

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02459

研究課題名(和文) 寄生植物ストライガにおけるストリゴラクトンシグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文) Elucidating the mechanism of strigolactone signal transduction in a parasitic plant *Striga*

研究代表者

土屋 雄一郎 (Tsuchiya, Yuichiro)

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・特任准教授

研究者番号：00442989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ハマウツボ科の寄生植物であるストライガ(*Striga hermonthica*)は、トウモロコシやソルガムといった穀物に寄生し枯死させることが知られており、アフリカの食糧生産に甚大な被害を与えることが知られている。土中で休眠する種子は、宿主植物が近くで生育を始めるとその根から放出されるストリゴラクトン(SL)を感知して発芽することが知られており、本研究では化学遺伝学的手法で新たなシグナル伝達因子の同定を目指した。発芽抑制、発芽上限突破の2種のスクリーニングより有望な化合物が得られ、標的タンパク質の同定とその生化学的な機構の解明を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ストライガをはじめとした寄生植物特有に見られる受容体のコピー数の増加の生物学的な意義が見出せていない現状において、本研究より受容体間に機能的な相互作用が存在することが示唆された。すなわち、土中に存在するSLの種類により発芽するか否かが決定されることを示唆しており、ストライガが寄生する宿主の種類をSLのブレンドを認識することで起こしていると考えられた。また、受容体ネットワークを制御することで発芽を抑制できることより、この原理を踏襲した発芽抑制剤の開発が可能となり、自殺発芽とは異なるアプローチでストライガの寄生を抑える方法へと発展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：A parasitic plant called *Striga* causes huge damages on crop production in Africa by parasitizing monocot crops including maize and sorghum. Dormant *Striga* seeds sense host-derived strigolactones (SLs) for germination. We took chemical genetic approach to identify novel components involved in this process. We performed two types of chemical screening, one for suppressors of SL-induced germination, and the other for small molecules that break upper-limit of *Striga* germination rate. Both screenings identify several hit molecules, and we performed identifications of target proteins and biochemical characterization of these proteins.

研究分野：植物ケミカルバイオロジー

キーワード：ストリゴラクトン 寄生植物 ストライガ 受容体 発芽

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ハマウツボ科の寄生植物の一つであるストライガ (*Striga hermonthica*) は、トウモロコシやソルガムといった穀物に寄生し枯死させることが知られており、アフリカの食糧生産に甚大な被害を与えることが知られている。土中で休眠する種子は、宿主植物が近くで生育を始めるとその根から放出されるストリゴラクトン (SL) を感知して発芽する。この現象は、宿主のいないところでストライガを強制的に発芽させ枯死させる自殺発芽法の観点からも注目されており、我々の最近の研究などからストライガの SL 受容体の同定が行われてきた。一方、他のシグナル伝達因子に関する知見は乏しく、SL 認識がどのようなシグナル伝達機構を介して発芽を誘導するかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、ストライガにおける新たな SL シグナル伝達を同定し、その機能を解析することで SL シグナル伝達機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

変異株や形質転換等の遺伝学解析を利用できないストライガでこの目的を達成するため、ストライガの発芽を制御する低分子化合物をケミカルライブラリーよりスリーニングし、その標的タンパク質の同定と機能解析を通じて SL シグナル伝達機構の解明を目指した。

4. 研究成果

(1) 発芽を抑制する化合物のスクリーニング

最近の研究より、ストライガには HYPOSENSITIVE TO LIGHT / KARRIKIN INSENSITIVE2 (HTL/KAI2) と呼ばれる SL 受容体が少なくとも 11 コピー存在し (ShHTL1~ShHTL11) 受容体ポケットの形状の多様性に起因して、それぞれ SL 類への結合の選択性が異なることが明らかになっている。すなわち、SL を感知する際には複数の受容体アイソフォームが活性化されると想定される。この複雑性を回避するため、我々が最近開発したスフィノラクトン-7 (SPL7) と呼ばれる、ShHTL7 に選択的に結合する人工 SL を用い、その作用を抑圧する人工化合物をケミカルライブラリーよりスクリーニングすることで、ShHTL7 依存経路に関わる因子の同定を試みた。1 万化合物を 2 反復でスクリーニングした結果、41 個の多様な構造を持つ発芽抑制化合物群を同定することに成功した。

(2) SL 受容体を標的する化合物の解析

得られた発芽抑制化合物には、ShHTL7 に結合することで SPL7 と競合することで発芽を抑制するものも含まれると考えられた。そこでこれら 41 個全ての化合物と、ShHTL7 との生化学的な結合を、我々が開発したヨシムラクトングリーン (YLG) と呼ばれる蛍光性 SL ミミックを用いた競合試験により評価した。その結果、実際に 4 個の化合物が ShHTL7 に結合することが明らかとなった。この化合物の受容体アイソフォームへの選択性を評価するため、ShHTL7 を除く残りの受容体タンパク質との結合を同様に YLG を用いたアッセイにより評価した結果、3 個は ShHTL7 のみに、残り一つは ShHTL7 以外の受容体に標的するものも含まれることが明らかとなった。ShHTL7 に対する競合阻害が発芽抑制の原因であることを調べるため、他の多数の受容体にも結合する人工 SL である GR24 に対するこれら 4 個の発芽阻害剤の作用を調べたところ、興味深いことにこれら化合物は GR24 による発芽誘導も抑えることが明らかとなった。すなわち、これら化合物は、ShHTL7 に結合することで、結合していない受容体の機能を抑制することが示唆された。そこで、スクリーニングで選抜された 41 個の化合物について全ての受容体に対する生化学的結合を再評価した結果、ShHTL7 には結合せず他の受容体に結合する化合物がさらに 6 個見つかった。

ストリゴラクトンを感知したストライガ種子では、別の植物ホルモンであるエチレンの合成が促進され、発芽が誘導されることが明らかとなっており、例えばエチレン生合成阻害剤である AVG を添加することで SL の発芽誘導を抑えることができる。この原理を踏襲し、エチレンの発芽刺激作用を得られた化合物で抑圧できるかを調べることで、これら化合物がエチレン合成より上流で作用するか、下流で作用するかを判別できると考えた。そこで、エチレン前駆体である ACC を化合物とともにストライガに与えて発芽を調べた結果、これら化合物全てについて発芽が観察されたため、これらの発芽抑制作用はエチレン合成より上流に作用することで起こることと考えられた。

以後、ShHTL2 に選択的に結合する化合物を RTC2 と名付け、ShHTL2 を介した ShHTL7 機能の抑制機構の解明に取り組んだ。シロイヌナズナにおいては、AtHTL タンパク質は、F-box タンパク質である MAX2 を介して、負の制御因子である SMAX1 タンパク質をユビキチン/プロテアソーム経路で分解することによりシグナルをオンにすることが明らかとなっている。ストライガでは ShHTL 受容体が複数存在するため、受容体間での競合が起こり、例えば RTC2 のような化合物が

ShHTL2 を部分的に活性化することで MAX2 や SMAX1 タンパク質と ShHTL7 との結合を阻害する機構を想定した。まずは、ShMAX2 タンパク質と ShHTL7 タンパク質との SL 依存的なタンパク質-タンパク質相互作用に対する RTC2/ShHTL2 タンパク質の作用を、酵母 2 ハイブリッド法、酵母 3 ハイブリッド法、共免疫沈降を用いて解析したが、RTC2/ShHTL2 タンパク質が競合的に阻害することは観察されなかった。現在は報告されていないストライガ SMAX1 遺伝子と ShHTL7 との SL 依存的な相互作用を RTC2/ShHTL2 タンパク質が競合的に阻害する可能性が残されており、この遺伝子の同定と機能解析と並行して、同様に酵母 2 ハイブリッド法、酵母 3 ハイブリッド法、共免疫沈降を用いて評価する必要があると考えられる。

YLG バリアンとを用い、*in vivo* での受容体機能を蛍光画像として可視化することに成功しており、蛍光顕微鏡を用いたタイムラプスムービーを撮影することで、ストライガが発芽する際に SL 受容がダイナミックに起こることが明らかとなっている。具体的には、根の先端から種子全体に波のように受容が広がる wake-up wave、いったん蛍光が消失する pre-germination pause、再び根の先端から受容が広がる elongation tide の 3 つのステップを踏んで発芽を起こす。この受容パターンに対する発芽阻害剤の作用を調べた結果、標的受容体によって、蛍光強度の抑制、wake-up wave の展開速度の抑制、蛍光の消失等のパターンが観察され、それぞれの受容体機能が正しく働くことによってこのような 3 段階のプロセスが形成されると考えられた。

ストライガをはじめとした寄生植物特有に見られる受容体のコピー数の増加の生物学的な意義が見出せていない現状において、本研究より受容体間に機能的な相互作用が存在することが示唆された。すなわち、土中に存在する SL の種類により発芽するか否かが決定されることを示唆しており、ストライガが寄生する宿主の種類を SL のブレンドを認識することで起こしていると考えられた。また、受容体ネットワークを制御することで発芽を抑制できることより、この原理を踏襲した発芽抑制剤の開発が可能となり、自殺発芽とは異なるアプローチでストライガの寄生を抑える方法へと発展することが期待される。

(3) ストライガの発芽上限を上昇させる化合物のスクリーニングと解析

ストライガの発芽は、SL を高濃度で与えても決して 100%に達しないことが知られている。これは、同種での宿主の奪い合いや、SL 様の分子が降りかかった際に全滅を防ぐ役割があると考えられる。一方、自殺発芽を実践する上で、この発芽上限より効率が著しく低下することも懸念される。そこで、上記発芽抑制化合物に加え、発芽上限を突破する化合物のケミカルスクリーニングも行った。発芽飽和を起こす SPL7 濃度にさらにライブラリー化合物を加え、発芽率の上昇を起こす化合物を、3 万化合物よりスクリーニングし、8-50 と名付けた 1 個のヒット化合物を得ることができた。後の解析より、この化合物は単独でも発芽刺激することができ、SL と同時添加することでさらに上限を伸ばせることが明らかとなった。上記同様、この化合物がエチレン合成より上流に作用するか、下流に作用するかを判定するため、AVG と同時添加した所、発芽が観察された。すなわち、8-50 はエチレン合成より下流に作用する分子であると考えられる。この標的タンパク質を同定するため、構造活性相関の解析より修飾可能な部位を同定し、そこにリンカーを介してビーズに結合できる分子を有機合成し、作成したアフィニティーカラムを用いてストライガ種子から粗抽出したタンパク質より結合タンパク質の同定を試みた。しかし、この実験からは有望な結合タンパク質を見出すことはできなかった。この原因として、シグナル伝達因子等のタンパク質発現量の低いものを標的すると考え、酵母 3 ハイブリッド法を用いた方法により標的タンパク質の同定を試みた。リンカーを介して DEX と 8-50 を結合した分子を合成し、DNA 結合ドメインにグルコシルコリド受容体を融合したタンパク質をベイトに、この化合物に依存的に相互作用するタンパク質をスクリーニングした結果、独立な二つのコロニーより、既知のエチレンシグナル伝達因子が同定された。生化学的結合とその作用メカニズムを解明するために更なる研究が必要と考えられるが、SL が飽和した条件ではエチレン経路が発芽上限の律速となることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Uraguchi Daisuke, Kuwata Keiko, Hijikata Yuh, Yamaguchi Rie, Imaizumi Hanae, AM Sathiyarayanan, Rakers Christin, Mori Narumi, Akiyama Kohki, Irle Stephan, McCourt Peter, Kinoshita Toshinori, Ooi Takashi, Tsuchiya Yuichiro	4. 巻 362
2. 論文標題 A femtomolar-range suicide germination stimulant for the parasitic plant <i>Striga hermonthica</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 1301 ~ 1305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aau5445	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsuchiya Yuichiro	4. 巻 59
2. 論文標題 Small Molecule Toolbox for Strigolactone Biology	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1511 ~ 1519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcy119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchiya Yuichiro, Yoshimura Masahiko, Hagihara Shinya	4. 巻 69
2. 論文標題 The dynamics of strigolactone perception in <i>Striga hermonthica</i> : a working hypothesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 2281 ~ 2290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/ery061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yuichiro Tsuchiya
2. 発表標題 Unravel strigolactone signaling and controlling parasitic plant behaviors
3. 学会等名 ACS Spring 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 寄生植物発芽調節剤	発明者 土屋雄一朗、浦口大輔、大井貴史、木下俊則、望田啓子	権利者 国立大学法人名古屋大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2018/036785	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

http://www.itbm.nagoya-u.ac.jp/en/research/2018/12/Striga-SPL7.php

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------