

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	森 愛美
学位授与の日付	2020年3月31日	
論文名	ミヤコグサにおける典型的および非典型的ストリゴラクトン生合成に関する生物有機化学的研究	
論文審査委員	主査	秋山 康紀
	副査	川口 剛司
	副査	片岡 道彦

## 論文要旨

### 序章

ストリゴラクトン (strigolactone, SL) は植物においてアーバスキュラー菌根菌や根寄生植物との相互作用における根圏情報物質として作用するのみならず, 地上部の枝分かれを制御する内生ホルモンとしても働くアポカロテノイドである。SLは構造によって定義され, メチルブテノライド環 (D環) に結合したエノールエーテル架橋を基本骨格とする。SLは典型的 SL と非典型的 SL の2つのグループに大別される。典型的 SL は, 基本骨格のエノールエーテル架橋が三環性ラクトン (ABC環) と結合した構造を持ち, さらにC環の立体配置の違いにより strigol 型と orobanchol 型に分類される。非典型的 SL は三環性ラクトンのB環とC環のどちらか, あるいは両方を欠いた構造を持つ。これまでに天然から約30種の典型的・非典型的 SL が同定されているが, これら多様な SL の構造を作り分ける生合成機構については未だ明らかになっていない。

マメ科モデル植物のミヤコグサ (*Lotus japonicus*) は, 典型的 SL である 5-deoxystrigol (5DS) と非典型的 SL である lotuslactone (LL) を根圏情報物質として生産する。本研究では, 生物有機化学的手法によってミヤコグサにおける典型的・非典型的 SL の生合成機構を解明することを試みた。SL 生合成の共通の中間体である carlactone (CL) からの多様な SL の生成には複数の酸化酵素の関与が推測された。そこで酸化酵素ファミリーのシトクロム P450 や 2-オキシグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ (2OGD) に着目し, それら生合成酵素の機能解析および生合成中間体の同定を行った。

## 第一章 CYP711A ファミリーの LjMAX1 酵素の機能解析

シトクロム P450 である MAX1 酵素のうち、イネの MAX1 ホモログの一つは CL から orobanchol 型 SL を生成することが明らかにされている。ミヤコグサは strigol 型 SL の 5DS を生産するが、その MAX1 ホモログ (LjMAX1) の機能はいまだ明らかになっていない。そこでミヤコグサの SL 生合成における LjMAX1 の機能解析を行った。

酵母で発現させた組換え LjMAX1 酵素は CL から carlactonoic acid (CLA) を経由し、新規 MAX1 産物である 18-hydroxyCLA (18-HO-CLA) を生成した。18-HO-CLA の同定は新規合成した methyl 18-hydroxycarlactonoate (18-HO-MeCLA) との比較により行った。ミヤコグサ内在性レトロトランスポゾン *LORE1* (*Lotus Retrotransposon 1*) を利用した遺伝子タギング集団から *LjMAX1* 欠損変異体を取得し、その 5DS および LL 生産について調べたところ、どちらの SL も生産していないことが明らかになった。この *ljmax1* 変異体を用いて根に対する取り込み実験を行った。[10-<sup>13</sup>C]-18-HO-MeCLA を投与した *ljmax1* 変異体は、<sup>13</sup>C-18-HO-CLA、<sup>13</sup>C-5DS および <sup>13</sup>C-LL を生成した。このことから、18-HO-CLA の下流には LjMAX1 は関与しないことが確定し、5DS と LL は 18-HO-CLA または 18-HO-MeCLA を前駆体とすることがわかった。[1-<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>]-CLA の取り込み実験でも <sup>13</sup>C-5DS および <sup>13</sup>C-LL が生成したことから、CLA から 18-HO-CLA への変換は LjMAX1 を含む重複した経路であることも明らかになった。以上の結果より、LjMAX1 は 5DS および LL の共通の生合成酵素であることが明らかになった。

## 第二章 LjMAX1 下流の生合成酵素である LjLBO 酵素の機能解析

第一章の結果は、ミヤコグサ SL の BC 環の形成は LjMAX1 の下流に存在している別の酵素が担うことを示唆している。LBO 酵素はシロイヌナズナにおいて MAX1 の下流で活性型ホルモンの生成に関与する 2OGD として新たに発見された。シロイヌナズナ LBO は methyl carlactonoate (MeCLA) を MeCLA+16 Da 体と CLA に変換する。LBO はゲノムが解読されている典型的 SL を生産するすべての植物において 1 コピーで保存されており、ミヤコグサにも 1 コピー存在する。そこで、ミヤコグサ MAX1 の下流の酸化酵素としてミヤコグサ LBO の 5DS 生合成への関与について調べることにした。

*LjLBO* をクローニングし、大腸菌で発現させた組換え酵素を用いて MeCLA の変換実験を行った。シロイヌナズナ LBO と同様に *LjLBO* は MeCLA から MeCLA+16 Da 体と CLA を生成した。また 18-HO-MeCLA を基質とした変換実験では 18-HO-CLA は生成したが 5DS は検出されなかった。続いて、*LORE1* 遺伝子タギング集団から *LjLBO* 欠損変異体を取得し、5DS 生産について調べた。その結果、*ljlbo* 変異体も野生型と同程度の 5DS を生産していた。以上の結果より、LjMAX1 の下流に存在すると推定される *LjLBO* は 5DS の生産には関わらないことが明らかになった。

## 第三章 LjMAX1 下流の新規 SL 生合成酵素の探索と同定

SL の生合成において LBO は MAX1 の下流で働くこれまでに報告されていた唯一の酸化酵素であったが、第二章の結果からミヤコグサ LBO が 5DS の生産に関わらないことが分かった。そこで、5DS と LL の生合成に関与する候補酵素遺伝子を新たに探索することにした。

一般にSL生合成はリン酸栄養条件に制御されていることが報告されている。よって、新規のミヤコグサSL生合成遺伝子を発見するために、酸化酵素遺伝子のうちリン酸栄養条件によって発現変動するものをRNA-seqにより探索することで候補遺伝子を絞り込むことができると考えた。

ミヤコグサにおいてリン酸過剰条件下で SL 生産が低下することを確認した後、同様の条件で RNA-seq を行った。その結果、ミヤコグサの全 P450 (473 遺伝子) および全 2OGD (182 遺伝子) の 655 個の遺伝子のうち、リン酸過剰条件下で発現が低下した遺伝子は全体の 49% (P450 224 遺伝子, 2OGD 99 遺伝子) であった。それらのうち発現変動の大きかった上位 29 個の遺伝子についてさらに解析をすすめた。LORE1 遺伝子タギング集団から候補遺伝子の欠損変異体を取得し、それらの SL 生産について調べた。P450 候補遺伝子では、発現変動比 $<0.03$  の上位 9 候補のスクリーニングにより、上位三番目の候補遺伝子にあたるホモ接合挿入変異体が 5DS 生産のみを欠いていることが明らかになった。その遺伝子を 5DS 欠損表現型にちなんで *5-deoxystrigol defective enzyme*, *DSD* と名付けた。2OGD 候補遺伝子では、発現変動比 $<0.35$  の上位 20 候補のスクリーニングにより、上位五番目の候補遺伝子にあたるホモ接合挿入変異体が、LL 生産のみを欠いていることがわかった。その遺伝子を LL 欠損表現型にちなんで *lotuslactone defective enzyme*, *LLD* と名付けた。

次に、欠損株の遺伝子の相補実験を行い、*DSD* および *LLD* の変異がそれぞれ 5DS および LL の欠損の直接の原因であることを確認した。*DSD* と *LLD* の完全長 ORF をクローニングし、発現バイナリーベクター pUB-GW-GFP のユビキチンプロモーターの下流に挿入した。*Agrobacterium rhizogenes* 毛状根形質転換法を用いて、*dsd* 欠損株に pUB-*DSD*-GW-GFP、*lld* 欠損株に pUB-*LLD*-GW-GFP をそれぞれ導入した。空ベクターで形質転換した *dsd* 欠損株の根滲出液では 5DS は検出されなかったが、pUB-*DSD*-GW-GFP を導入した *dsd* 欠損株の根滲出液では 5DS 生産が回復した。同様に、空ベクターで形質転換した *lld* 欠損株の根滲出液では LL は検出されなかったが、pUB-*LLD*-GW-GFP を導入した *lld* 欠損株の根滲出液では LL 生産が回復した。これらの結果から、*DSD* と *LLD* における変異が 5DS と LL それぞれの生合成欠損の原因であることが明らかになった。

*DSD* および *LLD* について系統樹解析を行ったところ、*DSD* は P450 ファミリーのうち CYP722C サブファミリーに属することが分かった。他のマメ科植物では CYP722C と CYP722A の両方が存在していた。*LLD* は 2OGD ファミリーの DOXC55 クレードに含まれ、隣のクレードの DOXC54 には LBO が含まれていた。

イネやシロイヌナズナでは、ジベレリン A<sub>3</sub> 処理により SL 生産および既知 SL 生合成遺伝子発現が低下することが分かっている。そこで、ミヤコグサについても調べたところ、SL 生産と *DSD* および *LLD* を含む SL 生合成遺伝子発現の低下が同様に見られることが分かった。

*ljmax1* 変異体がミヤコグサ SL の両方を欠損し、*dsd* 変異体が LL のみを生成したことを考慮すると、*DSD* は LjMAX1 の下流の酵素であると予想された。それを確認するために、*dsd* 変異体の根に対する <sup>13</sup>C-CLA を用いた取り込み実験を行い、LC-MS/MS で根滲出液中の標識生成物を分析した。その結果、<sup>13</sup>C-5DS は検出されず、<sup>13</sup>C-18-HO-CLA が検出された。このことから、*DSD* は MAX1 の下流の SL 生合成の後期段階にあり、*DSD* の酵素機能は CLA の C-18 ヒドロキシル化ではないことが明らかになった。一方、*ljmax1* 変異体がミ

ヤコグサ SL の両方を欠損し、*lld* 変異体が 5DS のみを生成したことを考慮すると、DSD と LLD は LjMAX1 の下流で分岐した 5DS と LL それぞれの非共通経路に含まれる酵素であることがわかる。この発見は、MAX1 の下流の典型的または非典型的 SL を作り分ける生合成酵素の初めての発見である。

## 結論

本研究において、生物有機化学的手法を用いミヤコグサにおける典型的 SL である 5DS と非典型的 SL である LL の生合成経路の解明を行った。その結果、LjMAX1 が CL を 18-HO-CLA にまで変換する 5DS と LL の共通生合成酵素であること、DSD と LLD が 5DS と LL それぞれの非共通経路に含まれる酵素であること、LjLBO は 5DS や LL の生合成経路とは別の SL ホルモンを生成する経路に関与していることを明らかにした。また、それらは全てジベレリンとリン栄養により負に制御されていることも明らかにした。今後、さらに DSD と LLD の解析を進めることにより、植物が 2 つのクラスの SL を生産する方法と理由について理解を深めていくことが期待される。

## 審査結果の要旨

ストリゴラクトン (strigolactone, SL) は植物においてアーバスキュラー菌根菌や根寄生植物との相互作用における根圏情報物質および地上部の枝分かれを制御する内生ホルモンとして働くアポカロテノイドである。SL は構造によって定義され、メチルブテノライド環 (D 環) に結合したエノールエーテル架橋を基本骨格とする。SL は典型的 SL と非典型的 SL の 2 つのグループに大別される。典型的 SL は、基本骨格のエノールエーテル架橋が三環性ラクトン (ABC 環) と結合した構造を持つ。一方、非典型的 SL は三環性ラクトンの B 環と C 環のどちらか、あるいは両方を欠いた構造を持つ。これまでに天然から約 30 種の典型的・非典型的 SL が同定されているが、これら多様な SL の構造を作り分ける生合成機構については未だ明らかになっていない。マメ科モデル植物のミヤコグサ (*Lotus japonicus*) は、典型的 SL である 5-deoxystrigol (5DS) と非典型的 SL である lotuslactone (LL) を生産する。そこで、本学位申請者は、生物有機化学的手法によってミヤコグサにおける典型的・非典型的 SL の生合成機構を解明することを試みた。SL 生合成の共通の中間体である carlactone (CL) からの多様な SL の生成には複数の酸化酵素の関与が推測された。そこで酸化酵素ファミリーのシトクロム P450 や 2-オキシグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ (2OGD) に着目し、それら生合成酵素の機能解析および生合成中間体の同定を行った。

第一章では、CYP711A ファミリーに属するシトクロム P450 であるミヤコグサ MAX1 酵素の機能解析を行った。酵母で発現させた組換え LjMAX1 酵素は CL から carlactonoic acid (CLA) を経由し、新規 MAX1 産物である 18-hydroxyCLA (18-HO-CLA) を生成したが、5DS は生成しなかった。18-HO-CLA の同定はメチルエステル誘導体を新規に化学合成した methyl 18-hydroxycarlactonoate (18-HO-MeCLA) と比較して行った。ミヤコグサ内在性レト

ロトランスポゾン *LOREI* 遺伝子タギング集団から *LjMAX1* 欠損変異体を取得し、その 5DS および LL 生産について調べたところ、どちらも生産していなかった。*ljmax1* 変異体に  $[10-^{13}\text{C}]-18\text{-HO-MeCLA}$  を投与したところ、 $^{13}\text{C}-18\text{-HO-CLA}$ 、 $^{13}\text{C}-5\text{DS}$  および  $^{13}\text{C}-\text{LL}$  に変換されたことから、18-HO-CLA の下流の反応には *LjMAX1* は関与しないことが確定し、5DS と LL は 18-HO-CLA または 18-HO-MeCLA を前駆体とすることがわかった。 $[1-^{13}\text{CH}_3]-\text{CLA}$  の *ljmax1* 変異体による取り込み実験でも  $^{13}\text{C}-5\text{DS}$  および  $^{13}\text{C}-\text{LL}$  が生成したことから、CLA から 18-HO-CLA への変換は *LjMAX1* を含む重複した経路であることも明らかになった。以上の結果から、*LjMAX1* が 5DS および LL の共通の生合成酵素であることを明らかにした。

第二章では、ミヤコグサ LBO 酵素の機能解析を行った。LBO 酵素はシロイヌナズナにおいて MAX1 の下流で活性型ホルモンの生成に関与する 2OGD として新たに発見された。LBO はミヤコグサゲノムにも 1 コピー存在する。そこで、ミヤコグサ MAX1 の下流の酸化酵素としてミヤコグサ LBO の 5DS 生合成への関与について調べた。*LjLBO* をクローニングし、大腸菌で発現させた組換え酵素を用いて MeCLA の変換実験を行った。シロイヌナズナ LBO と同様に *LjLBO* は MeCLA から MeCLA+16 Da 体と CLA を生成した。また、18-HO-MeCLA を基質とした変換実験では 18-HO-CLA は生成したが 5DS は検出されなかった。*LOREI* 遺伝子タギング集団から *LjLBO* 欠損変異体を取得し、5DS 生産について調べたところ、野生型と同程度の 5DS を生産していた。以上の結果から、*LjLBO* は 5DS の生産には関与しないことを明らかにした。

第三章では、*LjMAX1* 下流の新規 SL 生合成酵素の探索を行った。SL 生合成はリン酸栄養条件に制御されている。よって、酸化酵素遺伝子のうちリン酸栄養条件によって発現変動するものを RNA-seq 解析で探索して候補遺伝子を絞り込み、*LOREI* 遺伝子タギング集団から候補遺伝子の欠損変異体を取得し、SL 生産の有無を調べることで新規のミヤコグサ SL 生合成遺伝子を探索した。P450 候補遺伝子では、発現変動比が大きかった上位 9 候補のうち、3 番目の候補遺伝子の欠損変異体が 5DS 生産のみを欠いていることが分かった。その遺伝子を 5-deoxystrigol defective enzyme, DSD と名付けた。2OGD 候補遺伝子では、上位 20 候補のうち、5 番目の候補遺伝子の欠損変異体が LL 生産のみを欠いていることが分かった。その遺伝子を lotuslactone defective enzyme, LLD と名付けた。DSD と LLD の完全長 ORF をクローニングし、*Agrobacterium rhizogenes* 毛状根形質転換によりそれぞれの欠損変異体に導入したところ、5DS と LL の生産能が回復した。DSD および LLD について系統樹解析を行ったところ、DSD は CYP722C サブファミリーに、LLD は DOXC55 クレードに属することが分かった。イネやシロイヌナズナでは、ジベレリンにより SL 生合成は負に制御される。そこで、ミヤコグサについても調べたところ、SL 生産と DSD および LLD を含む SL 生合成遺伝子発現が下方制御されることが分かった。以上、MAX1 の下流で典型的・非典型的 SL を作り分ける生合成酵素の初めての例として DSD および LLD を同定した。

本申請論文は、ミヤコグサにおける典型的・非典型的 SL 生合成における共通経路を担う MAX1 酵素の機能を明らかにすると共に、本酵素の生成する新規産物を同定し、さらに、典型的・非典型的 SL それぞれの生合成経路に含まれる新規の酸化酵素遺伝子の同定

に成功し、それらの調節機構を明らかにした画期的な研究である。これらの知見は SL 生合成の全容解明だけでなく、SL 調節を介した菌根共生促進、根寄生植物防除、植物形態調節を可能にする応用技術の開発に資するものであり、生理活性天然物化学および植物化学調節学に大きく貢献するものである。したがって、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。