

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02142

研究課題名(和文) コケ内在性ジベレリン起源物質の生理活性制御機構の解明

研究課題名(英文) The regulatory mechanism of endogenous gibberellin-like substances 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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：研究者らが構造決定したヒメツリガネコケ分化制御物質自身が活性本体であることの実証に挑んだ。制御物質の生合成酵素の同定が最重要の課題と捉えて、遺伝子発現状況から有力候補の絞り込みと、酵母発現系や植物を用いる一過的発現系を種々の確度から検討したが標的の酵素活性は最終的に見出せなかった。視野を拡大し、絞り込み範囲に従来は含めなかった分子種も検討に加えたところ、1つ以上の分子種から物質代謝に関与し得る酵素活性を見出した。これらが分化制御物質の生合成に直接関わるか慎重に検討し、各遺伝子破壊株取得に向けた準備を進める状況にある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の進化を論じる上で、高等植物の対極に位置づけて論じられることが多いコケ植物の重要性が一段と認識されるようになってきた。コケ植物はそれ自身がバイオマス素材として注目されるほか、震災発生後は放射能汚染地域の土地有効活用案として植物工場に注目が集まり、その室内において土に代わる素材としても有用視されている。コケ原系体の分化制御は、栄養生長から生殖生長への切り替えを司ることから研究者らがその構造を解明した生理活性物質の量的制御が人為的に可能となれば、コケ植物の産業活用の観点からも多大な貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have planned to elucidate that the endogenous regulator of a moss differentiation is physiologically active itself, and challenged to identify its biosynthetic enzyme. We narrowed down several candidates for the enzymes, based on the genes expression, and examined the all candidates with heterologous expression in the yeasts or plants. Unfortunately, the target enzyme activity could not be found in them. So then, we expanded our view points and added molecular species that were not previously included. We detected any enzyme activity that could be involved in the regulator's metabolism. Now we are in the process of carefully examining whether these are directly involved in the biosynthesis and we are preparing the moss strains of which each gene is knocked out.

研究分野：天然物生理化学・生物有機化学

キーワード：コケ 植物生理活性物質 生合成 信号伝達 ジテルペン

1. 研究開始当初の背景

2010年、本研究を組織する3研究者らはコケ植物の生活環に作用する分化促進物質として、*ent*-カウレン酸を経由する未同定生理活性物質の存在を報告した。すなわち、このコケ植物には植物ホルモン・ジベレリンの生合成中間体と位置づけられる上記 *ent*-カウレン酸までの合成能力があるものの、以降の代謝に必要な酵素群が欠けており、現に生体内からはジベレリンが検出されず、おそらく無い可能性が濃厚である。それにも関わらずジベレリン合成経路を途中で遺伝的または化学的に遮断した結果、当該コケ植物の分化に影響が生じた。そして、ジベレリン投与でこの影響は回復しないが、生合成中間体 *ent*-カウレン酸の投与ならば完全に回復した。これを根拠として「ジベレリンとは構造の異なる *ent*-カウレン酸代謝物が当該コケ植物の分化制御に関わる」ことを報告した。これを受け、*ent*-カウレン酸欠損変異体に *ent*-カウレン酸を投与して回復の兆しを見せる個体群を集め、逆相 HPLC 上で *ent*-カウレン酸と保持時間の異なる回復活性成分を見出し、安定同位体標識 *ent*-カウレン酸と LC-MS/MS を駆使した *ent*-カウレン酸代謝物の追跡、GC/MS あるいは NMR を用いた構造解析、さらに遺伝子の発現解析を通じて活性本体と目される物質の分子構造を特定した。ただし、この段階において研究者らが構造を決定した物質が生理作用を直接及ぼす活性本体であると断定するには時期尚早であり、さらに別の物質へ向かう生合成中間体である可能性を排除するものではなかった。よって、この物質自身が生理活性を持ついわゆる活性本体であることを確定することが最も重要な課題であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、構造を決めたコケ内在性分化誘導物質の生合成酵素あるいは受容体を特定し、この物質がコケの分化制御に直接関わる活性本体であることを確定させることである。

3. 研究の方法

目的の達成に向けて以下のアプローチを展開した。酵母を用いた異所発現系、および、植物における一過的発現系を利用して、網羅的解析の結果から入手したコケ遺伝子に関する発現応答状況に基づき、生合成酵素候補として絞り込んだ各遺伝子からのリコンビナント調製を展開し、GC/MS を用いた酵素活性の検出を試みた。加えて、構造を決めたコケ内在性分化誘導物質それ自身が思惑通り生理活性本体であるとするならば、その生合成酵素は「最終活性化酵素」と表現することができる。従って、この酵素の遺伝子破壊株は当該分化誘導物質の生産能が激減すると予想され、また、*ent*-カウレン酸投与では当該物質が正常に生合成されないことから明瞭な回復応答を示さないとの予想を立てた。そこで、候補遺伝子の破壊株を順次作出した。継代過程において、分化過程の進行状況にわずかであっても影響が生じたものを残し、*ent*-カウレン酸投与による回復試験を実施した。うち2株については、明瞭な回復が認められなかったことから、LC-MS/MS を用いて当該物質および関連物質の内生量を測定して当該物質の低下が確認されるか検討した。他方、分化制御に関わるコケ内在性分化誘導物質に対する受容体を生化学的に特定し、そのリガンド選択性を直接調べることにより「当該物質＝生理活性本体」を明らかにするアプローチも展開した。分化制御に関わる受容体候補分子検出のため、既に選抜済みの人工的分化誘導化合物の構造類縁体を調製し、投与効果を調べて構造-活性相関情報を蓄積した。光親和標識能付与を視野に入れた構造類縁体を調製してコケ変異体に投与し、生理活性強度の評価までは到達した。結局、光親和標識体の調製には至らず、受容体候補断片の配列解析、受容体候補の遺伝子破壊株の作出等はできなかった。

4. 研究成果

研究グループによりその分子構造が決定されたコケ内性物質(*Mol Plant*, 2018)について、ヒメツリガネゴケの分化制御を司る生理活性本体であることを明らかにすることを本研究の主眼に据えてきた。最終年度に向けた本研究の推進効率化向上のため、受容体候補の生化学的同定用プローブ合成については展開規模を縮小した。その代わりに、原糸体の分化を促すコケ内性物質こそがヒメツリガネゴケで機能する生理活性本体であることの確証を得るアプローチに集中する体制をとった。このアプローチでは、分化を促すコケ内性物質の生合成酵素遺伝子の同定が成否のカギとなっており、以前に実施した網羅的発現解析等の結果に基づいて遺伝子発現状況の比較から有力な候補遺伝子を絞り込み、これらを対象に酵母を用いた発現系を検討した。また本年度から新たに植物を用いた一過的発現系も検討したが、最終的に標的とする酵素活性を見出すことはできなかった。次世代シーケンサによる発現解析結果を用いて効率良い候補の絞り込みを達成したにも関わらず、未だ分子の特定までは至らず、「異所発現させた当該物質の生合成酵素

は活性維持が難しい分子」と推測している。これらの状況から期中において絞り込みの視野を拡大し、これまでは生合成酵素遺伝子の候補絞り込み範囲に含めていなかった分子種についても検討に加え吟味したところ、1つ以上の分子種がコケ内性物質の代謝変換に関与し得る酵素活性を持つことを見出した。これらが活性本体と目するコケ内性物質の生合成・代謝に直接関わるものであるか慎重に検討を加えるとともに、各遺伝子破壊株の取得に向けて準備を進める状況にある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 S. Miyazaki, M. Hara, S. Ito, K. Tanaka, T. Asami, K. Hayashi, H. Kawaide and M. Nakajima	4. 巻 11
2. 論文標題 An ancestral gibberellin biosynthetic pathway in the moss <i>Physcomitrella patens</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol. Plant	6. 最初と最後の頁 1097-1100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molp.2018.03.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 S. Miyazaki, K. Tomita, H. Yamane, M. Kobayashi, T. Asami and M. Nakajima	4. 巻 28
2. 論文標題 Characterization of a helminthosporic acid analog that is a selective agonist of gibberellin receptor.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorg. Med. Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 2465-2470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2018.06.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 K. Tomita, S. Miyazaki, K. Furihata, M. Nakajima and T. Asami	4. 巻 56
2. 論文標題 Assignment of ¹ H and ¹³ C NMR data of four helminthosporol analogs containing bicyclo[3.2.1]oct-6-ene framework.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Magn. Reson. Chem.	6. 最初と最後の頁 1130-1134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mrc.4761	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 N. Jaroensanti-Tanaka, S. Miyazaki, A. Hosoi, K. Tanaka, S. Ito, S. Iuchi, T. Nakano, M. Kobayashi, M. Nakajima and T. Asami	4. 巻 82
2. 論文標題 A chemical NJ15 affects hypocotyl elongation and shoot gravitropism via cutin polymer formation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biosci. Biotech. Biochem.	6. 最初と最後の頁 1770-1779
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2018.1484278	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 M. Nakajima, S. Miyazaki, H. Kawaide	4. 巻 61
2. 論文標題 Hormonal Diterpenoids Distinct to Gibberellins Regulate Protonema Differentiation in the Moss <i>Physcomitrium patens</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 1861-1868
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcaa129	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宮崎 翔, 川出 洋, 中嶋 正敏
2. 発表標題 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
3. 学会等名 新規素材探索研究会第17回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中-ジャルンサンティ ナイヤネート、宮崎 翔、細井 昂人、田中 啓介、伊藤 晋作、井内 聖、中野 雄司、小林 正智、中嶋 正敏、浅見 忠男
2. 発表標題 オーキシン・ブラシノステロイド信号伝達同時制御剤耐性株の選抜
3. 学会等名 日本農業学会第43回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中-ジャルンサンティ ナイヤネート、宮崎 翔、細井 昂人、田中 啓介、伊藤 晋作、井内 聖、中野 雄司、小林 正智、中嶋 正敏、浅見 忠男
2. 発表標題 オーキシン・ブラシノステロイド信号伝達同時制御剤耐性株の解析
3. 学会等名 植物化学調節学会第53回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中-ジャルンサンティ ナイヤネート、宮崎 翔、富田 憲司、細井 昂人、田中 啓介、伊藤 晋作、井内 聖、中野 雄司、小林 正智、中嶋 正敏、浅見 忠男
2. 発表標題 オーキシン・ブラシノステロイド信号伝達同時制御剤耐性株の解析
3. 学会等名 日本植物生理学会第60回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中-ジャルンサンティ ナイヤネート、宮崎 翔、富田 憲司、細井 昂人、田中 啓介、伊藤 晋作、井内 聖、中野 雄司、小林 正智、中嶋 正敏、浅見 忠男
2. 発表標題 オーキシン・ブラシノステロイド信号伝達同時制御剤耐性株の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	川出 洋 (Kawaide Hiroshi) (20291916)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授 (12605)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------