

令和 4 年 4 月 22 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02897

研究課題名(和文) 枝分かれ抑制ホルモンの実体解明を目指すストリゴラクトンBC環形成機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the BC-ring formation mechanisms in the biosynthesis of strigolactones

研究代表者

杉本 幸裕 (SUGIMOTO, YUKIHIRO)

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号：10243411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：ストリゴラクトン(SL)のBC環形成反応に関わる酵素としてササゲ、トマト、ワタからCYP722Cを同定した。CYP722Cをノックアウトしたトマト個体(SICYP722C ko)の根滲出物ではorobancholが検出されず、代わってカラクトン酸(CLA)の蓄積が確認された。また、地上部の形態に顕著な変化は認められなかった。このことから、枝分かれ抑制活性にBC環は必須ではなく、活性本体はCLAから派生すると考えられた。SICYP722C koに認められた、既知のSLとは異なる、ストライガ種子発芽活性を有する画分をさらに精製することで、枝分かれ抑制ホルモンの構造に迫ることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ストリゴラクトンは、植物地上部の枝分かれを制御する活性を有するとともに、根圏情報物質としても知られている。本研究により、ストリゴラクトン生合成に関わる重要な酵素を見出し、それをノックアウトすることでトマトの形態は変化させることなく、根寄生雑草の種子発芽に対する根分泌物の刺激活性を低下させることに成功した。この成果は、新規な生合成酵素を分子レベルで解明し、生成物が枝分かれ抑制活性に必須ではないことを示した点で学術的意義がある。さらに、地球規模で農業に甚大な被害をもたらしている根寄生雑草の害を軽減する新規の方策を示したという点で社会的な意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：Strigolactones (SLs) are carotenoid-derived phytohormones and rhizosphere signaling molecules for arbuscular mycorrhizal fungi and root parasitic weeds. Cytochrome P450 CYP722C was identified as a key enzyme that catalyzes the reaction of BC-ring closure and the conversion of carlactonoic acid (CLA) to 5-deoxystrigol in cotton and orobanchol in cowpea and tomato. By knocking out the gene in tomato plants, orobanchol was undetectable in the root exudates but CLA, which was not observed in root exudates of wild-type (WT) plants, was detected. Root exudates of the knockout plants reduced the induction of germination of seeds of root parasitic weeds compared to WT. The architecture of the knockout and WT plants was comparable. These findings suggest the possibility of generating crops with greater resistance to infection by noxious root parasitic weeds.

研究分野：生物有機化学

キーワード：ストリゴラクトン

1. 研究開始当初の背景

ストリゴラクトン (SL) は、根寄生雑草の種子発芽刺激活性を指標にして植物の根分泌物から単離されてきた、一連の構造類縁体の総称である。様々な植物で枝分かれ過剰の表現型を示す変異体が解析され、欠損遺伝子の共通性に基づき原因物質として SL が想定され、合成 SL 類縁体である GR24 がそれら変異体の表現型を回復したことから、SL は枝分かれ抑制活性を有すると考えられている。しかし、枝分かれ抑制ホルモンは化合物群としての SL と理解されているにとどまり、植物体内で機能している化合物が、ABC 環を有する canonical (典型的) SL なのか、BC 環が閉じていない non-canonical (非典型的) SL なのか、あるいは、別の類縁化合物なのかは明らかになっていなかった。SL 骨格形成の鍵となる BC 環形成反応に関わる酵素を見出しつつあったので、この知見を発展させることで、枝分かれ抑制ホルモンの化学的実体に迫ることができると考え本研究に着手した。

2. 研究の目的

典型的 SL はこれまでに見出された SL の多くを占めているが、BC 環形成反応は、イネで見出された、CLA を 4-deoxyorobanchol (4DO) に変換する CYP711A 以外に報告はなかった。Orobanchol を生産するササゲ (*Vigna unguiculata*) から orobanchol 型 SL の BC 環形成反応に関わる酵素を見出した。本研究は、この酵素を起点として、他の植物からも類似の機能を有する酵素を同定し生化学的性質を解明することとした。また、トマト (*Solanum lycopersicum*) で当該酵素遺伝子をノックアウトすることにより orobanchol の生成を抑制し地上部形態に与える効果を調べることで、枝分かれ抑制ホルモン活性に BC 環が必須かどうかを検証することとした。さらに、一連の知見に基づき、枝分かれ抑制ホルモンの化学的実体に迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

1) BC 環形成に関わる酵素の解析

Orobanchol を高生産する条件で育てたササゲを材料にトランスクリプトーム解析を行い、既知 SL 生合成遺伝子と共発現する P450 遺伝子を選抜した。タンパク質を異種発現させて CLA を orobanchol に変換する活性を有するタンパク質を探索した。同じく orobanchol を生産するトマトからホモログ遺伝子をクローニングし、組換えタンパク質を用いて酵素機能を解析した。

これらのタンパク質は *in vitro* で天然型の orobanchol だけでなく、天然型とほぼ等量の非天然型 *ent-2'-epi-orobanchol* を生産したことから、酵素反応産物は CLA の 18 位メチル基が二段階酸化されて生じたアルデヒドであり、これが自発的に環化して C 環の立体配置が異なる、天然型と非天然型の orobanchol が生成されると予測された。このことを化学的に証明するため、18-oxo-CLA よりも安定な 18-oxo-MeCLA を合成し、メチルエステル化した酵素反応産物と比較した。

Strigol 型 SL を生産するワタについても、ササゲの orobanchol 合成に関与する酵素遺伝子のホモログをクローニングし、組換えタンパク質を用いて酵素機能を解析した。

2) トマトにおける orobanchol 生合成に関わる酵素遺伝子のノックアウト

ゲノム編集によりトマトで当該酵素遺伝子をノックアウトし、得られた個体の生産する SL プロファイルと地上部形態を、野生型と比較した。これらに基づき、枝分かれ抑制活性における典型的 SL の BC 環の必要性を検証した。

3) トマトにおける CYP722C ノックアウト体を利用した枝分かれ抑制ホルモンの探索

Orobanchol およびその代謝産物と考えられる一連の典型的 SL を欠損したトマト個体と、野生型個体の間で地上部形態に顕著な差異が認められなかったことから、CLA は orobanchol とは異なる枝分かれ抑制活性物質に変換されると想定された。そこで、orobanchol を欠損したトマトの CYP722C ノックアウト体を材料として、SL に特異的に応答するストライガ (*Striga hermonthica*) 種子に対する発芽刺激活性を指標に、枝分かれ抑制ホルモンの探索を試みた。

4. 研究成果

1) 典型的 SL 生合成に関与する酵素 CYP722C の発見

ササゲを用いた投与実験で CLA が orobanchol に変換され、それがシトクロム P450 の阻害剤であるウニコナゾール P で阻害された。そこで、SL 生産量が異なるいくつかの条件でササゲを栽培し、その根を用いたトランスクリプトーム解析を実施した。既知の SL 生合成遺伝子と共発現するシトクロム P450 遺伝子として *VuCYP722C* を選抜し酵素機能を *in vitro* で調べた結果、*VuCYP722C* は CLA を基質として orobanchol および C 環の立体配置が逆のジアステレオマーである *ent-2'-epi-orobanchol* をほぼ 1:1 の比で生成した (図 1)。ササゲと同じく orobanchol を生産しているトマトの *SlCYP722C* も *in vitro* で *VuCYP722C* と同様の酵素活性を示した。

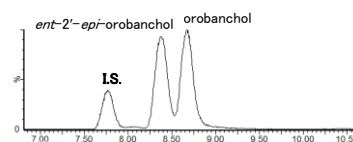


図 1. *VuCYP722C* による CLA の環化

CYP722C サブファミリーは、*orobanchol-type*, *strigol-type* のどちらのタイプの SL を生産するかに関わらず、双子葉植物に広く保存されている。このことから、同サブファミリーが様々な植物の典型的 SL 生合成に関与していると考えられた。そこで、*strigol-type* の 5-deoxystrigol (5DS) を生産するワタ (*Gossypium arboreum*) の GaCYP722C に着目し、その酵素機能を解析した。ワタ植物体に CLA を投与すると 5DS が生産されることから、GaCYP722C の基質も CLA と想定し *in vitro* で酵素機能解析を行った。GaCYP722C は CLA を基質として 5DS への変換を触媒したが、生成物としてジアステレオマーの 4DO を与えなかったことから、GaCYP722C は VuCYP722C や SiCYP722C とは異なり、*in vitro* で立体選択的な BC 環形成を触媒することが示された。

2) 典型的 SL の生理機能

トマトの *SiCYP722C* を CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集でノックアウトした。ノックアウト体の根滲出物では *orobanchol* が検出限界以下となり、代わって CLA の蓄積が確認された。このことから、植物体において *SiCYP722C* が CLA から *orobanchol* への変換に関与していることが証明された。ノックアウト体と野生型の間で、植物体地上部の形態に顕著な違いは認められなかった (図2)。このことは、トマトの枝分かれ抑制に *orobanchol* が必須ではないことを示している。典型的 SL の欠損が枝分かれに影響を及ぼさないことから、また、*carlactone* (CL) を CLA に変換する *MAX1* 遺伝子の変異が枝分かれの増加を引き起こすことから、枝分かれ抑制ホルモンの実体は ABC 環を持たない CLA に由来する非典型的 SL と考えられる。典型的 SL の主な機能は、根圏シグナルとして土壤中に分泌され植物-微生物および植物-植物のコミュニケーションに関与することと考えられる。

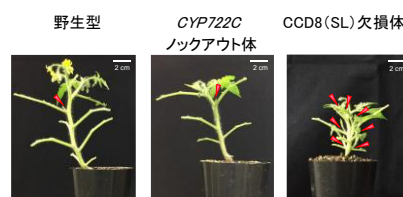


図2. トマトの地上部形態の比較

3) トマト CYP722C の酵素機能

植物でノックアウトすると *orobanchol* の生成が抑制される一方、*in vitro* 酵素反応では *orobanchol* と *ent-2'-epi-orobanchol* が生成するという矛盾を解決するために、高度に精製した *SiCYP722C* タンパク質を用いて酵素反応を行い、生成物を詳細に解析した。その結果、反応停止に酸処理を行うと *orobanchol* と *ent-2'-epi-orobanchol* の両方が検出されたのに対して、行わなかった場合にはこれらに代わって 18-oxo-CLA と考えられるピークが新規に検出された。酵素反応産物を TMS ジアゾメタンによりメチル化し LC-MS/MS 分析に供した結果、18-oxo-CLA と考えられるピークは消失し 18-oxo-MeCLA 合成標品と一致するピークとして検出されたので、*SiCYP722C* 反応産物の新規ピークを 18-oxo-CLA と同定した。酵素反応溶液中に *orobanchol* と *ent-2'-epi-orobanchol* の両方が検出されたのは、酸性条件下で 18-oxo-CLA が非酵素的に環化したためと説明できる。これらのことから、*SiCYP722C* の真の酵素機能は、CLA を 18-oxo-CLA に変換することと結論付けられた。

4) 枝分かれ抑制ホルモンの探索

トマトの *CYP722C* ノックアウト体が野生型と変わらない地上部形態を示したことから、枝分かれ抑制ホルモンは CLA から派生する化合物と推定される。そこで、トマトの *CYP722C* ノックアウト体抽出物に含まれる枝分かれ抑制ホルモンの探索を行った。ストライガの種子発芽活性を指標に精製を進めた結果、トマトに含まれる既知 SL とは異なる画分に活性が回収された。

以上のように、BC 環形成により CLA を典型的 SL に変換する酵素として *CYP722C* を見出した (図3)。ワタの *CYP722C* は CLA を立体選択的に 5DS に変換したが、ササゲとトマトの *CYP722C* の機能は CLA を 18-oxo-CLA に変換することであり、立体選択的な *orobanchol* への環化には別の因子に関わることが予想される。

CYP722C をノックアウトしたトマト個体の地上部枝分かれに顕著な変化は見出されなかったことから、典型的 SL 以外の SL が枝分かれ抑制に関わっていることが考えられる。トマトの *CYP722C* ノックアウト体から精製したストライガ種子発芽活性を有する画分には、枝分かれ抑制ホルモンが含まれていると期待されるので、さらなる精製を進めることで、枝分かれ抑制ホルモンの構造に迫ることが可能と考えている。

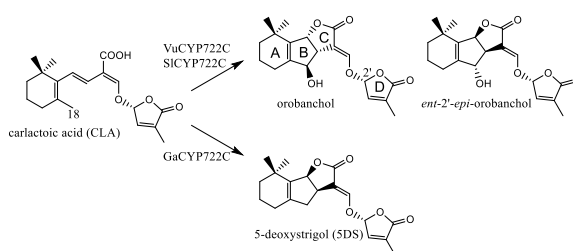


図3. BC 環形成により CLA を典型的 SL に変換する酵素反応

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takatoshi Wakabayashi, Kasumi Shida, Yurie Kitano, Hirosato Takikawa, Masaharu Mizutani, Yukihiro Sugimoto	4. 巻 251
2. 論文標題 CYP722C from <i>Gossypium arboreum</i> catalyzes the conversion of carlactonoic acid to 5-deoxystrigol	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Planta	6. 最初と最後の頁 97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00425-020-03390-6	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 Wakabayashi Takatoshi, Hamana Misaki, Mori Ayami, Akiyama Ryota, Ueno Kotomi, Osakabe Keishi, Osakabe Yuriko, Suzuki Hideyuki, Takikawa Hirosato, Mizutani Masaharu, Sugimoto Yukihiro	4. 巻 5
2. 論文標題 Direct conversion of carlactonoic acid to orobanchol by cytochrome P450 CYP722C in strigolactone biosynthesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aax9067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shiotani Nanami, Wakabayashi Takatoshi, Ogura Yusuke, Okamura Hironori, Sugimoto Yukihiro, Takikawa Hirosato	4. 巻 85
2. 論文標題 Synthesis of racemic orobanchols via acid-mediated cascade cyclization: Insight into the process of BC-ring formation in strigolactone biosynthesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 153469 ~ 153469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2021.153469	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 Shiotani Nanami, Wakabayashi Takatoshi, Ogura Yusuke, Sugimoto Yukihiro, Takikawa Hirosato	4. 巻 68
2. 論文標題 Studies on strigolactone BC-ring formation: Chemical conversion of an 18-hydroxycarlactonoate derivative into racemic 4-deoxyorobanchol/5-deoxystrigol via the acid-mediated cascade cyclization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 152922 ~ 152922
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2021.152922	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7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山下歩乃佳、支田香澄、若林孝俊、水谷正治、杉本幸裕
2. 発表標題 ミヤコグサにおけるCYP722Cサブファミリーの機能解析
3. 学会等名 植物化学調節学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 若林孝俊、濱名実咲、森采美、刑部敬史、刑部由里子、秋山遼太、水谷正治、杉本幸裕
2. 発表標題 カーラクトン酸をオロバンコールへと変換する新規オロバンコール合成酵素の同定
3. 学会等名 植物化学調節学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北野友里恵、支田香澄、若林孝俊、水谷正治、杉本幸裕
2. 発表標題 ワタにおける5-ストリゴールおよびソルゴモール生合成酵素の探索
3. 学会等名 植物化学調節学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukihiro SUGIMOTO
2. 発表標題 BC-ring formation in canonical strigolactones
3. 学会等名 3rd International Strigolactone Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本間 大翔、若林 孝俊、塩谷 七洋、滝川 浩郷、水谷 正治、杉本 幸裕
2. 発表標題 SICYP722C による 18-oxo-CLA の生成と非酵素的反応による orobanchol の BC 環形成
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塩谷 七洋、山本 舜也、小倉 由資、若林 孝俊、杉本 幸裕、滝川 浩郷
2. 発表標題 ストリゴラクトンのBC環形成過程の解明を志向したオロバンコールの合成化学的研究
3. 学会等名 第65回 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塩谷七洋、茂田巧、小倉由資、若林孝俊、杉本幸裕、滝川浩郷
2. 発表標題 推定生合成経路に基づくストリゴラクトン類の合成研究
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

植物生理活性物質ストリゴラクトンの謎に迫るオロバンコール合成酵素の発見
https://www.kobe-u.ac.jp/research_at_kobe/NEWS/news/2019_12_19_01.html

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
研究分担者	滝川 浩郷 (Takikawa Hirosato) (40271332)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授 (12601)	
研究分担者	水谷 正治 (Mizutani Masaharu) (60303898)	神戸大学・農学研究科・准教授 (14501)	

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