

根寄生雑草の寄生を制御する酵素の解明

-アフリカ諸国の主要穀物であるソルガムの被害軽減を可能に-

東京農工大学連合農学研究科博士課程 3 年の依田 彬義（宇都宮大学配置・日本学術振興会特別研究員 DC2）と宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センターの野村崇人准教授は、大阪府立大学の秋山康紀教授、筑波大学の三浦謙治教授、愛媛大学の米山香織講師、東京農業大学の伊澤かな准教授、京都大学の山口信次郎教授とカリフォルニア大学リバーサイド校のデイビッド・ネルソン准教授らとの国際共同研究グループによって、根寄生雑草ストライガの寄生に関与する宿主植物ソルガムの酵素の機能を明らかにしました。本研究による成果は、アフリカ諸国の主要穀物であるソルガムの生産に大きな被害を与えているストライガを防除するための新たな技術開発が可能になるものと期待されます。



ケニアにてソルガムに寄生しているストライガ(紫色の花)
[写真提供:名古屋大学・土屋雄一朗教授]

本研究成果は、英国科学誌「New Phytologist」のオンライン版で、令和 3 年 9 月 15 日に公開されました。

■研究背景■

根寄生植物(補足説明 1)のストライガ(*Striga*)、オロバンキ(*Orobanche*)やフェリパンキ(*Phelipanche*)は、宿主植物の根に寄生して養水分を奪うため、世界各地の農業に甚大な被害を与えています。特に被害が大きいサハラ砂漠以南のアフリカ諸国では、5,000 万ヘクタールの農耕地がストライガに汚染されており、農業損失額は年間 100 億ドルを上回ります。根寄生植物は、宿主植物の根から分泌されているストリゴラクトン(strigolactone, SL) (補足説明 2)という物質を認識することにより種子が発芽して寄生します。SL の本来の役割は、植物の根に共生して主にリン酸の吸収を助けている菌類のアーバスキュラー菌根菌(AM 菌)への共生シグナルです。また、SL は植物体内で自身の枝分かれを制御する植物ホルモンとしても機能しています。すなわち、植物は土壌中の栄養が少ない場合は、SL 生産・分泌量を増やして AM 菌との共生を促進しつつ、自身の枝分かれを抑えるということと同時に制御しています(補足図 1)。そして、そのシグナルを宿主認識として利用している根寄生雑草の被害は、アフリカのような痩せた土地において必然的に大きいのです。

現在までに根寄生雑草に有効な防除法は確立されていません。根寄生植物に寄生されないよう

にするには SL を生産しない作物の選抜等が考えられますが、SL 生産量が低下すると AM 菌と共生もできなくなってしまいます。土壌中のリン酸はその多くが金属イオンと結合して不溶化しているため植物は根で吸収できませんが、AM 菌が吸収して植物に分け与えてくれています（植物は光合成産物を与えています）。そのため、AM 菌と共生できないと植物は生育が悪くなってしまいます。また、SL が欠損すると植物において枝分かれの異常も引き起こしてしまいます。

本研究は独自に解析したソルガム(*Sorghum bicolor*) (補足説明 3)の品種 Tx430(補足図 2)に関する研究が端緒となりました。ソルガムは、主要な SL として 5-deoxystrigol (5DS)という構造のものを生産していますが、Tx430 という品種の主要な SL は C 環の立体が逆で B 環に水酸基が付加された orobanchol (Oro)というものになっていました(補足図 3)。ソルガムに寄生する主要な根寄生植物ストライガ(*Striga hermonthica*)の種子は 5DS によって発芽が強く誘導されますが、Oro に対しては弱いことが分かっています(補足図 3)。すなわち、Tx430 はストライガに寄生されにくい形質を持っていることとなります。一方、AM 菌に対しては共生誘導(菌糸分岐)活性は 5DS よりも Oro の方が強いことが分かっています。また、SL 欠損でもないことから枝分かれにも影響を与えません。すなわち、この品種の解析は、SL の「量」ではなく「質」を変えることにより根寄生雑草だけを制御する技術の基盤になります。

■ 研究手法と成果 ■

ソルガム Tx430 は、遺伝子組換え効率が高い性質をもっていることからソルガムの遺伝学的研究によく用いられている品種です。Tx430 は米国テキサス A&M 大学においてアフリカの品種を掛け合わせて作出されたものですが、ストライガ耐性としての形質をもっていることは知られていませんでした。興味深いことに、これまでに育種により作出されたソルガムのストライガ耐性品種は Tx430 と同様に Oro 生産体になっており、そして、米国とオランダの研究グループにより *LOW GERMINATION STIMULANT 1* (*LGS1*)と命名された遺伝子が欠損していることが報告されていました(Gobena et al., PNAS, 114: 4471-4476, 2017)。そこで、Tx430 を確認したところ、同様に *LGS1* 遺伝子が欠損していることが明らかになりました。また、農研機構遺伝資源研究センターが保有しているアジアとアフリカの 107 品種を取り寄せて解析したところ、新たに *LGS1* 遺伝子が欠損しているアフリカの 3 品種を見つけました。

LGS1 は硫酸基転移酵素 (補足説明 4)に属するタンパク質をコードしていますが、その機能は解明されていませんでした。硫酸基を使って立体の異なる産物を生成する反応は、これまでに知られている天然物には見られない反応でした。そこで、ソルガムの立体特異的な SL の環化反応に関わる *LGS1* タンパク質の機能の解明を進めました。*LGS1* タンパク質の基質は *lgs1* 欠損変異体に蓄積している可能性が高いと考え、Tx430 などの *lgs1* 変異体を分析したところ、SL の前駆物質として 18-hydroxycaractanoic acid (18-OH-CLA)という物質が蓄積していることを発見しました。

これまでの本研究グループの研究(補足説明 5)から、18-OH-CL はシトクロム P450 酵素(補足説明 6)の CYP711A ファミリーにより生成されていることが推測されました。ソルガムに 4 つある CYP711A の酵素機能を調べたところ、そのうちのひとつが carlactone という前駆体から 18-OH-CLA を主要な産物として生成していることを明らかにしました(補足図 4)。

次に、18-OH-CLA は *LGS1* 酵素の基質なのかを調べるため、大腸菌で発現させた *LGS1* タンパク質と 18-OH-CLA をインキュベートして確かめることにしました。*LGS1* タンパク質は細胞質に局在する可溶性酵素です。そのような異種生物の可溶性タンパク質を大腸菌を用いて発現させた場合、不溶性の画分に凝集してしまい(封入体)、機能的なタンパク質を発現できないことがよく起こります。*LGS1* タンパク質も封入体になってしまい、既存の可溶性タグ(GST など)や低温誘導を試みましたが改善が見られませんでした。そこで新たに可溶性発現を強力に誘導する方法を開発しました(野村崇人、依田彬義、鈴木智大、タンパク質の発現方法およびタンパク

質発現ベクター、特願 2019-130070)。その方法は、可溶性発現が非常に高い大腸菌のβ-グルクロニダーゼ(GUS) (補足説明 7)を融合して発現させる方法です。その方法により LGS1 の可溶性発現に成功しました(補足図 5)。

合成した 18-OH-CLA と大腸菌で発現させた LGS1 タンパク質をインキュベートしたところ、硫酸基供与体 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate 依存的に 5DS の生産が確認されました。しかし、同時にその立体異性体の 4-deoxyorobanchol (4DO)も検出されました(補足図 4)。これは 18-OH-CLA の水酸基に硫酸基が付加して脱離し、酵素非依存的に C 環の環化が進んだためと考えられました。4DO はソルガムからは検出されません。すなわち、5DS だけを生産する経路にはもう一つ、C 環の立体を決める酵素が必要であることが分かりました。

■今後の期待■

ストライガ耐性品種に関しては、現地によって様々な品種が混在しており、育種による品種改良がほとんど進んでいません。そのため、あらゆる品種にストライガ耐性を付与できる薬剤の開発が望まれています。ストライガの寄生に関与する LGS1 酵素の機能が部分的にでも明らかになったことにより、その活性を指標にした阻害剤のスクリーニングが可能となり、根寄生雑草だけを制御できる薬剤の開発の道がひらけました。ソルガムはアフリカ諸国において重要な穀物ですが、ストライガの主要な宿主であるため甚大な被害を受けています。ストライガが侵入した土地では農作物の収量を平均で 40%も低下させており、時には全く収穫できないこともあります。現在のところ日本には農作物に大きな被害を与えている根寄生雑草種は侵入していませんが、地中海沿岸諸国やオーストラリアといった農業先進国における根寄生雑草（主にオロバンキとフェリパンキ）の被害も顕在化しています。本研究成果を基盤にして根寄生雑草に有効な防除法が開発されれば、その被害を受けている世界中の多くの人々を救うことができます。

■論文情報■

掲載誌：New Phytologist

題名：Strigolactone biosynthesis catalyzed by cytochrome P450 and sulfotransferase in sorghum

著者：Yoda A, Mori N, Akiyama K, Kikuchi M, Xie X, Miura K, Yoneyama K, Sato-Izawa K, Yamaguchi S, Yoneyama Y, Nelson DC, Nomura T

DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.17737>

■謝辞■

本成果は、科研費基盤(C)(課題番号 19K05838)、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業（課題番号 27004A）、筑波大学形質転換植物デザイン研究拠点等の支援を受けて行われました。ソルガムの種子は農研機構遺伝資源研究センターから分与いただきました。

■問い合わせ先■

<研究に関すること>

宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センター

野村 崇人 (ノムラ タカヒト)

Tel:028-649-5149 E-mail: tnomura@cc.utsunomiya-u.ac.jp

研究室 HP: <http://c-bio.mine.utsunomiya-u.ac.jp/nomura/>

<本件に関する問合せ先>

宇都宮大学 バイオサイエンス教育研究センター

増山 芳香 (マスママ ヨシカ)

TEL : 028-649-5527 FAX : 028-649-8651 Email : c-bio@cc.utsunomiya-u.ac.jp

■補足図■

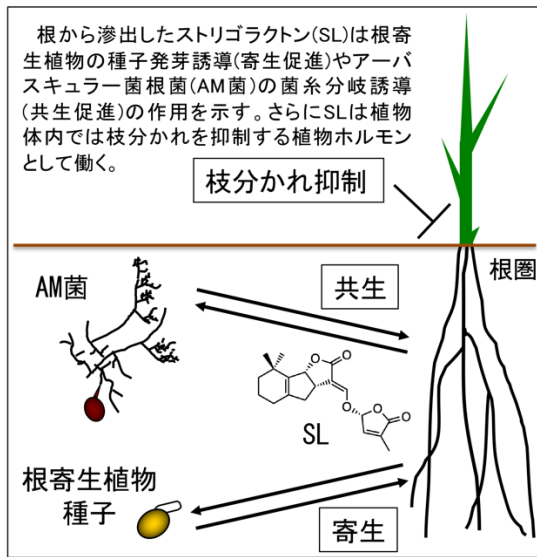


図1 ストリゴラクトン(SL)の生理作用

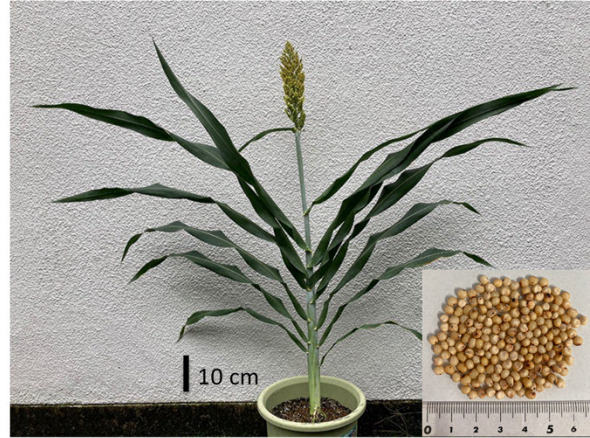


図2 ソルガムTx430

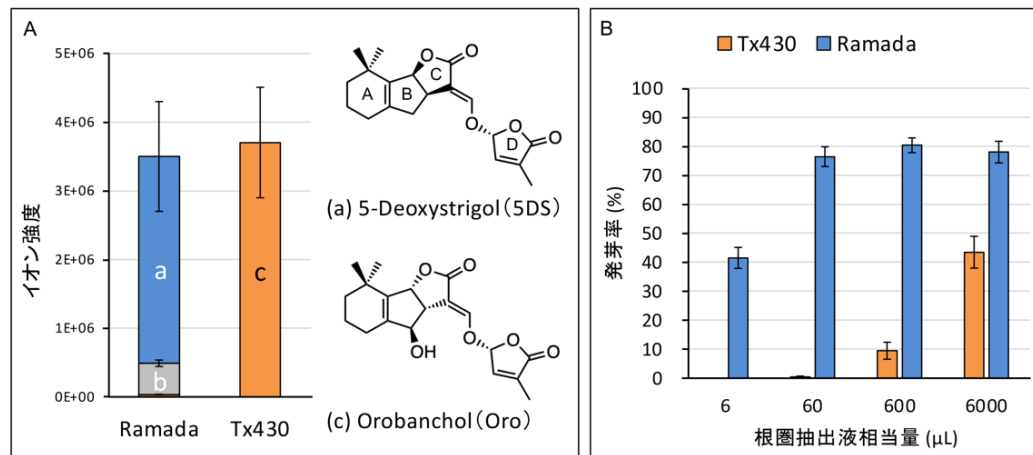


図3 ソルガム根滲出物に含まれるSLと根寄生植物に対する種子発芽活性

(A)根滲出物に含まれるSLをLC-MS/MSを用いて分析した。標準品種のRamadaは(a)5DSと(b)その水酸化体sorgomolが主要なSLであるが、Tx430からは(c)orobancholだけが検出される。(B)根滲出物を根寄生植物 *Striga hermonthica* の種子に投与した。Tx430の発芽活性はRamadaに比べて1/1000に低下していた。

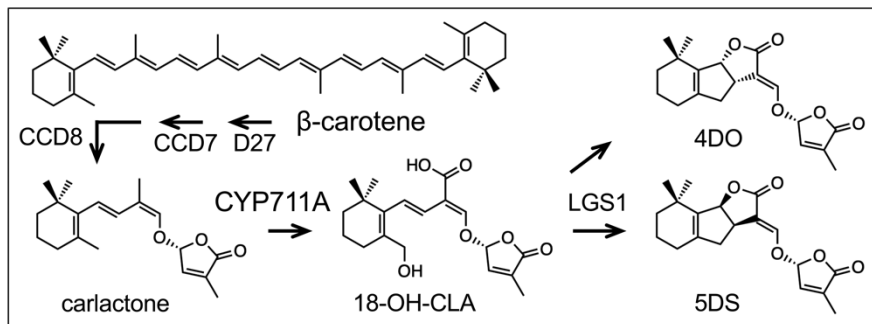


図4 ソルガムのSL生成経路と生成酵素

SLはカロテノイドから生合成される。 β -caroteneからD27、CCD7、CCD8酵素により生合成中間体のcarlactoneが生成される。CarlactoneはCYP711A酵素により酸化されて18-hydroxycaractonoic acid(18-OH-CLA)に変換する。LGS1は18-OH-CLAから硫酸基供与体依存的に5-deoxystrigol (5DS)とその立体異性体の4-deoxyorobanchol (4DO)を生成した。

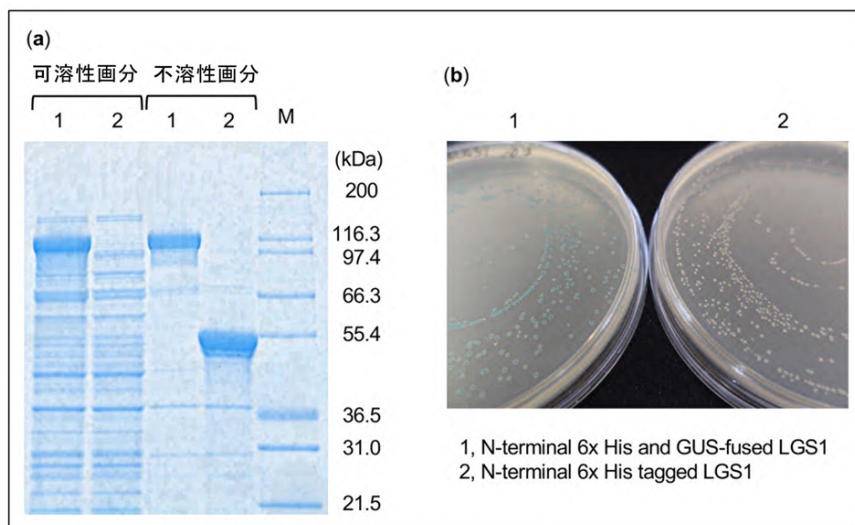


図5 大腸菌におけるGUS融合LGS1タンパク質の発現

(a) 大腸菌で 1, N-terminal 6x His and GUS-fused LGS1 protein (119.6 kDa) と 2, N-terminal 6x His tagged LGS1 protein (51.0 kDa) を発現させた。超音波破碎した後、遠心分離で可溶性画分と不溶性画分に分けてSDS-PAGEを行った。(b) 形質転換した大腸菌を5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-Gluc)を含むプレートで培養すると、目的タンパク質を発現しているクローン(青色)を選抜できる。

■補足説明■

補足説明 1 (根寄生植物) : 光合成能力が低下していたり、全く光合成をしていないため、別の植物の根に寄生して養水分を奪わないと生きられない。ストライガは主にイネ科に寄生にし、オロバンキとフェリパンキはナス科、マメ科、キク科やセリ科などの作物に寄生する。直径 0.2 mm ほどの微細な種子を一個体あたり数万~十万粒の種子をつける。種子は土壌中で数十年も休眠することができて、宿主の根が近くに現れるまで待ち構えている。

補足説明 2 (ストリゴラクトン, SL) : SL の基本構造は 3 環性のラクトン(ABC 環)とメチルブテノライド(D 環)がエノールエーテル結合したものである(補足図 3)。これまでに主に根寄生植物の種子発芽活性を指標にして様々な植物種の根滲出液から 30 種類以上単離・同定されており、SL はそれらの総称である。多様な SL 構造は植物種固有の根圏シグナルであると考えられるが、詳しいことは分かっていない。また、植物体内で植物ホルモンとして働いている活性本体の構造も分かっていない。

補足説明 3 (ソルガム) : 熱帯地域原産の作物で乾燥に強く、イネやコムギが育たない地域で栽培できる。コムギ、イネ、トウモロコシ、オオムギに次いで世界第 5 位の生産量である。主に食用の他に飼料として栽培される。特にアフリカにおいてはトウモロコシと並んで最重要の穀物である。

補足説明 4 (硫酸基転移酵素) : 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate の硫酸基を基質の水酸基やアミノ基に転移させる反応を触媒する。植物ホルモンの中では、ブラシノステロイドやジャスモン酸などが硫酸基を付加されて不活性化する反応が知られている。LGS1 酵素のように硫酸エステル化を水酸基の脱離として利用する反応は、動物においてカロテノイド誘導体のビタミン A (retinol) から anhydroretinol への反応が知られている。

補足説明 5（これまでの関連成果）：

Yoneyama K., Mori N., Stao T., Yoda A., Xie X., Okamoto M., Iwanaga M., Ohnishi T., Nishiwaki H., Asami T., Yokota T., Akiyama K., Yoneyama K., Nomura T. Conversion of carlactone to carlactonoic acid is a conserved function of MAX1 homologs in strigolactone biosynthesis. **New Phytologist**, 218: 1522-1533 (2018)

<https://doi.org/10.1111/nph.15055>

Abe S., Sado A., Tanaka K., Kisugi T., Asami K., Ota S., Kim H.I., Yoneyama K., Xie X., Ohnishi T., Seto Y., Yamaguchi S., Akiyama K., Yoneyama K., Nomura T. 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. USA**, 111: 18084-18089 (2014)

<https://doi.org/10.1073/pnas.1410801111>

補足説明 6（シトクロム P450 酵素）：酸素と NADPH などの電子供与体を使って基質を酸化する酵素である。一部の細菌を除くほとんどの生物が持っている。ヒトは 57 個の P450 遺伝子を持っており、ステロイドホルモンの合成や異物代謝を行っている。植物では様々な二次代謝物の生合成の酸化段階が P450 酵素により触媒されており、多くの P450 遺伝子が存在している（ソルガムには約 400 個）。

補足説明 7（ β -グルクロニダーゼ, GUS）：D-グルクロン酸の抱合体のグルクロニド結合を加水分解する酵素である。植物にはこの酵素の活性はほとんど認められないので、遺伝子のプロモーターに繋いで植物に導入し、発現組織を観察するためのレポーター遺伝子として利用されている。これまでに GUS を大腸菌発現の可溶化タグとして使用した例は無かった。