

ストリゴラクトンの生合成経路の 解明と応用

神戸大学大学院農学研究科

若林 孝俊

杉本 幸裕

はじめに

ストリゴラクトン (Strigolactone; SL) は、地球規模で食糧生産を阻害する根寄生雑草の種子発芽刺激物質として同定された化合物である。その後、多くの陸上植物と共生するアーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐を誘導する根圏シグナルや、植物の枝分かれを抑制する植物ホルモンとして機能することが示されて以来、植物科学分野で最も注目を集める化合物群の一つである。SLはカロテノイドを前駆体として合成されることが知られていたが、近年、重要な生合成中間体やそれらの生合成遺伝子が発見され、SL生合成への理解は急速に進展している。本稿では、SL生合成についてのこれまでの研究と、SL生合成に着目した根寄生雑草防除について解説したい。

1. ストリゴラクトンとは

SLは、ハマウツボ科に属するストライガ (*Striga* spp.) およびオロバンキ (*Orobanche* spp.) やフェリパンキ (*Phelipanche* spp.) などの根寄生雑草種子の発芽刺激物質として同定された一連の構造類縁体の総称である。SL研究の歴史は古く、1966年にワタ (*Gossypium hirsutum*) の根滲出物から strigol (図-1) が単離されたことに始まる (Cook *et al.* 1966)。ワタはストライガの宿主ではなかったが、その後、ストライガやオロバンキ

の宿主植物の根滲出物からも類似した構造をもつ化合物が同定され、発芽刺激物質としての役割が認知された。なぜ植物が自身に不利益となる根寄生雑草の発芽刺激物質を生産・分泌するのかについては長年にわたり謎であったが、2005年に、SLが、多くの陸上植物と共生し、植物の栄養状態を改善するアーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐を誘導するブランシングファクターであることが示された (Akiyama *et al.* 2015)。すなわち根寄生雑草は、植物がアーバスキュラー菌根菌との共生促進のために分泌するSLを、宿主が近傍にいることを検出するためのシグナルとして巧みに利用している。さらに、2008年にはSLは植物の枝分かれを抑制する内生の植物ホルモン様の活性を有することが見出された (Gomez-Roldan *et al.* 2008; Umehara *et al.* 2008)。このようにSLは植物の生長

のみならず、アレロケミカルとして根圏で周囲の生物にも作用する極めて多機能な化合物である。

Strigolに代表される研究の初期から知られてきたSLは、六員環 (A環) と五員環 (B環) およびラクトン (C環) からなる三環性の母核 (ABC環) にメチルプテノライド (D環) がエノールエーテルを介して結合した基本骨格を有している (図-1)。この基本骨格を有するSLは、今日、典型的SLと呼ばれる。典型的SLには、C環の立体配置が α 配置と β 配置のものが存在し、それぞれ orobanchol-type, strigol-type と分類されている (図-1)。さらに、A環やB環への様々な化学修飾によって構造多様性がもたられている。近年では、ABC環構造はもたないがD環を有する新奇なSLが多数報告されており、これらは前者と区別して非典型的SLと呼ばれる。

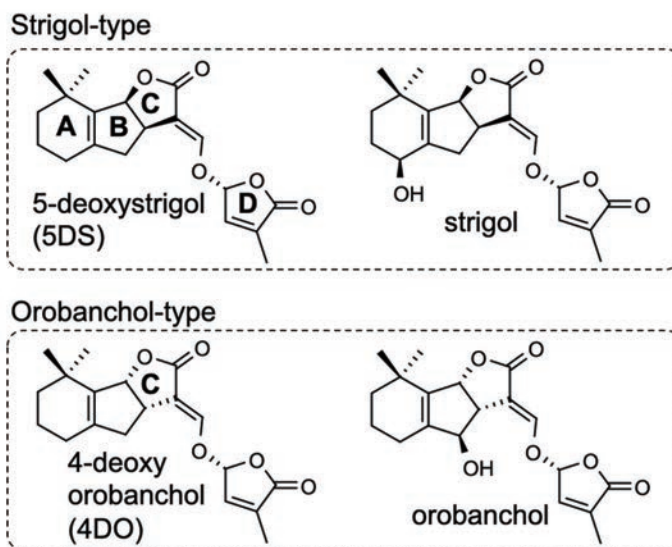


図-1 典型的ストリゴラクトンの構造

2. ストリゴラクトン生合成経路

(1) 生合成中間体, carlactone および carlactonoic acid

植物ホルモンとしての機能が発見される以前から, SLはカロテノイドに由来する化合物であることが示唆されていた。2008年に, 枝分かれ過剰変異体の解析から, カロテノイド酸化開裂酵素 (CAROTENOID CLEAVAGE DIOXIGENASE; CCD) の CCD7 や CCD8 遺伝子が欠損した変異体では, SLがほとんど生産されないことが明らかにされた。さらに, これらの変異体に合成SLを投与すると, 過剰な枝分かれが回復することが示された (Gomez-Roldan *et al.* 2008; Umehara *et al.* 2008)。これらの研究から, 根圏シグナルとして知られていたSLが, 植物地上部の枝分かれを抑制する機能も有することが明らかになった。この発見を契機に, 生合成経路の解明が飛躍的に進展し, β -カロテンからSLの基本骨格の形成に関わる一連の生合成遺伝子が同定されてきた。すなわち, イネ (*Oryza sativa*) の枝分かれ過剰変異体の一つ, *d27* の原因遺伝子から見いだされた鉄キレート型タンパク質 D27 が, all-*trans*- β -カロテンを 9-*cis*- β -カロテンへ異性化し, それを基質として CCD7 と CCD8 による連続的な酸化開裂により, carlactone (CL) と名付けられ

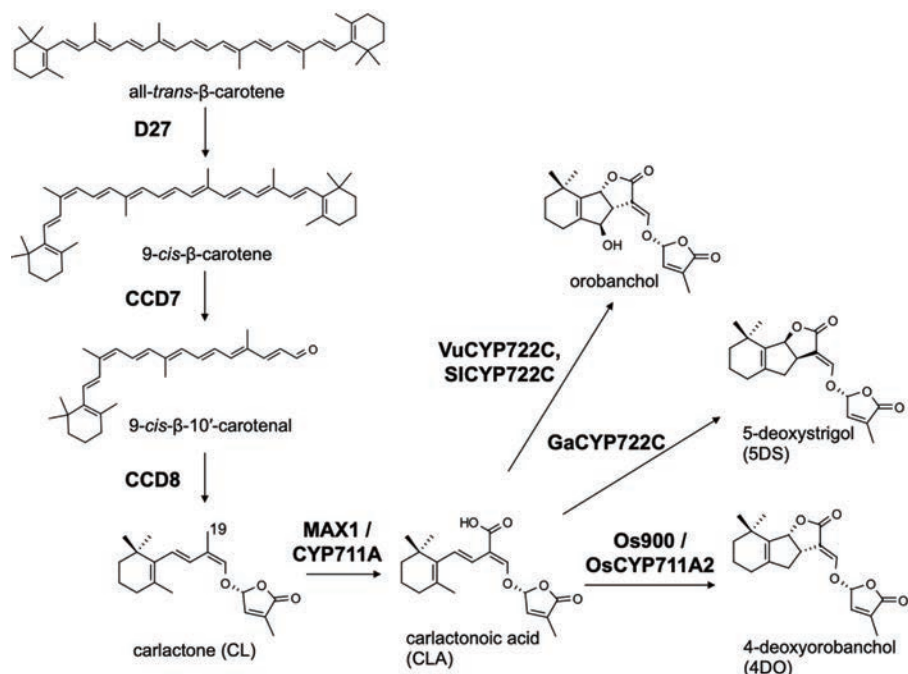


図-2 典型的ストリゴラクトン生合成経路の概略図

た生合成中間体が合成されることが示された (Alder *et al.* 2012; Seto *et al.* 2014) (図-2)。さらに CL は, シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の枝分かれ過剰変異体 *max1* の原因遺伝子がコードするシトクロム P450 の CYP711A や, イネの同サブファミリーにより, carlactonoic acid (CLA) に変換されることが明らかになった (Abe *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2014)。この CL から CLA への変換は, ささまざまな植物の CYP711A サブファミリーの共通の機能であることが示されており, CL や CLA が SL 生合成の中間体となることが明らかとなっている (Yoneyama *et al.* 2018)。

(2) CLA より下流の生合成経路

イネの CYP711A サブファミリーは, CL から CLA への変換という共通機能を有するだけでなく典型的 SL の生合成にも関与する。同サブファミリーのうち, Os900 / OsCYP711A2 は CL から CLA を経由して, 典型的 SL の一つである 4-deoxyorobanchol

(4DO) までの変換を触媒し, Os1400 / OsCYP711A3 は, 4DO の 4 位炭素を水酸化し orobanchol への変換を触媒する (Zhang *et al.* 2014)。イネの他に, シダ植物の一つであるイヌカタヒバ (*Selaginella moellendorffii*) の SmCYP711A17v1 および SmCYP711A17v3 が CL から 4DO までの変換を, トウモロコシ (*Zea mays*) の ZmCYP711A18 が 4DO から orobanchol への変換を触媒することが明らかになっている (Yoneyama *et al.* 2018)。植物種により CYP711A サブファミリーの触媒活性に違いがあることから, 同サブファミリーの機能には多様性があると考えられている。

シロイヌナズナでは, 非典型的 SL として CLA のメチルエステル体である methyl carlactonoate (MeCLA) の存在が報告されている (Abe *et al.* 2014)。MeCLA は CL や CLA とは異なり, 試験管内で SL 受容体タンパク質である D14 との相互作用が認められており, MeCLA がシロイヌナズナにおいて枝分かれ抑制ホルモンの一

つとして機能することが示唆されている (Abe *et al.* 2014)。

3. 双子葉植物の典型的ストリゴラクトン生合成に関与する CYP722C サブファミリーの発見

(1) Orobanchol 生合成

イネの CYP711A サブファミリーが BC 環形成を伴う典型的 SL の合成を触媒したことから、他の植物種においても同サブファミリーがこの反応を担うと想定された。しかし、種子植物で CL や CLA から典型的 SL への合成を触媒する同サブファミリーはイネ以外では同定されていない。したがって、CYP711A サブファミリー以外に、典型的 SL 生合成に関与する植物界に広く存在する酵素が存在すると考えられた。

筆者らは、イネと同様に orobanchol を生産するいくつかの植物 (マメ科のササゲ (*Vigna unguiculata*), アカクローバー, エンドウ, ナス科のアカピーマン) において、植物体に投与した CLA が orobanchol へと変換される一方で、4DO の投与では orobanchol が生成されないことを見いだした (Iseki *et al.* 2018; Ueno *et al.* 2018)。すなわち、これらの植物種には、4DO を経由せず CLA から直接 orobanchol を合成する生合成経路が備わっていることが示唆された。ササゲにおいてシトクロム P450 の阻害剤によって、CLA から orobanchol への変換が阻害されたことから、シ

トクロム P450 がこの変換に関与すると考えられた。そこで、候補遺伝子の探索のため、SL 生産量が異なるいくつかの条件で栽培したササゲの根の RNA-seq データを用いた遺伝子共発現解析を実施した。既知の SL 生合成遺伝子と共発現する機能未知の遺伝子として *VuCYP722C* を候補遺伝子とし、その組換え酵素による酵素反応試験を行った。その結果、*VuCYP722C* は CLA を基質として、orobanchol および C 環の立体配置が orobanchol とは逆向きのジアステレオマー、*ent-2'-epi-orobanchol* をほぼ 1:1 の比で生成することを見いだした。さらに、酵素反応生成物には 18-hydroxy CLA と考えられる化合物も含まれていた (Wakabayashi *et al.* 2019)。一方、投与実験の結果と矛盾なく、*VuCYP722C* は 4DO から orobanchol への変換を触媒しなかった。次に、トマト (*Solanum lycopersicum*) ゲノム中に見いだされる本遺伝子のホモログである *SICYP722C* について解析した結果、*SICYP722C* は既知 SL 生合成遺伝子と同様にリン欠乏条件下で発現量が増加し、組換え酵素はササゲの *VuCYP722C* と同様の活性を示した (Wakabayashi *et al.* 2019)。

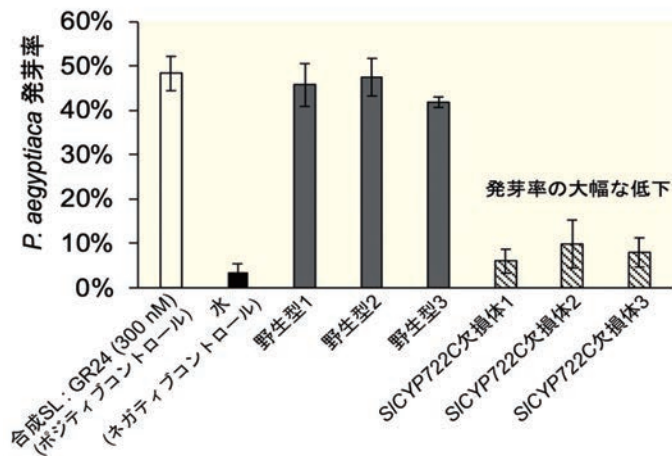
さらに、トマトにおいて CRISPR/Cas9 法によるゲノム編集で *SICYP722C* 遺伝子をノックアウトした植物体 (*SICYP722C*-KO 体) を作出し、SL 生産への影響を調べた。その結果、*SICYP722C*-KO 体の水耕液中には orobanchol が検出されず、代わって

CLA の蓄積が確認された。これらのことから、CLA を直接 orobanchol へ変換する *SICYP722C* の機能が証明された (Wakabayashi *et al.* 2019) (図-2)。一方、酵素反応試験で見られた生成物の *ent-2'-epi-orobanchol* については、ササゲやトマトからは検出されない。このことから、筆者らは、*VuCYP722C* および *SICYP722C* と協調して働き、orobanchol のみを環化生成物とする因子が存在するのではないかと考えている。

(2) 5-deoxystrigol 生合成

CYP722C サブファミリーは、双子葉植物に広く保存されたシトクロム P450 であり、strigol-type の SL を生産する植物もこれを有する。筆者らは、同サブファミリーが strigol-type SL の生合成にも関与しているのではないかと考え、5-deoxystrigol (5DS) を生産するワタ (*G. arboreum*) の *GaCYP722C* の酵素機能を解析した。組み換え酵素を用いた酵素反応試験の結果、*GaCYP722C* は CLA を基質として 5DS への変換を触媒し、生成物に 4DO は検出されなかった。すなわち、*GaCYP722C* は、*VuCYP722C* や *SICYP722C* とは異なり、立体選択的な BC 環形成を触媒する (Wakabayashi *et al.* 2020) (図-2)。また、ワタ以外にも、5DS を生産するミヤコグサ (*Lotus japonicus*) において、5DS 欠損の *dsd* 変異体が見いだされ、その原因遺伝子が *LjCYP722C* であることが明らかにされている (Mori *et al.*

(A)



(B)

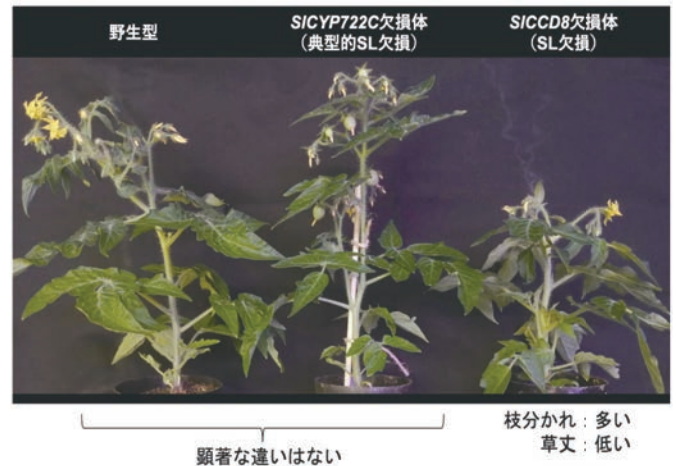


図-3 トマトにおける CYP722C 欠損体の表現型
(A) *P. aegyptiaca* に対する発芽誘導活性 (B) 地上部表現型

2020)。

以上のことから、同サブファミリーはC環の立体配置に関わらず、双子葉植物の典型的SLの生合成に関与する鍵酵素であると考えられる。

4. 生合成経路に着目した根寄生雑草防除

典型的SL生合成の制御は、根寄生雑草の有効な防除戦略となり得る。その最たる例が、ソルガムにおけるストライガ抵抗性品種SRN39である。SRN39はストライガに対する発芽刺激物質低生産性品種として選抜された (Hess *et al.* 1992)。2017年に、この品種では、硫酸転移酵素ドメインをもつタンパク質をコードする *LOW GERMINATION STIMULANT 1* (LGS1) 遺伝子に変異が生じており、生産される主要なSLが5DSからC環の立体配置が異なる orobancholへと変化していることが明らかになった (Gobena *et al.* 2017)。ストライガに対する発芽刺激活性は5DSより orobancholの方が低いため (Nomura *et al.* 2013), SRN39ではSLプロファイルの変化によって、ストライガに対する発芽刺激活性が低下し抵抗性が付

与されたと考えられる。一方、ソルガムにおける典型的SL生合成酵素や、LGS1の機能とBC環立体制御機構との関係は不明であり、今後の解明すべき問題である。

ソルガムのLGS1と並んで、筆者らが見いだした典型的SL生合成に関与するCYP722Cサブファミリーもまた、根寄生雑草抵抗性作物の育種に向けた有用なターゲットであると考えられる。トマトのSICYP722C-KO体の水耕液中からは、先述の orobanchol や orobanchol 代謝物と考えられる典型的SLが検出されない。この水耕液を根寄生雑草種子に対する発芽試験に供したところ、ストライガやトマトに農業的被害を及ぼす *P. aegyptiaca* の発芽率が大幅に低下した (図-3A)。一方、興味深いことにSICYP722C-KO体の地上部枝分かれ表現型は野生型と比較して顕著な違いは認められなかった (Wakabayashi *et al.* 2019) (図-3B)。このことから、トマトの枝分かれ制御には orobanchol を含む典型的SLは必須でないと考えられる。そこで筆者らは、作物に典型的SLを作らせないという根寄生雑草の防除戦略を考案している。CYP722Cサブファミリーの触媒によって典型的SLが合

成される植物では、この遺伝子を欠損させることで、地上部の形態を維持したまま根寄生雑草に対する抵抗性を付与できる可能性が高いと考えている。今後、実際に抵抗性がどれほど付与されるか、作物としての形質や、根圏環境への影響について調査することで、新たな防除戦略としての有効性を実証していきたい。

終わりに

SL生合成研究は、最近の10年間で急速に発展してきた。しかし、典型的SLのBC環制御機構や、より複雑に合成されると考えられる非典型的SLの生合成機構など、未だ不明な点が多い。また、現在までに、40種類程度のSLが単離・構造決定されている一方で、植物がなぜこのような多様なSLを生産・分泌しているかの理由や、個々の化合物の生理機能の多くは未解明である。特に、枝分かれ抑制ホルモンとしての機能を担う化合物の同定は今後のSL研究の大きな課題である。今後これらの問題の解明による本分野のさらなる進展と、SLの農業への利用技術の確立を期待したい。

引用

- Abe, S. *et al.* 2014. Carlactone is converted to carlactonoic acid by MAX1 in *Arabidopsis* and its methyl ester can directly interact with AtD14 in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111, 18084–18089.
- Akiyama, K. *et al.* 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. Nature 435, 824–827.
- Alder, A. *et al.* 2012. The path from β -carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone. Science 335, 1348–1351.
- Cook, CE. *et al.* 1966. Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour.): isolation and properties of a potent stimulant. Science 154, 1189–1190.
- Gobena, D. *et al.* 2017. Mutation in sorghum *LOW GERMINATION STIMULANT 1* alters strigolactones and causes *Striga* resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 114, 4471–4476.
- Gomez-Roldan, V. *et al.* 2008. Strigolactone inhibition of shoot branching. Nature 455, 189–194.
- Hess, DE. *et al.* 1992. Selecting sorghum genotypes expressing a quantitative biosynthetic trait that confers resistance to *Striga*. Phytochemistry 31, 493–497.
- Iseki, M., *et al.*, 2018. Evidence for species-dependent biosynthetic pathways for converting carlactone to strigolactones in plants. J. Exp. Bot. 69, 2305–2318.
- Mori, N. *et al.* 2020. Identification of two oxygenase genes involved in the respective biosynthetic pathways of canonical and non-canonical strigolactones in *Lotus japonicus*. Planta 251, 40.
- Nomura, S. *et al.* 2013. Structural requirements of strigolactones for germination induction and inhibition of *Striga gesnerioides* seeds. Plant Cell Rep. 32, 829–838.
- Seto, Y. *et al.* 2014. Carlactone is an endogenous biosynthetic precursor for strigolactones. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111, 1640–1645.
- Ueno, K. *et al.* 2018. Bioconversion of 5-deoxystrigol stereoisomers to monohydroxylated strigolactones by plants. J. Pestic. Sci. 43, 198–206.
- Umehara, M. *et al.* 2008. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. Nature 455, 195–200.
- Wakabayashi, T. *et al.* 2019. Direct conversion of carlactonoic acid to orobanchol by cytochrome P450 CYP722C in strigolactone biosynthesis. Sci. Adv. 5, eaax9067.
- Wakabayashi, T. *et al.* 2020. CYP722C from *Gossypium arboreum* catalyzes the conversion of carlactonoic acid to 5-deoxystrigol. Planta 251, 97.
- Yoneyama, K. *et al.* 2018. Conversion of carlactone to carlactonoic acid is a conserved function of MAX1 homologs in strigolactone biosynthesis. New Phytol. 218, 1522–1533.
- Zhang, Y. *et al.* 2014. Rice cytochrome P450 MAX1 homologs catalyze distinct steps in strigolactone biosynthesis. Nat. Chem. Biol. 10, 1028–1033.