

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2014～2016

課題番号：26520310

研究課題名(和文) 選択的な防除法の確立に資する寄生雑草に特有のプランテオース代謝経路の解明

研究課題名(英文) Elucidation of planteose metabolic pathway in parasitic weeds for their selective control

研究代表者

岡澤 敦司 (Okazawa, Atsushi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：10294042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：寄生雑草は、世界中の乾燥地～半乾燥地農業に大きな被害を与えており、グローバルな食糧安全保障を脅かしている。研究代表者らは寄生雑草に選択的な除草剤を開発するために、その特徴的な発芽に着目したメタボローム解析を行った。その結果、プランテオースの代謝経路が将来有望な標的となる可能性を示した。そこで、本研究では未だ報告例のないプランテオースの代謝経路明らかにすることを目的とした。その結果、プランテオースの生合成に関わる遺伝子のトマト変異体の取得とプランテオースの代謝の最初の加水分解を触媒すると考えられる酵素の取得に成功した。

研究成果の概要(英文)：Parasitic weeds damage agriculture in arid and semi-arid land worldwide and jeopardize global food security. We had conducted metabolome analysis of parasitic weed germination and revealed that planteose metabolic pathway can be promising target for their selective control. In this study, we tried to elucidate enzymes involved in planteose metabolic pathway. Tomato mutants lacking genes involved in planteose biosynthesis were obtained for gene identification. An enzyme catalyzing the first hydrolysis of planteose was successfully elucidated.

研究分野：生物有機化学

キーワード：寄生雑草 クス解析 ハマウツボ科 ストライガ オロバンキ プランテオース ノジリマイシン 除草剤 オミ

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究の対象となる寄生雑草は、世界中の乾燥～半乾燥地域で農業に甚大な被害を与えており、特にアフリカでは食料生産の不安定化を引き起こす最大の生物的要因とされている(図1)。人口増加の著しいアフリカにおける食料生産の不安定化は、グローバルな食糧安全保障を脅かすため、寄生雑草による被害の克服を目指した研究が、国内外で精力的に進められている。



図1. 寄生雑草ストライガによって壊滅的な被害を受けたスーダンのソルガム畑

(2) これらの寄生雑草は、宿主の根から放出されるストリゴラクトン (SL) などの発芽刺激物質を受容して初めて発芽するという特徴的な発芽様式を示す。そこで、メタボロミクスにより寄生雑草に特徴的な代謝経路を同定することで、その選択的な防除法を確立できると考えた。国内で入手可能なヤセウツボ (*Orobanche minor*) を材料として、SL 受容後、発芽にいたるまでの代謝変動を網羅的に解析したところ、直ちに減少する特徴的な化合物を見出し、単離精製ならびに構造解析によって、これがプランテオース (Pla) であると同定した(図2。)さらに、阻害剤のスクリーニングにより、ノジリマイシン (NJ) が、プランテオースの代謝を阻害することで、寄生雑草の発芽を抑制することを発見した(図3)。

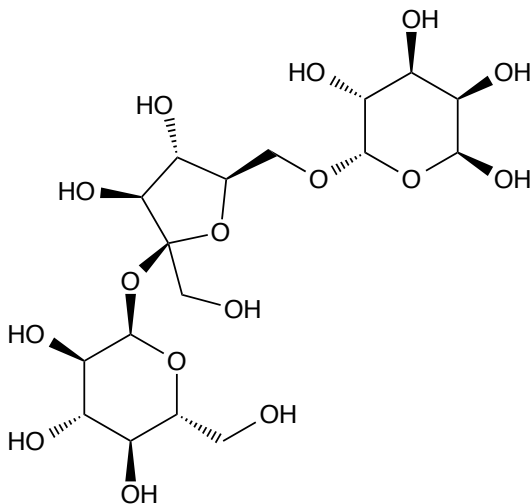


図2. プランテオースの構造

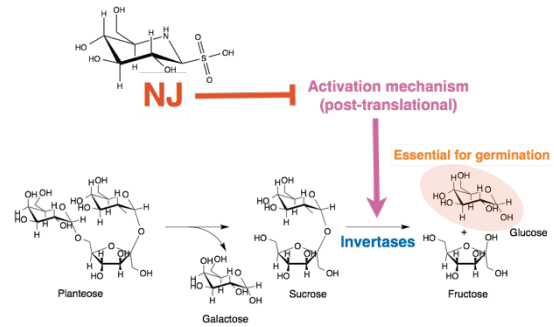


図3. ノジリマイシン (NJ) によるプランテオース代謝の阻害

2. 研究の目的

(1) NJ によって寄生雑草の発芽を選択的に抑制出来ていることから Pla の代謝経路を阻害出来る化合物は、寄生雑草選択的な除草剤として開発出来る可能性がある。しかし、Pla についてその代謝に関する研究はごく僅かであり、これに関わる酵素は明らかではない。そこで、本研究ではプランテオースの生合成ならびに分解酵素を明らかにすることを目的とした。

(2) また、NJ については Pla 代謝中間体のスクロース (Suc) の分解を担うインベルターゼを間接的に阻害していることを明らかにしているが、その詳細は明らかではなかったため、この分子機構を解明することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) まず、Pla の生合成酵素について、ゴマおよびヤセウツボの種子より調製したタンパク質抽出液を用いた活性の検出を試みたが、いずれもその活性を確認できなかった。そこで、研究戦略を変更し、Pla を種子に含んでいることが報告されているトマトを材料に、Pla 代謝関連変異体のスクリーニングを試みた。

(2) Pla の分解酵素について、別途取得したヤセウツボ発芽種子のトランスクリプトームデータを検索したところ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼと予想されるタンパク質の遺伝子発現量が、ヤセウツボの発芽の進行とともに上昇することを見出した。この遺伝子を OmAGAL とし、細胞内移行シグナルと予想される配列を除き N 末端にグルタチオン (GST) を融合した GST- $\Delta$ TP-OmAGAL を大腸菌にて発現しその活性を測定した。

(3) インベルターゼの NJ による活性低下の原因がインベルターゼのペプチドの切断への影響という仮説をたて、インベルターゼの配列をもとに作成したペプチドに対する抗体を用いたウェスタンブロッティングを行なった。

4. 研究成果

(1) メタンスルホン酸エチル (EMS) 処理によ

り変異を誘発した 3,000 系統のマイクロトムライブラリーのスクリーニングの結果, 19 系統で種子中の Pla の減少が確認できた. そのうちのいくつかの系統では WT との戻し交配によって得られた F<sub>1</sub> において Pla 含量が増加し, さらに F<sub>1</sub> の自家交配によって得られた F<sub>2</sub> において, Pla 蓄積量低下の変異形質と野生型の表現系が分離したことから, 今後この変異の遺伝子座を明らかにすることで, Pla 生合成に関わる遺伝子を同定できると期待される.

(2) モデル基質として p-ニトロフェニル- $\alpha$ -ガラクトピラノシドを用いた活性測定の結果, OmAGAL は酸性条件下で顕著な活性を示すことが明らかとなった (図 4). さらに, Pla を基質とした場合でも, 酸性条件下で分解活性を示すことが明らかになった (図 5). Pla の加水分解活性をもつ酵素はこれまでに報告されていない.

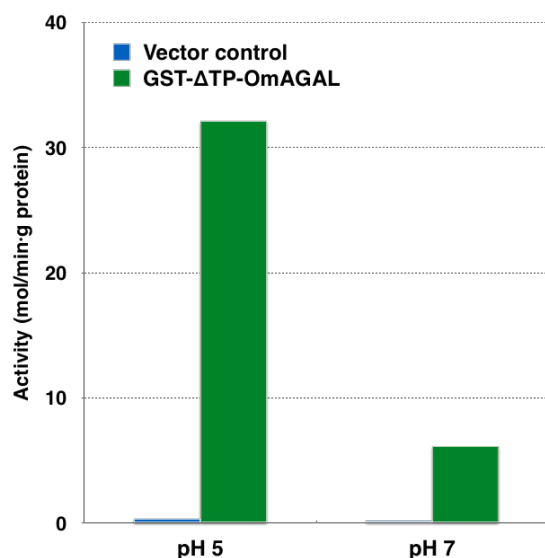


図 4. GTS- $\Delta$ TP-OmAGAL のモデル基質に対する活性

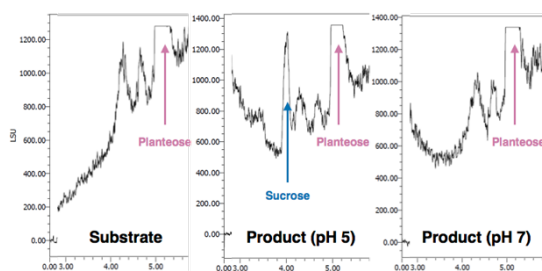


図 5. GTS- $\Delta$ TP-OmAGAL による Pla の加水分解

(3) ウェスタンブロットの結果, 予想に反し, NJ はインベルターゼのタンパク質発現量および分子量の分布に影響を与えていないことが明らかとなった (図 6). この際やはり NJ で処理した種子中のインベルターゼ活性は低下していたことから, NJ はプロセッシング以外の翻訳後修飾に影響を与えている可能性が示唆された.

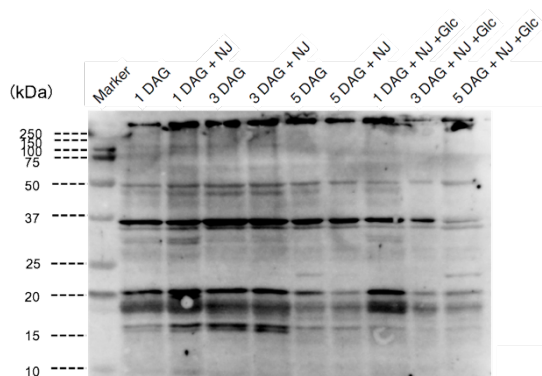


図 6. インベルターゼのウェスタンブロットティング

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① 岡澤敦司, オミクス解析による根寄生雑草選択的除草剤の標的探索, 日本農薬学会誌, 査読無, 42 巻, 2017, 84-90  
DOI:10.1584/jpestics.W17-25
- ② 岡澤敦司, 根寄生雑草選択的除草剤の開発に向けて, 生産と技術, 査読無, 68 巻, 2016, 90-93
- ③ 岡澤敦司, 根寄生雑草の発芽におけるプランテオース代謝の役割と防除標的としての可能性, 植物の生長調節, 査読無, 50 巻, 2015, 150-155
- ④ Wakabayashi, T., Joseph, B., Yasumoto, S., Akashi, T., Aoki, T., Harada, K., Muranaka, S., Bamba, T., Fukusaki, E., Takeuchi, Y., Yoneyama, K., Muranaka T., Sugimoto, Y., Okazawa, A., Planteose as a storage carbohydrate required for early stage of germination of *Orobancha minor* and its metabolism as a possible target for selective control, 査読有, J. Exp. Bot., Vol. 66, 2015, 3085-3097  
DOI:10.1093/jxb/erv116
- ⑤ 岡澤敦司, 若林孝俊, 代謝解析による規制雑草防除法の開発, 生物工学会誌, 査読無, 92 巻, 2014, 549-552  
DOI:10.5511/plantbiotechnology.14.0910a

[学会発表] (計 25 件)

- ① 岡澤敦司, 根寄生雑草に特徴的な代謝経路の同定と選択的除草剤への展開, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年 3 月 17-20 日, 京都女子大学, 京都 (招待講演)

- ② 馬場敦也, 徳永智哉, 木場康介, 小川拓水, 杉本幸裕, 太田大策, 岡澤敦司, ヤセウツボの種子発芽に特徴的なプランテオース代謝に関わる酵素の探索, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年 3 月 17-20 日, 京都女子大学, 京都
- ③ Okazawa, A., Metabolism of planteose, a storage carbohydrate in seeds of root parasitic Orobanchaceae, 10<sup>th</sup> International Symposium Exploring the Global Sustainability-Advances in plant biotechnology for agriculture in semi-arid land-, 2017 Mar. 14-15, Osaka University, Suita
- ④ Wakabayashi, T., Yasumoto, S., Akashi, T., Aoki, T., Sugimoto, Y., Ohta, D., Muranaka, T., Okazawa, A., Study on the effect of nojirimycin on sugar metabolism in germinating seeds for selective control of root parasitic weeds, 13<sup>th</sup> IUPAC International Congress of Pesticide Chemistry, 2014 Aug. 10-15, San Francisco (国際学会)
- ⑤ 馬場敦也, 徳永智哉, 木場康介, 小川拓水, 杉本幸裕, 太田大策, 岡澤敦司, 根寄生雑草ヤセウツボの発芽種子で発言している  $\alpha$ -ガラクトシダーゼの機能解析, 日本農薬学会第 42 回大会, 2017 年 3 月 6-8 日, 愛媛大学, 松山
- ⑥ Wakabayashi, T., Sugimoto, Y., Okazawa, A., Selective inhibition of germination of root parasitic weeds by nojirimycin, an inhibitor of planteose metabolism, SATREPS 2 Symposium Development of counter measures against *Striga* to conquer poverty and improve food security in Sudan, 2017 Jan. 29, Ministry of Higher Education and Scientific Research Conference Hall, Khartoum (国際学会)
- ⑦ Okazawa, A., Metabolic analysis toward development of herbicides selective to root parasitic weeds, NAIST interdisciplinary workshop Frontiers in Parasitic Plant and Host Interactions, 2016 Aug 30, NAIST Bioscience lecture hall, Ikoma (国際学会, 招待講演)
- ⑧ Okazawa, A., Metabolic study for development of a novel and selective herbicide against root parasitic weeds, The 1<sup>st</sup> China-Japan-Korea Trilateral Joint Symposium on Plant Biotechnology, 2016 Aug. 3-5, Wanyilijing Hotel, Guiyang (国際学会)
- ⑨ 岡澤敦司, オミクス解析による根寄生雑草選択的除草剤の標的探索, 日本農薬学会第 41 回大会, 2016 年 3 月 17-19 日, 島根大学, 松江 (招待講演)
- ⑩ 岡澤敦司, 橋本千里, 水川翔太, 小川拓水, 青木考, 太田大策, 根寄生雑草防除研究へ展開するためのトマト変異体のスクリーニング, 日本農薬学会第 41 回大会, 2016 年 3 月 17-19 日, 島根大学, 松江
- ⑪ Okazawa, A., Omics-based exploration for identification of targets for selective control of root parasitic weeds, 9<sup>th</sup> International Symposium Exploring the Global Sustainability-Advances in Plant Biotechnology in Semi-arid Land-, 2016 Mar. 7-8, Osaka University, Suita (国際学会)
- ⑫ 岡澤敦司, 植物代謝研究の応用展開-根寄生雑草の防除とゲノム編集に関する話題-, 住友化学株式会社内セミナー, 2016 年 2 月 19 日, 住友化学, 宝塚
- ⑬ 岡澤敦司, ノーベル平和賞級? 猛威をふるう寄生植物による被害の克服を目指して, 智の木協会新年交流会, 2016 年 1 月 23 日, 智の木協会, 大阪
- ⑭ Okazawa, A., Discovery of novel targets for selective chemical control of root parasitic weeds based on metabolic and transcriptomic analysis of their germination, Pacificchem 2015, 2015 Dec. 15-20, Hilton Waikiki Beach, Honolulu (国際学会)
- ⑮ 若林孝俊, 村中俊哉, 杉本幸裕, 岡澤敦司, 根寄生雑草ヤセウツボの発芽過程における RNA-Seq によるトランスクリプトーム解析, 植物化学調節学会第 50 回大会, 2015 年 10 月 23-25 日, 東京大学, 東京
- ⑯ 橋本千里, 小川拓水, 青木考, 太田大策, 岡澤敦司, 根寄生雑草ヤセウツボに対する抵抗性因子の探索, 第 32 回日本植物細胞分子生物学会 (東京) 大会・シンポジウム, 2015 年 8 月 10-12 日, 東京大学, 東京
- ⑰ 水川翔太, 橋本千里, 若林孝俊, 小川拓水, 青木考, 太田大策, 岡澤敦司, トマトにおけるプランテオース生合成関連遺

伝子の探索, 第 32 回日本植物細胞分子生物学会 (東京) 大会・シンポジウム, 2015 年 8 月 10-12 日, 東京大学, 東京

- ⑱ 岡澤敦司, 発芽種子中の代謝経路の理解による根寄生雑草防除への挑戦, 日本農芸化学会関西支部例会 (第 490 回講演会), 2015 年 6 月 4 日, 大阪府立大学, 堺 (招待講演)
- ⑲ 若林孝俊, 村中俊哉, 杉本幸裕, 岡澤敦司, 根寄生雑草選択摘発が阻害剤ノジリマイシンがヤセウツボ発芽初期過程の遺伝子発現に及ぼす影響, 日本農薬学会第 40 会大会, 2015 年 3 月 16-18 日, 玉川大学, 町田
- ⑳ Okazawa, A., Identification of a novel metabolic target for discovery of selective herbicides for root parasitic weeds, 8<sup>th</sup> International Symposium Exploring the Global Sustainability, 2015. Mar. 3-4, Osaka University, Suita (国際学会)
- 21 岡澤敦司, 食糧の安定供給を目指した根寄生雑草克服技術の開発, 未来へのバイオ技術勉強会, 2014 年 11 月 13 日, 一般財団法人バイオインダストリー協会, 東京 (招待講演)
- 22 Okazawa, A., Chemical inhibition of germination based on metabolic knowledge, International Symposium on *Striga* Management, 2014 Sep. 15, Khartoum (国際学会)
- 23 岡澤敦司, 寄生雑草選択的な除草剤の開発に向けた代謝研究, 2014 年 9 月 8 日-11 日, 札幌コンベンションセンター, 札幌
- 24 鈴岡万季, 黒野友理香, 長澤沙弥, 松浦秀幸, 岡澤敦司, 原田和生, 平田收正, 放線菌 *Streptomyces ficellus* による寄生植物発芽阻害剤ノジリマイシンの生産, 第 66 回日本生物工学会大会, 2014 年 9 月 8-11 日, 札幌コンベンションセンター, 札幌
- 25 若林孝俊, 杉本幸裕, 村中俊哉, 岡澤敦司, 根寄生雑草発芽阻害剤ノジリマイシンが及ぼすプランテオース代謝経路への影響, 第 32 回日本植物細胞分子生物学会 (盛岡) 大会・シンポジウム, 2014 年 8 月 20-22 日, アイーナいわて県民情報交流センター, 盛岡

[図書] (計 1 件)

- ① Okazawa, A., Wakabayashi, T., Chemical control of root parasitic weeds (Chapter), in "Discovery and Synthesis of Crop Protection Products", 2015, 317-330/467, American Chemical Society

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等  
<http://cell-metabolism.sakura.ne.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡澤 敦司 (OKAZAWA Atsushi)  
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授  
研究者番号 : 10294042

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

(4) 研究協力者

( )