



Characterization of strigolactone biosynthetic enzymes responsible for the formation of orobanchol and its derivatives in plants

本間, 大翔

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2025-03-25

(Date of Publication)

2027-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第9226号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100496507>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文内容の要旨

氏 名 _____ 本間 大翔 _____

専攻・講座 _____ 生命機能科学専攻・応用生命化学講座 _____

論文題目（外国語の場合は，その和訳を併記すること。）

Characterization of strigolactone biosynthetic enzymes
responsible for the formation of orobanchol and its
derivatives in plants

植物におけるオロバンコールとその誘導体の生成を担うス
トリゴラクトン生合成酵素の解析

指導教員 _____ 水谷 正治 _____

Strigolactone (SL)は、植物が生産する一群のアポカロテノイドの総称である。根から分泌された SL は、重大な農業的被害をもたらす根寄生雑草の種子の発芽を促す一方で、植物と共生し無機栄養素を供給するアーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐を誘導する。さらに、SL は植物地上部の枝分かれを抑制する植物ホルモンとしても機能する。このように SL は根圏および植物内において多様な生理学的役割を有している。

序章では SL の化学構造と生合成に関するこれまでの知見について論じた。典型的 SL は三環性ラクトン構造 (ABC 環)を有し、C 環の立体に基づいて strigol-type SL と orobanchol-type SL に分類される。一方で、非典型的 SL は不完全な ABC 環構造を持つ。これまでに、根寄生雑草の宿主や非宿主を含む植物種から 30 を超える多様な SL が同定されてきた。化学構造の違いはそれぞれの SL に特徴的な生物活性を生み出すと考えられる。多くの植物種において、all-trans- β -carotene から SL の前駆物質である carlactonoic acid (CLA) への生合成経路は保存されているが、CLA より下流の SL 生合成経路は未解明の部分が残されている。典型的 SL である orobanchol は、真正双子葉植物、単子葉植物、そして特定の裸子植物を含む様々な植物種から同定されており、植物界に広く分布する主要な SL の 1 つであると考えられる。加えて、上記の植物種から多様な orobanchol 誘導体が同定されてきた。しかしながら、orobanchol とその誘導体の生合成経路は部分的にしか解明されておらず、その構造多様性の背景にある分子基盤は限られていた。

第 1 章では、SL 生合成研究の分野において未解明の謎となっていた、立体選択的な orobanchol 生合成メカニズムの解明を目指した。先行研究により、トマト (*Solanum lycopersicum*)において CLA から orobanchol への変換に関わる酵素としてシトクローム P450 (CYP)である SlCYP722C が同定された。しかしながら、CLA を基質とした組み換え SlCYP722C による酵素反応では、orobanchol のみならず C 環の立体配置が異なる立体異性体である *ent*-2'-*epi*-orobanchol も検出された。このことは、orobanchol 生合成において C 環の立体化学を制御するために、更なる因子が必要であることを示唆していた。そこで、まずは SlCYP722C の酵素活性の詳細な解析を行った。その結果、SlCYP722C の酵素活性は CLA の 18-oxo-CLA への酸化であること、18-oxo-CLA は水溶液中で自発的に環化して orobanchol と *ent*-2'-*epi*-orobanchol の混合物を与えることがわかった。よって、18-oxo-CLA を orobanchol へと変換する stereoselective BC-ring forming factor (SRF)と称した酵素の存在が示唆された。SRF 候補として、植物二次代謝産物の立体選択的生合成に関与することが示唆される dirigent protein に着目した。トランスクリプトーム解析に基づき候補として選抜された dirigent protein をコードする遺伝子 (*Solyc01g059900*)の組み換え酵素は 18-oxo-CLA を orobanchol へと変換したことから、*Solyc01g059900* を SRF と同定した。また、ゲノム編集により作成した *srf* 変異体の根滲出液では、orobanchol と *ent*-2'-*epi*-orobanchol の等量混合物が検出された。さらに、SRF の立体構造予測や分子動力学シミュレーションなどの計算科学的手法に基づき orobanchol 生成に関与するアミノ酸残基を予測した。このアミノ酸残基

に点変異を導入した SRF 組み換え酵素は、orobanchol 生成活性の顕著な低下を示した。本章におけるこれらの発見は、典型的 SL を立体選択的に生成するメカニズムおよびその意義を理解するための重要な分子基盤となると考えられる。

第 2 章では、寄生雑草 *Striga gesnerioides* により農業的被害を被るササゲ (*Vigna unguiculata*) において、SRF ホモログの機能を解析し、SL 生合成経路を調べた。ササゲゲノムでは、2 つの SRF ホモログ遺伝子 (*Vigun03g413800* と *Vigun03g413900*) がタンデム重複遺伝子として見出される。これらの SRF ホモログの組み換え酵素を用いて 18-oxo-CLA を基質とした酵素反応を行った。その結果、*Vigun03g413900* (VuSRF) による 18-oxo-CLA の orobanchol への変換が確認された一方で、*Vigun03g413800* (VuSRF-like) は異なった酵素活性を示し、18-oxo-CLA を新規 SL (SL-X) へと変換した。VuSRF-like の詳細な生化学分析を行った結果、VuSRF-like は 2 段階の反応、つまり 18-oxo-CLA の orobanchol への変換と orobanchol の SL-X への変換を触媒することがわかった。NMR 解析により SL-X の構造を決定し、orobanchonoic acid と命名した。Orobanchonoic acid はササゲの根浸出液において、orobanchol と同程度の濃度で検出された。また、orobanchonoic acid の寄生雑草種子に対する発芽刺激活性は顕著に低かった。さらに、ササゲと系統的に近いマメ科植物のゲノムを解析すると、SRF のタンデム重複遺伝子がササゲにユニークで起こっていることがわかった。上記植物種の SRF ホモログは orobanchol を orobanchonoic acid へ変換し得たが、VuSRF-like と比較すると無視できるほどの活性であった。これらのことから、ササゲにおける SRF タンデム重複遺伝子は VuSRF-like の新機能化を促進し、ササゲにおける orobanchonoic acid の生合成を可能にしたことが推測される。

第 3 章では、マメ科植物における orobanchol 誘導体の生合成酵素の同定を目指した。A 環部分が 7 員環構造となっている medicaol、A 環にエポキシ基を有し、4 位のヒドロキシ基がアセチル化された fabacyl acetate、そして 4 位のヒドロキシ基がアセチル化された orobanchyl acetate がそれぞれ、タルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*)、エンドウ (*Pisum sativum*)、そしてササゲが生産する orobanchol 誘導体として同定された。まず、medicaol と fabacyl acetate の生合成には CYP や 2-オキシグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ (DOX) などの酸化酵素が関与していると予想されたため、酸化酵素阻害剤を用いたフィード実験により、orobanchol 下流の代謝経路を分析した。その結果、DOX の阻害剤であるプロヘキサジオンは、タルウマゴヤシにおける orobanchol から medicaol への変換と、エンドウにおける orobanchol の fabacyl acetate、およびその前駆体である fabacol への変換を阻害した。このことから、これら orobanchol 誘導体生合成への DOX の関与が示唆された。次に、トランスクリプトーム解析および既知の SL 生合成遺伝子との共発現解析に基づき、候補遺伝子を選抜し、組み換え酵素の酵素機能を解析した。その結果、orobanchol を medicaol へと変換する DOX である medicaol synthase (MOS)、orobanchol を fabacol へと変換する DOX である fabacol synthase (FOS)、そして fabacol をアセチル化し fabacyl acetate を生成する fabacol acetyltransferase (FAT)

を同定した。ササゲにおける FAT のホモログは orobanchol をアセチル化し orobanchyl acetate を生成したため、orobanchol acetyltransferase (OAT)として同定した。また、詳細な生化学的解析の結果、MOS、FOS、FAT、および OAT は orobanchol や fabacol といった基質に対して高い親和性と基質特異性を示すことがわかった。本章のこれらの発見により、マメ科植物における SL 構造多様化への理解が深まると考えられる。

以上のように、第 1 章、第 2 章、第 3 章を通じて代表的な SL である orobanchol およびその誘導体の生合成酵素を解明し、本研究は植物における SL 生合成について重要な知見を与えるものであると考えられる。また、orobanchol は様々な植物種が生産するため、これらの発見はカスタマイズされた SL 組成を持つ植物を作出するための分子基盤となると考えられる。生産する SL の組成が異なることにより、根寄生雑草種子の発芽誘導および根圏における微生物菌叢の相対的存在量へ影響があることが知られている。そのため、有益な微生物を引き寄せるように設計された作物や、根寄生雑草の発芽を抑制し、その発生率を減らすように設計された作物の生成が可能になることが期待される。

氏名	本間 大翔		
論文 題目	Characterization of strigolactone biosynthetic enzymes responsible for the formation of orobanchol and its derivatives in plants (植物におけるオロバンコールとその誘導体の生成を担うストリゴラクトン生合成酵素の解析)		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	水谷 正治
	副 査	教授	宇野 知秀
	副 査	准教授	山内 靖雄
	副 査	神戸大学 名誉教授	杉本 幸裕
要 旨			
Strigolactone (SL) は、植物が生産するアポカロテノイドの一群の総称である。根から分泌された SL は、植物間および植物-微生物相互作用に関与する化学シグナルとして機能する。SL はアフリカ地域において重大な農業的被害をもたらす根寄生雑草の種子の発芽を促してしまう一方、植物へ無機栄養素を供給するアーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐を誘導し、共生を促す機能も有している。一方、SL は植物の成長と発達を調節する植物ホルモンとしても機能する。例えば、植物の地上部の枝分かれの抑制や根の形態形成への関与が知られている。このように SL は根圏および植物内において多様な生理学的役割を有している。 序章では SL の構造と生合成に関するこれまでの知見について詳しく論じている。SL は化学構造に基づいて、典型的 SL と非典型的 SL の 2 種類に大別される。典型的 SL は三環式ラクトン構造 (ABC 環) を有する一方で、非典型的 SL は不完全な ABC 環構造を持つ。さらに、典型的 SL は C 環の立体に基づいて strigol-type SL と orobanchol-type SL に分類される。これまでに、さまざまな植物種から 30 を超える SL が同定され、酸化やアセチル化、メチル化などの修飾による構造多様性が報告されている。all-trans-β-carotene から SL の前駆物質である carlactonoic acid (CLA) への生合成経路は保存されているが、CLA より下流の SL 生合成経路は植物種によって異なっている。先行研究によりシトクロム P450 の CYP722C が真正双子葉植物における、CLA の典型的 SL への変換に関与していることが報告された。また、非典型的 SL の生合成において重要なステップである CLA のメチル化反応を CLAMT が担っていることが報告された。Orobanchol は、植物界に広く分布する主要な SL の 1 つであり、さまざまな orobanchol 誘導体が同定されてきたが、orobanchol とその誘導体の生合成経路は部分的にしか解明されていない。 第 1 章では、トマト (<i>Solanum lycopersicum</i>) における立体選択的 orobanchol 生合成メカニズムの解明を目指した研究について論じている。先行研究により、トマトにおいて CLA から orobanchol への変換に関わる SICYP722C が同定された。しかしながら、CLA を基質とした組換え SICYP722C による酵素反応では、orobanchol のみならず C 環の立体配置が異なるジアステレオマー <i>ent</i>-2'-<i>epi</i>-orobanchol も検出された。これは、トマトでは orobanchol 生合成の際に、その立体化学を制御するために別の因子が必要であることを示唆していた。そこで、まず SICYP722C の酵素活性の詳細な再解析を行った。その結果、SICYP722C の酵素活性は CLA の 18-oxo-CLA への酸化であること、18-oxo-CLA は化学的に不安定な物質であり、水溶液中で自発的に環化して orobanchol と <i>ent</i>-2'-<i>epi</i>-orobanchol の混合物を与えることがわかった。よって、18-oxo-CLA を orobanchol へと変換する Stereoselective BC-Ring Forming factor (SRF) と命名した酵素の存在が示唆された。そこで、植物二次代謝産物の立体選択的生合成に関与することが示唆される dirigent protein に着目した。トランスクリプトーム解析に基づき選抜された dirigent protein (<i>Solyc01g059900</i>) の組換え酵素は 18-oxo-CLA を orobanchol へと変換したことから、<i>Solyc01g059900</i> を SRF と同定した。ゲノム編集によって作成された <i>srf</i> トマト変異体の根滲出液では、orobanchol と <i>ent</i>-2'-<i>epi</i>-orobanchol の等量混合物が検出された。加えて、SRF の立体構造予測や分子動力学シミュレーションなどの計算科学的手法に基づき orobanchol 生成に関与すると選抜されたアミノ酸残基を変異させた SRF 組換え酵素を調製し、その酵素活性を解析した。その結果、D37 が 18 位のアルデヒド基のプロトン付加に重要な役割を果たし、酵素反応開始に必要なことが示唆された。また、Y90、D124、R131 が形成する水素結合ネットワークが 18-oxo-CLA のカルボキシ基の固定および酵素反応に重要であることが示唆された。これらの発見は、SL を立体選択的に生成するメカニズムと意義を理解するための重要な分子基盤となると考えられる。さらに、SRF の同定により、orobanchol を生産する他の植物における SL 生合成遺伝子の特定につながった。			

氏名	本間 大翔
第2章では、寄生雑草 <i>Striga gesnerioides</i> により農業的被害を被るササゲ (<i>Vigna unguiculata</i>) における SRF ホモログの機能解析を行った結果について論じている。ササゲゲノムでは、2つの SRF ホモログ遺伝子 (<i>Vigun03g413800</i> と <i>Vigun03g413900</i>) がタンDEM重複遺伝子として見出され、既知 SL 生合成遺伝子と類似した発現パターンを示していた。これらの SRF ホモログの組換え酵素を用いて 18-oxo-CLA を基質とした酵素反応を行った。その結果、<i>Vigun03g413900</i> による 18-oxo-CLA の orobanchol への変換が確認された一方で、<i>Vigun03g413800</i> は異なる酵素活性を示し、18-oxo-CLA を orobanchol とは異なる新規 SL (SL-X) へと変換した。よって、<i>Vigun03g413900</i> と <i>Vigun03g413800</i> をそれぞれ、VuSRF と VuSRF-like と命名した。続いて、VuSRF-like の詳細な生化学分析を行った結果、VuSRF-like は2段階の反応、つまり 18-oxo-CLA の orobanchol への変換と orobanchol の SL-X への変換を触媒することがわかった。VuSRF-like による orobanchol の SL-X への酵素反応を利用して SL-X を調製、精製し NMR 解析に供した。SL-X は orobanchol の C 環の開裂に由来するカルボキシ基を有し、orobanchol の4位のヒドロキシ基がケトン基へと変換されていた。化学構造に基づき、SL-X を orobanchonoic acid と命名した。Orobanchonoic acid はササゲの根の浸出液において、orobanchol と同程度の濃度で検出された。また、orobanchonoic acid の <i>Striga gesnerioides</i> などの根寄生雑草種子に対する発芽刺激活性は、ササゲが生産する他の SL である orobanchol や orobanchyl acetate と比較して低かった。さらに、ササゲと系統的に近いマメ科植物のゲノムを解析すると、SRF のタンDEM重複遺伝子がササゲにユニークで起こっていることがわかった。上記植物種の SRF 組換え酵素は orobanchol を orobanchonoic acid へ変換し得たが、VuSRF-like と比較すると無視できるほどの活性であった。これらのことから、ササゲにおける SRF タンDEM重複遺伝子は VuSRF-like の新機能化を促進し、ササゲにおける orobanchonoic acid 生成を可能にしたことが推測された。 第3章では、マメ科植物における orobanchol 誘導体の生合成酵素の同定を目指した研究について論じている。マメ科植物の根浸出液から、いくつかの orobanchol 誘導体が報告されている。A 環部分が7員環構造となっている medicaol、A 環にエポキシ基を有し4位のヒドロキシ基がアセチル化された fabacyl acetate、そして4位のヒドロキシ基がアセチル化された orobanchyl acetate が、タルウマゴヤシ (<i>Medicago truncatula</i>)、エンドウ (<i>Pisum sativum</i>)、そしてササゲからそれぞれ同定された。まず、medicaol と fabacyl acetate の生合成には CYP や 2-オキシグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ (DOX) などの酸化酵素が関与していると予想されたため、酸化酵素阻害剤を用いたフィード実験により、orobanchol 下流の代謝経路を分析した。その結果、DOX の阻害剤であるプロヘキサジオンは、タルウマゴヤシにおける orobanchol から medicaol への変換と、エンドウにおける orobanchol の fabacyl acetate とそのアセチル化される前の前駆体である fabacol への変換を阻害した。このことから、これらマメ科植物における orobanchol 誘導体生合成への DOX の関与が示唆された。次に、トランスクリプトーム解析および既知の SL 生合成遺伝子との共発現解析に基づき、orobanchol 誘導体生合成に関わる候補遺伝子を選別し、組換え酵素を調製し酵素機能を解析した。その結果、タルウマゴヤシから、orobanchol を medicaol へと変換する DOX である medicaol synthase (MOS) を、さらにエンドウから、orobanchol を fabacol へと変換する DOX である fabacol synthase (FOS) と fabacol をアセチル化し fabacyl acetate を生成する fabacol acetyltransferase (FAT) を同定した。ササゲにおける FAT のホモログは orobanchol をアセチル化し orobanchyl acetate を生成したため、orobanchol acetyltransferase (OAT) として同定した。また、速度論解析と基質特異性解析の結果、MOS、FOS、FAT、および OAT は orobanchol や fabacol といった基質に対して高い親和性と基質特異性を示すことがわかった。本章におけるこれらの発見は、特にマメ科植物における SL の構造的多様化へ洞察を与えるものであると考えられた。 以上のように、第1章、第2章、第3章を通じて、本研究は、代表的な strigolactone である orobanchol およびその誘導体の生合成に関わる酵素遺伝子を解明し、植物における strigolactone 生合成について重要な知見を与えるものである。また、orobanchol は様々な植物種が生産するため、これらの発見は strigolactone の構成を目的に応じて改変した植物を作出するための分子基盤となると考えられる。構造的に異なる strigolactone は、根圏微生物菌群の相対的存在量と根寄生雑草の発芽刺激活性に影響を与えることが示されている。したがって、本研究で同定された生合成酵素遺伝子を利用することにより、有益な微生物を引き寄せるように設計された作物や、根寄生雑草の発芽を抑制することでその発生率を減らすように設計された作物の分子育種も可能になることが期待される。 よって、学位申請者の本間大翔は、博士（農学）の学位を得る資格があると認める。	