

研究終了報告書

「根寄生雑草耐性作物のテーラーメイドな創成」

研究期間：2020年12月～2023年3月

研究者：若林 孝俊

1. 研究のねらい

ストライガ (*Striga* spp.) やオロバンキ (*Orobanche* spp.)、フェリパンキ (*Phelipanche* spp.) といったハマウツボ科 (Orobanchaceae) の根寄生雑草は、主要な穀物や経済上重要な作物に寄生することで世界の農業に甚大な被害を及ぼしている。しかし有効な防除法は未だ確立されていない。持続可能な開発目標 (SDGs) の内、「貧国をなくそう」「飢餓をゼロに」という目標を達成するためには、根寄生雑草による農業被害を最小限に抑制する方策が必須である。

これらの根寄生雑草の種子は、宿主の根から分泌されるストリゴラクトン (SL) を感知して初めて発芽することが知られている。さらに、SL はアーバスキュラー菌根菌との共生シグナルであることや、植物の枝分かれを制御する植物ホルモンであることが明らかにされている。SL の化学構造は、ABC 環を有する典型的 SL と BC 環を持たない非典型的 SL とに大別され、さらに典型的 SL は C 環の立体化学に基づき、orobanchol 型と strigol 型とに分けられる。近年、申請者は、典型的 SL の生成に必須の BC 環形成反応を触媒する酵素として CYP722C を同定した。ササゲ (*Vigna unguiculata*) とトマト (*Solanum lycopersicum*) の VuCYP722C、SiCYP722C は生合成中間体 carlactonoic acid (CLA) から orobanchol 型 SL の orobanchol への直接的な変換を触媒し、ワタ (*Gossypium arboreum*) の GaCYP722C は CLA から strigol 型 SL の 5-deoxystrigol への変換を触媒する。

申請者は、CYP722C サブファミリーの発見を契機に、新たな根寄生雑草防除法の可能性を見出した。トマトで SiCYP722C 遺伝子を破壊した場合、SiCYP722C 欠損体根分泌物の根寄生雑草に対する発芽誘導活性は低下するが、その一方で、SL 欠損体とは異なり、SiCYP722C 欠損体は正常に生育する。そこでこの知見を発展させ、作物が本来生産する SL から、その作物に寄生する根寄生雑草に対して低い発芽誘導活性を示す SL へと改変することで、抵抗性を付与することを着想した。トマトの SiCYP722C 欠損体では、orobanchol に代わって根寄生雑草に対する発芽誘導活性が低い生合成中間体の CLA が分泌されるが、本来 CLA は根圏に分泌される主要な SL ではなく、一般に化学的安定性が低いとされている。申請者が提案する改変の利点として、改変後の SL が他の植物で分泌されている SL の場合、根寄生雑草以外の根圏環境への影響が少ないと予想した。

本研究では、植物個別の SL 生合成機構を明らかにし、それを改変することで、発芽誘導活性の低い SL を分泌する根寄生雑草抵抗性作物の創成、すなわち、対象作物ごとに抵抗性を付与する“テーラーメイドな根寄生雑草抵抗性作物の創成”を目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、研究が先行しているトマトをモデルとして、根寄生雑草耐性トマトの作出を目指した。耐性トマト作出の戦略は以下の通りである。まず、トマトに被害を及ぼす根寄生雑草の発芽におけるストリゴラクトン(SL)構造要求性を解析し、低い発芽誘導活性を示す SL 構造を選抜する。これと同時に、様々な植物が持つ SL 生合成遺伝子の探索と同定を進め、生合成遺伝子のカタログ化を行う。最終的に、低発芽誘導活性 SL の生合成遺伝子を SICYP722C 欠損トマトで発現させることで、SL プロファイルを改変し、根寄生雑草の発芽に与える影響を解析する。

はじめに、「研究項目1」として、トマトに寄生する根寄生雑草である *Phelipanche aegyptiaca* および *P. ramosa* の発芽における SL 構造要求性の解析を試みた。しかし、保有していた種子では、種子の品質が低下していたため発芽試験を実施することができなかった。研究開始時には、研究協力先のスーダン共和国から種子を輸入する計画でいたが、スーダン内のクーデターによる情勢不安やCOVID-19による影響で種子を輸入することができず、研究項目1を実施することができなかった。

次に、「研究項目2」「研究項目3」として、SL 生合成に関与する新規遺伝子の探索を遂行した。「研究項目2」では、新規 SL 生合成遺伝子の同定を目的とした。本研究を通じて、いくつかの典型的、非典型的 SL の生合成遺伝子の同定に成功した。「研究項目3」では、典型的 SL の C 環立体化学を制御する立体制御因子の同定を目的とした。トマトにおける SL 立体制御因子の生化学的解析を進め C 環立体化学制御機構に迫った。これらの研究により、SL 生合成遺伝子のカタログ化を推進することができた。

また、本 ACT-X 研究を通じて得られた成果を基盤として提案した研究課題が、JST さきがけ:植物分子の機能と制御領域に、研究課題名「植物生長制御に寄与するアポカロテノイドの包括的理解」として採択された。

(2) 詳細

「研究項目1:根寄生雑草発芽の SL 構造要求性の解析」

SL の発芽誘導活性は根寄生雑草ごとに異なることが示されており、例えば、*Striga hermonthica* に対して 5-deoxystriol(5DS)は高い発芽誘導活性を示すが、orobanchol の活性は低い。*Orobancha cumana* に対して orobanchol は高い発芽誘導活性を示すが、striol の活性は低く、*S. gesnerioides* の発芽は、orobanchol には応答するがそのジアステレオマーである *ent-2'-epi-orobanchol* には応答しない。これらの例からも、作物の SL 生合成を改変出来れば、発芽誘導活性の低い SL を分泌する根寄生雑草抵抗性作物の創成が可能となると考えた。そこで、本研究項目では、トマトに寄生する重要な根寄生雑草、*P. aegyptiaca* および *P. ramosa* の発芽応答性を解析することを目的とした。しかしながら、成果概要で述べたように、研究に必要な根寄生雑草種子の確保が予定通りにいかず、本研究項目を実施することができなかった。現在は *P. ramosa* 種子を確保することができたため、引き続き SL に対する発芽応答性の解析を進める予定である。

「研究項目2: SL 生合成酵素の同定」

(2-1: イネ科植物における典型的 SL 生合成の解明と CYP722B 酵素機能の解析)

イネ科植物ではイネ (*Oryza sativa*) の CYP711A サブファミリーが典型的 SL 生合成に関与するが、それ以外の植物の生合成機構は十分に明らかになっていない。典型的 SL 生合成に関わる CYP722C は双子葉植物に保存されているが、イネ科植物は CYP722C を持たず別のサブファミリーの CYP722B を有する。また、CYP722 ファミリーには CYP722A/B/C のサブファミリーが存在し、双子葉植物には CYP722B サブファミリーと相同性が高い機能未知の CYP722A サブファミリーが保存されている。そこで、イネの OsCYP722B の典型的 SL 生合成への関与を検証するとともに、シロイヌナズナの AtCYP722A の酵素機能解析を実施した。

ベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) の葉を用いた一過的タンパク質発現系により、機能を検証した結果、OsCYP722B および AtCYP722A は CLA を典型的 SL に変換しなかった。この結果から、CYP722A/B サブファミリーは典型的 SL 生合成に関わる BC 環形成酵素ではないと判断した。

(2-2: Strigol 合成酵素の同定)

Strigol は 1960 年代にワタ (*Gossypium hirsutum*) の根分泌物から単離同定された初めての SL である。しかし、その生合成遺伝子は不明であったため、ワタを実験材料として strigol 合成酵素の同定を目指した。Strigol は 5DS からシトクロム P450 (CYP) の働きで合成されることが示唆されている。そこで、SL 生産量が増加するリン欠乏条件下で発現上昇する CYP 遺伝子を選抜し、ベンサミアナタバコ葉の一過的タンパク質発現系を用いて酵素機能を解析した。実験の結果、5DS 生合成遺伝子と、候補 CYP 遺伝子の一つを共発現させたベンサミアナタバコ葉において、5DS 蓄積量の減少が認められ、新たに strigol と一致する化合物が検出された。そこで、この CYP 遺伝子を大腸菌で発現させ、得られた組換え酵素タンパク質を精製した。4 種の 5DS 立体異性体を基質として酵素反応を行った結果、当該組換え酵素は 5DS のみを基質として立体選択的に strigol を与えることが明らかとなった。以上の結果から、本酵素は少なくとも *in vitro* で活性を持つワタの strigol 合成酵素であると同定できた。

(2-3: Helio lactone 合成酵素の同定)

非典型的 SL 生合成酵素遺伝子について、ヒマワリ (*Helianthus annuus*) を実験材料として MeCLA から helio lactone への変換を触媒する helio lactone 合成酵素の同定を目指した。非典型的 SL に分類される SL は、CLA がメチル化された methyl carlactonoate (MeCLA) を生合成前駆体とすることが示唆されている。実際に、helio lactone は MeCLA から合成されることを植物体へのフィーディング実験により明らかにしている。また、SL 由来の枝分かれ抑制ホルモンは MeCLA 代謝産物であることが予想されている。しかし、CLA から MeCLA への変換を担うメチル基転移酵素は不明であったため、はじめに、この酵素遺伝子の同定を試みた。

シロイヌナズナの遺伝子共発現解析により、CLA 生合成遺伝子である MAX1 と共発現する SABATH ファミリーのメチル基転移酵素遺伝子を選抜し酵素機能を解析した。その結果、At4g36470 にコードされるメチル基転移酵素が、*in vitro* において CLA を選択的にメチル化することを明らかにした (成果リスト(1)-3)。また、この遺伝子を欠損した植物体では枝分かれが

増加することから、SL 由来の枝分かれ抑制ホルモンの生合成に必須の遺伝子であった。さらに、ヒマワリにおける当該メチル基転移酵素のホモログもこの反応を触媒した。

次に MeCLA 下流で働く heliolactone 合成酵素について、いくつかの候補タンパク質を解析したが、その同定には至らなかった。一方で、生合成酵素とは別に、セイヨウチャヒキ (*Avena strigosa*) というイネ科植物が heliolactone のエピマーである 6-*epi*-heliolactone を主要な SL として生産することを見出した(成果リスト(1)-2)。

本研究期間内では、heliolactone 合成酵素の同定に至らなかったものの、非典型的 SL 生合成に関する重要な知見が得られた。

「研究項目3:BC 環立体制御因子の同定」

これまでの研究では、試験管内で組み換え SICYP722C と CLA を反応させると、orobanchol とそのジアステレオマーである *ent*-2' -*epi*-orobanchol がおよそ 1:1 の比で生成された。トマトから *ent*-2' -*epi*-orobanchol が検出されないことから、SICYP722C と協調的に働き立体選択的な BC 環形成を補助する因子が存在すると想定され、これまでに、その候補を選抜していた。

本研究項目では、はじめに SICYP722C 酵素機能を再解析した。SICYP722C を大腸菌で発現・精製した精製組み換え酵素を用いた機能解析を実施した結果、SICYP722C の機能を CLA から 18-*oxo*-CLA への変換であることを見いだした。18-*oxo*-CLA は化学的に不安定であるため、非酵素的な自発的 BC 環形成により、2つの立体異性体が生じていた。また、候補立体制御因子についても精製タンパク質の取得に成功し、生化学的機能解析を行った。その結果、立体制御因子は 18-*oxo*-CLA の立体選択的な BC 環形成を触媒し、orobanchol を生成することを見いだした。

また、トマトは orobanchol に関連する様々な SL を生成することが知られる。しかし、orobanchol の分子量より 2Da 小さい dihydroorobanchol (DDH) と呼ばれる SL 様化合物の構造は未同定であった。そこで、トマトの SL 生合成経路の包括的理解を目指して、トマトの根の分泌物から DDH と同じ分子量を持つ 3 つの新規 SL を同定した。ひとつは 6,7-dihydroorobanchol で、他の 2 つは DDH のカテゴリーに属さないものであったため、phelipanchol および epichelipanchol と命名した。これらの新規 SL をもとに orobanchol より下流の生合成経路を推定し、SL 生合成多様化の理解を深めた(成果リスト(1)-1)。

3. 今後の展開

研究項目1は実施できなかったが、生合成遺伝子のカタログ化を進めたことで、様々な SL プロファイルを示す植物体の創出が可能になった。今後、SL プロファイルの変化がもたらす根寄生雑草種子発芽への影響を解析していく。

研究項目2-2で得られた strigol 生合成酵素に関しては、2023 年中に論文として発表する。

研究項目2-3では、セイヨウチャヒキの 6-*epi*-heliolactone 生合成酵素遺伝子の探索と解析を実施し、非典型的 SL の生合成経路の解明を進める。

研究項目3では、トマトにおける典型的 SL の候補 BC 環立体制御因子が、*in vitro* で機能

することを見出した。しかし立体制御の分子機構は不明である。タンパク質構造の観点から、立体制御に重要なアミノ酸残基の特定を進める。

4. 自己評価

本研究では、研究項目2と研究項目3を通じて、いくつかの SL 生合成遺伝子を明らかにすることができ、生合成遺伝子のカタログ化という目的を概ね達成できたと評価する。本研究の基盤となる SL 生合成に関する総説を報告し、自身が注力してきた生合成研究において先導的役割を担うことができたと考えている。一方、研究項目1を実施することができなかった点および、SL プロファイルを変化し低発芽誘導性 SL 生産トマトの作出に至らなかった点は残念であった。しかし、生合成遺伝子の同定により、様々な SL を植物で生産させる道がひらけたと考える。今後、SL プロファイルを変化した植物体を利用することで、SL の根圏における詳細な機能解析が期待できる。将来的に SL の根圏シグナルとしての新規機能を発掘し、根圏環境制御という応用的研究テーマへと発展させたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:3件

1. Takatoshi Wakabayashi*, Daisuke Moriyama*, Ayumi Miyamoto, Hironori Okamura, Nanami Shiotani, Nobuhiro Shimizu, Masaharu Mizutani, Hirosato Takikawa, Yukihiro Sugimoto. Identification of novel canonical strigolactones produced by tomato. *Frontiers in Plant Science*. 2022. 13. 1064378. *Co-first authors.

トマトは、典型的ストリゴラクトン(SL)である orobanchol に関連する様々な SL を生成する。しかし、orobanchol の分子量より 2Da 小さい didehydroorobanchol (DDH) と呼ばれる SL 様化合物の構造的は未同定であった。本研究では、トマトの根の滲出液から DDH と同じ分子量を持つ 3 つの新規 SL を同定した。ひとつは 6,7-didehydroorobanchol で、他の 2 つは DDH のカテゴリーに属さないものであったため、phelipanchol および epiphelipanchol と命名した。また、これらの新規 SL をもとに orobanchol より下流の生合成経路を提唱した。

2. Daisuke Moriyama*, Takatoshi Wakabayashi*, Nanami Shiotani, Shunya Yamamoto, Yui Furusato, Kohki Yabe, Masaharu Mizutani, Hirosato Takikawa, Yukihiro Sugimoto. Identification of 6-*epi*-heliolactone as a biosynthetic precursor of avenaol in *Avena strigosa*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2022. 86(8). 998-1003. *Co-first authors.

セイヨウチャヒキ (*Avena strigosa*) の根滲出液に含まれる非典型的ストリゴラクトン(SL)である avenaol は、特徴的なビスクロ[4.1.0]ヘプタン骨格を有している。この特異な構造の生合成機構を解明することは、非典型的 SL の構造多様化をより理解するために重要である。本研究では、セイヨウチャヒキの根の滲出液に含まれる新規非典型的 SL、6-*epi*-heliolactone を同定した。植物体へのフィード実験から、6-*epi*-heliolactone は生合成経路上 methyl carlactonoate と avenaol の間に位置する生合成中間体であることを見出した。

3. Takatoshi Wakabayashi, Ryo Yasuhara, Kenji Miura, Hirosato Takikawa, Masaharu



Mizutani, Yukihiro Sugimoto. Specific methylation of (1*R*)-carlactonoic acid by an Arabidopsis SABATH methyltransferase. *Planta*. 2021. 254(5). 88.

非典型的ストリゴラクトン(SL)である methyl carlactonoate (MeCLA)は、種々の非典型的 SL の生合成中間体であると考えられている。MeCLA は carlactonoic acid (CLA) から生成されるが、CLA を MeCLA に変換するメチル基転移酵素(MT)については不明であった。本研究では、SL 生合成遺伝子と共発現していたシロイヌナズナの SABATH MT 遺伝子に属する At4g36470 遺伝子に着目し、生化学的な解析を行った。その結果、当該遺伝子がコードする酵素は、天然に存在する(1*R*)-CLA を基質として選択的に利用し、MeCLA への変換を触媒することを明らかにした。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のもも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【受賞】

奨励賞「シトクロム P450 が関与する典型的ストリゴラクトン生合成に関する研究」、植物化学調節学会、2021 年 11 月

【著作物】

(総説)

Takatoshi Wakabayashi, Kotomi Ueno, Yukihiro Sugimoto. Structure elucidation and biosynthesis of orobanchol. *Frontiers in Plant Science*. 2022. 13. 835160.

(著書、分担執筆)

Kotomi Ueno, Takatoshi Wakabayashi, Yukihiro Sugimoto. Isolation and Identification of Naturally Occurring Strigolactones. In “Strigolactones eds., Prandi, C., Cardinale, F.” *Methods in Molecular Biology*. 2021. 13-23.

(受賞総説)

若林孝俊. シトクロム P450 が関与する典型的ストリゴラクトン生合成に関する研究. 植物の生長調節. 2022. 57(1). 8-14