

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2015～2017

課題番号：15KT0031

研究課題名(和文) 寄生植物ストライガの撲滅に向けたケミカルジェネティクス研究

研究課題名(英文) Chemical genetic approach toward eradication of noxious parasitic weed *Striga hermonthica*

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) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アフリカで深刻な食糧問題を引き起こす寄生植物ストライガ(*Striga hermonthica*)を撲滅を目指して、自殺発芽によって土中の種子を自殺発芽に追い込むストリゴラクトン様人工化合物の開発を行った。低分子化合物スクリーニングより発見した人工化合物骨格に、ストリゴラクトンの活性部位を融合したハイブリット分子(コードネーム：SAMR690)を開発した。当該化合物は、フェムトモラーレベルでストライガの発芽を刺激する非常に高活性な化合物であるとともに、菌根菌や作物への影響が最小限に抑えられたため、実用レベルでの効果が期待される。

研究成果の概要(英文)：A noxious parasitic plant called *Striga hermonthica* (*Striga*) represents a major threat to food security in Africa. In this research project, I focused on a host-dependent germination mechanism in *Striga* and use it to develop a specific herbicide that lead the seeds to "suicide germination". The developed molecule (code name : SAMR690), which is composed of synthetic scaffold connected with the active core structure of strigolactones, exhibits extraordinary potency in stimulating *Striga* germination at femto-molar range without impinging on beneficial functions in the host strigolactone-related processes. Most importantly, the three-step procedure for synthesizing SAMO-Me-690 greatly increases the potential for *Striga* eradication via suicide germination campaigns in Africa.

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 植物ホルモン 寄生植物 ストライガ

#### 1. 研究開始当初の背景

ハマウツボ科のストライガ (*Striga hermonthica*) は、サハラ以南のアフリカでの穀物生産に深刻な被害を与える寄生植物である。この防除策として、宿主が存在しない状況で、薬剤により強制的に種子発芽させることで枯死に導く自殺発芽と呼ばれる手法が提案されてきた。ストライガの種子は、宿主の根から放出される植物ホルモンのストリゴラクトン (SL) を認識して発芽することから、安価で高活性な人工 SL アゴニストの開発が望まれてきた。しかし、その標的となるストライガの SL 受容体やそのシグナル伝達機構に関する知見は皆無であった。

#### 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、受容体の同定、低分子化合物との生化学的結合の評価系の開発、ケミカルスクリーニング、化合物の構造改変等を通し、リガンドと受容体の相互作用の観点から自殺発芽剤の開発に取り組んだ。

#### 3. 研究の方法

(1) ストライガの発芽を刺激する人工化合物のケミカルスクリーニング: 12,000 個の人工化合物を含むライブラリーより、ストライガの発芽を刺激する化合物のスクリーニングを行なった。96 穴プレートを用い、25  $\mu$ M の濃度で 2 反復のスクリーニングを行い、再現的に発芽を刺激するものを候補として選抜した。

(2) 蛍光性プローブ・ヨシムラクトンを用いた低分子リガンドと受容体の生化学的結合の評価: ヨシムラクトンを用い、蛍光を指標とした *in vitro* 競合試験により SL 受容体 ShHTL タンパク質に対する候補化合物の結合能を評価した。

(3) 化合物の構造変換による改変: 候補化合物の合成の際、高活性な副産物が確認されたため、HPLC による精製、MS 解析、NMR 解析により構造を決定し、さらに構造の最適化を行なった。

(4) ポットレベルでの自殺発芽アッセイ: 農水省植物防疫所の許可条件に従い、ポットレベルでのストライガのトウモロコシに対する寄生試験を行なった。ストライガ種子をポット内土中でコンディショニング処理し、候補化合物、あるいはコントロールとして DMSO を与えて 4 日間培養した。トウモロコシ種子を植え、さらに 3 ヶ月間共培養し、ストライガの寄生頻度を観測した。

#### 4. 研究成果

本研究を開始した当初、SL はイネやシロイヌナズナ等、非寄生植物においては枝分かれの制御等に関わる植物ホルモンとして機能することが明らかとなっており、SL 受容体として知られていた DWARF14 (D14) ファミリーのタンパク質は、受容の際、SL を加水分解する性質を持つことが示されていた。本研究員は、

この反応機構を利用して、加水分解を受けることで蛍光を発する SL ミミックであるヨシムラクトンを開発し、これを利用した *in vitro* での受容体タンパク質と SL 類との結合を評価するアッセイ系を確立した。このアッセイ系を用い、D14 ホモログである 11 個の ShHTL 遺伝子群が、ストライガにおける SL 受容体であることを見出した (Tsuchiya and Yoshimura et al., Science 2015)。

これら情報とアッセイ系を利用し、リガンドと受容体の相互作用という観点からストライガの自殺発芽剤の開発をおこなった。12,000 個の人工化合物からなるケミカルライブラリーよりストライガの発芽を刺激するものをスクリーニングした結果、19 個の共通の構造骨格を持つ化合物で発芽刺激活性が再現的に観察された。そこで、アナログ化合物を 60 個新たに合成し、発芽刺激活性、および *in vitro* での ShHTL タンパク質群に対する結合を解析したところ、活性が見られたアナログ化合物では高アフィニティー受容体の一つである ShHTL7 に対して強い選択的結合が見られた。また、シロイヌナズナの SL 受容体である AtD14 に対する結合は見られなかったことから、この化合物骨格よりストライガに対して選択的に作用する SL ミミックが開発できると考えられた。

ここまでで得られた化合物は、1  $\mu$ M 程度でストライガの発芽を刺激する活性を有していたが、人工 SL である GR24 (10 pM 程度で発芽刺激) と比較するとはるかに活性の低いものであった。しかし、アナログ化合物を合成する過程で、HPLC や NMR では観測できないレベルのごく少量でストライガの発芽を刺激する副産物の存在に気づき、この精製と構造決定を試みた。5g のスケールで合成したアナログから、0.6mg の副産物を含むフラクションを精製できたため、NMR と MS フラグメンテーションのパターンから構造を同定した結果、アナログ化合物と SL の構造が混合した新規の構造を持つ化合物であることが明らかとなった。この副産物では GR24 と同等、あるいはそれ以上の活性が観察されたが、さらなる構造の最適化の結果、最終的に得た化合物 SAMR-690 は 10 fM という極めて微量でストライガの発芽を刺激することが明らかとなった。これは、ストライガの天然の宿主であるソルガムが合成する天然 SL の 5-デオキシストリゴール (5DS) と同等の活性であった。

一方、5DS とは異なり、SAMR-690 は ShHTL7 に対する強い選択性を有し、AtD14 を含む他の受容体に結合しないことが生化学的な解析から明らかとなった。そこで、この選択性の原理を解明するため、ShHTL7 の受容ポケットを構成する 16 個のアミノ酸に突然変異を導入し、SAMR-690 に対する結合にどう寄与するかを生化学的に調べたところ、うち 7 個の変異が重なった時点で結合能が完全に失われた。興味深いことに、この 7 重変異 ShHTL7

タンパク質では、5DS に対する結合能は全く損なわれていなかった。すなわち、SAMR-690 は天然 SL とは異なる様式で受容体に結合してシグナルを活性化するため、5DS とは異なる選択性を持つと考えられた。さらに、構造活性相関へと研究を進め、SAMR-690 は、人工化合物に由来するパーツと SL とよく似たパーツの協調作用を伴う独特な活性様式によって fM レベルの高活性を持つことが示唆された。

以上結果より、SAMR-690 は、作物の成長には作用せず、ストライガに選択的に作用する自殺発芽剤として有効であろうと考えられた。これを検証するため、まず、シロイヌナズナに対して SL 活性を有するかを、SL 生合成欠損株である *max4-1* に与えることで解析した。その結果、10  $\mu$ M の SAMR-690 は SL 欠損の表現系である枝分かれの増加を回復することができなかつたため、シロイヌナズナに対しては SL 活性を有しないことが明らかとなった。AtD14 に対する結合能の欠如と一致する結果と言える。さらに、SAMR-690 が実際に自殺発芽を引き起こすことができるかを、ポットレベルでの試験で検証した。ストライガの種子を含む土に、SAMR-690 あるいは DMSO コントロールで処理し、4 日間自殺発芽を誘導したのち、宿主としてトウモロコシを生育する方法で検証した結果、100 pM あるいはそれ以上の SAMR-690 で処理したものはストライガの生育が見られなかった。従って、SAMR-690 は期待通り、実際に自殺発芽を引き起こすことが証明された。本成果は、人工ストリゴラクトンを遥かに凌駕する活性を有し、かつ環境に対する負荷の非常に少ない自殺発芽剤の開発に成功したものである。簡易な合成法も含め、アフリカでの実用レベルの効果が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(査読あり) Tsuchiya, Y., Yoshimura, M., & Hagihara, S. (2018). The dynamics of strigolactone perception in *Striga hermonthica*: a working hypothesis. *Journal of Experimental Botany*.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/ery061>  
(査読あり) 土屋 雄一郎、寄生植物ストライガにおけるストリゴラクトンの受容機構 (2017)、植物の成長調節 52:63-69.

〔学会発表〕(計 6 件)

Tsuchiya, Y. Chemical Biology to combat against a parasitic plant *Striga* 5th Annual South Asia Biosafety Conference (SABC). Bangalore, India, September, 2017.  
土屋雄一郎、寄生植物ストライガの撲滅

に向けた化学と生物の融合研究 . 天然物化学談話会 . 熱川 . 7 月、2017.

土屋 雄一郎、寄生植物ストライガの発芽を制御する人工アゴニストの開発 . 日本農芸化学会 . 京都 . 3 月、2017.

Yuichiro, Tsuchiya, Development of suicide germination molecule for a parasitic plant *Striga*. 2nd *International Congress on Strigolactones*. Turin, Italy. March 2017.

土屋 雄一郎、寄生植物ストライガの発芽を制御する人工アゴニストの開発 . 植物生理学会年会 . 鹿児島 . 3 月、2017.

Yuichiro Tsuchiya, Probing strigolactone receptors in *Striga hermonthica* with fluorescence. *International conference on plant growth substances (IPGSA)*. Toronto, Canada. June, 2016.

〔図書〕(計 2 件)

萩原伸也、吉村 柁彦、土屋雄一郎、木下俊則、伊丹健一郎 . 魔女の呪いを解く分子-寄生植物 “ストライガ” の発芽を制御する分子を開発 (2016). 化学 71(5):35-39.

土屋雄一郎 . 植物ホルモン・ストリゴラクトンをめぐる生物戦略 (2016). 理科通信 サイエンスネット (数研出版) 57 号 : 2-5 .

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称 : 寄生植物発芽調節剤

発明者 : 土屋 雄一郎、浦口 大輔、大井 貴史、木下 俊則、桑田 啓子、

権利者 : 国立大学法人名古屋大学

種類 : 特許

番号 : 特許願 10032016JP

出願年月日 : 平成 29 年 10 月 3 日

国内外の別 : 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.itbm.nagoya-u.ac.jp/ja/membre/y-tsuchiya/>

#### 6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし ( )

(3)連携研究者

浦口 大輔 (URAGUCHI, Daisuke)  
名古屋大学工学研究科・准教授  
研究者番号：70426328

(4)研究協力者

桑田 啓子 (KUWATA, Keiko)  
佐藤 綾人 (SATO, Ayato)