

令和元年6月17日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03283

研究課題名(和文) 化学防衛による植物陸上進出・陸域生態系適応戦略の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the system to get success on land by using chemical weapons

研究代表者

松井 健二 (Matsui, Kenji)

山口大学・大学院創成科学研究科 教授

研究者番号：90199729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：ゼニゴケは初めて陸上進出した植物の現生系統で、植物の陸域生態系適応の原型を有していると期待できる。本研究では陸域生態系での植食者との共進化で獲得した化学防衛システムの全容を明らかにする目的でゼニゴケの化学防衛物質のうち特にテルペン化合物の生成集積機構の解明を目指した。ゼニゴケゲノムの精査により菌類型テルペン合成酵素を11種見だし、それらが比較的近い過去に遺伝子重複により生じたことを確認した。また、その遺伝子の発現は油体細胞特異的であり、そのままでは自己にも毒性を示す化合物を防衛に十分高濃度に蓄積するために二次代謝産物合成に特化した細胞を分化させてきたことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

苔類は最初に陸上進出に成功し、他の植物系統が絶滅して行く中、陸域生態系を今日まで生き抜いてきた。その現生系統のゼニゴケは多様な化学防衛物質を構成的に持つことで高い防衛体制を常に有している。本研究ではそうした防衛体制が進化の過程でどのように獲得されてきたのかの一面を明らかにしたもので、その成果を活用することで新しい環境耐性強化植物の創成が期待できる。

研究成果の概要(英文)：It is assumed that *Marchantia polymorpha* still keeps some of the original systems that were acquired during settling on land. Among those, harnessing chemical weapons, such as terpenoids, seem to be responsible for its success on lands. In this study, we aimed to figure out how *M. polymorpha* acquired the genes for chemical defense and how *M. polymorpha* improved the system to accumulate the chemicals in distinct cells. A deep data-mining with genome sequence of *M. polymorpha* yielded more than 30 genes for terpene synthase (TPS). Among them, those similar to fungal TPS were shown to be involved in sesquiterpene synthesis. It was assumed that the genes duplicated many times very recently. A promoter-assay with *TdTomato* showed that the fungal type TPSs specifically expressed in oil body cells. Accordingly, it was suggested that acquiring TPS from fungi and innovation of cell-factories specific to form and store terpenoids took an important role for settling on lands.

研究分野：生物分子化学

キーワード：ゼニゴケ テルペン合成酵素 セスキテルペン 油体細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

テルペン類は炭素数5のユニットが縮合して生成される化合物群(図1)で、多岐にわたる生理活性により医薬、香料として利用されている。そのうち、モノ(C10)/セスキ(C15)テルペン類はほぼ全ての陸上植物が持ち、その揮発性も相まって植物と植物を取り巻く生物たちとの相互作用を媒介することで現在の陸域生態系を構成している。約5億年前に始まった植物の陸上進出後、多くの植食者も陸上進出し、陸上植物は植食者に対する防衛を迫られた。植物はこの課題克服のひとつにテルペン類による化学防衛を採用したと考えられる。C10/C15合成系は最初に陸上進出したタイ類が陸上で初めて獲得したと考えられ、植物の陸域生態系適応に欠かせなかったと考えられる。ゼニゴケ綱植物には油体細胞と呼ばれる、ほぼ油体だけからなる異型細胞が散在する(図2)。研究代表者はゼニゴケC10/C15類が油体細胞特異的に集積していることを明らかにし、C10/C15生成能獲得とそれらの特異的集積両方が陸上での適応に必須であったと提案した^{1,2)}。タイ類は陸上進出以降適応放散し、数億年も生き延びた成功者である。成功の鍵のひとつがテルペン類による化学防衛能の獲得だった。ほぼ全ての維管束植物がタイ類と同様、テルペン合成酵素(TPS)でC10/C15を作り、分泌集積により区画化して高度な化学防衛システムを樹立している。このシステムはそれぞれ独立して獲得されたであろうがこの類似性はテルペン類による化学防衛システムは植物が陸域生態系で適応度を高めるための極めて優れた形質であることを意味する。現生タイ類で本システム獲得過程を解明し、その過程を維管束植物と比較することでなぜテルペン類が選ばれたのか、その化学防衛戦略の基本原理は何か、を明らかにできると期待される。

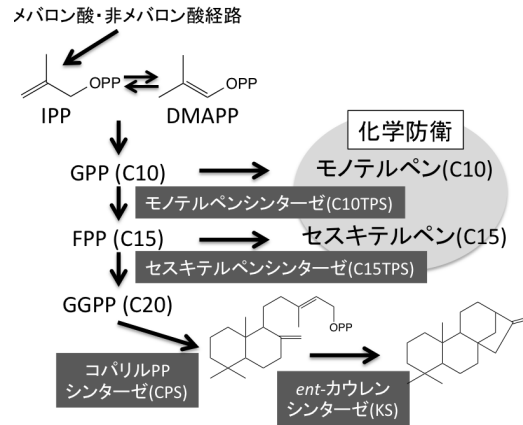


図1 テルペン類合成経路概略図
本研究で対象とする構成物を中心に記した。

ゼニゴケ綱植物には油体細胞と呼ばれる、ほぼ油体だけからなる異型細胞が散在する(図2)。研究代表者はゼニゴケC10/C15類が油体細胞特異的に集積していることを明らかにし、C10/C15生成能獲得とそれらの特異的集積両方が陸上での適応に必須であったと提案した^{1,2)}。タイ類は陸上進出以降適応放散し、数億年も生き延びた成功者である。成功の鍵のひとつがテルペン類による化学防衛能の獲得だった。ほぼ全ての維管束植物がタイ類と同様、テルペン合成酵素(TPS)でC10/C15を作り、分泌集積により区画化して高度な化学防衛システムを樹立している。このシステムはそれぞれ独立して獲得されたであろうがこの類似性はテルペン類による化学防衛システムは植物が陸域生態系で適応度を高めるための極めて優れた形質であることを意味する。現生タイ類で本システム獲得過程を解明し、その過程を維管束植物と比較することでなぜテルペン類が選ばれたのか、その化学防衛戦略の基本原理は何か、を明らかにできると期待される。

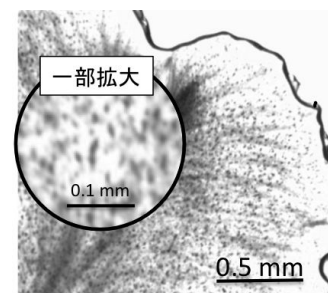


図2 ゼニゴケ葉状体油細胞
ゼニゴケ葉状体を脱色すると油細胞が斑点状に観察できる。

1) Kihara et al. (2014) *Phytochemistry*, 107, 42-49. 2) 田中ら (2015) 第59回 TEAC 講演要旨集 pp. 314-316.

2. 研究の目的

①-1 植物陸上進出と関連づけてテルペン合成酵素の進化過程を明らかにする 植物のC10/C15TPSは、コパリルニリン酸合成酵素(CPS)とent-カウレン合成酵素(KS)を併せ持つCPS/KS型TPSから進化したと考えられている。研究開始当初ゼニゴケには6個のTPS様遺伝子が知られていたが全てCPS/KS型TPSと相同なドメイン構成で、ゼニゴケのC10/C15生成能を説明できなかった。そこで、ゼニゴケゲノムのマイニングによりTPS様遺伝子を探索しC10/C15TPSを同定する。その配列情報からゼニゴケがどのようにC10/C15TPSを獲得したか、明らかにする。

テルペン類による化学防衛がタイ類の適応度を高めていることを実証する 現生の植食者でタイ類食者は限られている。これはタイ類が構成的に化学防衛しているためでその一部はC10/C15に依存していると考えられる。そこで、遺伝子操作、変異体単離によってC10/C15生成能欠損ゼニゴケを作成し、タイ類食者(シギアブ、コバナガ)、非タイ類食者(ハダニ、ハスモンヨトウ)を用いた生物検定を実施し、テルペン類による化学防衛がタイ類の適応度維持に寄与していることを実証する。

テルペン類分泌集積システムの分子基盤を明らかにする C10/C15をゼニゴケ葉状体上に垂らすと数分で組織が死滅した。この毒性は植食者に対する化学防衛には不可欠だが、生産者自身にも作用するので、植物がC10/C15を高濃度に蓄積することを困難にしている。このジレンマの克服に種子植物は樹脂道、油胞、分泌性トリコームなどの分泌集積システムを開発し、区画化によって防衛物質の高濃度化を達成している。タイ類は細胞内油体にテルペン類を分泌集積しており²⁾、中でもゼニゴケ綱植物は殆ど油体だけからなる異型細胞(油体細胞)を分化させ、特異的分泌集積システムの高度化に成功している。このシステムには油体細胞の分化、C10/C15合成経路の油細胞特異的活性化、生成したC10/C15の油体への細胞内輸送、といった複雑なプロセスが介在するがその分子機構は未解明である。そこで、タイ類ゼニゴケで油体細胞特異的発現遺伝子の単離、油体細胞/油体形成不全変異体の単離とその変異原因遺伝子の同定を進め、C10/C15分泌集積機構を解明する。

3. 研究の方法

ゼニゴケTPS様遺伝子の機能解析

ゼニゴケゲノムは共同研究者の河内らの研究により随時アップデートされている。その最新のゲノム情報の供与を受け、ゼニゴケゲノム中のTPS様遺伝子を網羅的に探索する。得られたTPS候補遺伝子のゲノム内での分布、配列情報に基づく分類を進め、ゼニゴケがC10/C15生成のた

めにどのように TPS 遺伝子を獲得してきたか解明する。

油細胞転写物解析

油細胞特異的に発現する遺伝子を特定するためゼニゴケ葉状体から油体細胞を取り出し、1細胞 RNA-Seq 技術を用いて油体細胞特異的に発現する遺伝子を同定する。一方で、これまでにゼニゴケは栽培条件によって油体細胞数と大きさを変化させることを確認している。そこで、油体細胞数が増える条件で栽培している途上のゼニゴケ葉状体について定量的 RT-PCR を実施し、油体細胞数増加と相関する TPS 遺伝子を特定する。

油細胞形成不全変異体のスクリーニング

ゼニゴケ孢子にメタンスルホン酸エチル(EMS)処理で化学変異を導入し、バーミキュライト上の油体細胞形成条件で栽培し、葉状体の一部を切り取って漂白剤処理後実顕微鏡で油細胞を確認(上記図2参照)することで油細胞形成不全変異体をスクリーニングする。ゼニゴケ葉状体は半数体なので変異導入第一世代でスクリーニング可能である。得られた変異体については細胞形態観察と代謝物解析を進め、戻し交雑による後代で SNP 解析により変異遺伝子を特定する。

各 TPS の組織、細胞内局在性の解析

で確認された C10/C15TPS 遺伝子のプロモーター領域を蛍光タンパク質遺伝子と融合してゼニゴケに導入し、実顕微鏡、共焦点顕微鏡観察により各 C10/C15TPS の組織、細胞特異的発現様式を明らかにする。

ゼニゴケ C10/C15TPS が化学防衛に必須であることの実証

で特定されたゼニゴケ C10/C15TPS についてゲノム編集、あるいは RNA 干渉技術でその発現を抑制し C10/C15 生成能欠損ゼニゴケを得る。得られた破壊株について、研究協力者の上船と連携して植食性節足動物の行動観察を実施し C10/C15 化合物の防衛能を評価する。

4. 研究成果

ゼニゴケ TPS 様遺伝子の機能解析

研究開始時にゼニゴケには6つのTPS様遺伝子が見いだされていたが、共同研究者河内らによって解析が進められたゼニゴケゲノムを再解析し、30個以上のTPS様遺伝子を同定した。ゼニゴケゲノム情報はCell誌に公表されたVer. 2から現在Ver. 3へアップデートが進んでおり、最新のゲノム情報を河内らより供与してもらい、TPS様遺伝子のマイニングを更に進めた。その結果、ゼニゴケゲノム中のTPS様遺伝子は植物型のジテルペン合成酵素と細菌型のTPS (MTPSL)、それに菌類型のFTPSの3種に分類できることが明らかとなった。本研究開始直後にテネシー大学Feng Chengらの研究グループによってゼニゴケTPSの概要が報告され³⁾、その中でFTPSがセスキテルペン合成を担っている可能性が示唆された。そこで、本研究では菌類型TPSに集中して解析することとした。最新のゲノム情報 (Ver. 3) で詳細に検索すると菌類型TPSには11種類のTPS遺伝子が存在し、それらは全てDNAレベルで95%程度の相同性を示した。そのうち8つの遺伝子は第6染色体の40 Mb程度の範囲に集中して存在し、FTPS3~6はお互いに隣接していることが明らかとなった(図4)。こうしたことからゼニゴケでFTPS遺伝子は比較的近い過去に重複を繰り返したようで、陸域生態系への適応にFTPS遺伝子の重複が寄与したと考えられた。

3) Kumar et al., (2016)

Plant Cell, 28,

2632-2650.

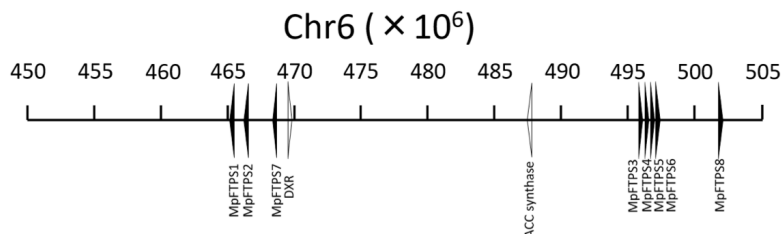


図4 ゼニゴケ第6染色体上のTPSホットスポット

油細胞転写物解析

本目的のために1細胞トランスクリプトーム解析に挑戦した。まず1細胞メタボローム解析で成功した、油体細胞内容物をキャピラリーで吸い出す実験系を用い、RNA-Seq解析を進めたが、この実験系ではどうしても油体細胞以外の細胞の内容物が混入し、特異的な1細胞トランスクリプトーム解析には不向きであることが明らかとなった。そこで、葉状体を高張液(0.7M マンニトール)に曝して原形質分離を引き起こさせた後、カミソリ刃で葉状体を切り刻むことで油体細胞プロトプラストを単離した。この細胞を数個集め、奈良先端科学技術大学院大学の久保准教授の協力のもと、RNA-Seqを進め、油体細胞特異的発現遺伝子としてF-Box Leucine Rich Protein遺伝子などを同定した(表1)。現在、1細胞トランスクリプトーム解析の再現性を確認するとともに、得られた遺伝子の機能解明に向けて、油体細胞特異的発現の再確認、ゲノム編集による各遺伝子ノックアウト体の作出を進めている。

表1 油体細胞特異的遺伝子候補

遺伝子番号 (ver. 2)	推定機能
Mapoly0010s0090	F-BOX/LEUCINE RICH REPEAT PROTEIN
Mapoly0146s0020	(UnKnown)
Mapoly0012s0134	PAP_fibrillin
Mapoly0009s0214	Protein of unknown function (DUF751)
Mapoly0039s0107	E-Associated membrane protein
Mapoly0008s0024	NADH-ubiquinone oxidoreductase complex I
Mapoly0036s0093	(UnKnown)
Mapoly0010s0161	(UnKnown)

油細胞形成不全変異体のスクリーニング

ゼニゴケ標準株Tak1由来胞子に化学変異剤処理し、致死率数十パーセントでアルビノ変異体出現率が1割程度の化学変異導入系を確立できた。スクリーニングは、切片観察による油体細胞数計測、GC-MS分析によるセスキテルペン定量により進めた。これまでに数千系統をスクリーニングし、油体細胞の見られない変異体#22の単離に成功した(図5)。#22についてはセスキテルペン量も極端に低く、油体形成不全株と考えられる。#22については残念ながら通常の赤色光照射で配偶体を形成しないので、配偶体形成条件の探索を進めている。また、HPLCを用いてマルカンチン組成解析をアッセイ系とするスクリーニングも同時に進行し、これまでにマルカンチン生成不全株2種を得た。これらはルヌラリン酸までは形成されているようで、ピベンジルの縮合反応の不全と考えられ、原因遺伝子の特定を進めている。

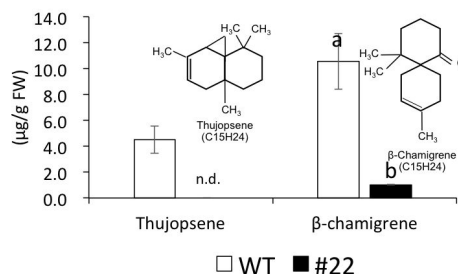
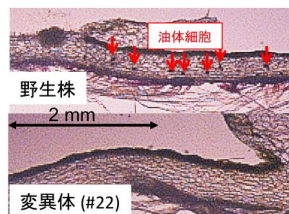


図5 油体細胞形成不全変異体#22

各 TPS の組織、細胞内局在性の解析

上記の結果から油体細胞でのセスキテルペン集積に寄与する遺伝子としてFTPS1をそれ以外の遺伝子としてMTPSL5を選び、それぞれのプロモーター配列を蛍光タンパク質TdTomato (NLS)と融合し、形質転換ゼニゴケを作成した。パーミキュライトでの油体形成条件で栽培した葉状体の切片を蛍光顕微鏡で観察した結果、FTPS1はほとんどの油体細胞で検出された一方、MTPSL5は油体細胞では発現が観察されず、腹鱗片の特定の細胞での発現が認められた。こうした解析結果からFTPS1は油体細胞特異的に発現することが確認でき、油体へのセスキテルペン集積に寄与していることが示唆された。

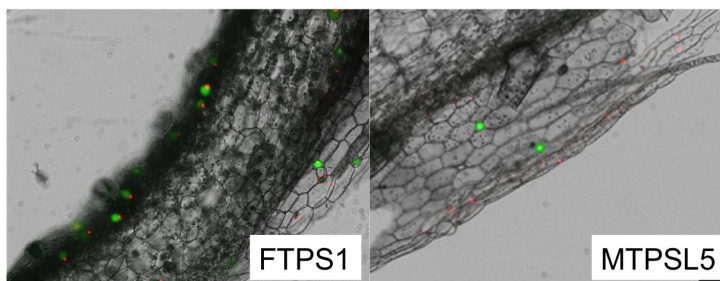


図6 TdTomato (NLS)を用いたFTPS1とMTPSL5プロモーター活性の細胞特異性確認

今後

現在FTPS1のRNAiによるノックダウンを進めており、その解析を進めることでFTPS1が油体でのセスキテルペン集積に寄与していることを確認する。1細胞トランスクリプトーム解析については上記で得た組換え体を用いてTdTomato由来蛍光を指標にした、より確実な油体細胞回収技術の確立を進めており、本研究で得られた予備的知見の再現性を確認して行く。また、油体細胞形成不全体についてもその原因遺伝子特定のためMutMap解析を進める。本研究で得た知見を活用し、特定の防衛物質形成能を失ったゼニゴケを用意し、ハダニなどの植食者に対する抵抗性を評価することでゼニゴケの化学防衛戦略の全容を明らかにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

- Tanaka, T., Ikeda, A., Shiojiri, K., Ozawa, R., Shiki, K., Nagai-Kunihiro, N., Fujita, K., Sugimoto, K., Yamato, K.T., Dohra, H., Ohnishi, T., Koeduka, T., Matsui, K. Identification of a hexenal reductase that changes composition of green leaf volatiles from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* (2018) **178**, 552-564. (査読有)
- Matsui, K., Takemoto, H., Koeduka, T., Ohnishi, T. 1-Octen-3-ol is formed from its glycoside during processing of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] seeds. *J. Agric. Food Chem.* (2018) **66**, 7409-7416. (査読有)
- Mochizuki, S., Matsui, K. (2018) Green leaf volatile-burst in *Arabidopsis* is governed by galactolipid oxygenation by a lipoxygenase that is under control of calcium ion. *Biochem Biophys Res Commn* (2018) 505: 939-944. (査読有)
- Tawfik MM, Yamato KT, Kohchi T, Koeduka T., Matsui K. *n*-Hexanal and (*Z*)-3-hexenal are generated from arachidonic acid and linolenic acid by a lipoxygenase in *Marchantia polymorpha* L. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **81**, 1148-1155 (2017). (査読有)
- Tanaka, M., Esaki, T., Kenmoku, H., Koeduka, T., Kiyoyama, Y., Masujima, T., Asakawa, Y., Matsui, K. (2016) Direct evidence of specific localization of sesquiterpenes and marchantin A in oil body cells of *Marchantia polymorpha* L. *Phytochemistry*, **130**, 77-84. (査読有)

〔学会発表〕(計4件)

滝澤遼典、畑田珠希、森脇佑太、肥塚崇男、松井健二、ゼニゴケ油体特異的テルペン集積機構、日本農芸化学会中四国支部第54回講演会、2019年6月1日、岡山理科大学(岡山市)

松井健二、植物生態系を紡ぐ香り化合物の代謝を利用した相互作用、理研シンポジウム「第19回分析・解析技術と化学の最先端」、2018年12月18日、理化学研究所鈴木梅太郎祈念ホール(和光市)

松井健二、香り化合物を介した植物-植物、植物-昆虫相互作用、第8回バイオシグナル研究会、植物が操るバイオシグナル～組織・器官・個体間の情報伝達～、2018年12月11日、神戸大学瀧川記念学術交流会館

Abe, S., Yamashita, Y., Hatada, M., Koeduka, T., Matsui, K. Growth condition of *Marchantia polymorpha* affects number of oil body cells and amounts of secondary metabolites. The 65th NIBB Conference, Renaissance of *Marchantia polymorpha*. Okazaki Conference Center, Okazaki (2018).

〔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：
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

<http://web.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~matsui/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：河内 孝之
ローマ字氏名：Kohchi, Takayuki
所属研究機関名：京都大学
部局名：生命科学研究科
職名：教授
研究者番号(8桁)：40202056

研究分担者氏名：肥塚 崇男
ローマ字氏名：Koeduka, Takao
所属研究機関名：山口大学
部局名：創成科学研究科
職名：助教
研究者番号(8桁)：30565106

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：嶋村 正樹
ローマ字氏名：Simamura, Masaki

研究協力者氏名：上船 雅義
ローマ字氏名：Uefune, Masayoshi

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。