

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：24405

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2020～2023

課題番号：20KK0131

研究課題名（和文）生物化学的な知見に基づく宿主作物への根寄生雑草に対する新規防御機構の付与

研究課題名（英文）Genetic modification of host crops to endow novel resistant traits against root parasitic weeds based on advanced biochemical knowledge

研究代表者

岡澤 敦司（Okazawa, Atsushi）

大阪公立大学・大学院農学研究科 ・准教授

研究者番号：10294042

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,400,000円

研究成果の概要（和文）：ハマウツボ科の根寄生雑草は、世界の農業に多大な被害をもたらしている。応募者らは、これまでスーダンを相手国として根寄生雑草による農業被害の克服に貢献するための研究に取り組んできた。本研究課題では、スーダンでも導入が容易な根寄生雑草に対する抵抗性を付与した宿主の開発に応用するための知見獲得を目的とした。宿主から根寄生雑草への糖の転流に着目し、このプロセスに中心的な役割を担うと予想されるインベルターゼの制御に関わるインベルターゼインヒビター遺伝子 comp33755 をヤセウツボより見出した。その生化学的な解析により、その機能を明らかにし宿主への根寄生雑草抵抗形質の付与に応用できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ヤセウツボのトランスクリプトームデータよりインベルターゼインヒビターをコードすると考えられる comp33755 に注目し、その機能を生化学的に解析した。その結果、comp33755 はアポプラストで細胞壁インベルターゼインヒビターとして機能することが示唆された。宿主から転流によって運ばれてきたスクロースは、根寄生雑草と宿主の細胞間（アポプラスト）で細胞壁インベルターゼによる加水分解を受け、生じる単糖が根寄生雑草に取り込まれると予想される。したがって、この過程に comp33755 を介入させることで根寄生雑草への糖の取り込みが阻害される可能性があり、今後、その活用を検討したい。

研究成果の概要（英文）：Orobanchaceae root parasitic weeds are causing significant damage to agriculture worldwide. We have been involved in research projects to contribute to overcoming the agricultural damage caused by root parasitic weeds in Sudan as a partner country. This study aimed to acquire knowledge for application in the development of hosts with resistance to root parasitic weeds, which can be easily introduced in Sudan. Focusing on the translocation of sugars from the host to the root parasitic weed, the invertase inhibitor gene comp33755, which is involved in the regulation of invertase, and is expected to play a central role in this process, was found in the *Orobanche minor*. Biochemical analysis of the gene revealed its function and its potential for application in conferring root parasitic weed resistance traits on the host.

研究分野：生物有機化学

キーワード：根寄生雑草 ハマウツボ科 インベルターゼ 糖代謝 ストリゴラクトン

1. 研究開始当初の背景

ハマウツボ科 (Orobanchaceae) の根寄生雑草は、トウモロコシ、イネ、ソルガムなどの主要穀物や、トマト、マメ類などの経済的に重要な作物、ナタネ、ヒマワリなどの油料作物など、世界の農業に多大な被害をもたらしている。特に、アフリカにおけるハマウツボ科ストライガ属 (*Striga spp.*) によるイネ科穀物に対する被害は深刻で、この大陸での貧困と飢餓の直接的な要因となっている (図 1)。持続可能な開発目標 (SDGs) を達成するためには、その克服が必須であり、これを目指すビル&メリンダ・ゲイツ財団による大型国際研究プロジェクトなどが進められている。

応募者らは、これまで JST・JICA 地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム (SATREPS) の課題「ストライガ防除による食料安全保障と貧困克服 (代表者: 杉本)」で、スーダンを共同研究の相手国として、この問題の解決に取り組んできた。応募者が生物有機化学を専門としていることから、SATREPS の課題では、根寄生雑草に有効な植物化学調節剤の開発利用を主目的として研究を推進してきた。既に、いくつかの有望な成果を得ているが、低分子有機化学物の開発途上国での利用には潜在的な問題が複数あることもわかってきた。主要な問題として、有機合成のインフラが整っていないこと、および、低分子化合物の環境影響を評価する体系が確立されていないことが挙げられる。このような状況に鑑み、これまでの研究に並行して、低分子の植物化学調節剤に依存しない防除法の開発を進めることが重要であると考えられた。

これまで一連の生物有機化学研究を推進することで、根寄生雑草の生化学についての知見が蓄積され、さらに、ゲノム編集など作物側から根寄生雑草の問題克服にアプローチ可能な技術開発も進んできたことから、開発途上国での実施可能性を視野に入れた作物への根寄生雑草への抵抗性付与についても問題解決のために進めるべき重要課題と考えるにいたった。なお、ハマウツボ科の根寄生雑草はその潜在的な脅威から、植物防疫によって国内への持込みや栽培が禁止されており、本国際共同研究ではスーダンでの実証試験が不可欠である。

研究代表者は、これまでに根寄生雑草種子の貯蔵糖の代謝経路ならびに関与する酵素を明らかにした (図 2)。これらの研究では、特に細胞外 (アポプラスト) での糖の代謝に着目した (図 3)。宿主作物の葉 (ソース器官) で合成されたスクロース (Suc) は、維管束 (篩管) 経由で、篩細胞あるいは篩部伴細胞より排出され、根寄生雑草 (シンク器官) の細胞外に存在する細胞壁型インペルターゼ (INV) によって加水分解を受け、生じたグルコース (Glc) やフルクトース (Fru) が、糖輸送体蛋白質によって、細胞内に取り込まれると予想された。一般的に植物では、INV の活性制御に阻害蛋白質 (INV inhibitor) が関与していると考えられていた。また、近年、INV が糖代謝に加えて、糖シグナリングに関わっているという報告もあり、植物の生長制御における役割が注目されていた。

根寄生雑草は宿主へ確実に寄生するために、宿主の根から分泌されるストリゴラクトン (SL) を受容してのみ発芽することが知られていた。研究分担者の杉本は、SL の単離構造決定や構造活性相関研究で多くの実績をあげてきた。高活性の SL 類縁体は、作物を植える前に圃場に投与することで、圃場中の根寄生雑草を強制的に発芽させることが可能である。根寄生雑草は宿主依存的に生育するため、強制的に発芽させられた場合、いずれ枯死にいたる。この防除戦略は自殺発芽誘導と呼ばれ、国内外の研究グループがこれに取り組んでいた。杉本らは、合成が簡便で活性の高い SL 類縁体 T-010 を開発し、スーダンの実験圃場にてその効果を検証したところ、ソルガムへの *Striga hermonthica* による被害が低減し、未処理区と比較した場合に収量が 2 倍となることを示した。

SL については、その化学構造から ABC 環を有する典型的 SL と、BC 環が閉じていない非典型的 SL とに分類される (図 4)。研究分担者の杉本、若林らは、典型的 SL の生合成に必須の BC 環



図 1. *Striga hermonthica* により壊滅的な被害を受けたスーダンのソルガム畑

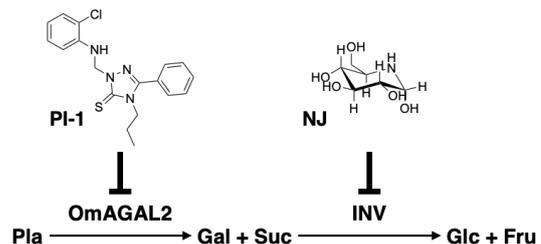


図 2. 研究代表者らによって明らかにされた根寄生雑草の発芽における貯蔵糖代謝経路および各代謝酵素阻害剤

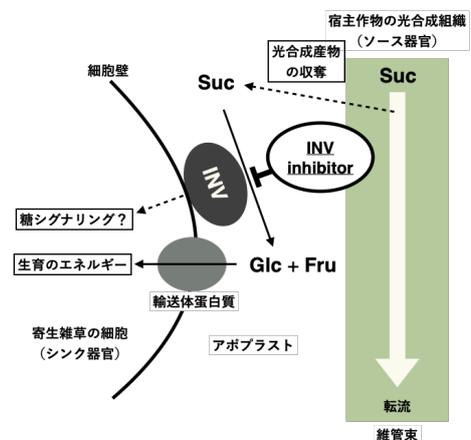


図 3. 根寄生雑草による宿主作物からの糖の収奪に関わる細胞壁型インペルターゼ (INV) の役割およびその阻害蛋白質 (INV inhibitor) による活性制御

形成を触媒する酵素として、複数の植物種からシトクロム P450 である CYP722C サブファミリーを同定した。ゲノム編集により、トマトでこの遺伝子を破壊すると、遺伝子破壊株の根分泌液から典型的 SL が検出されず、その根寄生雑草に対する発芽誘導活性が顕著に低下していることが示された。一方、この遺伝子破壊株の形態には異常が認められなかった。

2. 研究の目的

本国際共同研究では、根寄生雑草を克服するための応募者ならでの研究を実行した。すなわち、これまでの研究成果とスーダン側共同研究者との強固な連携体制をもとに、作物に、根寄生雑草に糖を奪われない形質(課題①)と、根寄生雑草の発芽を誘導しない形質(課題②)を付与し、スーダンの研究機関にて、これらの課題の実証試験を行い、開発途上国で社会実装可能な根寄生雑草防除法を提供することを目的とした(図5)。

3. 研究の方法

・根寄生雑草ヤセウツボ (*Orobanche minor*) の細胞壁型 INV の阻害タンパク質 (INV inhibitor) の機能解明

研究代表者は、ヤセウツボの発芽種子にノジリマイシン (NJ) を処理すると、細胞壁型 INV の活性が顕著に低下することを発見した。さらに、さらに、NJ 処理によって著しく発現が誘導される INV inhibitor 相同遺伝子を見出した(図6)。この配列をもとにヤセウツボの INV inhibitor 相同遺伝子 comp33775 のクローニングおよび大腸菌での異種発現を行い、comp33775 がコードするタンパク質について INV 阻害活性を評価した。また、comp33775 がコードするタンパク質の細胞内局在を、ベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) を用いた一過性発現によって調べた。

4. 研究成果

クローニングした comp33775 の配列を解析したところ、N 末端にシグナルペプチドが存在することが示唆され、配列中に INV inhibitor の特徴である4つのシステイン残基の存在が確認された(図7)そこで、シグナルペプチド(N末端から21残基)を除いたΔSP-comp33775 を GST 融合タンパク質として大腸菌で異種発現させたところ、可溶性画分に目的タンパク質 GST-ΔSP-comp33775 の発現を確認した(図8)。

この可溶性画分を用いて、ヤセウツボ発芽種子から調製した INV 粗酵素溶液に対する INV 阻害活性を測定した。その結果、pH 5.0 において統計的に有意ではないものの comp33775 がヤセウツボ由来のインペルターゼ活性を低下させる可能性が示された(図8)。

次に、comp33775 の細胞内局在を明らかにするために、植物一過性高発現ベクター pTKB3 (筑波大学三浦教授より分与) に comp33775-GFP を導入し、ベンサミアナタバコを用いたアグロインフィルトレーションによって発現させた。共焦点レーザー顕微鏡観察を行ったところアポプラストマーカーとして用いた At5g11420:pH-tdmTurquoise2 との共局在を確認した(図9)

以上の結果より、comp33775 はアポプラストで細胞壁型 INV の活性制御に関わることが示唆された。INV は宿主から根寄生雑草への糖の転流に深く関わることが示されており、本研究で見出した INV inhibitor comp33775 を宿主で発現させることで、根寄生雑草に糖を奪われない宿主の作出が可能になると考えられた。

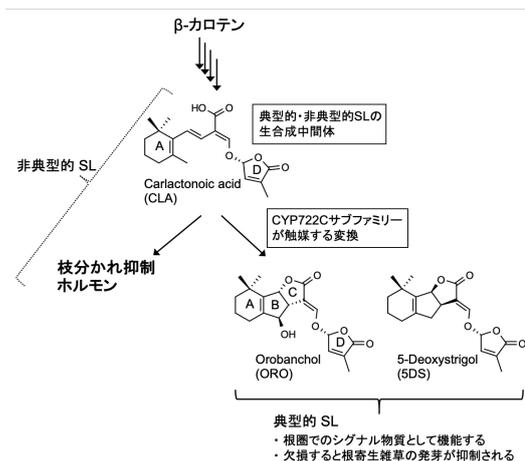


図4. 典型的および非典型的ストリゴラクトン の 生 成 成 と 生 理 的 的 役 割



図5. 本研究課題における作物への根寄生雑草に対する抵抗性の付与

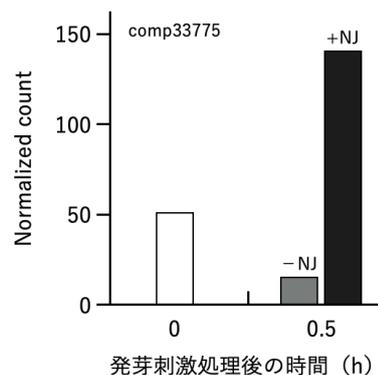
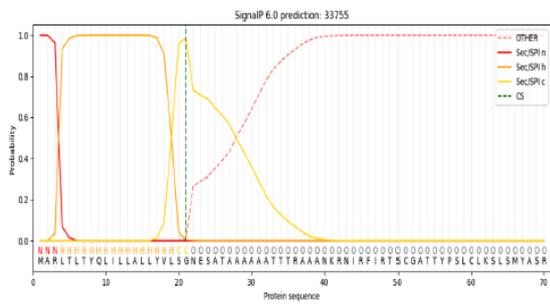


図6. NJ による INV 活性抑制の際に発現が誘導される INV inhibitor 相同遺伝子の発現パターン



```

comp33755_c0_seq1 MARLTLTYQLLLALLVYLSGNETASAAAAAATTTAAANKRNIRFIRTSQATTYPSLCC 60
CAA73334.1 MRNLFPIF--MLITNL-----AFNDNNNSNIINTGATTNYPCC 39
CAA09420.1 MKLILFLI--MFLA-----MLLVTSGNNLVETGANTPNYVLC 37
* * * * *

comp33755_c0_seq1 LKSLSMYASRIRNSPKLVTTLVYSVARSRHTKTFIYKLSKFRGLKRR--EYAAIKDCL 118
CAA73334.1 LTTLHSDPRTSEAEADLTTLGLVMVDAVKLSIEIMKSIKKLEKSNPE--LRLPLSNGT 97
CAA09420.1 VKTSLDKRSEK--AGDITTLALIMVDAIKSKANQAANTISKLRHSNPPQAWKDLKLC 95
* * * * *

comp33755_c0_seq1 EEL-----GDSVNRLLSDSIRELRLRGRARGTEFTWHMSNVQAWVSAALTDHSCLDGD 170
CAA73334.1 IVYYVLHADVTVAVEALKRGVPKFAENG-----MVDVAVEAECLDF 140
CAA09420.1 FSYKVIIPASMPALEALTKGDPKFAEDG-----MVGSSGDAGCLDEY 138
* * * * *

comp33755_c0_seq1 FSGRALRGRVKSVRARMTNVAQVTSNALALCNDFAVK 208
CAA73334.1 FRYNGL--VSPYSDMKEIIELSVAK--SIRMLL-- 172
CAA09420.1 FKATTIKYSPLSKLNIDVHELSDVGR--AIVRNLL-- 171
* * * * *

```

シグナルペプチド (SP) の解析

アミノ酸配列解析

図 7. Comp33755 の配列解析

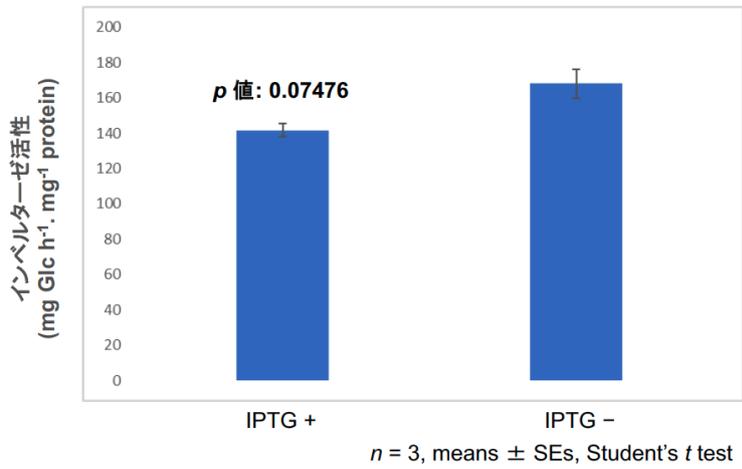
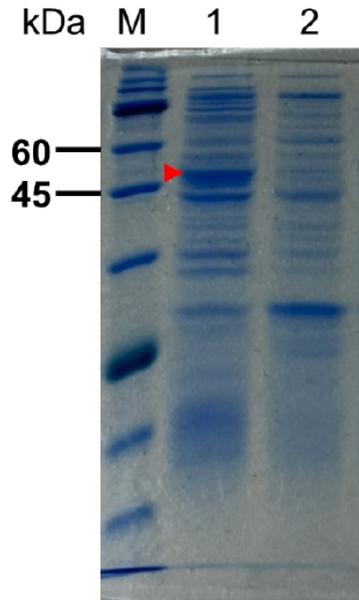


図 8. 大腸菌で発現させた GST-Δ SP-comp33755 (1 レーン、47 kDa) の SDS-PAGE の結果

図 9. 大腸菌で発現させた GST-Δ SP-comp33755 (IPTG+) がヤセウツボ由来インペルターゼの活性に与える影響

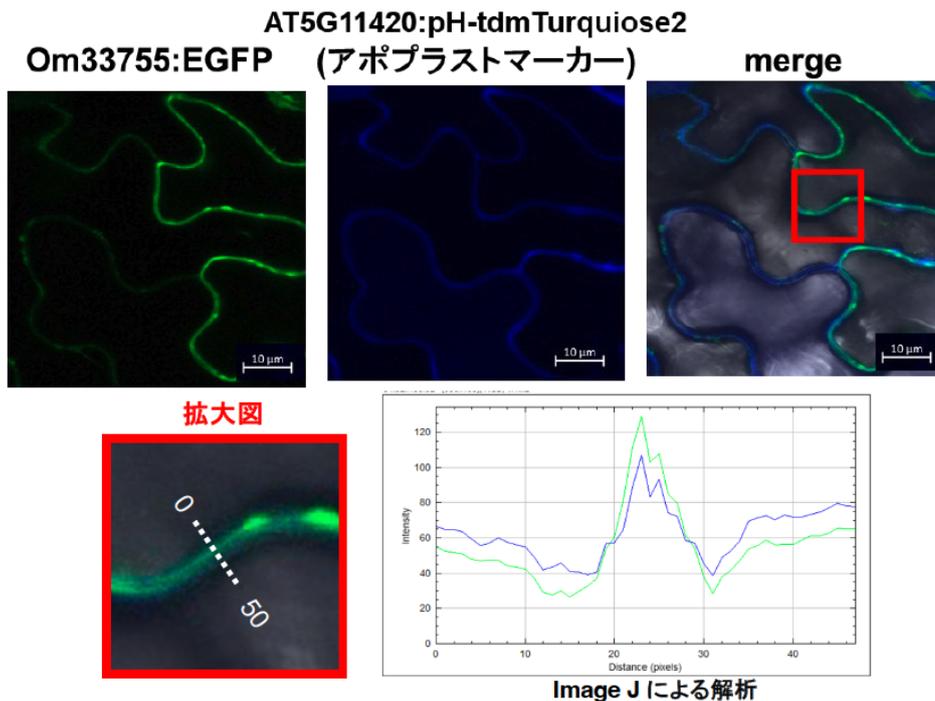


図 10. ペンサミアナタバコで一過性発現させた comp33755:GFP とアポプラストマーカー At5g11420:pH-tdmTurquoise2 の共局在

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3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 Sonoda Motohiro, Mimura Yusuke, Noda Shizuki, Okazawa Atsushi	4. 巻 135
2. 論文標題 Synthesis of aryloxyacetylthiourea derivatives for the development of radicle elongation inhibitor of parasitic weeds	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Tetrahedron	6. 最初と最後の頁 133333 ~ 133333
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tet.2023.133333	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 Okazawa Atsushi, Baba Atsuya, Okano Hikaru, Tokunaga Tomoya, Nakaue Tsubasa, Ogawa Takumi, Shimma Shuichi, Sugimoto Yukihiro, Ohta Daisaku	4. 巻 73
2. 論文標題 Involvement of α -galactosidase OmAGAL2 in planteose hydrolysis during seed germination of <i>Orobanche minor</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 1992 ~ 2004
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jxb/erab527	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 Okazawa Atsushi, Noda Shizuki, Mimura Yusuke, Fujino Kotaro, Wakabayashi Takatoshi, Ohta Daisaku, Sugimoto Yukihiro, Sonoda Motohiro	4. 巻 48
2. 論文標題 The structure-activity relationship of aryloxyacetylthioureas for the inhibition of <i>Orobanche minor</i> radicle elongation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pesticide Science	6. 最初と最後の頁 149 ~ 155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1584/jpestics.D23-034	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 岡澤敦司	4. 巻 7
2. 論文標題 オロバンキの発芽における糖質代謝動態の理解と防除への応用	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 949-954
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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15件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Atsushi Okazawa, Motohiro Sonoda, Daisaku Ohta, Yukihiro Sugimoto
2. 発表標題 Control of the root parasitic plant <i>Orobanche minor</i> through chemical inhibition of metabolism in germination
3. 学会等名 International Plant Molecular Biology (IPMB) Congress 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Atsushi Okazawa, Masahiro Onitsuka, Takatoshi Wakabayashi, Takumi Ogawa, Yukihiro Sugimoto, Daisaku Ohta
2. 発表標題 Screening of alpha-galactosidase OmAGAL2 inhibitors and their effect on germination and sugar profiles in <i>Orobanche minor</i>
3. 学会等名 17th World Congress on Parasitic Plants (WCPP) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Eri Saiga, Moe Matsumoto, Takumi Ogawa, Eiichiro Fukusaki, Daisaku Ohta, Atsushi Okazawa
2. 発表標題 Sugar profiling of root parasitic weed <i>Orobanche minor</i> and its host <i>Trifolium pratense</i>
3. 学会等名 17th World Congress on Parasitic Plants (WCPP) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 雑賀恵梨、松本萌、小川拓水、福崎英一郎、太田大策、岡澤敦司
2. 発表標題 寄生雑草ヤセウツボにおける炭素収奪代謝経路の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度東京大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Atsushi Okazawa, Shizuki Noda, Yusuke Mimura, Kotaro Fujino, Takatoshi Wakabayashi, Daisaku Ohta, Yukihiro Sugimoto, Motohiro Sonoda
2. 発表標題 Effect of aromatic carbonyl thioureas on radicle elongation of a root parasitic plant Orobanche minor
3. 学会等名 15th IUPAC International Congress of Crop Protection Chemistry (ICPC 2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三村勇介、野田鎮希、岡澤敦司、園田素啓
2. 発表標題 根寄生雑草の幼根伸長阻害活性が期待される芳香族チオウレアの合成
3. 学会等名 日本農薬学会第48回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡澤敦司、三村勇介、野田鎮希、藤野宏太郎、若林孝俊、杉本幸裕、太田大策、園田素啓
2. 発表標題 ヤセウツボ幼根伸長を阻害する芳香族チオウレアの構造活性相関
3. 学会等名 日本農薬学会第48回大会
4. 発表年 2023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 鬼束将弘、若林孝俊、小川拓水、太田大策、杉本幸裕、岡澤敦司
2. 発表標題 ヤセウツボの -ガラクトシダーゼに対する阻害剤のスクリーニングと発芽への影響評価
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 岡澤敦司、三村勇介、野田鎮希、太田大策、杉本幸裕、園田素啓
2. 発表標題 ヤセウツボ幼根伸長阻害効果を示す芳香族カルボニルチオウレアの構造活性相関
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 Atsushi Okazawa, Shizuki Noda, Yusuke Mimura, Daisaku Ohta, Yukihiro Sugimoto, Motohiro Sonoda
2. 発表標題 Structure-activity relationship of aromatic carbonylthioureas for inhibition of Orobanche minor radicle elongation
3. 学会等名 16th World Congress on Parasitic Plants (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsushi Okazawa, Takatoshi Wakabayashi, Hiroaki Samejima, Kazuo Harada, Shigeru Kitani, Yukihiro Sugimoto, Daisaku Ohta
2. 発表標題 Actinomycete metabolites for control of Orobancheaceae root parasitic weeds
3. 学会等名 Pacifichem2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡澤敦司、岡野ひかる、小川拓水、新聞秀一、杉本幸裕、太田大策
2. 発表標題 ヤセウツボ発芽種子におけるプランテオース代謝の局在
3. 学会等名 第38回日本植物バイオテクノロジー学会(つくば)大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡澤敦司、岡野ひかる、新聞秀一、小川拓水、杉本幸裕、太田大策
2. 発表標題 根寄生雑草ヤセウツボの発芽におけるプランテオースの代謝部位
3. 学会等名 日本農薬学会第 46 回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡野ひかる、小川拓水、杉本幸裕、太田大策、岡澤敦司
2. 発表標題 ヤセウツボ種子内でプランテオースを加水分解する β -ガラクトシダーゼの局在の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021 年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>プレスリリース；根寄生雑草防除の標的となる代謝酵素を特定 アフリカの飢餓克服への貢献をめざして https://www.osakafu-u.ac.jp/press-release/pr20211220/</p>

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	杉本 幸裕 (Sugimoto Yukihiro) (10243411)	神戸大学・農学研究科・教授 (14501)	
研究 分 担 者	若林 孝俊 (Wakabayashi Takatoshi) (20843858)	大阪公立大学・大学院農学研究科・特任研究員 (24405)	

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		
スーダン	National Center for Research		