

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β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β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法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

- (1) SL生産システム効率化
 - ① CL生産ホスト藍藻の検討：昨年度に引き続き、CL生産に適した藍藻ホストを検討した。広島大学との共同研究により見出した補色を回避できる伸長変異株 (特願2021-148599) にCL合成酵素発現プラスミドを導入しCLの生産量を野生株と比較した。
 - 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の活性の強化を目指して研究を実施した。昨年度見出した藍藻由来D27をCL合成酵素発現プラスミドに導入し、これを形質転換した藍藻株を用いてCLおよびSLの生産量を解析した。
 - ③ SL生産量の最適化：藍藻と酵母を共培養する際の培地について検討した。
- (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。(1) -②で作成した藍藻株が生産したCLの生理活性について、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に

より評価した。

- 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。新たに4種類のMAX1ホモログの発現酵母を作製した。
- (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
東アフリカのジブチにおける根寄生植物の分布を調べるため、根寄生植物に感受性を示すイネやソルガムを用いて圃場の汚染状況を調査した。

3. 研究の成果

(1) SL生産システム効率化

- ① CL生産宿主藍藻の検討：細胞が伸長した藍藻変異株においてもCLを合成可能かどうか検討した。CL合成酵素発現プラスミドを伸長変異株へと導入し、CL生産量を野生株と比較したが、細胞伸長変異株ではCL生産量が1/10程度まで減少した。
- ② 藍藻CL生産株の代謝ボトルネック解除：シアノバクテリアのアカリオクロリス種およびサーモシネココッカス種より見出したD27相同遺伝子を、それぞれCL合成酵素発現プラスミドに組み込み、CLとSLの生産量を比較した。その結果、アカリオクロリス由来D27はこれまで使用してきた緑藻由来D27の約2倍のCL生産量であることが示された。SLの生産量は緑藻由来D27とほぼ同等であった。一方、サーモシネココッカスのD27を用いた場合には、CLは全く合成されなくなった。

上記①、②と関連して、藍藻を用いた1,8-cineole生産系および、藍藻物質生産系に利用できる新規発現ベクターの開発について、成果を論文としてまとめ、発表した（学会誌等①⑥、出版物①）。

- ③ SL生産量の最適化：藍藻と酵母を共培養する際に培地について検討した結果、栄養が豊富に含まれているYPD培地よりも貧栄養のSG培地を用いた場合においてSL生産量が約5倍に増加することがわかった。

(2) 新規SL類似体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：アカリオクロリスD27を使用した生産系において取得されたCLに、生理活性（根寄生植物の発芽促進活性）があるかどうかについて解析した。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。その結果、アカリオクロリスD27を使用した場合においても、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：これまで研究に用いてきたイネ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ホモログに加え、タルウマゴヤシのMAX1ホモログを発現する酵母を取得した。また得られたSL様物質を特定できるよう、LC-MS-MSの解析ソフト（SCIEX社、スペクトルライブラリ）を新たに導入した。

(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

ジブチ市のドゥダ農場の圃場の土を用いて根寄生植物の試験を実施した。栽培試験ではイネは育たなかった。これは圃場の土がアルカリ性であったことが原因と考えられた。一方、ソルガムは十分な成長を示し、根寄生植物の寄生も確認されなかった。

4. 研究の反省・考察

(1) SL生産システム効率化

- ① CL生産宿主藍藻の検討：藍藻伸長変異株はCL生産には適さないことがわかった。今後は増殖の早い藍藻種を中心に、CL生産に適した藍藻ホストの検討を続ける。2022年度に作成した海洋性藍藻についても検討する。
- ② 藍藻CL生産株の代謝ボトルネック解除：アカリオクロリスD27はイネD27と比べ、高い活性を持つことが示された。一方で、サーモシネココッカスD27はCLを合成しないことが分かった。藍藻由来D27が有用であることが示されたことから、今後は他の藍藻由来D27を使用してCL合成活性を比較する。活性に違いが確認できた場合、それぞれのD27の構造を比較し、活性に必要な領域を同定する。また、新たに開発した新規発現ベクターについても検討を進める。
- ③ SL生産量の最適化：SG培地を用いることでSL生産量が増加したことから、今後はSG培地を生産試験に使用する。アカリオクロリスD27を利用して従来の2倍の効率でCLが生産で

きたにも関わらずSL生産量は同程度であった。酵母との共培養段階がSL生産の律速であると考えられたため、藍藻-酵母の共培養条件を検討する。

(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：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を進める。
- 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、タルウマゴヤシのMAX1の効果について研究を進める。また他のMAX1についても遺伝子をデザインして酵母株を構築する。

(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

試験に用いたドゥダ農場の圃場の土は根寄生植物が育たない土壌環境であり、寄生植物による汚染度も低いと考えられた。アフリカにおいても地域によって根寄生植物の汚染度が異なることがわかった。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Y. Sakamaki, M. Ono, N. Shigenari, T. Chibazakura, K. Shimomura, S. Watanabe, Photosynthetic 1,8-cineole production using cyanobacteria. *Biosci Biotechnol Biochem.* **87** (5)563-568 (2023).
- ② K. Dayarathne, T. Ishikawa, S. Watanabe, Y. Ishikawa, K. Aikeranmu, H. Kitagawaa, N. Komatsubara, M. Yamaguchi, M. Kawai-Yamada. Heterologous expression of mtf and mtc genes of *Pseudanabaena foetida* var. *intermedia* is sufficient to produce 2-methylisoborneol in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr.* **11** (5)e0256123 (2023)
- ③ H. Hasegawa, Y. Kanasaki, S. Watanabe, K. Tanaka, A high-temperature sensitivity of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 due to a tRNA-Leu mutation. *J Gen Appl Microbiol.* **69**(3):167-174 (2023)
- ④ A. Hishida, R. Shirai, A. Higo, M. Matsutani, K. Nimura-Matsune, T. Takahashi, S. Watanabe, S. Ehira, Y. Hihara. CRISPRi knockdown of the cyabrB1 gene induces the divergently transcribed icfG and sll1783 operons related to carbon metabolism in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Gen Appl Microbiol.* (2024) in press.
- ⑤ H. Hasegawa, I. Kobayashi, N. Bairagi, S. Watanabe, K. Tanaka. DnaK2 Mediates a Negative Feedback Regulation of the Heat Shock Responsive Hik2-Rre1 Two-component System in the Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol.* **65**(1):120-127 (2024)
- ⑥ K. Ohdate, M. Sakata, K. Maeda, Y. Sakamaki, K. Nimura-Matsune, R. Ohbayashi, W. Hess, S. Watanabe. Discovery of novel replication proteins for large plasmids in cyanobacteria and their potential applications in genetic engineering. *Front Microbiol.* **15**:1311290 (2024)

(2) 口頭発表

- ① 坂田 実乃里、青柳 智大、荷村(松根) かおり、Alena Kaltenbrunner、Wolfgang Hess、渡辺 智、藍藻*Synechocystis* sp. PCC 6803の巨大プラスミドpSYSAの複製メカニズム解明とベクターの開発、2023年度日本農芸化学会関東支部大会 (2023年9月)
- ② 田中 基貴、坂巻 裕、前田 海成、高市 真一、梅野 大輔、伊藤 晋作、渡辺 智、ストリゴラクトン生産強化に向けた新規D27の活性評価、2023年度日本農芸化学会関東支部大会 (2023年9月)
- ③ 大舘 和真、前田 海成、渡辺 智、藍藻*Synechocystis* sp. PCC 6803の細胞外硫酸多糖 シネカンの大量生産系の確立、2023年度日本農芸化学会関東支部大会 (2023年9月)
- ④ 小野 美月、坂巻 裕、重成 希、千葉櫻 拓、下村 健司、渡辺 智、シアノバクテリアを用いた光合成による1,8-シネオール生産、第67回TEAC (2023年10月)
- ⑤ 駒形 遥、坂巻 裕、内田 小百合、浦井 誠、兼崎 友、朝井 計、渡辺 智、スピルリナ強光培養後に出現するアルカリバチルス出現メカニズム解析、The 36th JSME and The

13 th ASME (2023年11月)

- ⑥ 坂田 実乃里、青柳 智大、荷村(松根) かおり、Alena Kaltenbrunner、Wolfgang Hess、渡辺 智、シアノバクテリアのプラスミド複製メカニズムとCyRepA1タンパク質の保存性に関する研究、The 36th JSME and The 13 th ASME (2023年11月)
- ⑦ 大館 和真、坂田 みのり、前田 海成、坂巻 裕、荷村-松根 かおり、大林 龍胆、渡辺 智、シアノバクテリアの巨大プラスミドDNA複製に関わる新規Repタンパク質の同定と発現ベクター系への利用、第46回日本分子生物学会年会 (2023年12月)
- ⑧ 大串航世、末崎裕寛、荷村-松根かおり、大林龍胆、渡辺 智、藍藻におけるDNAヘリカーゼDnaBとヘリカーゼローダーDciAの相互作用解析、第46回日本分子生物学会年会 (2023年12月)
- ⑨ 嘉数 健太、町田 颯太郎、渡辺 智、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803におけるRNA結合タンパク質Rbpの機能解析、第46回日本分子生物学会年会 (2023年12月)

(3) 出版物

- ① 坂巻 裕、坂田実乃里、前田海成、渡辺 智、シアノバクテリアによる物質生産に有用な広宿主域発現ベクターの開発、バイオサイエンスとインダストリー (B&I)、Vol.2 (2024)