

自殺発芽剤による寄生植物 ストライガからの防除

名古屋大学
トランスフォーマティブ生命分子研究所
土屋 雄一郎

ストライガとアフリカ

寄生植物とは、他の植物に寄生して栄養や水分を搾取して生育する植物であるが、その一部は作物に寄生して深刻な被害を与えることも知られている。サブサハラ以南のアフリカでは、別名「魔女の雑草」とも呼ばれる寄生植物のストライガ (*Striga hermonthica*) の蔓延が大きな問題となっている (Ejeta 2007, 図-1)。ストライガは、アフリカで主要穀物として栽培されるトウモロコシ、ソルガム、フィンガーミレットといった単子葉の作物に寄生し、実をつける前に枯らせてしまうため、一度寄生されると収量は皆無、あるいは著しく減少させる。種子の大きさは0.3mmと非常に小さく、また一つの植物から20万もの種子をつける性質と相まってアフリカの耕作地に広く拡散し、その被害額は年間1兆円、3億人もの人々の生活が影響を受けていると言われている。2050年には、アフリカ大陸の人口は倍増して20億人に達し、全人口の2



図-1 ストライガが蔓延したケニアの畑 (2019年撮影)

割を占めると予想される中、それを支えるための食糧の増産は世界的な課題と言えるだろう。本項では、寄生のプロセスを利用した自殺発芽によるストライガの防除法とそれを実現するための薬剤開発について解説したい。

自殺発芽とストリゴラクトン

寄生植物の生活環は、宿主植物とのコミュニケーションを含む複雑なものであることが知られている (Clarke et al. 2019)。土中に埋まっているストライガの種子は、通常の植物とは異なり、温度、光、水等の環境条件が適切になるだけでは決して発芽しないが、宿主植物が近くで生育を始めるとその根から放出されるストリゴラクトン (SL) と呼ばれるシグナル分子を認識することで初めて発芽する (図-2)。その根が宿主の根に十分に近づいたのちに、宿主細胞壁成分に由来するダイメトキシベンゾキノンを感知して吸器と呼ばれる器官を根の先端に形成し、宿主の根に侵入する。その後、維管束を連結させることで、宿主からの水分や栄養分を吸収し生育する。ストライガの種子は20年以上もの長い

間休眠状態で生き続けると言われているが、サイズは極めて小さく貯蔵栄養も少ないため、発芽後には4日以内に宿主にたどりつけないと栄養を使い切って枯死してしまう。そのため、発芽は生死を分ける意思決定であり、SLを感知することで宿主の根の近くで発芽する能力は寄生プロセス全体の中でも特に重要と考えられる。自殺発芽は、SLに反応して発芽する性質を逆手に取った防除法であり、作物を植える前に人工SLを土壤に散布し、栄養源となる宿主がない状態でストライガを強制的に発芽させることで枯死させる方法として考案された。

SLは、カロテノイドを前駆体として合成される一群のシグナル分子である (Xie et al. 2010)。1966年に *Striga lutea* の発芽を刺激する宿主因子としてワタの根抽出物からストリゴールが発見されて以来30を超える天然SLが同定されており、植物種によって作るSL種やそのブレンド構成が異なることが明らかとなってきている。このように多様なSLを植物が生産する理由はもちろんストライガに寄生されるためではなく、植物の生育に必須な多機能な分子であるためである。土

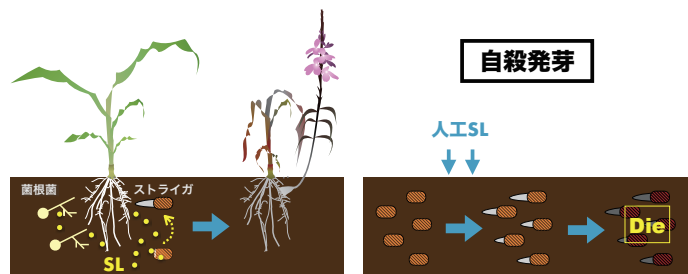


図-2 自殺発芽の概念

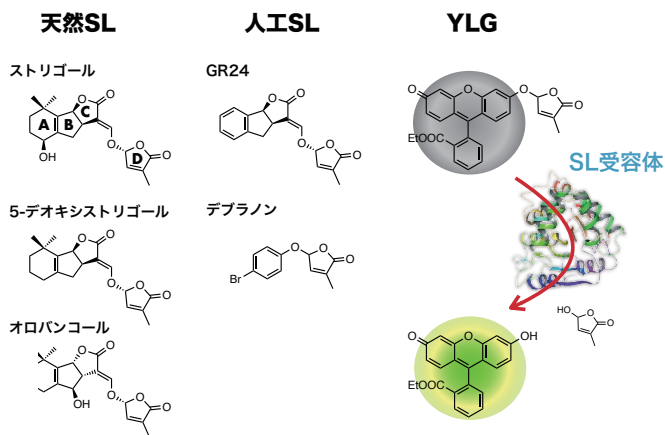


図-3 ストリゴラクトンの構造

中に放出されたSLは、植物と共生する菌根菌のブランディングファクターとしての機能を持ち、菌根菌を根に呼び寄せることでリン酸などの栄養欠乏環境での生育をサポートする働きがある。さらに、根で合成されたSLの一部は植物体の地上部へと移動し、枝分かれの抑制やストレス応答といった機能を担う植物ホルモンとしても働く。すなわち、SLは、寄生、共生、植物ホルモンという、三つの異なる現象を制御するシグナル分子と言える。このように植物や土壌微生物にも影響を与えるSL機能を自殺発芽へと応用するには、単に簡単に合成できて活性が高いだけでなく、環境に対する負荷を削減するためにストライガに対して選択的に作用する人工SLの開発が求められる。

SLは一般に、三つの環で構成されるABC環のパーツと、プテノライドで構成されるD環がエノールエーテルを介して結合する構造を持つことが知られている(図-3)。天然型SLのABC環では、水酸基やカルボニル基等の修飾、BC環の立体異性や、環の数(1~3個)に多様性が見られるのに対し、D環は立体異性も含め全ての天然型SLに保存される。この概念をベースに、A環をベンゼン環に変換したGR24やABC環をフェノールで置き換えたデブラノンなど多数の人工

SLが開発されてきたが、合成の簡易性と活性の両立は難しく、これらの研究からはストライガに対する選択性に関する知見を得ることは難しかった。

ストライガのSL受容体の同定

SLの構造からのアプローチに対し、SL受容体からのアプローチでは、より直接的にストライガを標的とした化合物の開発が可能となる。すなわち、ストライガのSL受容体のリガンド結合ポケットを解析し、それにフィットする構造骨格をケミカルスクリーニングや*in silico*でのシミュレーションを用いて探索する、現在の薬剤開発の主流とも言える論理的な開発のスキームに則った方法である。しかし、この方法を用いるためには、ストライガのSL受容体の情報と、リガンドの結合を簡便に行うためのハイスループットアッセイは必須である。実際、変異株や形質転換といった遺伝学的手法を用いることができないストライガにおいて、SL受容体の同定はSLが初めて発見されて以来50年近くの間、大きな課題として残っていた。

こういった中、SLが植物ホルモンとしてストライガのみならず一般の植物の生育に必須な機能を持つことが2008年に報告され、以来シロイヌ

ナズナやイネ等を用いた変異株の解析より合成やシグナル伝達のメカニズムが次々と明らかとなった。イネからDWARF14(D14)と呼ばれる α/β ヒドロラーゼ様タンパク質がSLシグナル伝達に関わることが報告され、のちの解析からこのタンパク質がSL受容体として機能することも明らかとなった(Arite *et al.* 2009; Hamiaux *et al.* 2012)。一般的な植物ホルモンの受容体とは異なり、D14はストリゴラクトンをABC環とD環へと加水分解する酵素活性も持ち、それに伴って下流のユビキチン/プロテアソーム経路を介してシグナル伝達を活性化する機構が考えられている。

一方筆者らは、ストライガではD14のホモログであるHYPOSENSITIVE TO LIGHT/KARRIKIN INSENSITIVE2(HTL/KAI2, 以下HTLと呼ぶ)のコピー数が少なくとも11個に増幅(*ShHTL1*~*ShHTL11*)していることを発見した。シロイヌナズナでは、HTL遺伝子は植物を燃やした煙に含まれるカリキンと呼ばれる発芽刺激成分の受容体として機能することが知られている。そこで、これら11個の遺伝子がSL受容体であるかを調べるため、蛍光性のSLミミックであるヨシムラクトングリーン(YLG)を開発した(Tsuchiya *et al.* 2015; Toh *et al.* 2015, 図-3)。YLGは、受容体によって加水分解を受けることで蛍光を発するようデザインされた分子であり、蛍光分子としてよく知られているフルオレセインにSLの活性に必須なD環を結合させた構造

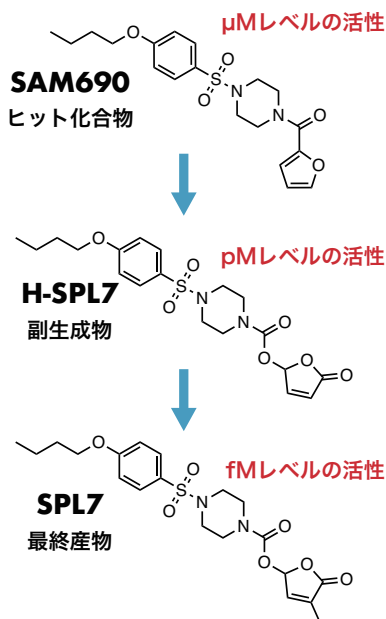


図-4 自殺発芽剤の開発

を持つ。YLG を用い、11 個の ShHTL タンパク質が *in vitro* でヨシムラクトンを加水分解すること、この分子がストライガの発芽を刺激すること、そして発芽したストライガ種子では蛍光が観察されたことから、ストライガの種子では ShHTL タンパク質が YLG を加水分解してシグナル伝達を活性化することで発芽を起こすと考えられた。

ストライガに選択的に作用する人工 SL の開発

YLG を用いた *in vitro* での試験は、化合物の ShHTL タンパク質への結合の評価にも用いることができる。すなわち、YLG との競合による濃度依存的な蛍光の減衰を調べることで、蛍光の値を 50% 減衰させるために必要な濃度 (IC_{50}) を指標としてアフィニティーを見積もることを簡便に行うことができる。これによって、SL 受容体の情報とハイスループットアッセイという、論理的に自殺発芽剤を開発する基盤が初めて整った。そこで筆者らは、ストライガの SL 受容体に選択的に結合する構造骨格を探索し、構造

改変により活性を向上させる戦略でストライガに選択的に作用する人工 SL の開発に取り組んだ (Uraguchi *et al.* 2018)。まず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人工化合物を選抜し、ヒット化合物の受容体への結合を YLG アッセイにより確認する 2 段階のケミカルスクリーニングにより選択的な構造骨格を探索した結果、12,000 の化合物より 18 個の候補化合物を得た (図-4)。これら化合物は全て、ピペラジンにベンゼンスルホンアミドとフランが結合した骨格を有するよく似た化合物で、 $1\mu\text{M}$ 程度で発芽を刺激する活性の低いものであったが、11 個の受容体の中でも ShHTL7 と呼ばれる単一のアイソフォームに結合し、シロイヌナズナ D14 タンパク質には結合しない選択性の高いものであったことから、この骨格をベースとして進めていくこととした。合計 100 を超えるアナログを合成しても活性の向上がなかなか見られない中、突破口は意外なところから訪れた。あるアナログ化合物を合成した際、精製を進めるほど発芽刺激活性が下がるという奇妙な現象が観

察され、更なる分析の結果、どうやら NMR や質量分析では検出できないレベルの微量の副生成物が極めて高い活性を保持するらしいことを突き止めた。そこで、そのアナログを大量に合成し、微量成分を精製して質量分析のフラグメントパターンから構造を予測した結果、フランが酸化を受けて D 環とよく似た構造に変換されていたことが明らかとなった。この副生成物を有機合成して活性を調べた結果、標準的な SL として用いられる GR24 と同等の pM レベルでの活性が観察された。さらに、メチル基をたすことで D 環と同一の構造へと改変した結果、 fM という極めて高い発芽刺激活性を得ることに成功した。この最終産物であるスフィノラクトン-7 (SPL7) は、天然 SL である 5-デオキシストリゴールと同等の活性を持ちつつも、ShHTL7 に対する選択性は維持されており、シロイヌナズナ D14 タンパク質とは結合しなかったことから、ストライガに対する選択性の高い人工 SL として自殺発芽に応用できると期待された。これを調べるため、シロイヌナズナに SPL7 を与えたところ、 $10\mu\text{M}$ という高い濃度でも典型的な SL 応答である枝分かれの抑制、根毛の伸長、また SL 応答性遺伝子の発現が見られなかったことから、SPL7 は実際にシロイヌナズナに対して SL 活性を持たないことが明らかとなった。さらに菌根菌への影響を調べたところ、GR24 と比較して $1/800$ 程度の非常に低い活性しか見られなかったことから、

SPL7 は期待通りストライガに選択的に作用する人工 SL であることが証明された。では、SPL7 は実際に自殺発芽を引き起こし、作物をストライガから守ることはできるのだろうか。これを調べるため、ポットでの自殺発芽試験を行った。ポットに入れた土にストライガの種子を混入し、SPL7 を与えて2週間放置したのちとうもろこしを播き2ヶ月間生育した結果、コントロールとしてDMSOを与えたものでは多数のストライガの出現が確認されたが、SPL7 を与えたものからはストライガは見られなかった。さらに1ヶ月生育すると、コントロールでストライガに寄生されたとうもろこしは枯れてしまったが、SPL7 を与えたものは健康に生育を続けた。従って、SPL7 は少なくともポットレベルでは実際にストライガの自殺発芽を引き起こすことが確認できた (図-4)。

以上より、SPL7 は、fM レベル (琵琶湖の水量に小さじ1杯程度) で発芽刺激する驚異的な活性と、ストライガに対する強い選択性を併せ持つ理想的な自殺発芽剤としてアフリカの食糧問題の解決に貢献することが期待される。これを実現するため、現在ストライガに大きな被害を受けるケニアでの現地実証試験を進めている。NPO、NGO、企業等、学内外の協力のもと、ケニア農畜産研究機構 (KALRO) との MoU の締結、SPL7 の大量合成、毒性試験 (現時点で毒性は確認されず)、ケニアへの輸送および試験研究許可の取得等のプロセスを経て、ピク

トリア湖岸に位置する KALRO Kibos 支所での圃場試験を2018年より開始した。現在、少なくともポット試験レベルでは、SPL7 は現地の気候・土壌環境においてもストライガの自殺発芽を誘導することが確認されている。

終わりに

偶然が重なりたどり着いた SPL7 は、結果的に人工骨格パーツに天然 SL で見られる D 環が結合したハイブリット分子であり、従来から言われていた ABC 環の構造の多様性と D 環の重要性が再認識された結果とも言える。一方で、ABC 環に相当する部位を改変することで活性の向上や選択性といったチューニングが可能であることも明らかとなり、人工 SL 開発の一つの戦略として良い ABC 環パーツをケミカルスクリーニングより見つけて、そこに D 環を付与するという一般的な方法を提示したとも言える。例えば同様の方法で、ストライガが持つ11個の受容体それぞれに選択的なアゴニスト、菌根菌特異的に作用するものや、農業被害を出しているオロバンキ等他の寄生植物の自殺発芽剤の開発への応用も期待される。現状、SPL7 はポットレベルでの自殺発芽に成功しているが、アフリカ各地でさまざまな作物に適応したストライガ系統への作用、土壌や気候条件による作用の違い、土壌での安定性等の調査、SPL7 耐性ストライガの出現などの予測される問題への対応が今後の課

題と言える。ストライガの蔓延は、ストライガの生物としてのしたたかさに加え、社会や宗教など複雑な問題を含むものであり、その撲滅は険しい道のりと思われるが、SPL7 がその一助になることを期待したい。

引用

- Arite, T. *et al.* 2009. d14, a Strigolactone-Insensitive Mutant of Rice, Shows an Accelerated Outgrowth of Tillers. *Plant Cell Physiol.* 50, 1416-1424.
- Clarke, C.R. *et al.* 2019. Molecular Dialogue Between Parasitic Plants and Their Hosts. *Annu. Rev. Phytopathol.* 57, 279-299.
- Ejeta, G. 2007. The Striga scourge in Africa: A growing pandemic. *Integr. Integrating New Technologies for Striga Control: Towards Ending the Witch-hunt* 3-15.
- Hamiaux, C. *et al.* 2012. DAD2 is an α / β hydrolase likely to be involved in the perception of the plant branching hormone, strigolactone. *Curr. Biol.* 22, 2032-2036.
- Toh, S. *et al.* 2015. Structure-function analysis identifies highly sensitive strigolactone receptors in Striga. *Science* 350, 203-208.
- Tsuchiya, Y. *et al.* 2015. Probing strigolactone receptors in Striga hermonthica with fluorescence. *Science* 349, 864-868.
- Uraguchi, D. *et al.* 2018. A femtomolar-range suicide germination stimulant for the parasitic plant Striga hermonthica. *Science* 362, 1301-1305.
- Xie, X. *et al.* 2010. The Strigolactone Story. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 93-117.