

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24380060

研究課題名(和文)ジベレリン起源物質の構造および活性制御機構の解明

研究課題名(英文)Gibberellin-like diterpenoids involved in differentiation of moss protonemata

研究代表者

中嶋 正敏 (Nakajima, Masatoshi)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：50237278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：コケ植物の分化促進物質の構造を解明すべく複数のアプローチを並行して進めた。生物検定系を用いた活性物質の精製を主軸に据えて、期中に代謝基質ent-カウレン酸の微量定量法を考案したことが大きく寄与した。独自技術で調製した¹³C標識ent-カウレン酸と先述の定量法を駆使して活性画分を精査した結果、画分からent-カウレン酸代謝物の由来ピーク検出に成功した。他方、その応答状況から生合成過程への関与が予想されたP450候補遺伝子を特定すべく、順次翻訳産物の酵素活性を調べたが奏功しなかった。そのため、候補遺伝子の破壊株を順次取得して結論が得られるよう対応方針を変えた。

研究成果の概要(英文)：A kind of moss (*Physcomitrella patens*) has a partial biosynthetic pathway of gibberellin, that is, an ent-kaurene synthase PpCPS/KS catalyzes a cyclization reaction from geranylgeranyl diphosphate to ent-kaurene, and then an ent-kaurene oxidase PpKO does from the ent-kaurene to ent-kaurenoic acid. However, the following pathway toward GAs is not identified in the moss. In our previous studies, we showed that the functional disruption of PpCPS/KS leads to the suppression of protonemal differentiation under the continuous red-light, and the phenotype was complemented by the application of either ent-kaurene or ent-kaurenoic acid, but not by that of gibberellin A(4). By using a bioassay system with the PpCPS/KS mutants, we identified the biologically-active metabolite(s) derived from ent-kaurenoic acid. We expect that any of the metabolite(s) should regulate the protonemal differentiation per se. The structural analyses of the metabolite(s) are now proceeding.

研究分野：活性生理化学・天然物化学

キーワード：植物 ホルモン 生理活性物質 コケ 分化制御

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、他機関と共同してジベレリン受容体を特定し、DELLA と称する信号伝達抑制因子の機能制御をジベレリン依存的に受容体が直接行うことを明らかにした。すなわち、DELLA 因子は通常ジベレリンの信号を後方に伝えないように抑制的に機能しているが、ジベレリンと結合した受容体は自身の性状を変化させ、新たに DELLA 因子との相互作用能を獲得することにより DELLA 因子の機能を弱めている。結果、信号伝達を阻む要素が減り、ジベレリンの作用が現れる。この受容体による信号伝達開始の仕組みは、高等植物・シダ植物で共通して認められるのに対して、コケ植物では受容体や DELLA 因子に対応する相同遺伝子がそれぞれに存在はするものの、ジベレリン結合能や両者間の相互作用能など機能的な性状を確認することができない。よって、コケ植物からシダ植物への進化過程の途上において、上記ジベレリンの信号伝達開始の仕組みは付与されたと結論している。

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、高等植物はもちろんシダ植物においても、生合成に必要な酵素遺伝子は全て存在し、生体からはジベレリンが検出される。他方、コケ植物では生合成の途中、*ent*-カウレンから *ent*-カウレン酸へ至る酸化過程(カウレン酸化酵素が触媒)までは各触媒酵素および生合成中間体の存在を確認できるが、以降の過程に必要な酵素遺伝子の存在は確認できず、加えて、ジベレリンも検出限界以下であった。従って、このアプローチからも、植物におけるジベレリンの利用はコケ植物からシダ植物への進化過程の途上で付与されたとする上記結論を支持する結果が得られたことになる。

そこで、3 研究者らは連携し、「ジベレリンを生産しないコケ植物にとって、途中段階までその生合成能を持つ意味」の解明に着手した。その結果、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、カウレン合成を経由する未知活性物質の関与を明らかにした。具体的には、カウレン合成酵素の機能を欠失させたコケ変異体を作成し、*ent*-カウレン酸の投与により変異体の分化不全形質が回復する応答系を構築してこの系にジベレリン類を投与した結果、いずれも回復の効果を認めず、分化誘導の活性本体 X がジベレリンではないことを確認した。これらの知見に基づき、生物有機化学・分子生物学・生化学の 3 種のアプローチを併用する本研究体制の枠組みを用いて、物質 X の追跡を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究を企画した 3 研究者らは、コケ植物の生活環を制御する物質として 2010 年、*ent*-カウレンを生合成中間体とする未同定の生理活性物質 X の関与を報告した。それを受けて本研究では、物質 X の構造とその生産制御機構の解明を目的に据えた。*ent*-カウレンは高等植物やシダ植物においては植物ホルモン・ジベレリンの生合成中間体として知られる。一方、コケ植物においてジベレリンは検出されず、また、その生合成に必要な酵素遺伝子の全ては揃わない。よって物質 X は、ジベレリンが植物に利用される以前の言わば「原始ジベレリン様物質」としてコケ植物限定で機能している可能性と、高等植物に至るまでの進化過程において実は継承されてきた新規ホルモンの可能性とが想定される。本研究の遂行により、どちらの可能性が正しいか明らかにすることも期待した。

3. 研究の方法

ent-カウレンを生合成中間体とする未同定の生理活性物質 X の構造とその生産制御機構の解明を目的として研究をスタートした。*ent*-カウレンは高等植物やシダ植物においては植物ホルモン・ジベレリンの生合成中間体として知られる一方、研究材料として用いているコケ植物においてはジベレリンが検出されず、加えて、その生合成に必須の酵素遺伝子が全ては揃わないためコケ植物の成長にジベレリンは必要ないと理解されている。初年度には目的の達成に向けて、以下の 3 アプローチを用いて開始した。(1) ヒメツリガネゴケの *ent*-カウレン合成酵素機能欠失変異株を用いて生物検定系を構築し、その形質回復応答状況を指標として物質 X およびその生合成中間体の検出および精製を展開した。(2) コケゲノムの情報に照らして P450 候補遺伝子を絞り込み、既知遺伝子との相同性・発現応答状況に基づき解析の優先順位をつけ、順次異種発現系を用いて P450 翻訳産物を調製し、その酵素活性の検出により物質 X の生合成に関与するものの特定を狙った。(3) 物質 X の信号受容機構がジベレリンの持つ機構に類するものである可能性を想定し、コケに存在する受容体様・直下の信号伝達因子様の両タンパク質を調製し、その複合体形成活性について酵母 2-ハイブリッド系を用いて調べた。このうち(3)については 2 つのタンパク質間に相互作用が確認されず、奏功の見込みが低いと判断して平成 25 年度終了時点で検討を打ち切った。以降は(1)・(2)のアプローチに重点を置き進めた。以下、この 2 つのアプローチの展開により得られた研究結果を年度ごとに記す。

4. 研究成果

(1) 分化回復応答状況に基づく *ent*-カウレン酸代謝生理活性物質の追跡

(平成24年度) *ent*-カウレンの合成に関わる酵素の欠損に伴い、クロロネマからカウロネマへの分化過程の進行が抑制された状態のヒメツリガネゴケ変異株 A74 に対して、継代の時期、*ent*-カウレン酸の投与時期、照射する光条件、などを変えて培養を継続し、分化回復効果に与える影響を精査した。*ent*-カウレン酸を投与し、固形培地だけでなく液体培養など幾つか大量培養に繋がる可能性がある培養系を試し、各方法で培養した変異株を収穫した中から活性を持つ代謝物の存在が確認できるか調べた。そのため、破碎して有機溶媒で抽出後、溶媒分画および逆相カラム HPLC を用いて精製し、変異株の分化回復状況を指標とする生物検定系を用いて評価した。その結果、液体培養系では明瞭な生理活性を確認することができず、従来から用いてきた固形培地上で生育させる方法を最適と判断した。放射性同位体 (^{14}C) 標識された *ent*-カウレン酸を投与し、分化回復効果を示す生育条件で培養したものについて、破碎後有機溶媒を用いて抽出した酸性低分子有機化合物を対象として薄層クロマトグラフィー (TLC) を行い、イメージングアナライザーと組み合わせて代謝反応の進行を確認した。結果、TLC における移動度として、投与した *ent*-カウレン酸よりも小さな、より高極性の代謝物への変換が生じていることを確認した。

(平成25年度) 前年度の放射性同位体標識物の投与実験により、*ent*-カウレン酸とは構造的に異なる高極性物質への代謝変換が確認されており、その物質に関する構造解析を行うべく活性画分の調製を繰り返した。*ent*-カウレン酸を投与して分化回復傾向を示す変異株の有機溶媒抽出物を対象として、逆相カラムを接続した HPLC による精製・分画を行い、生物検定系に投与して生理活性成分の含まれる画分の特定を試みたところ、前年度に情報を得ていた高極性代謝物の含まれる画分に本検討からも分化回復活性が検出された。

(平成26年度) 投与した *ent*-カウレン酸よりも極性の高い代謝産物を対象として、質量分析機器を用いてその構造情報の取得を目指したが、現状の精製度では夾雑物の妨害等により分析が難しく、加えて、量的にまだ不足していると考えられた。そこで、投与試験にこれまで用いてきた *ent*-カウレン酸を標的として、従来よりもさらに高感度で分析・定量できる手法を模索した。そして、*ent*-カウレン酸はこれまではもっぱら GC/MS を用いて分析してきたがこれを LC/MS/MS でも選

択的に検出可能な手法を開発した。これを突破口として、同手法を上記代謝物の微量検出に活用できるか検討した。その結果、HPLC で分画された各画分の生理活性強度に連動して変動するイオンピーク、すなわち、代謝物に由来すると考えられるイオンピークを LC/MS/MS のマスクロマト上で特定した。

(平成27年度) 前年度に把握した代謝物由来のイオンピークに焦点を当て、新たにインピトロ酵素反応カクテル技術を用いて安定同位体 (^{13}C) で部分的に標識した *ent*-カウレン酸 ($^{13}\text{C}_5$ -KA) を調製し、本系に投与してから代謝物の抽出・精製を試みた。その結果、注目していた当該イオンピークに関して期待どおり分子イオン (M^+) が 5.0 m/z だけ増加することを確認し、当該ピークが KA 代謝物であることを確定させると同時に、その分子量を明らかにした。また、応答状況を撮影した画像と、画像解析用ソフトを用いて処理することによりクロロネマからカウロネマへの分化状況を定量化する手法を考案し、この手法を用いることにより *ent*-カウレン酸と比較して代謝物の生理活性の強弱を議論できるようになった。さらに、HPLC を用いて得られる精製画分の濃縮率をさらに高め、当量的により多くの活性成分が含まれるように系を変えて生物検定系に投与したところ、上記分子量まで明らかにした主要活性画分よりさらに高極性の画分にも生理活性を見出した。これにより、少なくとも「*ent*-カウレン酸 第1代謝物質(分子量判明) 第2代謝物質」までの変換が確認できた。

(2) 生合成に関わる P450 候補分子の特定

(平成24年度) ヒメツリガネゴケのゲノム情報を利用して P450 候補遺伝子、特に高等植物のジベレリン合成に関わる P450 遺伝子に高い相同性を示すものから優先的に着目した。そのうち、*ent*-カウレン酸投与条件、または、光に関する分化誘導条件に連動してその発現量が変動するものは物質 X 生合成過程に関与する可能性が高いと判断した。そして、異種発現系を用いて翻訳産物の調製を優先的に実施した。また解析の途中から、ジベレリン生合成過程と物質 X 生合成過程の分岐点が *ent*-カウレン酸代謝時点である可能性に加えて、過程1段階上流の *ent*-カウレン酸代謝時点である可能性までを考慮して、酵素活性試験を行う際には基質として *ent*-カウレン酸だけでなく *ent*-カウレンの投与も視野に入れて検討する体制とした。各遺伝子に発現動態に関して、より情報を増やす必要があると判断し、次世代シーケンサーを用いて *ent*-カウレン酸および *ent*-カウレンの投与条件を設定し、対照条件と比較して発現量が変化している遺伝子の網羅的な解析を行い、解析対象に据えた候補リストに漏れがあれば追加を行った。

(平成25年度) 前年度の解析から、*ent*-カウレンあるいは *ent*-カウレン酸の投与に応答して発現変動を示す遺伝子群のうち、優先度の高いものの翻訳産物の調製を継続した。リコンビナントタンパク質の生産が確認できたものから *ent*-カウレン等を基質として代謝能の有無を調べたが、目的に合致する分子種の特定には至らなかった。そこで、残る候補の試験を継続しつつ、分化回復の効率が照射する光波長と深く関するとの情報を得て、当該観点を加味して新しく順位づけを検討した。なお、クロロネマからカウロネマへの分化過程は赤色光照射下で促進されるが、これに加えて、青色光では分化ではなく逃避反応が生じ、その反応に物質 X が関与することを新たに発見した。従って、この観点も含めて次世代シーケンサーを用いた再度の網羅的発現解析を計画し、おそらく相同性の高さなどに基づかない新たな候補遺伝子の列挙こそが突破口と期待してその準備に着手した。

(平成26年度) 注目した P450 候補遺伝子についてはほぼ全て、異種発現系を用いた翻訳産物の調製を行い、リコンビナントタンパク質の調製が認められたものについては酵素反応の進行を検討したが *ent*-カウレンおよび *ent*-カウレン酸を代謝するものは見つからなかった。また、P450 差スペクトル解析を用いて行う「*ent*-カウレン酸を基質とする結合活性に基づくスクリーニング法」が基質特定法として有用と判明したため、これを受けて各リコンビナントタンパク質と基質であるはずの *ent*-カウレン酸を用いて、結合活性の有無による P450 候補の可能性を検討した。外部委託する予定で前年度から準備を進めていた次世代シーケンサーを用いた再度の解析では、やはり対象植物のヒメツリガネゴケが一般的によく用いられる実験植物ではないことに起因して、信頼性の高い結果を入手するためには事情に精通する研究者の協力を要することが計画の途上で判明し、その共同研究体制を整えるため期間延長をリクエストして認められた。

(平成27年度) 異所発現系を用いて調製したリコンビナントタンパク質から *ent*-カウレン酸代謝能を持つものは確認されず、酵素としての活性自体を維持していない可能性は残るものの最終的に奏功しなかった。次世代シーケンサーによる発現解析は共同研究体制が整い、具体的な準備段階に入ったが、確度高いアウトプットを得るために要求された代謝の安定性および反応量の向上に大半の時間を割いて再三の検討を加えた。このため、年度内の解析実施が時間的に難しい公算となったが、新たな候補絞り込みの切り札として軽々に進めるべきことではないと考えて慎重に準備を進めた。酵素活性の

維持が難しい分子種が物質 X への代謝を担う可能性までを見越し、候補遺伝子の破壊株の作成を順次開始した。

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 3 件)

Sho Miyazaki, Hikaru Toyoshima, Masahiro Natsume, Masatoshi Nakajima and Hiroshi Kawaide, Blue-light irradiation up-regulates the *ent*-kaurene synthase gene and affects the avoidance response of protonemal growth in *Physcomitrella patens*, *Planta*, 2014, 117-124
DOI:10.1007/s00425-014-2068-4.

Sho Miyazaki, Masatoshi Nakajima and Hiroshi Kawaide, Hormonal diterpenoids derived from *ent*-kaurenoic acid are involved in the blue-light avoidance response of *Physcomitrella patens*, *Plant Signal. Behav.* (2015) 10, e989046
DOI:10.4161/15592324.2014.989046.

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

[学会発表](計 17 件)

Sho Miyazaki, Hikaru Toyoshima, Yuri Aoyama, Masahiro Natsume and Hiroshi Kawaide: Biochemical analysis of *ent*-kaurene oxidase in the *Physcomitrella patens*, TERPNET2013, ポスター発表, ギリシャ・クレタ, 2013年6月1-5日.

Sho Miyazaki, Hikaru Toyoshima, Masahiro Natsume, Masatoshi Nakajima and Hiroshi Kawaide. Biochemical analysis of *ent*-kaurene oxidase in the *Physcomitrella patens*, Plant Growth Regulation Society of America, ポスター発表, 米国・サンフランシスコ, 2014年7月13-17日.

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.

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

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*. Pacifichem 2015, ポスター発表, 米国・ホノルル, 2015年12月15-20日.

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*. Pacifichem 2015, 口頭&ポスター発表, 米国・ホノルル, 2015年12月15-20日.

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

宮崎 翔, 豊島 輝, 夏目雅裕, 中嶋正敏, 川出 洋. ヒメツリガネゴケにおけるジテルペン型成長制御物質の生理機能と生合成研究, 第23回イソプレノイド研究会例会, 口頭発表, 東京, 2013年9月14日.

Seung-Hyun Park, 中嶋正敏, 川出 洋, 林 謙一郎, 浅見忠男. ヒメツリガネゴケの原系体誘導物質に関する研究, 植物化学調節学会第48回大会, ポスター発表, 新潟, 2013年11月1日.

豊島 輝, 宮崎 翔, 夏目雅裕, 中嶋正敏, 川出 洋. 青色光に対するヒメツリガネゴケ原系体の忌避反応はジベレリン様新奇成長制御物質の制御を受ける, 植物化学調節学会第48回大会, ポスター発表, 新潟, 2013年11月1日.

Seung-Hyun Park, 大谷征史, 川出 洋, 林 謙一郎, 中嶋正敏, 浅見忠男. ヒメツリガネゴケ原系体の分化誘導に関わるジベレリン様新奇成長制御物質の探索, 日本農芸化学会, 口頭発表, 東京, 2014年3月27-29日.

宮崎 翔, 豊島 輝, 夏目雅裕, 中嶋正敏, 川出 洋. 青色光に対するヒメツリガネゴケ原系体の忌避反応にジベレリン様新奇成長制御物質が関与する, 日本農芸化学会, 口頭発表, 東京, 2014年3月27-29日.

宮崎 翔, 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で機能するジベレリン様分化制御物質の追究, 植物化学調節学会第49回大会, 京都, 2014年10月17-19日.

Che-Dong Yang, 宮崎 翔, Seung-Hyun Park, 大谷征史, 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促進活性を指標とした化合物探索, 植物化学調節学会第49回大会, 京都, 2014年10月17-19日.

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.

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するジベレリン様成長制御物質の探索, 日本農芸化学会, ポスター発表, 札幌, 2016年3月27-30日.

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, ポスター発表, 札幌, 2016年3月27-30日.

〔図書〕(計 0 件)

〔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：50237278

(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・准教授
研究者番号：20291916

(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：30289136