



# アフリカの農業を救うストリゴラクトン高活性類縁体の創出

## 1. 研究の目的

根寄生雑草ストライガは、アフリカ全域で主要作物に寄生し、生育不良、収量の減少を引き起こす。被害額は100億ドルと試算されており、エイズやマラリアと並ぶアフリカの重要問題として認識されている。植物ホルモンであるストリゴラクトン (SL) はストライガの自殺発芽誘導物質として知られており、スーダンでは圃場試験でストライガ駆除に一定の効果が認められている (Kountche, 2019)。一方、気候や土壌条件も多様なアフリカでは地域により天然 SL の安定性や効果にばらつきがあり駆除効果が認められない場合も多い。加えて、実験室レベルでも天然 SL は分解されやすく、土壌散布するには合成コストが高いという問題も挙げられる。広大なアフリカにおいて SL による根寄生雑草の防除を実装するには安価かつ大量に SL を生産する系の確立及び、地域特性に適合した活性と安定性を有する SL を創出する必要がある。

申請者らは、SL 化合物を大量に生産するためのホストとして光合成微生物「藍藻」と真核微生物「酵母」に着目した。植物における SL 生産の場は葉緑体と細胞質であり  $\beta$  カロテンを出発物質として前駆体カーラクトン (CL) まで葉緑体で生産され、細胞質に局在する P450 酵素 MAX1 により合成される (Zhang, 2014)。葉緑体の起源生物である藍藻は  $\beta$  カロテンを豊富に含み葉緑体と同様の代謝活性を有する。一方、酵母の細胞内環境は植物細胞質と類似しており MAX1 を機能的に発現させることができる。これまでに藍藻シネココッカス種において植物由来 SL 代謝系遺伝子 (D27、CCD7、CCD8) を導入し、CL を高生産することに成功した (特願 2020-22999)。さらにこれをイネの MAX1 ホモログを導入した酵母と共培養することで、作物の 5000 倍以上の高効率での SL 生産を達成した (特願 2021-164871)。

本研究では、これまでに構築した藍藻-酵母による SL 生産系を改良し、SL 生産システムの更なる効率化を図るとともに、多様な根寄生雑草に高い活性を持ち、アフリカ土壌においても安定な SL 類縁体 (High active- and stable-SL: H-SL) を創製する。アフリカにおける SL の社会実装に向けて、スーダンとは異なる気候、土壌条件の地域を対象としてストライガ被害および分布状況、土壌環境の調査を行うと共にアフリカでの SL によるストライガ防除の実装可能性を検討する。主な研究実施項目は以下の通りである。

- (1) SL 生産システム効率化
- (2) 新規 SL 類縁体 H-SL のスクリーニング
- (3) アフリカにおけるストライガ汚染状況、土壌性質の調査
- (4) H-SL の性能評価と構造決定
- (5) H-SL のアフリカ土壌での安定性、ストライガ防除効果の検証

## 2. 研究の計画

2022 年度は研究項目 (1)、(2) に注力して実施した。

- (1) SL 生産システム効率化
  - ① CL 生産ホスト藍藻の検討: CL 生産に適した藍藻ホストを検討した。遺伝子導入は独自開発した接合伝達法 (特願 2020-076701) を利用し研究を実施した。
  - ② 藍藻 CL 生産株の代謝ボトルネック解除: 藍藻 CL 生産系の代謝ボトルネックであると考えられる初発酵素 D27 の発現と活性の強化を目指して研究を実施した。
  - ③ 藍藻 CL 生産株における CL の輸送強化: CL 生産株は CL 生産量の半分が細胞内に蓄積しているため、CL 輸送体候補である ORF1570 に着目し CL 排出への効果を調べることを計画した。
  - ④ 酵母 SL 排出強化: SL 生産酵母において、植物で報告されている SL 輸送体を発現させ SL の細胞外への排出を促すことを計画した。
- (2) 新規 SL 類縁体 H-SL のスクリーニング
  - ① MAX1 変異ライブラリーの構築とスクリーニング: SL の構造変化を誘起することで新規性質を持つ SL 類縁体の取得を目指す。最初のステップとして根寄生雑草オロバンキ (*Orobancha minor*) の種子を用いたバイオアッセイ系の予備実験を計画した。

- ②多様な天然型MAX1の導入とスクリーニング:自然界に存在する多様なMAX1ホモログを酵母に導入しSL構造への影響を調べる。2022年度は材料となるMAX1発現酵母を作製した。

### 3. 研究の成果

#### (1) SL 生産システム効率化

- ①CL 生産ホスト藍藻の検討:接合伝達法を用いることで SL 代謝系遺伝子を海洋性藍藻 *Synechococcus* 種へ導入することに成功した。上記と関連して、SL 生産に使用する発現ベクターを開発し、成果を論文としてまとめ発表した (5. 研究発表(1)学会誌等①、②)。また藍藻からの試料調製のため細胞破碎装置を新たに導入した。
- ②藍藻CL生産株の代謝ボトルネック解除:D27に特異的な配列情報を探索し、一部の藍藻がD27に相同な遺伝子を持つことを発見した。さらに、この藍藻由来新規D27の活性は現在採用している緑藻由来D27遺伝子よりも高い活性を持つことを確認した。
- ③藍藻CL生産株におけるCLの輸送強化:ORF1570変異株を構築しCLの生産量や排出を解析したが、変異株のCL排出量は野生株と同程度であり、当該遺伝子は無関係であると考えられた。
- ④酵母SL排出強化:藍藻-酵母培養液中のCL, SL存在量を比較すると、酵母細胞内にはCLは存在せず、SLは培養上清中にのみ検出された。この結果より、藍藻で生産されたすべてのCLはSLへと変換され細胞外に排出されていると考えられた。

#### (2) 新規 SL 類縁体 H-SL のスクリーニング

- ①MAX1変異ライブラリーの構築とスクリーニング:藍藻-酵母培養系の上清に含まれるSL活性を直接評価するために、オロバンキを用いたバイオアッセイ系の準備を進めた。CLを含むシアノバクテリア培養液を用いて寒天培地を作製し、この上にオロバンキ種子を播種して効果を調べた結果、オロバンキの発芽が促進されることが確認できた。
- ②多様な天然型MAX1の導入とスクリーニング:試験の大規模化と効率化のため、人工気象器とプレートリーダーを導入した。また、従来研究に用いているイネMAX1と異なる反応を触媒するアスパラガスとラッカセイのMAX1ホモログ遺伝子を発現する酵母を取得した。

### 4. 研究の反省・考察

#### (1) SL 生産システム効率化

- ①CL 生産ホスト藍藻の検討:CL 生産に適した藍藻ホストとして海洋性藍藻を検討した。海洋性藍藻は生育が早く、海水が利用できることから CL 生産の効率化、大規模化が期待できる。さらに、接合伝達法を利用することで、自然形質転換能を持たない非モデルの藍藻にもベクター導入できることも示された。今後、様々な藍藻種での CL 生産が期待できる。
- ②藍藻CL生産株の代謝ボトルネック解除:大腸菌を用いた試験系において、イネD27と比べ、藍藻由来の新規D27は高い活性を持つことが示された。今後は藍藻内で活性試験を実施し有用性を検討する。
- ③藍藻CL生産株におけるCLの輸送強化:ORF1570を欠損した場合においてもCLの排出量に差が認められなかったことから、ORF1570が唯一の輸送体ではないことが示唆された。CLは藍藻細胞外に十分に輸送されていると判断し、本実験項目は一旦、止めることとした。
- ④酵母SL排出強化:酵母で生産された全てのSLが細胞外に排出されていることが示されたため、本項目に関しても一旦、止めることとする。一方、藍藻-酵母共培養時の培地を検討した結果、栄養を制限した合成培地においてSL生産量は5倍以上増加することが示されたため、今後は培養条件の検討を中心に進める予定である。

#### (2) 新規 SL 類縁体 H-SL のスクリーニング

- ①MAX1変異ライブラリーの構築とスクリーニング:スクリーニングのための条件検討を更に進める。またMAX1に変異を導入したライブラリー作製に着手する。
- ②多様な天然型MAX1の導入とスクリーニング:ラッカセイとアスパラガスのMAX1の効果について、研究を進めると同時に他のMAX1についても遺伝子をデザインして酵母株を構築する。またSL関連分子を効率的に検出するため、LC-MS/MSの代謝産物ライブラリーを検出装置にインストールし、以後の研究に用いる予定である。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ①A. Kaltenbrunner, (他 6 名), S. Watanabe, C. Steglich, A. Wilde, WR. Hess, Regulation of pSYSa defense plasmid copy number in *Synechocystis* through RNase E and a highly transcribed asRNA. *front Microbiol.* **14**, 1112307 (2023).
- ②Y. Sakamaki, (他 4 名), S. Watanabe, Characterization of a cyanobacterial rep protein with broad-host range and its utilization for expression vectors. *front Microbiol.* **14**, 1111979 (2023)

### (2) 口頭発表

坂巻裕、前田海成、荷村-松根かおり、千葉櫻拓、渡辺智、シアノバクテリアにおける自律複製領域の探索とそれを利用した高発現ベクターの構築、日本農芸化学会2023年度広島大会・オンライン開催 (2023年3月)

### (3) 出版物

なし