

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05838

研究課題名(和文) 根寄生雑草防除法の開発に向けたストリゴラクトン生合成酵素の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of strigolactone biosynthetic enzymes for developing a control method of root parasitic weeds

研究代表者

野村 崇人 (Nomura, Takahito)

宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・准教授

研究者番号：60373346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：根寄生植物は、宿主植物の根に寄生して養水分を奪うため、世界各地の農作物に甚大な被害を与えている。現在までに根寄生雑草の有効な防除法は確立されていない。根寄生雑草の種子は植物の根から浸出されるストリゴラクトン(SL)と呼ばれる二次代謝産物を認識して発芽する。これまでに根寄生雑草に耐性を示すソルガムの変異体から、その耐性を付与した原因遺伝子LGS1が同定されていた。LGS1遺伝子はSL生合成酵素をコードしていると考えられていたが、その機能は解明されていなかった。本研究により、ソルガムにおいてシトクロムP450酵素と硫酸基転移酵素により触媒されるSL生合成経路が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

根寄生雑草(特にストライガ類)はアフリカ諸国の農作物の収量を大きく低下させている。また、地中海沿岸諸国やオーストラリアといった農業先進国における根寄生雑草(特にオロバンキ類)の被害も顕在化している。現在のところ日本には農作物に大きな被害を与えている根寄生雑草種は侵入していないと考えられるが潜在的な脅威となっている。有効な防除法のない根寄生雑草に関する研究を行う意義は大きく、本研究の成果は根寄生雑草を制御する技術の基盤となりうる。

研究成果の概要(英文)：Root parasitic plants parasitize on the roots of host plants and deprive nutrients and water, causing extensive damage to crops around the world. So far, no effective control method for root parasitic weeds has been established. Root parasitic weed seeds germinate by recognizing secondary metabolites called strigolactones (SLs), which are exuded from the roots of host plants. The lgs1 mutant of sorghum that exhibits resistance to root parasitic weeds has been reported. The LGS1 gene was thought to encode an SL biosynthetic enzyme, but its function has not been elucidated. This study has revealed the SL biosynthetic pathway catalyzed by cytochrome P450 and sulfotransferase in sorghum.

研究分野：植物生理化学

キーワード：ストリゴラクトン 根寄生雑草 生合成酵素

### 1. 研究開始当初の背景

ストライガやオロバンキといった根寄生雑草は、宿主植物の根に寄生して養水分を奪うため、世界各地の農作物に甚大な被害を与えている。現在までに根寄生雑草の有効な防除法は確立されていない。根寄生雑草の種子は植物の根から浸出されるストリゴラクトン (SL) と呼ばれる二次代謝産物を認識して発芽する (図1)。また SL は植物にリン酸を供給するアーバスキュラー菌根菌 (AM 菌) との共生や宿主植物の枝分かれも制御している (図1)。

典型的な SL の基本骨格は 3 環性ラクトン構造 (ABC 環) を母核にもち、プテノライド (D 環) がエノールエーテル結合したものである (図2)。AB 環における置換基 (水酸基、アセチル基など) の違いにより 30 種類以上の SL が単離されている。植物が生産・分泌する典型的な SL は C 環の立体化学の違いにより 配位のオロバンコール型と配位のストリゴール型の二つに分けることができる (図2)。多くの植物はオロバンコール型かストリゴール型のどちらか一方の SL を生産しているがその理由は分かっていない。

これまでに、SL の生合成酵素遺伝子は、モデル植物のシロイヌナズナやイネなどから SL 欠損変異体の原因遺伝子として単離された。そのうち、D27、MAX3、MAX4 酵素により  $\beta$ -カロテンからカーラクトン (CL) とよばれる生合成中間体が生成することが明らかにされている (Alder A, et al., Science 335: 1348-1351, 2012、図3)。CL よりも下流で働く酵素に関しては、研究代表者らが、様々な植物種の MAX1 酵素 (シトクロム P450 酵素 CYP711A) が CL の C-19 位をカルボン酸まで酸化してカーラクトン酸 (CLA) を生成する酵素であることを明らかにした (Abe et al., PNAS, 111: 18084-18089, 2014; Yoneyama et al., New Phytologist, 218: 1522-1533, 2018、図3)。しかし、同時期にイネの MAX1 ホモログの一つ (Os900) は、CL から環化反応も触媒してオロバンコール型 SL の 4-デオキシオロバンコール (4D0) まで変換することが報告された (Zhang et al., Nat. Chem. Biol., 10: 1028-1033, 2014、図3)。その後、研究代表者らは、イネの Os900 による CL から 4D0 への変換は、CLA と 18-ヒドロキシカーラクトン酸 (18-OH-CLA) を経ることを明らかにした (Yoneyama et al., 2018、図3)。一方、ストリゴール型 SL の生合成経路は分かっていなかった。

### 2. 研究の目的

2017 年、ストライガ耐性品種として育種により作出されたイネ科穀物のソルガムから、その耐性を付与した原因遺伝子 *LGS1* が米国とオランダの研究グループにより同定された (Gobena et al., PNAS, 114: 4471-4476, 2017)。興味深いことに、正常なソルガムが生産する主要な SL はストリゴール型の 5-デオキシストリゴール (5DS) であるが、*lgs1* 欠損変異体では主要な SL がオロバンコール型のオロバンコール (Oro) に替わっていた (図2)。したがって、*LGS1* 遺伝子は立体選択的な SL の環化に関わっていると考えられた。*LGS1* 遺伝子がコードするタンパク質は硫酸基転移酵素に分類されるが、SL 生合成における *LGS1* 酵素の機能は解明されていなかった。ストライガ種子に対する発芽刺激活性は Oro の方が 5DS よりも低いことが、*lgs1* 変異体がストラ

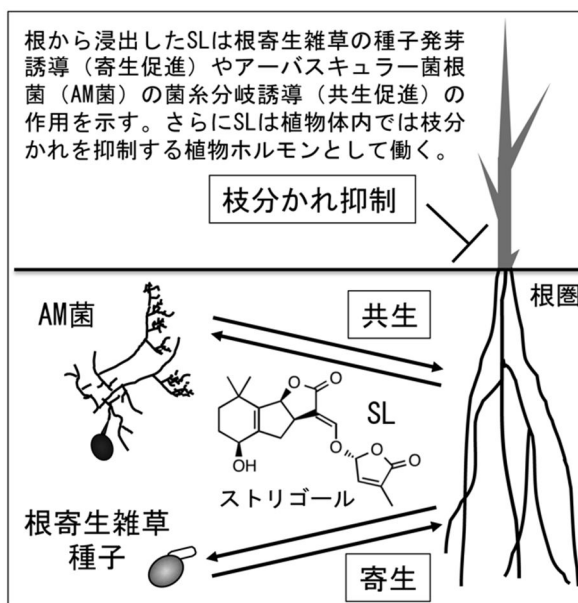


図1 ストリゴラクトン (SL) の生理作用

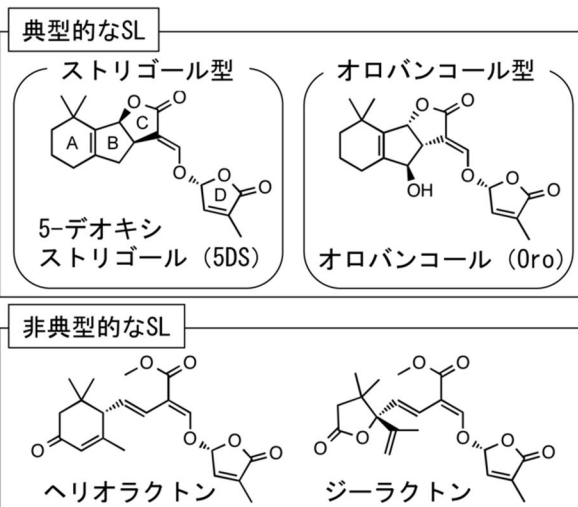


図2 天然SLの構造 典型的なSLの基本骨格は3環性ラクトン構造 (ABC環) を母核にもち、プテノライド (D環) がエノールエーテル結合したものである。C環の立体化学の違いによりオロバンコール型とストリゴール型に分けることができる。一方、ABC環構造を持たない非典型的なSLも知られている。

イガ耐性になった理由と考えられた。一方、Oro は 5DS よりも AM 菌に対する菌糸分岐活性（共生促進作用）が強い。そのため、ストライガ耐性品種として作出された *lgs1* 変異体における AM 菌共生は低下していない。また、植物の枝分かれ抑制においても Oro は活性が高いことから、地上部の枝分かれ形態も正常である。したがって、*LGS1* 遺伝子はストライガ被害だけを回避できる技術の基盤となる。そこで、本研究では *LGS1* 酵素の機能の解明を行うことを目的とした。

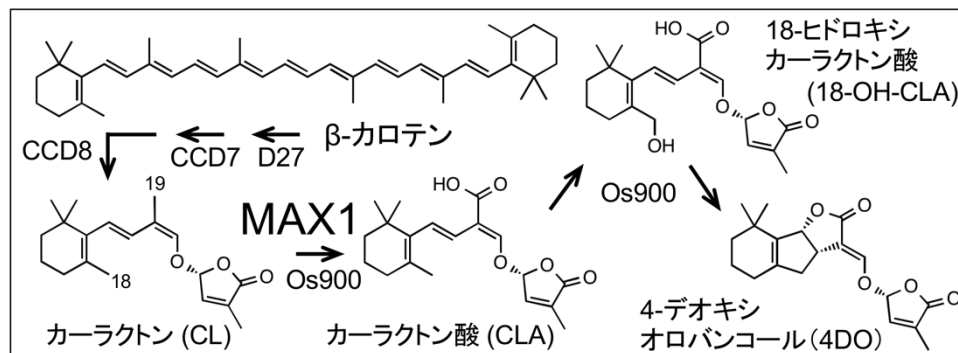


図3 SL 生合成経路と生合成酵素 SLはカロテノイドから生合成される。β-カロテンからD27、CCD7、CCD8酵素により生合成中間体のカラクトン(CL)が生成される。CLはMAX1酵素によりC-19位が酸化されてカラクトン酸(CLA)が生成される。イネではMAX1ホモログの一つであるOs900によって、CLからCLAと18-ヒドロキシカラクトン酸(18-OH-CLA)を経て4-デオキシオロバンコール(4DO)が生成される。

### 3. 研究の方法

一般的な硫酸基転移酵素は基質の水酸基に硫酸基を転移させることから、*LGS1* 酵素の基質は水酸基をもつ SL 前駆体である可能性が考えられた。そこで、ソルガム *lgs1* 変異体植物で蓄積していると推定される基質候補のヒドロキシ SL 前駆体を LC-MS/MS を用いて探索した。見つかった候補基質のヒドロキシ SL 前駆体の合成品を用いて、大腸菌で発現させた *LGS1* タンパク質と硫酸基供与体 3'-ホスホアデノシン-5'-ホスホ硫酸 (PAPS) をインキュベートして代謝物を LC-MS/MS を用いて解析した。また、ベンサミアナタバコを用いた一過的発現系を用いて *LGS1* タンパク質を発現させて解析を行った。SL は β-カロテンから生合成される。ベンサミアナタバコの葉に大量に含まれる β-カロテンを出発基質に、上流の SL 生合成酵素遺伝子を発現させれば基質を供給できる。アグロバクテリウムの発現ベクターに目的遺伝子を組み込み、葉に感染させた。5日後に抽出して、*LGS1* 遺伝子を発現させたときに産生される SL がどう変化するか LC-MS/MS を用いて調べた。

*LGS1* の候補基質であるヒドロキシ SL 前駆体は、これまでの研究から、その生成酵素の候補として MAX1 が考えられた。ソルガムの MAX1 ホモログは、P450 還元酵素と共発現させる酵母発現系 (pYeDP60-WAT11 系) を用いて発現させ、P450 タンパク質が局在するミクロソーム画分を調製した。*LGS1* の代謝物とインキュベートして CL からヒドロキシ CL やヒドロキシ CLA が生成するか調べた。さらに酵母発現系に加えて、ベンサミアナタバコを用いた代謝実験も行い、インビトロ代謝実験の結果の追試を行った。これらの実験によりソルガムの SL 生合成経路を解析した。

### 4. 研究成果

ソルガムの正常種と *lgs1* 変異体の根滲出物を抽出し、LC-MS/MS を用いて SL 関連物質を解析した。その結果、*lgs1* 変異体において SL 生合成中間体である 18-OH-CLA が蓄積していることを発見した。そこで *LGS1* タンパク質を大腸菌において発現し、合成標品の 18-OH-CLA の代謝実験を行なった。その結果、5DS の生成が確認されたが、そのジアステレオマーである 4DO も検出された (図4)。*LGS1* は硫酸基供与体依存的に 18-OH-CLA を減少させたことから、*LGS1* は 18-OH-CLA の 18 位の水酸基に硫酸基を転移させる機能をもつ硫酸基転移酵素であると考えられた。

ソルガムにおいて 18-OH-CLA に至る生合成経路は明らかにされていなかったが、イネと同様にソルガムにおいても 18-OH-CLA は MAX1 ホモログによって生成されると推測した。ソルガムは MAX1 ホモログを 4 つ有している (SbMAX1a, b, c, d と命名)。それらを酵母で発現し、CL の代謝実験により機能解析を行った結果、SbMAX1a の主な代謝産物として 18-OH-CLA が検出された。次にベンサミアナタバコにおける一過的発現システムを使用し、*LGS1* 酵素の機能解析を行った。アグロバクテリウムを介したインフィルトレーション法により、ベンサミアナタバコの葉においてソルガムの SL 生合成遺伝子を共発現させた。SbD27、SbCCD7、SbCCD8、SbMAX1a によりベンサミアナタバコの内生カロテノイドから 18-OH-CLA が生成されることを確認した後、それらの生合成遺伝子と *LGS1* を共発現させ、生成される SL の分析を行った。その結果、葉の抽出物から 5DS と 4DO が検出された。5DS と 4DO の検出量がほぼ 1:1 であったことから、*LGS1* による 18-OH-CLA の硫酸エステル化後、酵素非依存的に硫酸基が脱離し、5DS と 4DO への環化が起きたと考えられた (図4)。ソルガムからは 4DO は検出されないため、5DS への立体選択的な環化反応には更に未知の酵素が関与している可能性がある。本研究により、ソルガムにおいてシトクロム P450 酵素と硫酸基転移酵素により触媒される SL 生合成経路の存在が明らかになった。

根寄生雑草（特にストライガ類）はアフリカ諸国の農作物の収量を大きく低下させている。また、地中海沿岸諸国やオーストラリアといった農業先進国における根寄生雑草（特にオロバンキ類）の被害も顕在化している。現在のところ日本には農作物に大きな被害を与えている根寄生雑草種は侵入していないと考えられるが潜在的な脅威となっている。有効な防除法のない根寄生雑草に関する研究を行う意義は大きく、本研究の成果は根寄生雑草を制御する技術の基盤となりうる。

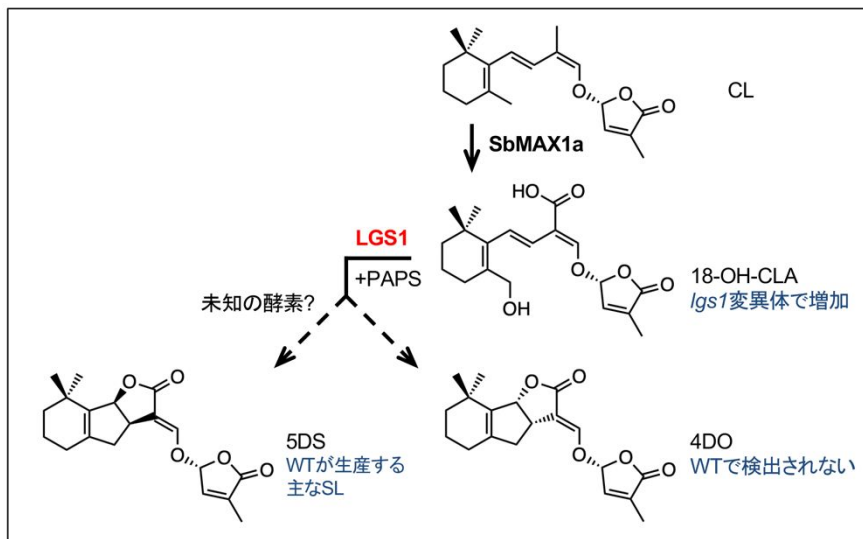


図4 ソルガムにおける推定SL合成経路 カーラクトン(CL)はSbMAX1aにより18-ヒドロキシカーラクトン酸(18-OH-CLA)に変換される。LGS1は硫酸基供与体PAPS依存的に18-OH-CLAから5-デオキシストリゴール(5DS)と4-デオキシオロバンコール(4DO)を生成する。ソルガムにおける5DSの立体選択的な生産は未知の酵素により触媒される可能性がある。

## 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 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kawada Kojiro, Uchida Yuya, Takahashi Ikuo, Nomura Takahito, Sasaki Yasuyuki, Asami Tadao, Yajima Shunsuke, Ito Shinsaku	4. 巻 25
2. 論文標題 Triflumizole as a Novel Lead Compound for Strigolactone Biosynthesis Inhibitor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	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） 10.3390/molecules25235525	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 Yoneyama Kaori, Akiyama Kohki, Brewer Philip B., Mori Narumi, Kawano Kawada Miyuki, Haruta Shinsuke, Nishiwaki Hisashi, Yamauchi Satoshi, Xie Xiaonan, Umehara Mikiyama, Beveridge Christine A., Yoneyama Koichi, Nomura Takahito	4. 巻 4
2. 論文標題 Hydroxyl carlactone derivatives are predominant strigolactones in Arabidopsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Direct	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） 10.1002/pld3.219	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 該当する
1. 著者名 Yoneyama Kaori, Xie Xiaonan, Nomura Takahito, Yoneyama Koichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Do Phosphate and Cytokinin Interact to Regulate Strigolactone Biosynthesis or Act Independently?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	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） 10.3389/fpls.2020.00438	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 Mori Narumi, Sado Aika, Xie Xiaonan, Yoneyama Kaori, Asami Kei, Seto Yoshiya, Nomura Takahito, Yamaguchi Shinjiro, Yoneyama Koichi, Akiyama Kohki	4. 巻 174
2. 論文標題 Chemical identification of 18-hydroxycarlactonoic acid as an LjMAX1 product and in planta conversion of its methyl ester to canonical and non-canonical strigolactones in Lotus japonicus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Phytochemistry	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） 10.1016/j.phytochem.2020.112349	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 Mori Narumi, Nomura Takahito, Akiyama Kohki	4. 巻 251
2. 論文標題 Identification of two oxygenase genes involved in the respective biosynthetic pathways of canonical and non-canonical strigolactones in <i>Lotus japonicus</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Planta	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) 10.1007/s00425-019-03332-x	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 Yoshida Satoko, Nomura Takahito [28番目/43人中]、et al.	4. 巻 29
2. 論文標題 Genome Sequence of <i>Striga asiatica</i> Provides Insight into the Evolution of Plant Parasitism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 3041 ~ 3052.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2019.07.086	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 該当する

1. 著者名 Yoda Akiyoshi, Mori Narumi, Akiyama Kohki, Kikuchi Mayu, Xie Xiaonan, Miura Kenji, Yoneyama Kaori, Sato Izawa Kanna, Yamaguchi Shinjiro, Yoneyama Koichi, Nelson David C., Nomura Takahito	4. 巻 232
2. 論文標題 Strigolactone biosynthesis catalyzed by cytochrome P450 and sulfotransferase in sorghum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 1999 ~ 2010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.17737	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 該当する

1. 著者名 Kyojuka Junko, Nomura Takahito, Shimamura Masaki	4. 巻 65
2. 論文標題 Origins and evolution of the dual functions of strigolactones as rhizosphere signaling molecules and plant hormones	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Opinion in Plant Biology	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) 10.1016/j.pbi.2021.102154	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 Xie Xiaonan, Yoneyama Kaori, Nomura Takahito, Yoneyama Koichi	4. 巻 2309
2. 論文標題 Evaluation and Quantification of Natural Strigolactones from Root Exudates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 3~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1429-7_1	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11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 依田彬義, 謝肖男, 島崎翔太, 児玉恭一, 米山香織, 秋山康紀, 嶋村正樹, 経塚淳子, 野村崇人
2. 発表標題 陸上植物に保存された祖先型ストリゴラクトン
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川田紘次郎, 高橋郁夫, 小野田聡志, 野村崇人, 佐々木康幸, 浅見忠男, 矢嶋俊介, 伊藤晋作
2. 発表標題 ストリゴラクトン生産を阻害する新規化合物の創製
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 依田彬義, 謝肖男, 島崎翔太, 児玉恭一, 米山香織, 秋山康紀, 嶋村正樹, 経塚淳子, 野村崇人
2. 発表標題 コケ植物におけるストリゴラクトン生合成
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野村崇人、依田彬義、森 愛美、三浦謙治、米山香織、謝 肖男、秋山康紀、米山弘一
2. 発表標題 根寄生雑草防除の標的酵素ソルガム LGS1 の機能解析
3. 学会等名 日本農薬学会第45回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 依田彬義、森 愛美、謝 肖男、米山香織、三浦謙治、秋山康紀、米山弘一、野村崇人
2. 発表標題 硫酸基転移酵素 LGS1 に触媒されるストリゴラクトン生合成経路
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤倉 優、依田彬義、謝 肖男、米山香織、秋山康紀、経塚淳子、米山弘一、野村崇人
2. 発表標題 シダ植物のストリゴラクトン
3. 学会等名 植物化学調節学会第54回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 依田彬義、森 愛美、謝 肖男、米山香織、三浦謙治、山口信次郎、秋山康紀、米山弘一、野村崇人
2. 発表標題 ソルガムにおける5-deoxystrigol生合成経路の解析
3. 学会等名 植物化学調節学会第54回大会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Akiyoshi Yoda, Narumi Mori, Xiaonan Xie, Kaori Yoneyama, David Nelson, Kohki Akiyama, Koichi Yoneyama, Takahito Nomura
2. 発表標題 Biochemical characterization of sorghum LGS1 enzyme involved in strigolactone biosynthesis
3. 学会等名 The 23rd International Conference on Plant Growth Substances (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 依田彬義、謝 肖男、児玉恭一、島崎翔太、秋山康紀、米山香織、嶋村正樹、経塚淳子、野村崇人
2. 発表標題 新規ストリゴラクトンbryosymbiolの生合成
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 川田 紘次郎、高橋 郁夫、野村 崇人、佐々木 康幸、浅見 忠男、矢嶋 俊介、伊藤 晋作
2. 発表標題 新奇根寄生性植物防除法の確立を目的としたストリゴラクトン生合成阻害剤の創製
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 Akiyoshi Yoda, Narumi Mori, Kohki Akiyama, Xiaonan Xie, Kaori Yoneyama, Koichi Yoneyama, David C. Nelson, Takahito Nomura
2. 発表標題 Strigolactone biosynthesis catalyzed by LGS1 in sorghum
3. 学会等名 3rd International Congress on Strigolactone (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 タンパク質の発現方法およびタンパク質発現用ベクター	発明者 野村崇人、彬義依田、鈴木智大	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-130070	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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		
米国	カルフォルニア大学リバーサイド校		