

令和元年5月30日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18693

研究課題名(和文)コケ植物で機能する原始ジベレリン様成長制御物質の構造と生合成経路の解明

研究課題名(英文)An ancestral gibberellin biosynthetic pathway in the moss *Physcomitrella patens*

研究代表者

宮崎 翔 (Miyazaki, Sho)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・助教

研究者番号：30755955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒメツリガネゴケはGA生合成中間体，ent-カウレン酸(KA)から3位水酸化KAを生産し，成長制御に利用していることを明らかとした．またトランスクリプトーム解析からKAの代謝に関わる酵素を特定し，酵素変換物は2位水酸化KAであると構造決定した．KA2位水酸化酵素欠損変異体は原系体の分化活性が野生株より高く，2位水酸化KAが原系体分化活性を示さない結果と併せると，KAの2位水酸化反応は不活性化経路上で機能していることを明らかとした．これらヒメツリガネゴケの生合成経路における活性制御は顕花植物のGA生合成経路でも見られる3位水酸化による活性化、2位水酸化による不活性化であることを明らかとした．

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物は普遍的に植物ホルモン類を生産し，生活環で利用していると考えられていた．しかし，ヒメツリガネゴケはGAを生産せず，30HKAを利用していた．陸上植物の進化と成長制御機構の共進化に関する重要な知見が得られた．

研究成果の概要(英文)：The moss *Physcomitrella patens* does not respond to active GAs, and GAs have not been detected in the moss. However, *P. patens* has a partial GA biosynthetic pathway. Using biochemical approaches, we found that a KA-derived diterpenoid functions as a potent regulator of protonemal cell differentiation in the moss. Bioassay-guided exploration with a *Ppcps/ks* mutant led to the detection of a bioactive metabolite from KA, and its structure was elucidated as 30HKA. Transcriptome analysis identified a gene involved in the oxidation of KA to 20HKA, an inactive metabolite in cell differentiation. These results indicate that *P. patens* converts KA to an active form by 3-oxidation and to an inactive form by 2-oxidation, identifying a potential activation/inactivation system for GA biosynthesis in flowering plants.

研究分野：天然物化学

キーワード：ジテルペノイド コケ植物 ジベレリン カウレン酸 ヒメツリガネゴケ 次世代シーケンサ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

顕花植物は成長制御物質としてジベレリン(以下, GA)類を普遍的に生合成し生活環上で利用するが, ヒメツリガネゴケ(*Physcomitrella patens*)から GA は検出されていなかった(Hayashi *et al.*, *Plant Physiol.*, 2010). しかし興味深いことに, ヒメツリガネゴケのゲノムデータベースを精査すると顕花植物の GA 生合成酵素遺伝子のいくつかについてそのホモログが同定された. 研究代表者は, ヒメツリガネゴケにおける GA 生合成酵素遺伝子ホモログの機能解析を実施し, ヒメツリガネゴケは *ent*-カウレン酸まで顕花植物と同じ GA 生合成経路を保有することを明らかにした(Miyazaki *et al.*, *FEBS Lett.*, 2011). GA を持たないコケが一部の GA 生合成経路を保存していることに着目し, *ent*-カウレン酸以降の代謝産物の生理機能を解析するために作出された *ent*-カウレン酸生合成能欠損変異体(以下, *Ppcps/ks* 変異体)は, 赤色光下で[細胞分化の抑制]が矮性に似た表現型として観察され, これは *ent*-カウレン酸で回復するが GA<sub>4</sub> (活性型 GA)では回復しない(Hayashi *et al.*, 2010). すなわちヒメツリガネゴケは *ent*-カウレン酸以降, GA と異なる GA 様成長制御物質(以下, 原始 GA)を生合成する可能性を示している. さらに研究代表者は, 原始 GA が[青色光への忌避応答]にも関与することを変異体解析から明らかにした(Miyazaki *et al.*, *Planta* 2014, Miyazaki *et al.*, *Plant Signal Behav.*, 2015). 顕花植物においては赤色光・青色光が関与するシグナル伝達制御として発芽過程や花芽形成過程に GA が関わっており, ヒメツリガネゴケで確認された二種の光応答の制御に原始 GA が関わることは両生理活性物質が進化的にも類似のイベントを制御する可能性を強く示唆する.

### 2. 研究の目的

GA が顕花植物に利用される前にコケ植物で機能していた可能性がある, コケ植物に特有な生理活性物質“原始 GA”の構造と生合成経路を明らかにすることを目的とした.

### 3. 研究の方法

#### (1) 原始 GA の同定

生物活性を指標として物質を追跡する「もの取り」研究で原始 GA を追跡することとした. 単離, 構造決定に向け, *ent*-カウレン酸生合成能欠損変異体(*Ppcps/ks* 変異体)が *ent*-カウレン酸で回復する表現型を生物検定法として利用し, *ent*-カウレン酸代謝産物の分析系の立ち上げ, 追跡に用いる非天然型 *ent*-カウレン酸の合成, の3つの準備を行った.

まず定量的な生物検定法の構築を目指した. *Ppcps/ks* 変異体が *ent*-カウレン酸で回復する生物検定法は全て目視でその分化の可否を判断していた. 客観的かつ数値として評価できる系を検討し, 画像処理ソフト(ImageJ)を導入することとした. *ent*-カウレン酸代謝産物はクロロネマ細胞からカウロネマ細胞への分化を制御している. クロロネマ細胞は, 葉緑体量が多く緑色が濃いのに対し, 分化後の細胞は葉緑体量が少なく薄くなる. 画像を白黒の2色化とすることで濃淡をソフトに認識させ, 図2に示すようにクロロネマ細胞とカウロネマ細胞を識別する閾値を設定し, 全体に占めるカウロネマ細胞の割合を評価値とした(Miyazaki *et al.* *Methods Mol Biol.*, 2019). これにより, 細胞分化率が高いほど画像処理後の評価値が高くなり, この定量法を用いて *ent*-カウレン酸終濃度 0.001~1 μM の範囲において濃度依存的に評価値の増加が認められた.

2つ目の準備として高感度分析系の立ち上げを行った. これまで単純な炭化水素骨格をもつ *ent*-カウレン酸やこれに似た *ent*-カウレン酸だけでなく, GA 類に関しても GC-MS での分析が主となっていた. 近年, LC-MS/MS を利用した高感度分析系が多く利用され, GA に関しても LC-MS/MS を用いた分析報告が増えていた. *ent*-カウレン酸を LC-MS/MS で分析すると, ネガティブモードで分子イオンを検出することは可能であったが, フラグメントイオンは得られなかった. しかし, このフラグメント化しにくい特徴を利用し, 十分にイオン化した *ent*-カウレン酸の分子イオンを二つ目のマスでも再選択することにより, LC-MS/MS を用いた *ent*-カウレン酸やその類縁化合物群の高感度検出系を構築した(Miyazaki *et al.*, *Biochem Biophys Rep.*, 2015).

最後の準備として内部標準物質の調製を行った. *ent*-カウレン酸の代謝産物を追跡するにあたり, その代謝物質が *ent*-カウレン酸由来かどうか検証するために非天然物質を用いることとした. しかし市販の重水素体 *ent*-カウレン酸を投与試験に利用するほど準備するのは困難と判断し, <sup>13</sup>C 標識化合物を利用することにした. テルペノイド化合物の特徴を活かして炭素5個のみ <sup>13</sup>C 標識した <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-*ent*-カウレン酸を酵素的に合成した. GA 生合成経路を模倣し, 非標識 FPP と <sup>13</sup>C-IPP から <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-*ent*-カウレン酸を調製した.

#### (2) 生合成酵素遺伝子の探索

顕花植物において *ent*-カウレン酸を基質に GA<sub>12</sub> へと変換する KAO はヒメツリガネゴケに存在しない. そこで生合成酵素遺伝子の探索は次世代シーケンサを用いたトランスクリプトーム解析で実施することとした. *Ppcps/ks* 欠損変異体に *ent*-カウレン酸を投与した *ent*-カウレン酸投与区と非投与区を設定し, その総発現遺伝子を次世代シーケンサで網羅的に解析することで生合成酵素遺伝子の探索をすることにした.

### 4. 研究成果

#### (1) 原始 GA の同定

上述の準備を整えて「もの取り」研究を開始した。Ppcps/ks 欠損変異体に *ent*-カウレン酸を投与し、カウロネマ細胞へと十分に分化した細胞から有機化合物類を抽出し、逆相 HPLC を用いて複数の画分を得た。再度 Ppcps/ks 欠損変異体に投与し、各画分の分化活性を の手法により評価したところ、fraction (fr) 15 及び 18 に検出できた。fr. 18 には投与した *ent*-カウレン酸が含まれており、fr. 15 に *ent*-カウレン酸からの活性代謝産物が含まれていることが明らかとなった。次に、この画分に含まれる化合物の構造情報を取得するため、 の手法で分析した。fr.15 の代謝産物は 317>317 で検出し、fr.18 の *ent*-カウレン酸をネガティブモード 301>301 の MRM チャンネルで検出した。つまり、*ent*-カウレン酸より分子量が 16 大きい化合物が生産され、その化合物は *ent*-カウレン酸から水酸化を受けたことが示唆された。この代謝産物が *ent*-カウレン酸由来である確証を得るため、非標識 *ent*-カウレン酸と で調製した <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-*ent*-カウレン酸を Ppcps/ks 欠損変異体に投与し、逆相 HPLC で分画した画分を LC-MS/MS で分析したところ、fr.15 において分子量 317 と 322 が投与した割合で検出されたことから、変換物は *ent*-カウレン酸由来である確証を得た。さらなる構造情報取得のため、fr.15 中の化合物を GC-MS で分析したところ、そのマスフラグメント及び保持時間と一致する化合物情報が得られた。この化合物を入手し、直接比較したところ保持時間、マスフラグメントが一致したことから fr.15 に含まれる *ent*-カウレン酸代謝産物は *ent*-3 -ヒドロキシカウレン酸 (以下、3OHKA) であると同定した。3OHKA と *ent*-カウレン酸の分化活性を比較したところ、3OHKA は KA より有意に分化活性が高い結果が得られた。次に、3OHKA から活性代謝産物がさらに生合成されているか検証するため、3OHKA を Ppcps/ks 欠損変異体に投与して、試験したが活性代謝産物の検出には至らなかった。

## (2)生合成酵素遺伝子の探索

次世代シーケンサから得られたデータの中から *ent*-カウレン酸を基質とし得る酵素遺伝子を数十選抜した。それらに関して組換え酵素を調製し、*ent*-カウレン酸との酵素反応に供した。その結果、ある一つの 2-オキソグルタル酸依存性 2 原子酸素添加酵素が *ent*-カウレン酸を基質として触媒活性を示した。その酵素代謝物は 3OHKA とは異なり、機器分析から同定には至らなかった。そこでこの新規 *ent*-カウレン酸代謝産物の構造を NMR で決定するため、酵素合成にて mg スケールの代謝物を得ることにした。最終的に各種多次元 NMR で解析することで、*ent*-2 -ヒドロキシカウレン酸 (2OHKA) であると構造決定した。この 2OHKA を Ppcps/ks 欠損変異体に投与して分化活性を確認したところ、活性を示さなかった。生体内での機能を明らかにするため、2OHKA 合成酵素、PpKA2ox の過剰変異体と欠損変異体の作出を試みたが、過剰発現体が得られず、複数の欠損変異体を得るのみであった。この欠損変異体の表現型を観察すると、赤色光条件で培養すると野生株より細胞が分化する表現型が得られ、それにあわせて KA 及び 3OHKA 量が有意に蓄積していた。すなわち、PpKA2ox は *ent*-カウレン酸代謝経路において不活性化経路で機能していることを示している。

以上の結果から、ヒメツリガネゴケは *ent*-カウレン酸以降、GA 類を生産しない代わりに 3 位の水酸化によって活性型の 3OHKA が、2 位の水酸化によって不活性型の 2OHKA が生合成されていることが明らかとなった (Miyazaki et al. Mol Plant, 2018)。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

- 1 宮崎 翔 ヒメツリガネゴケで機能するジベレリン起源物質の同定, 化学と生物, Vol. 57, No.2, Pp. 72-73. 2019 年 2 月, 査読有
- 2 Sho Miyazaki, Kenji Tomita, Hisakazu Yamane, Masatomo Kobayashi, Tadao Asami, and Masatoshi Nakajima, Characterization of a helminthosporic acid analog that is a selective agonist of gibberellin receptor. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 28, No.14, pp.2465-2470. 2018, 査読有, DOI: 10.1016/j.bmcl.2018.06.005
- 3 Naiyanate Jaroensanti-Tanaka, Sho Miyazaki, Akito Hosoi, Keisuke Tanaka, Shinsaku Ito, Satoshi Iuchi, Takeshi Nakano, Masatomo Kobayashi, Masatoshi Nakajima and Tadao Asami, The chemical NJ15 affects hypocotyl elongation and shoot gravitropism via cutin polymerization. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, Vol. 82, No.10, pp. 1770-1779. 2018, 査読有, DOI: 10.1080/09168451.2018.1484278.
- 4 Kenji Tomita, Sho Miyazaki, Kazuo Furihata, Masatoshi Nakajima and Tadao Asami, Assignment of <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR data for four helminthosporol analogs with the bicyclo[3.2.1]oct-6-ene framework. Magnetic Resonance in Chemistry, Vol. 56, No.11, pp. 1130-1134., 2018, 査読有, DOI: 10.1002/mrc.4761
- 5 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, Vol. 11, No.8, pp.1097-1100. 2018, 査読有, DOI: 10.1016/j.molp.2018.03.010
- 6 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. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, Vol.

- 82, No.6, pp.1021-1030. 2018, 査読有, DOI: 10.1080/09168451.2017.1398067.
- 7 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. *Journal of Biochemistry*, Vol. 163, No.1, pp.69-76. 2018, 査読有, DOI: 10.1093/jb/mvx063.
  - 8 Sho Miyazaki, Jiang Kai, Masatomo Kobayashi, Tadao Asami and Masatoshi Nakajima, Helminthosporic acid functions as an agonist for gibberellin receptor. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, Vol. 81, No.11, pp.2152-2159. 2017, 査読有, DOI: 10.1080/09168451.2017.1381018.
  - 9 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 Reports*, Vol. 6. 25316, 12 pages. 2016, 査読有, DOI: 10.1038/srep25316.

〔学会発表〕(計 17 件)

- 1 宮崎 翔, 川出 洋, 中嶋 正敏 “コケ植物で機能する原始ジベレリン様成長制御物質の同定” 新規素材探索研究会第 17 回大会, 口頭・ポスター発表, 神奈川, 講演番号 25, 2018 年 6 月
- 2 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” 農芸化学会 2018 年度大会, 口頭発表, 名古屋, 講演番号 2A28a13, 2018 年 3 月
- 2 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. 蕨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.
- 3 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
- 4 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
- 5 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(議長推薦), ポスター発表, 2017 年 11 月, Taiwan, Taipei
- 6 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, 鹿児島, 口頭・ポスター発表, 講演番号 66, 2017 年 10 月
- 7 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
- 8 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
- 9 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” 農芸化学会 2017 年度大会, 口頭発表, 京都, 講演番号 2J32p03, 2017 年 3 月
- 1 0 Sho Miyazaki, Hiroshi Kawaide, Ken-ichiro Hayashi, Tadao Asami, Masatoshi Nakajima, Identification of novel diterpene-type growth regulator in *Physcomitrella patens*. *Moss 2016*, ポスター発表, 2016 年 9 月, UK, Leeds
- 1 1 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” 日本蕨苔類学会第 45 回屋久島大会, 口頭発表, 鹿児島, 2016 年 8 月
- 1 2 Sho Miyazaki, Mariho Hara, Hiroshi Kawaide, Ken-ichiro Hayashi, Tadao Asami, Masatoshi Nakajima, Endogenous *ent*-kaurenoic acid-metabolite regulates the differentiation of *Physcomitrella patens*. *International Plant Growth Substances Association 2016*, ポスター発表, 2016 年 6 月, Canada, Toronto
- 1 3 Hiroshi Kawaide, Sho Miyazaki, Masatoshi Nakajima, A moss-specific diterpenoids hormone regulates protonemal growth and development. *International Plant Growth Substances Association 2016*, ポスター発表, 2016 年 6 月, Canada, Toronto
- 1 4 Masatoshi Nakajima, Yang Che-Dong, Sho Miyazaki, Seung-Hyun Park, Masato Otani,

Hiroshi Kawaide, Ken-ichiro Hayashi, Tadao Asami, Screening of chemicals that affect protonemal differentiation of a moss *Physcomitrella patens*. International Plant Growth Substances Association 2016, ポスター発表, 2016年6月, Canada, Toronto

- 1 5 宮崎 翔, Yang Che-Dong, 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するジベレリン様成長制御物質の探索” 農芸化学会 2016 年度大会, ポスター発表, 北海道, 講演番号 172H015, 2016 年 3 月
- 1 6 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

〔図書〕(計 1 件)

- 1 Sho Miyazaki, Masatoshi Nakajima and Hiroshi Kawaide (2018) Assays of Protonemal Growth Responses in *Physcomitrella patens* under Blue- and Red-light Stimuli. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 1924, Pp. 35-43. 2019 ,査読有 ,10.1007/978-1-4939-9015-3\_4.

〔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:  
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:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名:  
ローマ字氏名:  
所属研究機関名:  
部局名:  
職名:  
研究者番号(8桁):

### (2)研究協力者

研究協力者氏名:  
ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。