

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：24405

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15459

研究課題名(和文) 真の枝分かれ抑制ホルモンの同定を志向した典型的ストリゴラクトン生合成経路の解明

研究課題名(英文) Elucidation of canonical strigolactone biosynthesis pathway toward the identification of a genuine structure of branching inhibitory hormone

研究代表者

若林 孝俊 (Wakabayashi, Takatoshi)

大阪公立大学・大学院農学研究科・特任研究員

研究者番号：20843858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ストリゴラクトン(SL)は根寄生雑草種子の発芽刺激物質として様々な植物の根分泌液から単離されてきた、一連の構造類縁体の総称である。SLは植物の枝分かれ抑制活性をも有するが、植物体内で機能している化合物の正体は明らかになっておらず、生合成経路の全貌は明らかになっていない。本研究では様々な植物のSL生合成経路の解明に取り組んだ。その結果、BC環構造を有するSLの生合成に関与する遺伝子や新規SL構造、SLのメチル化に関与するメチル基転移酵素を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SLは、根圏シグナルとしてだけでなく、植物内生の植物ホルモンとしても重要である。SL生産の制御は、根寄生雑草の種子発芽の抑制や、アーバスキュラー菌根菌との共生の促進、さらには植物の形態制御に応用できる。したがって、個々の生理機能を担っている化合物を明らかにできれば、植物の形態や根圏環境を人為的に調節する道が開ける。本研究において、様々なSL生合成酵素を同定することができたことから、今後個々のSL機能の解明とその農業応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Strigolactone (SL) is the collective term for a series of structural analogs that have been isolated from the root exudates of various plants as germination stimulants for seeds of root parasitic weeds. SLs also have branching inhibiting activities in plants, but the actual endogenous compounds that function in plants are not clear, and the entire biosynthetic pathway has not been elucidated. This study aimed to elucidate the SL biosynthesis pathway in various plants. As a result, genes involved in the biosynthesis of SLs with BC-ring structure and methyltransferases involved in the methylation of SLs were identified. Furthermore, SLs with novel structures were isolated and identified.

研究分野：生物有機化学

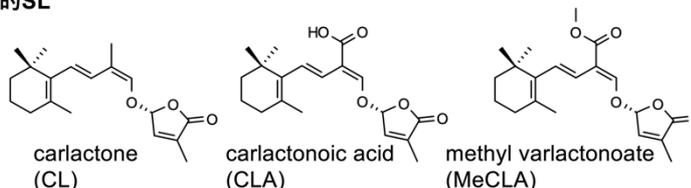
キーワード：植物ホルモン ストリゴラクトン 生合成 シトクロムP450

### 1. 研究開始当初の背景

ストリゴラクトン (SL) は根寄生雑草種子の発芽刺激物質として様々な植物の根分泌液から単離されてきた、一連の構造類縁体の総称である。SL は、多くの陸上植物と共生し植物の栄養状態を改善するアーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐を誘導する活性、および、植物地上部の枝分かれを抑制する活性も有するため、植物の根圏分泌シグナルとしてだけでなく、形態を制御する植物ホルモンとしても重要である。SL の化学構造は、ABC 環を有する典型的 SL と保存された BC 環構造を持たない非典型的 SL に大別される。典型的 SL はさらに C 環の立体化学に基づき、C 環が D 環と同じ方向に配置する 4-deoxyorobanchol (4DO) 型 SL (SL<sup>4DO</sup>) と、逆側に配置する 5-deoxystrigol (5DS) 型 SL (SL<sup>5DS</sup>) に分けられる (図 1)。このように SL の化学構造は多様性に富んでおり、現在までに 30 種類を超える SL 構造が報告されている。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の正体は明らかになっていない。

SL の生合成経路は部分的に解明されている。SL は  $\beta$ -carotene を出発物質として生合成され、3 種類の酵素の一連の反応により生合成中間体である carlactone (CL) が合成される。CL はシトクロム P450 である CYP711A サブファミリーにより、carlactonoic acid (CLA) へ変換される。CLA 以降の経路では、イネにおいて CLA を 4DO に変換する OsCYP711A2 および 4DO を orobanchol に変換する OsCYP711A3 が報告されている<sup>①</sup>。しかし、大部分の植物の CYP711A サブファミリーは CL を CLA あるいは 18-hydroxy-CLA まで酸化するにとどまり、環形成反応を触媒しない。また、非典型的 SL 生産植物では、CLA がメチル化した methyl carlactonoate (MeCLA) がその生合成に関与していると考えられているが、メチル化反応を触媒するメチル基転移酵素は未同定である。

#### 非典型的 SL



#### 典型的 SL

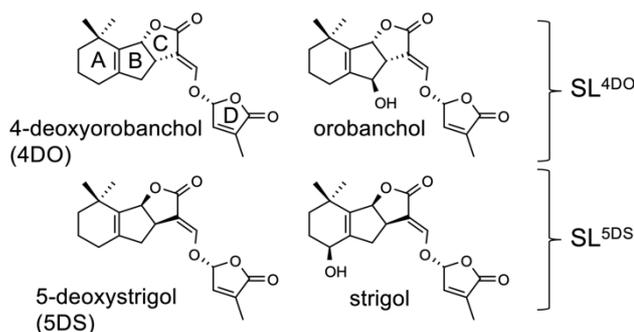


図 1 ストリゴラクトンの構造

### 2. 研究の目的

SL 研究における解明すべき課題は、枝分かれ抑制ホルモンの化学的実体は何かである。構造多様な SL のうちどの化合物が根圏シグナルやホルモンとしての機能を担っているのかは明らかになっておらず、CLA 以降の SL 生合成経路も未解明な部分が多い。一方申請者は、トマトにおいてイネの場合とは異なる orobanchol 生合成経路を同定した。この経路ではトマトの S1CYP722C が CLA から 4DO を経由しない orobanchol への変換に関与する<sup>②</sup>。CYP722 ファミリーは植物に広く保存されており、典型的 SL の生合成に重要であると考えられた。そこで本研究では、CYP722 ファミリーの機能解析および非典型的 SL 生合成遺伝子の探索と同定を通じて、枝分かれ抑制ホルモン活性本体同定のための足がかりとして、典型的・非典型的 SL のどちらが活性本体として寄与しているかを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

CYP722 ファミリーには CYP722A/B/C のサブファミリーが含まれ、CYP722A/C は双子葉植物に、CYP722B (CYP722B は CYP722A と同源性が高い) は単子葉植物に保存されている。このファミリーに属する遺伝子をクローニングし、大腸菌あるいは昆虫細胞でタンパク質を異種発現させ酵素機能を解析した。組み換え酵素と有機合成した基質を反応させた後、生成物を LC-MS/MS で分析した。また、上記に加えベンサムアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) におけるアグロインフィルトレーション法による一過的タンパク質発現システムを用いて酵素機能解析を行った。すなわち、既知の SL 生合成遺伝子 (例えば、CLA を合成するための *D27*, *CCD7*, *CCD8* および *CYP711A*) と、ターゲットである遺伝子を同時に発現させることで、タバコ葉内在の  $\beta$ -カロテンを基質として SL を合成させた。SL 生合成遺伝子とターゲット遺伝子を同時に過剰発現させたタバコ葉から SL を抽出し、抽出物を LC-MS/MS で分析した。

生合成酵素遺伝子の探索では、トランスクリプトーム解析により候補遺伝子を絞り込んだ。SL

はリン欠乏条件下で生産量が増大することが知られている。そこで、この時に発現上昇する遺伝子を候補遺伝子とした。また、既知の SL 生合成遺伝子と共発現する遺伝子についても候補として選抜した。

#### 4. 研究成果

トマトの S1CYP722C は、典型的 SL の orobanchol の生合成に関与する。CYP722C サブファミリーは双子葉植物に幅広く保存され、SL<sup>400</sup> 生産植物に限らず、SL<sup>5DS</sup> 生産植物にも保存される。CYP722C サブファミリーの機能解明のため、orobanchol とは C 環の立体化学が異なる SL である 5DS を生産するワタ (*Gossypium arboreum*) の GaCYP722C の機能解析を実施した。昆虫細胞発現系によりタンパク質を異種発現させ、in vitro 酵素アッセイを行った結果、GaCYP722C が CLA から 5DS への立体選択的な変換反応を触媒することを見出した<sup>③</sup>。また、近年、5DS 生産植物であるミヤコグサ (*Lotus japonicus*) の LjCYP722C や、ワイルドストロベリー (*Fragaria vesca*) の FvCYP722C が CLA から 5DS への変換を触媒することが報告された<sup>④</sup>。これらのことから、CYP722C サブファミリーは双子葉植物において、CLA から典型的ストリゴラクトンへの変換を触媒する鍵酵素であると結論づけた。

また別種のワタ (*G. hirsutum*) における SL 生合成経路を解析した。*G. hirsutum* は *G. arboreum* と同様な生合成経路で 5DS を合成した。一方、5DS から strigol への変換を担う酵素遺伝子はこれまで不明であった。トランスクリプトーム解析による候補遺伝子の絞り込みと、ベンサミアナタバコを用いた一過的タンパク質発現システムによる酵素機能のスクリーニングを実施し、有力な候補として一つのシトクロム P450 を見出した。組み換え酵素を用いた in vitro 酵素アッセイを行った結果、当該候補酵素が 5DS から strigol への変換を触媒することを明らかにし、これを新規 strigol 合成酵素と同定した。

次に、ベンサミアナタバコを用いた一過的タンパク質発現システムにより、イネおよびソルガム (*Sorghum bicolor*) の OsCYP722B、SbCYP722B の機能解析を行った。CLA 生合成経路に関わる酵素遺伝子と CYP722B 遺伝子を共発現させたタバコ葉から SL を抽出し分析した結果、典型的 SL は検出されなかった。したがって、双子葉植物の CYP722C サブファミリーは典型的 SL 生合成に関与するものの、単子葉植物の CYP722B サブファミリーはそれとは異なる機能を有することが示唆された。

典型的 SL 生合成の鍵酵素である S1CYP722C を欠損したトマトでは、根分泌物から orobanchol が検出されなくなる。同時に、複数の SL と考えられる代謝物も検出されなくなった。本研究では、これらのうち 3 種類の新規 SL の構造を決定し、orobanchol 代謝物と同定した。トマトは主要な SL として solanacol を生産するが、本研究でこれらの新規 SL を同定したことで、CLA から orobanchol を経由する solanacol までの生合成経路を新たに提案した<sup>⑤</sup>。

上記のように S1CYP722C 欠損体では典型的 SL が分泌されなくなるが、その一方で枝分かれは増加しないことを報告している。したがって、枝分かれ抑制ホルモンは非典型的 SL に由来すると考えられた。CLA のメチル化体である MeCLA は非典型的 SL のひとつであり、in vitro で SL 受容体と結合し、生理活性型 SL の一つと考えられる。MeCLA を生産することが知られているシロイヌナズナにおいて CLA メチル基転移酵素を探索した結果、CLA を特異的にメチル化する CLA メチル基転移酵素を同定した<sup>⑥</sup>。様々な植物における当該メチル基転移酵素ホモログの機能を調べた結果、トマト、ミヤコグサ、ヒマワリのホモログ酵素が同様の酵素活性を有することを明らかにし、CLA のメチル化が植物に広く保存された機能であることを示した。近年、シロイヌナズナでの詳細な解析が実施され、枝分かれ抑制には当該メチル基転移酵素による CLA のメチル化が重要であることが示された<sup>⑦</sup>。したがって、枝分かれ抑制ホルモンは非典型的 SL に由来し、CLA がメチル化された部分構造を有することが強く示唆された。また、多くの非典型的 SL は MeCLA と同一の部分構造を有するため、MeCLA が非典型的 SL の生合成前駆体であることが示唆されている。本研究では、セイショウチャヒキ (*Avena strigosa*) が生産する新規 SL として 6-*epi*-heliolactone を単離同定した。さらに、植物体へのフィード実験において、投与した MeCLA が 6-*epi*-heliolactone に変換されたことから、MeCLA を経由する非典型的 SL 生合成経路の存在が強く示唆された<sup>⑧</sup>。

以上のように本研究では、典型的・非典型的 SL 生合成に重要な酵素遺伝子を同定し、枝分かれ抑制ホルモンが非典型的 SL に由来する可能性を示すことができた。

#### <引用文献>

- ① Zhang, Y. et al. Rice cytochrome P450 MAX1 homologs catalyze distinct steps in strigolactone biosynthesis. *Nat Chem Biol* 10, 1028-1033 (2014).
- ② Wakabayashi, T. et al. Direct conversion of carlactonoic acid to orobanchol by cytochrome P450 CYP722C in strigolactone biosynthesis. *Science Advances* 5, eaax9067 (2019).
- ③ Wakabayashi, T. et al. CYP722C from *Gossypium arboreum* catalyzes the conversion of carlactonoic acid to 5-deoxystrigol. *Planta* 251, 97 (2020).
- ④ Wu, S. et al. Establishment of strigolactone-producing bacterium-yeast consortium. *Science Advances* 7, eabh4048 (2021).

- ⑤ Wakabayashi, T. et al. Identification of novel canonical strigolactones produced by tomato. *Frontiers in Plant Science* 13, (2022).
- ⑥ Wakabayashi, T. et al. Specific methylation of (11*R*)-carlactonoic acid by an *Arabidopsis* SABATH methyltransferase. *Planta* 254, 88 (2021).
- ⑦ Mashiguchi, K. et al. A carlactonoic acid methyltransferase that contributes to the inhibition of shoot branching in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 119, e2111565119 (2022).
- ⑧ Moriyama, D. et al. Identification of 6-*epi*-heliolactone as a biosynthetic precursor of avenaol in *Avena strigosa*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 86, 998-1003 (2022).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wakabayashi Takatoshi, Moriyama Daisuke, Miyamoto Ayumi, Okamura Hironori, Shiotani Nanami, Shimizu Nobuhiro, Mizutani Masaharu, Takikawa Hirosato, Sugimoto Yukihiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Identification of novel canonical strigolactones produced by tomato	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1064378
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2022.1064378	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 Moriyama Daisuke, Wakabayashi Takatoshi, Shiotani Nanami, Yamamoto Shunya, Furusato Yui, Yabe Kohki, Mizutani Masaharu, Takikawa Hirosato, Sugimoto Yukihiro	4. 巻 86
2. 論文標題 Identification of 6-epi-heliolactone as a biosynthetic precursor of avenaol in Avena strigosa	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 998-1003
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbac069	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, Ueno Kotomi, Sugimoto Yukihiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Structure Elucidation and Biosynthesis of Orobanchol	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 835160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2022.835160	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 Takatoshi Wakabayashi, Ryo Yasuhara, Kenji Miura, Hirosato Takikawa, Masaharu Mizutani, Yukihiro Sugimoto	4. 巻 254
2. 論文標題 Specific methylation of (11R)-carlactonic acid by an Arabidopsis SABATH methyltransferase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Planta	6. 最初と最後の頁 88
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00425-021-03738-6	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, Shinde Hikaru, Shiotani Nanami, Yamamoto Shunya, Mizutani Masaharu, Takikawa Hirosto, Sugimoto Yukihiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Conversion of methyl carlactonoate to heliolactone in sunflower	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Natural Product Research	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14786419.2020.1826477	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, Shida Kasumi, Kitano Yurie, Takikawa Hirosto, Mizutani Masaharu, Sugimoto Yukihiro	4. 巻 251
2. 論文標題 CYP722C from Gossypium arboreum 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 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宮本 歩美、森山 太介、若林 孝俊、岡村 仁則、塩谷 七洋、滝川 浩郷、水谷 正治、杉本 幸裕
2. 発表標題 トマトが生産する新規ストリゴラクトンの同定
3. 学会等名 植物化学調節学会第57回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢部 広暉、森山 太介、若林 孝俊、塩谷 七洋、古里 優衣、水谷 正治、滝川 浩郷、杉本 幸裕
2. 発表標題 セイヨウチャヒキが生産する6-epi-heliolactoneの単離・同定とavenaol生合成経路の解析
3. 学会等名 植物化学調節学会第57回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山 芽与、本間 大翔、北野 友里恵、若林 孝俊、三浦 謙治、滝川 浩郷、水谷 正治、杉本 幸裕
2. 発表標題 Gossypium hirsutumにおけるstrigol合成酵素の同定
3. 学会等名 植物化学調節学会第57回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本間 大翔、若林 孝俊、塩谷 七洋、磯部 一樹、岡澤 敦司、太田 大策、滝川 浩郷、水谷 正治、杉本 幸裕
2. 発表標題 トマトにおいて18-oxo-CLAを基質とするorobanchol合成酵素の同定
3. 学会等名 植物化学調節学会第57回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 若林孝俊, 中山芽与, 本間大翔, 三浦謙治, 滝川浩郷, 水谷正治, 杉本幸裕
2. 発表標題 ワタ(Gossypium hirsutum)におけるstrigol合成酵素の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安原峻, 若林孝俊, 水谷正治, 杉本幸裕
2. 発表標題 ヒマワリにおける非典型的ストリゴラクトンの生合成遺伝子の探索
3. 学会等名 植物化学調節学会第56回大会
4. 発表年 2021年

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 塩谷七洋、若林孝俊、茂田巧、小倉由資、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〕

-

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