

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04492

研究課題名(和文) 進化過程に隠されたジベレリン起源物質の構造解明

研究課題名(英文) Identification of ancestral gibberellin in a moss

研究代表者

中嶋 正敏 (NAKAJIMA, MASATOSHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：50237278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：ジベレリンの合成中間体であるent-カウレン酸(KA)から代謝され、ヒメツリガネゴケの分化を誘導する活性型代謝物として、KAの3位が水酸化された3OH-KAを同定した。加えてNGS解析からの成果としてKAの2位を水酸化する酵素(KA2ox)遺伝子を特定し、2OH-KA合成過程が不活性化反応であることも示した。さらに、KA2ox遺伝子の発現応答様式を解析して、上記3OH-KAが活性本体であることも示した。これら一連の研究成果は査読付き原著論文として受理され、公表の機会を得た(Miyazaki et al., 2018)。

研究成果の概要(英文)：The moss *Physcomitrella patens* has a partial biosynthetic pathway for gibberellin and produces an intermediate, ent-kaurenoic acid (KA). Protonemal cell differentiation is incomplete under KA-deficiency and restored by KA application but not by gibberellin. Herein, two KA-metabolites, ent-3-hydroxy-kaurenoic acid and ent-2-hydroxy-kaurenoic acid were identified. The oxidation of KA at the C-3/C-2 position determines the activation or inactivation of the KA-metabolism, which appears to be an ancient type of gibberellin regulation.

研究分野：植物活性制御学

キーワード：コケ植物 分化誘導物質 生理活性物質 ジベレリン ジテルペン

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は他と共同してジベレリン受容体を特定し、ジベレリン依存的に信号伝達抑制因子 DELLA の機能制御を受容体が直接行うことを明らかにした。この受容体による信号伝達の仕組みは、高等植物・シダ植物において共通して認められるのに対して、コケ植物由来の分子には受容体としての機能が確認できない。よって、コケ植物からシダ植物への進化過程で、ジベレリン信号伝達の仕組みが植物に付与されたものと結論している。

他方、研究分担者と連携研究者は共同して、ジベレリン生合成酵素の解析を通じて植物の進化過程を考察してきた。それによれば、高等植物・シダ植物からジベレリンが検出されるのに対して、コケ植物からは生合成の途中段階、*ent*-カウレン酸の生成過程までは確認できるものの、以降の過程に必要な酵素遺伝子がゲノム上欠如しており、予想されるとおりジベレリンは検出されない。従って、この方面からも植物のジベレリン利用はコケ植物からシダ植物への進化過程で付与されたとする上記結論を支持した。

そこで、3 研究者らは連携を図り、「ジベレリンを生産できないコケ植物が、なぜ途中の *ent*-カウレン酸までの合成能を持つか」に注目し、解明に着手した。そして、コケ植物の生活環における重要な一時期、栄養生長から生殖生長へとフェーズを切り替える分化の過程に、*ent*-カウレンを経由して生合成される未同定の生理活性物質が関与することを明らかにした(Plant Physiol., 2010)。2012 年から 3 年間、3 研究者で企画・提案した基盤研究(B)が採択となり、資金面の大きなサポートが得られた。「生物有機化学・分子生物学・生化学」の 3 視点に基づくアプローチを展開して、物質 X の特定に近づく一定の成果を得た。本研究はその物質特定に向けた継続課題である。

2. 研究の目的

ヒメツリガネコケ原系体の分化促進物質 X の同定を最終目的とした。その達成に向け、以下 3 視点に基づきアプローチを展開した。

(1)生物有機化学の視点から：回復応答生物検定系を用いた物質 X の同定を狙った。

(2)化学生物学の視点から：受容体アンタゴニストを用いた物質 X の同定を狙った。

(3)分子生物学の視点から：生合成酵素の機能確認に伴う物質 X の同定を狙った。

3. 研究の方法

アプローチ(1)について：*ent*-カウレン酸代謝物の検出においては、既にカウレン合成能欠損に伴う分化阻害状態のコケ変異株を対象に *ent*-カウレン酸を投与し、回復応答を示した個体を集め、HPLC 上で *ent*-カウレン酸とは明らかに保持時間が異なる 2 つの画分に回復活性を検出していた。そこで新た

に、安定同位体標識 *ent*-カウレン酸を調製し、LC/MS/MS および GC/MS を用いて当該画分中に含まれる *ent*-カウレン酸代謝物の構造情報の収集を予定した。変異株同様に、その投与により分化阻害を誘導する化合物が数種利用可能であることから、本生物検定を用いてその投与に伴う代謝物の消長を把握し、代謝物を再び変異株へ投与して再代謝を調べることを予定した。なお、*ent*-カウレン酸から代謝過程を経るに連れて次第に水溶性を増すと予想したため、この手法では生合成の 3~4 過程が把握できれば良しと考えていた。活性本体(物質 X)まで多段階で構成される場合は次アプローチ(2)との連携の重要性が増す。また、DELLA 因子を経由して分化応答過程が進行することを検証すべく、ジベレリンの信号伝達時に倣い、当該コケの DELLA 相同タンパク質が、物質 X からの信号伝達時に分解される可能性を調べるため、ウエスタンブロットにおいて用いる DELLA 特異抗体が、あるいは GFP あるいは His 等の検出用 Tag と融合した DELLA レポーターラインの作出を予定した。

アプローチ(2)について：受容体アゴニスト候補の選抜では、上記アプローチ(1)で用いるカウレン合成能欠損変異株に、1 万種を超える市販ライブラリーに収録された化合物を投与して、*ent*-カウレン酸投与時と同様の回復応答を示す化合物の選抜を予定した。阻害応答でなく回復応答を示すものを選抜対象とするため、コケの生育一般に影響し得るニセ物を誤って捨てる可能性は低く維持できると期待した。続いて、選抜した化合物を対象に有機合成の手法を用いて、構造類縁体を調製してその投与効果を調べたり、回復応答を示す親化合物の周辺に回復阻害応答を示す構造類縁体が検出されるかに主眼をおき評価し、最終的に親化合物の回復応答活性をも阻害するのを受容体アンタゴニスト候補、同時に、親化合物を受容体アゴニスト候補と位置づけて事後の展開に利用する予定としていた。

アプローチ(3)について：P450 酵素機能欠失型変異株の作出に関しては、異所発現系を用いて翻訳産物を調製を図るが、必ずしも P450 酵素の活性維持が保証されない点の打開策として、*ent*-カウレン酸代謝酵素候補の選抜のため、発現応答情報と相同情報の双方に基づき可能性が高い上位 10 種程度の候補分子に関する各々の機能欠損型変異株を作出する予定としていた。この中に、(1)・(2)両アプローチで用いるカウレン合成能欠損変異株と類似形質を示すものを探索し、「*ent*-カウレン酸投与では回復せず、(1)で入手する *ent*-カウレン酸代謝物あるいは(2)で入手する受容体アゴニスト候補らの投与では回復する」ことを確認することを予定した。また、研究分担者が熟知する酵素反応系に供し、酵素活性について *in vitro* レベルでの確認を予定した。物質 X 生合成前駆体の

逐次調製では、物質 X 生合成過程で機能する酵素分子種が特定できた段階で、*in vitro* 酵素反応系を用いて *ent*-カウレン酸代謝物を調製することとし、また、高純度に ¹³C 標識された代謝物も調製して機器分析時の内部標準物質として活用することを予定した。*ent*-カウレン酸応答性遺伝子の把握では、次世代シーケンサを用いた物質 X 生合成酵素遺伝子の探索に改めて挑戦することを計画した。これは前回の本課題 3 年間において、当該アプローチがうまく奏功しなかった主要因として、RNA 調製時のコケ材料の精度が低く、応答に寄与しない部位が多々含まれていたからと考えた。この対応として、物質 X が引き起こす分化部位は主にコケ外周部のみで顕著に認められるが、その部位だけを収穫することが極めて難しく、できるだけ分化部位を高純度にサンプルとする調製法の検討を継続するとともに、他方で本課題に関わる研究者らが明らかにした「分化応答に加え、物質 X が青色光からの逃避応答にも関与する点」も利用して、コケを一例に並べる調製法の採用も視野に入れて奏功を図ることを予定した。

4. 研究成果

アプローチ(1)について：モノ取り手法を整備して、従来は GC/MS でしか行えなかった *ent*-カウレン酸およびその代謝物を LC/MS/MS を用いて高感度検出できるよう分析系を開発した。加えて、生物検定系を整備し、本過程の進行状況について定量的評価が可能となった。この 2 点の整備を終えた段階から、*ent*-カウレン酸代謝物の追跡を展開した結果、生理活性強度が上昇した分子として 3 位に水酸基が導入された 30H-KA がコケ生体内で生合成されることをつきとめた。

アプローチ(3)について：当該コケ植物ゲノム中に存在するチトクロム P450 候補遺伝子を対象として、*ent*-カウレン酸の代謝に関わるものを探索したが、この方向からの候補分子の絞り込みは奏功しなかった。しかし、細心の注意を払い実施した次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子の発現解析結果より、*ent*-カウレン酸投与に応じてその発現量を変動させる応答性遺伝子の絞り込みに成功し、その異所発現産物の中から *ent*-カウレン酸を代謝させるもの 1 種を特定した。結果、*ent*-カウレン酸の 2 位水酸化過程を触媒する酵素遺伝子であることが判明した。当該遺伝子の発現応答様式を調べることにより、アプローチ(1)で明らかにした 3 位に水酸基を持つ *ent*-カウレン酸代謝物 30H-KA は、その前段階である *ent*-カウレン酸が具有しない「短時間処理条件での遺伝子発現誘導能」を有することを明らかとし、30H-KA が活性本体であることを裏付けた。

アプローチ(2)について：本現象を司る受容体単離に有効な分子ツールとして、化合物ライブラリーの中から候補分子を見出し

た。しかし、アプローチ(1)と連動させて進めていた DELLA 様タンパク質に関する信号伝達利用の可能性は非常に低いことが中に判明し、この報告からの短期受容体特定には至らないと判断して他へ勢力を集中させる体制をとった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

(1)Sho Miyazaki, Mariho Hara, Shinsaku Ito, Keisuke Tanaka, Tadao Asami, Ken-ichiro Hayashi, Hiroshi Kawaide and Masatoshi Nakajima. An ancestral gibberellin in a moss *Physcomitrella patens*. *Molecular Plant*, in press (2018), 査読有, DOI: 10.1016/j.molp.2018.03.010.

(2)Chisato Noguchi, Sho Miyazaki, Hiroshi Kawaide, Osamu Gotoh, Yuzo Yoshida and Yuri Aoyama. Characterization of moss *ent*-kaurene oxidase (CYP701B1) using a highly purified preparation. *J. Biochem.*, 163: 69-76 (2018), 査読有, DOI: 10.1093/jb/mvx063.

(3)Zhongfeng Ye, Kohei Yamazaki, Hiromi Minoda, Koji Miyamoto, Sho Miyazaki, Hiroshi Kawaide, Arata Yajima, Hideaki Nojiri, Hisakazu Yamane and Kazunori Okada. In planta functions of cytochrome P450 monooxygenase genes in the phytocassane biosynthetic gene cluster on rice chromosome 2. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 20: 1-10 (2017), 査読有, DOI: 10.1080/09168451.2017.1398067.

(4)Sho Miyazaki, Jiang Kai, Masatomo Kobayashi, Tadao Asami and Masatoshi Nakajima. Helminthosporic acid functions as an agonist for gibberellin receptor. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 81: 2152-2159 (2017), 査読有, DOI: 10.1080/09168451.2017.1381018.

(5)Kazunori Okada, Hiroshi Kawaide, Koji Miyamoto, Sho Miyazaki, Honoka Kimura, Kaoru Fujiwara, Masahiro Natsume, Hideaki Nojiri, Masatoshi Nakajima, Hisakazu Yamane, Yuki Hatano, Hiroshi Nozaki and Ken-ichiro Hayashi. HpDTC1, a stress-inducible bifunctional diterpene cyclase involved in momilactone biosynthesis, functions in chemical defence in the moss *Hypnum plumaeforme*. *Scientific Report*, 6: 25316 (2016), 査読有, DOI:10.1038/srep25316.

(6) Sho Miyazaki, Honoka Kimura, Masahiro Natsume, Tadao Asami, Ken-ichiro Hayashi, Hiroshi Kawaide, and Masatoshi Nakajima. Analysis of *ent*-kaurenoic acid by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Reports*, 2: 103-107 (2015), 査読有, DOI:10.1016/j.bbrep.2015.05.010.

〔学会発表〕(計 2 2 件)

(1) Sho Miyazaki, Mariho Hara, Shinsaku Ito, Keisuke Tanaka, Tadao Asami, Ken-ichiro Hayashi, Hiroshi Kawaide, Masatoshi Nakajima. An ancestral gibberellin biosynthetic pathway in the moss. Taiwan-Japan Plant Biology 2017, 口頭発表, 台湾(招待講演), 2017 年 10 月 3-5 日.

(2) Masatoshi Nakajima, Yang Che-Dong, Sho Miyazaki, Seung-Hyun Park, Masato Otani, Hiroshi Kawaide, Ken-ichiro Hayashi and Tadao Asami. Screening of chemicals that affect protonemal differentiation of a moss *Physcomitrella patens*. 国際植物生長調節物質会議(IPGSA), ポスター発表, カナダ・トロント, 2016 年 6 月 21-25 日.

(3) Hiroshi Kawaide, Sho Miyazaki and Masatoshi Nakajima. A moss-specific diterpenoid hormone regulates protonemal growth and development. 国際植物生長調節物質会議(IPGSA), ポスター発表, カナダ・トロント, 2016 年 6 月 21-25 日.

(4) Sho Miyazaki, Mariho Hara, Hiroshi Kawaide, Ken-ichiro Hayashi, Tadao Asami and Masatoshi Nakajima. Endogenous *ent*-kaurenoic acid-metabolite regulates the differentiation of *Physcomitrella patens*. 国際植物生長調節物質会議(IPGSA), ポスター発表, カナダ・トロント, 2016 年 6 月 21-25 日.

(5) Sho Miyazaki, Hiroshi Kawaide, Ken-ichiro Hayashi, Tadao Asami and Masatoshi Nakajima. Identification of novel diterpene-type growth regulator in *Physcomitrella patens*. MOSS, 口頭発表, 英国・リーズ, 2016 年 9 月 2-6 日.

(6) Hiroshi Kawaide, Sho Miyazaki, Masatoshi Nakajima. Biosynthesis and physiological function of a moss-specific diterpenoid hormone. Pacificchem 2015, 口頭発表, 米国・ホノルル, 2015 年 12 月 15-20 日.

(7) Sho Miyazaki, Seung-Hyun Park, Hiroshi

Kawaide, Ken-ichiro Hayashi, Tadao Asami, Masatoshi Nakajima. Hormonal diterpenoids besides gibberellin are involved in photomorphogenesis of *Physcomitrella patens*. Pacificchem 2015, 口頭&ポスター発表, 米国・ホノルル, 2015 年 12 月 15-20 日.

(8) Masatoshi Nakajima, Che-Dong Yang, Sho Miyazaki, Seung-Hyun Park, Masato Otani, Hiroshi Kawaide, Ken-ichiro Hayashi, Tadao Asami. Screening of chemicals that affect protonemal differentiation of *Physcomitrella patens*. Pacificchem 2015, ポスター発表, 米国・ホノルル, 2015 年 12 月 15-20 日.

(9) Hiroshi Kawaide, Sho Miyazaki, Masatoshi Nakajima. Functional evolution of *ent*-kaurene synthases of bryophytes and beyond. Terpnet 2015, 口頭発表, カナダ・バンクーバー, 2015 年 6 月 1-5 日.

(10) Sho Miyazaki, Hiroshi Kawaide and Masatoshi Nakajima. Hormonal diterpenoids are involved in photomorphogenesis under the blue-light in *Physcomitrella patens*. Terpnet 2015, ポスター発表, カナダ・バンクーバー, 2015 年 6 月 1-5 日.

(11) 宮崎 翔, 原 万里穂, 伊藤 晋作, 田中 啓介, 川出 洋, 林 謙一郎, 浅見 忠男, 中嶋 正敏. 原始ジベレリン様成長制御物質の同定. 日本農芸化学会 2018 年度大会, 口頭発表, 名古屋, 2018 年 3 月 15-18 日.

(12) 照屋 美優, 藤原 薫, 宮本 皓司, 山根 久和, 新屋 友規, ガリス イバン, 林 謙一郎, 宮崎 翔, 中嶋 正敏, 野尻 秀昭, 岡田 憲典. 藓類におけるジャスモン酸類の探索と生理活性の追究. 日本農芸化学会 2018 年度大会, 口頭発表, 名古屋, 2018 年 3 月 15-18 日.

(13) 福田 和佳子, 宮崎 翔, 牧野 晴香, 木村 穂乃香, 貝沼 遼介, 安藤 朋子, 夏目 雅裕, 野崎 浩, 林 謙一郎, 川出 洋. 下等植物から高等植物に至る *ent*-kaurene 合成酵素の機能進化. 日本農芸化学会 2018 年度大会, 口頭発表, 名古屋, 2018 年 3 月 15-18 日.

(14) 川出 洋, 宮崎 翔, 林 謙一郎, 岡田 憲典, 中嶋 正敏. 陸上植物における生理活性ジテルペノイドの生合成にみられる機能進化. 日本農芸化学会 2018 年度大会, 口頭発表(招待講演), 名古屋, 2018 年 3 月 15-18 日.

(15) 宮崎 翔, 原 万里穂, 伊藤 晋作, 田中 啓介, 川出 洋, 林 謙一郎, 浅見 忠男, 中嶋 正敏. ヒメツリガネゴケ原系体の分化制御に関わる新奇生理活性物質の同定. 植物

化学調節学会第 52 回大会，口頭&ポスター発表，鹿児島，2017 年 10 月 27-29 日。

(16)小野 真太郎，梁 彩東，宮崎 翔，林 謙一郎，川出 洋，浅見 忠男，中嶋 正敏。ヒメツリガネゴケの原系体の分化を促す化合物の活性評価。植物化学調節学会第 52 回大会，口頭&ポスター発表，鹿児島，2017 年 10 月 27-29 日。

(17)福田 和佳子，宮崎 翔，牧野 晴香，木村 穂乃香，貝沼 遼介，安藤 朋子，夏目 雅裕，野崎 浩，林 謙一郎，川出 洋。ハイゴケ由来の相同性の高い二つのジテルペン環化酵素の構造と機能における進化的関係。植物化学調節学会第 52 回大会，口頭&ポスター発表，鹿児島，2017 年 10 月 27-29 日。

(18)宮崎 翔，原 万里穂，伊藤 晋作，田中 啓介，川出 洋，林 謙一郎，浅見 忠男，中嶋 正敏。ヒメツリガネゴケ原系体の分化制御に関わる新奇生理活性物質の同定。日本農芸化学会 2017 年度大会，口頭発表，京都，2017 年 3 月 17-20 日。

(19)宮崎 翔，原 万里穂，Seung-Hyun Park，川出 洋，林 謙一郎，浅見 忠男，中嶋 正敏。ヒメツリガネゴケの生活環で機能するジベレリン様成長制御物質の探索。日本蘚苔類学会，口頭発表，鹿児島，2016 年 8 月 27-28 日。

(20)Masatoshi Nakajima, Che-Dong Yang, Sho Miyazaki, Seung-Hyun Park, Masato Otani, Hiroshi Kawaide, Ken-ichiro Hayashi, Tadao Asami: Screening of chemicals that affect protonemal differentiation of *Physcomitrella patens*, 日本農芸化学会 2016 年度大会，ポスター発表，札幌，2016 年 3 月 27-30 日。

(21)宮崎 翔，Che-Dong Yang, Seung-Hyun Park, 川出 洋，林 謙一郎，浅見 忠男，中嶋 正敏。ヒメツリガネゴケ原系体の分化に関与するジベレリン様成長制御物質の探索，日本農芸化学会 2016 年度大会，ポスター発表，札幌，2016 年 3 月 27-30 日。

(22)宮崎 翔，Che-Dong Yang, Seung-Hyun Park, 川出 洋，林 謙一郎，浅見 忠男，中嶋 正敏。ヒメツリガネゴケ原系体の分化に関与するジベレリン様成長制御物質の解明，植物化学調節学会第 50 回大会，東京，口頭&ポスター発表，2015 年 10 月 23-25 日。

〔図書〕(計 1 件)

(1)Sho Miyazaki, Masatoshi Nakajima and Hiroshi Kawaide. Assays of Protonemal Growth Responses in *Physcomitrella patens*

under Blue- and Red-light Stimuli. *Methods Mol. Biol.*, accepted, 査読有 (2019 年出版予定)。

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中嶋 正敏 (NAKAJIMA, Masatoshi)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号：5 0 2 3 7 2 7 8

(2) 研究分担者

川出 洋 (KAWAIDE, Hiroshi)
東京農工大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：2 0 2 9 1 9 1 6

(3) 連携研究者

林 謙一郎 (HAYASHI, Ken-ichiro)
岡山理科大学・理学部・教授
研究者番号：3 0 2 8 9 1 3 6

(4) 研究協力者

()