

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15460

研究課題名(和文) 苔類に特徴的な大環状芳香族化合物の生合成機構および生理作用の解明

研究課題名(英文) Elucidation of biosynthetic pathway and physiological function of macrocyclic compounds produced by bryophytes

研究代表者

北岡 直樹 (Kitaoka, Naoki)

北海道大学・農学研究院・准教授

研究者番号：20785547

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)：苔類に属する様々な種からみついている一方で、苔類以外の植物種からはみつけない『苔類にユニークな代謝産物』が植物体内でどのように作られ(生合成され)、どのような役割を担っているか(生理作用を有するか)を明らかにすることを目的として本研究課題では研究を進めた。標的代謝産物の生合成に関わることが予想される遺伝子をゼニゴケゲノムより見出した。得られた候補遺伝子の破壊株の作製、遺伝子発現量の解析、組換えタンパク質を用いた機能解析を通して、それら遺伝子の機能解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で見出した生合成遺伝子クラスターは、苔類のゲノム上で見出した一例目の生合成遺伝子クラスターである。本研究で見出した遺伝子クラスター上の遺伝子の機能解析を進めることで、苔類における二次代謝産物の生合成研究が飛躍的に進行することが期待される。ゼニゴケなど苔類の植物の細胞内には脂溶性芳香族化合物やテルペノイドを貯蔵する「油体」と呼ばれる構造を有し、大量の二次代謝産物を蓄積している。ゼニゴケの代謝産物の生合成機構の解明に迫る本研究結果は、ゼニゴケを宿主とした有用物質大量生産プロセスを可能とする、第一歩と思われる。

研究成果の概要(英文)：I researched about the biosynthetic pathway and physiological function of unique metabolites in bryophytes. The biosynthetic genes were identified in *Marchantia polymorpha*. The knock-out lines of the candidate genes were produced by CRISPR/Cas9. The target compounds in produced knock-out lines were quantified. The gene expressions of the candidate genes were observed after the wounding and UV treatments. The enzyme activities were examined using the recombinant proteins.

研究分野：生物有機化学

キーワード：苔類 生合成

## 1. 研究開始当初の背景

陸上植物は藻類から進化し、約5億年前に水中から陸上へと進出した。陸上への進出には乾燥やUVといった非生物ストレスや病原菌などの生物ストレスへの適応が不可欠である。陸上植物においては、それらストレスに対する適応手段の一つとしてフェニルプロパノイドなどの二次代謝産物の生合成経路が発達したと考えられている。陸上進出後の最も早い時期に他の種から分かれて独自に進化した植物の系統の1つであり、陸上植物の祖先の特徴を有する苔類はフェニルプロパノイド化合物を高蓄積している。苔類のフェニルプロパノイドの中には、苔類に属する様々な種から同定されている一方で、苔類以外の植物種からは同定されていない『苔類に特徴的な代謝産物』も存在する。それら代謝産物の中には、2個のベンゼン環を持つビベンジルがエーテル結合もしくはピアリール結合で連結した極めてユニークな化学構造を有する大環状芳香族化合物であるビスビベンジル類も含まれる。植物体内における代謝産物の生理作用を解明する上で、「対象となる代謝産物を生合成できない生合成遺伝子破壊株」の表現型の解析が重要であるが、ビスビベンジル類を含むゼニゴケのフェニルプロパノイド化合物の生合成経路の大部分は未解明であり、それら代謝産物の生理作用はよくわかっていなかった。

病虫害や環境ストレスに応答して植物の二次代謝産物の生合成が誘導されることが明らかとなっている。種子植物においては、ジャスモン酸が二次代謝産物の生合成誘導の鍵となる植物ホルモンであることが知られている。ジャスモン酸の生合成やシグナル伝達に関わる多くの遺伝子が苔類においても保存されていることが明らかとなっている。ジャスモン酸受容体 COI1-JAZ の相互作用を誘導するリガンドが、高等植物ではジャスモン酸イソロイシンである一方、ゼニゴケでは dn-12-oxo-phytodienoic acid (dn-OPDA) であることが明らかとなっている。dn-OPDA はジャスモン酸の生合成中間体であり、ゼニゴケにおける JA の存在や生理作用はよくわかっていなかった。JA のメチルエステル体であるジャスモン酸メチル (MeJA) は揮発性警報シグナルと考えられ、種子植物において MeJA は二次 (特化) 代謝産物の生合成遺伝子など種々の JA 類応答遺伝子の転写を誘導することが知られている。

## 2. 研究の目的

本研究では、苔類の二次代謝産物、特にフェニルプロパノイドの生合成機構を明らかにするとともに、種子植物の二次代謝産物の生合成を司る MeJA の代謝、および、JA の生合成に関する研究を行なった。

## 3. 研究の方法

### 3-1 ゼニゴケのフェニルプロパノイド化合物に関する研究

ゼニゴケのゲノム上に見出したフェニルプロパノイド経路への関与が予想される生合成遺伝子クラスター上の遺伝子の機能解析を行った。具体的には、ゲノム編集を用いて作製した破壊株におけるフェニルプロパノイド関連化合物の内生量分析、組換え酵素を用いた酵素活性の評価、および、遺伝子の発現量の解析を行った。

### 3-2 ゼニゴケの MeJA の代謝および JA の生合成に関する研究

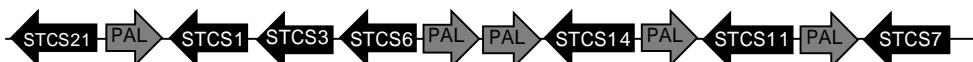
重水素で標識した MeJA-d3、methyl 4,5-didehydrojasmonate-d6 と methyl 3,4-didehydrojasmonate-d6 をゼニゴケに空気伝搬処理し、それら化合物の代謝を調べると共に、ゼニゴケの JA 経路へのフィードバック制御を調べた。

## 4. 研究成果

### 4-1 苔類ゲノム上における遺伝子クラスターの発見

植物の二次代謝産物の生合成遺伝子の中には、同じ生合成経路上の生合成遺伝子群がゲノムの近傍に存在する「生合成遺伝子クラスター」を形成するものがある。これを踏まえ、ゼニゴケのゲノムを調査した。その結果、フェニルプロパノイド経路への関与が予想される stilbene and chalcone synthase (STCS)と phenylalanine ammonia lyase (PAL)と推定される遺伝子が隣り合うゲノム領域をゼニゴケの4番染色体と5番染色体に発見した。さらに興味深いことに、4番染色体上の遺伝子クラスターにおいては、リグニン生合成などにおいて芳香族化合物の酸化的重合への関与が報告されている peroxidase も存在していることを明らかとした。

#### 4番染色体上のクラスター



#### 5番染色体上のクラスター

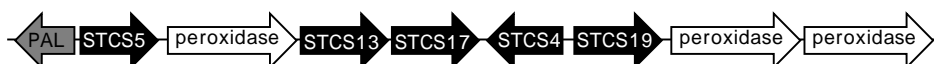


図1 ゼニゴケゲノムに見出した生合成遺伝子クラスター

### 4-2 STCS 破壊株の作製

4-1 で示した二つの生合成遺伝子クラスターのうち、peroxidase も含まれる5番染色体のクラスターに特に注目し、研究を進めた。5番染色体上の STCS4、STCS5、STCS13、STCS17 とクラスター外に存在する STCS17 は互いに高い相同性を有していたため、それら5遺伝子が破壊された5重破壊株をゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 を用いて作製した。作製した5重破壊株におけるフェニルプロパノイド類の内生量を分析した。ビスビベンジル類の内生量は野生株と同程度であった一方で、フラボノイドである apigenin および luteolin の内生量は野生株と比べて有意に減少していることがわかった。

### 4-3 STCS の遺伝子発現量解析

これまでに、UV 処理や傷処理により、ビスビベンジル類、apigenin、luteolin などのフェニルプロパノイド関連化合物の蓄積量が上昇することが確認されている。そのため、それら処理を行なったゼニゴケ野生株における STCS 遺伝子の発現量を解析した。STCS4、STCS5、STCS12、および、STCS13 は配列の類似性が非常に高く、各遺伝子を増幅する定量 PCR 用のプライマーを設計することが困難であった。そのため、4つの遺伝子を増幅するプライマーを用いて遺伝子発現量の解析を行なった。その結果、STCS4、STCS5、STCS12、および、STCS13 の発現量は UV 処理により有意に増加することが明らかとなった。

### 4-4 組換え酵素を用いた STCS の機能解析

大腸菌 BL21(DE3)株を宿主として、STCS4、STCS5、STCS17 の組換え酵素を His-tag 融合タンパク質をそれぞれ発現した。Ni アフィニティーカラムにより精製し得られた組換え酵素を基質として *p*-coumaroyl-CoA と malonyl-CoA を用いた酵素反応試験に供した。その結果、STCS4 の反応液において、ごく少量ではあるが naringenin もしくは naringenin chalcone と思われるピークを検出した。

### 4-5 Peroxidase 破壊株の作製

4-2 と同様に、CRISPR/Cas9 により、5番染色体の生合成遺伝子クラスター上の peroxidase 遺伝子の破壊株を作製した。3つある peroxidase 遺伝子のうち、2遺伝子の各単独破壊株の作製に成功した。作製した peroxidase 破壊株におけるフェニルプロパノイド関連化合物の内生量を分析したが、野生株と比較して顕著な内生量の増減は見られなかった。

### 4-6 Peroxidase の遺伝子発現量解析

4-4 と同様に、UV 処理や傷処理後の5番染色体の生合成遺伝子クラスター上の peroxidase 遺伝子の発現量を解析した。その結果、UV 処理では3つの peroxidase 遺伝子の発現量が上昇し、傷処理では2つの peroxidase 遺伝子の発現量の上昇することを明らかとした。

#### 4-7 ゼニゴケにおける MeJA の代謝経路の確認

MeJA の重水素標識体である MeJA-d3 を空気伝播させ、ゼニゴケにおける MeJA-d3 の代謝と内生 JA 類へのフィードバック制御を調べた。その結果、MeJA-d3 を空気伝播させたゼニゴケで、JA-d3 とその 12-ヒドロキシ体である 12-OH-JA-d2 が蓄積し、MeJA-d3 からそれら化合物への変換を確認した。その一方で、JA-IIIe の重水素標識体は検出限界以下であった。さらに興味深いことに、MeJA-d3 を処理したゼニゴケにおいて、JA および dn-OPDA の非標識体の内生量と、それら化合物の生合成遺伝子の転写量の有意な増加を確認した。これは、気中より吸い取った MeJA-d3 もしくはその代謝物はゼニゴケに受容され、正のフィードバックにより JA の生合成を誘導したことを示唆する。MeJA-d3 処理後の非標識体 JA の有意な増加は、ゼニゴケが JA を生合成していることを決定づける結果と考えられる。ゼニゴケにおける JA の生合成経路を明らかにするために、methyl 4,5-didehydrojasmonate-d6 と methyl 3,4-didehydrojasmonate-d6 を空気伝播処理を施した植物における JA 類の内生量分析を行った。その結果、methyl 4,5-dihydrojasmonate-d6 を処理したゼニゴケにおいて、JA-d6 が検出された。本結果より、ゼニゴケにおいて 4,5-didehydro-JA を経由する経路で JA が生合成されることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1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 北岡直樹、高橋公咲	4. 巻 56
2. 論文標題 ジャスモン酸類の生合成およびシグナル伝達機構の進化	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 植物の生長調節	6. 最初と最後の頁 77-84
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 北岡 直樹, 都築 玄武, 高橋 公咲, 松浦 英幸	4. 巻 7
2. 論文標題 ゼニゴケにおけるジャスモン酸の生合成	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 60-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Hiromu Tsuzuki, Naoki Kitaoka, Shiro Inoue, Kosaku Takahashi, Hideyuki Matsuura	4. 巻 -
2. 論文標題 Airborne Methyl Jasmonate is Metabolized to Jasmonic Acid and 12-Hydroxyjasmonic Acid, and Induces Jasmonate Biosynthesis in Marchantia polymorpha	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ChemistrySelect	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 都築玄武, 井上史郎, 北岡直樹, 松浦英幸
2. 発表標題 空気伝搬させた methyl jasmonate がゼニゴケの植物ホルモン内生量に与える影響の解明
3. 学会等名 2021年度 日本農芸化学会北海道支部第2回学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 都築玄武, 井上史郎, 北岡直樹, 松浦英幸
2. 発表標題 空気伝搬のジャスモン酸類縁体がゼニゴケのジャスモン酸生成に与える影響の解明
3. 学会等名 植物化学調節学会第57回大会
4. 発表年 2022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

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