatic activities of gibberellin 3-oxidase 1 in *Oryza*. *Commun Biol* 5: 67. doi:10.1038/s42003-022-03008-5.

- Kurosawa E. (1926) Experimental studies on the nature of the substance excreted by the ‘bakanae’ fungus. *Trans Nat Hist Soc Formos* 16: 213–227.
- Lo SF, Yang SY, Chen KT, Hsing YI, Zeevaart JA, Chen LJ, Yu SM. (2008) A novel class of gibberellin 2-oxidases control semidwarfism, tillering, and root development in rice. *Plant Cell* 20: 2603-18. doi: 10.1105/tpc.108.060913.
- MacMillan J, Suter PJ. (1958) The occurrence of gibberellin A₁ in higher plants—isolation from the seed of runner bean (*Phaseolus multiflorus*). *Naturwissenschaften* 45: 46.
- Magome H, Yamaguchi S, Hanada A, Kamiya Y, Oda K. (2008) The DDF1 transcriptional activator upregulates expression of a gibberellin-deactivating gene, GA2ox7, under high-salinity stress in Arabidopsis. *Plant J* 56: 613-26. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03627.x.
- Mellor N, Mellor N, Band LR, Pěňčík A, Novák O, Rashed A, Holman T, Wilson MH, Voß U, Bishopp A et al. (2016) Dynamic regulation of auxin oxidase and conjugating enzymes AtDAO1 and GH3 modulates auxin homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: 11022–11027. doi: 10.1073/pnas.1604458113.
- Mitchum MG, Yamaguchi S, Hanada A, Kuwahara A, Yoshioka Y, Kato T, Tabata S, Kamiya Y, Sun TP. (2006) Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in Arabidopsis development. *Plant J* 45: 804-18. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02642.x.
- Monod J, Wyman J, Changeux JP. (1965) On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J Mol Biol* 12: 88–118.
- Murase K, Hirano Y, Sun T-p, Hakoshima T. (2008) Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* 456: 459–463. doi: 10.1038/nature07519.
- Rieu I, Eriksson S, Powers SJ, Gong F, Griffiths J, Woolley L, Benlloch R, Nilsson O, Thomas SG, Hedden P et al. (2008) Genetic analysis reveals that C19-GA 2-oxidation is a major gibberellin inactivation pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* 20: 2420-36. doi: 10.1105/tpc.108.058818.
- Sakamoto T, Miura K, Itoh H, Tatsumi T, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Agrawal GK, Takeda S, Abe K et al. (2004) An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiol* 134: 1642-53. doi: 10.1104/pp.103.033696.
- Schomburg FM, Bizzell CM, Lee DJ, Zeevaart JA, Amasino RM. (2003) Overexpression of a novel class of gibberellin 2-oxidases decreases gibberellin levels and creates dwarf plants. *Plant Cell* 15: 151-63. doi: 10.1105/tpc.005975.
- Shimada A, Ueguchi-Tanaka M, Nakatsu T, Nakajima M, Naoe Y, Ohmiya H, Kato H, Matsuoka M. (2008) Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature* 456: 520-523. doi: 10.1038/nature07546.
- Sun TP. (2008) Gibberellin metabolism, perception and signaling pathways in Arabidopsis. *Arabidopsis Book* 6: e0103. doi: 10.1199/tab.0103.
- Takahashi N, Kitamura H, Kawarada A, Seta Y, Takai M, Tamura S, Sumiki Y. (1955) Biochemical studies on “Bakanae” fungus. Part XXXIV. Isolation of gibberellins and their properties. *Bull Agric Chem Soc Jpn* 19: 267–277.

- Takehara S, Sakuraba S, Mikami B, Yoshida H, Yoshimura H, Itoh A, Endo M, Watanabe N, Nagae T, Matsuoka M et al. (2020) A common allosteric mechanism regulates homeostatic inactivation of auxin and gibberellin. *Nat Commun* 11: 2143. doi: 10.1038/s41467-020-16068-0.
- Tanaka J, Yano K, Aya K, Hirano K, Takehara S, Koketsu E, Ordonio RL, Park SH, Nakajima M, Ueguchi-Tanaka M et al. (2014) Antheridiogen determines sex in ferns via a spatiotemporally split gibberellin synthesis pathway. *Science* 346: 469-73. doi: 10.1126/science.1259923.
- Thomas SG, Phillips AL, Hedden P. (1999) Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2- oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4698–4703. doi: 10.1073/pnas.96.8.4698.
- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M, Chow TY, Hsing YI, Kitano H, Yamaguchi I et al. (2005) GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 437: 693-698. doi: 10.1038/nature04028.
- Ueguchi-Tanaka M, Nakajima M, Katoh E, Ohmiya H, Asano K, Saji S, Hongyu X, Ashikari M, Kitano H, Yamaguchi I et al. (2007) Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, GID1, with a rice DELLA protein, SLR1, and gibberellin. *Plant Cell* 19: 2140-2155. doi: 10.1105/tpc.106.043729.
- Ueguchi-Tanaka M, Matsuoka M. (2010) The perception of gibberellins: clues from receptor structure. *Curr Opin Plant Biol* 13: 503-8. doi: 10.1016/j.pbi.2010.08.004.
- Varbanova M, Yamaguchi S, Yang Y, McKelvey K, Hanada A, Borochoy R, Yu F, Jikumaru Y, Ross J, Cortes D et al. (2007) Methylation of gibberellins by Arabidopsis GAMT1 and GAMT2. *Plant Cell* 19: 32-45. doi: 10.1105/tpc.106.044602.
- Wang Y, Cui Y, Hu G, Wang X, Chen H, Shi Q, Xiang J, Zhang Y, Zhu D, Zhang Y. (2018) Reduced bioactive gibberellin content in rice seeds under low temperature leads to decreased sugar consumption and low seed germination rates. *Physiol Biochem* 133: 1-10. doi: 10.1016/j.plaphy.2018.10.020.
- Yabuta T, Sumiki T. (1938) Communication to the editor. *J Agric Chem Soc Japan* 14: 1526.
- Yamaguchi S. (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol* 59: 225–251. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092804.
- Yamamoto Y, Hirai T, Yamamoto E, Kawamura M, Sato T, Kitano H, Matsuoka M, Ueguchi-Tanaka M. (2010) A rice *gid1* suppressor mutant reveals that gibberellin is not always required for interaction between its receptor, GID1, and DELLA proteins. *Plant Cell* 22: 3589-602. doi: 10.1105/tpc.110.074542.
- Yoshida H, Tanimoto E, Hirai T, Miyanoiri Y, Mitani R, Kawamura M, Takeda M, Takehara S, Hirano K, Kainosho M et al. (2018) Evolution and diversification of the plant gibberellin receptor GID1. *Proc Natl Acad Sci USA* 115: E7844-E7853. doi: 10.1073/pnas.1806040115.
- Yoshida H, Takehara S, Mori M, Ordonio RL, Matsuoka M. (2020) Evolution of GA Metabolic Enzymes in Land Plants. *Plant Cell Physiol* 61: 1919-1934. doi: 10.1093/pcp/pcaa126.
- Zhang J, Peer WA. (2017) Auxin homeostasis: the DAO of catabolism. *J Exp Bot* 68: 3145–3154. doi: 10.1093/jxb/erx221.

ジャスモン酸関連転写因子活性の化学制御の試み

高岡 洋輔¹, 上田 実^{1,2}

¹東北大学大学院理学研究科化学専攻

²東北大学大学院生命科学研究科

〒980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3

Challenges to chemical regulation of jasmonate-related transcription factors

Yousuke Takaoka¹, Minoru Ueda^{1,2}

¹Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tohoku University

²Department of Molecular and Chemical Life Sciences, Graduate School of Life Sciences, Tohoku University

6-3 Aramaki-Aza Aoba, Aoba-ku, Sendai, Miyagi, 980-8578, Japan

Keywords: Jasmonate, Plant hormone, Protein-protein interaction, Transcription factor

DOI: 10.24480/bsj-review.13b4.00227

1. はじめに

1-1. ジャスモン酸

植物が腐生菌による感染を受けたり害虫にかじられたりすると、植物ホルモンであるジャスモン酸 (JA) を合成し、様々な防御応答を引き起こす (Wasternack 2007; Wasternack and Hause 2013)。多くの植物ホルモンにも見られるように、この JA 応答には様々な転写因子が関与していることが知られている。ジャスモン酸は最終的に、イソロイシンと縮合されることで生成するジャスモン酸イソロイシン (JA-Ile) が活性本体として働き (Fonseca et al. 2009)、ユビキチンリガーゼの構成要素である F-box タンパク質 CORONATINE INSENSITIVE 1 (COI1) と、転写リプレッサータンパク質である JASMONATE-ZIM-domain (JAZ) との間のタンパク質間相互作用 (PPI) を誘起することで、JAZ のユビキチン化による 26S プロテアソーム系での分解を促す。JAZ は定常状態で様々な転写因子を抑制しており、JA-Ile 依存的な JAZ タンパク質の分解に応じて、これらの転写因子が同時に活性化され、その下流の遺伝子群の発現を促すとされる (図 1) (Wasternack and Kombrink 2010)。これにより上記の防御応答として、病原菌や害虫に対する忌避物質である毒性タンパク質の発現や、抗がん活性をもつ様々な二次代謝産物の生合成を一挙に引き起こす。その一方で、ジャスモン酸は生長抑制作用や老化を促すことも知られており、このジャスモン酸が引き起こす活性の「生長と防御のトレードオフ」の関係は、未だその制御メカニズムに不明な点が残されている。

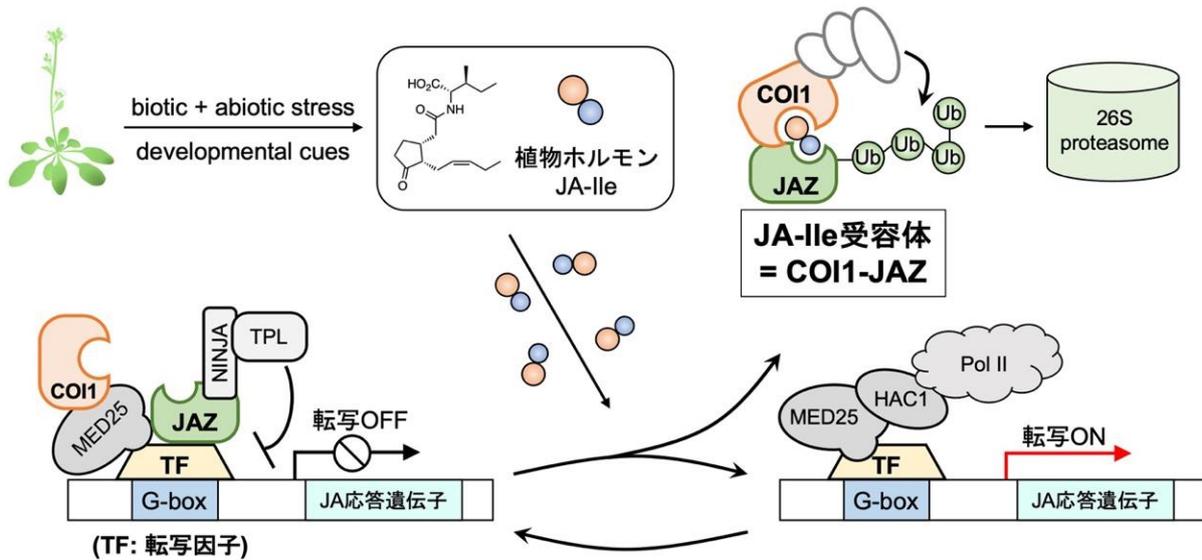


図1. ジャスモン酸シグナル伝達機構の全体図: JA-Ile が COI1-JAZ の PPI を誘起することで JAZ が分解され、JAZ により抑制されていた転写因子が JA 応答遺伝子の転写を促す。

1-2. ジャスモン酸関連転写因子の化学制御

この JA シグナル伝達経路を構成するタンパク質として、モデル植物シロイヌナズにおいて COI1 は 1 種類だが、JAZ リプレッサーには 13 種類のサブタイプが、JAZ と直接相互作用する転写因子にはさらに多くの種類の遺伝子群がコードされている (図2) (Chini et al. 2016)。さらにこれらの転写調節因子 (JAZ リプレッサー及び転写因子) は、遺伝的重複性が高いだけでなく、各々がクロストークしたりすることで解析が困難となっている。このような場合、特定のタンパク質に対する選択的なケミカルツールが有効であると考えられる。例えば我々は最近、13 種の COI1-JAZ 共受容体のうち 2 種類のサブタイプ JAZ9 及び 10 に選択的に結合する小分子リガンドを開発した (Takaoka et al. 2018)。この分子は、生長抑制作用は弱い一方で、病原菌耐性応答を選択的に誘導することが明らかとなった。またこれをケミカルツールとして用いることで、この応答に JAZ9 が関与していることなどが示された。JAZ サブタイプは遺伝的重複性が高く、*jaz9* ノックアウト株ではこのような表現型を示さないが、ケミカルツールであれば複数あるジャスモン酸応答のうち、選択的な応答を引き起こせることを示している。

我々はこのような背景のもと、JA 応答に関わる転写因子の活性化メカニズムの解析 (2 章)、並びに化学的に JA 関連転写因子を制御する方法論の開発 (3 章) に着手した。以下に詳細を述べる。

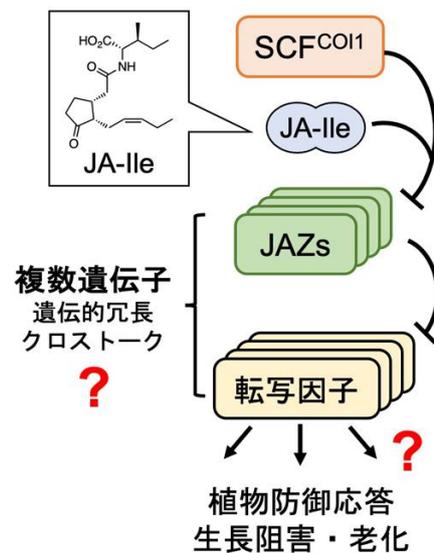


図2. ジャスモン酸シグナルにおける JAZ と転写因子の複雑性: シロイヌナズナでは 1 種類の SCF^{COI1} に対し、13 種類 JAZ と複数の転写因子が複雑にシグナルを制御する。

2. ジャスモン酸関連転写因子の活性化機構の解析

2-1. JA 主要転写因子 MYC の抑制と活性化

再びジャスモン酸シグナル伝達の全体図に話を戻す。近年、複数のグループからジャスモン酸シグナルに関連するタンパク質の構造解析が相次いで報告されている。まず JAZ の C 末端領域に存在する保存度の高い Jas motif が COI1 結合サイトとして同定され、この Jas motif を用いて COI1-JA-Ile との三者複合体の構造解析が達成された (Sheard et al. 2010)。この時、Jas motif の N 末端側はランダムループ構造を形成して JA-Ile と直接相互作用し、C 末端側は α -ヘリックス構造を形成することが明らかとなった (図 3a)。一方 2015 年に発表された JAZ と MYC との結晶構造解析から、JAZ は同じ Jas motif を用いて MYC と結合するが、その構造は劇的に変化し、Jas motif 全体が α -ヘリックス構造を形成していた (図 3b) (Zhang et al. 2015)。つまり、定常状態では α -ヘリックス構造によって MYC と結合しその活性を抑制する JAZ が、ジャスモン酸の生合成によって JA-Ile が産生されると、その結合ドメインの N 末端側の構造をランダムループ構造に変化させて、COI1-JA-Ile と結合するという興味深い構造スイッチが起こることが示された。

一方、JA 応答が活性化されると、JAZ10 の Jas motif が一部もしくは完全に欠損したスプライズバリエント JAZ10.3, JAZ10.4 が発現するという興味深い現象が報告された。詳細に解析された結果、JAZ10 には C 末端付近の Jas motif の他に、N 末端領域に MYC と強力に結合するドメイン: Cryptic MYC-interacting domain (CMID) が存在し、これが転写因子を抑制する機能があることが明らかとなった (Chung and Howe 2009; Moreno et al. 2013; Zhang et al. 2017)。すなわち、スプライズバリエント JAZ10.4 は、Jas motif を持たないことで JA-Ile 存在下でも COI1 と結合することができず、ユビキチン化とそれに続くタンパク質分解を受けることがないが、MYC を抑制する機能のみを有することになり、これがシグナル活性化状態の後期で発現してくることで、ジャスモン酸応答を沈静化するとされている。

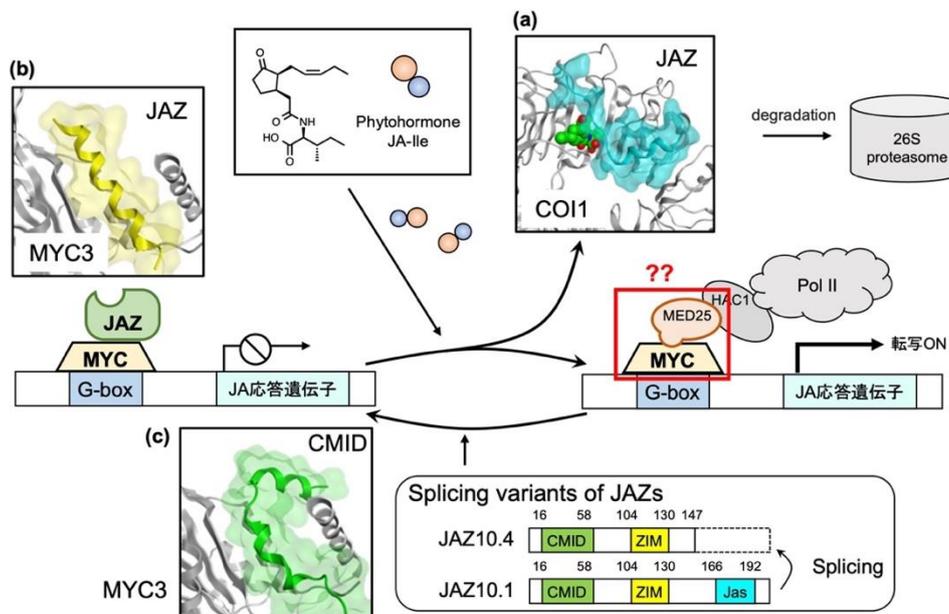


図 3. JA シグナル伝達における各タンパク質の構造解析結果 (a: JA-Ile 共受容体 COI1-JAZ1^{Jas} (PDB ID: 3OGL), b: 転写因子 MYC3 と JAZ9^{Jas} (PDB-ID: 4RS9), c: 転写因子 MYC3 と JAZ10^{CMID} (PDB ID: 5T0F))

2-2. MYC と MED25 間のタンパク質間相互作用解析

JA 応答のうち、定常状態における転写因子 MYC-JAZ 間のタンパク質間相互作用 (PPI), JA-Ile 産生によって誘導される COI1-JA-Ile-JAZ 三者複合体構造, 及び JA 応答の再抑制化に関わる MYC-CMID 間 PPI については構造が解かれたが, JA 応答の活性化状態については構造的知見に乏しかった。具体的には, JA-Ile 存在下で JAZ が分解されることによって, MYC の空いた結合サイト (JID ドメインと TAD ドメイン) に転写メディエーターである MED25 が結合し, これに続いてヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAC I), RNA 合成酵素 (Poll II) などがリクルートされ, 転写開始前複合体 (transcriptional pre-initiation complex, PIC) と呼ばれる複合体が形成されることで, MYC 下流遺伝子の発現が引き起こされる (An et al. 2017; Cevik et al. 2012; Zhang et al. 2015)。ここで, MYC と MED25 との結合には MED25 の C 末端側にある ACID 領域 (activator interaction domain, 551-680 番目のアミノ酸) と呼ばれる比較的大きなドメインが結合サイトとして同定されていたものの, 詳細は不明であった。そこで我々は, MYC と MED25 との相互作用様式について考察を加えるため, それぞれのアラニン変異体を調整してこの PPI を詳細に解析した。それぞれのタンパク質は, 様々なタンパク質の効率的調整法として有用な, 愛媛大澤崎らが確立したコムギ胚芽由来無細胞翻訳系を用いた (Sawasaki et al. 2002)。構造的知見の豊富な JA 主要転写因子 MYC3 に FLAG タグを導入した FLAG-MYC3 と, GST タグ及びビオチン修飾サイトを導入した MED25 (GST-BIs-MED25) について発現を行ない, PPI を高感度かつハイスループットに検出可能な AlphaScreen を利用して MYC3-MED25 間の相互作用を評価した結果, MYC3-MED25 間の相互作用に重要な複数のアミノ酸を同定できた。またこの相互作用は, MYC3-JAZ 間の相互作用よりも, MYC3-CMID 間に見られる相互作用様式に近いことが示唆されたことから, MYC3 に対する MED25 の結合ドメインを CMID-like MYC-interacting domain (CMIDM) と名付けた (Takaoka et al. 2022)。これにより, MYC3 に対する JAZ 及び MED25 の結合サイトが同定されたので, それぞれに対し蛍光色素を修飾したペプチド群 (JAZ9^{Jas}, JAZ10^{CMID}, 及び MED25^{CMIDM}) を別途用意し, それぞれの結合親和性を蛍光異方性によって定量的に解析した。その結果, 親和性の序列は

MYC3-JAZ9^{Jas}, MYC3-MED25^{CMIDM}, MYC3-JAZ10^{CMID}の順で強くなることが示された (図 4)。この結果は, シグナル伝達が進むにつれて機能するタンパク質の序列に沿って結合が強くなっていることを意味し, このシグナル伝達経路が効率的に進行することを再認識させる結果であった。

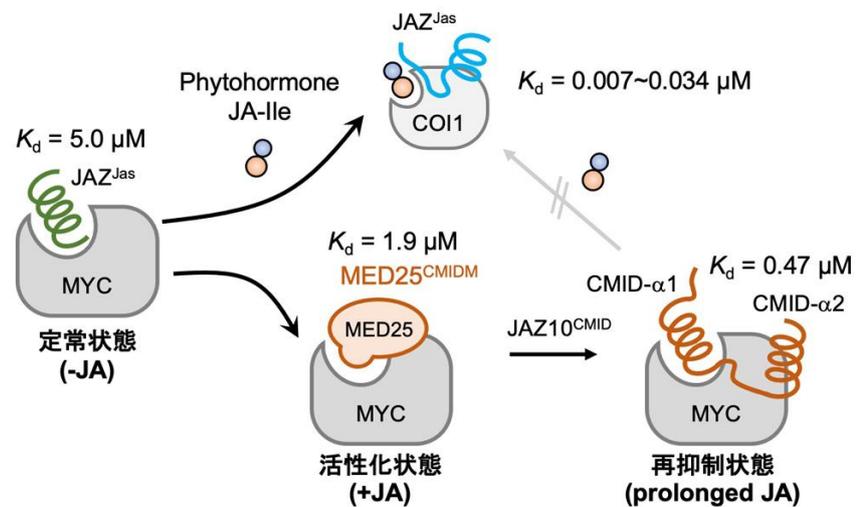


図 4. MYC3 と JAZ9^{Jas}, MED25^{CMIDM}, JAZ10^{CMID} および COI1 と JAZ9^{Jas} 間の結合定数の比較。

3. ジャスモン酸関連転写因子に対するペプチド型阻害剤の開発

我々はジャスモン酸関連転写因子に対するケミカルツールを開発すべく、主要転写因子 MYC3 と JAZ9^{Jas} との相互作用に着目した。前述の通り、JAZ の Jas motif は MYC3 と結合する際は全体が α -ヘリックス構造を形成するが、COI1 と結合する時には一部をランダムループ構造に変形する。すなわち、Jas motif を基に、MYC3 との結合フォームに構造を規定すれば、シグナル伝達の上流である COI1 には結合せず、さまざまな応答を制御する転写因子に対する選択的なケミカルツールが創出できると期待される。さらには、Jas motif は MED25 との結合を阻害することで MYC の転写活性を抑制しているため、このケミカルツールは MYC に対する転写阻害剤になる可能性が高い。このような発想のもと、 α -ヘリックス構造に規定するペプチドのステーブル化技術を用いて、MYC 阻害剤の開発に着手した。

3-1. 分子設計と合成

G. Verdine らが 2000 年ごろに開発したペプチドのステーブル化技術は、タンパク質間相互作用を制御するペプチド型阻害剤として、臨床応用が期待される薬剤開発技術の一つである (Schafmeister et al. 2000)。具体的には、剛直な炭化水素の末端に二重結合を配した非天然アミノ酸を、 α -ヘリックスの螺旋上の同じ向きに配置するように導入したペプチドを固相合成により調整し、Grubbs らが開発したルテニウム触媒を用いて、二重結合同士を連結するオレフィンメタセシス反応でこの非天然アミノ酸を連結することで、ペプチドが共有結合で α -ヘリックス構造にステーブル (ホチキス留め) される。このステーブル部分は立体障害になりうるため、MYC3-JAZ9^{Jas} 間の相互作用を邪魔しないように、結合面とは反対の位置に向くように末端オレフィン型の非天然アミノ酸を導入したペプチドを、Fmoc 固相合成によって調整した (図 5a)。JAZ9^{Jas} は計 4 箇所 of 螺旋構造を有するため、最大 2 箇所をステーブルすることができる。そこで、COI1 との結合時にランダムループ構造に変形する N 端側 (St1)、常に α -ヘリックス構造を形成する C 端側 (St2)、及び両方を同時にステーブル化するペプチド (St3) をそれぞれ用意し、ステーブル化しない野生型ペプチド (Wt) とともに、MYC3 との結合評価に用いた (図 5b)。なお、これらが溶液中で α -ヘリックス構造を形成しているかを CD スペクトルで確認した結果、予想通りステーブル化の頻度に応じて α -ヘリックス含量が向上した。一方、全くステーブル化しない野生型ペプチドはほぼ完全なランダムループ構造であることから、Jas motif は天然変性領域であり、結合相手に応じて二次構造を巧みに変形させることが強く示唆された (Suzuki et al. 2021)。

3-2. 試験管内での転写因子への阻害能と選択性

合成したステーブルペプチドについて、結晶構造が取られている MYC3 との結合親和性を蛍光異方性によって確認したところ、野生型ペプチド (Wt) の結合が約 5 μ M の K_d 値であるのに対し、1 箇所ステーブル化した St1 および St2 は約 10 倍、2 箇所ステーブル化した St3 ペプチドは約 50 倍と親和性が向上し、 K_d 値にして約 100 nM であることが明らかとなった (図 5c)。また、MYC3 のアイソフォームである MYC2,4 に対してもその傾向が見られ、これらのタンパク質に対しても JAZ の Jas motif は α -ヘリックス構造で結合していることが強く示唆

された。一方、同様に蛍光異方性を用いて COI1-JA-Ile に対する結合を確認したところ、N 端側をステーブル化した二種類のペプチドは全く結合しないことが明らかとなった。つまり設計通り、MYC との結合フォームに構造を規定することで、シグナル伝達上流の COI1 には結合せず、下流の MYC 選択的に結合するケミカルツールとなることが期待された。

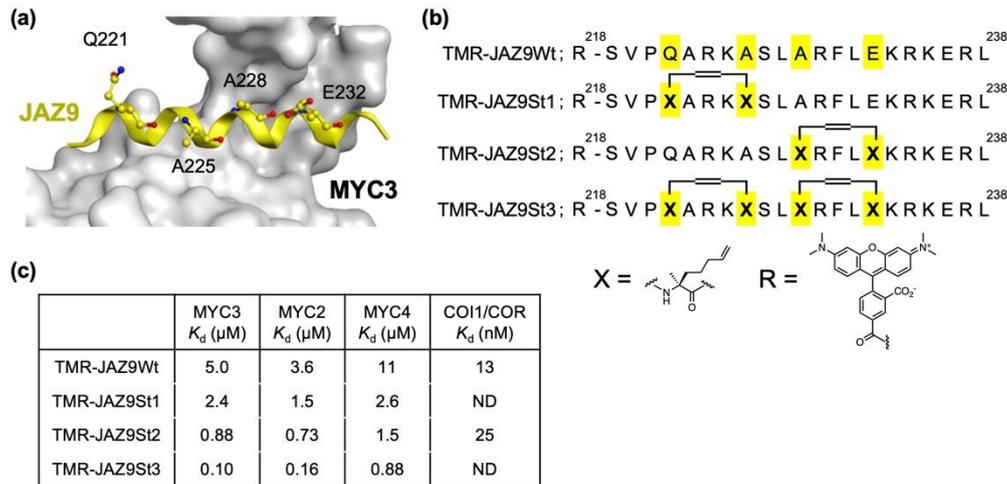


図 5. (a) MYC3-JAZ9 の結晶構造 (PDB ID: 4RS9) と、(b) 合成したステーブルペプチド。(c) 各種ペプチドとタンパク質との結合親和性 (ND: シグナル変化が小さく解析不可)。

3-3. 植物個体内での阻害能評価

COI1 には結合せず、JA 主要転写因子である MYC ファミリーに選択的に結合するステーブルペプチドが開発できたので、次に植物個体内での機能評価を行なった。ダブルステーブル化した St3 ペプチドは、MYC が活性化される際に形成される MYC-MED25 との相互作用をも阻害することで、MYC の下流で起こる遺伝子発現を抑制することが期待される。そこで、シロイヌナズナ幼植物に対してジャスモン酸前駆体であるメチルジャスモン酸 (MeJA) を投与して起こる MYC 下流のジャスモン酸応答マーカ遺伝子の転写活性化を、本ステーブルペプチドが抑制するかどうかを、リアルタイム PCR で解析を行なった。具体的には MYC2 それ自体やジャスモン酸生合成遺伝子の一つである AOS, 虫害耐性遺伝子 VSP2 などが MeJA 添加によって活性化されるのに対し、St3 ペプチドを MeJA と同時投与したところ、その転写活性化が有意に抑制された (図 6b)。すなわち、本ステーブルペプチドは植物個体内に浸透し、MYC の転写活性化を阻害できることが示された (Suzuki et al. 2021)。本成果は、ステーブルペプチドが植物個体内で機能することを実証した初の例であり、今後様々な機能性ペプチドの植物科学での展開が期待される。

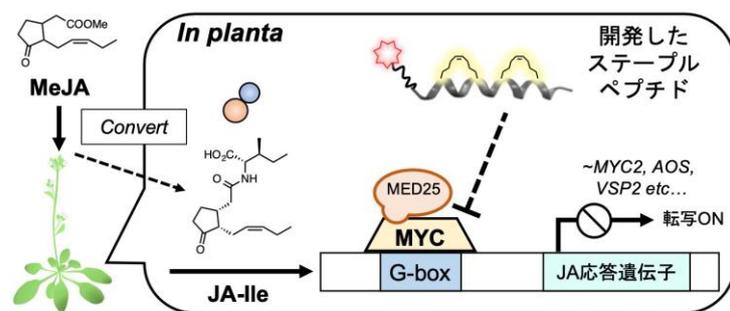


図 6. ステーブルペプチドの植物への投与のイメージ図。

4. おわりに

植物防御応答に関連するジャスモン酸シグナル伝達の最新の知見と、それに基づいて設計・開発したステーブルペプチドによるジャスモン酸シグナルの転写制御の試みについて述べた。ジャスモン酸に限らず、植物ホルモンの多くは、低濃度でも植物全体の転写ネットワークを巧みに調節することで、植物のライフサイクルにおける重要な多くのイベントを制御する。その過程では、多種類の転写因子が複雑にタンパク質間相互作用を引き起こすことが明らかになりつつあり、そのタンパク質間相互作用を制御するペプチド型ケミカルツールは今後ますます注目を集めるものと期待される。今後我々も、これらに関連する転写因子の中で選択的に狙った遺伝子のみを時空間的に制御する方法論の開発を目指して、検討を続ける。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、愛媛大学 澤崎達也教授、野澤彰准教授、高橋宏隆准教授に、タンパク質無細胞翻訳系や AlphaScreen 解析技術などについて有益なご助言を多数いただいた。また本稿で紹介した研究は、日本学術振興会・科学研究費補助金 (17H06407, 18KK0162, 20H00402, 19H05283, 21H00270) および武田ライフサイエンス研究助成による支援を受けて行なったものである。この場を借りて感謝申し上げる。

引用文献

- An C, Li L, Zhai Q, You Y, Deng L, Wu F, Chen R, Jiang H, Wang H, Chen Q, Li C (2017) Mediator subunit MED25 links the jasmonate receptor to transcriptionally active chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E8930-E8939. doi :10.1073/pnas.1710885114.
- Cevik V, Kidd BN, Zhang P, Hill C, Kiddle S, Denby KJ, Holub EB, Cahill DM, Manners JM, Schenk PM, Beynon J, Kazan K (2012) MEDIATOR25 acts as an integrative hub for the regulation of jasmonate-responsive gene expression in Arabidopsis. *Plant Physiol* 160:541-555. doi :10.1104/pp.112.202697.
- Chini A, Gimenez-Ibanez S, Goossens A, Solano R (2016) Redundancy and specificity in jasmonate signalling. *Curr Opin Plant Biol* 33:147-156. doi :10.1016/j.pbi.2016.07.005
- Chung HS, Howe GA (2009) A critical role for the TIFY motif in repression of jasmonate signaling by a stabilized splice variant of the JASMONATE ZIM-domain protein JAZ10 in Arabidopsis. *Plant Cell* 21:131-145. doi :10.1105/tpc.108.064097
- Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C, Solano R (2009) (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat Chem Biol* 5:344-350. doi : 10.1038/nchembio.161
- Moreno JE, Shyu C, Campos ML, Patel LC, Chung HS, Yao J, He SY, Howe GA (2013) Negative feedback control of jasmonate signaling by an alternative splice variant of JAZ10. *Plant Physiol* 162:1006-1017. doi :10.1104/pp.113.218164
- Sawasaki T, Hasegawa Y, Tsuchimochi M, Kamura N, Ogasawara T, Kuroita T, Endo Y (2002) A bilayer cell-free protein synthesis system for high-throughput screening of gene products. *FEBS Letters* 514:102-105. doi :10.1016/s0014-5793(02)02329-3.

- Schafmeister CE, Po J, Verdine GL (2000) An All-Hydrocarbon Cross-Linking System for Enhancing the Helicity and Metabolic Stability of Peptides. *J Am Chem Soc* 122:5891-5892. doi :10.1021/ja000563a
- Sheard LB, Tan X, Mao H, Withers J, Ben-Nissan G, Hinds TR, Kobayashi Y, Hsu FF, Sharon M, Browse J, He SY, Rizo J, Howe GA, Zheng N (2010) Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* 468:400-405. doi :10.1038/nature09430
- Suzuki K, Takaoka Y, Ueda M (2021) Rational design of a stapled JAZ9 peptide inhibiting protein-protein interaction of a plant transcription factor. *RSC Chemical Biology* 2:499-502. doi : 10.1039/d0cb00204f
- Takaoka Y, Iwahashi M, Chini A, Saito H, Ishimaru Y, Egoshi S, Kato N, Tanaka M, Bashir K, Seki M, Solano R, Ueda M (2018) A rationally designed JAZ subtype-selective agonist of jasmonate perception. *Nat Commun* 9:3654. doi :10.1038/s41467-018-06135-y
- Takaoka Y, Suzuki K, Nozawa A, Takahashi H, Sawasaki T, Ueda M (2022) Protein-protein interactions between jasmonate-related master regulator MYC and transcriptional mediator MED25 depend on a short binding domain. *Journal of Biological Chemistry* 298:101504. doi :10.1016/j.jbc.2021.101504
- Wasternack C (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot* 100:681-697. doi :10.1093/aob/mct079
- Wasternack C, Hause B (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann Bot* 111:1021-1058. doi :10.1093/aob/mct067
- Wasternack C, Kombrink E (2010) Jasmonates- Structural Requirements for Lipid-Derived Signals Active in Plant Stress Responses and Development. *ACS Chem Biol* 5:63-77. doi :10.1021/cb900269u
- Zhang F, Ke J, Zhang L, Chen R, Sugimoto K, Howe GA, Xu HE, Zhou M, He SY, Melcher K (2017) Structural insights into alternative splicing-mediated desensitization of jasmonate signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:1720-1725. doi :10.1073/pnas.1616938114
- Zhang F, Yao J, Ke J, Zhang L, Lam VQ, Xin XF, Zhou XE, Chen J, Brunzelle J, Griffin PR, Zhou M, Xu HE, Melcher K, He SY (2015) Structural basis of JAZ repression of MYC transcription factors in jasmonate signalling. *Nature* 525:269-273. doi :10.1038/nature14661

多様な骨格を持つストリゴラク톤の生合成経路

米山香織

愛媛大学農学研究科
〒790-8566 愛媛県松山市樽味 3-5-7

Biosynthetic pathway of structurally diverse strigolactones

Kaori Yoneyama

Graduate School of Agriculture, Ehime University,
3-5-7 Tarumi, Matsuyama, Ehime, 790-8566, Japan

Keywords: plant hormone, root parasitic plant, strigolactone

DOI: 10.24480/bsj-review.13b5.00228

1. はじめに

ストリゴラク톤は、1966年、アメリカのUSDAのグループによって、根寄生雑草 *Striga* の発芽を誘導する発芽刺激物質としてワタの根浸出液から単離構造決定された (Cook et al. 1966)。植物が寄生されるリスクを冒してまで発芽刺激物質ストリゴラク톤を分泌する理由は長い間不明であったが、2005年に大阪府立大学の秋山らは、ミヤコグサの根浸出液から、絶対共生菌であるアーバスキュラー菌根 (AM) 菌の菌糸分岐誘導物質としてストリゴラク톤を単離し (Akiyama et al. 2005)、ストリゴラク톤の根圏シグナルとしての重要性が明らかとなった。AM 菌は、宿主植物の根の近傍でのみ菌糸を激しく分岐させ、共生の準備を整える。すなわち植物は、菌糸分岐誘導物質であるストリゴラク톤を、AM 菌の宿主認識シグナルとして分泌していると考えられるようになった。一方、同じ年にオランダのグループは、ストリゴラク톤と ABA の構造類似性から、ストリゴラク톤は ABA と同様にプラスチドのカロテノイドから生合成されるという仮説を建て、カロテノイド生合成阻害剤やカロテノイド生合成変異体を用いた実験から、仮説の正当性を示した (Matusova et al. 2005)。また、ホワイトルーピンやシロイヌナズナなどのような AM 共生しない植物も、ストリゴラク톤を生産していることが明らかとなり、ストリゴラク톤の新しい機能の存在が示唆された (Goldwasser et al. 2008; Yoneyama et al. 2008)。そして 2008 年、過剰な地上部枝分かれの表現型が見られる変異体を用いた実験により、ストリゴラク톤は植物の地上部枝分かれを抑制する新奇植物ホルモンであることが 2つのグループから同時に報告された (Gomez-Roldan et al. 2008; Umehara et al. 2008)。その後、ストリゴラク톤欠損変異体と合成ストリゴラク톤 (GR24) を利用した実験により、地上部だけでなく地下部の形態形成制御に、AM 菌だけでなく根粒菌共生に、ストリゴラク톤が関与していることが次々に報告された (図 1)。

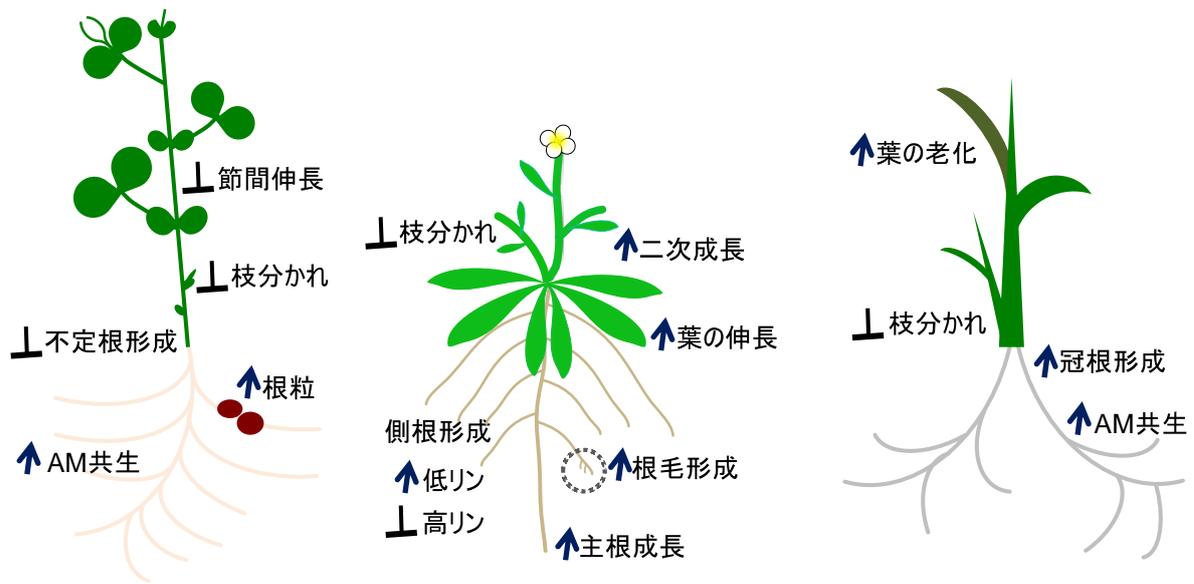


図1 植物成長におけるストリゴラクトンの機能

青の矢印は促進、黒のバーは抑制を示している。エンドウ、シロイヌナズナ、イネのストリゴラクトン生合成・受容シグナル伝達欠損変異体の表現型や、合成ストリゴラクトンを与えることによる表現型の回復を詳細に調べることにより、これらの機能は明らかにされてきた (Yoneyama, 2019)。

2. ストリゴラクトンの基本骨格

ストリゴラクトンは、現在、その構造の違いから、典型的ストリゴラクトンと非典型的ストリゴラクトンとに大別されている (図2)。すなわち、根寄生雑草 *Striga* の発芽刺激物質として単離構造決定された strigol の様に、6あるいは7員環 (A環) と5員環 (B環)、ラクトン (C環) から構成される3環性ラクトンとメチルフラノン (D環) がエノールエーテル結合した構造を持つものが、典型的ストリゴラクトンと呼ばれ、一方、完全な3環性ラクトンを持たず、D環とエノールエーテル結合した構造だけを持つものは、非典型的ストリゴラクトンと呼ばれている。典型的ストリゴラクトンのC環の立体配置が、 α 配位 (orobanchol-type) か、 β 配位 (strigol-type)であるかによっても生合成経路は微妙に異なっている (図3)。

これまでにストリゴラクトンは、主に根寄生雑草の発芽刺激物質の活性を指標として、30種類以上が単離・構造決定されている。また、少なくとも10種類以上の構造未知のストリゴラクトンの存在が示唆されている。そして興味深いことに、1つの植物は少なくとも3つ以上のストリゴラクトンの混合物を分泌しているが、その理由は不明である (Yoneyama and Brewer, 2021)。

Orobanchol は、日本にも帰化している根寄生植物 *Orobanche minor* の発芽刺激物質として、アカクローバーの根浸出液から単離構造決定された (Yokota et al. 1998)。その後、ダイズ、エンドウのようなマメ科植物、マリーゴールド、レタスのようなキク科植物、ナス科のトマト、単子葉類のイネなどの根浸出液からも同定された (Yoneyama et al. 2008; Umehara et al. 2008;

Yoneyama et al. 2011)。Orobanchol 同様、ソルガムの根浸出液から単離構造決定された sorgomol (Xie et al. 2008)も、マメ科のレンゲ、キク科のコスモスから同定され、様々な植物種に広く分布している (Yoneyama et al. 2008; Yoneyama et al. 2011)。一方、タバコの根浸出液から単離構造決定された solanacol (Xie et al. 2007) は、トマトやベンサミアーナタバコとナス科のみでしか確認されておらず、エンドウの根浸出液から単離構造決定された fabacyl acetate (Xie et al. 2009)は、ソラマメのみと、特定のマメ科でのみしか確認されていない (Trabelsi et al. 2017)。Zealactone は、トウモロコシの根浸出液から単離構造決定された、ABC 環を持たない非典型的ストリゴラクトンであるが、イネ、ソルガム、ミレットなどの他のイネ科植物からは検出されていない (Xie et al. 2017)。

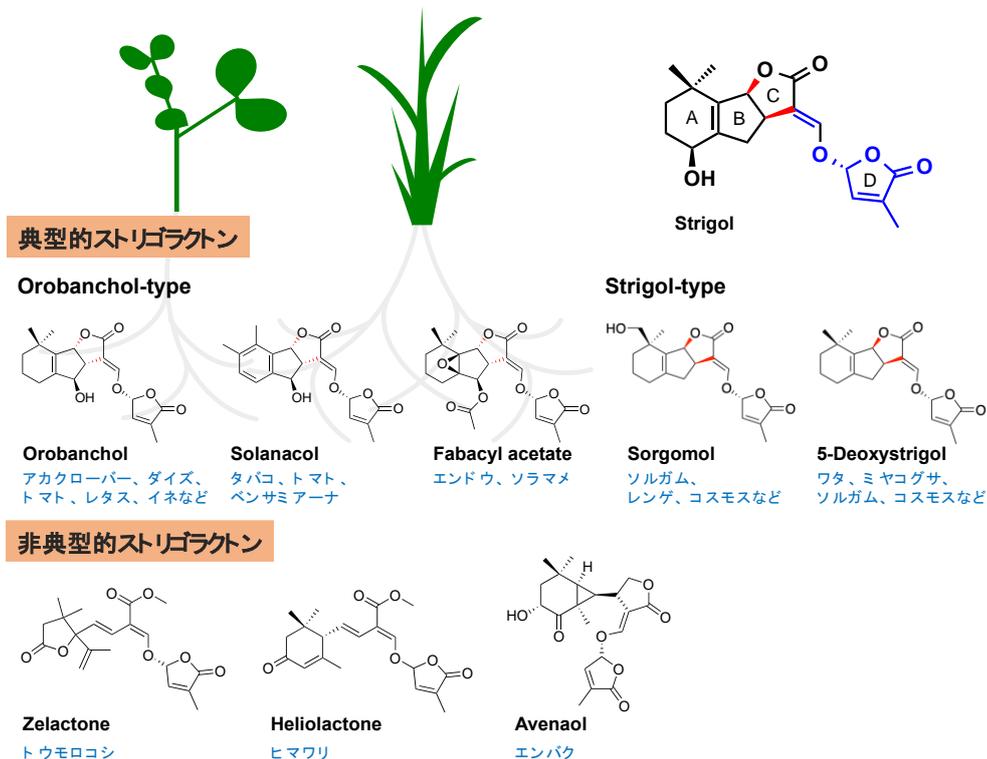


図2 天然ストリゴラクトンの構造

ストリゴラクトンは、エノールエーテル結合および D 環を共通の骨格としてもつ (strigol の青の線)。この部分は活性に必須な構造である。典型的ストリゴラクトンの C 環の立体配置の違いを赤で示した。Strigol-type は C 環が β 配位, orobanchol-type は α 配位となっている。非典型的ストリゴラクトンの heliolactone は、ヒマワリの根浸出液から単離構造決定された (Ueno et al. 2014)。BC 環部分は閉環していないが、ストリゴラクトン前駆体である carlactone (図 3) に類似した構造であるのに対し, zealactone やエンバクから単離構造決定された avenaol (Kim et al. 2014) は、その前駆体が予想できないほど自由な構造をしており、多種多様なストリゴラクトンが潜在的に多数存在することが予想される。

3. ストリゴラクトンの生合成経路

過剰な地上部枝分かれの原因遺伝子が、シロイヌナズナ、エンドウ、イネ、ペチュニアから同定され、それぞれ、*MORE AXILLARY GROWTH (MAX)*, *RMOSUS (RMS)*, *DWARF (D)*,

DECREASED APICAL DOMINANCE (DAD) と名付けられ、機能解析が行われた。その結果、ストリゴラクトンは共通した主要合成経路をもっており、カロテノイド異性化酵素、2つのカロテノイド酸化開裂酵素の連続的な反応により、カロテノイドから非典型的ストリゴラクトンである carlactone (CL) が生成される (図3)。CL は、大腸菌を用いた *in vitro* 系により同定されたが (Alder et al. 2012), その後、イネやシロイヌナズナに内生物質として存在することが確認された (Seto et al. 2014)。

シトクロム P450 をコードする CYP711A は、CL から carlactonoic acid (CLA) への変換を触媒する (Abe et al. 2014)。この CL から CLA への変換は、既述の植物4種だけでなく、ソルガム、トウモロコシ、トマトなどの主要作物、下等植物のイヌカタヒバ、モデル樹木のポプラの CYP711A も全て触媒することが明らかにされており、植物界に高く保存されていることがわかる (Yoneyama et al. 2018)。興味深いことに、植物種によっては、CYP711A が、CLA からさらに典型的ストリゴラクトンへの変換を触媒する。例えば、シロイヌナズナは、CYP711A1 の1つしか持っていないが、イネ (*Oryza sativa*) は5つの CYP711A を持っている。そのうちの1つ、CYP711A2 は、CL をイネの主要なストリゴラクトンの1つである 4-deoxyorobanchol (4DO) へと変換する (Zhang et al. 2014)。さらにもう1つの CYP711A3 は、4DO を orobanchol へと変換する (Zhang et al. 2014)。CYP711A の機能を調べた植物種の中で、4DO を生産・分泌する事が確認されている植物の CYP711A は、CL から CLA を経て 4DO を生成する。しかし、orobanchol を生産しているが、4DO を生産していない植物の CYP711A は、4DO を基質として与えても、イネの CYP711A3 のように orobanchol を生成しない事がわかった。しかし、トウモロコシは、4DO も orobanchol も生産・分泌する事が確認できないにも関わらず、3つの CYP711A のうち、CYP711A18 が、4DO から orobanchol へと変換する能力を持っている事がわかった。これらのことから、植物のストリゴラクトン生産能力は、本来備わっている特性だけでなく、基質の有無によっても決定されることが示唆された (Yoneyama et al. 2018)。

最近では、逆遺伝学的手法により、CLA 以降の合成経路の解明が急激に進んでいる。シロイヌナズナでは、メチルトランスフェラーゼにより、CLA から methyl carlactonoate (MeCLA) へ (Wakabayashi et al. 2021b)、2-オキシグルタル酸/鉄依存性ジオキシゲナーゼにより、MeCLA から hydroxymethyl carlactonoate (1'-OH-MeCLA) へと変換される (Yoneyama et al. 2020)。さらに、CYP711A 以外のシトクロム P450 の関与も次々に報告されている。CYP722C は、CYP711A とは全く異なるクレイドに位置するが、ササゲやトマトの CYP722C は、CLA を直接 orobanchol へと変換する事が明らかにされた (Wakabayashi et al. 2019)。一方、ワタの CYP722C は、CLA から 5-deoxystrigol への変換を触媒した (Wakabayashi et al. 2020)。別のクレイドに位置するソルガムの CYP728B35 は、リン酸欠乏によって発現が上昇することにより選抜され、5-deoxystrigol から sorgomol への変換に関与する (Wakabayashi et al. 2021a)。さらに、多様なストリゴラクトン生成には、CL の下流だけでなく、カロテノイドか

ら枝分かれた上流も重要であることが示唆されている (Baz et al. 2018, 図 3 のライトブルー背景)。

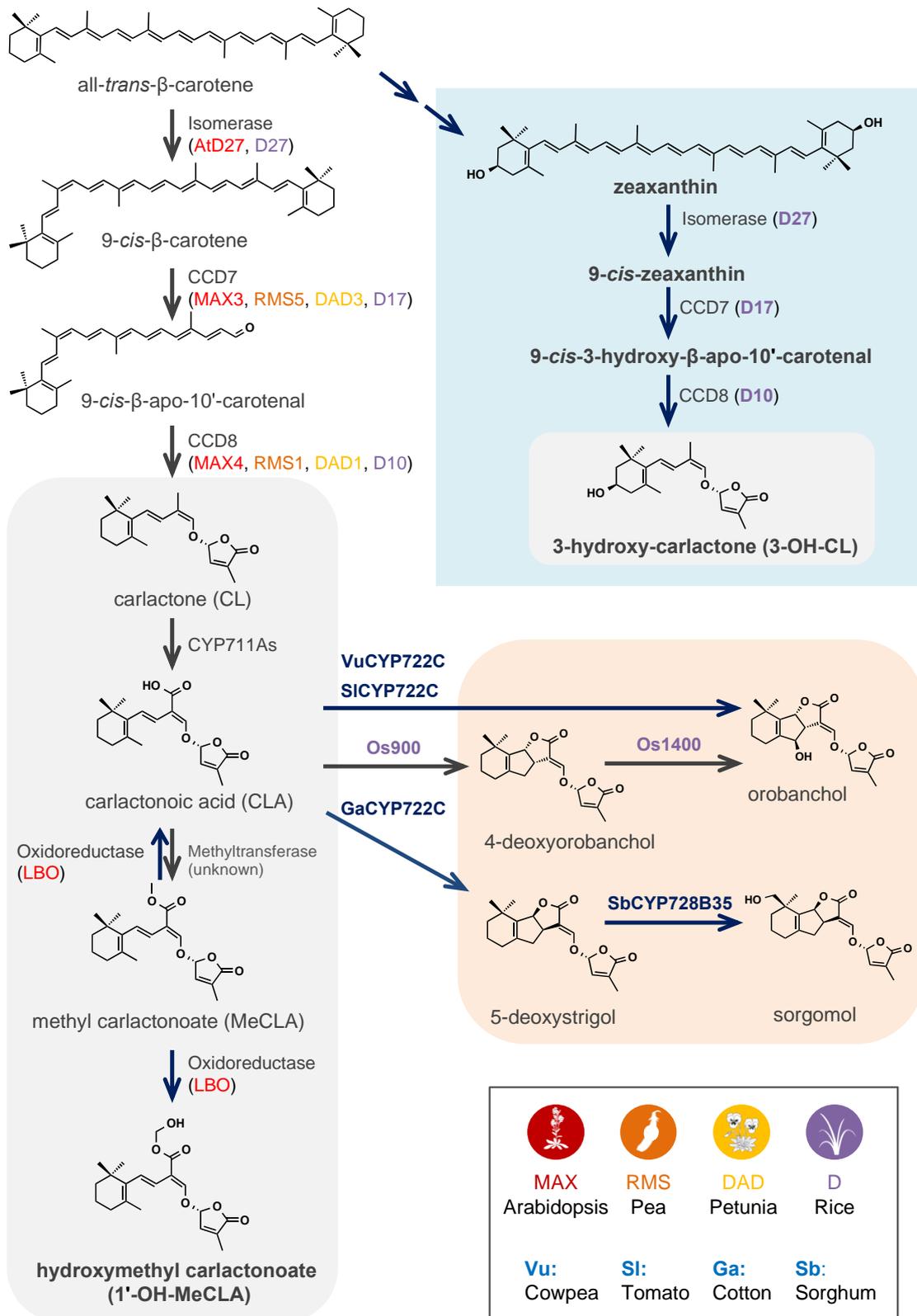


図 3 ストリゴラクトンの生合成経路 (Yoneyama and Brewer 2021)

4. 養分条件によるストリゴラクトンの生産・分泌制御

AM 菌と共生する植物において、ストリゴラクトンの生産・分泌量は植物の養分状況に強く依存する。AM 菌による宿主植物への養分供給において、最も重要視されている養分はリン酸であるが、これまで調べられた AM 菌の宿主植物は、共通してリン酸欠乏によってストリゴラクトンの生産・分泌が顕著に促進される。一方、ソルガム、トウモロコシ、レタス、マリーゴールドなどは、リン酸欠乏だけでなく窒素欠乏によってもそれぞれのストリゴラクトン生産・分泌が促進される。しかし、アカクローバー、アルファルファは、窒素欠乏では促進されない。根粒菌と共生関係を形成するマメ科植物は、AM 菌による窒素供給を期待せず、ストリゴラクトン分泌が窒素欠乏には応答しない可能性が考えられたが、同じマメ科のレンゲは、窒素欠乏でもストリゴラクトンの分泌が顕著に促進された。また、非マメ科のトマトは窒素欠乏には応答しなかった (Yoneyama et al. 2012; Yoneyama. 2019)。このような養分欠乏に対する異なるストリゴラクトン分泌応答の理由は不明のままである。さらに、AM 共生しないマメ科のホワイトルーピンやシロイヌナズナは、窒素欠乏でもリン酸欠乏でもストリゴラクトンの分泌は促進されない (Yoneyama et al. 2008; Seto et al. 2014)。AM 菌の非宿主植物が養分欠乏によるストリゴラクトン分泌促進が認められないことは合理的であるが、シロイヌナズナでは、窒素欠乏やリン酸欠乏によって地上部枝分かれ抑制が認められることから (de Jong et al. 2014; Kohlen et al. 2011)、養分欠乏がストリゴラクトン生産に影響を与えている可能性は否定できない。窒素欠乏によって、シロイヌナズナのストリゴラクトン生合成遺伝子の発現が増加するという報告はある (Ito et al. 2016) が、どのストリゴラクトンの内生量が上昇するのかは明らかになっていない。少なくともリン酸欠乏による CL の内生量増加は認められなかった (Seto et al. 2014)。

5. 今後の展望

多種多様なストリゴラクトンがどのように生合成され、分泌されるのか、その仕組みを解明することにより、なぜ、植物は多種多様なストリゴラクトンを生産・分泌するのか、その理由解明につながることを期待される。

謝辞

シンポジウムの企画に際しては、オーガナイザーとして瀬尾光範博士（理化学研究所）と岡本昌憲博士（宇都宮大学）にご尽力頂きました。感謝申し上げます。

本研究は、JST さきがけ（JPMJPR17QA）および科研費（15J40043, 16K18560）の助成を受けたものです。

引用文献

- Abe S, Sado A, Tanaka K, Kisugi T, Asami K, Ota S, Kim HI, Yoneyama K, Xie X, Ohnishi T et al. (2014) Carlactone is converted to carlactonoic acid by *MAX1* in *Arabidopsis* and its methyl ester can directly interact with AtD14 *in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A 111: 18084-18089. doi.org/10.1073/pnas.1410801111

- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H. (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435: 824–827. doi:10.1038/nature03608
- Alder A, Jamil M, Marzorati M, Bruno M, Vermathen M, Bigler P, Ghisia S, Bouwmeester H, Beyer P, Al-Babili S. (2012) The path from β -carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone. *Science* 335: 1348-1351. doi. 10.1126/science.1218094
- Baz L, Mori N, Mi J, Jamil M, Kountche BA, Guo X, Balakrishna A, Jia KP, Vermathen M, Akiyama K et al. (2018) 3-Hydroxycarlactone, a novel product of the strigolactone biosynthesis core pathway. *Mol Plant* 11: 1312-1314. doi.org/10.1016/j.molp.2018.06.008
- Cook CE, Whichard LP, Turner B, Wall ME, Egley GH. (1966) Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour.): isolation and properties of a potent stimulant. *Science* 154:1189-1190. doi.org/10.1126/science.154.3753.1189
- de Jong, George G, Ongaro V, Williamson L, Willetts B, Ljung K, McCulloch H, Leyser O. (2014) Auxin and strigolactone signaling are required for modulation of *Arabidopsis* shoot branching by nitrogen supply. *Plant Physiol* 166: 384-395. doi.org/10.1104/pp.114.242388
- Goldwasser Y, Yoneyama K, Xie X, Yoneyama K. (2008) Production of strigolactones by *Arabidopsis thaliana* responsible for *Orobanchae aegyptiaca* seed germination. *Plant Growth Regul* 55: 21-28. doi.org/10.1007/s10725-008-9253-z
- Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pages V, Dun EA, Pillot JP, Letisse F, Matussova R, Danoun S, Portais JC et al. (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455: 189-194. doi:10.1038/nature07271
- Ito S, Ito K, Abe N, Takahashi R, Sakai Y, Yajima S. (2016) Effects of strigolactone signaling on *Arabidopsis* growth under nitrogen deficient stress condition. *Plant signaling & behavior* 11: e1126031. doi.org/10.1080/15592324.2015.1126031
- Kim HI, Kisugi T, Khetkam P, Xie X, Yoneyama K, Uchida K, Yokota T, Nomura T, McErlean CSP, Yoneyama K. (2014) Avenaol, a germination stimulant for root parasitic plants from *Avena strigosa*. *Phytochemistry* 103: 85-88. doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.03.030
- Kohlen W, Charnikhova T, Liu Q, Bours R, Domagalska MA, Beguerie S, Verstappen F, Leyser O, Bouwmeester H, Ruyter-Spira C. (2011) Strigolactones are transported through the xylem and play a key role in shoot architectural response to phosphate deficiency in nonarbuscular mycorrhizal host *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 155: 974-987. doi.org/10.1104/pp.110.164640
- Matussova R, Rani K, Verstappen FWA, Franssen MCR, Beale MH, Bouwmeester HJ. (2005) The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanchae* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiol* 139: 920-934. doi.org/10.1104/pp.105.061382
- Seto Y, Sado A, Asami K, Hanada A, Umehara M, Akiyama K, Yamaguchi S. (2014) Carlactone is an endogenous biosynthetic precursor for strigolactones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 1640–1645. doi.org/10.1073/pnas.1314805111
- Trabelsi I, Yoneyama K, Abbes Z, Amri M, Xie X, Kisugi T, Kim HI, Kharrat M, Yoneyama K. (2017) Characterization of strigolactones produced by *Orobanchae foetida* and *Orobanchae crenata* resistant faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes and effects of phosphorus, nitrogen, and potassium deficiencies

- on strigolactone production. South African Journal Botany 108: 15-22. doi.org/10.1016/j.sajb.2016.09.009
- Ueno K, Furumoto T, Umeda S, Mizutani M, Takikawa H, Batchvarova R, Sugimoto Y. (2014) Heliolactone, a non-sesquiterpene lactone germination stimulant for root parasitic weeds from sunflower. *Phytochemistry* 108: 122-128. doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.09.018
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K et al. (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* 455: 195–200. doi:10.1038/nature07272
- Wakabayashi T, Hamana M, Mori A, Akiyama R, Ueno K, Osakabe K, Osakabe Y, Suzuki H, Takikawa H, Mizutani M et al. (2019) Direct conversion of carlactonoic acid to orobanchol by cytochrome P450 CYP722C in strigolactone biosynthesis. *Sci Adv* 5: eaax9067. doi: 10.1126/sciadv.aax9067
- Wakabayashi T, Ishiwa S, Shida K, Motonami N, Suzuki H, Takikawa H, Mizutani M, Sugimoto Y. (2021a) Identification and characterization of sorgomol synthase in sorghum strigolactone biosynthesis. *Plant Physiol* 185: 902-913. doi.org/10.1093/plphys/kiaa113
- Wakabayashi T, Shida K, Kitano Y, Takikawa H, Mizutani M, Sugimoto Y. (2020) CYP722C from *Gossypium arboreum* catalyzes the conversion of carlactonoic acid to 5-deoxystriol. *Planta* 251: 97. doi.org/10.1007/s00425-020-03390-6
- Wakabayashi T, Yasuhara R, Miura K, Takikawa H, Mizutani M, Sugimoto Y. (2021b) Specific methylation of (1R)-carlactonoic acid by an Arabidopsis SABATH methyltransferase. *Planta* 254:88 doi.org/10.1007/s00425-021-03738-6
- Xie X, Kisugi T, Yoneyama K, Nomura T, Akiyama K, Uchida K, Yokota T, McErlean CSP, Yoneyama K (2017) Methyl zealactonoate, a novel germination stimulant for root parasitic weeds produced by maize. *J. Pest. Sci.* 42: 58-61. doi.org/10.1584/jpestics.D16-103
- Xie X, Kusumoto D, Takeuchi Y, Yoneyama K, Yamada Y, Yoneyama K. (2007) 2-epi-orobanchol and solanacol, two unique strigolactones, germination stimulants for root parasitic weeds, produced by tobacco. *J Agric Food Chem* 55: 8067-8072. doi.org/10.1021/jf0715121
- Xie X, Yoneyama K, Harada Y, Fusegi N, Yamada Y, Ito S, Yokota T, Takeuchi Y, Yoneyama K. (2009) Fabacyl acetate, a germination stimulant for root parasitic plants from *Pisum sativum*. *Phytochemistry* 70: 211-215. doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.12.013
- Xie X, Yoneyama K, Kusumoto D, Yamada Y, Takeuchi Y, Sugimoto Y, Yoneyama K. (2008) Sorgomol, germination stimulant for root parasitic plants, produced by *Sorghum bicolor*. *Tetrahedron Letters* 49: 2066-2068. doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.01.131
- Yokota T, Sakai H, Okuno K, Yoneyama K, Takeuchi Y (1998) Alectrol and orobanchol, germination stimulants for *Orobanche minor*, from its host red clover. *Phytochemistry* 49: 1967-1973. doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00419-1
- Yoneyama K. (2019) How do strigolactones ameliorate nutrient deficiencies in plants? *Engineering plants for agriculture* 11. doi.10.1101/cshperspect.a034686

- Yoneyama K, Akiyama K, Brewer PB, Mori N, Kawano-Kawada M, Haruta S, Nishiwaki H, Yamauchi S, Xie X, Umehara M et al. (2020) Hydroxyl carlactone derivatives are predominant strigolactones in *Arabidopsis*. *Plant Direct* 4: e00219. doi.org/10.1002/pld3.219
- Yoneyama K and Brewer PB. (2021) Strigolactones, how are they synthesized to regulate plant growth and development? *Curr Opin Plant Biol* 63: 102072. doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102072
- Yoneyama K, Mori N, Sato T, Yoda A, Xie X, Okamoto M, Iwanaga M, Ohnishi T, Nishiwaki H, Asami T. et al. (2018) Conversion of carlactone to carlactonoic acid is a conserved function of MAX1 homologs in strigolactone biosynthesis. *New Phytol* 218: 1522–1533. doi.org/10.1111/nph.15055
- Yoneyama K, Xie X, Kim HI, Kisugi T, Nomura T, Sekimoto H, Yokota T, Yoneyama K. (2012) How do nitrogen and phosphorus deficiencies affect strigolactone production and exudation? *Planta* 235: 1197-207. doi.10.1007/s00425-011-1568-8
- Yoneyama K, Xie X, Kisugi T, Nomura T, Sekimoto H, Yokota T, Yoneyama K. (2011) Characterization of strigolactones exuded by Asteraceae plants. *Plant Growth Regul.* 65: 495-504. doi.10.1007/s10725-011-9620-z
- Yoneyama K, Xie X, Sekimoto H, Takeuchi Y, Ogasawara S, Akiyama K, Hayashi H, Yoneyama K. (2008) Strigolactones, host recognition signals for root parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi, from Fabaceae plants. *New Phytol* 179: 484-494. doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02462.x
- Zhang Y, van Dijk AD, Scaffidi A, Flematti GR, Hofmann M, Charnikhova T, Verstappen F, Hepworth J, van der Krol S, Leyser O et al. (2014) Rice cytochrome P450 MAX1 homologs catalyze distinct steps in strigolactone biosynthesis. *Nat Chem Biol* 10:1028-1033. doi.10.1038/NCHEMBIO.1660

生理活性物質の膜輸送を介した作用メカニズム

渡邊 俊介¹, 清水 崇史², 瀬尾 光範³

¹Biochemistry and Plant Molecular Physiology Research Unit, UMR INRAE CNRS SupAgro
2 Place Pierre Viala, 34060 Montpellier cedex 02, France

²奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術科
〒630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5

³理化学研究所 環境資源科学研究センター
〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22

Mode of action of bioactive molecules through transmembrane transport

Shunsuke Watanabe¹, Takafumi Shimizu², Mitsunori Seo³

¹Biochemistry and Plant Molecular Physiology Research Unit, UMR INRAE CNRS SupAgro
2 Place Pierre Viala, 34060 Montpellier cedex 02, France

²Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology
8916-5 Takayama, Ikoma, Nara, 630-0192, Japan

³IKEN Center for Sustainable Resource Science
1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa, 230-0045, Japan

Keywords: abscisic acid (ABA), auxin, indole-3-butyric acid (IBA), NPF, plant hormones

DOI: 10.24480/bsj-review.13b6.00229

1. はじめに

生体内で作られ出される多種多様な化合物は、自身や他の生物の生命活動に様々な形で用いられている。いずれの場合にも、細胞もしくは細胞内小器官の内外を仕切る生体膜を介した化合物の移動を必要とする場合が多い。化合物の膜輸送を司る因子、すなわち「輸送体」に関する研究は精力的に進められているが、生体内に存在すると考えられる化合物の数、もしくはゲノム情報から推測される輸送体タンパク質の数に比べ、機能（輸送基質）が明らかにされている輸送体の数は圧倒的に少ない。

私たちは、植物ホルモンに代表される低分子生理活性物質に着目し、その輸送体の同定に取り組んでいる。ダーウィンの実験でもよく知られているように、オーキシシン (indole-3-acetic acid; IAA) は植物体内を極性輸送される。1990年代頃からオーキシシンの輸送に欠陥を持つ変異体が形態異常や、外生オーキシシンに対する感受性を指標として数多く単離され、その解析を通して現在までに PIN, AUX, ABC 型に分類される複数の輸送体によってオーキシシンの輸送が複雑に制御されている様子が明らかになってきている (Benjamins and Scheres 2008; Petrasek and Friml 2009; Groner and Friml 2015; Anfang and Shani 2021)。これに対し、他の植物ホルモンに関しては同位体ラベルした化合物の投与や接木実験などから植物体内を輸送される事が示唆されているものもあるが、その制御機構については不明な点が多い。この様な状況の中、私たちは NPF と呼ばれるタンパク質ファミリーが複数の植物ホルモンの輸送に関与

する事をこの 10 年ほどの間に明らかにしてきたので、本稿ではその一部について紹介したい。

2. 乾燥に応答した気孔の閉鎖とアブシシン酸 (ABA)

ABA の代表的な生理作用の一つとして、気孔の閉鎖誘導が挙げられる。葉の水分含量を変えず、根の一部にのみ乾燥を与えた場合にも気孔の閉鎖が誘導される事、またこの時に道管中の ABA 濃度の上昇が見られる事から「根で合成された ABA が道管を通して地上部に運ばれて気孔の閉鎖を誘導する」という考えが長い間受け入れられてきた (Davies and Zhang 1991; Jiang and Hartung 2008; Schachtman and Goodger 2008; Christmann et al. 2013)。しかしながらその後の ABA 欠損変異体を用いた接木実験などでは、気孔の閉鎖は地上部の ABA 生合成能力に大きく依存するという報告が多数なされている (Holbrook et al. 2002; Christmann et al. 2007; McAdam et al. 2016)。さらに、シロイヌナズナにおいて ABA 生合成の鍵酵素である NCED3 とそれに続く細胞質内での ABA 生合成最終段階の反応を触媒する ABA2, AAO3 といった酵素が葉の維管束周辺の細胞に多く分布している事などから (Endo et al. 2008; Kuomori et al. 2014), 乾燥に応答して ABA が主に葉の維管束組織で合成されると考えられるようになっていく。実際に、シロイヌナズナ ABA 欠損変異体 *aba2* において正常な *ABA2* 遺伝子を維管束組織 (師部伴細胞) 特異的に発現させる事により、その表現型が回復する事が確認されている (Merilo et al. 2018)。これらの事は、維管束組織で合成された ABA が孔辺細胞へと輸送され、気孔の閉鎖を誘導する事を示唆している。

3. ABA 輸送体

孔辺細胞は、原形質連結 (プラスモデスマータ) を持たない。また、ABA 受容体は細胞膜上に存在する可能性も考えられていたが、現在では細胞質もしくは核内で機能する可溶性タンパク質である PYR1/PYL/RCAR が主要な ABA 受容体である事が明らかになっている (Rodriguez et al. 2019)。そのため、維管束周辺の細胞で合成された ABA が受容体に認識され気孔の閉鎖を誘導するためには、ABA が一度細胞外に排出され孔辺細胞内に取り込まれるという過程が必要になる。ABA は pK_a 値 4.7 の弱酸であり、溶液中では pH に依存してカルボキシル基がイオン化する解離型 (COO^-) と非解離型 ($COOH$) の 2 つの形態の存在比が変化する。非解離型の ABA は比較的脂溶性が高く、拡散によって細胞膜を通過する事ができる。また、オーキシン輸送体の多くが形態異常やオーキシン低感受性を示す変異体の解析を通して同定されてきたのに対し、ABA の輸送に欠陥を持つ変異体はいわゆる順遺伝学的手法では単離されてこなかった。これらの事から、ABA の細胞膜を介した移動に能動的な仕組みが必要であるかどうかは長らく不明であった。

このような状況の中、私たちは ABA の生体膜を介した移動を仲介する因子、すなわち輸送体 (トランスポーター) となり得るタンパク質を活性に基づいて網羅的にスクリーニングする方法を、ABA 受容体 PYR1/PYL/RCAR がリガンド依存的に PP2C タンパク質ホスファターゼと相互作用するという報告 (Park et al. 2009) から着想を得て構築した。すなわち、ABA 受容体と PP2C の相互作用を検出する酵母 two-hybrid (Y2H) 系を確立し、そこに ABA を細胞内

に取り込む輸送体を発現させた場合には、選択培地上での酵母の生存が通常より低濃度の ABA 存在下で可能になると期待したのである (図 1)。これに基づいて、シロイヌナズナの cDNA ライブラリーを用いたランダムなスクリーニングを行った結果、低親和性の硝酸イオン輸送体として知られている NRT1 (NITRATE TRANSPORTER 1) タンパク質を含むファミリーメンバー (Tsay et al. 2007; Leran et al. 2014; Corratge-Faillie and Lacombe 2017) のいくつかは、細胞内に ABA を取り込む活性を持つ事を明らかにした (Kanno et al. 2012)。NRT1 が属する輸送体ファミリーは動物の SLC15 (Solute Carrier 15) に相当し、シロイヌナズナには 53 のメンバーが存在する。その中には、小ペプチド (主にジペプチドとトリペプチド) の輸送体 (PEPTIDE TRANSPORTER; PTR) として機能するタンパク質が存在する事も報告されている (Tsay et al. 2007; Leran et al. 2014; Corratge-Faillie and Lacombe 2017)。私たちは当初 ABA 輸送活性を持つ当該ファミリーメンバーに AIT (ABA-IMPORTING TRANSPORTER) という名前を付けたが、後述する通り同一のタンパク質が複数の化合物を輸送する可能性がある事から、基質に基づいた命名は後に混乱を引き起こす事が懸念された。そのため、NRT1 と PTR を含む輸送体ファミリー全体を NRT1/PTR FAMILY (NPF) として系統的に 8 つのサブファミリーに分類し、NPF1.1, NPF1.2, . . . NPF8.1, NPF8.2, . . . という様に統一した呼び方をする事が提案されている (Leran et al. 2014)。私たちが酵母で確認した中では、NPF4.6 が ABA に対して比較的高い輸送活性を示した。NPF4.6 は過去の研究で硝酸イオン輸送体としての機能が明らかにされていた NRT1.2 (Huang et al. 1999) と同一のタンパク質であるが、ABA に対する K_m 値が $0.5\sim 5 \mu\text{M}$ と比較的低い (Kanno et al. 2012; Leran et al. 2020) (硝酸イオンに対する K_m 値は約 5.9mM)。さらに NPF4.6 の機能を失った変異体 (*npf4.6*) において発芽時の外生 ABA に対する感受性が低下している事、NPF4.6 の過剰発現により発芽時の外生 ABA に対する感受性が高まる事から、NPF4.6 が植物体内で ABA 輸送体として機能し得る事が示された (Kanno et al. 2012)。

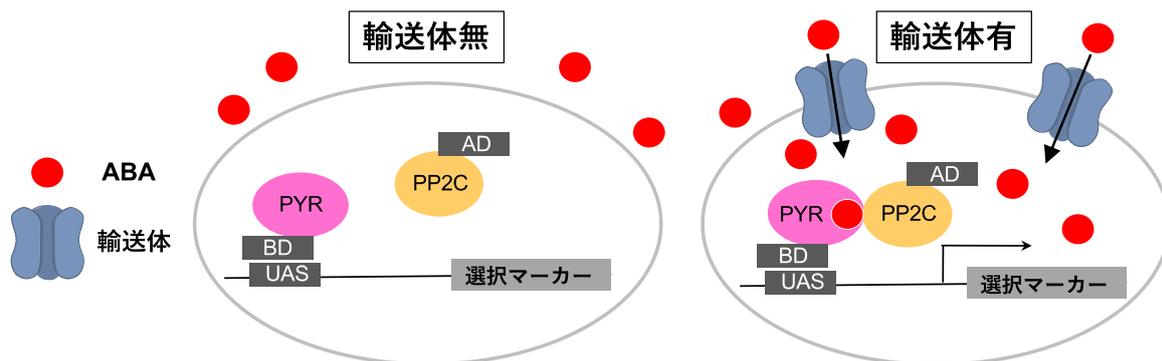


図 1. ABA 受容体 (PYR) と PP2C タンパク質ホスファターゼの ABA 依存的な相互作用を検出する Y2H 系を用いた輸送体の同定

ここで本題に入る。NPF4.6 は、維管束組織から孔辺細胞への ABA の輸送に関与しているのであるか? *npf4.6* 単独変異体においては葉の表面温度に関して野生型との違いが見られないが、ABA の内生量が減少した (完全には欠損しない) *aao3* 変異体と *npf4.6* を掛け合わせた二重変異体においては *aao3* 単独変異体に比べて葉の表面温度が低下する (Shimizu et al.

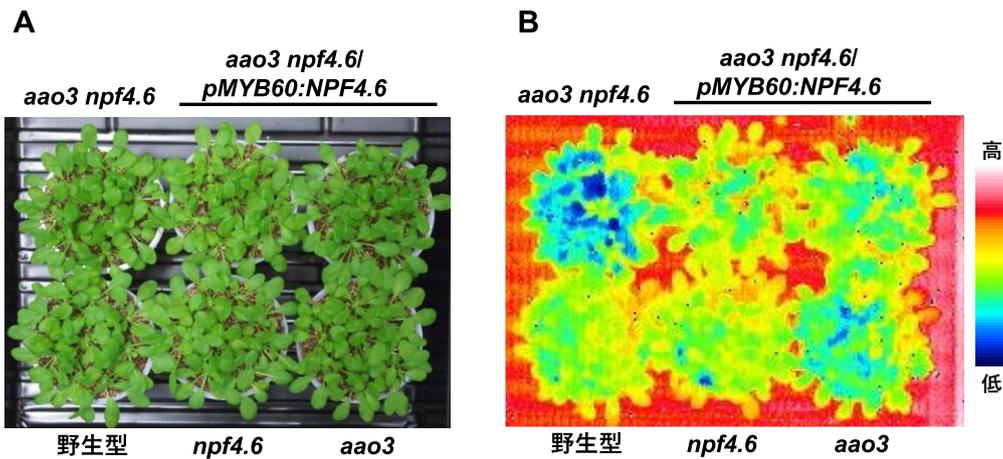


図 2. *npf4.6* 変異の葉の表面温度に対する影響

(A) 発芽後約 1 ヶ月の野生型, *npf4.6*, *aao3*, *aao3 npf4.6* および *aao3 npf4.6* 背景で孔辺細胞特異的に正常な *NPF4.6* を発現させる形質転換植物 (*aao3 npf4.6/pMYB60:NPF4.6*)。 (B) サーモグラフィーで観察した表面温度。

2021) (図 2)。このことから, *NPF4.6* は気孔の閉鎖を促進する働きを持つと考えられる。*NPF4.6* のゲノム配列の下流に *GUS* を挿入し, 自身のプロモーターで *NPF4.6* と *GUS* の融合タンパク質を発現させる形質転換体 (*pNPF4.6:gNPF4.6-GUS*) において, 維管束組織および孔辺細胞で *GUS* 活性が検出された (Shimizu et al. 2021) (図 3)。*NPF4.6* は細胞内に ABA を取り込む活性を持つ事 (Kanno et al. 2012), *aao3 npf4.6* において気孔の開度が *aao3* に比べて高まる (葉の表面温度が低下する) 事 (Shimizu et al. 2021) を考えると, 孔辺細胞における ABA の取り込みが *NPF4.6* の主要な働きであると予想された。この事は, *aao3 npf4.6* 二重変異体背景で, 正常な *NPF4.6* 遺伝子を孔辺細胞特異的な *MYB60* プロモーターで発現させると気孔の閉鎖が促進する (葉の表面温度が高まる) という実験結果 (Shimizu et al. 2021) (図 3) から支持される。維管束組織で発現している *NPF4.6* の生理的な機能については現時点で不明であるが, 生合成部位から孔辺細胞へと輸送される ABA 量の制御等に関与している可能性などが考えられる。

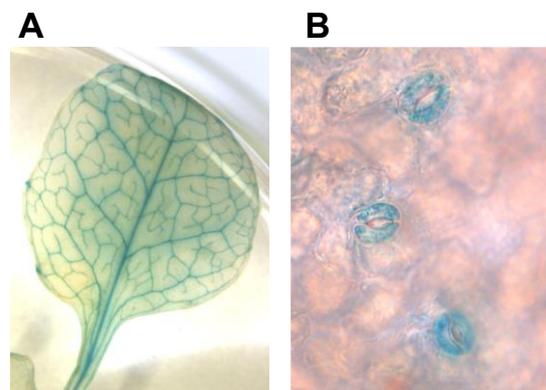


図 3. *NPF4.6* タンパク質の局在部位

NPF4.6 プロモーター支配下で *NPF4.6* と *GUS* の融合タンパク質を発現させる形質転換体における *GUS* 染色。(A) ロゼット葉。(B) 表皮の拡大写真。

前述の通り, 輸送活性に強弱はあるものの *NPF4.6* 以外にも複数の *NPF* が ABA を基質とする (Kanno et al. 2012; Chiba et al. 2015)。そのうちの *NPF5.1* に関しては, 機能欠失変異体 (*npf5.1*) において葉の表面温度が野生型よりも高い (気孔開度が低い) 事が明らかになった

(Shimizu et al. 2021) (図 4)。この事は、NPF5.1 が気孔の閉鎖を負に制御する因子である事を意味している。NPF5.1 は NPF4.6 と同様に、酵母においては細胞内への ABA の取り込みを仲介する (Shimizu et al. 2021)。NPF5.1 の過剰発現により発芽時の ABA に対する感受性が高まる事からも、NPF5.1 が植物体内で ABA 取り込み輸送体として機能するという事が支持される (Shimizu et al. 2021)。それでは何故、同じ ABA 取り込み輸送体としての機能を持つ NPF4.6 と NPF5.1 の機能欠失が気孔の開度に関して反対の表現型を示すのであろうか？それはおそらく、二つのタンパク質の機能部位の違いによるものであると考えられる。前述の通り NPF4.6 が孔辺細胞で ABA の取り込みに関与している一方で、NPF5.1 の発現は少なくともプロモーター活性に基づくと葉肉細胞や維管束組織など広範囲で見られる (図 5)。これらの事から、NPF5.1 は維管束組織から孔辺細胞へと輸送される ABA を葉肉細胞や維管束組織に取り込む事で気孔の閉鎖を抑制しており、*npf5.1* においては細胞間を通して維管束組織から孔辺細胞へ辿り着く ABA の量が増大する事で気孔が閉鎖すると考えられる (図 6)。*npf4.6 npf5.1* 二重変異体と野生型の葉の表面温度が同程度である事 (図 2) は、NPF4.6 による孔辺細胞への ABA の取り込みが気孔閉鎖において重要である事を改めて意味している。

長らくその実態が不明であった ABA の輸送メカニズムであるが、ここで紹介した NPF4.6、NPF5.1 を含め、実に多くの ABA 輸送体が近年になって続々と報告されている (Kuromori et al. 2018; Seo and Marion-Poll 2019; Anfang and Shani 2021)。本稿では主に気孔閉鎖に焦点を当て ABA 輸送の必要性を考えてきたが、これまでに知られている多様な ABA の生理作用と照らし合わせると複数の ABA 輸送体の存在意義がより鮮明になるであろう。

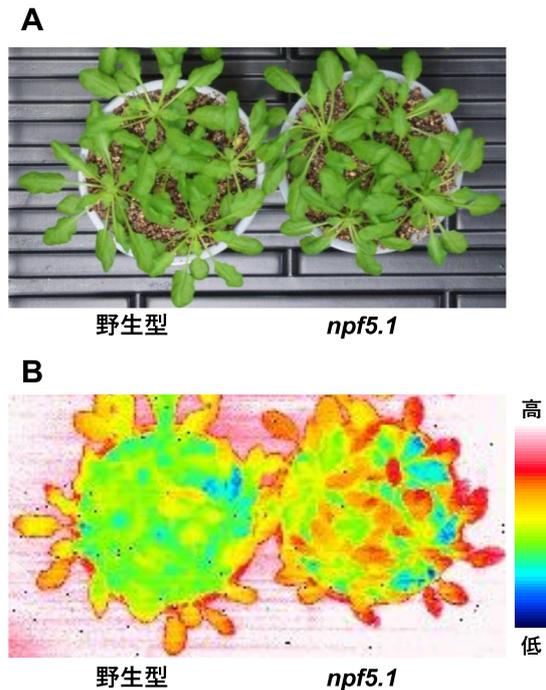


図 4. 野生型及び *npf5.1* の葉の表面温度 (A) 発芽後約 1 ヶ月の植物。(B) サーモグラフィーで観察した表面温度。

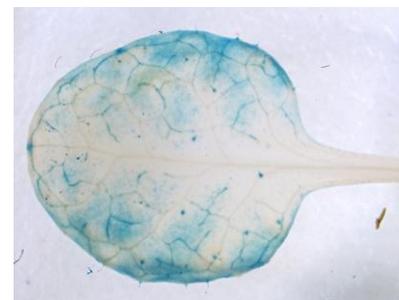


図 5. NPF5.1 のプロモーター活性 NPF5.1 プロモーター支配下で GUS を発現させる形質転換体のロゼット葉における GUS 染色。

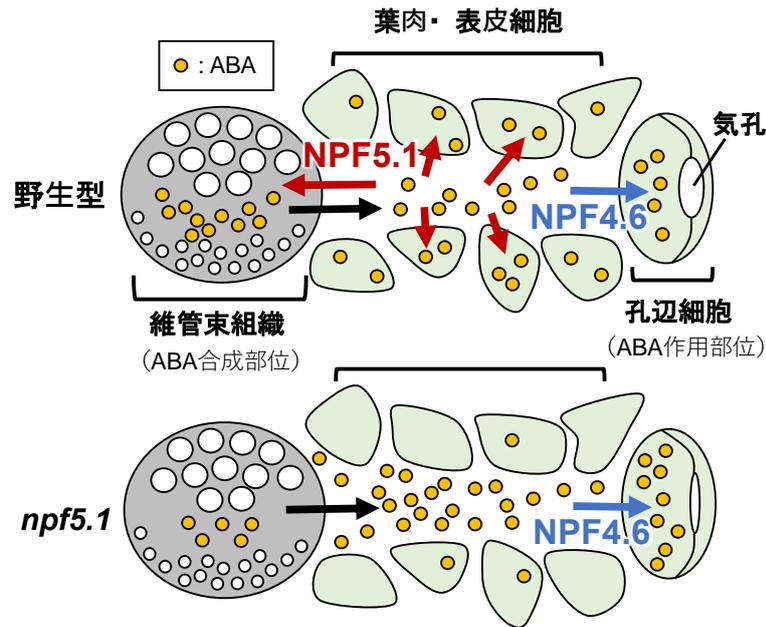


図 6. NPF4.6, NPF5.1 の維管束組織から孔辺細胞への ABA 輸送と気孔閉鎖における機能

4. NPF の多様な機能

NPF は古くから知られている硝酸イオン、小ペプチド、そして前述の ABA 以外にも、オーキシン (Krouk et al. 2010)、ジベレリン (Saito et al. 2015; David et al. 2016; Tal et al. 2016)、ジャスモン酸 (Ishimaru et al. 2017) といった植物ホルモンや、グルコシノレート (Nour Eldin et al. 2012)、アルカロイド (Payne et al. 2017)、ニコチアミン (Chao et al. 2021) 等の二次代謝産物を基質とする事が明らかになってきている。ファミリー全体を見渡した場合もそうであるが、興味深い点はある特定の NPF が複数の基質を認識する場合も多々見受けられる事である。

タルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*) の *nip/latd* は、根粒形成、側根形成、主根伸長等に欠陥を持つ変異体である (Veereshlingam et al. 2004; Bright et al. 2005)。NIP/LATD は硝酸イオンに対して輸送活性を示す NPF タンパク質をコードするが、*nip/latd* 変異体で同じく硝酸イオンを基質とするシロイヌナズナ NRT1.1/CHL1 (NPF6.3) を発現させた場合には主根成長、側根形成が部分的に回復する一方で、根粒形成に関する表現型は相補されない (Bagchi et al. 2012)。この事は、NIP/LATD が硝酸イオン以外に根粒形成に重要な役割を果たす何らかの化合物の輸送体として機能する可能性を示唆している。今後 NPF の機能解析を通して、化合物の新たな働きや新規の生理活性物質・植物ホルモンが発見される事が期待される。

5. インドール酪酸 (IBA) の輸送に関わる NPF

シロイヌナズナに存在する 53 の NPF の中には、植物体内での機能が明らかになっていないものが多数存在する。さらに前述の通り、ある一つの基質輸送に関する生理的役割が明らかになっている NPF があっても、その NPF に他の未知の機能が隠されている可能性

も考えられる。この様な事から、私たちは NPF の機能を失った変異体の表現型を幅広く観察している。

この過程において、過去に硝酸イオンおよびカリウムイオンを基質とする事が報告されていた NPF7.3 (NRT1.5 としても知られる) (Lin et al. 2008; Li et al. 2017) の機能を失った変異体 (*npf7.3*) の根の重力屈性が異常になっている事に気付いた (Watanabe et al. 2020) (図 7)。この表現型は培地中に硝酸イオンおよびカリウムイオンが高濃度に含まれている条件においても観察される事から、NPF7.3 の基質となる他の化合物の存在が示唆された。オーキシンが根の重力屈性に関与している事がよく知られている。NPF7.3 は酵母において主要な内生オーキシンであるインドール酢酸 (IAA) に対して優位な取り込み活性を示したが、IAA は比較的脂溶性が高いために NPF7.3 非存在下でも酵母細胞内に取り込まれやすく、また NPF4.6 が ABA に対して示した輸送活性ほど NPF7.3 の IAA 輸送活性は顕著ではなかった。これに対し、植物の内生化合物であり IAA の前駆体としても知られる IBA は膜透過性が比較的 low、NPF7.3 の基質として IAA よりも効率的に輸送された。*npf7.3* で観察される根の重力屈性異常は外生 IAA 処理で回復するが IBA 処理では回復しない。また、*npf7.3* においては野生型に比べてオーキシン誘導性プロモーターである DR5 の活性が低下しており、重力に応答した DR5 活性の偏差分布が起きにくい (図 8)。さらに NPF7.3 の発現は、IBA の IAA への変換が活発に行われる事が予想されているコルメラ細胞で見られる。これらの事から、*npf7.3* では IBA から IAA への変換が行われる細胞内への IBA の取り込みが低下していると考えられる (Watanabe et al. 2020) (図 9)。IBA から合成される IAA が側根形成に重要である事が

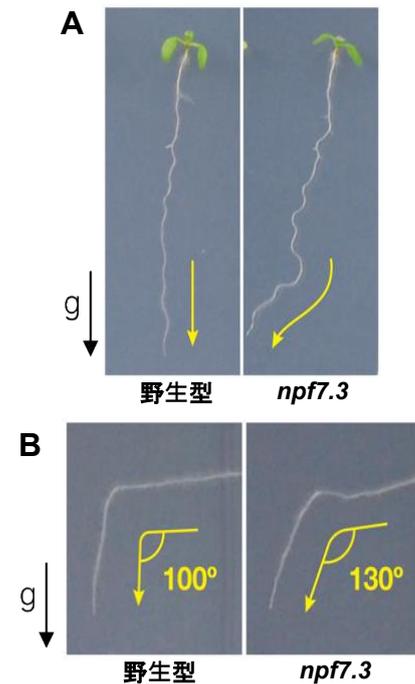


図 7. 野生型, *npf7.3* の根の重力屈性

(A) 垂直に立てた培地上で *npf7.3* の根は波を打ち重力に向かってまっすぐに伸長しにくい。(B) 重力方向を 90 度変化させた場合 *npf7.3* の根は重力方向に屈曲しにくい。

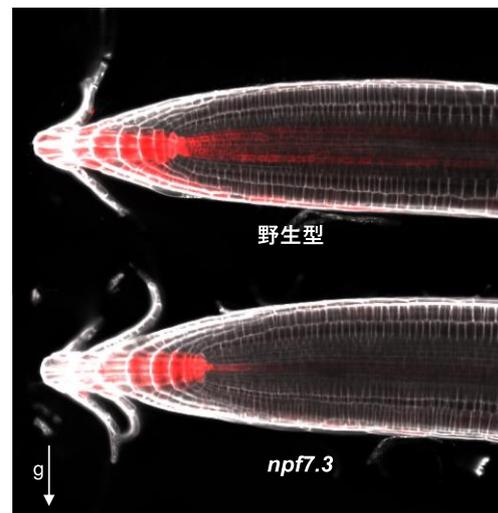


図 8. 野生型, *npf7.3* における DR5 活性
根の重量方向を 90 度変化させると 野生型では重力側に DR5 活性 (赤) が偏って分布するが、*npf7.3* ではそれがみられない。

よく知られていたが、私たちの NPF の機能解析を通して、IBA から合成される IAA が根の重力屈性にも必要であるという新たな発見をもたらす事ができた。

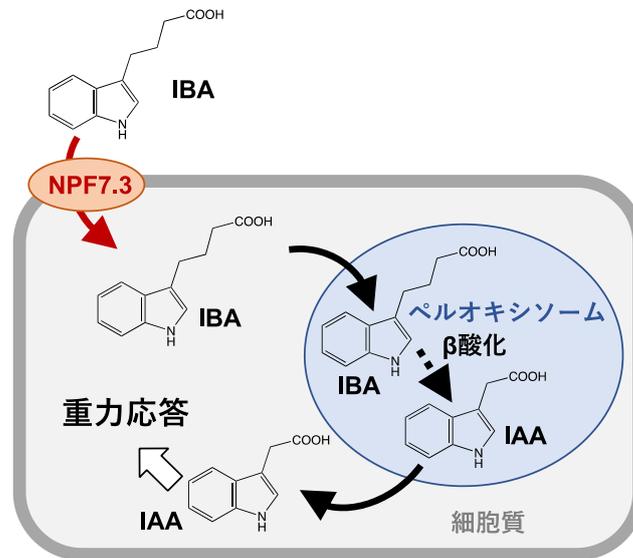


図 9. NPF7.3 によって細胞内に取り込まれた IBA はペルオキシソーム内での β 酸化によって IAA へと変換され、重力応答を引き起こす。

6. 終わりに

これまで私たちの NPF に着目した研究を中心に紹介してきたが、近年になって異なる輸送体ファミリーに属する新たな植物ホルモン輸送体の同定が進んでいる (Anfang and Shani 2021)。今後、植物ホルモンの輸送介の詳細な制御メカニズムを明らかにしていくためには、植物体内における植物ホルモンの分布を正確に把握する事が必要であろう。現在私たちは、一細胞・超微量サンプルからの質量分析系の確立に取り組んでいる (Shimizu et al. 2015; 清水ら 2020)。これにより、適したマーカー遺伝子やセンサータンパク質が確立されていない植物ホルモンに関してもその局在を、高い空間解像度で明らかにする事が可能になると期待している。近い将来、これらの成果についても紹介できる日が来る事を強く願っている。

引用文献

- Anfang M, Shani E (2021) Transport mechanisms of plant hormones. *Curr Opin Plant Biol* 63: 102055. doi: 10.1016/j.pbi.2021.102055
- Bagchi R, Salehin M, Adeyemo OS, Salazar C, Shulaev V, Sherrier DJ, Dickstein R (2012) Functional assessment of the *Medicago truncatula* NPF/TATD protein demonstrates that it is a high-affinity nitrate transporter. *Plant Physiol* 160: 906-916. doi: 10.1104/pp.112.196444
- Benjamins R, Scheres B (2008) Auxin: the looping star in plant development. *Annu Rev Plant Biol* 59: 443-465. doi: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103805

- Bright LJ, Liang Y, Mitchell DM, Harris JM (2005) The LATD gene of *Medicago truncatula* is required for both nodule and root development. *Mol Plant-Microbe interact* 18: 521-532. doi: 10.1094/MPMI-18-0521
- Chao ZF, Wang YL, Chen YY, Zhang CY, Wang PY, Song T, Liu CB, Lv QY, Han ML, Wang SS et al. (2021) NPF transporters in synaptic-like vesicles control delivery of iron and copper to seeds. *Sci Adv* 7: eabh2450. doi: 10.1126/sciadv.abh2450
- Chiba Y, Shimizu T, Miyakawa S, Kanno Y, Koshiha T, Kamiya Y, Seo M (2015) Identification of *Arabidopsis thaliana* NRT1/PTR FAMILY (NPF) proteins capable of transporting plant hormones. *J Plant Res* 128: 679-686. doi: 10.1007/s10265-015-0710-2
- Christmann A, Grill E, Huang J (2013) Hydraulic signals in long-distance signaling. *Curr Opin Plant Biol* 16: 293-300. doi: 10.1016/j.pbi.2013.02.011
- Christmann A, Weiler EW, Steudle E, Grill E (2007) A hydraulic signal in root-to-shoot signaling of water shortage. *Plant J* 52: 167-174. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2007.03234.x
- Corratge-Faillie C, Lacombe B (2017) Substrate (un)specificity of *Arabidopsis* NRT1/PTR FAMILY (NPF) proteins. *J Exp Bot* 68: 3107-3113. doi: 10.1093/jxb/erw499
- David LC, Berquin P, Kanno Y, Seo M, Danniell-Vedele F, Ferrarion-Mery S (2016) N availability modulates the role of NPF3.1, a gibberellin transporter, in GA-mediated phenotypes in *Arabidopsis*. *Planta* 244: 1315-1328. doi: 10.1007/s00425-016-2588-1
- Davies WJ, Zhang J (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annu Rev Plant Biol Plant Mol Biol* 42: 55-76. doi: 10.1146/annurev.pp.42.060191.000415
- Endo A, Sawada Y, Takahashi H, Okamoto M, Ikegami K, Koiwai H, Seo M, Toyomasu T, Mitsushashi W, Shinozaki K et al. (2008) Drought induction of *Arabidopsis* 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells. *Plant Physiol* 147: 1984-1993. doi: 10.1104/pp.108.116632
- Grones P, Friml J (2015) Auxin transporters and binding proteins at a glance. *J Cell Sci* 128: 1-7. doi: 10.1242/jcs.159418
- Holbrook NM, Shashidhar VR, James RA, Munns R (2002) Stomatal control in tomato with ABA-deficient roots: response of grafted plants to soil drying. *J Exp Bot* 53: 1503-1514. Doi: 10.1093/jexbot/53.373.1503
- Huang NC, Liu KH, Lo HJ, Tsay YF (1999) Cloning and functional characterization of an *Arabidopsis* Nitrate Transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *Plant Cell* 11: 1381-1392. doi: 10.1105/tpc.11.8.1381
- Ishimaru Y, Oikawa T, Suzuki T, Takeishi S, Matsuura H, Takahashi K, Hamamoto S, Uozumi N, Shimizu T, Seo M et al. (2017) GTR1 is a jasmonic acid and jasmonoyl-L-isoleucine transporter in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem* 81: 249-255. doi: 10.1080/09168451.2016.1246174
- Jiang F, Hartung W (2008) Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. *J Exp Bot* 59: 37-43. doi: 10.1093/jxb/erm127

- Kanno Y, Hanada A, Chiba Y, Ichikawa T, Nakazawa M, Matsui M, Koshiha T, Kamiya Y, Seo M (2012) Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 9653-9658. doi: 10.1073/pnas.1203567109
- Krouk G, Lacombe B, Bielach A, Perrine-Walker F, Malinska K, Mounier E, Hoyerova K, Tillard P, Leon S, Ljung K et al. (2010) Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Dev Cell* 18: 927-937. doi: 10.1016/j.devcel.2010.05.008
- Kuromori T, Seo M, Shinozaki K (2018) ABA transport and plant water stress responses. *Trends Plant Sci* 23: 513-522. doi: 10.1016/j.tplants.2018.04.001
- Kuromori T, Sugimoto E, Shinozaki K (2014) Intertissue signal transfer of abscisic acid from vascular cells to guard cells. *Plant Physiol* 164: 1587-1592. doi: 10.1104/pp.114.235556
- Leran S, Noguero M, Corratge-Faillie C, Boursiac Y, Brachet C, Lacombe B (2020) Functional characterization of the Arabidopsis abscisic acid transporter NPF4.5 and NPF4.6 in *Xenopus* oocytes. *Front Plant Sci* 11: 144. doi: 10.3389/fpls.2020.00144
- Leran S, Varala K, Boyer JC, Chiurazzi M, Crawford N, Daniel-Vedele F, David L, Dickstein R, Fernandez E, Forde B et al. (2014) A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. *Trends Plant Sci* 19: 5-9. doi: 10.1016/j.tplants.2013.08.008
- Li H, Yu M, Du XQ, Wang ZF, Wu WH, Quintero FJ, Jin XH, Li HD, Wang Y (2017) NRT1.5/NPF7.3 functions as a proton-coupled H⁺/K⁺ antiporter for K⁺ loading into the xylem in Arabidopsis. *Plant Cell* 29: 2016-2026. doi: 10.1105/tpc.16.00972
- Lin SH, Kuo HF, Canivenc G, Lin CS, Lepetit M, Hsu PK, Tillard P, Lin HL, Wang YY, Tsai CB et al. (2008) Mutation of the Arabidopsis NRT1.5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. *Plant Cell* 20: 2514-2528. doi: 10.1105/tpc.108.060244
- McAdam SAM, Brodribb TJ, Ross JJ (2016) Shoot-derived abscisic acid promotes root growth. *Plant Cell Environ* 39: 652-659. doi: 10.1111/pce.12669
- Merilo E, Yarmolinsky D, Jalakas P, Parik H, Tulva I, Rasulov B, Kilk K, Kollist H (2018) Stomatal VPD response: there is more to the story than ABA. *Plant Physiol* 176: 851-864. doi: 10.1104/pp.17.00912
- Nour-Eldin HH, Andersen TG, Burow M, Madsen SR, Jorgensen ME, Olsen CE, Dreyer I, Hedrich R, Geiger D, Halkier BA (2012) NRT/PTR transporters are essential for translocation of glucosinolate defence compounds to seeds. *Nature* 488: 531-534. doi: 10.1038/nature11285
- Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TF et al. (2009) Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatase via the PYR/PTL family of START proteins. *Science* 324: 1068-1071. Doi: 10.1126/science.1173041
- Payne RME, Xu D, Foureau E, Carqueijeiro MIST, Oudin A, de Bernonville TD, Novak V, Burow M, Olsen CE, Jones DM et al. (2017) An NPF transporter exports a central monoterpene indole alkaloid intermediate from the vacuole. *Nat Plants* 3: 16208. doi: 10.1038/nplants.2016.208
- Petrasek J, Friml J (2009) Auxin transport routes in plant development. *Development* 136: 2675-2688.

- Rodriguez PL, Lozano-Juste J, Albert A (2019) PYR/PYL/RCAR ABA receptors. *Adv Bot Res* 92: 51-82. doi: 10.1242/dev.030353
- Saito H, Oikawa T, Hamamoto S, Ishimaru Y, Kanamori-Sato M, Sasaki-Sekimoto Y, Utsumi T, Chen J, Kanno Y, Masuda S et al. (2015) The jasmonate-responsive GTR1 transporter is required for gibberellin-mediated stamen development in *Arabidopsis*. *Nat Commun* 6: 6095. doi: 10.1038/ncomms7095
- Schachtman DP, Goodger JQD (2008) Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends Plant Sci* 13: 281-287. doi: 10.1016/j.tplants.2008.04.003
- Seo M, Marion-Poll A (2019) Abscisic acid metabolism and transport. *Adv Bot Res* 92: 1-49. doi: 10.1016/bs.abr.2019.04.004
- Shimizu T, Kanno Y, Suzuki H, Watanabe S, Seo M (2021) *Arabidopsis* NPF4.6 and NPF5.1 control leaf stomatal aperture by regulating abscisic acid transport. *Genes* 12: 885. doi: 10.3390/genes12060885
- Shimizu T, Miyakawa S, Esaki T, Mizuno H, Masujima T, Koshihara T, Seo M (2015) Live single-cell plant hormone analysis by video-mass spectrometry. *Plant Cell Physiol* 56: 1287-1296. doi:10.1093/pcp/pcv042
- 清水崇史, 渡邊俊介, 鈴木洋弥, 竹林裕美子, 瀬尾光範 (2020) 植物科学における一細胞質量分析法: 植物ホルモンの定量と今後の展望. *J Mass Spec* 68: 26-32. doi: 10.5702/massspec.S20-0
- Tal I, Zhang Y, Jorgensen ME, Pisanty O, Barbosa ICR, Zourelidou M, Regnault T, Crocoll C, Olsen CE, Weinstain R, Schwechheimer C et al. (2016) The *Arabidopsis* NPF3 protein is a GA transporter. *Nat Commun* 7: 11486. doi: 10.1038/ncomms11486
- Tsay YF, Chiu CC, Tsai CB, Ho CH, Hsu PK (2007) Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Lett* 581: 2290-2300. doi: 10.1016/j.febslet.2007.04.047
- Veereshlingam H, Haynes JG, Penmetsa RV, Cook DR, Sherrier DJ, Dickstein R (2004) *nip*, a symbiotic *Medicago truncatula* mutant that forms root nodules with aberrant infection threads and plant defense-like response. *Plant Physiol* 136: 3692-3702. doi: 10.1104/pp.104.049064
- Watanabe S, Takahashi N, Kanno Y, Suzuki H, Aoi Y, Takeda-Kamiya N, Toyooka K, Kasahara H, Hayashi K, Umeda M et al. (2020) The *Arabidopsis* NRT1/PTR FAMILY protein NPF7.3/NRT1.5 is an indole-3-butyric acid transporter involved in root gravitropism. *Proc Natl Acad Sci USA* 117: 31500-31509. doi: 10.1073/pnas.2013305117

イメージングで明らかになる 茎頂メリステムにおける生理活性物質の時空間的パターン

木下 温子
東京都立大学 理学系研究科 生命科学専攻
〒192-0397 東京都八王子市南大沢 1-1

Spatiotemporal pattern of bioactive substances based on imaging technique

Atsuko Kinoshita

Tokyo Metropolitan University
1-1, Minami-Osawa, Hachioji, Tokyo, Japan 192-0397

Keywords: Doming, floral transition, gibberellin metabolism, shoot apical meristem

DOI: 10.24480/bsj-review.13b7.00230

1. はじめに

陸上植物の茎頂メリステムは、胚発生後の過程において地上部の器官形成を担う重要な組織である。その秩序だった形態形成は古くから解剖学的に解析されてきた。また近年の分子生物学の発展により、茎頂メリステムの維持機構で働く生理活性物質の存在や、その作用機構についても多くの知見が得られている。しかしながら、生理活性物質の局在を細胞レベルで明らかにすることは非常に困難であり、また異なる発生ステージにおける生理活性物質の分布の違いなど未解明の現象は多く残されている。本稿では、古典的解剖学の知見とともに、近年の分子生物学的成果を紹介し、イメージング技術を基盤として茎頂メリステムの形態変化や生理活性物質の時空間パターン変化にアプローチする可能性について議論したい。

2. 茎頂メリステムの構造と機能に関わる生理活性物質

2-1. 茎頂メリステムの基本構造

被子植物の茎頂メリステムは垂層分裂を繰り返して層構造を成す外衣 (tunica) と任意の分裂面をもつ細胞からなる内体 (corpus) により構成される (Schmidt 1924)。外衣は通常 L1, L2 層の 2 層から成り、内体に当たる内側の細胞群は L3 層とも呼ばれる (図 1A)。また、組織学的切片における染色の違いから、細胞分裂活性の低い中央帯 (Central zone: CZ)、さかんに細胞分裂を繰り返し側生器官原基に細胞を供給する周辺部 (Peripheral zone: PZ)、これらの下部に位置する髄状部 (Rib zone: RZ) の領域に大別される (Gifford 1954) (図 1B)。

シロイヌナズナを用いた分子遺伝学的解析により、茎頂メリステムの恒常性維持には CZ で発現する *WUSCHEL* (*WUS*) および *CLAVATA3* (*CLV3*) 間における細胞非自律的な相互遺伝子発現制御が重要であることが示されている (図 1C)。*WUS* はホメオドメイン型転写因子をコードし、茎頂メリステムにおける幹細胞 (stem cell) の性質を決定する因子である (Laux et al. 1996)。*WUS* は CZ の中でも特に細胞分裂活性の低い、形成中心 (Organizing center: OC)

と呼ばれる領域で発現し、この領域に属する細胞群は幹細胞ニッチとして機能すると考えられている(Mayer et al. 1998)。一方で、茎頂メリステムの幹細胞は OC の上部の領域に位置する。この領域に属する細胞は、一定の細胞分裂活性を持ち、自己と同じ幹細胞の性質をもつ細胞と、PZ へ移行し分化する運命に転じる細胞とに非対称分裂する能力を有するとされる(Laux 2003)。幹細胞で発現する *CLV3* は分泌性のペプチドリガンドをコードし、翻訳産物の C 末端に存在する進化的に保存された CLE ドメインが切り出され、化学修飾を受けて成熟型 *CLV3* ペプチドとなり、細胞外に分泌される (Fletcher 1999; Kondo et al. 2006; Ohyama et al. 2009)。成熟型 *CLV3* ペプチドは、OC 周辺で発現する受容体 *CLV1* に認識され、その後細胞内シグナル伝達を経て *WUS* の発現を抑制する (Clark et al. 1997; Ogawa et al. 2008; Shinohara and Matsubayashi 2015)。一方で、*WUS* は原形質連絡を介して幹細胞へと輸送され、*CLV3* 遺伝子の制御領域に直接結合してその発現を正に制御することが示されている (Yadav et al. 2011; Daum et al. 2014)。この結果成立する *WUS-CLV3* 間の負のフィードバック機構により、茎頂メリステムの恒常性が維持されると考えられている。

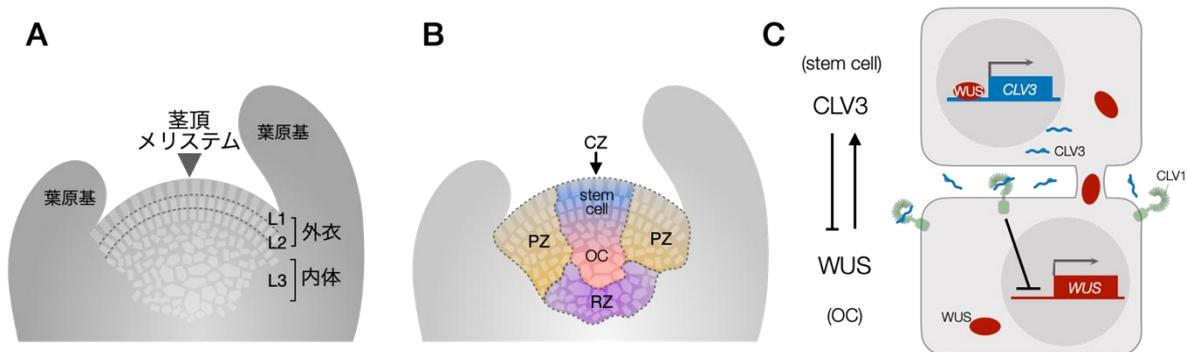


図 1. 茎頂メリステムの構造

(A) 茎頂メリステムの層構造。垂層分裂を繰り返す L1, L2 層が外衣に、任意の分裂面をもつ L3 層が内体に相当する。(B) 茎頂メリステムの細胞組織帯。CZ: 中央部, PZ: 周辺部, RZ: 髄状部, OC: 形成中心。(C) *WUS-CLV3* フィードバック機構。幹細胞から細胞外に分泌された *CLV3* ペプチドは *CLV1* に受容され、その下流で *WUS* の発現を抑制する。*WUS* は原形質連絡を介して幹細胞に移行し、*CLV3* の発現を直接誘導する。

2-2. 茎頂メリステムにおける植物ホルモンの機能

前項で紹介した *CLV3* は、近年植物で数多く見出されているペプチドホルモンの一種である (Matsubayashi and Sakagami 2006; Betsuyaku et al. 2011)。これに加え、従来の低分子植物ホルモンも茎頂メリステムの維持に重要な役割を担うことが知られている。植物ホルモンの機能は多岐にわたるが、本稿ではシロイヌナズナを用いて近年明らかにされた、茎頂メリステムの維持機構に関連する機能について紹介する (図 2)。各植物ホルモンの化学的性質やシグナル伝達機構については本や総説が出版されているのでそちらを参照されたい (浅見 and 柿本 2016)。

サイトカイニンは細胞分裂やシュート再生を誘導する植物ホルモンであり、茎頂メリステムの形成に重要な *KNOX* 型転写因子である *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* により正に制御される (Jasinski et al. 2005)。シロイヌナズナの茎頂メリステムにおいては、活性型サイトカ

イニン合成の最終段階で機能する *LONELY GUY (LOG) 4* 遺伝子が L1 層で特異的に発現することから、サイトカニンでは L1 層で合成され求散的に拡散することにより濃度勾配を形成すると考えられている (Chickarmane et al. 2012)。これに対し、サイトカニン受容体をコードする *AHK4* は OC を含む領域で強く発現し (Gordon et al. 2009)，さらにその下流で転写活性化因子として機能する Type-B ARR により *WUS* の発現が直接誘導されることが明らかとなっている (Meng et al. 2017; Xie et al. 2018)。また、サイトカニン添加により *CLV1* の遺伝子発現が低下することも確認されており、CLV シグナル伝達系の抑制により間接的に *WUS* を発現誘導することも示唆されている (Lindsay et al. 2006; Gordon et al. 2009)。一方で、*WUS* はサイトカニン応答の負の制御因子である Type-A ARR の遺伝子発現を抑制することから、*WUS* とサイトカニン応答の間にもフィードバック機構が成立すると考えられる (Leibfried et al. 2005)。コンピューターシミュレーションを用いた解析から、正の制御因子であるサイトカニンと負の制御因子である CLV3 ペプチドの拮抗作用は、*WUS* の特異的な発現部位の決定に重要であることが示されている (Gordon et al. 2009; Chickarmane et al. 2012)。

オーキシンは器官形成や葉序パターンの形成など茎頂メリステムにおける細胞の分化誘導に重要であり、主に PZ で機能すると考えられている (Reinhardt et al. 2003; Vernoux et al. 2011)。とりわけ、オーキシン応答転写因子である MONOPTEROS (MP)/ AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) 5 は、クロマチンリモデリング因子をリクルートすることにより、PZ における遺伝子発現を制御し、器官分化を誘導する重要な因子である (Przemeck et al. 1996; Yamaguchi et al. 2013; Wu et al. 2015; Chung et al. 2019)。一方で、MP/ARF5 は type-A ARR をコードする *ARR7* および *ARR15* の発現抑制を介してサイトカニン応答を調整することにより、茎頂メリステムの幹細胞性維持にも関与することが報告されている (Zhao et al. 2010)。更に、遺伝学的な分子ツールとゲノム解析を組み合わせた詳細な解析により、茎頂メリステムの幹細胞はオーキシンによる分化誘導を受けないこと、その背景には *WUS* によるオーキ

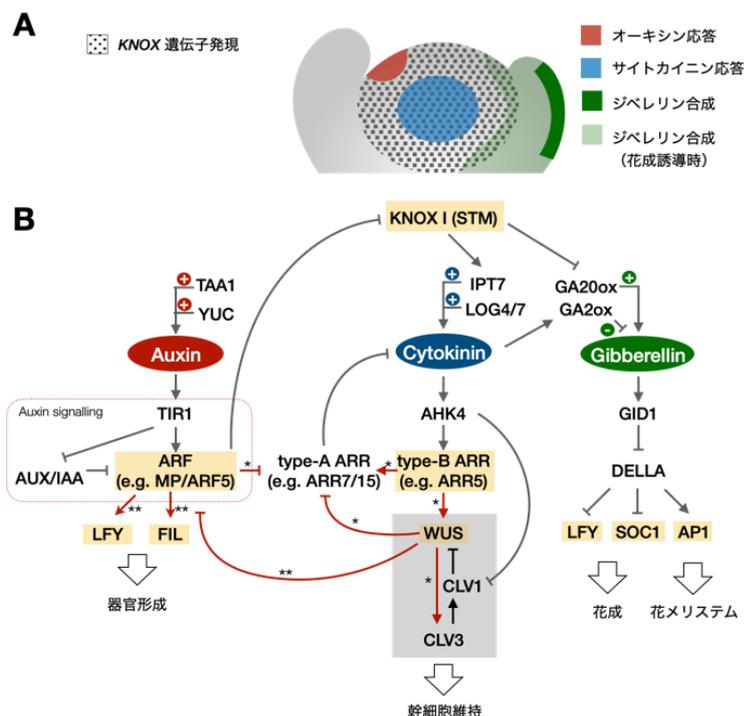


図2. 茎頂メリステムにおける植物ホルモンの機能

(A) 茎頂メリステムにおける植物ホルモンの分布模式図。オーキシン・サイトカニン応答やジベレリン合成酵素の発現、*KNOX* 遺伝子の発現部位を模式的に示す。

(B) 茎頂メリステムにおける植物ホルモンのクロストーク。転写調節をもつ因子を黄色の網掛けで示す。*は直接的転写制御を、**はクロマチンリモデリングを介した転写制御を示す。

シンシグナリングの包括的な遺伝子発現抑制があることが明らかにされた。同時に、茎頂メリステムの幹細胞維持には一定レベルのオーキシシンシグナリングが必要であることも示されており、このように極めて精緻なオーキシシンシグナリングの制御は標的遺伝子の緩やかなヒストン脱アセチル化を介していることが示唆されている (Ma et al. 2019)。このように、WUS-CLV3 間の相互作用を主軸とした茎頂メリステムの幹細胞維持機構は、代表的な植物ホルモンであるオーキシシンとサイトカイニンによる複数のフィードバックを受け、さらに厳密に制御されると考えられる。

オーキシシンとサイトカイニン以外の植物ホルモンについては、茎頂メリステムにおける機能がほとんど明らかにされていないが、ジベレリンに関しては複数の植物種において、KNOX 型転写因子により茎頂メリステムにおけるジベレリン代謝酵素の遺伝子発現が制御されることが示されている (Sakamoto et al. 2001a, 2001b; Hay et al. 2002; Chen et al. 2004; Bolduc and Hake 2009)。また、サイトカイニン欠乏状態においてジベレリンのシグナル伝達を構成的に活性化すると、茎頂メリステムが著しく損なわれることから、KNOX 型転写因子によるサイトカイニンとジベレリンの代謝制御が茎頂メリステムの正常な機能に重要であると考えられている (Jasinski et al. 2005)。興味深いことに、近年著者らが行った解析により、茎頂メリステムにおけるジベレリン生合成酵素の遺伝子発現が花成誘導時にメリステムの PZ まで拡大することが示された (Kinoshita et al. 2020) (図 2A)。この結果は、茎頂メリステムにおける生理活性物質のバランスが植物の発生ステージに応じて変化しうることを示唆している。

3. 植物の成長相転換を制御する生理活性物質

3-1. フロリゲンによる光周期花成

植物はその発生ステージに応じて異なる形態を示す。花成は、植物が栄養生長から生殖生長に転じる重要な成長相転換であり、光周期 (日長)、気温、齢、植物ホルモンなど、複数の外的・内的因子によって制御される (図 3)。これらの外的・内的因子はそれぞれ情報伝達経路を介して *FLOWERING LOCUS T (FT)*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS (SOC) 1*, *LEAFY (LFY)* などの経路統合遺伝子へと集約され、最終的には茎頂メリステムにおいて *LFY*, *APETALA (AP) 1*, *FRUITFULL (FUL)* などの花芽形成決定遺伝子を活性化することにより、花メリステムの形成を誘導する (Andrés and Coupland 2012)。

光周期は花成誘導に重要な外的因子の一つであり、春化を必要としない *Columbia* などのシロイヌナズナ実験室栽培系統ではとりわけ強力な花成誘導能を持つ。このシグナル伝達経路で特に重要な役割を持つのが、葉から茎頂へ情報を伝える長距離移行シグナルのフロリゲンである (図 3)。シロイヌナズナやイネの解析から、フロリゲンの実体は FT/Hd3a タンパク質であることが示されている (Corbesier et al. 2007; Tamaki et al. 2007; Jaeger and Wigge 2007; Mathieu et al. 2007)。シロイヌナズナでは長日条件下で葉の維管束篩部細胞における *FT* 遺伝子の発現が誘導され、その翻訳産物である FT タンパク質は茎頂に輸送される。茎頂に到達した FT タンパク質は 14-3-3 タンパク質を介して bZIP 型転写因子である FD と相互作用し、*API* を代表とする花芽形成遺伝子を活性化することにより花メリステムの形成を誘導する (Abe et al. 2005; Wigge et al. 2005; Taoka et al. 2011)。近年、改変型 BiFC を用いたイメージン

グ解析により、花成誘導時の茎頂メリステムにおけるフロリゲン複合体 (FT-FD 複合体) の挙動が詳細に検証され、*API* の発現が開始する原基形成予定部位 (floral anlagen) においてフロリゲン複合体が共局在すること、またフロリゲン複合体は花成誘導後速やかに減少することが明らかにされた (Abe et al. 2019)。この知見は、茎頂メリステムにおけるフロリゲン複合体の時空間的な作用が極めてダイナミックに変化していることを示唆している。

3-2. フロリゲンとアンチフロリゲンによる標的遺伝子の制御

FT は phosphatidylethanolamine binding protein (PEBP) ファミリーに属する約 20kDa のタンパク質であり、花成の誘導因子として機能する。一方、同じ PEBP ファミリーに属する TERMINAL FLOWER (TFL) 1 は花成抑制因子 (アンチフロリゲン) として機能することが知られている (Bradley et al. 1997)。近年、ゲノムワイドな標的配列解析や薬剤処理による発現誘導実験の結果から、FT と TFL1 が FD との複合体形成において競合的に働き、花成時期を制御していることが明らかとなった (Collani et al. 2019; Goretti et al. 2020; Zhu et al. 2020)。特に、花芽形成のマスターレギュレーターをコードする *LFY* は、FT-FD 複合体および TFL1-FD 複合体の共通の標的遺伝子であり、それぞれ正および負の制御を受けることにより、花成の時期を制御すると考えられる。また、TFL1-FD 複合体はアブシジン酸、サイトカニン、ブラシノステロイド、オーキシン、ストリゴラクトンなどの植物ホルモンや、糖のシグナル伝達に関与する遺伝子の抑制にも関与することが示された (Zhu et al. 2020)。これらの生理活性物質は、花芽の形成に促進的に働く一方、側枝の形成を抑制する働きを持つことから、TFL1 は花成の時期だけでなく植物の花序の分枝形態も制御することが示唆されている (図 4A)。

3-3. ジベレリンによる花成誘導

植物ホルモンのジベレリンは、ロゼット植物を中心とする長日植物において、花成誘導に一定の効果を持つとされる内生のシグナルである (Bao et al. 2020)。シロイヌナズナでは、ジベレリン欠損変異体が短日条件下で花成に至らないことから、特に非誘導条件下における花成に必須であると考えられている (Wilson et al. 1992)。組織特異的プロモーターを用いた解析から、ジベレリンは葉および茎頂の両組織において花成に促進的に働くことが明らかにされた (Porri et al. 2012; Galvão et al. 2012) (図 3)。ジベレリンは葉での *FT* 遺伝子発現を誘導する一方、茎頂メリステムにおいては経路統合遺伝子である *SOCI* や *LFY* の遺伝子発現を促進す

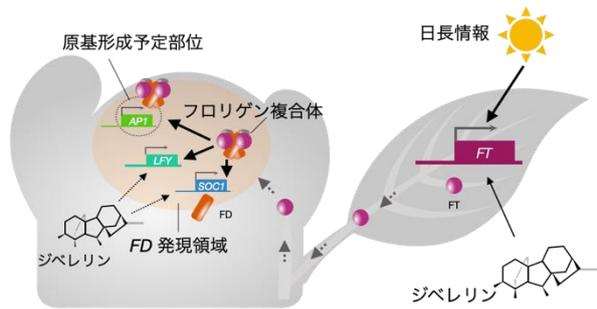


図 3. シロイヌナズナにおける花成制御

外的・内的因子の情報は葉で受容され、経路統合遺伝子である *FT* の遺伝子発現に集約される。*FT* タンパク質は長距離移行シグナルとして茎頂に輸送され、メリステムで発現する *FD* と相互作用してフロリゲン複合体を形成する。フロリゲン複合体の下流で経路統合遺伝子である *SOCI* や *LFY* の発現が誘導され、最終的には原基形成予定部位において花芽形成決定遺伝子である *API* の発現を誘導することにより花器官の分化を決定する。

ることが示されている (Moon et al. 2003; Eriksson et al. 2006; Bao et al. 2019)。しかしながら、長日条件下においてはフロリゲンによる強力な花成誘導の効果に比べ、その機能は限定的である。

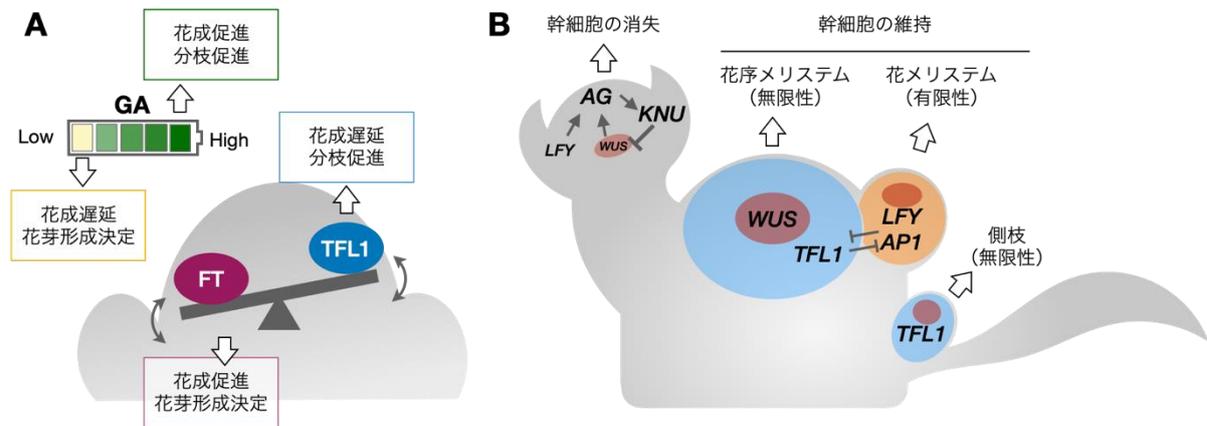


図4. 異なる発生ステージにおけるメリステムのアイデンティティ

(A) 成長相転換期におけるメリステムのアイデンティティ決定。FD のパートナーである FT と TFL1 のバランスは、花成の時期や器官原基のアイデンティティ決定に作用する。また、ジベレリンの濃度も FT/TFL1 とは異なるメカニズムで花成の時期や器官原基のアイデンティティ決定に関与する。(B) 生殖成長期におけるメリステムのアイデンティティ決定。TFL1 (青) は花序および側芽のメリステムで発現し、LFY/API (橙) の発現を抑制することにより花メリステムへの転換を抑制する。LFY/API は花メリステムのアイデンティティを決定し、花器官の分化を誘導する。WUS (赤) により誘導される AG は KNU の発現誘導を介して WUS を抑制し、この結果花メリステムの幹細胞が維持されず終結する。

4. 植物の成長相転換とメリステムの性質転換

4-1. メリステムと発生ステージ

茎頂メリステムの無限性は、植物がその一生を通じて新たな器官を形成し続けるために必須である。その意義は栄養成長期において特に顕著であるが、生殖成長期においてはその限りではない。植物は、その繁殖戦略により生殖成長期におけるメリステムの無限性、有限性を段階的に制御し、その結果として多様な花序形態を生み出している (Sablowski 2007; Benlloch et al. 2015; Périlleux et al. 2019)。

生殖成長期に形成される花原基は幹細胞を有し、複数の花器官を形成する能力をもつことから花メリステムと呼ばれる。一般的に、花メリステムは有限性のメリステムであり、一定の花器官を形成した後に幹細胞の性質が失われ、終結する。この過程に関しては、花メリステムのアイデンティティが確立した後に WUS と LFY によって誘導される AGAMOUS (AG) 転写因子が、ヒストン修飾を介した KNUCKLE (KNU) 発現誘導により WUS の発現を抑制するという、時間差制御機構が明らかにされている (Yanofsky et al. 1990; Lenhard et al. 2001; Sun et al. 2009, 2014)。チューリップやスミレのように単頂花序を持つ植物では、花成にともない茎頂メリステムは花メリステムへと転換し、これはすなわち主茎における無限成長の終結を意味する。一方で、多くの植物種では花成にともない茎頂メリステムは花序メリステムへと転換し、この花序メリステムから側枝あるいは花メリステムが形成される。花序形態によっ

て期間に相違はあるものの、シロイヌナズナのような総状花序をもつ種では、花序メリステムにおいても WUS-CLV3 間の負のフィードバック機構により幹細胞が維持されており、ほぼ永続的に花メリステムを形成する能力をもつ (図 4B)。成長相転換にともない茎頂メリステムが花序メリステムあるいは花メリステムのいずれに転換するのか、また花序メリステムにおける無限性や側方原基のアイデンティティがどのように制御されているのか。これらの点は、生殖成長期におけるメリステムの性質転換と密接な関係があり、また植物における花序形態の多様性を理解する上で重要な要素である。

4-2. 生殖成長期におけるメリステムのアイデンティティ決定

TFL1 は花成抑制因子として働く一方、メリステムのアイデンティティ決定にも作用することが知られている。TFL1 は茎頂メリステムの CZ で発現し、その発現レベルは花成に先立って顕著に上昇する (Bradley et al. 1997)。TFL1 の機能欠損変異体では花序メリステムが早期に花メリステムへと転換し終結することにより、有限花序様の形態を示すことが観察されている。遺伝学的な機能解析により、TFL1 は花メリステムのアイデンティティ決定に必要な LFY や API など MADS ボックス型転写因子をコードする遺伝子の発現を花序メリステムで抑制する機能を持つことが示された。一方で、花メリステムで強く発現する LFY および API は TFL1 の発現を抑制する機能を持ち、このような相互に抑制的な遺伝子発現制御機構により、花序メリステムと花メリステムのアイデンティティが確立される (Ratcliffe et al. 1999) (図 4B)。

生殖成長期において、花序メリステムからは花メリステムのみならず、苞葉の腋芽から側枝として新たな花序メリステムも形成される。シロイヌナズナでは、生殖成長期の前期には茎生葉および側枝を形成し、その後花メリステムを形成する後期へと移行する (Pouteau and Albertini 2011)。生殖成長前期から後期への移行には、植物ホルモンのジベレリンの関与が示唆されている。3-3 で述べたように、シロイヌナズナにおいてジベレリンは栄養成長期から生殖成長期への転換に促進的に働く。一方で、ジベレリンは側枝の形成から花メリステムの形成への転換には抑制的に働き、ジベレリンが高蓄積した遺伝学的背景では側枝の数が増大することが報告されている。側枝と花メリステムのアイデンティティ決定には、ジベレリンシグナリングの標的因子である DELLA タンパク質と SQUAMOSA PROMOTER-BINDING LIKE (SPL) 転写因子による協調的な API 遺伝子の発現制御があることが示されている (Yamaguchi et al. 2014) (図 2B)。上記のように、ジベレリンもまた TFL1 とは異なる作用機構で花序の分枝形態を制御しうると考えられる (図 4A)。

4-3. 成長相転換にともなうメリステムの形態変化

前項で紹介したように、栄養成長期から生殖成長期への転換は、茎頂メリステムから花序メリステムあるいは花メリステムへの転換と捉えられる。この転換の過程には、メリステムにおける遺伝子発現プロファイルのみならず、形態的にも大規模な変化が起こることが明らかにされている (Kwiatkowska 2008)。

成長相転換にともなうメリステムの形態変化のうちで最も顕著なものが、細胞分裂活性の変化である。組織切片を用いた古典的な解剖学的解析から、花成の日長要求性や花序形態によらず様々な植物種において、花成にともない茎頂メリステムの細胞分裂活性が上昇することが報告されている (Kwiatkowska 2008)。特に、細胞分裂活性が低いとされている CZ において細胞分裂の活性化が認められ、細胞組織帯の構造が変化の様子が観察されている (Bodson 1975; Marc and Palmer 1982)。一方で、メリステムの内部の細胞は順々に液胞化し、その結果として茎頂メリステムのサイズは全体的に大きくなり、しばしば高いドーム状の構造 (ドーミング) へと変化する。また、細胞分裂活性の変化の他にも、アブラナ科のシロガラシにおいて花成にともなう原形質連絡の増大や、細胞周期の同調の例などが報告されている (Ormenese et al. 2000, 2002)。

このような細胞分裂活性やメリステムの形態変化の例は数多く報告されているにも関わらず、その分子メカニズムについてはほとんど明らかにされていない。その原因として、これらの知見が主に古典的な解剖学的知見に基づいており、遺伝学的な検証が欠如していることが挙げられる。モデル植物のシロイヌナズナにおいても、領域ごとの細胞分裂活性は検証されているものの、その分子機構については十分検証されているとは言い難い (Laufs et al. 1998; Jacquard et al. 2003; Reddy et al. 2004)。近年、トマトにおいてアンチフロリゲンをコードする *SELF PRUNING (SP)* の発現抑制が解除されることにより早期にドーミングが起こる変異体が単離されており、花成にともなうアンチフロリゲンの増大がメリステムのサイズを制御する可能性が示唆されている (Tal et al. 2017)。また、筆者らは 3D 画像解析を用いて花成にともなう茎頂メリステムの形態変化を定量的に解析し、花成に促進的に働く FT とジベレリンの関与を検証した。その結果、長日条件における花成の誘導に際しメリステムの細胞数と細胞サイズがいずれも増大すること、またこの過程には FT とジベレリンの両者が寄与していることを報告した (Kinoshita et al. 2020)。これらの知見は、メリステムの形態が大きく変化する成長相転換期において、メリステムの恒常性を攪乱する作用をもつ生理活性物質が存在することを示唆しており、このような発生ステージ依存的な制御機構に関してはさらなる遺伝学的検証の余地が残されていると考えられる。

5. まとめ

本稿では、茎頂メリステムにおける様々な生理活性物質の局在や機能について紹介した。ここでは取り上げなかったが、CLE40 や EPFL など茎頂メリステムで機能することが示唆されているペプチドホルモンも多く存在する (Uchida et al. 2013; Zhang et al. 2021; Schlegel et al. 2021)。このように、茎頂メリステムという微細な構造の中では、実に多くの生理活性物質が細胞の内外を行き交い、しかもその局在や濃度は発生ステージに応じてダイナミックに変動している。低分子の生理活性物質の検出は技術的に困難であると考えられているが、機能的な生合成酵素の局在や、シグナリングレポーターの利用、さらにタンパク質間相互作用を利用した検出系の開発など、イメージング技術を基盤としたアプローチにより、その一端が徐々に明らかになりつつある。今後も、新たな技術の開発と遺伝学的アプローチの融合により、異なる発生ステージにおける生理活性物質の挙動が明らかになると期待される。

謝辞

本稿の執筆にあたっては、JSPS 海外特別研究員奨励費、アレクサンダー・フォン・フンボルト財団、公益社団法人 内藤記念科学振興財団の助成をいただきました。この場を借りて御礼申し上げます。

引用文献

- Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, Ikeda Y, Ichinoki H, Notaguchi M, Goto K, Araki T (2005) FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* 309:1052–1056. doi: 10.1126/science.1115983
- Abe M, Kosaka S, Shibuta M, Nagata K, Uemura T, Nakano A, Kaya H (2019) Transient activity of the florigen complex during the floral transition in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 146:dev171504. doi: 10.1242/dev.171504
- Andrés F, Coupland G (2012) The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nat Rev Genet* 13:627–639. doi: 10.1038/nrg3291
- 浅見忠男, 柿本辰男 (2016) 新しい植物ホルモンの科学 第3版. 講談社, 東京
- Bao S, Hua C, Huang G, Cheng P, Gong X, Shen L, Yu H (2019) Molecular Basis of Natural Variation in Photoperiodic Flowering Responses. *Dev Cell* 50:90-101.e3. doi: 10.1016/j.devcel.2019.05.018
- Bao S, Hua C, Shen L, Yu H (2020) New insights into gibberellin signaling in regulating flowering in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol* 62:118–131. doi: 10.1111/jipb.12892
- Benlloch R, Berbel A, Ali L, Gohari G, Millán T, Madueño F (2015) Genetic control of inflorescence architecture in legumes. *Front Plant Sci* 6:1–14. doi: 10.3389/fpls.2015.00543
- Betsuyaku S, Sawa S, Yamada M (2011) The Function of the CLE Peptides in Plant Development and Plant-Microbe Interactions. *The Arabidopsis Book* 2011:e0149. doi: 10.1199/tab.0149
- Bodson M (1975) Variation in the Rate of Cell Division in the Apical Meristem of *Sinapis alba* During Transition to Flowering. *Ann Bot* 39:547–554. doi: 10.1093/oxfordjournals.aob.a084965
- Bolduc N, Hake S (2009) The Maize Transcription Factor KNOTTED1 Directly Regulates the Gibberellin Catabolism Gene *ga2ox1*. *Plant Cell* 21:1647–1658. doi: 10.1105/tpc.109.068221
- Bradley D, Ratcliffe O, Vincent C, Carpenter R, Coen E (1997) Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science* 275:80–83. doi: 10.1126/science.275.5296.80
- Chen H, Banerjee AK, Hannapel DJ (2004) The tandem complex of BEL and KNOX partners is required for transcriptional repression of *ga2ox1*. *Plant J* 38:276–284. doi: 10.1111/j.1365-313x.2004.02048.x.
- Chickarmane VS, Gordon SP, Tarr PT, Heisler MG, Meyerowitz EM (2012) Cytokinin signaling as a positional cue for patterning the apical-basal axis of the growing *Arabidopsis* shoot meristem. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:4002–4007. doi: 10.1073/pnas.1200636109
- Chung Y, Zhu Y, Wu MF, Simonini S, Kuhn A, Armenta-Medina A, Jin R, Østergaard L, Gillmor CS, Wagner D (2019) Auxin Response Factors promote organogenesis by chromatin-mediated repression of the pluripotency gene SHOOTMERISTEMLESS. *Nat Commun* 10:1–11. doi: 10.1038/s41467-019-08861-3

- Clark SE, Williams RW, Meyerowitz EM (1997) The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in arabidopsis. *Cell* 89:575–585. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80239-1
- Collani S, Neumann M, Yant L, Schmid M (2019) FT Modulates Genome-Wide DNA-Binding of the bZIP Transcription Factor FD. *Plant Physiol* 180:367–380. doi: 10.1104/pp.18.01505
- Corbesier L, Vincent C, Jang S, Fornara F, Fan Q, Searle I, Giakountis A, Farrona S, Gissot L, Turnbull C et al. (2007) FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of Arabidopsis. *Science* 316:1030–1033. doi: 10.1126/science.1141752
- Daum G, Medzihradzky A, Suzaki T, Lohmann JU (2014) A mechanistic framework for noncell autonomous stem cell induction in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:14619–14624. doi: 10.1073/pnas.1406446111
- Eriksson S, Böhlenius H, Moritz T, Nilsson O (2006) GA4 Is the Active Gibberellin in the Regulation of LEAFY Transcription and Arabidopsis Floral Initiation. *Plant Cell* 18:2172–2181. doi: 10.1105/tpc.106.042317
- Fletcher JC (1999) Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in Arabidopsis shoot meristems. *Science* 283:1911–1914. doi: 10.1126/science.283.5409.1911
- Galvão VC, Horrer D, Küttner F, Schmid M (2012) Spatial control of flowering by DELLA proteins in Arabidopsis thaliana. *Development* 139:4072–4082. doi: 10.1242/dev.080879
- Gifford EM (1954) The shoot apex in angiosperms. *Bot Rev* 20:477–529. doi: 10.1007/bf02957569
- Gordon SP, Chickarmane VS, Ohno C, Meyerowitz EM (2009) Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the Arabidopsis shoot meristem. *Proc Natl Acad Sci* 106:16529–16534. doi: 10.1073/pnas.0908122106
- Goretti D, Silvestre M, Collani S, Langenecker T, Méndez C, Madueño F, Schmid M (2020) TERMINAL FLOWER1 Functions as a Mobile Transcriptional Cofactor in the Shoot Apical Meristem. *Plant Physiol* 182:2081–2095. doi: 10.1104/pp.19.00867
- Hay A, Kaur H, Phillips A, Hedden P, Hake S, Tsiantis M (2002) The Gibberellin Pathway Mediates KNOTTED1-Type Homeobox Function in Plants with Different Body Plans. *Curr Biol* 12:1557–1565. doi: 10.1016/s0960-9822(02)01125-9
- Jacqumard A, Gadsisseur I, Bernier G (2003) Cell Division and Morphological Changes in the Shoot Apex of Arabidopsis thaliana during Floral Transition. *Ann Bot* 91:571–576. doi: 10.1093/aob/mcg053
- Jaeger KE, Wigge PA (2007) FT Protein Acts as a Long-Range Signal in Arabidopsis. *Curr Biol* 17:1050–1054. doi: 10.1016/j.cub.2007.05.008
- Jasinski S, Piazza P, Craft J, Hay A, Woolley L, Rieu I, Phillips A, Hedden P, Tsiantis M (2005) KNOX action in Arabidopsis is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Curr Biol* 15:1560–1565. doi: 10.1016/j.cub.2005.07.023
- Kinoshita A, Vayssières A, Richter R, Sang Q, Roggen A, Van Driel AD, Smith RS, Coupland G (2020) Regulation of shoot meristem shape by photoperiodic signaling and phytohormones during floral induction of arabidopsis. *Elife* 9:1–29. doi: 10.7554/elife.60661
- Kondo T, Sawa S, Kinoshita A, Mizuno S, Kakimoto T, Fukuda H, Sakagami Y (2006) A plant peptide

- encoded by CLV3 identified by in situ MALDI-TOF MS analysis. *Science* 313:845–848. doi: 10.1126/science.1128439
- Kwiatkowska D (2008) Flowering and apical meristem growth dynamics. *J Exp Bot* 59:187–201. doi: 10.1093/jxb/erm290
- Laufs P, Grandjean O, Jonak C, Kiêu K, Traas J (1998) Cellular Parameters of the Shoot Apical Meristem in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:1375–1389. doi: 10.1105/tpc.10.8.1375
- Laux T (2003) The Stem Cell Concept in Plants: A Matter of Debate. *Cell* 113:281–283. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00312-x
- Laux T, Mayer KFX, Berger J, Jürgens G (1996) The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* 122:87–96. doi: 10.1242/dev.122.1.87
- Leibfried A, To JPC, Busch W, Stehling S, Kehle A, Demar M, Kieber JJ, Lohmann JU (2005) WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature* 438:1172–1175. doi: 10.1038/nature04270
- Lenhard M, Bohnert A, Jürgens G, Laux T (2001) Termination of Stem Cell Maintenance in *Arabidopsis* Floral Meristems by Interactions between WUSCHEL and AGAMOUS. *Cell* 105:805–814. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00390-7
- Lindsay DL, Sawhney VK, Bonham-Smith PC (2006) Cytokinin-induced changes in CLAVATA1 and WUSCHEL expression temporally coincide with altered floral development in *Arabidopsis*. *Plant Sci* 170:1111–1117. doi: 10.1016/j.plantsci.2006.01.015
- Ma Y, Miotk A, Šutiković Z, Ermakova O, Wenzl C, Medzihradský A, Gaillochet C, Forner J, Utan G, Brackmann K et al. (2019) WUSCHEL acts as an auxin response rheostat to maintain apical stem cells in *Arabidopsis*. *Nat Commun* 10:5093. doi: 10.1038/s41467-019-13074-9
- Marc J, Palmer JH (1982) Changes in Mitotic Activity and Cell Size in the Aical Meristem of *Helianthus annuus* L. during the Transition to Flowering. *Am J Bot* 69:768–775. doi: 10.1002/j.1537-2197.1982.tb13317.x
- Mathieu J, Warthmann N, Küttner F, Schmid M (2007) Export of FT Protein from Phloem Companion Cells Is Sufficient for Floral Induction in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 17:1055–1060. doi: 10.1016/j.cub.2007.05.009
- Matsubayashi Y, Sakagami Y (2006) Peptide Hormones in Plants. *Annu Rev Plant Biol* 57:649–674. doi: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144204
- Mayer KFX, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jürgens G, Laux T (1998) Role of WUSCHEL in Regulating Stem Cell Fate in the *Arabidopsis* Shoot Meristem. *Cell* 95:805–815. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81703-1
- Meng WJ, Cheng ZJ, Sang YL, Zhang MM, Rong XF, Wang ZW, Tang YY, Zhang XS (2017) Type-B ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS Specify the Shoot Stem Cell Niche by Dual Regulation of WUSCHEL. *Plant Cell* 29:1357–1372. doi: 10.1105/tpc.16.00640
- Moon J, Suh SS, Lee H, Choi KR, Hong CB, Paek NC, Kim SG, Lee I (2003) The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*. *Plant J* 35:613–623. doi: 10.1046/j.1365-313x.2003.01833.x

- Ogawa M, Shinohara H, Sakagami Y, Matsubayashi Y (2008) Arabidopsis CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science* 319:294. doi: 10.1126/science.1150083
- Ohyama K, Shinohara H, Ogawa-Ohnishi M, Matsubayashi Y (2009) A glycopeptide regulating stem cell fate in Arabidopsis thaliana. *Nat Chem Biol* 2009 5:578–580. doi: 10.1038/nchembio.182
- Ormenese S, Havelange A, Bernier G, Van der Schoot C (2002) The shoot apical meristem of *Sinapis alba* L. expands its central symplasmic field during the floral transition. *Planta* 215:67–78. doi: 10.1007/s00425-002-0746-0
- Ormenese S, Havelange A, Deltour R, Bernier G (2000) The frequency of plasmodesmata increases early in the whole shoot apical meristem of *Sinapis alba* L. during floral transition. *Planta* 211:370–375. doi: 10.1007/s004250000294
- Périlleux C, Bouché F, Randoux M, Orman-Ligeza B (2019) Turning Meristems into Fortresses. *Trends Plant Sci* 24:431–442. doi: 10.1016/j.tplants.2019.02.004
- Porri A, Torti S, Romera-Branchat M, Coupland G (2012) Spatially distinct regulatory roles for gibberellins in the promotion of flowering of Arabidopsis under long photoperiods. *Development* 139:2198–2209. doi: 10.1242/dev.077164
- Pouteau S, Albertini C (2011) An assessment of morphogenetic fluctuation during reproductive phase change in Arabidopsis. *Ann Bot* 107:1017–1027. doi: 10.1093/aob/mcr039
- Przemeck GKH, Mattsson J, Hardtke CS, Sung ZR, Berleth T (1996) Studies on the role of the Arabidopsis gene MONOPTEROS in vascular development and plant cell axialization. *Planta* 200:229–237. doi: 10.1007/bf00208313
- Ratcliffe OJ, Bradley DJ, Coen ES (1999) Separation of shoot and floral identity in Arabidopsis. *Development* 126:1109–1120. doi: 10.1242/dev.126.6.1109
- Reddy GV, Heisler MG, Ehrhardt DW, Meyerowitz EM (2004) Real-time lineage analysis reveals oriented cell divisions associated with morphogenesis at the shoot apex of Arabidopsis thaliana. *Development* 131:4225–4237. doi: 10.1242/dev.01261
- Reinhardt D, Pesce ER, Stieger P, Mandel T, Baltensperger K, Bennett M, Traas J, Friml J, Kuhlemeier C (2003) Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* 426:255–260. doi: 10.1038/nature02081
- Sablowski R (2007) Flowering and determinacy in Arabidopsis. *J Exp Bot* 58:899–907 doi: 10.1093/jxb/erm002
- Sakamoto T, Kamiya N, Ueguchi-Tanaka M, Iwahori S, Matsuoka M (2001a) KNOX homeodomain protein directly suppresses the expression of a gibberellin biosynthetic gene in the tobacco shoot apical meristem. *Genes Dev* 15:581. doi: 10.1101/gad.867901
- Sakamoto T, Kobayashi M, Itoh H, Tagiri A, Kayano T, Tanaka H, Iwahori S, Matsuoka M (2001b) Expression of a Gibberellin 2-Oxidase Gene around the Shoot Apex Is Related to Phase Transition in Rice. *Plant Physiol* 125:1508–1516. doi: 10.1104/pp.125.3.1508
- Schlegel J, Denay G, Wink R, Pinto KG, Stahl Y, Schmid J, Blümke P, Simon R (2021) Control of Arabidopsis shoot stem cell homeostasis by two antagonistic cle peptide signalling pathways. *Elife* 10:e70934. doi: 10.7554/elife.70934

- Schmidt A (1924) Histologische studien an phanerogamen vegetationspunkten. *Bot Arch* 8:345–404
- Shinohara H, Matsubayashi Y (2015) Reevaluation of the CLV3-receptor interaction in the shoot apical meristem: dissection of the CLV3 signaling pathway from a direct ligand-binding point of view. *Plant J* 82:328–336. doi: 10.1111/tpj.12817
- Sun B, Looi LS, Guo S, He Z, Gan ES, Huang J, Xu Y, Wee WY, Ito T (2014) Timing mechanism dependent on cell division is invoked by Polycomb eviction in plant stem cells. *Science* 343:1248559. doi: 10.1126/science.1248559
- Sun B, Xu Y, Ng KH, Ito T (2009) A timing mechanism for stem cell maintenance and differentiation in the Arabidopsis floral meristem. *Genes Dev* 23:1791–1804. doi: 10.1101/gad.1800409
- Tal L, Friedlander G, Gilboa NS, Unger T, Gilad S, Eshed Y (2017) Coordination of Meristem Doming and the Floral Transition by Late Termination, a Kelch Repeat Protein. *Plant Cell* 29:681. doi: 10.1105/tpc.17.00030
- Tamaki S, Matsuo S, Hann LW, Yokoi S, Shimamoto K (2007) Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science* 316:1033–1036. doi: 10.1073/pnas.1417623112
- Taoka KI, Ohki I, Tsuji H, Furuita K, Hayashi K, Yanase T, Yamaguchi M, Nakashima C, Purwestri YA, Tamaki S et al. (2011) 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen. *Nature* 476:332–335. doi: 10.1038/nature10272
- Uchida N, Shimada M, Tasaka M (2013) ERECTA-Family Receptor Kinases Regulate Stem Cell Homeostasis via Buffering its Cytokinin Responsiveness in the Shoot Apical Meristem. *Plant Cell Physiol* 54:343–351. doi: 10.1093/pcp/pcs109
- Vernoux T, Brunoud G, Farcot E, Morin V, van den Daele H, Legrand J, Oliva M, Das P, Larrieu A, Wells D et al. (2011) The auxin signalling network translates dynamic input into robust patterning at the shoot apex. *Mol Syst Biol* 7:508. doi: 10.1038/msb.2011.39
- Wigge PA, Kim MC, Jaeger KE, Busch W, Schmid M, Lohmann JU, Weigel D (2005) Integration of spatial and temporal information during floral induction in Arabidopsis. *Science* 309:1056–1059. doi: 10.1126/science.1114358
- Wilson RN, Heckman JW, Somerville CR (1992) Gibberellin Is Required for Flowering in Arabidopsis thaliana under Short Days. *Plant Physiol* 100:403–408. doi: 10.1104/pp.100.1.403
- Wu MF, Yamaguchi N, Xiao J, Bargmann B, Estelle M, Sang Y, Wagner D (2015) Auxin-regulated chromatin switch directs acquisition of flower primordium founder fate. *Elife* 4:e09269. doi: 10.7554/elife.09269
- Xie M, Chen H, Huang L, O’Neil RC, Shokhirev MN, Ecker JR (2018) A B-ARR-mediated cytokinin transcriptional network directs hormone cross-regulation and shoot development. *Nat Commun* 9:1–13. doi: 10.1038/s41467-018-03921-6
- Yadav RK, Perales M, Gruel J, Girke T, Jönsson H, Venugopala Reddy G (2011) WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot apex. *Genes Dev* 25:2025–2030. doi: 10.1101/gad.17258511
- Yamaguchi N, Winter CM, Wu MF, Kanno Y, Yamaguchi A, Seo M, Wagner D (2014) Gibberellin acts positively then negatively to control onset of flower formation in Arabidopsis. *Science* 344:638–

641. doi: 10.1126/science.1250498

Yamaguchi N, Wu MF, Winter CM, Berns MC, Nole-Wilson S, Yamaguchi A, Coupland G, Krizek BA, Wagner D (2013) A Molecular Framework for Auxin-Mediated Initiation of Flower Primordia. *Dev Cell* 24:271–282. doi: 10.1016/j.devcel.2012.12.017

Yanofsky MF, Ma H, Bowman JL, Drews GN, Feldmann KA, Meyerowitz EM (1990) The protein encoded by the Arabidopsis homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature* 346:35–39. doi: 10.1038/346035a0

Zhang L, Gennaro D De, Lin G, Chai J, Shpak ED (2021) ERECTA family signaling constrains CLAVATA3 and WUSCHEL to the center of the shoot apical meristem. *Development* 148:dev189753. doi: 10.1242/dev.189753/237495

Zhao Z, Andersen SU, Ljung K, Dolezal K, Miotk A, Schultheiss SJ, Lohmann JU (2010) Hormonal control of the shoot stem-cell niche. *Nature* 465:1089–1092. doi: 10.1038/nature09126

Zhu Y, Klasfeld S, Jeong CW, Jin R, Goto K, Yamaguchi N, Wagner D (2020) TERMINAL FLOWER 1-FD complex target genes and competition with FLOWERING LOCUS T. *Nat Commun* 11:1–12. doi: 10.1038/s41467-020-18782-1