

博士論文

ソルガムのストリゴラクトン生合成に関する
生物有機化学的及び分子生物学的研究

2022.3

東京農工大学大学院連合農学研究科
生物生産科学専攻

依 田 彬 義

学 位 論 文 要 旨

ソルガムのストリゴラクトン生合成に関する生物有機化学的及び分子生物学的研究

Study on strigolactone biosynthesis in *Sorghum bicolor* using methods in bioorganic chemistry and molecular biology

生物生産科学専攻 生物制御科学大講座
依田彬義

ストリゴラクトン (SL) は植物の枝分かれを制御する植物ホルモンである。一方で、根圏に分泌された SL はアーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐誘導 (共生誘導) やストライガなどの根寄生植物の種子発芽刺激作用 (寄生誘導) を示す。典型的な SL の化学構造は 3 環性ラクトン (ABC 環) とブテノライド (D 環) がエノールエーテル結合したものであり、C 環の立体化学の違いにより α 配位の orobanchol-type (O-type) と β 配位の strigol-type (S-type) の二つに分けられる。SL はカロテノイドである β -カロテンから生合成され、D27、CCD7、CCD8 酵素により生合成中間体である carlactone (CL) が生成される¹。シロイヌナズナにおいて CL はシトクロム P450 酵素である MAX1 (CYP711A1) により carlactonoic acid (CLA) へ変換される²。一方、イネの MAX1 ホモログである Os900 (CYP711A2) は CL を基質として、CLA および 18-hydroxycarlactonoic acid (18-OH-CLA) を経由して、O-type の 4-deoxyorobanchol (4DO) を生成する³。すなわち、SL 生合成経路には植物種における多様性がある。ソルガムはアフリカ諸国において主要なイネ科穀物であるが、ストライガの宿主であるため甚大な被害を受けている。2017 年に、ストライガ耐性品種として作出されたソルガムから、その耐性を付与した原因遺伝子 *LOW GERMINATION STIMULANT 1* (*LGS1*) が同定された⁴。興味深いことに、正常なソルガムが生産する主要な SL は S-type の 5-deoxystrigol (5DS) であるが、*lgs1* 変異体ではストライガ種子に対する発芽刺激活性が低い O-type の orobanchol に替わっていた。*LGS1* 遺伝子がコードするタンパク質は硫酸基転移酵素に類似しているが、*LGS1* の酵素機能は解明されていなかった。本研究では、ソルガムにおける 5DS の生合成

経路の解明を目的に、LGS1 とその上流で働く MAX1 ホモログの機能解析を行った。

まず、*lgs1* 遺伝子に変異を持つ新たなソルガム品種を同定し、それらの *lgs1* 変異体で蓄積している可能性がある LGS1 酵素の基質の探索を行った。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 関連物質を分析した。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。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 が検出されたが、そのジアステレオマーである 4DO も検出された。ソルガムからは 4DO は検出されないため、ベンサミアナタバコの植物体内で生産された 18-OH-CLA 以外の未知の代謝産物を *LGS1* が基質として利用し、5DS に加えて 4DO が生産された可能性が考えられた。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、ベンサミアナタバコにおける実験と同様に 5DS と 4DO が検出された。*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る。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る。したがって、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⁵。

参考文献

- 1) Alder *et al.*, *Science*, 335:1348-1351, 2012.
- 2) Abe *et al.*, *PNAS*, 111:18084-18089, 2014.
- 3) Yoneyama *et al.*, *New Phytologist*, 218:1522-1533, 2018.
- 4) Gobena *et al.*, *PNAS*, 114:4471-4476, 2017.
- 5) Yoda *et al.*, *New Phytologist*, 232:1999-2010, 2021.

目次

第1章 序論	1
--------	---

第2章 <i>lgs1</i> 変異体 'Tx430' の SL 解析	
2-1 諸論	13
2-2 材料・方法	15
2-3 結果	24
2-4 考察	31

第3章 LGS1 酵素の候補基質とその生合成酵素 MAX1 の解析	
3-1 諸論	32
3-2 材料・方法	34
3-3 結果	38
3-4 考察	44

第4章 LGS1 酵素の <i>in vivo</i> 機能解析	
4-1 諸論	45
4-2 材料・方法	46
4-3 結果	50
4-4 考察	59

第5章 LGS1 酵素の <i>in vitro</i> 機能解析	
5-1 諸論	60
5-2 材料・方法	61
5-3 結果	63
5-4 考察	68

総論	70
----	----

参考文献	74
謝辞	78

略語一覽

18-OH-CLA	18-Hydroxycarlactonoic acid
4DO	4-Deoxyorobanchol
5DS	5-Deoxystrigol
AM 菌	Arbuscular mycorrhizal fungi
CCD7, 8	CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 7, 8
CL	Carlactone
CLA	Carlactonoic acid
CPR	NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase
CYP	Cytochrome P450
D27	DWARF27
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
GUS	β -Glucuronidase
LBO	LATERAL BRANCHING OXIDOREDUCTASE
LC-MS/MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry
LGS1	LOW GERMINATION STIMULANT 1
MAX1	MORE AXILLARY GROWTH 1
MRM	Multiple reaction monitoring
MeCLA	Methyl carlactonoate
PAPS	3'-Phosphoadenosine 5'-phosphosulfate
SL	Strigolactone

第1章 序論

ハマウツボ科のストライガ (*Striga*) やオロバンキ (*Orobanch*e)、フェリパンキ (*Phelipanche*) は宿主植物から栄養や水分を奪う根寄生植物である。特にストライガはサハラ砂漠以南のアフリカ諸国において作物に甚大な被害をもたらしている。ストライガの多くはトウモロコシ (*Zea mays*) やソルガム (*Sorghum bicolor*)、イネ (*Oryza sativa*) などの重要な食用穀物であるイネ科植物に寄生し、農耕地の被害面積は 5000 万ヘクタール以上、作物生産への被害額は年間約 100 億 US ドルにのぼると推定されている (Westwood *et al.*, 2010)。1966 年にワタの根浸出液からストライガの種子発芽を誘導する物質として strigol と strigyl acetate が単離された (Cook *et al.*, 1966)。その後、様々な植物から根寄生植物種子に対する発芽刺激活性物質として類縁化合物が単離され、それらはストリゴラクトン (strigolactone, SL) と総称された (図 1)。絶対寄生植物であるストライガやオロバンキ、フェリパンキは発芽から数日以内に宿主の根に寄生しなければ死んでしまうため、宿主の根から分泌される SL の存在下で発芽するよう進化したと考えられている (Nelson, 2021)。しかしながら、宿主植物が SL を分泌することで不利益を被るにもかかわらず、なぜ SL を生産し分泌しているのかは長い間不明であった。

2005 年、SL はアーバスキュラー菌根菌 (arbuscular mycorrhizal fungi, AM 菌) の菌糸分岐を誘導し、共生を促進する有益な役割を持つことが明らかにされた (図 1) (Akiyama *et al.*, 2005)。AM 菌は陸上植物の約 8 割と共生し、リンなどの無機栄養の吸収を助ける絶対共生菌である。植物は陸上進出したころに AM 菌との共生システムを進化させることでリンの効率的な吸収を可能にしたと考えられている (MacLean *et al.*, 2017)。すなわち、根寄生植物は宿主植物が分泌する AM 菌共生シグナルを利用し、効率的に寄生できるよう進化したと推測される。

さらに 2008 年には、SL が植物地上部の形態形成を制御する新たな植物ホルモンとして作用することが明らかにされた (図 1) (Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008)。枝分かれを調節する

植物ホルモンとしてオーキシンやサイトカイニンが古くから知られていたが、エンドウ (*Pisum sativum*) の *ramosus* (*rms*) 変異体やイネの *dwarf* (*d*) 変異体、シロイヌナズナにおける *more axillary growth* (*max*) 変異体などの過剰な枝分かれを示す変異体の解析により、枝分かれの制御に関与する別のホルモンの存在が示唆されていた(Beveridge *et al.*, 1996; Booker *et al.*, 2004; Arite *et al.*, 2007)。それらの変異体が SL を欠損していることや、根寄生植物に対する種子発芽刺激活性が低下していること、SL の合成類縁体である GR24 で処理すると表現型が回復することなどが示され、欠損している枝分かれ抑制ホルモンが SL であることが判明した(Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008)。SL が枝分かれを抑制することが発見されて以来、植物ホルモンとしての多様な機能が報告されており、地上部の重力応答や不定根形成、葉の老化、二次成長、根毛の伸長などを制御することが明らかにされている(Chesterfield *et al.*, 2020)。

SL は植物の栄養不足に対する応答を制御する重要な物質である。リン酸や窒素などの栄養欠乏によって SL 生合成遺伝子の発現量は増加し、SL の生産量が増加することが知られている(Yoneyama *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2014)。リン酸の欠乏に対する SL 生産量の増加は多くの植物で共通しているが、窒素欠乏に対する応答は種によって異なり、イネやソルガムなどのイネ科植物に見られる反応である(Umehara, 2011)。SL の増加は AM 菌のコロニー形成を促進し、栄養分へのアクセスが改善されるだけでなく、植物内の SL 生産量を調節することで栄養飢餓に対応した成長の調整が可能となる(Umehara, 2011)。

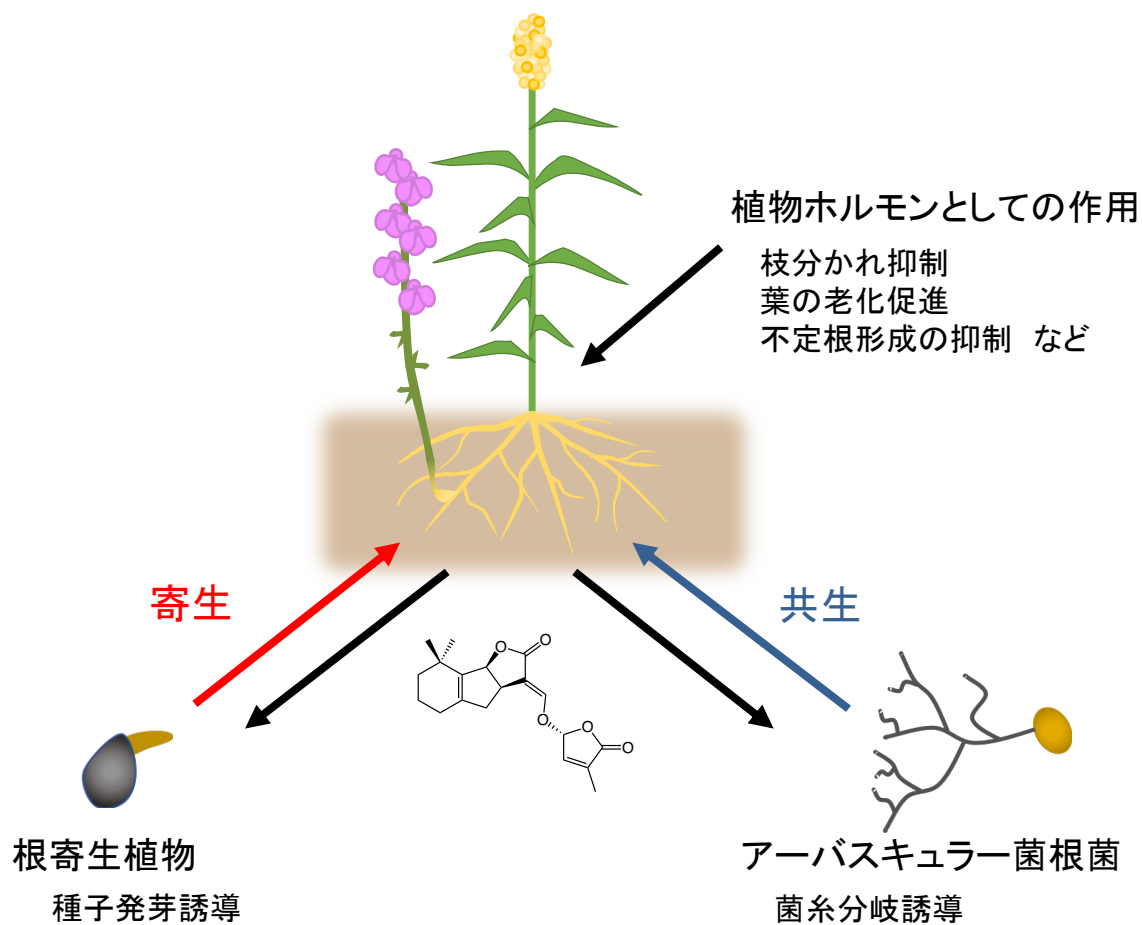


図1：ストリゴラクトン（SL）の生理機能

これまでに 30 種類以上の SL が根寄生植物の種子発芽刺激活性を指標に様々な植物から単離されている (図 2) (Yoneyama *et al.*, 2018b; Kodama *et al.*, 2021)。SL は典型的 SL と非典型的 SL に分類される。典型的 SL は三環性ラクトン (ABC 環) にメチルブテノライド (D 環) がエノールエーテル結合した構造を有する (図 2)。一方、非典型的 SL は A、B または C 環を持たないが生理活性に必須であるエノールエーテル結合した D 環部位を有している (図 3)。エノールエーテル結合を含む D 環構造はこれまでに単離されている全ての天然 SL において保存されており、D 環の 2'位の立体は全て *R* 配置である。さらに典型的 SL は BC 環接合部における立体化学により α 配置の orobanchol-type と β 配置の strigol-type に分けることができる (図 2) (Xie *et al.*, 2013)。典型的 SL の多くは orobanchol-type の 4-deoxyorobanchol (4DO) や strigol-type の 5-deoxystrigol (5DS) を基本骨格として、水酸基やアセチル基、エポキシ基などの置換基により多様化している。多くの植物は 2 つの立体配置の内、一方の SL のみを生産しているが、この立体選択的な SL 生合成の生理的な重要性はほとんど分かっていない。

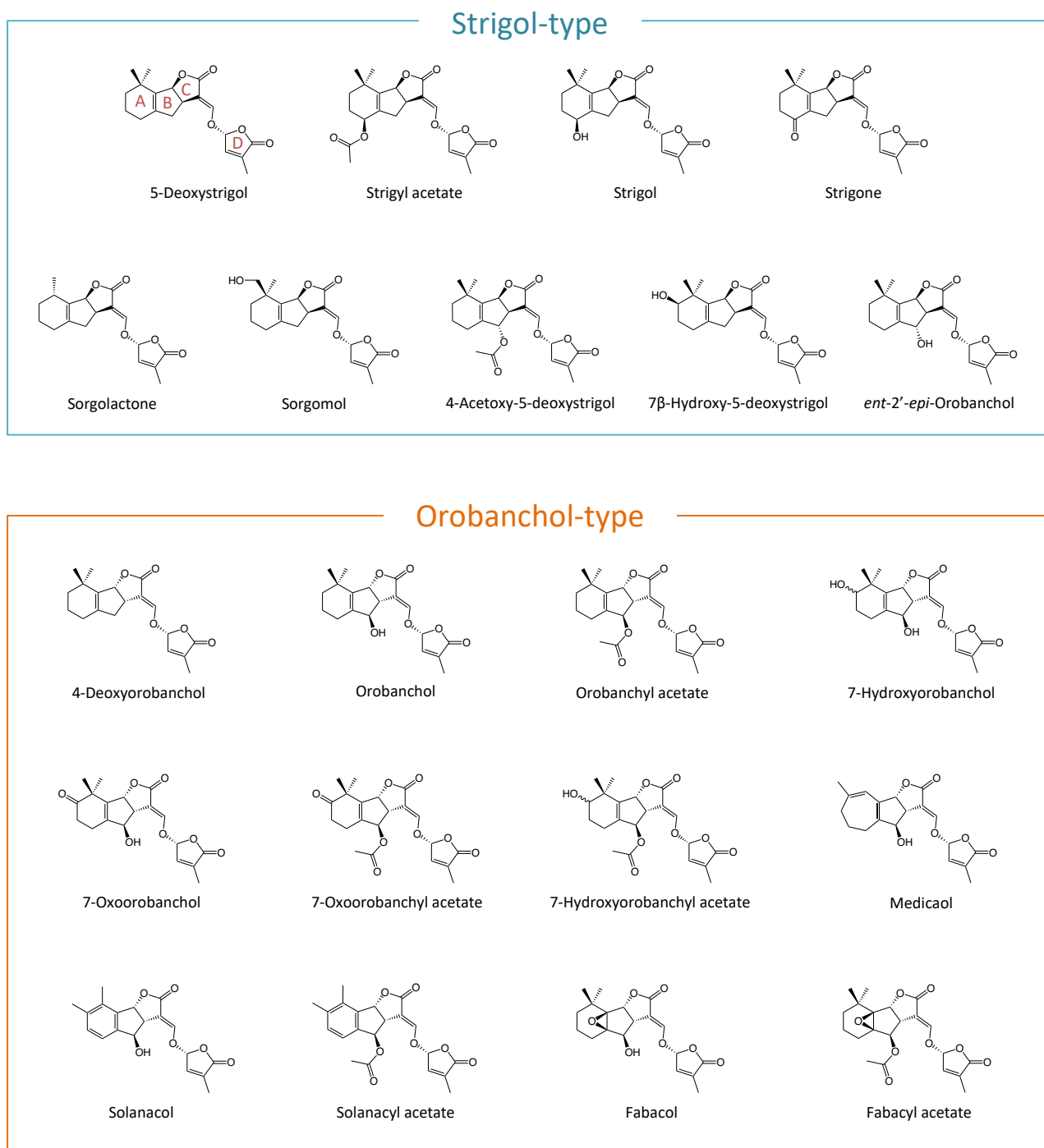


図2：典型的SLの化学構造

典型的SLは、ABC環にメチルブテノライドのD環がエノールエーテル結合した4環構造をしている（5-deoxystrigolの構造参照）。典型的SLは、BC環接合部の立体化学に基づいて、strigol-typeまたはorobanchol-typeに分類される。

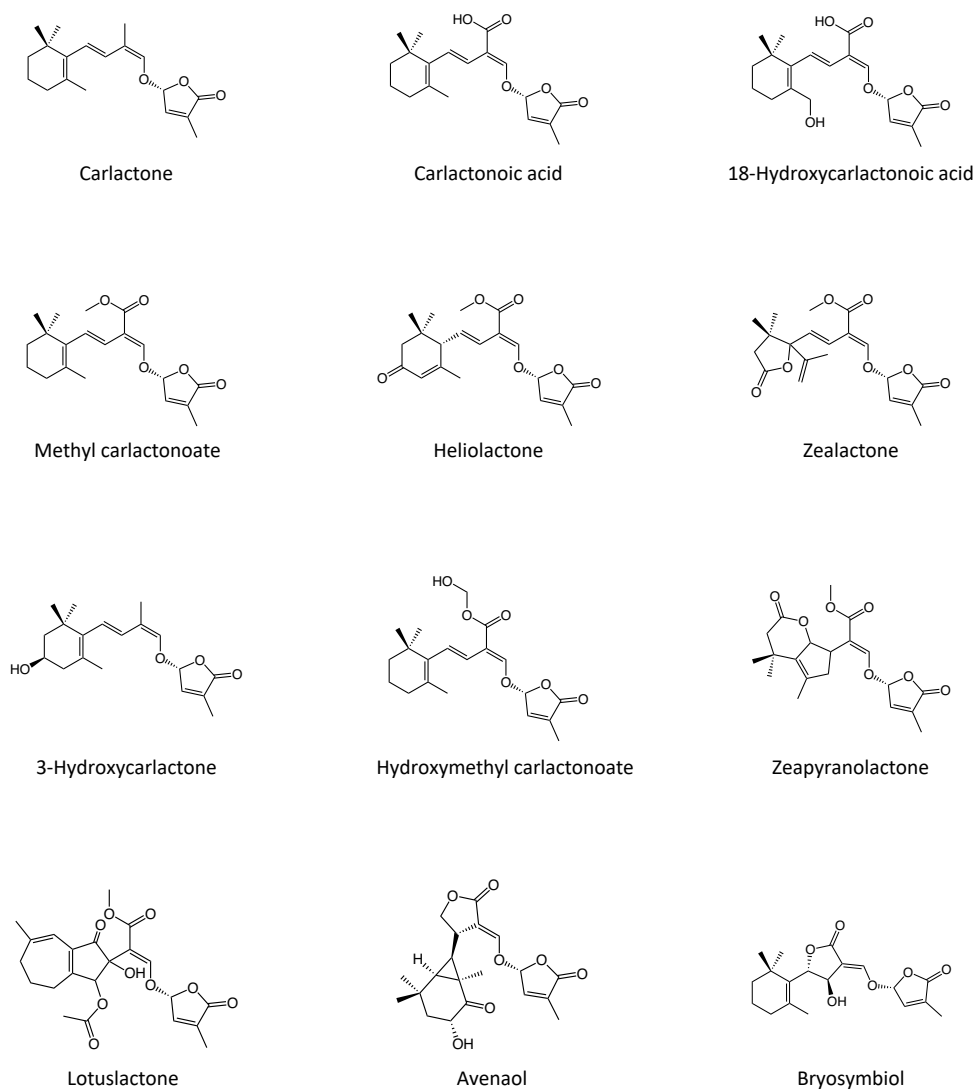


図3：非典型的SLの化学構造

非典型的SLは4環性の構造を持たないがSLの生理活性に必須であるエノールエーテル結合したD環構造が保存されている。

現在、根寄生植物の防除法の開発に向けた SL の研究が活発に行われている。その方法の一つとして合成 SL 類似化合物による根寄生植物の自殺発芽が挙げられる。絶対寄生植物であるストライガやオロバンキは発芽後数日以内に宿主植物に寄生しなければ枯死してしまう。そのため農作物を植える前に、化学合成した SL 類似化合物を土壤に散布することで根寄生植物の発芽を誘発し、土壤中に存在する根寄生植物の種子を除去しようとする試みである。*Striga hermonthica* に対する発芽促進剤として開発された T-010 は、 100 g ha^{-1} 以上を土壤に処理することでソルガムを用いたポット試験において *S. hermonthica* の発生を 94~100 %減少させ、圃場試験では 33 %減少させた (図 4) (Samejima *et al.*, 2016)。また、SL 類似化合物である Nijmegen-1 はトウジンビエを用いた圃場試験において 32 g ha^{-1} の処理により *S. hermonthica* の発生を 65 %減少させた (図 4) (Kountche *et al.*, 2019)。近年では fM レベルの低濃度でストライガ種子に対する発芽刺激活性を示す sphynolactone-7 という化合物が報告されている (図 4) (Uraguchi *et al.*, 2018)。Sphynolactone-7 は *S. hermonthica* 種子の発芽において主要な役割を果たす SL 受容体 ShHTL7 に対して選択的に結合するため宿主植物に対する影響は少なく、ストライガに選択的な発芽促進剤であることが示されているが、圃場試験の結果はまだ報告されていない。このように自殺発芽を利用した根寄生植物の防除法に向けた SL 類似化合物の開発が行われているが、圃場試験における結果では寄生による被害を完全に抑えるほどの効果は見られていない。また、SL は寄生植物による宿主の認識だけでなく、AM 菌の共生や植物自身の形態形成、環境応答など様々な活性を有しているため、SL 類縁体処理によるオフターゲット効果のリスクは排除できない。

根寄生植物の防除法として考えられている他の方法として、SL 生合成阻害剤の開発が挙げられる。SL 生合成阻害剤としてトリアゾール化合物である TIS108 が報告されている (図 4) (Ito *et al.*, 2011)。イネに対して TIS108 を処理することで、濃度依存的に根および根滲出液中の SL 量は減少し、根滲出液のストライガ種子に対する発芽刺激活性は低下した。トリアゾール誘導体はシトクロム P450 酵素の阻害剤として作用することが知られているため、TIS108 も同様にシトクロム P450 酵素の阻害剤として作用していると考えられるが、ターゲットとなる SL 生合成酵素は明らかにさ

れていない。また、TIS108 の誘導体として合成された KK5 は nM レベルで SL 生合成を阻害する (図 4) (Kawada *et al.*, 2019)。SL 生合成阻害剤は様々な植物に適応可能であるため、根寄生植物の防除に向けた新しいツールとなるだけでなく、SL の機能解析においても有用な役割を果たしている (Jiu *et al.*, 2022)。

SL はカロテノイドから生合成される。SL 生合成酵素はエンドウやイネ、シロイヌナズナにおける枝分かれが過剰な変異体から同定されてきた (Beveridge *et al.*, 1996; Booker *et al.*, 2004; Arite *et al.*, 2007)。これまでに明らかにされている典型的 SL の生合成経路を図 5 に示す。all-*trans*- β -Carotene は DWARF27 (D27) と CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 7 (CCD7)、CCD8 酵素により 9-*cis*- β -carotene と 9-*cis*- β -10'-carotenal を経て SL 共通の前駆体である carlactone (CL) へ変換される (図 5) (Alder *et al.*, 2012)。シロイヌナズナにおいて、CL はシトクロム P450 酵素である MORE AXILLARY GROWTH 1 (MAX1, CYP711A1) により C-19 位が酸化され、carlactonoic acid (CLA) へ変換される (図 5) (Abe *et al.*, 2014)。CL から CLA への変換は様々な植物種における MAX1 ホモログに保存された酵素機能であるが、CLA 以降の SL 生合成経路には植物種における多様性がある。イネにおいて、MAX1 ホモログの一つである Os900 (CYP711A2, Os01g0700900) は CL を CLA と 18-hydroxycarlactonoic acid (18-OH-CLA) を経て典型的 SL である 4DO へ変換する (図 5) (Zhang *et al.*, 2014; Yoneyama *et al.*, 2018a)。4DO はイネの Os1400 (CYP711A3, Os01g0701400) によって orobanchol へ変換される (Zhang *et al.*, 2014)。さらに最近では、コケ植物のフタバネゼニゴケ (*Marchantia paleacea*) の MAX1 ホモログが祖先型 SL として単離された bryosymbiol (BSB) を CL から生成することが明らかにされた (図 3) (Kodama *et al.*, 2021)。

トマト (*Solanum lycopersicum*) とササゲ (*Vigna unguiculata*) は orobanchol を生産しているが、イネの生合成経路とは異なり、シトクロム P450 酵素である CYP722C が CLA から orobanchol への変換に関与している (図 5) (Wakabayashi *et al.*, 2019)。一方で、ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) とワタ (*Gossypium arboreum*) の CYP722C は strigol-type の SL である 5DS を CLA から生成する (図

5) (Mori *et al.*, 2020; Wakabayashi *et al.*, 2020)。近年、CLA のメチルエステル誘導体であり、BC 環を持たない様々な非典型的 SL が根寄生植物の種子発芽刺激物質として単離されている (Yoneyama, 2020)。典型的 SL は炭素数 19 の化合物であるのに対し、非典型的 SL の多くは炭素数 20 の化合物であるため、それらの非典型的 SL は SL 生合成経路における最初の炭素数 20 の化合物である methyl carlactonoate (MeCLA) に由来すると考えられる (図 3)。シロイヌナズナにおいて、MeCLA はメチル基転移酵素 At4g36470 により CLA から生成される (Wakabayashi *et al.*, 2021b)。さらに MeCLA は 2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼである LATERAL BRANCHING OXIDOREDUCTASE (LBO) により hydroxymethyl carlactonoate (1'-OH-MeCLA) に変換されることが明らかになっている (図 3) (Yoneyama *et al.*, 2020)。また、ミヤコグサにおいて非典型的 SL である lotuslactone の生合成に関与する遺伝子として 2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼである Lj1g3v4997280 (lotuslactone-defective phenotype, LLD) が同定されており、その酵素機能は明らかにされていないが MeCLA の下流で働く酵素であると推測される (Mori *et al.*, 2020)。

植物の枝分かれを抑制する SL の活性本体の化学構造は未だに不明である。SL 生合成において *D27*、*CCD7*、*CCD8* や *MAX1* の変異体には枝分かれの増加などの形態異常が見られるが、トマトの *CYP722C* 変異体では枝分かれ数に異常は見られない (Wakabayashi *et al.*, 2019)。一方、*LBO* の変異体では枝分かれの増加が観察されるため、*LBO* の下流に植物ホルモンとしての活性本体が存在すると考えられている (Brewer *et al.*, 2016)。すなわち、炭素数 19 の典型的 SL は根圏シグナルとして働いており、枝分かれ抑制ホルモンは CLA から分岐した炭素数 20 の非典型的 SL であると考えられる。

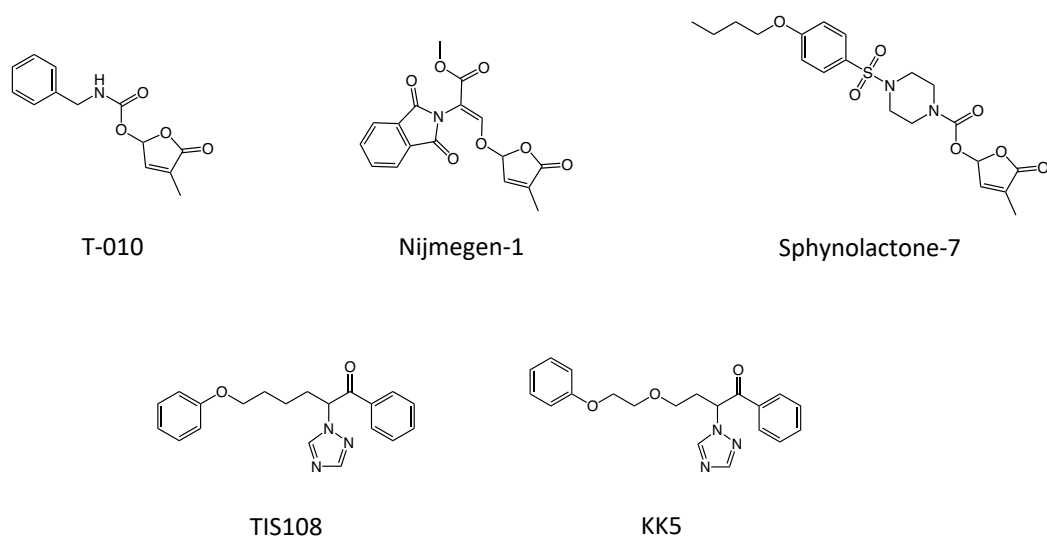


図4：合成SL類縁体とSL生合成阻害剤の化学構造

T-010, Nijmegen-1と sphynolactone-7は根寄生植物種子に対する発芽刺激物質として報告されている合成SL類縁体である。TIS108とKK5はSL生合成阻害剤として報告されているトリアゾール誘導体である。

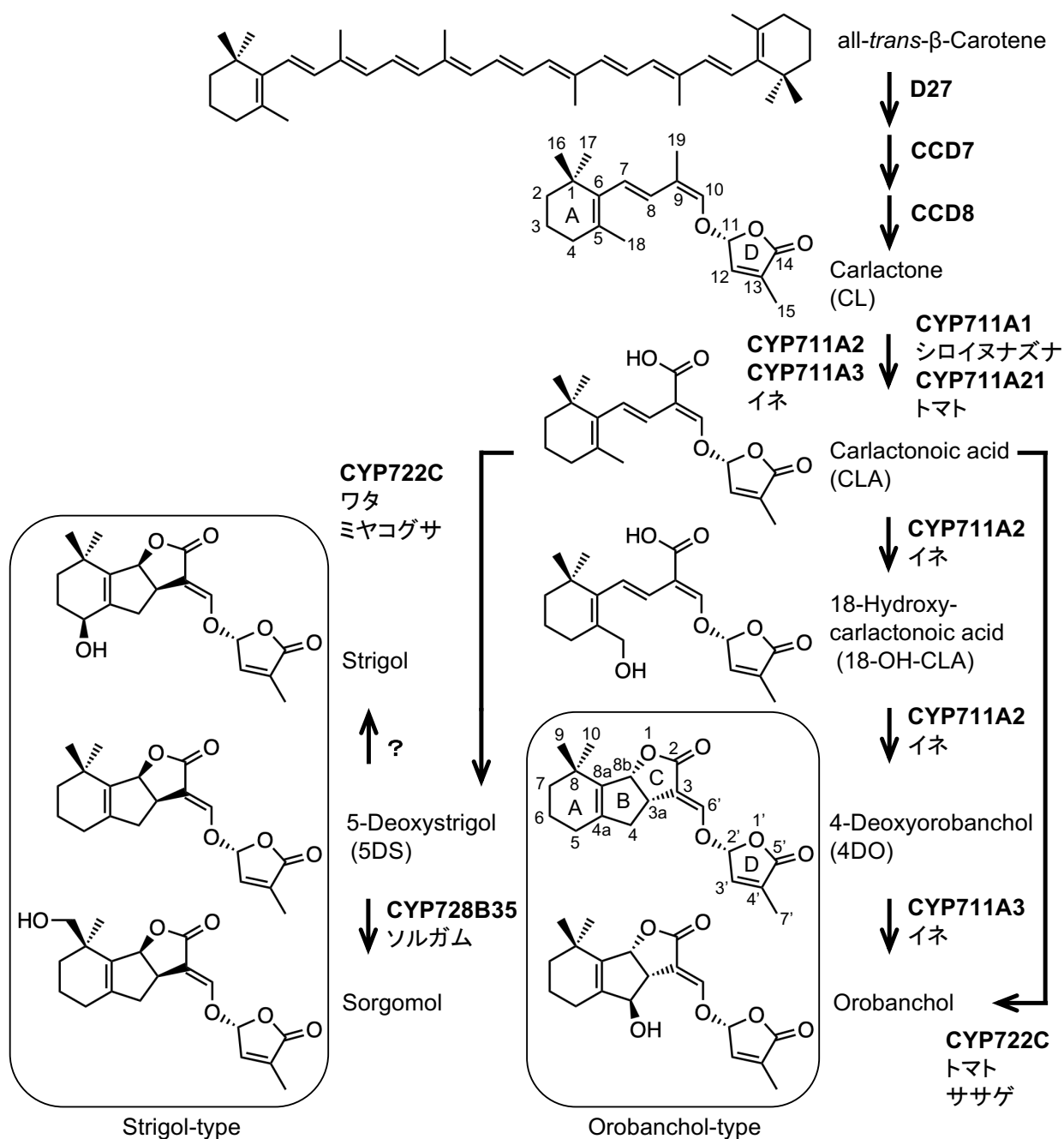


図5：SLの生合成経路

β -CaroteneはD27、CCD7、CCD8により carlactone (CL) へ変換される。CLから carlactonoic acid (CLA) への変換はCYP711Aファミリー (MAX1) の保存された機能である。CLAはCYP711AとCYP722Cの種特異的な酵素機能によりC環の立体化学が異なる strigol-type または orobanchol-type のSLに変換される。

ソルガムはアフリカ諸国において主要な穀物であるが、ストライガの宿主であるため甚大な被害を受けている。ソルガムは 5DS や sorgomol などの C 環の立体が β 配置である strigol-type の SL を生産する。ソルガムにおいて 5DS は CYP728B35 により sorgomol に変換されるが、5DS に至る生合成経路は未だ明らかにされていない(Wakabayashi *et al.*, 2021a)。2017 年に、ストライガ耐性品種として作出されたソルガムから、その耐性を付与した原因遺伝子 *LOW GERMINATION STIMULANT 1* (*LGS1*) が同定された(Gobena *et al.*, 2017)。ストライガ耐性を示すソルガム品種の多くが *LGS1* 遺伝子を欠損しており、それらの品種において主要な SL が orobanchol に替わっていることが報告されている(Gobena *et al.*, 2017)。Orobanchol は 5DS よりストライガ種子に対する発芽刺激活性が弱いことが *lgs1* 変異体において *S. hermonthica* の寄生が減る原因であると考えられている(Mohemed *et al.*, 2018)。また、*lgs1* 変異体はストライガ耐性を示す一方で、SL 欠損変異体とは異なり、地上部の枝分かれ形態や AM 菌共生に影響がないことが確認されている(Gobena *et al.*, 2017)。*LGS1* 遺伝子は硫酸基転移酵素に類似したタンパク質をコードしており、立体特異的な 5DS の生合成に関与していると考えられるが、その酵素機能は明らかにされていない。ストライガに対する発芽刺激活性が強い strigol-type の SL である 5DS の生合成経路の解明は、ストライガ防除法開発の基盤となる。そこで本研究ではソルガムにおける SL 生合成経路の解明を目的として *LGS1* 酵素の機能解析を行った。

本論文では、*lgs1* 遺伝子に変異を持つ新たなソルガム品種を同定し、それらの SL 分析を行った(第2章)。そして、*lgs1* 変異体において蓄積している *LGS1* 酵素の基質候補を発見し、その生合成に関与する *MAX1* ホモログの機能解析を行った(第3章)。さらに、ベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) の一過的発現系を用いてソルガムの SL 生合成経路を再構築して解析した(第4章)。また、大腸菌で発現させた *LGS1* タンパク質を用いて代謝実験を行なった(第5章)。これらの本研究により、ソルガムの SL はシトクロム P450 酵素と硫酸基転移酵素により触媒される他の植物種では報告されていない経路で生合成されることを明らかにした。

第2章 *lgs1* 変異体 ‘Tx430’ の SL 解析

2-1 諸論

2017年、ストライガ耐性品種として育種により作出されたソルガムから、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.*, 2017)。ソルガムにおける*LGS1*遺伝子の変異は、根滲出液中の主要なSLをストライガに対して高い発芽活性を示す5DSから、異なる立体化学を持つSLであるorobancholに変化させ、ストライガ種子に対する発芽刺激活性を劇的に低下させる。*lgs1*変異体はSLが欠損しているのではなく、根寄生植物に対する発芽活性が異なるSLの相対的な生産量を変化させるだけであるため、SLの他の重要な機能(植物体の形態形成やAM菌との共生促進、栄養不足などの環境に対する応答性)はそのまま維持されている。Gobenaらにより*LGS1*遺伝子に変異を持つソルガム品種はSRN39、555、IS7777、SC103、Tetronが同定されており、それらの対立遺伝子はそれぞれ*lgs1-1*、*lgs1-2*、*lgs1-3*、*lgs1-4*、*lgs1-5*と命名された(Gobena *et al.*, 2017)。さらに2018年にはMohemedらにより36種のソルガム品種の根滲出液におけるSLとストライガに対する発芽活性が調べられている。*lgs1*変異体におけるストライガに対する発芽刺激活性と感染率の低下は5DSとorobancholの生産量の変化によるものであることが証明され、ストライガ耐性遺伝子型のソルガムとしてさらにIS15401、Framida、Hakika、IS9830が報告された(Mohemed *et al.*, 2018)。

ストライガはアフリカやアジアの半乾燥熱帯地域におけるソルガム生産に甚大な被害を与えている。ソルガムのストライガに対する遺伝的抵抗性の獲得は、アフリカ諸国の自給自足農家において経済的に実現可能な防除手段の1つである。近年、穀物の改良を目的としたゲノム編集の可能性は急速に拡大しているが、その形質転換効率は穀物におけるゲノム編集のボトルネックとなっている。RamadaとTx430は比較的高い形質転換効率を有するソルガムの自殖系統である(Raghuwanshi & Birch, 2010; Liu & Godwin, 2012; Sato-Izawa *et al.*, 2018)。ストライガに対する抵抗性を向上させたソルガム品種を作成するにあたり、これらのソルガム品種が利用可能かを調べるため、まずRamadaとTx430の根滲出液に含まれるSLを分析した。その結果、Tx430は*lgs1*変異体であると考えられ

たことから、*S. hermonthica* と *Orobancha minor* の種子に対する Tx430 と Ramada の根滲出液の発芽刺激活性を調べた。また、PCR を用いて Tx430 と Ramada のゲノム DNA における *LGS1* 遺伝子およびその近傍の遺伝子の増幅を行なった。さらに、テキサス A&M 大学で育種された他の Tx 品種 18 種およびアジアとアフリカの代表的な 107 系統のソルガムにおいても *LGS1* 遺伝子の変異を調査した (Shehzad *et al.*, 2009)。 *LGS1* 遺伝子を欠損している品種については、その根滲出液に含まれる SL を分析した。

2-2 材料・方法

植物材料

ソルガムの Tx430 と Ramada の種子は米国ネブラスカ大学の Plant Transformation Core Research Facility から提供された。ソルガムの Tx 系統 (表 1) とコアコレクション (表 2) は農業・食品産業技術総合研究機構のジーンバンクから入手した。*O. minor* の種子は 2017 年 6 月に栃木県に自生するアカツメクサ (*Trifolium pretense* L.) に寄生した *O. minor* から採取した。*S. hermonthica* の種子はスーダン工科大学の A. G. T. Babiker 博士に提供していただいた。

表 1 本研究で使用したソルガム Tx 系統

ID*	Name
44642	Tx430
43967	Tx09
44312	Tx390B
44284	Tx406B
43966	Tx412
43998	Tx414
44326	Tx600B
49403	Tx601B
49404	Tx602B
44212	Tx603A
44041	Tx607
49408	Tx609B
49406	Tx610B
49409	Tx611B
49407	Tx612B
44295	Tx613B
49405	Tx614B
49402	Tx616B
44234	Tx623A

*農業・食品産業技術総合研究機構のジーンバンクの ID

表2 本研究で使したソルガムのコアコレクション

ID*	Name	Origin
WSC 01	OOTOYO-MURA ZAIRAI	Japan
WSC 02	TAKAKIMI	Japan
WSC 03	IKEDACHO MATSUO ZAIRAI	Japan
WSC 04	KOUCHI OUKAWA ZAIRAI	Japan
WSC 05	DANGOMOROKOSHI	Japan
WSC 06	TOKIBI	Japan
WSC 07	HIMEKI ZAIRAI	Japan
WSC 08	KIKUCHI ZAIRAI	Japan
WSC 09	AKAHO	Japan
WSC 10	KANAGAWAZAIRAI	Japan
WSC 11	72-10-10-5	Japan
WSC 12	HANGETSUTOSUI	Korean Peninsula
WSC 13	KOUSHUU ZAIRAISHU	Korean Peninsula
WSC 14	CHAL WAXY SORGHUM	Korean Peninsula
WSC 15	KOUBOUSHI	Korean Peninsula
WSC 16	MOCTAC LOCAL	South Korea
WSC 17	SENKINHAKU	Korean Peninsula
WSC 18	CHOONCHAN LOCAL	South Korea
WSC 19	72-8-13	Taiwan
WSC 20	AI HUI	China
WSC 23	LIAOZA 1	China
WSC 24	BIG WHITE HULL	China
WSC 25	XIONG YUE 334	China
WSC 26	BATTANBAN	Cambodia
WSC 27	AS 5781 HUAN SA PHAUNG AH LPYSU 2	Myanmar
WSC 28	Y. E. (I. P.) INT. TYPE	India
WSC 29	KALJANPUR	India
WSC 30	SC NO.0217 CH1197	India
WSC 31	GOOSENECK	India
WSC 32	MARIANGARI JORA MUDDAHIHAL	India

WSC 33	DHOOTI ANEHULA	India
WSC 34	RABI YANGAR JORA MITHUGADUR	India
WSC 35	AS 4136 MASAKA LUWEMEA	India
WSC 36	COL/PAK/1989/IBPGR/2386(2)	Pakistan
WSC 37	COL/PAK/1991/IBPGR/2724(2)	Pakistan
WSC 38	COL/PAK/1989/IBPGR/2420(1)	Pakistan
WSC 39	COL/PAK/1989/IBPGR/2427(5)	Pakistan
WSC 40	COL/PAK/1989/IBPGR/2439(1)	Pakistan
WSC 41	COL/PAK/1989/IBPGR/2444(1)	Pakistan
WSC 42	COL/PAK/1989/IBPGR/2550(1)	Pakistan
WSC 43	COL/PAK/1989/IBPGR/2553(4)	Pakistan
WSC 44	COL/PAK/1989/IBPGR/2411(1)	Pakistan
WSC 45	COL/PAK/1989/IBPGR/2416(2)	Pakistan
WSC 46	COL/PAK/1989/IBPGR/2592(7)	Pakistan
WSC 47	87-9-21-3-1	Pakistan
WSC 48	87-9-21-3-2	Pakistan
WSC 49	PI 220636 Q 2/3/56	Afghanistan
WSC 50	PI 220636 Q 2/3/56	Afghanistan
WSC 51	ALLAKH	Bangladesh
WSC 52	EC 18868	Nepal
WSC 53	JUNELO	Nepal
WSC 54	PI 229486 VULGARE	Iran
WSC 55	HAZERA 6014	Israel
WSC 56	E 9	Chad
WSC 57	PI 282834	Chad
WSC 58	E 17	Chad
WSC 59	MAKHOTLONG I	Lesotho
WSC 60	TENANT WHITE	Lesotho
WSC 61	NYAKASOBA BEST	Lesotho
WSC 62	AIT BRAHIM	Morocco
WSC 63	CODY	Morocco
WSC 64	KOURNIANIA	Morocco

WSC 65	PHATSAI	Morocco
WSC 66	SCHROCK	Morocco
WSC 67	ESHOME	South Africa
WSC 68	E 232 INGWARUMA PEARLY	South Africa
WSC 69	AW 70/12 DL/59/1532	South Africa
WSC 70	E 233 BARNARD RED	South Africa
WSC 71	RED KAFIR	South Africa
WSC 72	S.BASUTORUM DL/60/97	South Africa
WSC 73	EAR FROM PIETESBURG DL/60/107	South Africa
WSC 74	MILO PET. 139/51 EX TANGANYIKA	Central African
WSC 75	HEGARI MALOWAR	Sudan
WSC 76	143 DINDERAWI 1	Sudan
WSC 77	REDBINE 655	Sudan
WSC 78	E 1089	Sudan
WSC 79	LAMBAS	Sudan
WSC 80	DINDERAWI 1	Sudan
WSC 81	240 WAD UMM BENEIN	Sudan
WSC 82	MUGBASH WHITE	Sudan
WSC 83	B-112	Sudan
WSC 84	E 1091	Sudan
WSC 85	109 TONJI	Sudan
WSC 86	ZA113 DAWA PAS PARA	Nigeria
WSC 87	AS 4547 JARDIRA	Nigeria
WSC 88	MN 1277 MUHEYAR	Nigeria
WSC 89	KA 24	Nigeria
WSC 90	MN 401	Algeria
WSC 91	S. VULGARE 72-726-7	Uganda
WSC 92	S. VULGARE 72-728-1	Uganda
WSC 93	E 276 FRAMIDA	Uganda
WSC 94	UGANDA L 1	Uganda
WSC 95	MORABA 74	Ethiopia
WSC 96	THIBA RED	Ethiopia

WSC 97	SC 112	Ethiopia
WSC 98	GIZA 3/59	Ethiopia
WSC 99	PI 329762	Ethiopia
WSC 100	AKLMOI WHITE	Kenya
WSC 101	E 959	Kenya
WSC 102	PI 152748 C	Kenya
WSC 103	WAD YABOO 132/53	Zimbabwe
WSC 104	CAPE COLO 28/53	Zimbabwe
WSC 105	TSETA LOCAL NATURE TYPE 27/51	Zimbabwe
WSC 106	AS 4637 NHORONGO NENPI	Tanzania
WSC 107	E 37	Tanzania

*農業・食品産業技術総合研究機構のジーンバンクの ID。ジーンバンクで保有している世界各地のソルガム約 3,500 点から SSR 多型解析により対立遺伝子の多様性を 90%以上カバーする 107 品種。

根滲出液の SL 分析

バーミキュライトを詰めたポット（直径 10 cm）にソルガムを 5 個体植え、明所（ $265 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）16 時間（ $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ）：暗所 8 時間（ $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ）のチャンバー内で 10 日間栽培した。1 ポットあたり 200 ml の水を上からかけ流し、ポットの下から滲出液を回収した。回収した水を 200 ml の酢酸エチルで分配し、硫酸ナトリウムで脱水した後、減圧濃縮した。LC-MS/MS（QTRAP 5500; AB Sciex, USA）を用いて SL を分析した(Abe *et al.*, 2014; Yoneyama *et al.*, 2018a)。UHPLC と Mass Spectrometer の設定を以下に示す。多重反応モニタリング（multiple reaction monitoring, MRM）の設定チャンネルを表 3 に示す。

 ・UHPLC の設定

UHPLC	Nexera X2 (Shimazu)
Column	Kinetex C18, ϕ 2.1×50 mm, 1.7 μ m (Phenomenex)
Column oven temperature	30°C
Mobile phase	Solvent A: Water (0.1% acetic acid) Solvent B: Acetonitrile (0.1% acetic acid)
Linear gradient	35% B (0 min)- 95% B (20 min)
Flow rate	0.2 ml/min

 ・Mass Spectrometer の設定

Mass Spectrometer	QTRAP 5500 (AB Sciex)
Ion source: Temperature	400°C
Curtain gas	20 psi
CAD gas	7 psi
Ion source gas1	80 psi
Ion source gas2	70 psi
Ionspray Voltage	5,500 V (positive mode) -4,500 V (negative mode)
Declustering potential (DP)	60 V (positive mode) -60V (negative mode)
Entrance potential (EP)	10 V (positive mode) -10V (negative mode)
Collision cell exit potential (CXP)	15 V (positive mode) -15V (negative mode)

表3 MRM の分析条件

Compound	Transition type	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Collision energy (V)
4DO/5DS	Quantifier	331.15	97.00	30
	Qualifier 1	331.15	216.00	22
	Qualifier 2	331.15	234.00	15
Orobanchol	Quantifier	347.00	97.00	34
	Qualifier 1	347.00	205.00	26
	Qualifier 2	347.00	233.00	17
Sorgomol	Quantifier	347.00	233.00	17
	Qualifier 1	347.00	317.00	10
	Qualifier 2	347.00	97.00	36

根寄生植物の種子発芽活性試験

O. minor と *S. hermonthica* の種子を 0.1% Tween-20 を含む 1% 次亜塩素酸ナトリウムで 5 分間表面殺菌した。その後、滅菌した蒸留水で 10 回洗浄し、風乾させた。直径 9 cm のシャーレに濾紙を 2 枚敷き、4 ml の滅菌蒸留水で湿らせた後、ガラス繊維濾紙 (Whatman GF/A, UK) の直径 5 mm のディスクを濾紙の上に敷き詰めた。ディスク 1 枚あたり 20~40 粒の種子を播き、シャーレをパラフィルムで密封し、暗所 22 °C で 7 日間 (*O. minor*) または暗所 30 °C で 15 日間 (*S. hermonthica*) コンディショニングを行った (Yoneyama *et al.*, 2007)。濾紙を敷いた直径 5 cm のシャーレに Ramada と Tx430 の根滲出液 200 ml の抽出液から 6000 μ l、600 μ l、60 μ l、6 μ l 相当量を加え、風乾したあと 600 μ l の滅菌水を加えた。コンディショニング後の種子のディスクを 3 枚ずつ置き、シャーレをパラフィルムで密封し、暗所 22 °C で 4 日間 (*O. minor*) または暗所 30 °C で 3 日間 (*S. hermonthica*) インキュベートした後、発芽率を測定した。

PCR 分析

Phire Plant Direct PCR Master Mix (Thermo Scientific, USA) の Dilution Buffer 50 μ l に 10 日齢のソルガムの葉先 (約 2 mm²) を切り入れ、ペッスルホモジナイザーを使用して破碎した。遠心後の上清 1 μ l を鋳型に、表 4 のプライマーを使用して KOD FX Neo (TOYOBO, Japan) で PCR 増幅を行った。PCR 産物を 0.8 % アガロースゲル (Agarose L03, TaKaRa Bio, Japan) で電気泳動し、臭化エチジウムで染色した。*LGS1* の非特異的な増幅産物は、FastGene Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics, Japan) によりゲル抽出を行い、Ex Taq HS (TaKaRa Bio, Japan) で PCR 増幅を行ったあと、PCR 産物を pCR4-TOPO (Invitrogen, USA) に挿入し、シーケンス解析を行った。

PCR 溶液

ゲノム DNA 溶液	1 μ l
2 x PCR Buffer for KOD FX Neo	25 μ l
2 mM dNTPs	10 μ l
10 μ M プライマー-F	1 μ l
10 μ M プライマー-R	1 μ l
滅菌水	11 μ l
KOD FX Neo	1 μ l

反応条件

98 °C 2 分、【98 °C 10 秒、55 °C 30 秒、68 °C 1 分 30 秒】 x 30 サイクル、68 °C 7 分、16 °C

表4 ゲノム PCR に使用したプライマー配列

Primer name	5' to 3' sequence
<i>Sobic.005G213300</i>	
5G213300-F1	ACAGAGGTAGGAACAAGTCAAC
5G213300-R1	ATCACTCCTCTATGCATCTGAAG
<i>Sobic.005G213400</i>	
5G213400-F1	TTTCTGATAGAGAGAGCGTTGAG
5G213400-R1	ACTGTACCAATTCCGACAAGAG
<i>Sobic.005G213500</i>	
SbSRG1-F1	CAAACGCTAGCTCCCAAG
SbSRG1-R1	TTTCTTTTGCATAGAAACATCAC
<i>Sobic.005G213600 (LGS1)</i>	
SbLGS1-F3	GACGTACGTTTACAGTGCCTC
SbLGS1-R1	CTCGATACATGCATGGTCAC
<i>Sobic.005G213700</i>	
5G213700-F1	AAGCAGCAGAGATAGATCGAG
5G213700-R1	TCACTCTAGCTAGCATAGCAG
<i>Sobic.005G213766</i>	
5G213766-F1	AGTAGCTCTGCTAAACAGACTC
5G213766-R1	CGATCGATCACATTGTATGCAC
<i>Sobic.005G213832</i>	
5G213832-F1	ACAAAGTGTTAGAACCATGTCTC
5G213832-R1	TGATTTTGGACATCGACCAATG
<i>Sobic.005G213900</i>	
5G213900-F1	GAAACTTTCAGAGATGCCACAC
5G213900-R1	CAACATTACATGGAGGCAACAC

2-3 結果

Ramada からは主要な SL として 5DS が検出され、さらに sorgomol が少量検出されたが、orobanchol は検出されなかった (図 6)。Tx430 においては、Ramada における 5DS の量に相当する orobanchol が検出されたが、5DS は検出されなかった (図 6、図 7)。Orobanchol と sorgomol は異性体であるため、同じ分子量でほとんど同じ保持時間に検出されるが、特徴的なプロダクトイオン (orobanchol: 347>205、sorgomol: 347>317) により識別した (図 6)。Tx430 は 5DS の生産能が失われているため、ストライガ耐性品種の形質をもつと考えられるが、これまでにそのような報告はなされていなかった (Mohemed *et al.*, 2018)。そこで、*S. hermonthica* と *O. minor* の種子に対する Tx430 と Ramada の根滲出液の発芽刺激活性を調べた。その結果、Tx430 の根滲出液は *S. hermonthica* に対する発芽刺激活性が Ramada の根滲出液と比較して約 1000 倍低かった。一方、*O. minor* に対する発芽刺激活性は Ramada の根滲出液よりも高かった (図 8)。ソルガムは本来オロバンキの宿主ではないが、これらの発芽刺激活性の違いはストライガとオロバンキの宿主選択性を反映している (Fernández-Aparicio *et al.*, 2010; Nomura *et al.*, 2013)。

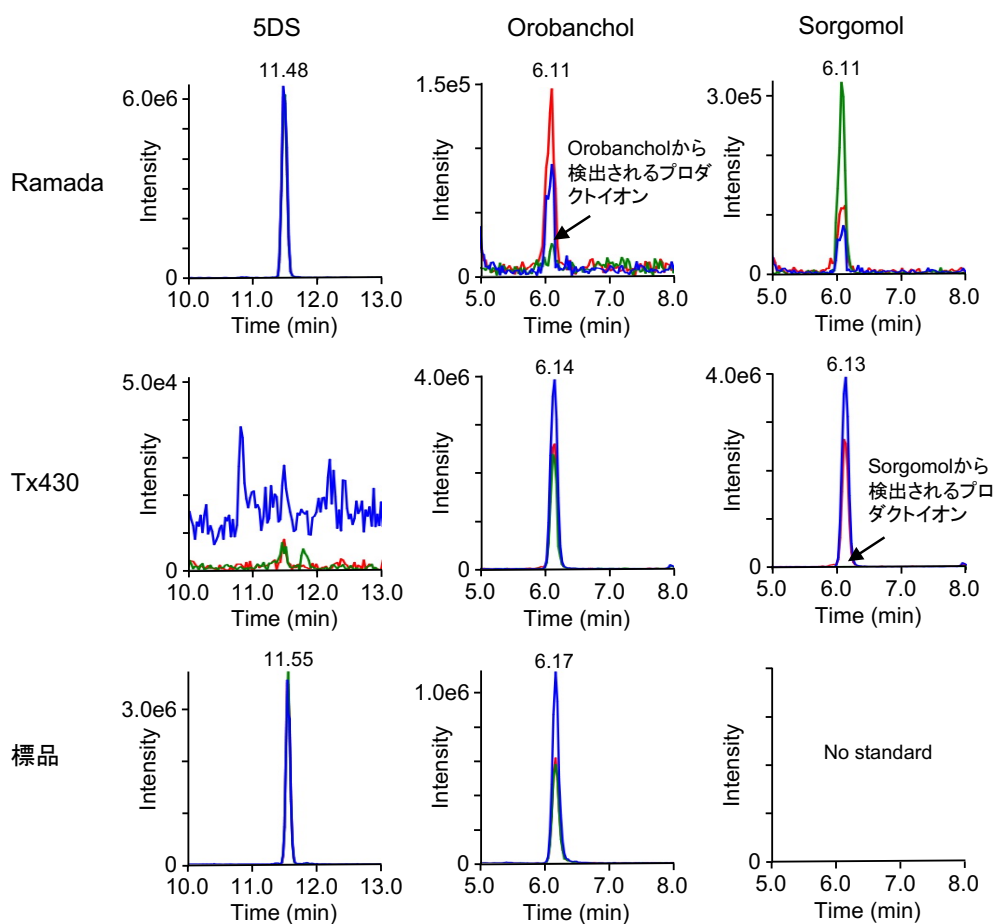


図6：RamadaとTx430の根滲出液における5-deoxystrigol (5DS)、orobanchol、sorgomolの分析

LC-MS/MSによる多重反応モニタリング (MRM) のクロマトグラムを示す。Orobancholと sorgomolは異性体であるためプロダクトイオンが類似しているが、それぞれの特徴的なイオン (green) により識別が可能である。

5DS (blue, 331.10/97.00; red, 331.10/216.00; green, 331.10/234.00; m/z in positive mode)

Orobanchol (blue, 347.00/233.00; red, 347.00/97.00; green, 347.00/205.00; m/z in positive mode)

Sorgomol (blue, 347.00/233.00; red, 347.00/97.00; green, 347.00/317.00; m/z in positive mode)

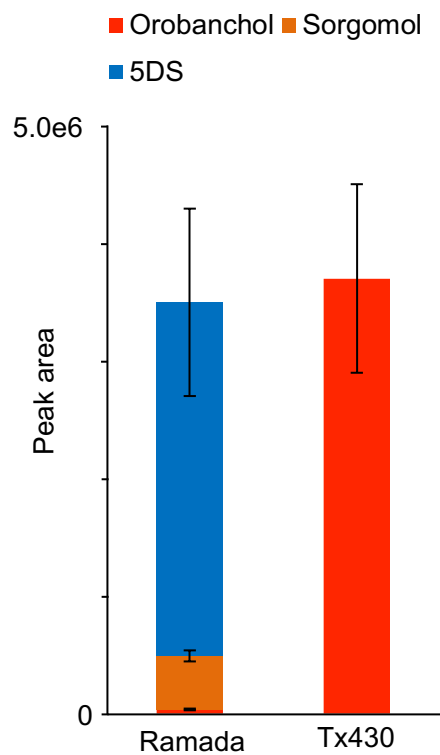


図7：RamadaとTx430の根滲出液におけるSLの割合

LC-MS/MSによるMRMのピーク面積値を示す。
 5-Deoxystigol (5DS) (331.15/97.00; *m/z* in positive mode)
 Orobanchol (347.00/205.00; *m/z* in positive mode)
 Sorgomol (347.00/317.00; *m/z* in positive mode)

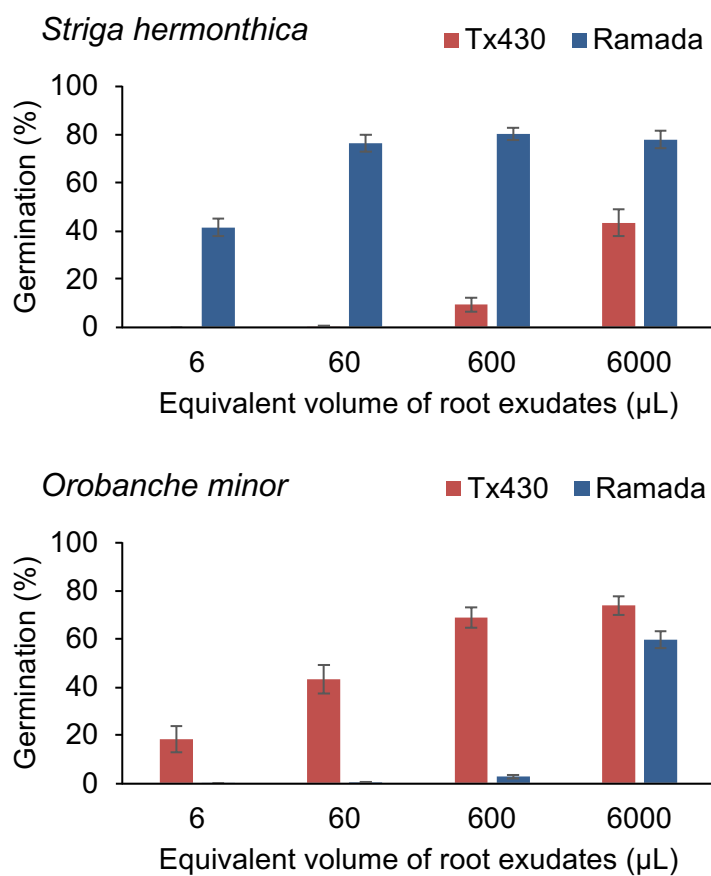


図8：RamadaとTx430の根滲出液の根寄生植物種子に対する発芽刺激活性

根滲出液を抽出し、*Striga hermonthica*と*Orobanche minor*の種子発芽刺激活性を調べた。平均値±SE (n = 9)。

Tx430 は5番、6番、7番染色体に大きな逆位を有することが知られている(Deschamps *et al.*, 2018)。そのため、5番染色体上にある *LGS1* 遺伝子が Tx430 において欠損している可能性が考えられた(Gobena *et al.*, 2017; Bellis *et al.*, 2020)。そこで PCR を用いて Tx430 と Ramada のゲノム DNA における *LGS1* 遺伝子およびその近傍の遺伝子の増幅を行なった。その結果、Tx430 において *Sobic.005G213600* (*LGS1*) は増幅しなかった(図9)。近傍の遺伝子については、*Sobic.005G213400* と *Sobic.005G213500* が増幅せず、*Sobic.005G213700*、*Sobic.005G213766* と *Sobic.005G213832* は増幅した。これらの結果から、Tx430 はこれまでに報告されているストライガ耐性ソルガム 555 (*lgs1-2*) と同様の染色体欠損を有していると考えられた(Gobena *et al.*, 2017)。Tx430 はストライガ耐性を目的に作出された品種ではない。Tx430 は米国テキサス A&M 大学で育種された品種であるが、他にも *LGS1* 遺伝子を欠損する品種が存在するのか、日本で入手可能な Tx 品種 18 種における *LGS1* 遺伝子の保存性を調べた。その結果、他の Tx 品種において *LGS1* 遺伝子は欠損していなかった。

次に、同様の方法でアジアとアフリカのソルガムについて対立遺伝子の多様性を 90%以上カバーする代表的な 107 系統についても調べた(Shehzad *et al.*, 2009)。その結果、アフリカの E9、E1091 と E276 FRAMIDA において *LGS1* の増幅は見られず、非特異的な増幅が観察された(図9)。シーケンス解析により、それらの非特異的な増幅産物は *Sobic.006G147200* の 5'末端と Tat レトロトランスポゾン遺伝子に由来することを確認した。さらに *Sobic.005G213500*、*Sobic.005G213700*、*Sobic.005G213766* と *Sobic.005G213832* は、3 品種において増幅しなかった(図9)。それら 3 品種はこれまでに報告されているストライガ耐性ソルガム SRN39 (*lgs1-1*) と同様の染色体欠損を有していると考えられた(Gobena *et al.*, 2017)。さらに、E9、E1091 と E276 FRAMIDA の根滲出液における SL を分析した結果、それら 3 品種は 5DS ではなく orobanchol を主要な SL として生産しており、*lgs1* 変異体であることを明らかにした(図10)。

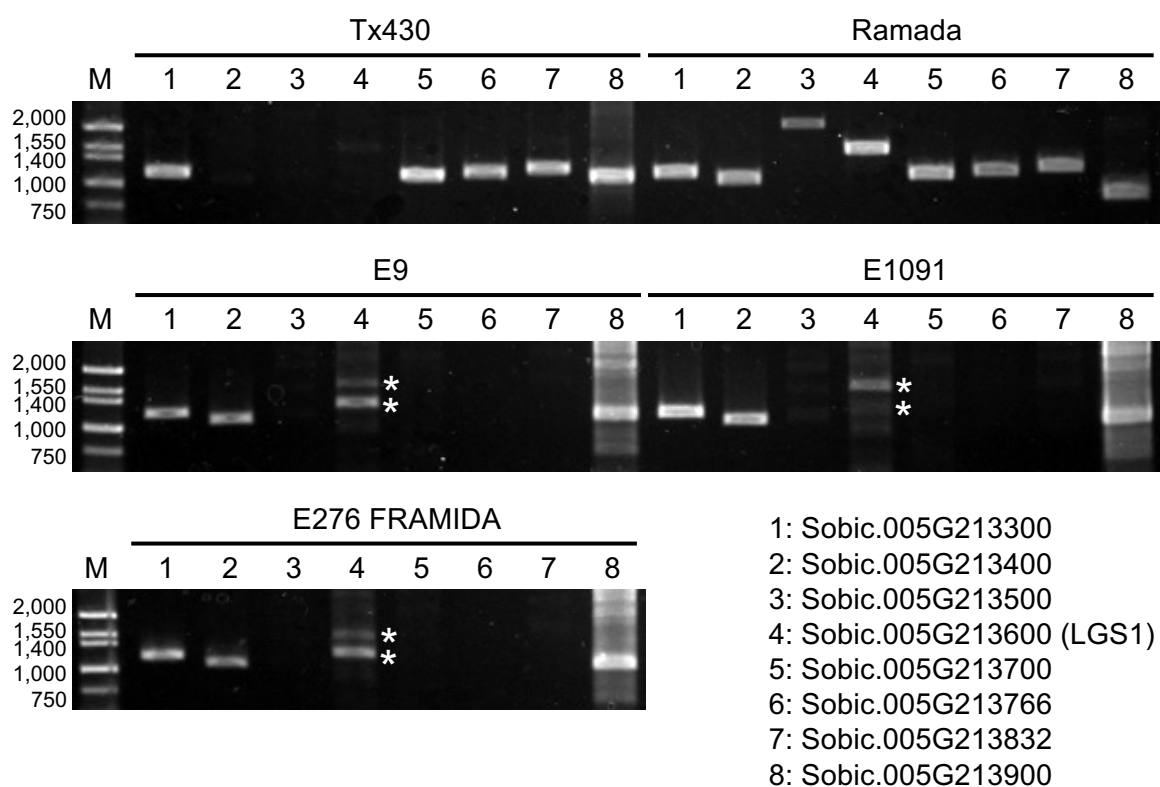


図9：各ソルガム品種における*LGS1*とその近傍の遺伝子のPCR解析

Tx430とRamada、コアコレクション (E9 [WSC56], E1091 [WSC84], E276 FRAMIDA [WSC93]) からゲノムDNAを抽出し、表3に示したプライマーでPCRを行った。*LGS1*における非特異的なPCR増幅産物をアスタリスクで示す。上の非特異的なバンドは*LGS1*のサイズに類似しているが、*Sobic.006G147200*の5'末端由来の増幅産物である。下の非特異的なバンドはTatレトロトランスポゾン遺伝子に由来する。

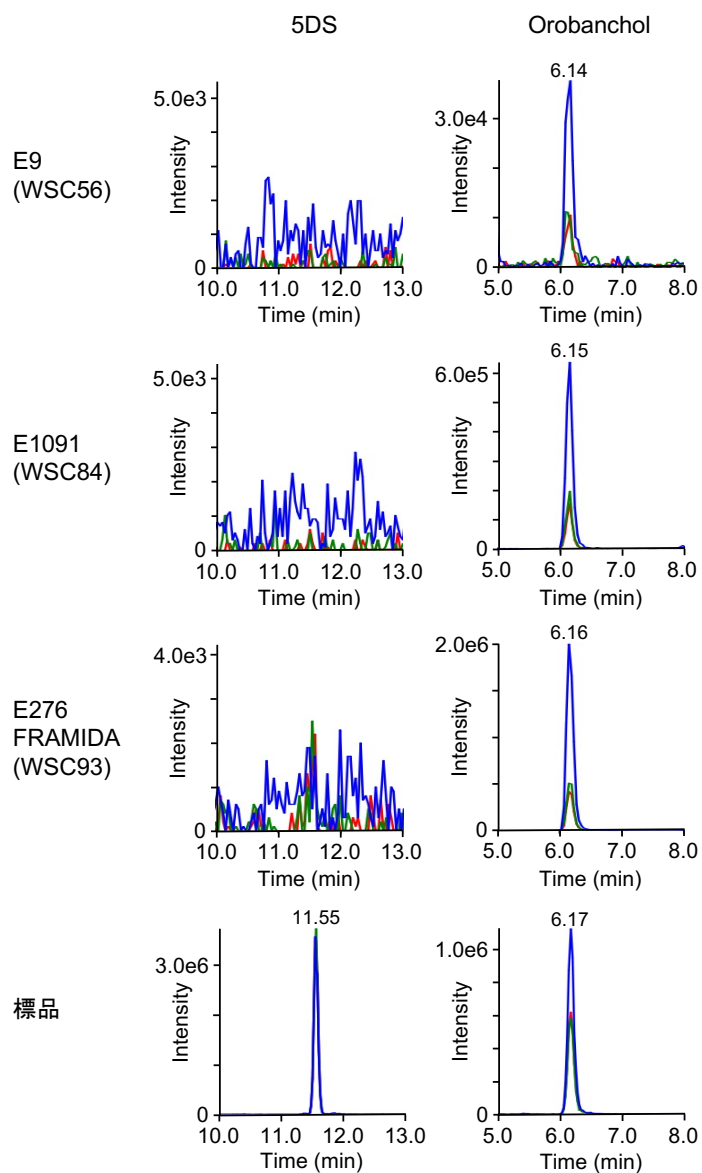


図10：ソルガムのコアコレクションの根滲出液における5-deoxystrigol (5DS) とorobancholの分析

LC-MS/MSによるMRMのクロマトグラムを示す。

5DS (blue, 331.15/97.00; red, 331.15/216.00; green, 331.15/234.00; m/z in positive mode)

Orobanchol (blue, 347.00/233.00; red, 347.00/97.00; green, 347.00/205.00; m/z in positive mode)

2-4 考察

Tx430 は種子におけるタンニン含量が低く、比較的形質転換効率が高い半矮性品種であるため、ソルガムの改良に有用な品種である(Liu & Godwin, 2012; Sato-Izawa *et al.*, 2018)。本研究は Tx430 が *LGS1* 遺伝子を欠損しており、その結果、生産する主要な SL が 5DS から orobanchol に変わっていることを明らかにした。Tx430 の根滲出液は *S. hermonthica* に対して弱い発芽活性を示し、Tx430 が他の *lgs1* 欠損の品種と同様に圃場においてストライガ耐性を有していることが示唆された。Tx430 はテキサス A&M 大学においてアフリカ由来品種の交配により育種された自殖系統である(Miller, 1984)。本研究で調査した他の Tx 系統には *LGS1* の欠損は見られなかった。ソルガムのコアコレクションの 107 系統のうち、3 つの品種において *LGS1* の欠損がみられ、それらは全てアフリカ由来であった。ソルガムの *LGS1* の機能欠損はストライガに汚染されたアフリカに広く保存されており、地理的に *S. hermonthica* の発生と関連していることが報告されている (Bellis *et al.*, 2020)。本研究において発見した Tx430 を含む 4 つの *lgs1* 変異体では、*LGS1* 周辺のいくつかの遺伝子も欠損しており、どの遺伝子が SL 生合成に関係しているかは明らかにできていない。しかし、ゲノム編集により *LGS1* 遺伝子のみの欠損をもつソルガムが作出されており、orobanchol 生産体への転換とストライガ耐性が引き起こされることがすでに証明されている(Bellis *et al.*, 2020)。したがって、本研究で発見した 4 品種における SL 生合成の変化は *LGS1* 遺伝子の欠損によるものだと考えられる。ソルガムにおいて *LGS1* 遺伝子の欠損は SL 欠乏を引き起こさず、生産する SL を 5DS から orobanchol に変える。Orobanchol はストライガ種子に対する発芽刺激活性が 5DS と比べて弱いため、*lgs1* 変異体はストライガ耐性となる。一方で、orobanchol は 5DS と比較して強い AM 菌の菌糸分岐誘導活性を有するため(Akiyama *et al.*, 2010)、*lgs1* 変異体において AM 菌との共生は維持される(Gobena *et al.*, 2017)。これらの特徴は *LGS1* への変異導入がストライガ耐性ソルガムの作出に有用であることを示している。形質転換効率の高い Tx430 を用いたゲノム編集はストライガ耐性に加えて、有益な形質をソルガムに与えるスタック品種の作出に有効である。

第3章 LGS1 酵素の候補基質とその生合成酵素 MAX1 の解析

3-1 諸論

LGS1 遺伝子は硫酸基転移酵素に類似したタンパク質をコードしている(Gobena *et al.*, 2017)。一般的に硫酸基転移酵素は 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) を硫酸基の供与体として基質の水酸基に硫酸基を転移するため(Hirschmann *et al.*, 2014)、LGS1 の基質は水酸化 CL もしくは水酸化 CLA である可能性が考えられた。シロイヌナズナからは水酸化 CL である 3-hydroxycaractone (3-OH-CL)や 4-OH-CL、16-OH-CL、水酸化 CLA である 3-hydroxycaractonoic acid (3-OH-CLA)や 4-OH-CLA、16-OH-CLA が検出されることが報告されている(Yoneyama *et al.*, 2020)。また、イネにおいて 5DS のジアステレオマーである 4DO は 18-OH-CLA を経て生合成されることが報告されている(Zhang *et al.*, 2014; Yoneyama *et al.*, 2018a)。そこで水酸化 CL や水酸化 CLA がソルガムの *lgs1* 変異体において蓄積しているかを調べた。その結果、18-OH-CLA が *lgs1* 変異体の根浸出液において蓄積していることが明らかになった。18-OH-CLA はシトクロム P450 酵素 CYP711A/MAX1 のイネにおける 5つのホモログの1つである Os900 (CYP711A2, Os01g0700900) による CL から 4DO への変換の中間体として検出されている(Yoneyama *et al.*, 2018a)。ソルガムはイネ科 (*Poaceae*) に属するため、ソルガムにおいても 18-OH-CLA は CYP711A によって生成されると推測した。ソルガムのゲノムには CYP711A 遺伝子が4つあり、それぞれを *SbMAX1a*、*SbMAX1b*、*SbMAX1c*、*SbMAX1d* と命名した(図 11)。*SbMAX1a* (SbCYP711A31, Sobic.003G269500) は、大腸菌を用いた機能解析により、CL から CLA への変換を触媒することが報告されている(Wakabayashi *et al.*, 2021a)。本研究では、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用いたタンパク質発現系を使用して(Abe *et al.*, 2014; Yoneyama *et al.*, 2018a)、4つの *SbMAX1* の機能解析を行った。

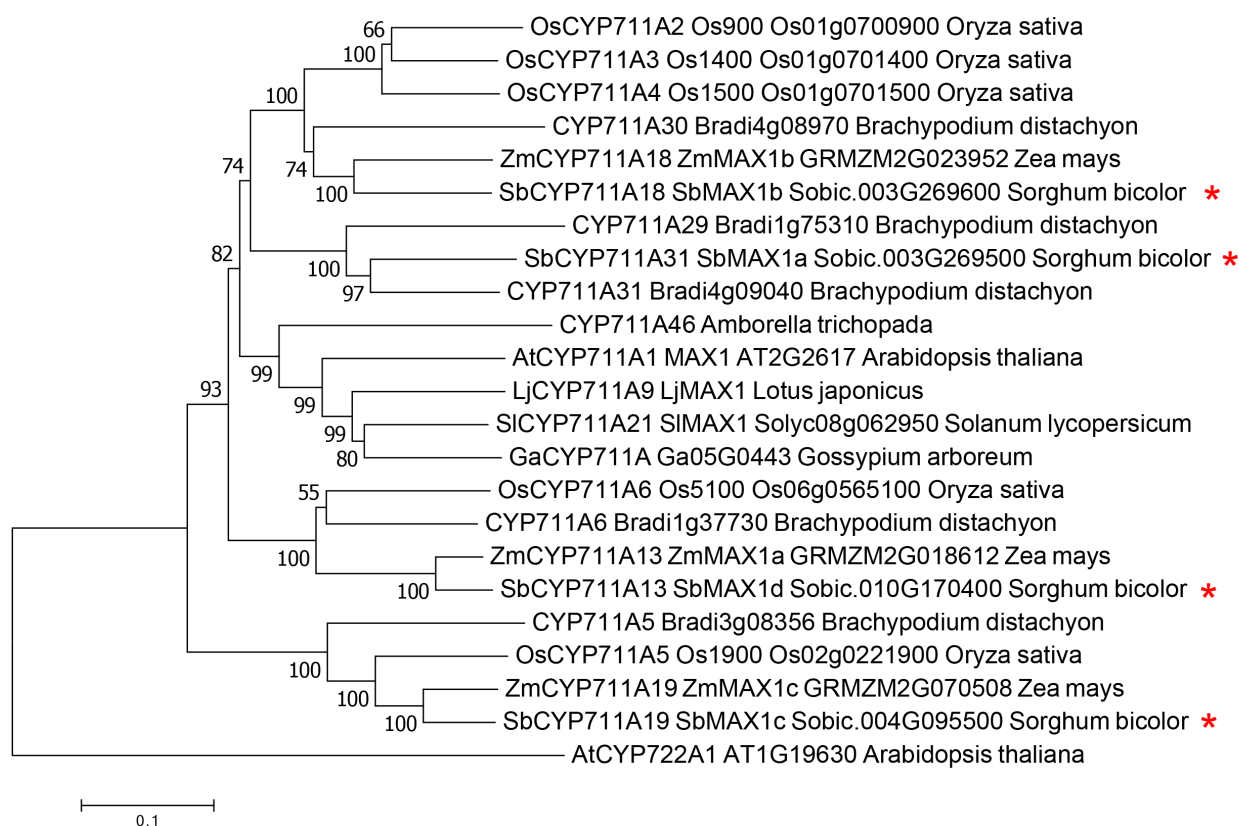


図11 : CYP711 (MAX1) の分子系統樹

シロイヌナズナ、トマト、ワタ、ミヤコグサ、アンボレラ、イネ、トウモロコシ、ミナトカモジグサのCYP711Aファミリーのアミノ酸配列は以前の論文(Yoneyama *et al.* 2018a) とPhytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/>) から得た。アスタリスクは本研究で調べたソルガムの配列を示す。MEGA7 (Kumar *et al.* 2016)を用いて近隣結合法 (bootstrap test: 1000 replicates, *p*-distance) により作成した。スケールバーは相違するアミノ酸配列の比率を示す。

3-2 材料・方法

根滲出液の SL 分析

第2章と同様に根滲出液を抽出し、LC-MS/MS (QTRAP 5500; AB Sciex, USA) を用いて SL を分析した。MRM の設定チャンネルを表5に示す。

表5 MRM の分析条件

Compound	Transition type	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy (V)
OH-CL	Quantifier	301.00	97.00	35
	Qualifier 1	319.00	205.00	10
	Qualifier 2	301.00	148.00	25
	Qualifier 3	301.00	189.00	30
CLA	Quantifier	331.10	113.00	-15
	Qualifier 1	331.10	69.00	-40
18-OH-CLA	Quantifier	347.00	113.00	-15
	Qualifier 1	347.00	69.00	-40
4DO/5DS	Quantifier	331.15	97.00	30
	Qualifier 1	331.15	216.00	22
	Qualifier 2	331.15	234.00	15

化合物

本研究に使用した *rac*-CL, *rac*-CLA および *rac*-18-OH-CLA の標品は大阪府立大学大学院生命科学研究所の秋山康紀教授からご提供いただいた。

cDNA のクローニング

RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) を用いて 10 日齢のソルガム (Ramada) から Total RNA

を抽出し、SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, USA) で一本鎖 cDNA に逆転写した。表 6 に記載したプライマーを使用して PrimeSTAR HS DNA polymerase with GC Buffer (TaKaRa Bio, Japan) で PCR 増幅を行った。クローニングした配列は DDBJ (DNA Data Bank of Japan) に登録した。アクセッション番号：LC422681 (SbMAX1a/CYP711A31, Sobic.003G269500)、LC422682 (SbMAX1b/CYP711A18, Sobic.003G269600)、LC422683 (SbMAX1c/CYP711A19, Sobic.004G095500)、LC422685 (SbMAX1d/CYP711A13, Sobic.010G170400)

表 6 *SbMAX1s* のクローニングに使用したプライマー配列

Primer name	5' to 3' sequence
<i>SbMAX1a for pYeDP60</i>	
SbMAX1a-F1 (1st PCR)	AATCACGAACCGATCGAGAC
SbMAX1a-R1 (1st PCR)	CGTGCATCAGTTTTTCCTCTC
BamHI-SbMAX1a-F	CTAAATTACCGATCATGGGGTGGGGAGAAATC
KpnI-SbMAX1a-R	GCGAATTCGAGCTCGTCAGTTTTTCCTCTCGATGAC
<i>SbMAX1b for pYeDP60</i>	
SbMAX1b-F1 (1st PCR)	CAAAGCAAGGGCGTGTATG
SbMAX1b-R1 (1st PCR)	CCTCTTAATAAAAGCAGTCCATCC
BamHI-SbMAX1b-F	CTAAATTACCGATCATGGAGATGGGCACGGTTC
KpnI-SbMAX1b-R	GCGAATTCGAGCTCGTTAATTATTTCCACATGCCTCTTG
<i>SbMAX1c for pYeDP60</i>	
SbMAX1c-F1 (1st PCR)	CAGTGTCCAAAGCTTCTCTC
SbMAX1c-R1 (1st PCR)	ATGCAGTTCCACACGTGAC
BamHI-SbMAX1c-F	CTAAATTACCGATCATGGAGATTGCACTCACAGTTAG
KpnI-SbMAX1c-R	GCGAATTCGAGCTCGTCAGCTTCTCCTGATGGC
<i>SbMAX1d for pYeDP60</i>	
SbMAX1d-F1 (1st PCR)	ACCTAGGACGAAGAAGCTG
SbMAX1d-R1 (1st PCR)	TTACCATCCGTCCGTACAC
BamHI-SbMAX1d-F	CTAAATTACCGATCATGGAGATGGCAGGCG
KpnI-SbMAX1d-R	GCGAATTCGAGCTCGCTACGACATGGCAGCG

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) における異種発現

ガラクトース誘導性の *GAL10-CYCI* プロモーターにより制御される pYeDP60 を発現ベクターとして使用し、シロイヌナズナの NADPH-P450 還元酵素 (ATR1) が同プロモーター下でゲノムに挿入された酵母 WAT11 株を形質転換に使用した(Pompon *et al.*, 1996)。SbMAX1s の完全長 cDNA を GeneArt Seamless Cloning and Assembly Enzyme Mix (Invitrogen, USA) を用いて、pYeDP60 のマルチクローニングサイトの *BamH I* と *Kpn I* の間に挿入した。大腸菌 DH5 α に形質転換し、LB 培地 (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ampicillin) で培養したポジティブクローンからプラスミドを抽出した。シーケンス解析により配列を確認したプラスミドを Frozen-EZ Yeast Transformation II Kit (Zymo Research, USA) を用いて WAT11 に形質転換した(Pompon *et al.*, 1996)。形質転換した酵母を 10 ml の SGI 培地に接種し、30 $^{\circ}\text{C}$ 、180rpm で 25 時間培養した。20 ml の SLI 培地に SGI 培養液を 1 ml 加え、28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 rpm で 22 時間培養した。培養前後の OD₆₀₀ を測定し、増殖速度を計算した。培養時間 16 時間で OD₆₀₀ が 1 になるように SLI 培地 400 ml (1 L 容三角フラスコ) \times 4 本に培養液を加え、28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 rpm で 16 時間培養した。OD₆₀₀ を測定後、培養液を遠心用ボトルに移し、3,500 rpm で 5 分間遠心した。ペレットを酵母培養液 (16 時間培養後) の OD₆₀₀ が 1 に対して 6.6 ml 量の 0.1 M K-Pi Buffer で懸濁した後、1500 x g で 3 分間遠心した。沈殿を同量の 0.1 M K-Pi Buffer で再度懸濁し、圧力式細胞破碎装置 (EmulsiFlex-B15; Avestin Inc., Canada) を用いて 83 MPa で破碎した。4 $^{\circ}\text{C}$ 、10,000 x g で 5 分間遠心し、上清をローターP28S 用遠心管に移し、超遠心機 CP80NX (himac, Japan) を用いて 4 $^{\circ}\text{C}$ 、100,000 x g で 1 時間遠心した。上清を捨て、酵母培養液 (16 時間培養後) の OD₆₀₀ が 1 に対して 200 μl 量の 0.1 M K-Pi Buffer を加えた後、ペッスルで懸濁し、ミクロソーム画分を得た(Abe *et al.*, 2014; Yoneyama *et al.*, 2018a)。ミクロソーム溶液 (100 μl) に *rac*-CL (最終濃度 33 μM) と NADPH (最終濃度 500 μM) を加え、28 $^{\circ}\text{C}$ 1 時間反応させた。反応液を 200 μl の酢酸エチルで抽出し、硫酸ナトリウムで脱水した後、LC-MS/MS 分析を行った。

LB 培地

Bacto Tryptone	10 g
Bacto Yeast Extract	5 g
NaCl	10 g
Water	Up to 1 L

SGI 培地

Glucose	20 g
Yeast Nitrogen Base without Amino Acid	6.7 g
Bacto Casamino Acid	1 g
DL-Tryptophan	40 mg
Water	Up to 1 L

SLI 培地

Galactose	20 g
Yeast Nitrogen Base without Amino Acid	6.7 g
Bacto Casamino Acid	1 g
DL-Tryptophan	40 mg
Water	Up to 1 L

0.1 M K-Pi Buffer (pH 7.5)

1 M K ₂ HPO ₄	20 mL
1 M KH ₂ PO ₄	5 mL
Water	Up to 250 mL

3-3 結果

ソルガムの Ramada と Tx430、E1091 の根滲出物における水酸化 CL および水酸化 CLA を分析した結果、正常種である Ramada と比較して *lgs1* 変異体である Tx430 と E1091 の根滲出液において 18-OH-CLA の量が有意に増加していた (図 12、図 13)。一方、Ramada と *lgs1* 変異体の根の抽出物からは 18-OH-CLA は検出されなかった。

SbMAX1a を発現させた酵母のミクロソーム画分と *rac*-CL をインキュベートしたところ、CLA に加えて 18-OH-CLA が MRM チャンネルに検出された (図 14)。そのピークについてネガティブモードでプリカーサー (m/z 347 [M-H]⁻) のプロダクトイオンスキャンを行なった結果、18-OH-CLA の標品とマススペクトルが一致した (図 15)。イネの Os900 とは異なり 4DO は検出されなかった。*SbMAX1a* により生成された 18-OH-CLA の検出量は CLA の約 100 倍であり、18-OH-CLA が主な代謝産物であると考えられた (図 14)。酵母で発現させた *SbMAX1b*、*SbMAX1c*、*SbMAX1d* は *rac*-CL を基質に CLA を生成したが、18-OH-CLA と 4DO は検出されなかった (図 16)。

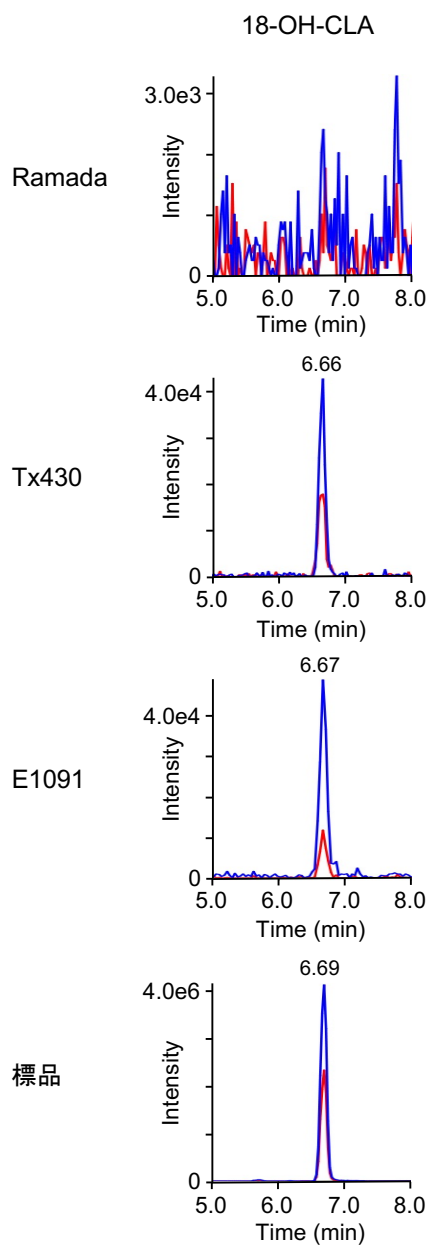


図12：各ソルガム品種の根滲出液における18-hydroxycaractonoic acid (18-OH-CLA) の分析

LC-MS/MSによるMRMのクロマトグラムを示す。

18-OH-CLA (blue, 347.00/113.00; red, 347.00/69.00; m/z in negative mode)

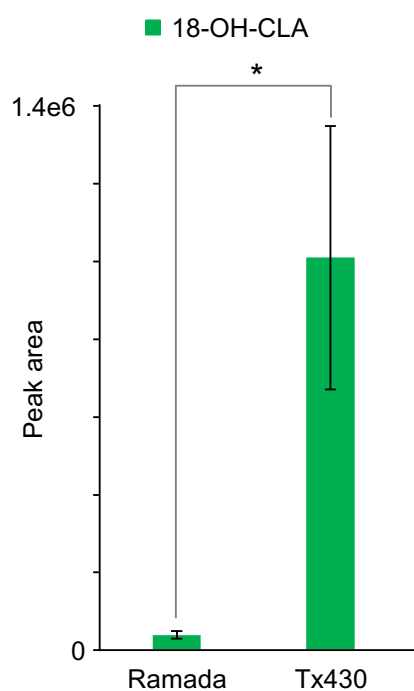


図13：RamadaとTx430の根滲出液における18-hydroxycaractonoic acid（18-OH-CLA）の検出量

LC-MS/MSによるMRMのピーク面積値を示す。

18-OH-CLA (347.00/113.00; m/z in negative mode)

*Student's t test, $p < 0.05$ ($n = 5$).

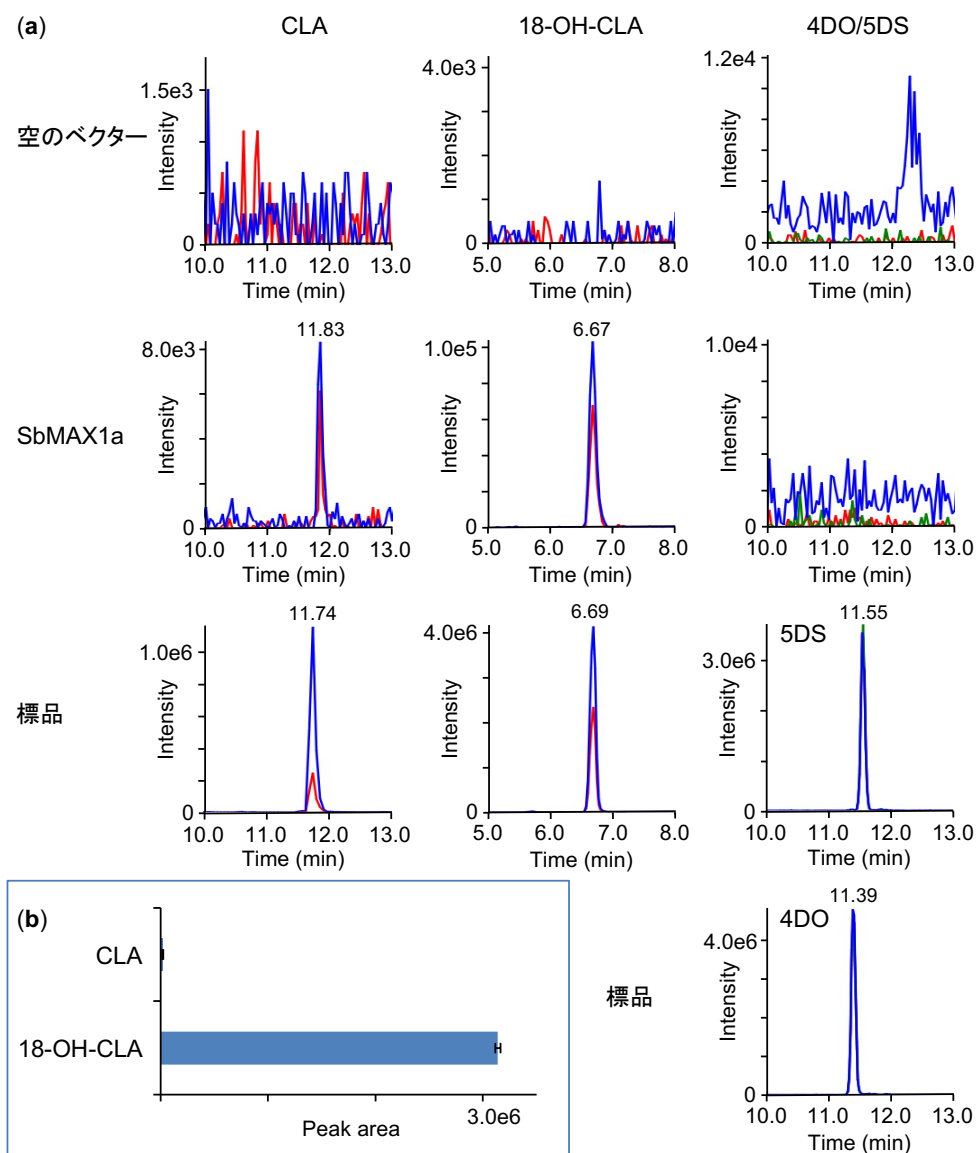


図14：酵母マイクロソームにおいて発現させたSbMAX1aのcarlactone (CL) 代謝実験

空のベクターを導入した酵母のマイクロソームをネガティブコントロールとして使用した。マイクロソーム画分を*rac*-CLとインキュベートし、抽出物をLC-MS/MSにより分析した。

(a) MRMのクロマトグラムを示す。4-Deoxyorobanchol (4DO)と5-deoxystrigol (5DS)は同じプロダクトイオンを示すジアステレオマーであるが、異なる保持時間に検出される。

Carlactonic acid (CLA) (blue, 331.10/113.00; red, 331.10/69.00; *m/z* in negative mode)

18-Hydroxycarlactonic acid (18-OH-CLA) (blue, 347.00/113.00; red, 347.00/69.00; *m/z* in negative mode)

4DO/5DS (blue, 331.15/97.00; red, 331.15/216.00; green, 331.15/234.00; *m/z* in positive mode)

(b) SbMAX1aを発現したマイクロソームにより生成された代謝産物の検出量。CLA (331.10/113.00)と18-OH-CLA (347.00/113.00)の面積値を示す。平均値± SE (n = 3)。

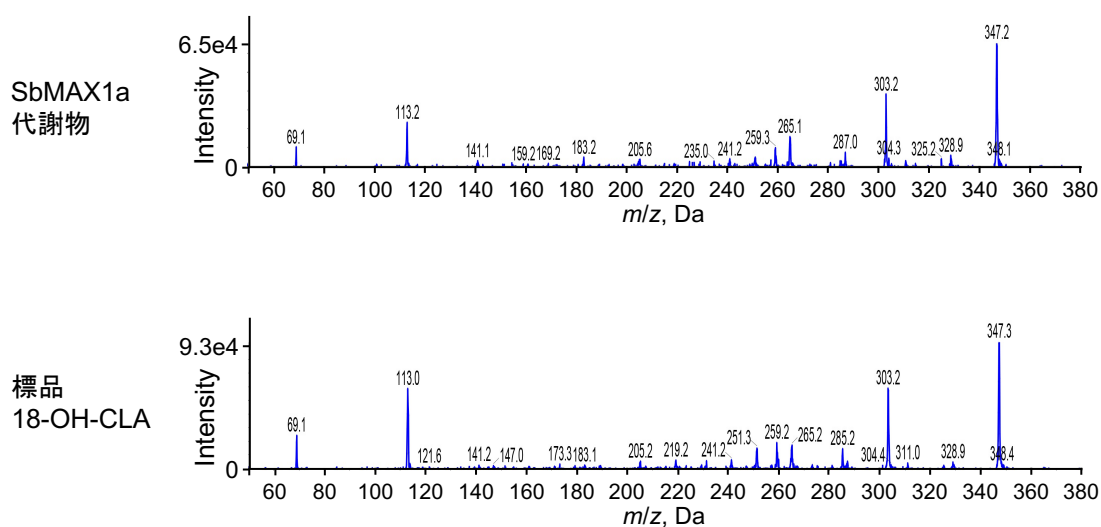


図15：SbMAX1aによるcarlactone (CL) 代謝物のプロダクトイオンスペクトル

SbMAX1aを発現させた酵母のマイクロソームによるCL代謝物 (Rt 6.69 min) と標品18-hydroxycarlactonic acid (18-OH-CLA) (Rt 6.66 min)をプロダクトイオンキャンモードにより分析した。プリカーサーイオン $[M-H]^-$ (m/z 347) から生成されたプロダクトイオンのマススペクトルを示す。

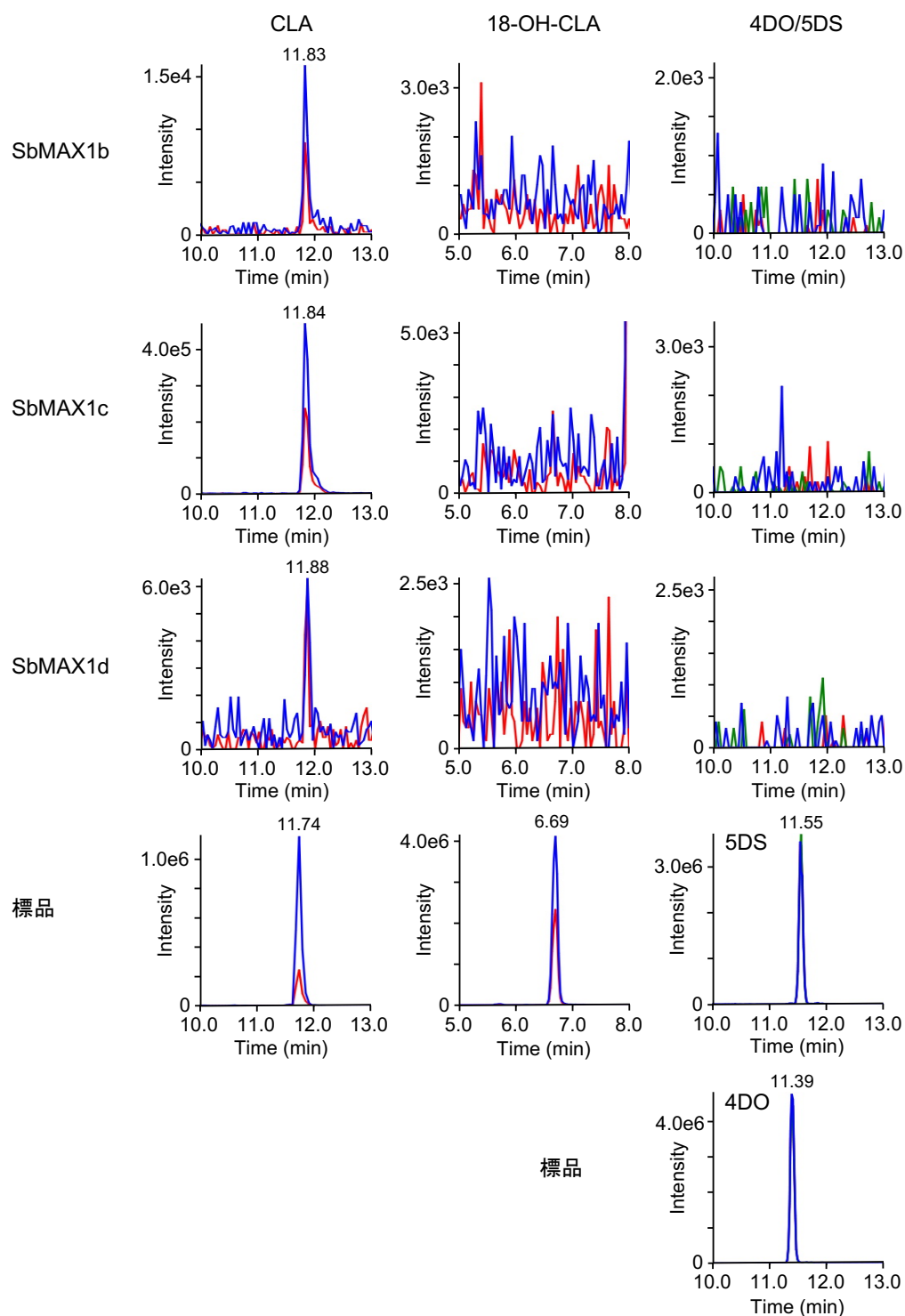


図16：酵母マイクロソームにおいて発現させたSbMAX1ホモログのcarlactone (CL) 代謝実験

各*SbMAX1*ホモログ遺伝子を酵母のマイクロソームにおいて発現させた。*rac*-CLとインキュベートし、抽出物をLC-MS/MSにより分析した。Carlactonic acid (CLA), 18-hydroxycarlactonic acid (18-OH-CLA), 4-deoxyrobanchol (4DO) / 5-deoxystrigol (5DS) のMRMのクロマトグラムを示す。

3-4 考察

lgs1 変異体である Tx430 と E1091 の根滲出液において 18-OH-CLA の量が有意に増加していたことから 18-OH-CLA が LGS1 酵素により硫酸基が付加される基質であると考えられた。しかし、Tx430 と E1091 の根の抽出物からは 18-OH-CLA が検出されなかった。内生として 18-OH-CLA が検出されなかった理由としては、18-OH-CLA が不安定であることや、*lgs1* 変異体の根において 18-OH-CLA が orobanchol の前駆体として使われて減少していることが考えられた。

ソルガムにおける 18-OH-CLA の生合成酵素は、イネの CYP711A ホモログである Os900 (CYP711A2, Os01g0700900) の酵素機能から推測したとおり、同じ CYP711A ファミリーに属するタンパク質であることを明らかにした。すなわち、酵母で発現させた 4 つのソルガムの CYP711A ホモログのうちの SbMAX1a が *rac*-CL から CLA を経て 18-OH-CLA を生成することを明らかにした。Os900 とは異なり、SbMAX1a は 4DO を生成しなかった。4DO はイネの主要な SL であるが、ソルガムの植物体や根滲出液から 4DO は検出されないため、SbMAX1a の酵素機能はそのことと矛盾しない。CYP711A の分子系統樹において (図 11)、Os900 と Os1400 (CYP711A3, Os01g0701400: 4DO から orobanchol への合成酵素)、Os1500 (CYP711A4, Os01g071500: C 末端欠損の偽遺伝子) と同じクレードに位置しているのは SbMAX1b であるが、SbMAX1b は *rac*-CL から CLA を生成したものの 18-OH-CLA や 4DO は生成しなかった。SbMAX1c と SbMAX1d は、CL から CLA への変換活性が弱いことが知られている Os1900 (CYP711A5, Os02g0221900) と Os5100 (CYP711A6, Os06g0565100) のそれぞれのオーソログであると考えられた(Yoneyama *et al.*, 2018a)。本研究において、SbMAX1c と SbMAX1d は *rac*-CL から CLA を生成することが確認されたが、SbMAX1c の CLA 生成能は SbMAX1b や SbMAX1d よりも高かった (図 16)。SbMAX1a のクレードにはイネとトウモロコシの遺伝子は存在しないが、他のイネ科植物であるミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) やコムギ (*Triticum aestivum*) においては保存されている。それらの酵素は SbMAX1a と同様に 18-OH-CLA を生成する機能を有している可能性がある。

第4章 LGS1 酵素の *in vivo* 機能解析

4-1 諸論

第3章において、LGS1の候補基質である18-OH-CLAをCLから生合成する酵素はSbMAX1aであることを明らかにした。CLはall-*trans*- β -caroteneからD27、CCD7、CCD8酵素により生合成されることが明らかにされている(図5)(Alder *et al.*, 2012)。そこで、ベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*)における一過的な発現システムを使用してソルガムにおける18-OH-CLAまでの生合成経路を再構築して、そこにLGS1も共発現させることでその機能を解析することにした。ベンサミアナタバコでのSL生合成遺伝子の共発現によるSL生合成経路の再構築は、これまでにイネやトマトにおけるMAX1ホモログの機能解析に利用されており、SL生合成の解析に有用な手法である(Zhang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2018)。

D27、CCD7、CCD8はソルガムにそれぞれ1コピーずつあり、*SbD27*、*SbCCD7*、*SbCCD8*と命名してクローニングした。4つのMAX1ホモログは第3章のプラスミドからサブクローニングした。シトクロムP450酵素であるMAX1(CYP711A)が機能するには、NADPHから電子をP450に伝達するNADPH-シトクロムP450還元酵素(NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase, CPR)が必要である。ソルガムには3つのCPRが存在するがそのうちの1つ*SbCPR1*をクローニングした。また、MAX1とは異なるシトクロムP450酵素であるCYP722Cは、ミヤコグサとワタではCLAから5DSへの変換を触媒し、トマトとササゲではCLAからorobancholへの変換に関与している(図5)(Wakabayashi *et al.*, 2019; Mori *et al.*, 2020; Wakabayashi *et al.*, 2020)。そこで、ソルガムの5DS生産や*lgs1*変異体でのorobanchol生産にCYP722酵素が関与しているか調べるため、ソルガムに存在するCYP722Bをクローニングした。それらに加えてLGS1をクローニングして、ベンサミアナタバコの葉においてアグロバクテリウム(*Agrobacterium tumefaciens*)を介したインフィルトレーション法(アグロインフィルトレーション法)により共発現させた。本研究ではタンパク質の高発現が期待されるジェミニウイルス由来の複製システムとダブルターミネーターを組み合わせた「つくばシステム」を使用した(Yamamoto *et al.*, 2018)。

4-2 材料・方法

cDNA のクローニング

第3章と同様に表7に記載したプライマーを使用してcDNAのクローニングを行った。*SbMAX1a*、*SbMAX1b*、*SbMAX1c*、*SbMAX1d*は第3章のプラスミドを鋳型にしてサブクローニングした。本研究でクローニングした配列はDDBJに登録した。アクセッション番号：LC422680 (*LGS1*, Sobic.005G213600)、LC556201 (*SbD27*, Sobic.005G168200)、LC556202 (*SbCCD7*, Sobic.006G170300)、LC556203 (*SbCCD8*, Sobic.003G293600)、LC556204 (*SbCPRI*, Sobic.006G245400)、LC556206 (*SbCYP722B*, Sobic.009G000700)

表7 ソルガム SL 生合成遺伝子のクローニングに使用したプライマー配列

Primer name	5' to 3' sequence
<i>LGS1 for pBYR2HS</i>	
SbLGS1-F3 (1st PCR)	GACGTACGTTTACAGTGCCTC
SbLGS1-R1 (1st PCR)	CTCGATACATGCATGGTCAC
SalI-SbLGS1-F	ACTGTTGATAGTCGAATGAACGTACAGGAGAGGAG
SalI-SbLGS1-R	ATTCAGAATTGTCGATTACACGGATATGGAGTCGGCAAAG
<i>SbMAX1a for pBYR2HS</i>	
SalI-SbMAX1a-F	ACTGTTGATAGTCGAATGGGGTGGGGAGAAATC
SalI-SbMAX1a-R	ATTCAGAATTGTCGATCAGTTTTTCCTCTCGATGAC
<i>SbMAX1b for pBYR2HS</i>	
SalI-SbMAX1b-F	ACTGTTGATAGTCGAATGGAGATGGGCACGGTTC
SalI-SbMAX1b-R	ATTCAGAATTGTCGATTAATTATTTCCACATGCCTCTTG
<i>SbMAX1c for pBYR2HS</i>	
SalI-SbMAX1c-F	ACTGTTGATAGTCGAATGGAGATTGCACTCACAGTTAG
SalI-SbMAX1c-R	ATTCAGAATTGTCGATCAGCTTCTCCTGATGGC
<i>SbMAX1d for pBYR2HS</i>	
SalI-SbMAX1d-F	ACTGTTGATAGTCGAATGGAGATGGCAGGCG
SalI-SbMAX1d-R	ATTCAGAATTGTCGACTACGACATGGCAGCG

SbD27 for pBYR2HS

SbD27-F1 (1st PCR)	TCACTCATCACTCGACGCAC
SbD27-R2 (1st PCR)	GGGAATAAACATGAAGGCATGG
SalI-SbD27-F	ACTGTTGATAGTCGAAGTTAACGGGAGACATGGAG
SalI-SbD27-R	ATTCAGAATTGTGCGAACATATCCTCTTCCTCTCAAATC

SbCCD7 for pBYR2HS

SbCCD7-F1 (1st PCR)	CAAGCTCCAAGCCTAGCAAC
SbCCD7-R1 (1st PCR)	GCAACCGATTGAAGAGTGAG
SalI-SbCCD7-F	ACTGTTGATAGTCGAATGTCTCAACACACCATTGC
SalI-SbCCD7-R	ATTCAGAATTGTGCGAGTCATTCATCTGCCAGAAC

SbCCD8 for pBYR2HS

SbCCD8-F1 (1st PCR)	GGTACTACAACCCTAGCAAGAG
SbCCD8-R1 (1st PCR)	ATGCCTATGTCTGGCAAGTC
SalI-SbCCD8-F	ACTGTTGATAGTCGAATGTCTCCACTATGGCTTC
SalI-SbCCD8-R	ATTCAGAATTGTGCGAGAACGATCTGCTAGTGCTAC

SbCPR1 for pBYR2HS

SbCPR1-F1 (1st PCR)	GCACTGGTTGTTGGTAGGTG
SbCPR1-R1 (1st PCR)	AATTCCACACGCTAGAAGCTATG
SalI-SbCPR1-F	ACTGTTGATAGTCGAAGGAAGCGAGCGACGATG
SalI-SbCPR1-R	ATTCAGAATTGTGCGATGTCACCATACATCACGGAG

SbCYP722B for pBYR2HS

Sb722B-F1 (1st PCR)	CTTGGATTGCCTGCCTTG
Sb722B-R1 (1st PCR)	GGTTGGAGCCGCTCTATAC
SalI-Sb722B-F	ACTGTTGATAGTCGAATGGACGACATGCACAG
SalI-Sb722B-R	ATTCAGAATTGTGCGATCATATGGGTGTGAGGTGAATG

植物材料

ベンサミアナタバコの種子は本研究室で繁殖したものを使用した(Yoneyama *et al.*, 2018a)。ベンサミアナタバコは培養土（スーパーミックス A, サカタのタネ）とバーミキュライトを 1:1 で混ぜた土に播種し、明所 ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 14 時間 : 暗所 10 時間、24 °C で栽培した。

ベンサミアナタバコにおける一過的発現

SL 生合成遺伝子の完全長 cDNA を GeneArt Seamless Cloning and Assembly Enzyme Mix (Invitrogen, USA) を用いて pBYR2HS (Yamamoto *et al.*, 2018) の *SalI* サイトに挿入した。大腸菌 DH5 α に形質転換し、LB 培地 ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$ kanamycin) で培養したポジティブクローンからプラスミドを抽出した。シーケンス解析により配列を確認したプラスミドをアグロバクテリウム GV3101 に形質転換し、10 ml の LB 培地 ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$ kanamycin) で 28 °C、180 rpm、16 時間培養した。2,000 x g で 10 分間遠心し、10 ml の滅菌水で 2 回洗浄した後、アグロバクテリウム懸濁液を OD₆₀₀ が 0.4 になるように滅菌水で希釈した。希釈したアグロバクテリウム懸濁液を混合し、5 週齢のベンサミアナタバコの葉にシリンジを用いて浸潤させた。感染 4 日後、アグロバクテリウムを感染させた葉を約 1 cm² に切り、1 g 新鮮重量の葉切片を 40 ml のアセトンに 4 °C で 2 日間浸けた。抽出液を濾過して減圧濃縮後、水性残渣に蒸留水を 1 ml 加えた。2 ml の酢酸エチルで 2 回抽出後、硫酸ナトリウムで脱水した。濾過して減圧濃縮後、1 ml の 2-プロパノールに溶解し、Bond Elut DEA cartridge column (100 mg; Agilent Technologies, USA) にチャージした。さらに 2 ml の 2-プロパノールで中性区を溶出し、その後 3 ml の 1% 酢酸 含 2-プロパノールで酸性区を溶出した。中性区は窒素ガスを吹き付けて風乾後、すぐに 1 ml のヘキサンに溶解して、Bond Elut SI cartridge column (100 mg; Agilent Technologies) にチャージした。10 mL のヘキサン : 酢酸エチル (9 : 1) で溶出した後、10 ml のヘキサン : 酢酸エチル (7 : 3) で SL 区を溶出した。溶出液を窒素ガスで濃縮し、LC-MS/MS 分析を行った。MRM の設定チャンネルを表 8 に示す。

表8 MRM の分析条件

Compound	Transition type	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Collision energy (V)
CL	Quantifier	303.00	97.00	30
	Qualifier 1	303.00	189.00	15
	Qualifier 2	303.00	207.00	15
CLA	Quantifier	331.10	113.00	-15
	Qualifier 1	331.10	69.00	-40
18-OH-CLA	Quantifier	347.00	113.00	-15
	Qualifier 1	347.00	69.00	-40
4DO/5DS	Quantifier	331.15	97.00	30
	Qualifier 1	331.15	216.00	22
	Qualifier 2	331.15	234.00	15
Orobanchol	Quantifier	347.00	97.00	34
	Qualifier 1	347.00	205.00	26
	Qualifier 2	347.00	233.00	17

4-3 結果

SL 生合成の上流で働く *D27*、*CCD7*、*CCD8* のソルガムのホモログである *SbD27*、*SbCCD7*、*SbCCD8* をベンサミアナタバコの葉において共発現させた結果、内生の β -カロテンから生成されたと考えられる SL 生合成中間体である CL が葉の抽出物から検出された (図 17)。ネガティブコントロールとして *EGFP* を発現させた葉からは CL は検出されなかった (図 17)。さらに、*SbMAX1a* と NADPH-シトクロム P450 還元酵素である *SbCPR1* を *SbD27*、*SbCCD7*、*SbCCD8* と共発現させた葉から CLA および 18-OH-CLA が検出された (図 18)。第 3 章の酵母を用いた機能解析の結果と同様に 4DO は検出されなかった。また *SbMAX1a* の代わりに *SbMAX1b*、*SbMAX1c*、*SbMAX1d* をそれぞれ同様に共発現させた結果、CLA が検出され、*SbMAX1b* と *SbMAX1d* においては 18-OH-CLA も検出された (図 19)。そして、*SbD27*、*SbCCD7*、*SbCCD8*、*SbCPR1*、*SbMAX1a* に *LGS1* を加えて共発現させると、5DS とそのジアステレオマーの 4DO が検出された (図 18)。*SbMAX1a* の代わりに *SbMAX1b* または *SbMAX1d* を *LGS1* と共発現した時も、少量の 5DS と 4DO が検出された (図 20)。

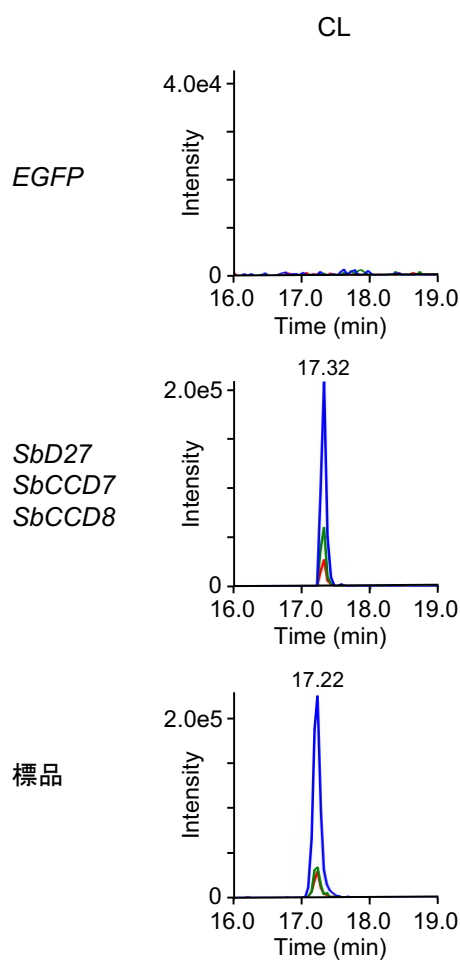


図17：ベンサミアナタバコにおけるソルガムのSL上流合成遺伝子の一過的発現による carlactone (CL) 生産

ソルガムの *SbD27* と *SbCCD7*、*SbCCD8* をアグロインフィルトレーション法を用いてベンサミアナタバコの葉において共発現させた。*EGFP* を発現させたものをネガティブコントロールとした。葉の抽出物をLC-MS/MS分析した。MRMのクロマトグラムを示す。
CL (blue, 303.00/97.00; red, 303.00/189.00; green, 303.00/207.00; *m/z* in positive mode)

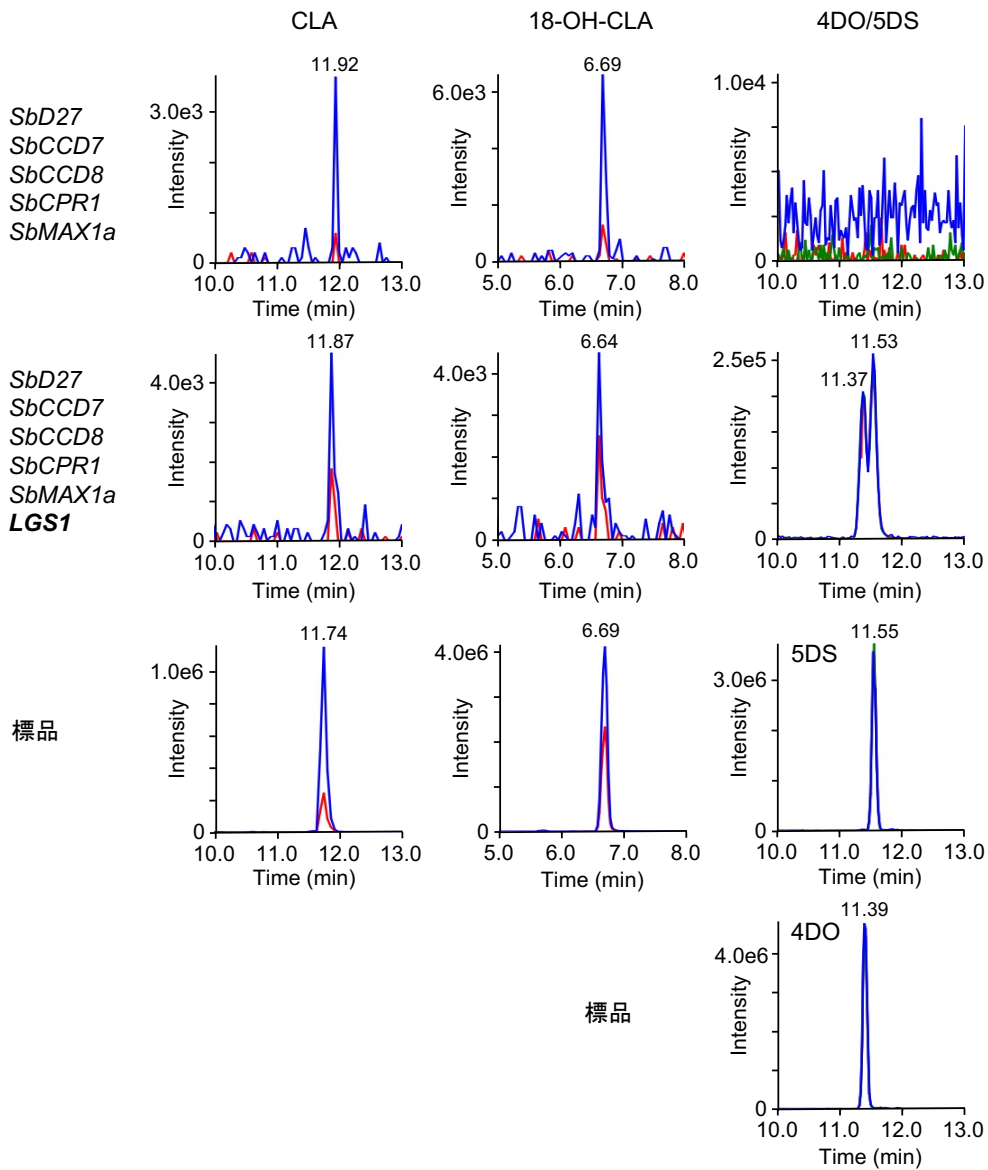


図18：ベンサミアナタバコにおける*SbMAX1a*と*LGS1*の一過的発現によるSL生産

アグロ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で共発現させたソルガムの遺伝子をクロマトグラムの上に示す。葉の抽出物をLC-MS/MSにより分析した。MRMのクロマトグラムを示す。

Carlactonic acid (CLA) (blue, 331.10/113.00; red, 331.10/69.00; *m/z* in negative mode)

18-Hydroxycarlactonic acid (18-OH-CLA) (blue, 347.00/113.00; red, 347.00/69.00; *m/z* in negative mode)

4-Deoxyorobanchol (4DO) / 5-deoxystrigol (5DS) (blue, 331.15/97.00; red, 331.15/216.00; green, 331.15/234.00; *m/z* in positive mode)

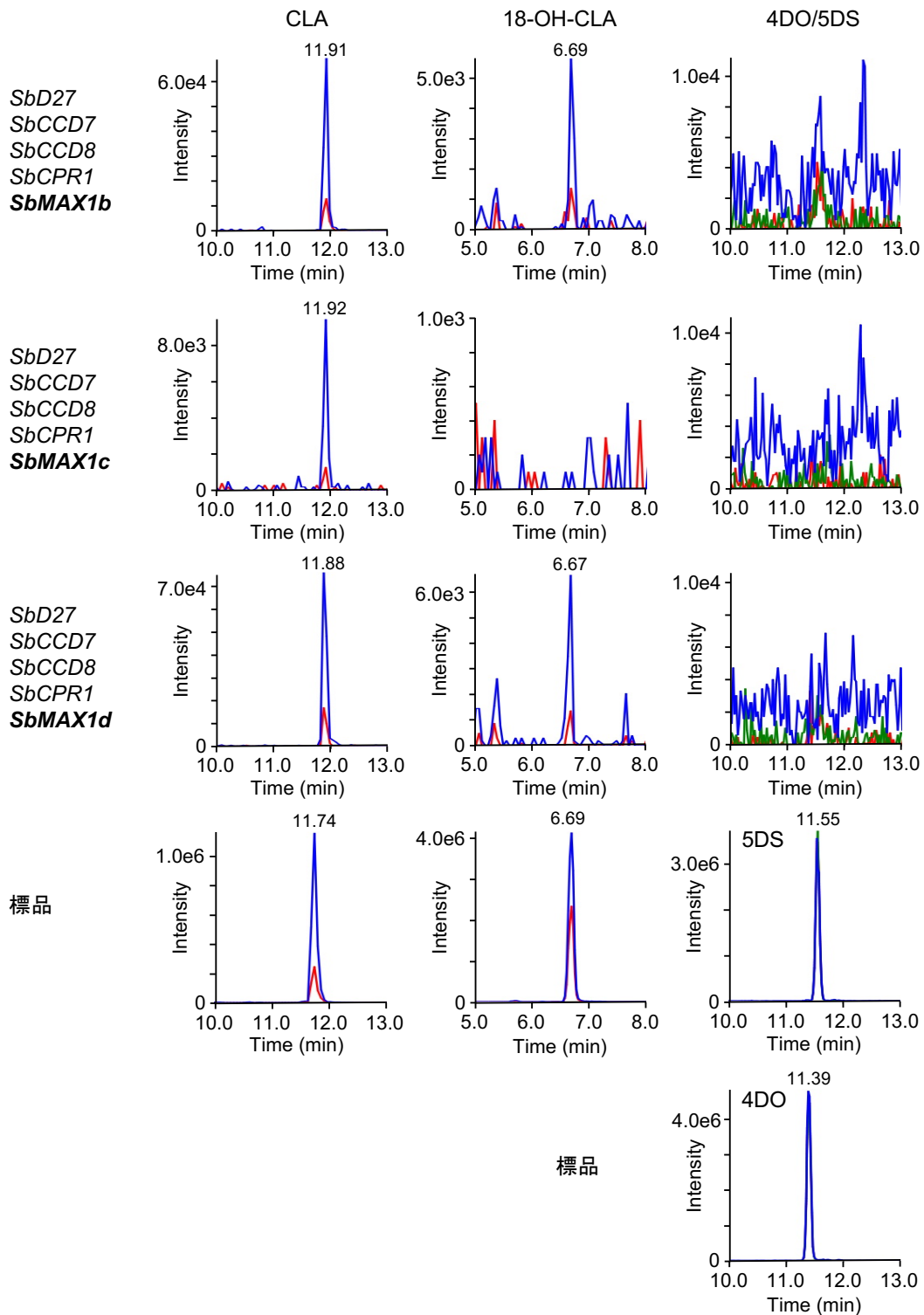


図19：ベンサミアナタバコにおけるソルガムMAXIホモログの一過的発現によるSL生産

アグロインフィルトレーション法によりベンサミアナタバコにおいてSL生合成遺伝子を共発現させた。葉の抽出物はLC-MS/MSにより分析した。Carlactonoic acid (CLA), 18-hydroxycarlactonoic acid (18-OH-CLA), 4-deoxyorobanchol (4DO) / 5-deoxystrigol (5DS) のMRMのクロマトグラムを示す。

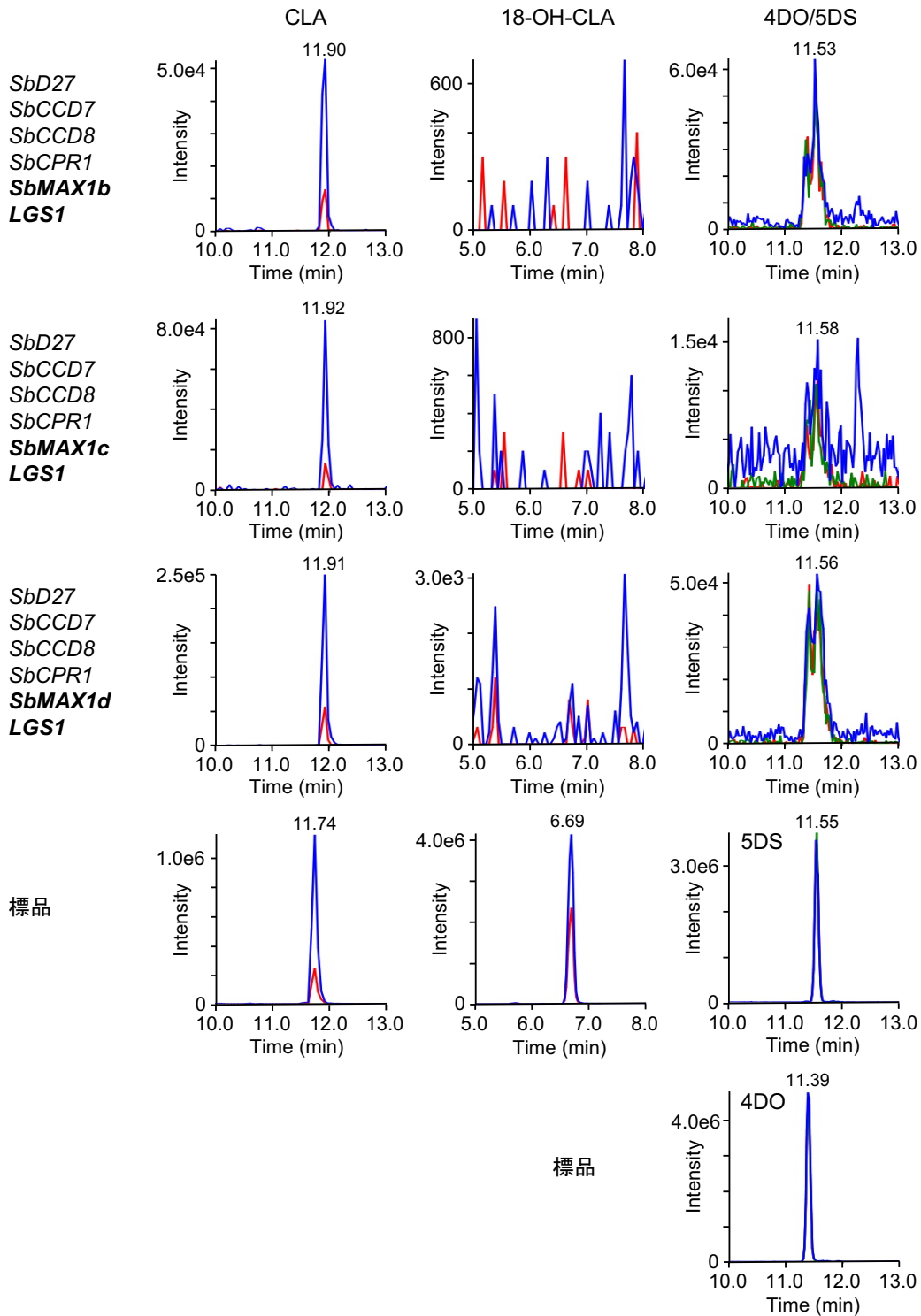


図20：ベンサミアナタバコにおけるソルガムMAXIホモログとLGS1の一過的発現によるSL生産

酵素遺伝子をアグロインフィルトレーション法によりベンサミアナタバコで共発現させた。葉の抽出物をLC-MS/MS分析した。Carlactonic acid (CLA), 18-hydroxycarlactonic acid (18-OH-CLA), 4-deoxyorobanchol (4DO) / 5-deoxystrigol (5DS) のMRMのクロマトグラムを示す。

ミヤコグサやワタにおいてシトクロム P450 酵素である CYP722C ファミリーは CLA から 5DS への変換を触媒している (図 5) (Mori *et al.*, 2020; Wakabayashi *et al.*, 2020)。ソルガムを含むイネ科植物のゲノムには CYP722C は存在せず、40%以上且つ 55%以下のアミノ酸の相同性をもつ CYP722B サブファミリーの遺伝子を有する (図 21)。4 つの SbMAX1s は CLA の生産能を有するので (図 14、図 16)、CYP722B により CLA から 5DS が生産される可能性も考えられる。そこで、ソルガムの CYP722B ホモログである SbCYP722B が 5DS の生産に関与しているかを調べた。ベンサミアナタバコにおいて SbCYP722B を SbD27、SbCCD7、SbCCD8、SbCPR1 に SbMAX1 ホモログ 4 つそれぞれの組み合わせで共発現させた結果、5DS は何れの組み合わせにおいても検出されなかった (図 22)。また、トマトやササゲの CYP722C は CLA から orobanchol とそのジアステレオマーである *ent*-2'-*epi*-orobanchol を生成する酵素機能があることが報告されている (Wakabayashi *et al.*, 2019)。そのため、ソルガムの *lgs1* 変異体における orobanchol の生成に SbCYP722B が関与している可能性も考えられた。しかし、5DS と同様に何れの組み合わせにおいてもベンサミアナタバコにおける一過的発現では orobanchol やその異性体は検出されなかった (図 23)。

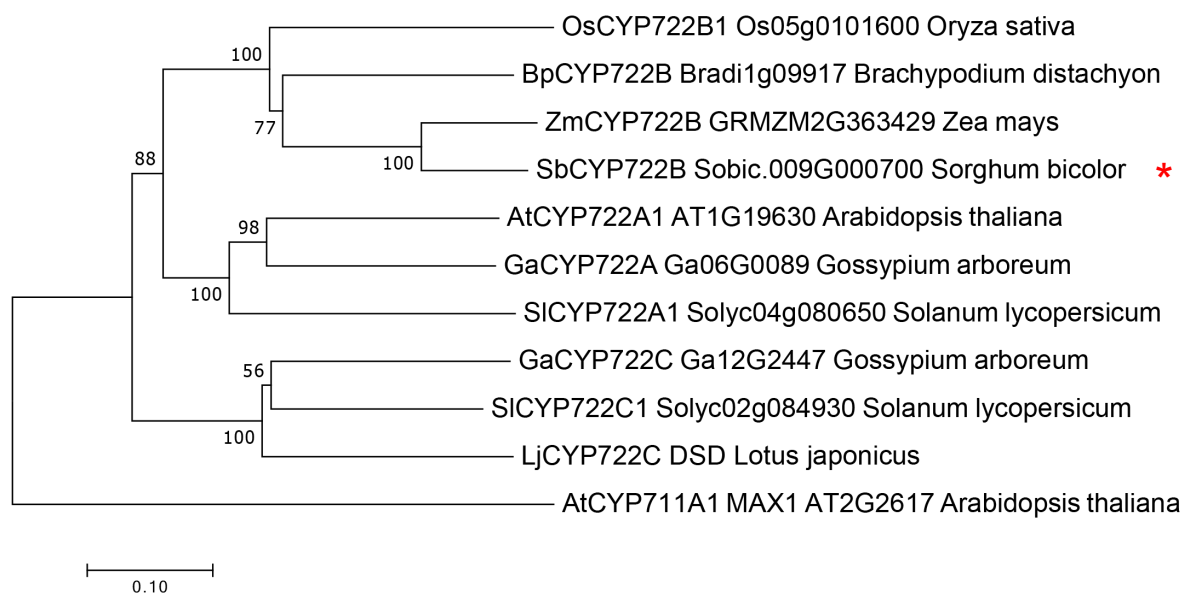


図21：CYP722の分子系統樹

シロイヌナズナ、トマト、ワタ、ミヤコグサ、イネ、トウモロコシ、ミナトカモジグサのCYP722ファミリーのアミノ酸配列は以前の論文(Wakabayashi *et al.* 2020a; 2020b; Mori *et al.* 2020) と Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/>) から得た。アスタリスクは本研究で調べたソルガムの配列を示す。MEGA7 (Kumar *et al.* 2016)を用いて近隣結合法(bootstrap test, 1000 replicates, *p*-distance)により作成した。スケールバーは相違するアミノ酸配列の比率を示す。

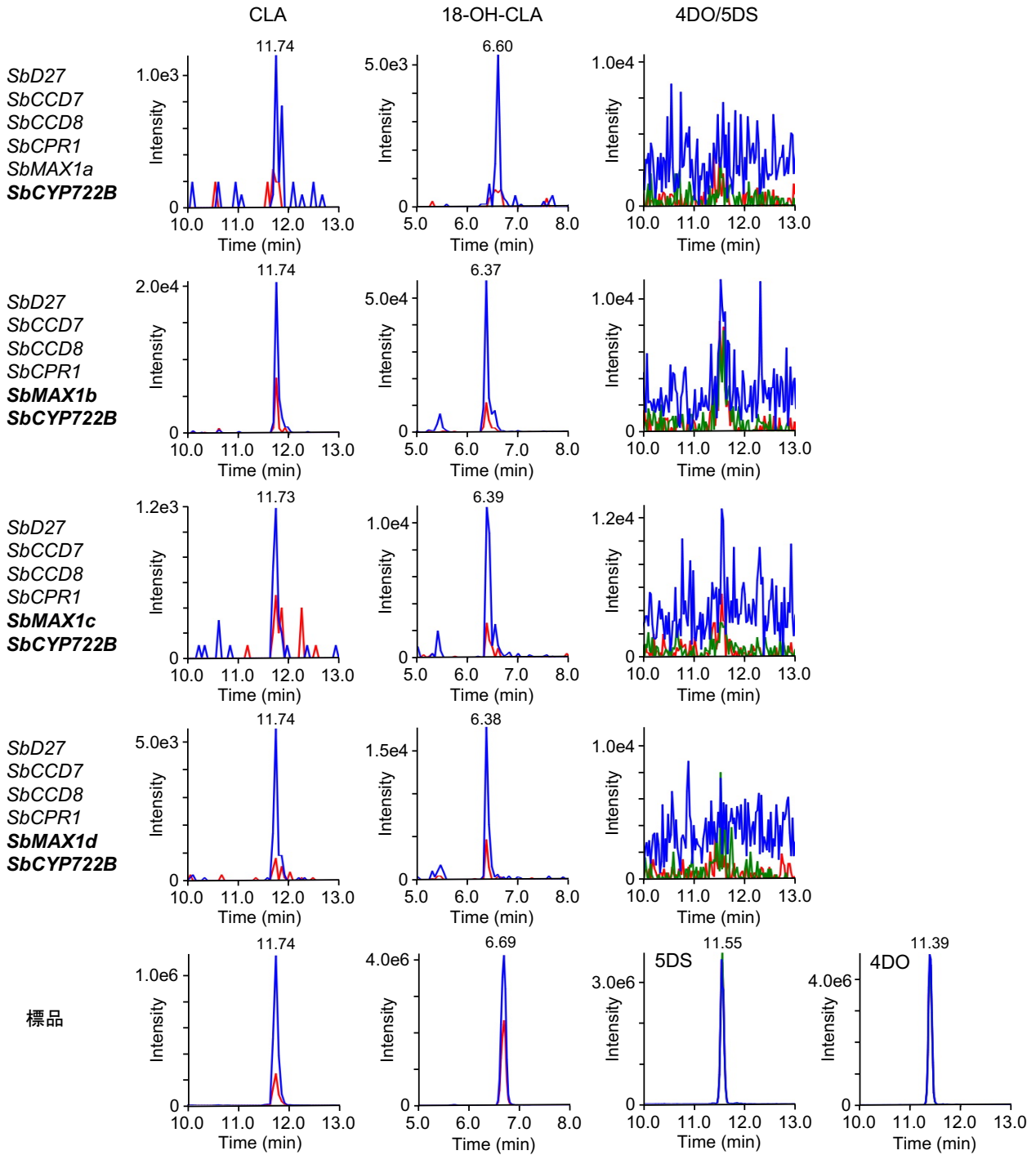


図22：5-Deoxystrigol (5DS) 生産能を確認するためのベンサミアナタバコにおけるソルガムSL合成遺伝子と*SbCYP722B*の一過的発現

酵素遺伝子をベンサミアナタバコの葉においてアグロインフィルトレーション法により共発現させた。葉の抽出物をLC-MS/MSにより分析した。Carlactonic acid (CLA), 18-hydroxycarlactonic acid (18-OH-CLA), 4-deoxyorobanchol (4DO) / 5DSのMRMのクロマトグラムを示す。

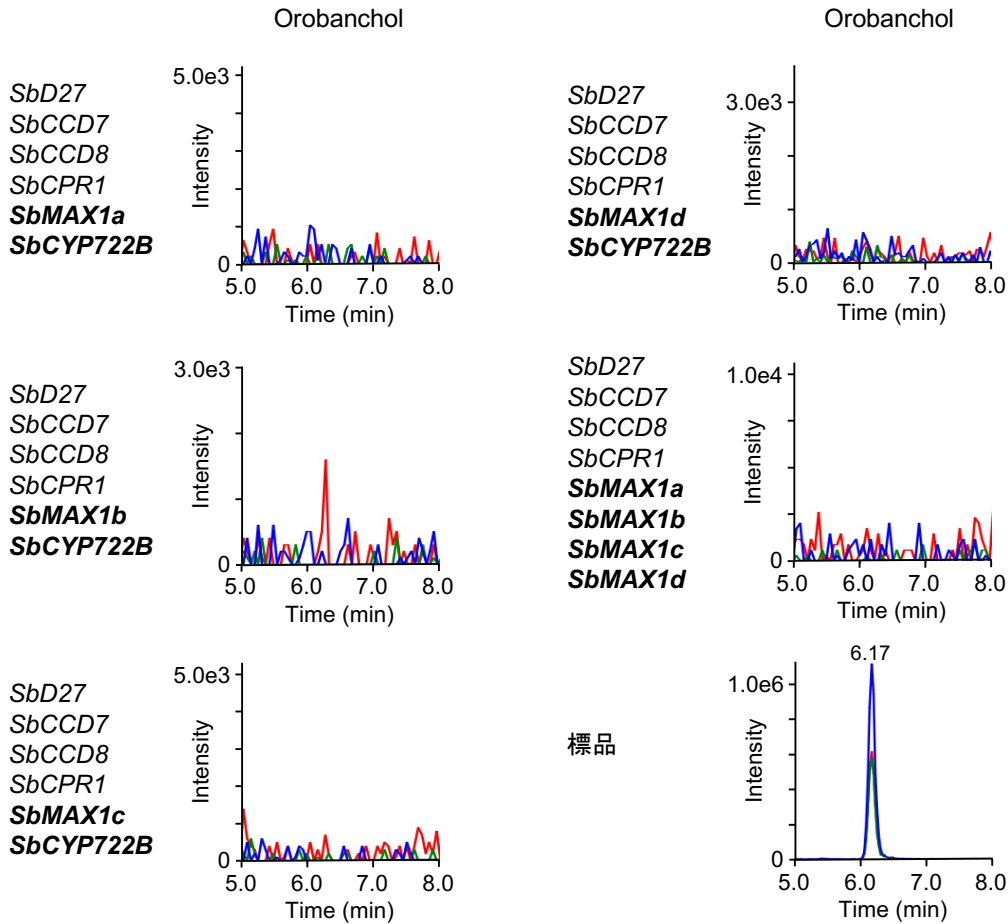


図23：Orobanchol生産能を確認するためのベンサミアナタバコにおけるソルガムSL生合成遺伝子と*SbCYP722B*の一過的発現

酵素遺伝子をアグロインフィルトレーション法によりベンサミアナタバコにおいて一過的に共発現させ、葉の抽出物をLC-MS/MSにより分析した。MRMのクロマトグラムを示す。Orobanchol (blue, 347.00/233.00; red, 347.00/97.00; green, 347.00/205.00; *m/z* in positive mode)

4-4 考察

SbD27、*SbCCD7*、*SbCCD8*、*SbCPR1*、*SbMAX1a* を共発現させたベンサミアナタバコの葉からは CLA 及び 18-OH-CLA が検出された。この結果は第3章の酵母における *SbMAX1a* の機能解析の結果と一致した。さらに *LGS1* を共発現させた葉からは 5DS だけでなく 4DO も検出された。その量はほぼ 1:1 の割合で検出された。この結果は *LGS1* が SL 生合成酵素として機能していることを示した。しかしながら、ソルガムからは 4DO は検出されないため、4DO の生成は本来の反応で生成されたものではないと考えられた。可能性としては、5DS の立体選択的な生成にはさらに未知の酵素が必要であることが考えられた。または、ソルガムの SL 生合成酵素によりベンサミアナタバコの植物体内 (*in vivo*) で生産された 18-OH-CLA 以外の未知の代謝産物を *LGS1* が基質として使用し、5DS に加えて 4DO が生産された可能性も考えられた。この可能性についての追試は、*in vitro* 代謝実験による *LGS1* の機能解析を第5章で行なった。

酵母ミクロソームで発現させた *SbMAX1b* と *SbMAX1d* は CL から CLA のみを生産したが、ベンサミアナタバコの一過的発現では 18-OH-CLA の生産能が確認された。さらに、*LGS1* と共発現させた場合には 4DO と 5DS の生産も確認されたが、それらの量は *SbMAX1a* と比較して少なかった。これらの結果から、ソルガムにおいて *LGS1* に基質となる 18-OH-CLA の生合成経路で主に働いているのは *SbMAX1a* であると考えられた。

LGS1 遺伝子の欠損によりソルガムは *orobanchol* を生産するが、ソルガムにおける *orobanchol* の生合成経路は明らかにされていない。イネにおいて *orobanchol* は MAX1 ホモログである CYP711A2 と CYP711A3 により生産される(図5)(Zhang *et al.*, 2014)。また、トマトとササゲにおいては CYP722C が *orobanchol* の生合成に関与している(Wakabayashi *et al.*, 2019)。一方、ミヤコグサとワタでは CYP722C が 5DS の生産に関与していることが報告されている(Mori *et al.*, 2020; Wakabayashi *et al.*, 2020)。しかしながら、ベンサミアナタバコにおける一過的発現においてソルガムの *SbMAX1s* や *SbCYP722B* を何れの組み合わせで発現させても *orobanchol* や 5DS は検出されなかった。これらの結果は *LGS1* が欠損した際に *orobanchol* を生産する未知の酵素が存在することを示している。

第 5 章 LGS1 酵素の *in vitro* 機能解析

5-1 諸論

第 4 章のベンサミアナタバコにおけるソルガムの SL 生合成経路の再構築では、*LGS1* を発現させることにより 5DS に加えてソルガムからは検出されない 4DO の生産が確認された。植物体内で生産された 18-OH-CLA 以外の未知の代謝産物を *LGS1* が基質として変換した可能性は否定できない。そこで、大腸菌において *LGS1* タンパク質を発現させて、合成標品の 18-OH-CLA と試験管内 (*in vitro*) でインキュベートすることにより *LGS1* の機能解析を行った。*LGS1* 遺伝子がコードする推定タンパク質は細胞質局在の硫酸基転移酵素である。まず、大腸菌において N 末端に His-tag を付加した *LGS1* タンパク質の可溶性発現を試みたが、全て封入体を形成してしまった。可溶化を促進するマルトース融合タンパク質のタグの使用や、低温誘導発現ベクターの使用により可溶化を試みたが、*LGS1* タンパク質の可溶性画分での発現はみられなかった。そこで、可溶性画分において高発現する大腸菌由来の β -glucuronidase (GUS) に着目し、GUS を可溶化タグとして *LGS1* の N 末端に付加した独自の発現ベクターを構築した。そのベクターの使用により可溶性発現に成功した GUS 融合 *LGS1* タンパク質を用いて *rac*-18-OH-CLA の代謝実験を行い、*LGS1* の酵素機能を解析した。

5-2 材料・方法

化合物

rac-18-OH-CLA は大阪府立大学大学院生命科学研究科の秋山康紀教授からご提供いただいた。

大腸菌 (*Escherichia coli*) における GUS 融合 LGS1 タンパク質の発現

LGS1 の完全長 cDNA を pENTR/D-TOPO (Invitrogen, USA) にクローニングした。使用したプライマーは表9に示す。GUS 融合 LGS1 タンパク質の発現ベクターを構築するため、ストップコドンを除いた大腸菌由来の *GUS* 遺伝子 (LC588893) を *LGS1* の N 末端に位置する pENTR/D-TOPO 上の *NotI* サイトに GeneArt Seamless Cloning and Assembly Enzyme Mix (Invitrogen, USA) を用いて挿入した。また、ネガティブコントロールとして *GUS* の完全長 cDNA を pENTR/D-TOPO にクローニングした。それらエントリークローンはシークエンスにより配列を確認後、Gateway system を用いて N 末端に 6×His タグを含む pET300/NT-DEST (Invitrogen, USA) に LR リコンビネーションした。作成したプラスミドを大腸菌 Rosetta 2(DE3)pLysS (Novagen, Germany) に形質転換した。形質転換大腸菌を 150 ml の LB 培地 (100 μg ml⁻¹ carbenicillin)、37 °C、180 rpm で OD₆₀₀ が 0.5 になるまで培養した。25 °C、180 rpm で 30 分間前培養を行った後、0.1 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を加え、25 °C、180 rpm で 6 時間培養した。培養液を 8,000 x g で 5 分間遠心して大腸菌を回収し、15 ml の 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) で懸濁した。超音波発生機 UD-100 (TOMY, Japan) の出力設定値 99 %、間欠タイマー 30 秒 on/off で 4 分間破碎し、20,400 x g、4 °C で 5 分間遠心した。His GraviTrap (GE Healthcare, USA) を用いて上清に含まれる His タグタンパク質を精製した。沈殿は 1.5 ml の 8 M urea で溶解し、不溶性画分とした。精製タンパク質 (14 μg ml⁻¹, 200 μl) と 15 μM 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS)、0.25-20 μM *rac*-18-OH-CLA を 28 °C で 1 時間インキュベートした (カイネティクス測定の際は 28 °C で 10 分間インキュベート)。反応液を酢酸エチルで抽出後、硫酸ナトリウムで脱水し、第4章と同様に LC-MS/MS 分析を行った。精製タンパク質の定量は TaKaRa Bradford Protein Assay Kit (TaKaRa Bio, Japan) を用いて行った。カイネティックパラメータは 3 反復取得し、SigmaPlot 14 (Systat Software, USA) を用いて Michaelis-Menten 式

により計算した。Chiral-LC-MS/MS 分析は UHPLC (Nexera X2; Shimadzu, Japan) にキラルカラム (CHIRALPAK IC-3, ϕ 2.1 x 150 mm, 3 μ m; DAICEL Corp., Japan) を装着し、カラムの温度は氷水を用いて 0 °C に維持した。移動相は 0.05 % 酢酸を含むアセトニトリルと水を使用し、流速 0.2 ml min⁻¹ でアセトニトリル 30 % (0 min) から 60 % (5 min) グラジエント溶出を行った後、60 % (15 min) イソクラティック溶出を行った。

表9 LGS1 と GUS のクローニングに使用したプライマー配列

Primer name	5' to 3' sequence
<i>LGS1 for pENTR</i>	
SbLGS1-F4	CACCATGAACGTACAGGAGAGGAG
SbLGS1-R2	TTACACGGATATGGAGTCGGCAAAG
<i>GUS for pENTR</i>	
GUS-pENTR-InF	GCAGGCTCCGCGGCCATGGTCCGTCCTGTAGAAAC
GUS-pENTR-InR	GTGAAGGGGGCGGCCGCTTGTTTGCCTCCCTGCTG

5-3 結果

可溶性画分において高発現する大腸菌由来の GUS を LGS1 タンパク質の N 末端に付加することで、大腸菌の可溶性画分に GUS 融合 LGS1 タンパク質 (GUS-LGS1) として発現させることに成功した (図 24)。GUS 遺伝子は植物体における遺伝子発現解析のレポーター遺伝子として一般的に用いられているが、大腸菌発現系における可溶化タグとしての使用はこれまでに報告されていない。また、形質転換した大腸菌を GUS 活性の検出試薬として知られる 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-gluc) と IPTG を含む LB 培地プレートで培養したところ、GUS-LGS1 を発現しているコロニーが GUS の加水分解活性により青色に呈色した (図 24)。

GUS-LGS1 を用いて合成標品 *rac*-18-OH-CLA の代謝実験を行った。一般的に硫酸基転移酵素は硫酸基供与体として PAPS が必要である (Hirschmann *et al.*, 2014)。PAPS 非存在下の GUS-LGS1 や GUS 単独発現では基質である 18-OH-CLA の減少は認められなかったが、PAPS 存在下において GUS-LGS1 は 18-OH-CLA を劇的に減少させ、第 4 章のベンサミアナタバコを用いた実験と同様に 5DS と 4DO が生成された (図 25)。それらのプロダクトイオンは標品の 4DO と 5DS のプロダクトイオンと一致した (図 26)。*rac*-18-OH-CLA に対する GUS-LGS1 のミカエリス定数 (K_m) は $6.37 \pm 1.27 \mu\text{M}$ であった。キラルカラムを用いて代謝物を分析し、4DO と 5DS の 4 つの立体異性体と比較した結果、GUS-LGS1 によって生成される代謝産物は全ての天然 SL にみられる 2'-R 配置の 5DS と 4DO であることを確認した (図 27)。

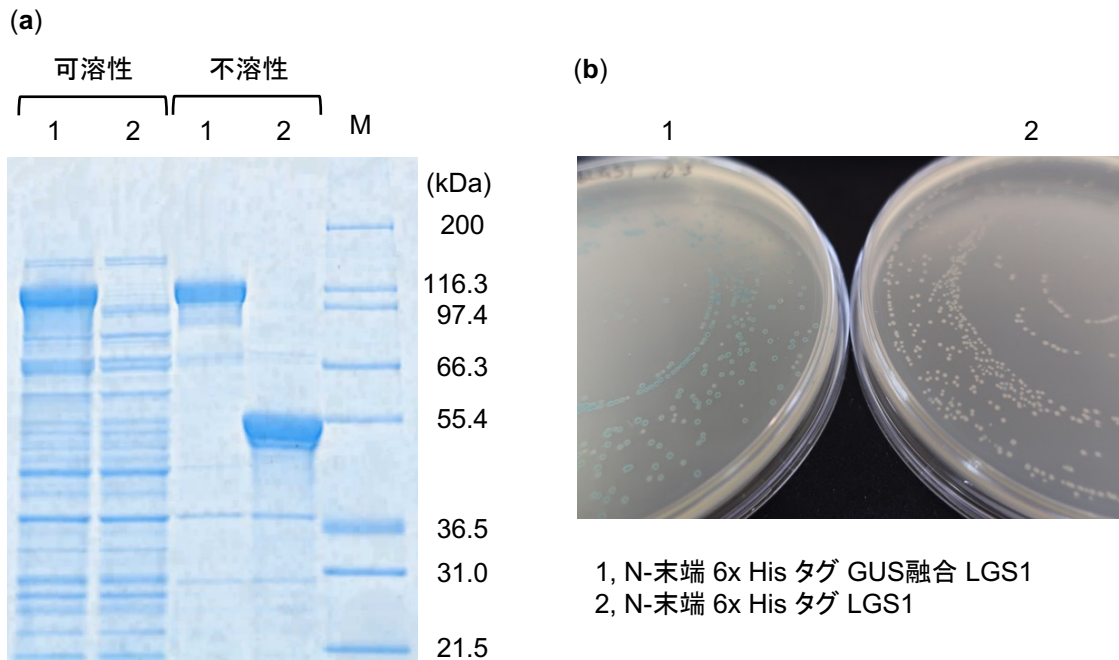


図24：大腸菌における β -glucuronidase (GUS) 融合LGS1タンパク質の発現

(a) LGS1タンパク質のSDS-PAGE。1：N-末端 6x Hisタグ GUS融合LGS1タンパク質 (119.6 kDa)、2：N-末端 6x Hisタグ LGS1タンパク質 (51.0 kDa)を大腸菌において発現させた。超音波破碎し、20,400 x g遠心の上清を可溶性画分、ペレットを8 M ureaで溶解したものを不溶性画分とした。Mはタンパク質の分子量マーカを表す。

(b) GUS融合LGS1タンパク質のGUS活性。形質転換した大腸菌を100 μ g/ml ampicillinと0.1 mM IPTG、100 μ g/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-Gluc)を含むLB培地のプレートで培養した。

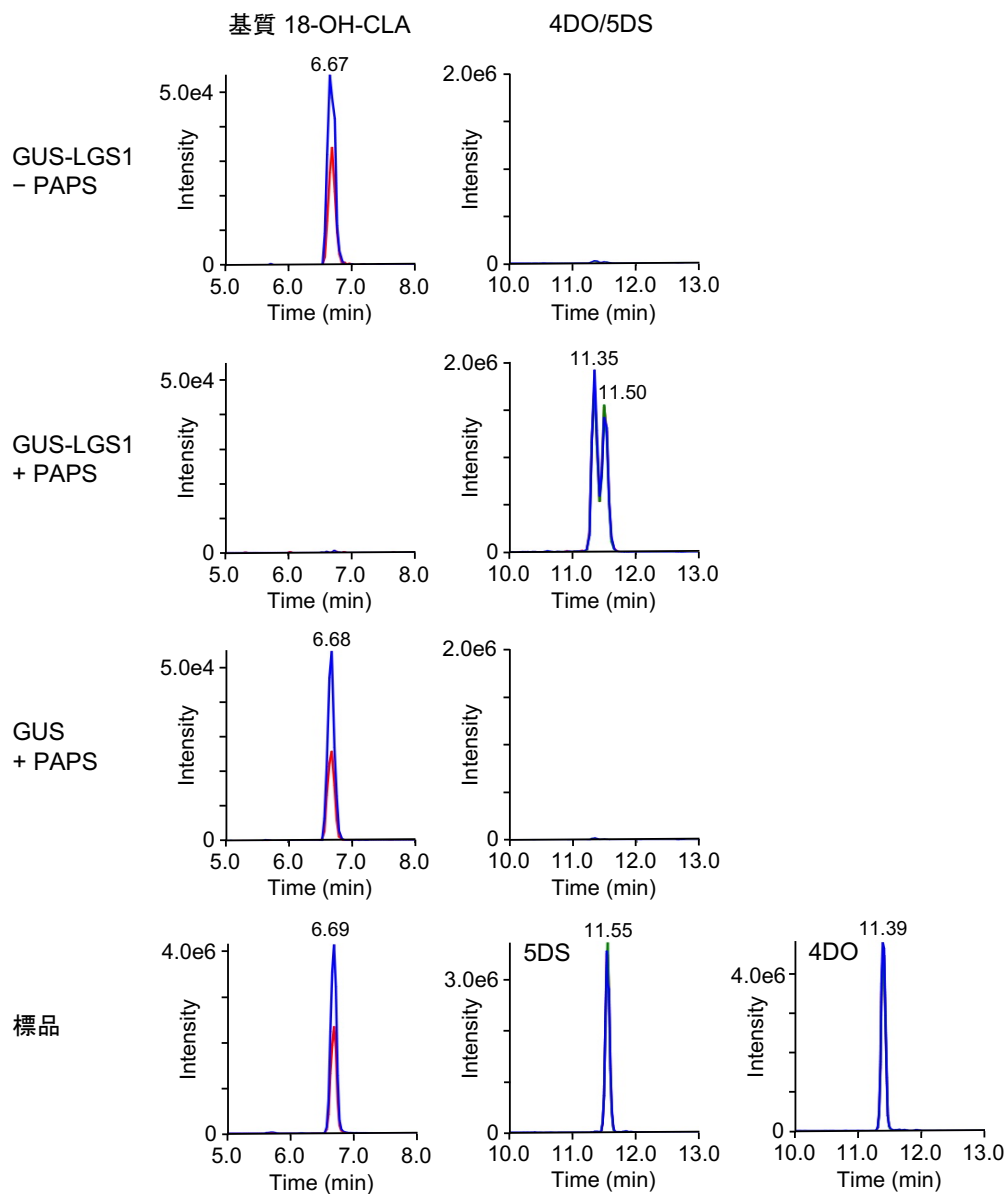


図25：大腸菌で発現させたGUS融合LGS1タンパク質（GUS-LGS1）による18-hydroxycaractonoic acid（18-OH-CLA）の代謝実験

硫酸基供与体である3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate（PAPS）を無添加条件（- PAPS）、または添加条件（+ PAPS）で、GUS-LGS1と*rac*-18-OH-CLAをインキュベートした。GUSを単独で発現させたものをネガティブコントロールとした。抽出物をLC-MS/MSにより分析した。MRMのクロマトグラムを示す。

18-OH-CLA (blue, 347.00/113.00; red, 347.00/69.00; *m/z* in negative mode)

4-Deoxyorobanchol (4DO) / 5-deoxystrigol (5DS) (blue, 331.15/97.00; red, 331.15/216.00; green, 331.15/234.00; *m/z* in positive mode)

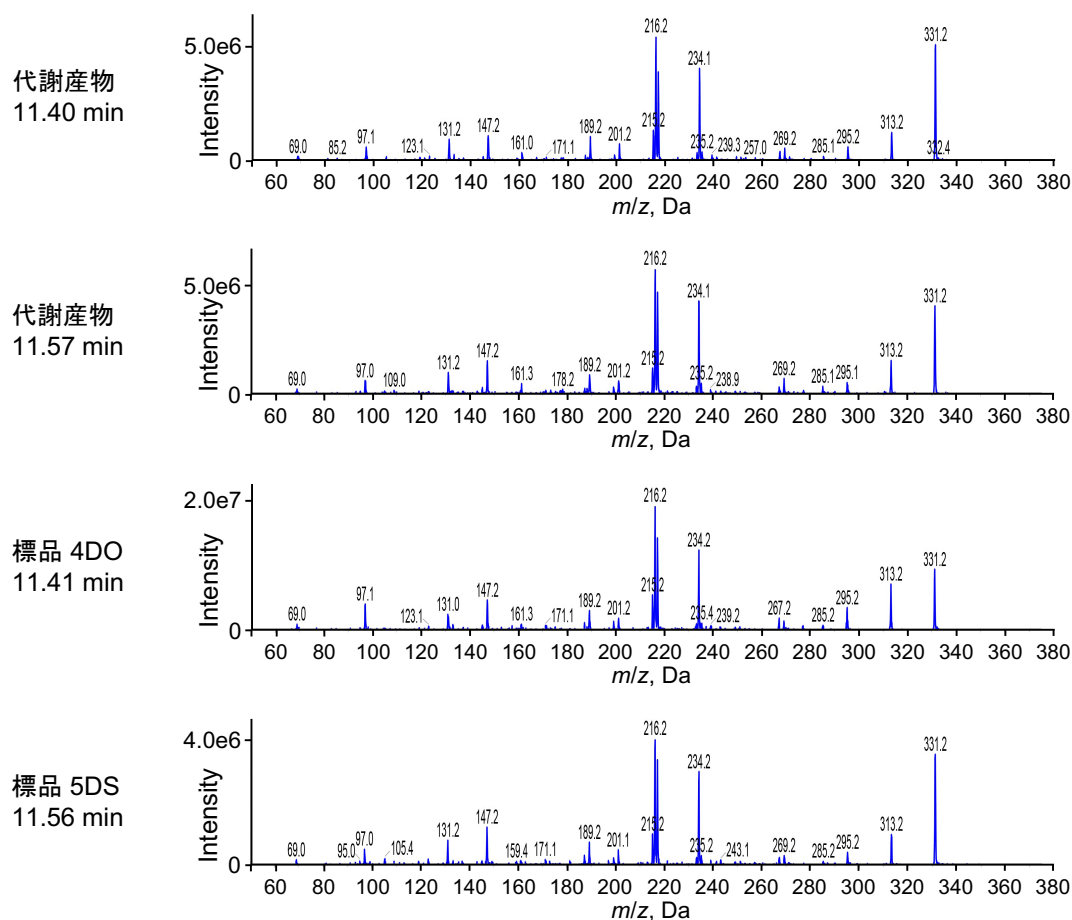


図26： GUS融合LGS1タンパク質による18-hydroxycaractanoic acid (18-OH-CLA) 代謝物のプロダクトイオン

GUS融合LGS1タンパク質と *rac*-18-OH-CLAをインキュベートして、4-deoxyrobanchol (4DO) / 5-deoxystigol (5DS)のチャンネルに生成した2つの代謝物と標品4DOと5DSをプロダクトイオンスキャンモードにより分析した。それぞれのプリカーサーイオン $[M+H]^+$ (m/z 331)から得られたプロダクトイオンスペクトルを示す。

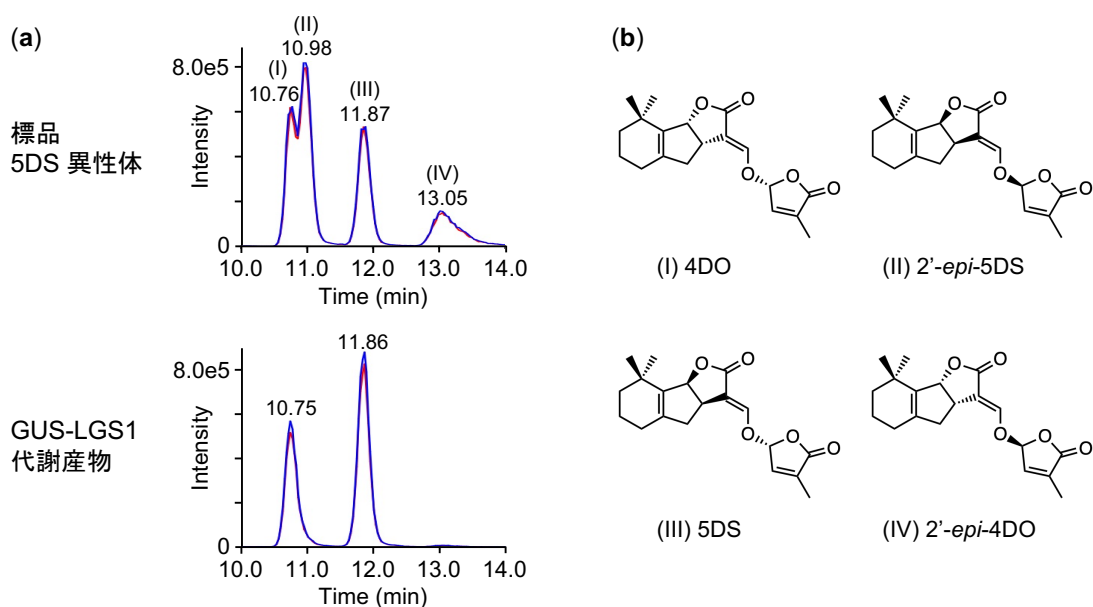


図27：GUS融合LGS1タンパク質（GUS-LGS1）により生成された18-hydroxycaractonoic acid代謝物のChiral-LC-MS/MS分析

(a) 標品4-deoxyrobanchol (4DO) / 5-deoxystrigol (5DS) の4つの立体異性体とGUS-LGS1による18-hydroxycaractonoic acid代謝物のMRM (blue, 331.10/216.00; red, 331.10/234.00; m/z in positive mode) のクロマトグラムを示す。

(b) 4DOと5DSの立体異性体の化学構造。

5-4 考察

大腸菌を用いて異種のタンパク質を発現させた場合、可溶性タンパク質が封入体になってしまうことがよく起こる。封入体となってしまったタンパク質は正常なフォールディングが起きていないため目的タンパク質の機能を解析できなくなる。そのため、既存の手法としてマルトース結合タンパク質やグルタチオン-S-トランフェラーゼなどを可溶化タグとして用いた発現方法や、低温において発現を誘導する系など様々な可溶化手法が知られているが、依然として可溶性画分での発現が困難なタンパク質が存在する。LGS1 タンパク質も既存の方法では可溶性画分に全く発現できなかったが、植物体における遺伝子発現解析のレポーター遺伝子として用いられている GUS を N 末端に融合することで、LGS1 タンパク質を大腸菌の可溶性画分に発現させることに成功した。この可溶性発現を強力に促進する手法は特許を出願した（タンパク質の発現方法およびタンパク質発現ベクター、特願 2019-130070）。目的タンパク質を GUS との融合タンパク質として発現させる本方法は、既存の手法において可溶性発現が困難な他のタンパク質においても可溶化を促進することが期待される。さらに、付加した GUS の酵素活性は維持されているため、目的のタンパク質を発現しているクローンを X-gluc を用いて選抜することが可能である。 β -Galactosidase (LacZ) によるブルーホワイトセレクションとは異なり、実際に目的タンパク質を発現しているクローンを選抜することができる方法である。

GUS-LGS1 タンパク質による合成標品 *rac*-18-OH-CLA の代謝実験の結果、硫酸基供与体 PAPS 依存的に 18-OH-CLA が減少して、代謝物として 4DO と 5DS が検出された。この結果は、第4章のベンサミアナタバコを用いた一過的発現系において LGS1 の発現により 4DO と 5DS が検出された結果と同じであった。本章の *in vitro* における代謝実験において PAPS 依存的に 18-OH-CLA の代謝物として 4DO と 5DS を生成したことから、LGS1 は PAPS から 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る。しかしながら、標品がないため 18-OH-CLA の硫酸エステル体は検出できていない。4DO と 5DS のピーク強度がほぼ 1:1 であったことから、18-OH-CLA への硫酸基の転移反応後、酵素非依存的に硫酸基が脱離して 4DO と 5DS への環化が起きている可能性が考えられた。

MAX1 タンパク質は *rac*-CL とインキュベートすると 11*R*-CL のみを特異的に代謝して、11*R*-CLA を生成することが明らかにされている(Abe *et al.*, 2014)。本章において、GUS-LGS1 タンパク質とインキュベートしたのは 11*R*-18-OH-CLA と 11*S*-18-OH-CLA の *rac*-18-OH-CLA である。キラル分析により、GUS-LGS1 タンパク質によって生成された代謝産物は、全ての天然 SL にみられる 2'-*R* 配置 (CL と CLA 骨格の C-11 位) の 5DS と 4DO であることが確認された。LGS1 も MAX1 と同様に 11-*R* 配置の 11*R*-18-OH-CLA を特異的に変換していると考えられる。

総論

ソルガムにおいて *LGS1* 遺伝子の欠損は、生産する SL を C 環の立体化学が異なる strigol-type (β 配位) から orobanchol-type (α 配位) に変える。これはソルガムにおいて *LGS1* タンパク質が SL の立体選択的な環化反応を制御していることを示している。本研究において *LGS1* の基質は 18-OH-CLA であり、18-OH-CLA はシトクロム P450 酵素である *SbMAX1a* により主に生産されることを明らかにした (図 28)。*in vivo* (ベンサミアナタバコによる一過的発現系) と *in vitro* (大腸菌による組み換えタンパク質発現系) の両方の実験において、*LGS1* タンパク質は 18-OH-CLA から 5DS だけでなく、そのジアステレオマーである 4DO を生成し、立体選択的な環化反応は示さなかった (図 28)。*LGS1* タンパク質は硫酸基供与体依存的にその反応を触媒したことから *LGS1* は硫酸基転移酵素であり、18-OH-CLA のスルホン化を触媒していると考えられるが、18-OH-CLA の硫酸エステル体は合成標品がないため検出できていない。*in vivo* と *in vitro* 両方の実験において 5DS と 4DO がほぼ等量生成されたため、18-OH-CLA の硫酸エステルから硫酸基が脱離し、人工的に立体非選択的な環化反応が起きていると考えられる。4DO はソルガムから検出されないため、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。または、4DO が未知の SL に代謝されているか、もしくは選択的に分解されている可能性も考えられる。

LGS1 遺伝子の欠損によりソルガムは orobanchol を生産するが、ソルガムにおける orobanchol の生合成経路は明らかにされていない。イネでは *MAX1* のホモログである *CYP711A2* (*Os900*) が CL から 4DO を生産して、*CYP711A3* (*Os1400*) が 4DO を orobanchol へ変換する (Zhang *et al.*, 2014)。トマトとササゲにおいては orobanchol の生合成に関与している酵素として *MAX1* (*CYP711A*) とは異なる P450 酵素ファミリーの *CYP722C* が同定されており、CLA から orobanchol への変換に関与している (Wakabayashi *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2021)。ソルガムにおいても *CYP711A* (*MAX1*) や *CYP722* ファミリーが orobanchol の生合成に関与しているのではないかと考え、ベンサミアナタバコの発現システムにおいてソルガムの *SbMAX1s* や *SbCYP722B* を発現させたが何れの組み合わせにおいても

orobancholは検出されなかった(図28)。この結果はLGS1が欠損した際にorobancholを生産する未知の酵素が存在することを示している。

硫酸基転移酵素は他の植物種においても存在するが、LGS1に高い相同性をもつ遺伝子はイネやトウモロコシのゲノムには存在しない。ゲノムが解読された植物の中では、ススキ (*Miscanthus sinensis*) において見つかるLGS1に74.2%のアミノ酸相同性をもつ配列が最も相同性が高い。SL生合成において、CLAまでは様々な植物種において保存されている経路であるが、CLA以降経路には種における多様性がある(Yoneyama *et al.*, 2018a)。LGS1を利用した5DSの生合成はソルガム、もしくはススキに存在する限定的な経路である。LGS1遺伝子が欠損するとソルガムはorobanchol生産体になることから、LGS1を獲得する前のソルガムはイネと同様にorobancholが主要なSLであったのかもしれない。立体選択的なSLの多様な生合成の進化を促進する要因は明らかにされていないが、根圏における病原性微生物や寄生植物との相互作用による結果、多様なSLの生合成経路が形成されているのかもしれない。

ソルガムは5DSを生産するために硫酸基転移酵素をSL生合成経路に取り入れ、LGS1が18-OH-CLAの水酸基の脱離と環化を触媒するために硫酸基を利用していると考えられる。植物ホルモンの生合成経路において、ブラシノステロイドやジャスモン酸、サリチル酸などは硫酸基転移酵素によりスルホン化されることが知られている(Hirschmann *et al.*, 2014)。しかしながら、それらはLGS1のような脱水や環化を伴わない反応である。興味深いことに、動物におけるビタミンA (retinol) はSLと同様にカロテノイドから生合成されるが、その水酸基の脱離反応は硫酸基転移酵素によりPAPS依存的に触媒される。5DSと同様に、最終産物 (anhydroretinol) はスルホン化されていない(Vakiani *et al.*, 1998)。

ソルガムにおける LGS1 遺伝子の変異はストライガに対する耐性を付与し、AM 菌との共生やソルガム自身の枝分かれにも影響を与えない。すなわち、*lgs1* 変異の導入は、SL の「量」ではなく

「質」を変えることにより根寄生植物だけを制御する技術の基盤になる。しかしながら、ストライガによる被害の大きいアフリカ諸国においては現地によって様々な品種が混在しており、それらの全てに *lgs1* 変異を導入することは難しい。そのため、現地の品種にストライガ耐性を付与できる薬剤が開発できればその解決に繋がる。SL の「質」を制御する薬剤の開発には LGS1 の真の酵素機能を含め、ソルガムにおける立体選択的な 5DS の環化を触媒する酵素や、LGS1 遺伝子が欠損した際に orobanchol を生産する酵素の解明が不可欠である。それらの解明が進めば、その阻害剤のスクリーニングにより、根寄生植物だけを制御できる薬剤の開発が可能となる。

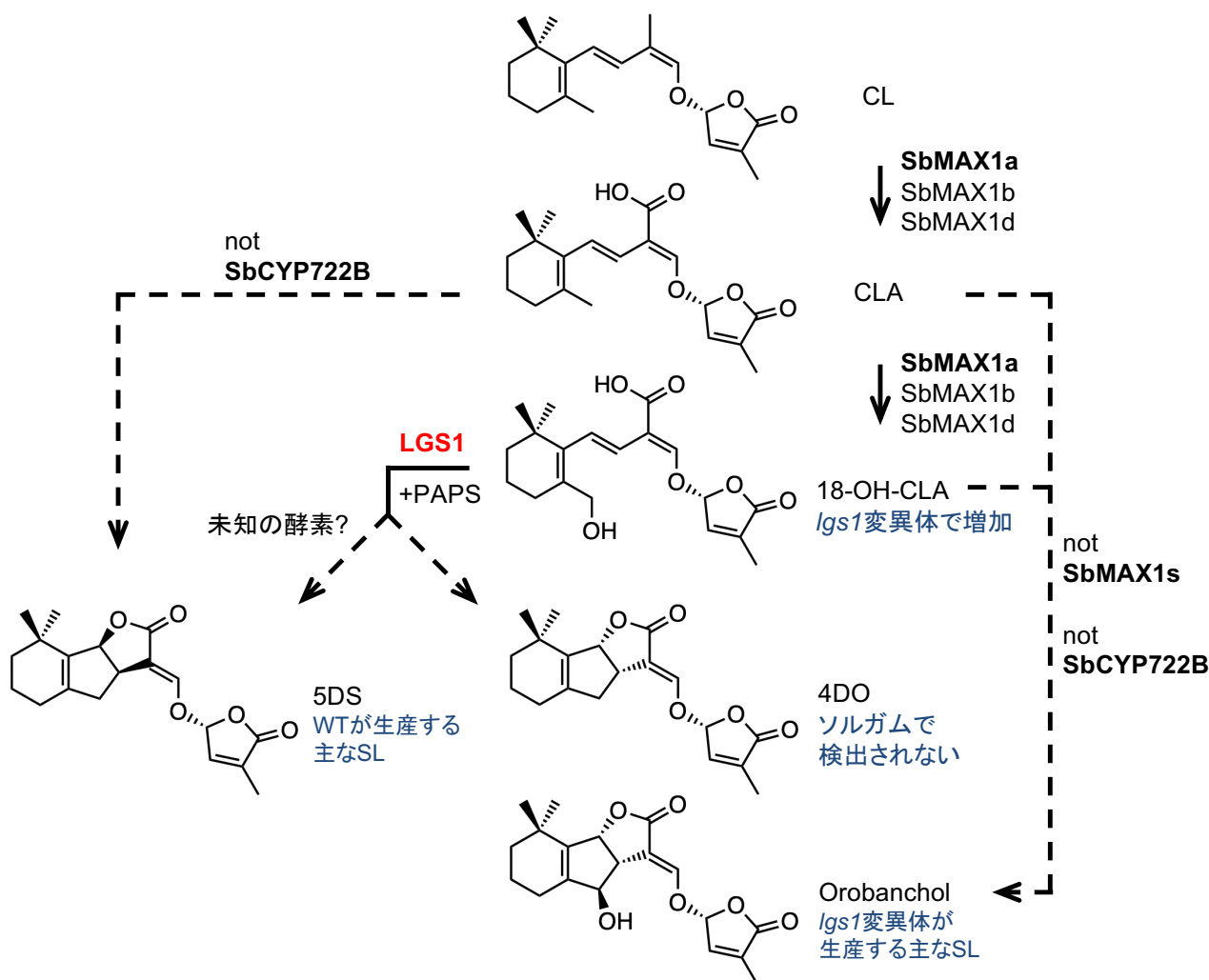


図28：ソルガムにおける推定SL生合成経路

Carlactone (CL) は主にSbMAX1aにより18-hydroxycarlactonic acid (18-OH-CLA) に変換される。LGS1は硫酸基供与体PAPSの存在下において18-OH-CLAから4-deoxyorobanchol (4DO) と5-deoxystrigol (5DS) を生成する。野生型 (WT) が生産する5DSの立体選択的な生成はソルガムにおける未知の酵素により触媒される可能性がある。ワタやミヤコグサのCYP722Cとは異なり、SbCYP722Bは5DSを生産しない。イネのCYP711AやトマトのCYP722Cと異なり、SbMAX1s (CYP711A) やSbCYP722Bによりorobancholは生成されない。

参考文献

- Abe S, Sado A, Tanaka K, Kisugi T, Asami K, Ota S, Kim HI, Yoneyama K, Xie X, Ohnishi T, 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 USA* 111(50): 18084-18089.
- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H. 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435(7043): 824-827.
- Akiyama K, Ogasawara S, Ito S, Hayashi H. 2010. Structural requirements of strigolactones for hyphal branching in AM fungi. *Plant Cell Physiol* 51(7): 1104-1117.
- Alder A, Jamil M, Marzorati M, Bruno M, Vermathen M, Bigler P, Ghisla S, Bouwmeester H, Beyer P, Al-Babili S. 2012. The path from β -carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone. *Science* 335(6074): 1348-1351.
- Arite T, Iwata H, Ohshima K, Maekawa M, Nakajima M, Kojima M, Sakakibara H, Kyojuka J. 2007. *DWARF10*, an *RMS1/MAX4/DADI* ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *Plant J* 51(6): 1019-1029.
- Bellis ES, Kelly EA, Lorts CM, Gao H, DeLeo VL, Rouhan G, Budden A, Bhaskara GB, Hu Z, Muscarella R, et al. 2020. Genomics of sorghum local adaptation to a parasitic plant. *Proc Natl Acad Sci USA* 117(8): 4243-4251.
- Beveridge CA, Ross JJ, Murfet IC. 1996. Branching in Pea (Action of Genes *Rms3* and *Rms4*). *Plant Physiol* 110(3): 859-865.
- Booker J, Auldridge M, Wills S, McCarty D, Klee H, Leyser O. 2004. MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. *Curr Biol* 14(14): 1232-1238.
- Brewer PB, Yoneyama K, Filardo F, Meyers E, Scaffidi A, Frickey T, Akiyama K, Seto Y, Dun EA, Cremer JE, et al. 2016. *LATERAL BRANCHING OXIDOREDUCTASE* acts in the final stages of strigolactone biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 113(22): 6301-6306.
- Chesterfield RJ, Vickers CE, Beveridge CA. 2020. Translation of Strigolactones from Plant Hormone to Agriculture: Achievements, Future Perspectives, and Challenges. *Trends Plant Sci* 25(11): 1087-1106.
- Cook CE, Whichard LP, Turner B, Wall ME, Egley GH. 1966. Germination of Witchweed (*Striga lutea* Lour.): Isolation and Properties of a Potent Stimulant. *Science* 154(3753): 1189-1190.
- Deschamps S, Zhang Y, Llaca V, Ye L, Sanyal A, King M, May G, Lin H. 2018. A chromosome-scale assembly of the sorghum genome using nanopore sequencing and optical mapping. *Nat Commun* 9(1): 4844.
- Fernández-Aparicio M, Yoneyama K, Rubiales D. 2010. The role of strigolactones in host specificity of *Orobanche* and *Phelipanche* seed germination. *Seed Science Research* 21(1): 55-61.
- Gobena D, Shimels M, Rich PJ, Ruyter-Spira C, Bouwmeester H, Kanuganti S, Mengiste T, Ejeta G. 2017. Mutation in sorghum *LOW GERMINATION STIMULANT 1* alters strigolactones and causes *Striga* resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 114(17): 4471-4476.

- Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pages V, Dun EA, Pillot JP, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais JC, et al. 2008. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**(7210): 189-194.
- Hirschmann F, Krause F, Papenbrock J. 2014. The multi-protein family of sulfotransferases in plants: composition, occurrence, substrate specificity, and functions. *Front Plant Sci* **5**: 556.
- Ito S, Umehara M, Hanada A, Kitahata N, Hayase H, Yamaguchi S, Asami T. 2011. Effects of triazole derivatives on strigolactone levels and growth retardation in rice. *PLoS ONE* **6**(7): e21723.
- Jiu S, Xu Y, Xie X, Wang J, Xu J, Liu X, Sun W, Xu W, Wang S, Zhang C. 2022. Strigolactones affect the root system architecture of cherry rootstock by mediating hormone signaling pathways. *Environmental and Experimental Botany* **193**: 104667.
- Kawada K, Takahashi I, Arai M, Sasaki Y, Asami T, Yajima S, Ito S. 2019. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Triazole Derivatives as Strigolactone Biosynthesis Inhibitors. *J Agric Food Chem* **67**(22): 6143-6149.
- Kodama K, Rich MK, Yoda A, Shimazaki S, Xie X, Akiyama K, Mizuno Y, Komatsu A, Luo Y, Suzuki H, et al. 2021. An Ancestral Function of Strigolactones as Symbiotic Rhizosphere Signals: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Kountche BA, Jamil M, Yonli D, Nikiema MP, Blanco - Ania D, Asami T, Zwanenburg B, Al - Babili S. 2019. Suicidal germination as a control strategy for *Striga hermonthica* (Benth.) in smallholder farms of sub-Saharan Africa. *PLANTS, PEOPLE, PLANET* **1**(2): 107-118.
- Liu G, Godwin ID. 2012. Highly efficient sorghum transformation. *Plant Cell Rep* **31**(6): 999-1007.
- MacLean AM, Bravo A, Harrison MJ. 2017. Plant Signaling and Metabolic Pathways Enabling Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Plant Cell* **29**(10): 2319-2335.
- Miller FR. 1984. Registration of RTx430 Sorghum Parental Line. *Crop Science* **24**(6): crops1984.0011183X002400060074x.
- Mohemed N, Charnikhova T, Fradin EF, Rienstra J, Babiker AGT, Bouwmeester HJ. 2018. Genetic variation in *Sorghum bicolor* strigolactones and their role in resistance against *Striga hermonthica*. *J Exp Bot* **69**(9): 2415-2430.
- Mori N, Nomura T, Akiyama K. 2020. Identification of two oxygenase genes involved in the respective biosynthetic pathways of canonical and non-canonical strigolactones in *Lotus japonicus*. *Planta* **251**(2): 40.
- Nelson DC. 2021. The mechanism of host-induced germination in root parasitic plants. *Plant Physiol* **185**(4): 1353-1373.
- Nomura S, Nakashima H, Mizutani M, Takikawa H, Sugimoto Y. 2013. Structural requirements of strigolactones for germination induction and inhibition of *Striga gesnerioides* seeds. *Plant Cell Rep* **32**(6): 829-838.
- Pompon D, Louerat B, Bronine A, Urban P. 1996. Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods Enzymol* **272**: 51-64.
- Raghuwanshi A, Birch RG. 2010. Genetic transformation of sweet sorghum. *Plant Cell Rep* **29**(9): 997-1005.

- Samejima H, Babiker AG, Takikawa H, Sasaki M, Sugimoto Y. 2016. Practicality of the suicidal germination approach for controlling *Striga hermonthica*. *Pest Manag Sci* **72**(11): 2035-2042.
- Sato-Izawa K, Tokue K, Ezura H. 2018. Development of a stable *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for *Sorghum bicolor* Tx430. *Plant Biotechnol (Tokyo)* **35**(2): 181-185.
- Shehzad T, Okuizumi H, Kawase M, Okuno K. 2009. Development of SSR-based sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) diversity research set of germplasm and its evaluation by morphological traits. *Genetic Resources and Crop Evolution* **56**(6): 809-827.
- Sun H, Tao J, Liu S, Huang S, Chen S, Xie X, Yoneyama K, Zhang Y, Xu G. 2014. Strigolactones are involved in phosphate- and nitrate-deficiency-induced root development and auxin transport in rice. *J Exp Bot* **65**(22): 6735-6746.
- Umehara M. 2011. Strigolactone, a key regulator of nutrient allocation in plants. *Plant Biotechnology* **28**(5): 429-437.
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, et al. 2008. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455**(7210): 195-200.
- Uraguchi D, Kuwata K, Hijikata Y, Yamaguchi R, Imaizumi H, Am S, Rakers C, Mori N, Akiyama K, Irle S, et al. 2018. A femtomolar-range suicide germination stimulant for the parasitic plant *Striga hermonthica*. *Science* **362**(6420): 1301-1305.
- Vakiani E, Luz JG, Buck J. 1998. Substrate specificity and kinetic mechanism of the insect sulfotransferase, retinol dehydratase. *J Biol Chem* **273**(52): 35381-35387.
- Wakabayashi T, Hamana M, Mori A, Akiyama R, Ueno K, Osakabe K, Osakabe Y, Suzuki H, Takikawa H, Mizutani M, et al. 2019. Direct conversion of carlactonoic acid to orobanchol by cytochrome P450 CYP722C in strigolactone biosynthesis. *Sci Adv* **5**(12): eaax9067.
- Wakabayashi T, Ishiwa S, Shida K, Motonami N, Suzuki H, Takikawa H, Mizutani M, Sugimoto Y. 2021a. Identification and characterization of sorgomol synthase in sorghum strigolactone biosynthesis. *Plant Physiol* **185**(3): 902-913.
- Wakabayashi T, Shida K, Kitano Y, Takikawa H, Mizutani M, Sugimoto Y. 2020. CYP722C from *Gossypium arboreum* catalyzes the conversion of carlactonoic acid to 5-deoxystrigol. *Planta* **251**(5): 97.
- Wakabayashi T, Yasuhara R, Miura K, Takikawa H, Mizutani M, Sugimoto Y. 2021b. Specific methylation of (11*R*)-carlactonoic acid by an Arabidopsis SABATH methyltransferase. *Planta* **254**(5): 88.
- Westwood JH, Yoder JI, Timko MP, dePamphilis CW. 2010. The evolution of parasitism in plants. *Trends Plant Sci* **15**(4): 227-235.
- Wu S, Ma X, Zhou A, Valenzuela A, Zhou K, Li Y. 2021. Establishment of strigolactone-producing bacterium-yeast consortium. *Sci Adv* **7**(38): eabh4048.
- Xie X, Yoneyama K, Kisugi T, Uchida K, Ito S, Akiyama K, Hayashi H, Yokota T, Nomura T, Yoneyama K. 2013. Confirming stereochemical structures of strigolactones produced by rice and tobacco. *Mol Plant* **6**(1): 153-163.

-
- Yamamoto T, Hoshikawa K, Ezura K, Okazawa R, Fujita S, Takaoka M, Mason HS, Ezura H, Miura K. 2018. Improvement of the transient expression system for production of recombinant proteins in plants. *Sci Rep* **8**(1): 4755.
- Yoneyama K. 2020. Recent progress in the chemistry and biochemistry of strigolactones. *J Pestic Sci* **45**(2): 45-53.
- Yoneyama K, Akiyama K, Brewer PB, Mori N, Kawano-Kawada M, Haruta S, Nishiwaki H, Yamauchi S, Xie X, Umehara M, et al. 2020. Hydroxyl carlactone derivatives are predominant strigolactones in *Arabidopsis*. *Plant Direct* **4**(5): e00219.
- Yoneyama K, Mori N, Sato T, Yoda A, Xie X, Okamoto M, Iwanaga M, Ohnishi T, Nishiwaki H, Asami T, et al. 2018a. Conversion of carlactone to carlactonoic acid is a conserved function of MAX1 homologs in strigolactone biosynthesis. *New Phytol* **218**(4): 1522-1533.
- Yoneyama K, Xie X, Kim HI, Kisugi T, Nomura T, Sekimoto H, Yokota T, Yoneyama K. 2012. How do nitrogen and phosphorus deficiencies affect strigolactone production and exudation? *Planta* **235**(6): 1197-1207.
- Yoneyama K, Xie X, Yoneyama K, Kisugi T, Nomura T, Nakatani Y, Akiyama K, McErlean CSP. 2018b. Which are the major players, canonical or non-canonical strigolactones? *J Exp Bot* **69**(9): 2231-2239.
- Yoneyama K, Yoneyama K, Takeuchi Y, Sekimoto H. 2007. Phosphorus deficiency in red clover promotes exudation of orobanchol, the signal for mycorrhizal symbionts and germination stimulant for root parasites. *Planta* **225**(4): 1031-1038.
- Zhang Y, Cheng X, Wang Y, Diez-Simon C, Flokova K, Bimbo A, Bouwmeester HJ, Ruyter-Spira C. 2018. The tomato MAX1 homolog, SIMAX1, is involved in the biosynthesis of tomato strigolactones from carlactone. *New Phytol* **219**(1): 297-309.
- Zhang Y, van Dijk AD, Scaffidi A, Flematti GR, Hofmann M, Charnikhova T, Verstappen F, Hepworth J, van der Krol S, Leyser O, et al. 2014. Rice cytochrome P450 MAX1 homologs catalyze distinct steps in strigolactone biosynthesis. *Nat Chem Biol* **10**(12): 1028-1033.

謝辞

本研究の遂行にあたり丁寧な御指導、御鞭撻を賜りました宇都宮大学准教授 野村崇人 先生に深く感謝すると共に御礼申し上げます。

本研究に必要な不可欠な CL、CLA、18-OH-CLA を合成して頂きました大阪府立大学教授 秋山康紀 先生と、森 愛美さんに心から感謝致します。秋山康紀 先生には SL の合成標品を御供与頂いただけでなく、研究遂行にあたり多くの御助言を賜りましたこと深く御礼申し上げます。本研究に御助力頂きましたカリフォルニア大学准教授 David C. Nelson 先生、東京農工大学准教授 伊澤かなな 先生、京都大学教授 山口信次郎 先生、筑波大学教授 三浦謙治 先生に御礼申し上げます。

宇都宮大学准教授 謝 肖男 先生、宇都宮大学名誉教授 米山弘一 先生、愛媛大学助教 米山香織 先生には多くの御助言、御助力を賜りましたこと御礼申し上げます。また、論文審査を担当して頂きました茨城大学教授 鈴木義人 先生、東京農工大学教授 笠原博幸 先生、宇都宮大学准教授 岡本昌憲 先生に心から感謝致します。

最後に、長い学生生活を支えてくれた両親と妻に感謝の意を表し、謝辞とさせていただきます。

依田彬義