

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07991

研究課題名(和文)植物細胞内で多様な四環性ジテルペン骨格を選択的に産生する分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism producing diterpenes with various tetracyclic skeletons in plant cells

研究代表者

山村 良美 (Yamamura, Yoshimi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・助教

研究者番号：30464027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で我々は、de novoトランスクリプトーム解析により、SDB生合成に関与することが予想されるP450遺伝子や環化酵素遺伝子クローン(SdCPS2、SdKSL1)についての候補を新規に取得することに成功した。さらに環化酵素SdCPS2(syn-copalyl diphosphate synthase)の機能解析の結果、SdCPS2はGGPPからsyn-CPPへの環化を行う双子葉類で初めて単離されたsyn-CPSであることが明らかとなった。得られた情報は、植物が産生するラブダン関連ジテルペンの骨格多様性のメカニズムの解明に大きく寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the diterpene biosynthetic machinery of scopadulcic acid B (SDB), which are known for their unique tetracyclic skeleton in *Scoparia dulcis*, we performed an RNA-seq analysis. We found diterpene synthases genes including a putative syn-copalyl diphosphate synthase (SdCPS2) and a kaurene synthase-like (SdKSL1) genes. Besides them, more than 90 full-length of cytochrome P450 (CYP450) genes were also discovered. The expression analyses showed selected CYP450s associated with their expression pattern of SdCPS2 and SdKSL1, suggesting that CYP450 candidates involved diterpene modification. Functional analysis of the SdCPS2 revealed that SdCPS2 was suggested to be syn-CPS in *S. dulcis*. SdCPS2 represents the first predicted gene to produce syn-copalyl diphosphate in dicots. In addition, SdKSL1 potentially contributes to the SDB biosynthetic pathway.

研究分野：植物生理学

キーワード：植物二次代謝 ジテルペン チトクロームP450 環化酵素 有用物質生産 エリシター

1. 研究開始当初の背景

Scoparia dulcis (スコパリア) は、主に葉で四環性ジテルペン類である scopadulcic acid B (SDB) や scopadulciol を産生する。これらの四環性ジテルペン類は、ウイルス感染症や癌、骨粗鬆症などに有効である。四環性ジテルペン類は、そのユニークな構造と多彩な生物活性から相次いで全合成のターゲットとされたが、現在のところ、ラセミ体しか得られていない。SDB などの四環性ジテルペン類は、全てその共通中間体であるゲラニルゲラニルニリン酸 (GGDP) からコパリルニリン酸 (*syn*-CDP または *ent*-CDP) を経て生合成される。最終産物である SDB 誘導体は、環化酵素 *syn*-CDP 合成酵素 (CPS) やそれに関連する特異的なチトクローム P450 (P450) により生合成されると想定されている。一方、*ent*-kaurene を経て gibberellin に至る経路には、*ent*-CPS およびそれにリンクする特異的な P450 が関与していると考えられている。

我々の研究グループは、これまでに高等植物が同一細胞内で構造の異なる複数のジテルペン骨格を精密に作り分ける機構に関する研究に取り組んでいる。現在までに我々は、高等植物においてフラボノイドやアルカロイドなどの二次代謝に関与する酵素として知られている P450 が、スコパリアの SDB 生合成経路において、酸化または環化メカニズムに関与することを強く示唆する研究結果を得ている。すなわち、スコパリアをはじめとする、複数の四環性ジテルペン骨格を同一の細胞内で構築する植物において、それぞれの骨格を構築するための重要なステップは、環化酵素と複数の P450 が担っているものと推察される。一方、我々は、スコパリアのジテルペン化合物のうち *ent*-kaurene や gibberellin のジャスモン酸 (JA) 応答性は極めて低いことを認めている。加えて、我々は gibberellin 生合成関連酵素 (*ent*-CPS を含めた *ent*-kaurene 合成酵素 (KS) および P450) の全てを既にクローニングし、発現特性や触媒能等の機能解析を進めている。これに対して、同じジテルペン化合物でありながら SDB とその誘導体が、JA 刺激に応答した結果、葉での蓄積量が大きく増加することを見出している。また、その生合成に関わる遺伝子の発現も、顕著に上昇することを確認している。本研究では、これまでの成果を分子基盤として、ジテルペンの骨格形成に関わる酵素群、特に、生合成機構に特有な P450 を同定・機能解析し、多彩な四環性ジテルペン骨格を植物が同一細胞内で作り分ける機構を分子レベルで解明する。

2. 研究の目的

本研究の目的は「スコパリアの有用ジテルペン scopadulcic acid B (SDB) 生合成に関与するチトクローム P450 および環化酵素をコードする遺伝子群を“蓄積パターンが異なる器官”さらに“JA 刺激に対する応答性の違い”

を利用して単離および機能解析し、生合成機構を明らかにすること」である。

3. 研究の方法

(1) *de novo* RNA-seq 法によるトランスクリプトーム解析

トランスクリプトーム解析については、器官間比較および JA 応答を利用した比較を行った。本研究では、包括的かつ定量性の高い次世代型シーケンサー (illumina MiSeq) を用いてトランスクリプトームを解析した。我々が先行研究により明らかにした SDB の蓄積パターンが顕著に異なる 3 器官 (若葉、成葉および根) および JA 刺激によって SDB 合成を誘導した成葉の 4 個体をトランスクリプトーム解析の対象とした。各サンプルから抽出した mRNA を用いて RNA-seq ライブラリーを作製した。これらのライブラリーを次世代型シーケンサーによるシーケンシングを行い、配列データを取得 (一次解析) 後、二次解析 (アセンブリ) に非モデル生物対応の Trinity アセンブリ用プログラムを使用して、若葉および JA 刺激に特異的発現遺伝子の情報を得た。若葉特異的遺伝子と JA 応答性の遺伝子の発現量の有意差を定量的に解析 (ディファレンシャル解析) し、BLAST による相同性解析で注釈を行なった (三次解析)。それらの中から我々が標的としている水酸化および環化反応に関与していると予測される P450 クローンまたは新規の P450 と想定されるもの等の候補をピックアップした。さらに、環化酵素 *syn*-CPS の候補も検索した。

(2) P450 クローンおよび環化酵素 *syn*-CPS の分子生物学的解析

網羅的トランスクリプトーム解析に引き続き、得られた P450 および環化酵素の候補遺伝子情報を基に必要な応じて、5'-ならびに 3'-RACE 法を行い、全長 cDNA のクローニングおよび遺伝子発現の解析を行った。得られた P450 遺伝子および環化酵素遺伝子クローンについて、JA 刺激に対する応答、器官特異性についての発現の変動を定量的リアルタイム PCR で解析した。

(3) *in vivo* 組換え SdCPS2 タンパク質の酵素活性

既知のスコパリア由来 geranylgeranyl diphosphate synthase (SdGGPPS1) と単離した SdCPS2 の各シグナルペプチド部位を切断した ORF 領域を組み込んだ大腸菌発現ベクター (pACYCDuet) を作製した。コントロールとして SdGGPPS1 とイネ由来の OsCPS4 (*syn*-CPS) の発現ベクターも同時に作製した。続いて、これらのベクターを発現用大腸菌 C41 株にそれぞれ形質転換し、IPTG で発現を誘導した大腸菌培養液抽出物を GC-MS で分析した。さらにこの反応生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、NMR

で解析し、構造決定を行った。

4. 研究成果

(1) *de novo* トランスクリプトーム解析により、得られた遺伝子群に対して、BLAST 検索やモチーフ検索を実施し、既知の配列との照合を行った結果、P450 遺伝子（完全長、既知も含む）を 91 個、環化酵素遺伝子（完全長、既知も含む）を 13 個得ることができた。これらの遺伝子の中でも SDB 生合成に関与することが予想された環化酵素遺伝子について、*syn-copalyl diphosphate synthase* および *kaurene synthase like* をコードすると思われる新規クローンを特定することができた。これらのクローンをそれぞれ *SdCPS2* および *SdKSL1* と命名した。*SdCPS2* については、双子葉植物からの *syn-copalyl diphosphate synthase* の単離は今回の報告が初めてである。

(2) *SdCPS2* は Class II に、*SdKSL1* は Class I にそれぞれ属している環化酵素であることが推定された。また、JA 刺激に対する P450 遺伝子および環化酵素遺伝子の発現の変動をリアルタイム PCR で解析した。その結果、JA 処理 3 時間後で *SdCPS2* および *SdKSL1* 遺伝子の発現量が急激に増加していたが、*SdCPS1* および *SdKS* に関してはその発現の変動はほとんど見られなかった。この結果は、JA 処理によって SDB 生合成が活性化されるという以前の我々の結果と相関性を示す結果である。また、*SdCPS2* および *SdKSL1* 遺伝子とほぼ同様の発現変動を示した P450 クローンに関して、これらの遺伝子も SDB 生合成に関与することが強く示唆された。

(3) *in vivo* 組換え酵素解析より、*SdCPS2* は GGPP から *syn*-CPP への環化を行う *syn*-CPS であることが明らかとなった。スコパリアのジテルペンの骨格多様性は、それらの生合成に関与する酵素によって生み出される。*SdCPS2* は双子葉類で初めて単離された *syn*-CPS であった。*Scopadulane* 骨格の形成に関与する酵素は、これまでに同定されておらず、今回が初めての報告となる。本研究は、スコパリアの SDB 生合成における骨格形成プロセスを解き明かすものとなった。得られた情報は、植物が産生するラブダン関連ジテルペンの骨格多様性のメカニズムの解明に大きく寄与するものである。

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 2 件)

Yamamura Y, Kurosaki F, Lee JB. (2017) Elucidation of terpenoid metabolism in *Scoparia dulcis* by RNA-seq analysis. *Scientific Reports*. 7:43311. DOI: 10.1038/srep43311. (査読有)

Yamamura Y, Taguchi Y, Ichitani K, Umebara I, Ohshita A, Kurosaki F, Lee JB. (2018) Characterization of *ent*-kaurene synthase and kaurene oxidase involved in gibberellin biosynthesis from *Scoparia dulcis*. *Journal of Natural Medicines*. 72(2): 456-463. DOI:10.1007/s11418-017-1168-4. (査読有)

〔学会発表〕(計 9 件)

Yamamura Y, Umebara I, Kurosaki F, Lee JB. Functional characterization of *syn-copalyl diphosphate synthase* from *Scoparia dulcis*. The 13th International Meeting on Biosynthesis, Function and Synthetic Biology of Isoprenoids (TERPNET 2017); 2017 Jul 16-20; Dalian, China.

山村良美, 黒崎文也, 李 貞範. RNA-Seq 解析による薬用植物スコパリアのジテルペン代謝の解明. 日本生薬学会第 64 回年会; 2017 Sep 9-10; 千葉.

梅原依男, 山村良美, 黒崎文也, 李 貞範. 薬用植物スコパリアにおけるジテルペン環化酵素の機能解析. 日本生薬学会第 64 回年会; 2017 Sep 9-10; 千葉.

Yamamura Y, Umebara I, Kurosaki F, Lee JB. Discovery of two diterpene cyclases involved in the scopadulane-type diterpene biosynthesis in *Scoparia dulcis*. 9th Joint Natural Products Conference 2016; 2016 Jul 24-27; Copenhagen, Denmark.

Yamamura Y, Taguchi Y, Ichitani K, Kurosaki F, Lee JB. Characterization of two genes for the biosynthesis of gibberellin in *Scoparia dulcis*. The First International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network (TAA-Pharm Symposium); 2016 Sep 12-13; Toyama.

Umebara I, Yamamura Y, Kurosaki F, Lee JB. Functional identification of two diterpene cyclases from *Scoparia dulcis*. The First International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network (TAA-Pharm Symposium); 2016 Sep 12-13; Toyama.

田口裕香里, 市谷 圭, 李 貞範, 山村良美, 黒崎文也. *Scoparia dulcis* 由来ジテルペン生合成酵素群の機能解析. 第 34 回日本植物細胞分子生物学会(上田)大会; 2016 Sep 1-3; 上田.

梅原依男, 山村良美, 黒崎文也, 李 貞範. 薬用植物 *Scoparia dulcis* 由来ジテルペンの骨格形成に関与する酵素遺伝子の機能解析. 植物化学調節学会第 51 回大会; 2016 Oct 28-30; 高知.

Yamamura Y and Lee JB. Prediction of genes involved in terpenoid diversity in *Scoparia dulcis* L. 11th International

Congress of Plant Molecular Biology
(IPMB; International Society for Plant
Molecular Biology); 2015 Oct 25-30;
Iguazú Falls, Brazil.

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山村 良美 (YAMAMURA, Yoshimi)
富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・
助教
研究者番号：30464027

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

李 貞範 (LEE, Jung-Bum)
富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・
助教
研究者番号：40332655

(4) 研究協力者

()