

2024年度（第49回）學術研究振興資金 學術研究報告

学 校 名	東 京 農 業 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	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	研 究 分 野	農 学
キ ー ワ ー ド	①ストリゴラクトン ②根寄生雑草 ③アフリカ農業支援 ④生合成工学 ⑤光合成		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
渡 辺 智	生 命 科 学 部	准 教 授	研究代表者 総括

○研究分担者

[illegible]

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生産の場合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

2024年度は以下の計画に沿って実施した。

- (1) SL生産システムの効率化：藍藻CL生産株の代謝ボトルネック解除に向けて高い活性をもつCL合成酵素を探索するとともに、合成酵素の改変を進め経路を強化する。
- (2) 新規SL類縁体H-SLスクリーニング系の構築：アスパラガス、ラッカセイ等のMAX1ホモログを酵母へと組み込みSL合成への効果を調べる。
- (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：ジブチにおいて土壌の成分を分析すると共に、根寄生植物の汚染調査を実施する。シーケンスによりジブチ土壌の菌叢を明らかにする。
- (4) H-SLの性能評価・構造解析：藍藻-酵母を用いて生産したSLについてストライガ等、根寄生植物の発芽を指標に生理活性を評価する。研究の進展によりH-SLが得られた場合、現状のSLと効果を比較する。

3. 研究の成果

(1) SL生産システムの効率化

- ① 藍藻CL生産株の代謝酵素の検討：新たに三種の藍藻（*Geminocystis* NIES-3709、*Synechococcus* PCC 7335、*Leptolyngbya* PCC 7375）にD27と相同な遺伝子を見出したため、被子植物タルウマゴヤシのD27とともに、それぞれCL合成プラスミドに組み込み、これを形質転換した組換え藍藻を得た。CL生産について調べた結果、すべてのコンストラクトでCL生産を確認した。CL合成量は当初から用いてきた緑藻D27用いたCL生産藍藻より増加した。構築した8種のコンストラクトの中では藍藻*Acaryochloris* D27 (AmD27)を用いたCL生産プラスミドがもっとも多くCLが生産されたため、以後の実験にはAmD27を用いることとした。D27の次の反応を担うCCD7およびCCD8について、ホスト藍藻に最適化した人工遺伝子をデザインし、これをCL生産系に組み込んで生産量への影響を比較したがCL生産量はコドン改変前と同程度であった。
- ② CL生産ホスト藍藻の検討：これまでホストとして用いてきた藍藻*Synechococcus* PCC 7942の近縁種であり、増殖が早いと言われている*Synechococcus* UTEX 2973にCL生産プラスミドを形質転換し、CL生産量を比較した。予想に反し、CL生産量は20分の1にまで減少した。
- ③ SL生産量の最適化：上記のCL生産藍藻とMAX1発現酵母を混ぜて培養し、培養液中に含まれるSL（4-デオキシオロバンコール、4D0）の生産量を比較した。CL生産量に比例して4D0生産量も増加すると期待したが、予想に反し、4D0生産量はCL生産量に依らず一定であった。

(2) 新規SL類縁体H-SLスクリーニング系の構築

多様な天然型MAX1の導入とスクリーニング：自然界では多様なSLが存在しており、植物ごとにそれぞれのSLに対する感度が異なることが知られている。これまで研究に用いてきたイネMAX1が生産する4D0は、典型型のSLに分類される。一方、アスパラガスやラッカセイのMAX1ホモログ（AoMAX1, AhMAX1）は、骨格が異なる非典型型SLブリオシンビオール（BSB）を生成する。そこで、AoMAX1, AhMAX1を発現する酵母をそれぞれ取得し、CL生産藍藻と共培養することでSLを生産させた。期待通り、BSBとBSB異性体をえることができ、酵母で発現させるMAX1を変えることで多様なSLを効率よく生産できることがわかった。

(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

ジブチの圃場より抽出したDNAについて、アンプリコンシーケンスにより菌叢を解析した。施肥の有無で比較すると、施肥した土壌ではDNAの回収率が向上し、菌叢が多様化することがわかった。また、ある圃場では硝酸細菌群に分類される*Mesorhizobium*が施肥された農地で有意に増えていることが明らかとなった。

(4) H-SLの性能評価・構造解析

藍藻-酵母を用いて生産したSL（4D0）の生理活性について、根寄生植物であるストライガおよびオロバンキの種子の発芽を指標に確認した。今後、これまでに得られた藍藻、酵母株や培養の条件を検討することで、より大規模なスケールでの研究を実施したい。

尚、上記の研究を進めるにあたり、無菌操作を行うための卓上式クリーンベンチ、作成した株を凍結保存するためのフリーズ超低温槽、およびデータ解析のためのパソコンを新規に購入した。

4. 研究の反省・考察

本研究から、利用する酵素や培養条件、ホストとする藍藻種など、CL生産の条件を検討できた。特に初発酵素のD27については、藍藻がD27ホモログをもつことを新たに発見し、これを利用することでCL生産量を増産できた。一方、酵母との共培養による4D0生産量はCL生産量に依らず一定であったことから、SL生産量を増加させるためには、MAX1発現酵母の条件の検討が必要であることがわかった。

酵母において発現させるMAX1ホモログを変更することで、非典型SLであるBSBを生産させることに成功した。根寄生植物は植物ごとに感知するSLが異なることが知られている。本発見は多様なSLを大量に生産できる可能性を示した画期的な成果であり、今後、実用化に向けてさらなる生産経路の強化や大量培養にむけた条件の検討が必要である。

アフリカ、ジブチでの調査を実施し、土壌の性質や菌叢を明らかにした。ジブチ土壌はアルカリ性であり窒素、リン、カリウム等の作物の栽培に必要な栄養塩が不足していることが

わかった。施肥によって一部改善が見られたが、リンが不足する傾向が認められた。家畜の糞などリンを多く含む肥料を多く施肥することで土壌の性質改善が期待できる。また、菌叢解析からも、ジブチの圃場の土壌が農業に適していないことが明らかとなった。施肥により、菌叢が多様化することが確認でき、土壌微生物の観点からも土壌の質を評価できることがわかった。また、当初の予想に反し、ジブチで実施した生物試験（根寄生植物感受性イネを用いた試験）では根寄生植物が検出されなかった。ジブチの土壌は栄養に乏しく農地としてほとんど利用されてこなかったこと、根寄生植物が蔓延している中央アフリカから離れていることから、現状では根寄生植物に汚染されていないと考えられる。今後、より感度の高い解析方法などで、より詳細に調べる必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Abdel-Hady GN, Hino T, Murakami H, Miwa A, Thi Thuy Cao L, Kuroki T, Nimura-Matsune K, Ikeda T, Ishida T, Funabashi H, Watanabe S, Kuroda A, Hirota R. Laboratory evolution and characterization of nitrate-resistant phosphite dehydrogenase (PtxD) for enhanced cyanobacterial cultivation. *J Biotechnol.* **402** 59-68 (2025)
- ② Schmidt N, Stappert N, Nimura-Matsune K, Watanabe S, Sobotka R, Hagemann M, Hess WR. Epigenetic control of tetrapyrrole biosynthesis by m4C DNA methylation in a cyanobacterium. *DNA Res.* **31**(6):dsae035 (2024)
- ③ Sato M, Kawaguchi T, Maeda K, Watanabe M, Ikeuchi M, Narikawa R, Watanabe S. Functional Modification of Cyanobacterial Phycobiliprotein and Phycobilisomes through Bilin Metabolism Control. *ACS Synth Biol.* **13**(8):2391-2401 (2024)
- ④ Toda N, Inoue-Kashino N, Fujita H, Yoshida R, Nimura-Matsune K, Watanabe S, Kuroda A, Kashino Y, Hirota R. Cell morphology engineering enhances grazing resistance of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 for non-sterile large-scale cultivation. *J Biosci Bioeng.* **137**(4):245-253 (2024)

(2) 口頭発表

- ① 渡辺智、シアノバクテリアにおける遺伝子工学技術開発～新規複製タンパク質の発見とその利用～日本農芸化学会2025年度大会（2025年3月）
- ② 岩田みさき、佐藤瑞穂、川口毅、前田海成、渡辺麻衣、池内昌彦、成川礼、渡辺智、ベリン合成制御によるシアノバクテリアのフィコビリソームの機能改変、第66回日本植物生理学会年会（2025年3月）

(3) 出版物

なし