

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.