

機関番号: 35302

研究種目: 基盤研究 (C)

研究期間: 2008~2010

課題番号: 20510210

研究課題名 (和文) 下等陸上植物(蘚苔類, シダ類)のジテルペン生合成経路の進化に関する研究

研究課題名 (英文) Studies for the biosynthetic pathway of diterpenes in lower land plants.

研究代表者

野崎 浩 (NOZAKI HIROSHI)

岡山理科大学・理学部・教授

研究者番号: 60159085

研究成果の概要 (和文) : 高等植物では, ジテルペノイドは植物ホルモン, 抗菌物質や摂食忌避物質など, 様々な生理活性を示す 2 次代謝物として生産される。下等な陸上植物である蘚苔類やシダ類においては, それらジテルペンの生合成経路は不明であった。そこで, 陸上植物におけるテルペノイド生合成系の進化を世界に先駆けて明らかにすることを目的として, 下等植物である蘚類と苔類からのジテルペン合成酵素のクローニングと機能解析に加えて, シダ植物イヌカタヒバからも, ジテルペン合成酵素遺伝子のクローニングと機能解析に着手した。その結果, 苔類ツツソロイゴケと蘚類ヒメツリガネゴケのカウレン合成酵素の遺伝子クローニング, 機能解析および酵素触媒機構の解析に成功した。また, イヌカタヒバからは, 4 種類のジテルペン合成酵素遺伝子をクローニングし, その酵素機能に成功した。興味深いことに, シダ類は, より下等な蘚苔類とは異なるタイプのジテルペン合成酵素遺伝子を保持しており, 被子植物のジテルペン合成へと進化する途上の酵素遺伝子群と考えられた。

研究成果の概要 (英文) : Higher land plants, angiosperm produces various bioactive diterpenoids as antibiotic, anti-feedant and plant hormones. The lower land plants, the moss, liverwort and fern produce the diterpenoids, however, the biosynthetic pathway of diterpenes have not been revealed in these lower plants. To elucidate the evolution of diterpene biosynthesis in land plants, diterpene synthetic genes in lower land plants was cloned, and the enzymatic functions were investigated. We herein demonstrate that the cloning of new diterpene cyclase genes from the fern, *Selaginella moellendorffii* and moss *Hypnum plumaeforme*. Additionally, we showed the detailed catalyzing mechanism of *ent*-kaurene synthase using the chimeric enzymes in the moss and liverwort.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

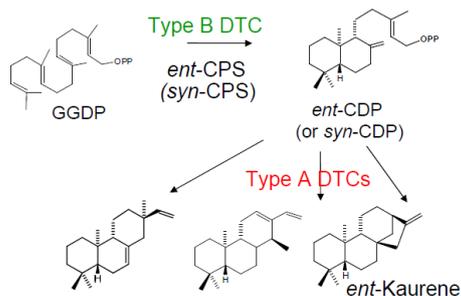
研究分野: 複合新領域

科研費の分科・細目: 生物分子科学

キーワード: 蘚苔類・シダ類・ジテルペン・生合成

1. 研究開始当初の背景

現在までに、高等植物から多くのテルペノイド合成酵素（環化酵素）遺伝子がクローニングされており、それらのアミノ酸配列の比較から、テルペノイド合成酵素の活性部位や、その触媒機構が報告されてきた。被子植物の環状ジテルペンの炭素骨格は、2段階の酵素反応で合成される。すなわち、geranyl geranyl diphosphate (GGDP) を基質として、B型のジテルペン環化酵素である copalyl diphosphate synthase (CPS) が環化を行い、copalyl diphosphate (CDP) が合成される。この CDP を基質としてさらに、A型のジテルペン環化酵素が、環化反応を触媒し、多様な骨格が構築される。これら環化酵素の活性中心と考えられるコンセンサスモチーフが報告されており、B型のジテルペン環化酵素である CPS には、DXDD モチーフが存在し、A型の環化酵素では、DXDXD モチーフが存在する。下等な植物である蘚苔類やシダ植物からは、現在までにテルペノイド合成酵素遺伝子のクローニングは、まったく報告がなかった。下等植物のテルペノイド合成酵素の研究にあたり、我々は蘚類のモデル植物としてリソースが整備されている蘚類ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) に着目し、その2次代謝成分の検索を行ったところ、2002年に、ヒメツリガネゴケが *ent*-16 α -hydroxykaurene を多量に生産することを見出した。さらに、苔類 *Jungermannia* 属が、カウラン型ジテルペンを主な2次代謝成分として生産していることに着目し、苔類ツツソロイゴケ (*Jungermannia subulata*) の培養細胞より、数種の新規なカウラン型ジテルペンを単離、構造決定した。これらの蘚苔類は、カウラン型ジテルペンを生合成していることから、カウレン合成酵素遺伝子を発現していると推定できた。そこで、ヒメツリガネゴケから、ジテルペン合成遺伝子ホモログのクローニングと機能解析を行い、ヒメツリガネゴケの *ent*-カウレン合成酵素遺伝子 (*PpCPS/KS*) を同定した。その結果、驚くべきことに、蘚類のカウレン合成酵素は、被子植物とは異なり、単一ポリペプチド中に A型と B型の両活性を有するバイファンクショナルな環化酵素 (A-B型) であり、GGDP から 1



段階で *ent*-カウレン骨格を構築した。また、最近、苔類ツツソロイゴケの培養細胞からの *ent*-カウレン合成酵素遺伝子のクローニングに成功し、その機能解析を行ったところ、苔類のカウレン合成酵素もバイファンクショナルな環化酵素であった。裸子植物では、数例のバイファンクショナルな環化酵素遺伝子が報告されているが、同一炭素骨格の生成物を与える環化酵素で酵素反応機構が異なる例は初めての例であり、陸上植物でのジテルペン合成酵素遺伝子の進化に関して示唆に富むものであった。

2. 研究の目的

(1) 下等陸上植物のカウレン合成酵素遺伝子の進化

陸上植物での環状ジテルペン生合成の進化を検討するにあたり、*ent*-カウレン合成酵素遺伝子が、目的にもっとも適すると考えた。すなわち、*ent*-カウレンは、植物ホルモンであるジベレリンの初期生合成中間体であるため、多くの被子植物からカウレン合成酵素遺伝子がクローニングされ、その遺伝子構造と触媒機能が明らかにされているためである。我々は、蘚類と苔類から、カウレン合成酵素のクローニングと機能解析に成功しており、さらに、シダ植物でのカウレン合成酵素遺伝子をクローニングし、その酵素機能を比較解析し、下等植物である苔類、蘚類、シダ植物でのジテルペン合成酵素の進化を検討した。また、蘚苔類でのカウレン合成酵素の生理的意義、すなわち、下等植物での植物ホルモン・ジベレリンの生合成経路・ホルモン作用について検討した。

(2) 下等陸上植物のファイトアレキシン合成経路

稲のファイトアレキシンとして報告されている環状ジテルペンのモミラクトンを、蘚類ハイゴケも、アレロケミカル (他感物質) として生産することを見出している。そこで、ハイゴケから、モミラクトンの生合成中間体であるピマラジエン合成酵素遺伝子のクローニングを試みた。このことによりハイゴケでのモミラクトンのアレロケミカルとしての機能を分子レベルで解析し、その生合成遺伝子の機能や転写調節機能を解析することで、植物におけるアレロケミカルによる自己防御の進化過程について、手掛かりを得ることができると考えている。

3. 研究の方法

(1) シダ類イヌカタヒバからのジテルペン合成酵素遺伝子のクローニングと機能解析

蘚類ヒメツリガネゴケと苔類ツツソロイゴケのカウレン合成酵素はともに、ジテルペン

環化酵素の共通モチーフである SXYDTWA と触媒部位である DXDD および DDXXD モチーフを保持しており、互いに高い相同性を示す。これらの配列と比較して、シダ植物イヌカタヒバのゲノム解析を行った。得られたジテルペン環化酵素遺伝子の候補を、イヌカタヒバの cDNA ライブラリーから増幅し、RACE-PCR により全長 cDNA 遺伝子を取得した。クローニングした遺伝子の機能解析に関しては、蘚苔類のカウレン合成酵素で採用した無細胞タンパク質合成系でタンパク発現を行った。また、苔類ツツソロイゴケと蘚類ヒメツリガネゴケのカウレン合成酵素遺伝子から、遺伝子組み換えにより、両者のキメラ酵素を作成し、その酵素機能の解析を行った。

(2) 蘚類ハイゴケのモミラクトン生合成遺伝子のクローニングと機能解析

蘚類ハイゴケが稲のアレロケミカル（ファイトアレキシン）として報告されているモミラクトン A と B を生産することを見出した。このことから、モミラクトンは、ハイゴケにおいても、アレロケミカルとして機能していることが示唆された。モミラクトンの生合成中間体は、ピマラジエンであると報告されており、稲では、ピマラジエン合成酵素遺伝子がクローニングされており、紫外線障害や病原菌などにより、合成酵素遺伝子の誘導が起こると報告されている。野生のハイゴケは、生育条件、採集時期が異なると、モミラクトンの合成量が顕著に異なることを確認しており、再現性よくモミラクトン生合成遺伝子の cDNA を得るためには、一定の培養条件下で生育させることができる無菌培養体から、cDNA を調製した。この cDNA ライブラリーから、Degenerate PCR により、ジテルペン合成酵素遺伝子の cDNA を得て、クローニングした生合成遺伝子については、無細胞タンパク質合成系による発現を行った。

4. 研究成果

(1) シダ類イヌカタヒバからのジテルペン合成酵素遺伝子のクローニングと機能解析

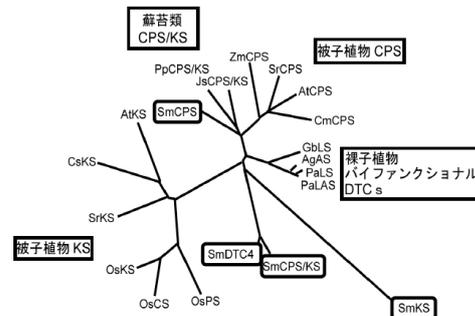
シダ類イヌカタヒバはゲノムプロジェクトが進んでおり、全ゲノムのドラフト配列情報が解析されている。そこでヒメツリガネゴケを含む既知の高等植物の各種テルペン合成酵素との相同性検索を行ったところ、8 種類のジテルペン合成酵素遺伝子の存在が示唆された。それら 8 種類の遺伝子には被子植物と同様な A 型や B 型の単機能環化酵素遺伝子に加え、被子植物には存在しないバイファンクショナルな A-B 型の環化酵素遺伝子の存在が確認された。

イヌカタヒバから調製した cDNA を用いて、発現解析を行ったところ、8 種類の内 A 型の

遺伝子が 1 種類、B 型の遺伝子が 1 種類、A-B 型の遺伝子が 2 種類、計 4 種の遺伝子が発現していることが確認できた。それら 4 種のジテルペン環化酵素遺伝子は無細胞タンパク質発現系ベクターに組み込み、組み換え酵素タンパク質の発現を行い、それらの酵素活性を測定した。機能解析の結果、SmDTC1 は CDP が反応生成物として同定されたため、SmDTC1 は copalyl diphosphate 合成酵素 (CPS) と同定した。SmDTC1 と SmDTC7 を同時に発現させた系では ent-カウレンが反応生成物として同定できたことから、SmDTC7 は、A 型の単機能な ent-カウレン合成酵素 (KS) と同定した。驚くべきことに、イヌカタヒバの A-B 型の SmDTC3 は、ent-カウレンが反応生成物として確認されたことから、SmDTC3 は A-B 型のバイファンクショナルな ent-カウレン合成酵素 (CPS/KS) と推定した。

イヌカタヒバ DTC の系統樹解析結果

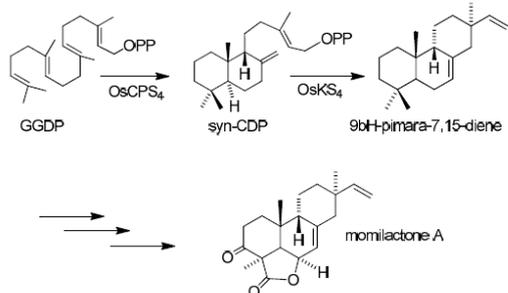
以上の結果から、蘚苔類のバイファンクショナルな A-B 型の環化酵素は、シダ類に進化する



る過程で変異により、単機能な A 型と B 型の環化酵素になったとも推測できる。また、シダ類から高等植物に進化する過程で、被子植物では、A-B 型の環化酵素が消失したとも推定できる。一方、ent-カウレンを生合成中間体とする植物ホルモンのジベレリンはシダ類以降から生合成され、ホルモンとして作用していることが報告されている。シダ類からジベレリンの生合成系が発達したとすれば、その進化の過程でシダ植物では、蘚苔類と同様なバイファンクショナルな ent-カウレン合成酵素と、被子植物に見られる単機能な ent-カウレン合成酵素の両方の遺伝子を保存してきたとも考えられる。また、苔類ツツソロイゴケと蘚類ヒメツリガネゴケのカウレン合成酵素のキメラ酵素の機能解析から、蘚類ヒメツリガネゴケの Ala710 は、ヒメツリガネゴケのカウレン合成酵素の基質ポケットに位置し、酵素触媒反応の最終段階でのカウラニルカチオンのクエンチングに関与することを明らかとすることができた。

(2) 下等陸上植物のファイトアレキシン合成経路

イネでは、モミラクトンは、GGDP から *syn*-CDP を経て、CDP 環化酵素 OsKS4 (ジテルペン環化酵素) により、9βH-pimara-7,15-diene が合成され、モミラクトンの3環性ジテルペン骨格が構築される。すなわち、モミラクトン類の炭素骨格の構築は、GGDP から CPS4 と KS4 の2つの環化酵素による2段階の反応で構築される。さらに、この炭化水



素骨格が P450 酸化酵素 CYP99A2/A3 と OsMAS により酸化されて、モミラクトン類が生合成される。ハイゴケにおいてもイネと同様に、9βH-pimara-7,15-diene から、モミラクトンが生合成されると推定し、ハイゴケのジテルペン環化酵素のクローニングを試みた。

ハイゴケではゲノム情報が利用できないことから、ヒメツリガネゴケと被子植物のジテルペン環化酵素遺伝子に共通するコンセンサス領域の縮重プライマーを用いて、ハイゴケ培養体より調製したゲノム DNA と cDNA ライブラリーを degenerate-PCR で増幅し、ヒメツリガネゴケ *ent*-カウレン合成酵素遺伝子と高い相同性を示す遺伝子断片を得た。さらに、cDNA ライブラリーに対して、RACE-PCR を行い、最終的に全長 3345 bp の全長 cDNA HpDTC1 遺伝子をクローニングした。HpDTC1 cDNA クローンは、881 アミノ酸残基の ORF をコードしており、ジテルペン環化酵素に特徴的な SAYDTAWA と活性サイトの DxDD, DDxxD モチーフを保持していた。このことから、ヒメツリガネゴケと同様な多機能性のジテルペン環化酵素であると推測された。また、既知のジテルペン環化酵素遺伝子の中で、ヒメツリガネゴケの *ent*-カウレン合成酵素と最も高い 70% の相同性を示し、次に、シダ類イヌカタヒバのジテルペン環化酵素と 50% の相同性を示した。

そこで、昆虫培養細胞に由来する無細胞タンパク質合成系で、組換え体酵素を合成して、GGDP を基質として、組換え体酵素の酵素反応を行った。反応後、GC-MS で分析した結果、 $R_t=6.0\text{min}$ (m/z 272) に、1本の生成物由来のピークが観察され、そのマススペクトルは、3環性ジテルペンに特徴的な m/z 272 $[M]^+$ と 257 のフラグメントイオンピークを示した。標品との比較から、*ent*-カウレンとは異なるジテルペンであることを確認した。現在、酵素反応生成物の同定を検討している。

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2件)

① Kawaide H, Hayashi K, Kawanabe R, Sakigi Y, Matsuo A, Natsume M, Nozaki H: Identification of the single amino acid involved in quenching the *ent*-kauranyl cation by a water molecule in *ent*-kaurene synthase of *Physcomitrella patens*. FEBS J 278:123-133 (2011) [査読有]

② Hayashi K, Horie K, Hiwatashi Y, Kawaide H, Yamaguchi S, Hanada A, Nakashima T, Nakajima M, Mander LN, Yamane H, Hasebe M, Nozaki H: Endogenous diterpenes derived from *ent*-kaurene, a common gibberellin precursor, regulate protonema differentiation of the moss *Physcomitrella patens*. Plant Physiol 153:1085-1097 (2010) [査読有]

[学会発表] (計9件)

① 安藤 朋子, 菅井 佳宣, 嶋根 真奈美, 貝沼 遼介, 林 謙一郎, 野崎 浩, 夏目 雅裕, 川出 洋: ”モミラクトンを生産する蘚類ハイゴケのジテルペン環化酵素” 日本農芸化学会大会 (2011年3月25日) 京都

② 植野 陽平, 菅井 佳宣, 林 謙一郎, 野崎 浩, 夏目 雅裕, 川出 洋: ”シダ植物のジテルペン環化酵素が作る予想外の生合成経路網” 日本農芸化学会大会 (2011年3月25日) 京都

③ 川那部 亮, 林 謙一郎, 野崎 浩, 夏目 雅裕, 川出 洋: ”蘚苔類バイファンクショナル型 *ent*-カウレン合成酵素の環化触媒反応に関与するアミノ酸の同定” 第45回植物化学調節学会大会 (2010年11月1日) 神戸

④ 林 謙一郎, 川出 洋, 宮脇 良太, 西村 直樹, 松尾昭彦, 野崎 浩: ”蘚類ハイゴケの生産するアレロケミカル・モミラクトンに関する研究” 第54回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会 (2010年10月24日) 山梨

⑤ 大上伸悟, 植野陽平, 川出 洋, 林 謙一郎, 中島 保, 松本 定, 松尾昭彦, 野崎 浩: ”シダ類イヌカタヒバ *Selaginella moellendorffii* のジテルペン合成酵素” 第53回 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会 (2009年11月7日) 奈良

⑥ 植野陽平, 大上信悟, 林謙一郎, 野崎 浩, 夏目雅裕, 川出 洋: ” シダ植物イヌカタヒバにおけるジテルペン環化酵素の機能解析” 第44回植物化学調節学会大会(2009年10月29日) 仙台

⑦ 林 謙一郎, 堀江桂介, 日渡祐二, 川出洋, 山口信次郎, 中島 保, 長谷部光泰, 野崎 浩: ” コケ植物の *ent*-カウレン由来の内因性ジテルペン型成長調節物質の生理機能” 第44回植物化学調節学会大会(2009年10月29日) 仙台

⑧ 川那部 亮, 林 謙一郎, 野崎 浩, 夏目 雅裕, 川出 洋: ” 蘚苔類バイファンクショナル型 *ent*-カウレン合成酵素の環化触媒反応に関与するアミノ酸の同定” 第43回植物化学調節学会大会(2008年10月29日) 筑波

⑨ 大上伸悟, 堀江桂介, 林謙一郎, 川出 浩, 松本定, 松尾昭彦, 野崎 浩: ” 陸上植物のジテルペン合成経路の進化に関する研究”, 第52回香料・テルペンおよび精油科学に関する討論会(2008年10月27日) 板倉

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野崎 浩 (NOZAKI HIROSHI)
岡山理科大学・理学部・教授
研究者番号: 60159085

(2) 研究分担者

川出 洋 (KAWAIDE HIROSHI)
東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・講師
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・准教授
研究者番号: 30289136