

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 8 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03811

研究課題名(和文)モミラクトン生産植物の生合成遺伝子クラスター制御機構とその進化に関する研究

研究課題名(英文) Regulation mechanisms of the momilactone gene cluster and its evolution in momilactone producing plants

研究代表者

岡田 憲典 (Okada, Kazunori)

東京大学・生物生産工学研究センター・准教授

研究者番号：20312241

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)：本研究ではまず栽培イネのジテルペン型ファイトアレキシン生合成経路を安定同位体ラベル基質の投与により追究し、その生合成経路を構成するP450酸化酵素の植物体内での機能同定を行った。次に、この生合成遺伝子群の制御に関わる主要因子の解析を進め、OsTAGP1が根でのアレロパシー活性に重要であること、また、DPFが野生イネでも保存されていることを示した。さらに、下等植物では初となる、蘚類ハイゴケにおけるモミラクトン生合成遺伝子クラスターを機能的に証明し、イネ、イヌビエ、ハイゴケの進化的距離を保つ3つの植物が、収斂進化によりモミラクトン生合成遺伝子クラスターを獲得した可能性が高いことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物に競争力を与えるモミラクトンはこれまでイネだけが利用していると考えられてきたが、イヌビエやハイゴケなど複数の進化的に離れた植物においても、ゲノム上の遺伝子クラスターの存在と共にモミラクトン合成能を維持していることが明らかになり、陸上植物が利用可能な生理活性物質としてのポテンシャルが高いことが示された。さらに、ハイゴケのモミラクトン生合成遺伝子クラスター内の遺伝子を用い、異種植物におけるモミラクトン生産にも成功した。これらの成果を利用することで、モミラクトンを生産し病害抵抗性を付与した新たな作物の開発につながる期待が大きく、本研究成果は学術的に重要なだけでなく社会的意義を持つものである。

研究成果の概要(英文)：The cultivated rice *Oryza sativa* has shown to hold two biosynthetic gene clusters on their genome for the production of antimicrobial diterpenoid phytoalexins. In this study, we first showed in planta functions of P450 oxygenases that comprise the biosynthetic pathway of diterpenoid phytoalexins in cultivated rice by analyzing metabolic flows in the pathway using a feeding approach with stable isotopes. We also analyzed two major transcriptional factors involved in the regulation of the genes in the diterpenoid phytoalexin biosynthetic gene clusters and demonstrated that OsTAGP1 has an important role on an allelopathic activity in roots and DPF is both genetically and functionally conserved in wild-rice. Finally, we discovered a functional biosynthetic gene cluster for momilactone A in bryophyte *Calohyponum plumiforme*, and suggested a genomic evidence for convergent evolution of the momilactone biosynthetic gene cluster in rice, barnyardgrass, and the moss.

研究分野：植物代謝生化学

キーワード：二次代謝物質 生合成遺伝子クラスター 転写制御 病害抵抗性 テルペノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者が研究対象としてきたイネ *Oryza sativa* は、病虫害応答の一つとして抗菌性テルペノイド化合物であるジテルペン型ファイトアレキシンを誘導的に生産する。その主要成分の一つであるモミラクトンは、菌類に対する抗菌活性と植物に対するアレロパシー活性を合わせ持つ興味深い化学防御物質である。いもち病菌をイネ葉身に接種すると、約 72 時間後には病斑が伸展した葉身に 10 $\mu\text{g/gFW}$ 程度のモミラクトンが蓄積する (Riemann *et al.*, Plant J(2013) 74: 226-38)。また、イネの根からは常時微量のモミラクトンが水田の根圏に滲出しており、そのアレロパシー効果によって水田雑草の生育を抑える機能を果たしている (Toyomasu *et al.*, Physiol Plant(2013)150: 55-62)。このように、モミラクトンは、イネの周りに存在する微生物群や植物に対し、自らの生育を守るための防御物質として働いている。

研究代表者らは、モミラクトン生合成遺伝子群が、イネ第 4 番染色体上にクラスターを形成して存在しており、クラスター内の全ての生合成遺伝子が、イネの病害抵抗性反応時に協調的な発現誘導を示すことを報告した (Shimura *et al.*, J Biol Chem(2007)282: 34013-18)。この発見は、植物における二次代謝産物の遺伝子クラスターの存在を示す 3 例目の成果であったが、遺伝子クラスター研究をリードする重要な研究例として注目された。

このような協調的なクラスター遺伝子群の発現制御機構を理解するために制御に関わる転写因子のスクリーニングが行われ、これまでに研究代表者らによって、モミラクトン生合成遺伝子クラスターのストレス応答的な転写誘導に関わる制御因子として bZIP 型転写因子 OsTGAP1 や bHLH 型転写因子 DPF が同定された (Okada *et al.*, J Biol Chem(2009)284:26510-18; Yamamura *et al.*, Plant J(2015)84:1100-13)。OsTGAP1 過剰発現株を用いた解析から OsTGAP1 のゲノム上の結合領域が同定されると、モミラクトン生合成遺伝子クラスター領域における結合は、前駆体ピマラジエンの合成酵素遺伝子 OsKSL4 の上流に認められたがその他の遺伝子のプロモーター付近には見られず、むしろ遺伝子間領域に多く存在することが示された (Miyamoto *et al.*, PLOS ONE(2015)9:e105823)。また、DPF についてもその変異体と過剰発現体を用いた解析から、モミラクトン生合成遺伝子クラスター内の全ての遺伝子が DPF による発現制御を受けることを示した (Yamamura *et al.*, Plant J(2015)84:1100-13)。しかし、DPF によるクラスター内遺伝子の上流域への結合を介した直接的な制御については実験的証明に至っていなかった。

研究代表者らは、このような遺伝子クラスターをイネがいつどのように獲得したのかについて追究するため、野生種のイネを用いた解析を進めた。その結果、約 250 万年前に出現したと考えられる野生イネ *O. punctata* がモミラクトンの生産能と共に、生合成遺伝子クラスターを保持していることをつきとめた。さらに、それよりも前に出現したとされる *O. officinalis* や *O. brachyantha* などのモミラクトン非生産株においても、生合成遺伝子クラスターのあるゲノム領域には先祖遺伝子と思われる数個の関連遺伝子が座乗しており、あたかもクラスター構築途中の領域のように見られた (Miyamoto *et al.*, Plant J(2016)87:293-304)。興味深いことに、これらの野生イネにおいては、育種イネ *O. sativa* と同様に OsTGAP1 や DPF といったモミラクトン生産制御因子が保存されており、また、不完全なクラスター領域に座乗する数種の遺伝子は、重金属ストレス処理により、発現誘導を受けることが示唆されていた。

さらに進化を遡ると、下等植物である蘚類ハイゴケが周辺の植物の生育を抑えるためにモミラクトンを生産することが知られていたが、研究代表者らはハイゴケからモミラクトン生合成遺伝子としてピマラジエン合成酵素遺伝子 *HpDTC1* を単離し、*HpDTC1* の発現もイネの場合と同様な様々なストレス処理によって誘導を受けることを示した (Okada *et al.*, Sci.Rep(2016)6:25316)。この結果は、ハイゴケがモミラクトンを植物の生育抑制のみならず、病害菌に対する防御物質として誘導的に生産していることを意味するもので、植物の化学防御システムのプロトタイプと考えられた。一方、ハイゴケがモミラクトン生合成遺伝子クラスターを保持しているのかどうかについても、大きな疑問として残されていた。

冒頭で述べたようにイネの生産するモミラクトンはアレロパシー物質として水田雑草に対して生育抑制効果を持つ。ところが、中国浙江大学との共同研究により、水田雑草イヌビエがモミラクトン生合成遺伝子クラスターを保持していることも、証明されつつある状況であった。水田において敵対関係にあるイネとイヌビエがどちらもモミラクトン生合成遺伝子クラスターを保持しているようであったが、イヌビエにおけるモミラクトン生産のポテンシャルについては不明だった。

2. 研究の目的

本研究においては、イネのモミラクトン生合成遺伝子クラスターの同調的な転写制御メカニズムを分子レベルで理解するため、まず、未解明の生合成遺伝子に対する解析について安定同位体ラベル基質を用いた生合成経路の精査を行い、次に、OsTGAP1 と DPF を中心とした転写因子による発現制御の実体解明を、転写誘導活性の評価等により進めた。また、野生イネのモミラクトン生産あるいは非生産株についても、生合成遺伝子の機能同定と DPF オルソログの機能解析を進め、*Oryza* 属におけるモミラクトン生合成遺伝子クラスターの制御機構の進化について議論できる情報を収集した。さらに、進化的にかけ離れたイヌビエやハイゴケに関しても、生合成遺伝子群の機能証明を進め、モミラクトン生産植物における生合成遺伝子のクラスターの実体を明らかにし、モミラクトン生産植物における生合成遺伝子の制御機構の比較を試みた。このように、栽培イネ、野生イネ、ハイゴケを研究対象として生合成経路、制御機構、遺伝子クラスター構成

に着目したアプローチで研究を展開し、モミラクトン生合成遺伝子クラスターの構築と制御の進化を紐解くこと目的とした。

3. 研究の方法

(1) ¹³C ラベル化ジテルペン炭化水素の合成と植物体におけるジテルペン型ファイトアレキシンへの取り込み

ジテルペン型ファイトアレキシンの生合成経路で働く P450 酸化酵素の触媒ステップについては、既存の炭化水素であるピマラジエンやカサジエンを基質とした *in vitro* 反応で得られる水酸化された炭化水素の同定に留まっていた。ファイトアレキシンの生合成中間体を明らかにする目的で、¹³C ラベルされたピマラジエンおよびカサジエンを合成し、イネ植物体における代謝を追跡した。¹³C ラベル化基質については、¹³C メバロン酸ラク톤を基質に用いて ¹³C-GGPP までの合成に必要な酵素群 (NcMVK, NcPMVK, NcMVD, NcIPI, SaGGPS) とピマラジエンを生産の為の HpDTC1 およびカサジエン生産の為の OsCPS2, OsKSL7 を His タグ融合あるいは GST 融合型タンパク質として大腸菌を用いて発現精製し *in vitro* 合成した。得られた [U-¹³C₂₀] *ent*-cassa-12,15-diene と [U-¹³C₂₀] *syn*-pimaradiene の構造を NMR および GC-MS で確認し、植物体へのフィーディング実験に用いた。フィーディング実験には栽培イネの他、ファイトカサン生産が認められるイネ科 *Leersia perrieri* とモミラクトン生産ゴケである蘚類ハイゴケを対象として用い、LC-MSMS による分析により ¹³C ラベル化したファイトアレキシンを検出した。

(2) イネ 2 番染色体のファイトカサン生合成遺伝子クラスターに存在する P450 酸化酵素の植物体における機能の証明

これまでの研究でイネ 4 番染色体に見いだされたモミラクトン生合成遺伝子クラスターに存在する各遺伝子の機能解析は進んでいたが、2 番染色体のファイトカサン生合成遺伝子クラスター内の P450 酸化酵素については、*in vitro* でのジテルペン炭化水素に対する酸化能のみが調べられているに留まり、植物体における真の反応ステップは不明であった。そこで、ファイトカサン生合成遺伝子クラスターに存在する P450 遺伝子のうち、*CYP76M7/M8* と *CYP71Z7* について、発現抑制株を用いた解析を行った。*CYP76M7/M8* については RNAi 抑制株を作製し、*CYP71Z7* については韓国 POSTECH の T-DNA アクチベーションタグラインを用いて以下の実験に用いた。使用する発現抑制株における当該遺伝子の発現状況は RT-qPCR により調べ、特異的な抑制が確認された個体を用いて内生のファイトアレキシンと中間体の蓄積を GC-MS および LC-MSMS により分析した。また、¹³C ラベル化カサジエンを用いてフィーディング実験を行い、仮想中間体へのラベルの取り込みを追うことで、各 P450 の植物体内における機能の同定を行った。

(3) OsTGAP1 と DPF によるジテルペン型ファイトアレキシンの生産制御

イネのジテルペン型ファイトアレキシン生産制御因子としては、これまでの研究で bZIP 型転写因子の OsTGAP1 がイネ培養細胞においてモミラクトンおよびファイトカサンの生産に必要な生合成遺伝子クラスター内遺伝子の協調的発現の制御に関わることがわかっていた。また、イネ植物体におけるいもち菌感染などのストレス応答時には、bHLH 型転写因子の DPF が 2 つのクラスター内遺伝子の発現誘導に必要であることが示されていた。本研究においては、OsTGAP1 の植物体におけるファイトアレキシン生産への寄与と、DPF による生合成経路上の制御範囲を明らかにすべく、以下の実験を行った。OsTGAP1 のノックダウン変異体として、あらたに *Tos17* 挿入系統から NG3606 を選択し利用した。OsTGAP1 の過剰発現イネを作出し、変異体と合わせて発現の変動を確認した後、ファイトアレキシン蓄積、アレロパシー活性への影響を調べた。また、レポーター遺伝子アッセイにより、OsTGAP1 の転写活性化能を根のプロトプラストを用いた実験系により検討した。DPF については、まずゲノム編集により作出された DPF 欠損株を用いて RNA-seq を行い、DPF の制御下にある遺伝子をスクリーニングし、特定の遺伝子に対する制御様式を精査した。さらに、DPF については、ファイトアレキシンの集積とゲノム情報からクラスター保持の状況が把握できている数種の野生イネを対象に、オルソログ遺伝子の単離と機能解析を進め、DPF の進化的な保存の実態を探った。

(4) モミラクトン生産植物における遺伝子クラスターの存在

モミラクトン生産植物として知られるイネ以外の植物として水田雑草のイヌビエがある。イヌビエのゲノムシーケンス解析からは、イネと同様なモミラクトン生産に関わる可能性のある遺伝子クラスターの存在が明らかになった。そこでいもち菌処理されたイヌビエの葉身におけるモミラクトンの分析とクラスター内に存在する環化酵素遺伝子候補の *EckSL1* およびモミラクトン合成酵素遺伝子候補の *EclMAS* の発現解析を進めた。また、モミラクトン生産が見られる唯一の下等植物である蘚類ハイゴケからは、ピマラジエン合成酵素遺伝子の *HpDTC1* が取得されていたが、その他の生合成遺伝子の取得を目指し、ゲノムシーケンス解析を進めた。さらにゲノムアセンブルから見いだされた遺伝子クラスターについて、その領域に含まれる遺伝子の機能同定を進め、モミラクトン生合成遺伝子クラスターの証明を試みた。

4. 研究成果

(1) ¹³C ラベル化ジテルペン炭化水素の合成と植物体におけるジテルペン型ファイトアレキシン

への取り組み

*In vitro*での¹³C ジテルペン炭化水素合成によって、分子質量が20 マスユニット増加したカサジエンとピマラジエンを得ることに成功し、二次元 NMR 解析から立体構造も既知の化合物と一致することが示された。¹³C ラベルされたジテルペン炭化水素の *in vitro*での生成効率は、カサジエンが90%、ピマラジエンが66%で、どちらも1 mg 程度のラベル化合物を得た。塩化銅処理によってファイトアレキシン合成酵素の発現を活性化させた栽培イネの幼苗に対し、それの¹³C ラベル物質 15 μg を密閉した試験管内で塗布し、72 時間後にメタノール抽出し LC-MSMS 分析を行った。その結果、ピマラジエンからモミラクトン A および B への *in planta*での変換が起こることが明らかとなった。さらに、ファイトカサン C, E の生産がみられる *L. perrieri* においても、この2つのファイトアレキシンが¹³C ラベル化体として検出された。この結果から、合成遺伝子の機能が未解明の *L. perrieri* においても、栽培イネと同様なファイトカサン合成経路の存在が示された。モミラクトン生産の認められる藓類ハイゴケを用いた場合、¹³C ラベル化モミラクトンが確認された。ハイゴケではモミラクトン B がモミラクトン A よりも多く蓄積するが、¹³C ラベル化モミラクトンの蓄積もその傾向が認められた。これらの結果から、ハイゴケにおいてもピマラジエンからの数段の酸化反応によってモミラクトンを与える合成経路の存在が実証された。この結果は、¹³C ラベル化されたジテルペン炭化水素を基質として用いることで、未知の合成中間体をサーベイできる可能性を示しており、ジテルペンファイトアレキシンの合成経路解明の強力なツールとなることが期待された。なお、本結果は論文業績 Ye *et al.*, BBB (2017) として報告し、BBB 論文賞を授賞する高評価を得た。

(2)イネ2番染色体のファイトカサン合成遺伝子クラスターに存在する P450 酸化酵素の植物体における機能の証明

CYP71Z7 の T-DNA タグシステムについては #2、#5 の二システムを用いた。RT-qPCR による発現解析では、どちらの系統においても *CYP71Z7* 遺伝子への T-DNA の挿入による特異的な遺伝子発現抑制が認められた。#5 においては、クラスター内で隣に位置する *CYP71Z6* 遺伝子の発現が野生型株と比較して600倍に増加していたが、これは挿入 T-DNA によるアクチベーションが起こったためと考えられた。ファイトアレキシンの蓄積については、#2、#5 どちらの *CYP71Z7* 変異体においても、ファイトカサン A, B, D (2 位水酸化タイプ) が減少し、ファイトカサン C, E (1 位水酸化タイプ) の蓄積量増加が認められた。この結果から、*CYP71Z7* はファイトカサン骨格の 2 位水酸化を担う P450 酸化酵素であることが強く示唆された。さらに、*CYP71Z7* RNAi 株では、ファイトカサンの中間体として 1-deoxyphytocassane C と 2-deoxyphytocassane A の蓄積が認められた。*CYP76M7/M8* の RNAi 株の 3 系統 (#6, #8, #48) については、発現解析の結果 *CYP76M7* と *CYP76M8* の 2 つの遺伝子の発現が抑制されていることがわかった。これらの株におけるファイトアレキシンの蓄積は、フラボノイド型ファイトアレキシンであるサクラネチンの生産誘導に変化が認められない一方で、全てのファイトカサンとモミラクトンの蓄積量減少が見られた。この結果から、*CYP76M7/M8* のいずれか一方あるいは両方が、ファイトカサンとモミラクトン生産の両方に必要であることが示された。さらに、中間体として 3-hydroxy-*ent*-cassadiene と 3-hydroxy-*ent*-cassadien-2-one の蓄積が認められることから、*CYP76M7/M8* は、ファイトカサン骨格の 11 位の酸化を担うことが示唆された。以上の結果は、研究成果(1)で構築した¹³C ラベル化カサジエンを用いたフィーディングアッセイにおいても同様な結論を得た。このように、*CYP76M7/M8* と *CYP71Z7* の植物体内でのファイトカサン合成経路における触媒ポイントが明らかになった【図1】。これらの結果は論文業績 Ye *et al.*, BBB (2017) として報告した。

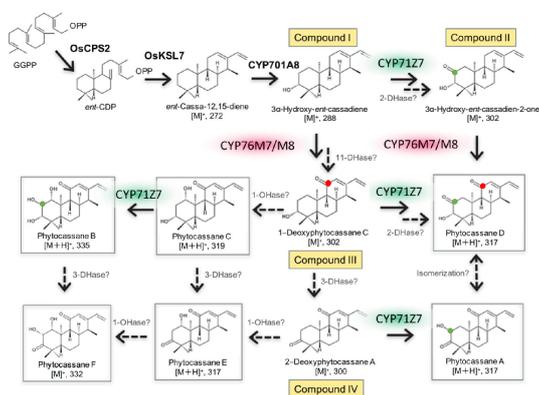


図1 ファイトカサン合成経路におけるCYP71Z7とCYP76M7/M8の触媒過程

(3)OsTGAP1 と DPF によるジテルペン型ファイトアレキシンの生産制御

OsTGAP1 について植物体の各組織を用いて発現解析を行ったところ、本転写因子が根で主に発現していることが明らかとなり、その機能についても根に着目すべきであると考えられた。根における *OsTGAP1* の発現誘導は、ファイトアレキシン誘導を引き起こすジャスモン酸処理時において、野性型株では経時的な発現増加が認められるが、*ostgap1* 変異体については認められなかった。ファイトアレキシンの生産量についても LC-MSMS を用いて定量したところ、モミラクトン、ファイトカサンのどちらについても、変異体の根における蓄積量の減少が認められた。一方で、*OsTGAP1* 過剰発現体では、ファイトアレキシン合成遺伝子のジャスモン酸誘導時の発現量が地上部と地下部の両方で増加し、ファイトアレキシン量も同様に増加していた。そこで、モミラクトン生産量の増減が見られる *OsTGAP1* 過剰発現体と変異体を用いて、水田雑草イヌビエに対するアレロパシー活性を混植実験により検討した。その結果、図2に示すように、*OsTGAP1* の発現量とイヌビエに対するアレロパシー活性には相関が見られた。この結果から、*OsTGAP1* がアレロ

パシー活性に影響を与えることが明らかとなり、その原因のひとつとして、根におけるモミラクトン生産が *OsTGAP1* により正に制御されていることが考えられた。*OsTGAP1* による転写制御については、根から調整したプロトプラストを用いたレポーター遺伝子アッセイにおいて、*OsKSL4*, *OsKSL7*, *OsDXS3* のプロモーターに対し、*OsTGAP1* が転写活性化能を発揮することが明らかとなった。これらの結果から、*OsTGAP1* は根におけるジテルペン型ファイトアレキシンの生産を、上流に位置する MEP 経路の遺伝子である *OsDXS3* と下流のジテルペン型ファイトアレキシン合成遺伝子群を協調的に誘導することで制御していることが示された。これらの結果は、論文業績 Yoshida *et al.*, *Physiol. Plantarum* (2017) として発表した。

DPF については、ゲノム編集により作出された欠損変異体を用いた RNA-seq 解析から、2 番染色体、4 番染色体のファイトアレキシン合成遺伝子クラスター以外に、ジテルペン合成のスタート物質である GGPP の合成酵素遺伝子が DPF の制御下にあることがわかった。*OsGGPS* のプロモーター解析から、DPF による転写活性化能に必要な上流領域約 100bp を絞り込むことに成功した。この結果から、DPF がジテルペン型ファイトアレキシンの生産に必要な代謝経路の内、上流 GGPP 合成から下流のファイトアレキシン合成をになうクラスター内遺伝子に至る範囲の制御に関わる転写因子であることが明らかとなった。さらに、数種の野生イネの RNA-Seq 解析からファイトアレキシンの生産と遺伝子クラスターの有無に関わらず、ストレスに応答して発現する DPF ホモログ遺伝子の存在をつきとめた。そこで、DPF の野生イネにおけるホモログ遺伝子として、*O. rufipogon*, *O. punctata*, *O. brachyantha*, *L. perrieri* の 4 種すべてから、DPF の完全長をカバーする cDNA を PCR により取得した。これらの野生イネ DPF ホモログについて、栽培イネのプロトプラストにおけるジテルペン型ファイトアレキシンの生産誘導について検討したところ、ストレス誘導がない状態でもすべての DPF ホモログに栽培イネにおけるジテルペン型ファイトアレキシンの誘導活性が認められた。これらの結果から、*Oryza* 属に広く保存された DPF の機能によって、イネの栽培化以前からファイトアレキシンの生産制御が行われてきた可能性が強く示唆された。現在、これらの結果をまとめており、今後、論文投稿を行う予定である。

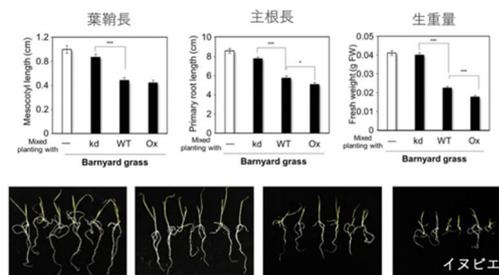


図2 *OsTGAP1* 発現量の異なるイネのイヌビエに対するアレロパシー活性の変化

(4) モミラクトン生産植物における遺伝子クラスターの存在

イネ以外のモミラクトン生産植物である藨類ハイゴケのゲノムシーケンスの結果、*HpDTC1* と *HpMAS* に隣接した 2 種の P450 で構成される遺伝子クラスターの存在が確認となった。2 つの P450 は米国テネシー大の David Nelson 教授の協力により、*CYP970A14* と *CYP964A1* と命名し、遺伝子クラスターに存在するこれらの遺伝子の機能解析を進めた。まず、2 つの機能未知 P450 酸化酵素について、酵母とベンサミアナタバコを用いた機能解析から、*CYP970A14* がピマラジエン酸合成酵素として働き、*CYP964A1* がピマラジエンの 3 位水酸化を担うことを明らかにした。さらに、これらの 2 つの P450 遺伝子を、ベンサミアナに共導入することで、モミラクトンの中間体であるピマラジエノライドの蓄積と最終産物であるモミラクトン A の異種生産に成功した。クラスター内に存在する脱水素酵素の *HpMAS* については *in vitro* のモミラクトン A 合成活性を証明すると同時に、モミラクトン合成遺伝子群と共にベンサミアナ内で発現させることで、モミラクトン A 生産の増加が確認された。これらの結果から、ハイゴケにおいてもモミラクトン A 合成遺伝子がクラスターを形成することが示された【図 3】。この証明は下等植物における二次代謝産物の合成遺伝子クラスターとして初めての発見であり、陸上植物が収斂進化によってモミラクトン合成遺伝子クラスターを獲得してきたことを示す論文業績 Mao *et al.*, *PNAS* (2020) として報告した。

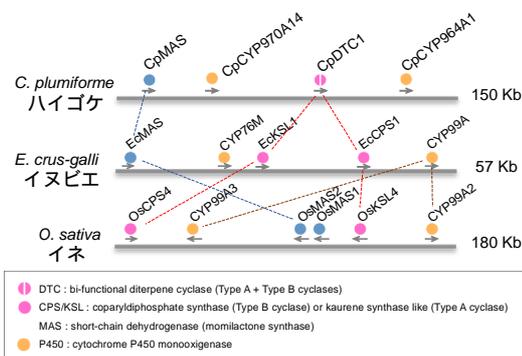


図3 モミラクトン生産植物における合成遺伝子クラスター

まとめ

本研究を通じて、イネのジテルペン型ファイトアレキシンの合成経路で働く酵素の詳細な反応触媒ステップがほぼ明らかとなり、さらに、下等植物の藨類ハイゴケの遺伝子を用いてモミラクトン A の異種植物内生産を可能にすることで、モミラクトン合成経路の再構成に初めて成功した。また、ハイゴケにおけるモミラクトン合成遺伝子クラスターの証明は、下等植物における二次代謝物質の生産を担う機能的な合成遺伝子クラスターの存在を示した初めての例となった。*OsTGAP1* と DPF の機能解析や野生イネにおける機能保存を明らかにすることで、イネにおけるジテルペン型ファイトアレキシンの制御機構の進化的な保存性を示すことができた。一方で、ハイゴケの転写制御因子の解析など、今後さらに研究が進展することで、植物種を超えたモミラクトンの生産制御機構の進化についても、明らかになっていくことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ye Zhongfeng, Nakagawa Kazuya, Natsume Masahiro, Nojiri Hideaki, Kawaide Hiroshi, Okada Kazunori	4. 巻 81
2. 論文標題 Biochemical synthesis of uniformly ¹³ C-labeled diterpene hydrocarbons and their bioconversion to diterpenoid phytoalexins in planta	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1176 ~ 1184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1080/09168451.2017.1285689	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 Ogawa Satoshi, Miyamoto Koji, Nemoto Keiichirou, Sawasaki Tatsuya, Yamane Hisakazu, Nojiri Hideaki, Okada Kazunori	4. 巻 7
2. 論文標題 OsMYC2, an essential factor for JA-inductive sakuranetin production in rice, interacts with MYC2-like proteins that enhance its transactivation ability	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 40175-40175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/srep40175	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 Ogawa Satoshi, Kawahara-Miki Ryouka, Miyamoto Koji, Yamane Hisakazu, Nojiri Hideaki, Tsujii Yoshimasa, Okada Kazunori	4. 巻 486
2. 論文標題 OsMYC2 mediates numerous defence-related transcriptional changes via jasmonic acid signalling in rice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 796 ~ 803
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.bbrc.2017.03.125	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 Guo Longbiao, Qiu Jie, Ye Chuyu, Jin Gulei, Mao Lingfeng, Miyamoto Koji, Okada Kazunori, Kim Do-Soon, Cai Daguang, Zhang Chulong, Lou Yonggen, Qian Qian, Yamaguchi Hirofumi, Yamane Hisakazu, Kong Chui-Hua, Timko Michael P., Bai Lianyang, Fan Longjiang et al.	4. 巻 8
2. 論文標題 Echinochloa crus-galli genome analysis provides insight into its adaptation and invasiveness as a weed	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1031-1031
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41467-017-01067-5	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 該当する

1. 著者名 Yoshida Yuri, Miyamoto Koji, Yamane Hisakazu, Nishizawa Yoko, Minami Eiichi, Nojiri Hideaki, Okada Kazunori	4. 巻 161
2. 論文標題 OsTGAP1 is responsible for JA-inducible diterpenoid phytoalexin biosynthesis in rice roots with biological impacts on allelopathic interaction	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Physiologia Plantarum	6. 最初と最後の頁 532 ~ 544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/ppl.12638	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 Toyomasu Tomonobu, Goda Chisato, Sakai Arisa, Miyamoto Koji, Shenton Matthew R., Tomiyama Shiho, Mitsuhashi Wataru, Yamane Hisakazu, Kurata Nori, Okada Kazunori	4. 巻 503
2. 論文標題 Characterization of diterpene synthase genes in the wild rice species <i>Oryza brachyatha</i> provides evolutionary insight into rice phytoalexin biosynthesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1221 ~ 1227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.07.028	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 Yamamoto Takahiro, Yoshida Yuri, Nakajima Kazunari, Tominaga Makiko, Gyohda Atsuko, Suzuki Hiromi, Okamoto Takashi, Nishimura Takeshi, Yokotani Naoki, Minami Eiichi, Nishizawa Yoko, Miyamoto Koji, Yamane Hisakazu, Okada Kazunori, Koshiba Tomokazu	4. 巻 2
2. 論文標題 Expression of rRSOsPR10 in rice roots is antagonistically regulated by jasmonate/ethylene and salicylic acid via the activator OsERF87 and the repressor OsWRKY76, respectively	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Direct	6. 最初と最後の頁 e00049 ~ e00049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pld3.49	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 Salvador-Guirao Raquel, Baldrich Patricia, Tomiyama Shiho, Hsing Yue-Ie, Okada Kazunori, San Segundo Blanca	4. 巻 123
2. 論文標題 OsDCL1a activation impairs phytoalexin biosynthesis and compromises disease resistance in rice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of Botany	6. 最初と最後の頁 79 ~ 93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/aob/mcy141	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 該当する

1. 著者名 Ye Zhongfeng, Yamazaki Kohei, Minoda Hiromi, Miyamoto Koji, Miyazaki Sho, Kawaide Hiroshi, Yajima Arata, Nojiri Hideaki, Yamane Hisakazu, Okada Kazunori	4. 巻 82
2. 論文標題 In planta functions of cytochrome P450 monooxygenase genes in the phytocassane biosynthetic gene cluster on rice chromosome 2	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1021 ~ 1030
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2017.1398067	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 Sanchez-Sanuy Ferran, Peris-Peris Cristina, Tomiyama Shiho, Okada Kazunori, Hsing Yue-le, San Segundo Blanca, Campo Sonia	4. 巻 19
2. 論文標題 Osa-miR7695 enhances transcriptional priming in defense responses against the rice blast fungus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Plant Biology	6. 最初と最後の頁 563-563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12870-019-2156-5	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 該当する

1. 著者名 Mao Lingfeng, Kawaide Hiroshi, Higuchi Toshiya, Chen Meihong, Miyamoto Koji, Hirata Yoshiki, Kimura Honoka, Miyazaki Sho, Teruya Miyu, Fujiwara Kaoru, Tomita Keisuke, Yamane Hisakazu, Hayashi Ken-ichiro, Nojiri Hideaki, Jia Lei, Qiu Jie, Ye Chuyu, Timko Michael P., Fan Longjiang, Okada Kazunori	4. 巻 117
2. 論文標題 Genomic evidence for convergent evolution of gene clusters for momilactone biosynthesis in land plants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 12472 ~ 12480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1914373117	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 該当する

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Yuri Yoshida, Koji Miyamoto, Hisakazu Yamane, Hideaki Nojiri, Kazunori Okada
2. 発表標題 Disrupting cis-region by CRISPR/Cas9 affects momilactones biosynthetic cluster genes regulation
3. 学会等名 ゲノム編集学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shiho Tomiyama, Ryouka Kawahara-Miki, Kaihei Koshio, Koji Miyamoto, Hisakazu Yamane, Longjiang Fan, Hideaki Nojiri, Kazunori Okada
2. 発表標題 Evolutionary insights into regulatory mechanisms of the phytoalexin biosynthetic gene cluster in rice
3. 学会等名 TERPNET2017 - The 13th International Meeting on Biosynthesis, Function and Synthetic Biology of Isoprenoids (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shiho Tomiyama, Ryouka Kawahara-Miki, Kaihei Koshio, Koji Miyamoto, Hisakazu Yamane, Hideaki Nojiri, Kazunori Okada
2. 発表標題 Conservation of inductive expression pattern of phytoalexins biosynthetic gene clusters in wild Oryza species
3. 学会等名 15th International Symposium on Rice Functional Genomics (ISRFG 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shiho Tomiyama, Ryouka Kawahara-Miki, Kaihei Koshio, Koji Miyamoto, Hisakazu Yamane, Jie Qiu, Longjiang Fan, Tomonobu Toyomasu, Nori Kurata, Hideaki Nojiri, Kazunori Okada
2. 発表標題 An evolutionary point of view of the biosynthetic gene clusters formation for phytoalexins in rice and related species.
3. 学会等名 15th International Symposium on Rice Functional Genomics (ISRFG 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 富田 啓介, 松尾 安浩, 川向 誠, 八代田 陽子, 吉田 稔, 三橋 渉, 野尻 秀昭, 岡田 憲典
2. 発表標題 植物がつくりだす化学防御物質モミラクトンの分裂酵母に対する生育抑制効果
3. 学会等名 植物化学調節学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 富田 啓介, 松尾 安浩, 川向 誠, 八代田 陽子, 吉田 稔, 三橋 渉, 野尻 秀昭, 岡田 憲典
2. 発表標題 様々な生物種の生育を抑制するジテルペノイド化合物モミラクトンの作用機序解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kazunori Okada
2. 発表標題 Evolutionary history of gene clustering for diterpenoid phytoalexins in the tribe Oryzeae
3. 学会等名 2nd China-Japan Joint Symposium on Natural Product Biosynthesis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shiho Tomiyama, Ryouka Kawahara-Miki, Koji Miyamoto, Hisakazu Yamane, Hideaki Nojiri, Kazunori Okada
2. 発表標題 Conservation of inductive expression mechanism of diterpenoid phytoalexin biosynthetic gene clusters among the tribe Oryzeae
3. 学会等名 16th International Symposium on Rice Functional Genomics (ISRFG 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡田憲典
2. 発表標題 植物種を超えて存在するモミラクトン生合成遺伝子クラスター
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会(シンポジウム) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富田 啓介、松尾 安浩、川向 誠、八代田 陽子、松本 健、吉田 稔、野尻 秀昭、岡田 憲典
2. 発表標題 イネの化学防御を担うモミラクトンBの作用機序に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富山 詩歩、川原 玲香、宮本 皓司、山根 久和、豊増 知伸、野尻 秀昭、岡田 憲典
2. 発表標題 野生イネにも保存されているファイトアレキシン生産制御因子DPFの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田 美樹、田淵 雄夢、森 昌樹、野尻 秀昭、岡田 憲典
2. 発表標題 イネのストレス誘導型プレニル2リン酸合成酵素遺伝子の発現制御機構の解明
3. 学会等名 植物化学調節学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 樋口 俊哉、照屋 美優、藤原 薫、宮本 皓司、山根 久和、林 謙一郎、川出 洋、Longjiang Fan、野尻 秀昭、岡田 憲典
2. 発表標題 ハイゴケにおけるモミラクトン生合成遺伝子クラスターの存在
3. 学会等名 植物化学調節学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 富山 詩歩, 川原 玲香, 宮本 皓司, 山根 久和, 野尻 秀昭, 岡田 憲典
2. 発表標題 イネ属に保存されている遺伝子クラスターの同調的発現制御機構
3. 学会等名 イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 樋口俊哉, 照屋美優, 藤原薫, 宮本皓司, 山根久和, 林謙一郎, 川出洋, Longjiang Fan, 野尻秀昭, 岡田憲典
2. 発表標題 蕨類ハイゴケの染色体上でクラスター化したモミラクトン生合成遺伝子群の機能解析
3. 学会等名 植物化学調節学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川一輝, 山村千紘, 和田美樹, 富山詩歩, 前田哲, 岡田憲典, 鎌倉高志, 森昌樹
2. 発表標題 イネのジテルペン系ファイトアレキシン生合成遺伝子のノックアウトイネの作出と解析
3. 学会等名 植物化学調節学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋明里, 烏邊翔, 富山詩歩, 富田啓介, 有村源一郎, 萩原寛之, 小原敏明, 岡田憲典
2. 発表標題 新規殺菌剤トルプロカルブに関する研究(第13報) -イネにおけるジテルペン型ファイトアレキシン類の蓄積-
3. 学会等名 農薬学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shiho Tomiyama, Ryouka Kawahara-Miki, Koji Miyamoto, Hisakazu Yamane, Hideaki Nojiri, Naoki Yamamoto, Kazunori Okada.
2. 発表標題 Regulatory machinery for the coordinated expression on the phytoalexin biosynthetic gene clusters conserved in wild rice genome
3. 学会等名 17th International Symposium on Rice Functional Genomics (ISRFG 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keisuke Tomita, Yasuhiro Matsuo, Makoto Kawamukai, Yoko Yashiroda, Minoru Yoshida, Hideaki Nojiri, Kazunori Okada
2. 発表標題 Chemical genomics approach to dissect the mode of action of momilactone B, a major contributor to chemical defense in rice
3. 学会等名 TERPNET 2019 - The 14th International Meeting on Biosynthesis, Function and Synthetic Biology of Isoprenoids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miki Wada, Tomonori Shinya, Ivan Galis, Rika Ozawa, Gen-ichiro Arimura, Masaki Mori, Hideaki Nojiri, Kazunori Okada
2. 発表標題 Regulators of stress-inducible prenyldiphosphate synthases that define types of terpenoids production in rice
3. 学会等名 TERPNET 2019 - The 14th International Meeting on Biosynthesis, Function and Synthetic Biology of Isoprenoids (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 水谷 正治、土反 伸和、杉山 暁史(編)、岡田憲典・高橋征司(分担執筆)	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 326
3. 書名 基礎から学ぶ植物代謝生化学	

〔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
研究協力者	樊 龍江 (Fan Longjiang)	浙江大学・Institute of Crop Sciences & Institute of Bioinformatics・教授	
連携研究者	林 謙一郎 (Hayashi Ken-ichiro) (30289136)	岡山理科大学・理学部・教授 (35302)	
連携研究者	澤崎 達也 (Sawasaki Tatsuya) (50314969)	愛媛大学・学内共同利用施設等・教授 (16301)	