

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06777

研究課題名(和文) 食虫植物の消化酵素の起源と進化：遺伝子発現様式の変更による新規形質獲得の普遍性

研究課題名(英文) Digestive enzymes of carnivorous plants: generality for origin, evolution and gene expression

研究代表者

大山 隆 (Ohyama, Takashi)

早稲田大学・教育・総合科学学術院・教授

研究者番号：60268513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ツルギバモウセンゴケの消化液には少なくとも26種類のタンパク質が含まれていることを明らかにした。その内、S様リボヌクレアーゼ、システインプロテアーゼ、 α -1,3-グルカナーゼ、ヘベイン様タンパク質、クラスIキチナーゼ、ソーマチン様タンパク質、S1型ヌクレアーゼ2種の各々について、遺伝子発現やDNAのメチル化修飾の解析などを行った。その結果、S1型ヌクレアーゼの1種を除き全ての遺伝子が腺毛特異的に発現をしていることと、半数がメチル化を介したエピジェネティックな制御を受けていることが示唆された。また、非食虫植物の根で発現する遺伝子の異所的発現が食虫植物の消化液の起源である可能性が強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食虫植物の祖先は、長い年月をかけて「昆虫などを捕らえるための器官」と「捕らえた獲物を消化・吸収する能力」を獲得したと考えられている。最近になって一部の食虫植物のゲノム配列が解読され、食虫植物の進化・系統学的な位置やゲノムの特徴などが明らかになり始めた。しかし、捕虫器官の形成に関わる遺伝子はまだ同定されていない。一方、我々の研究により獲物の消化に関わる機能が進化的にどのように獲得されたかが明らかになり始めた。本研究により、消化液中の酵素やタンパク質の種類、機能、遺伝子発現とその制御機構などに関して多くの新知見が得られた。当該分野におけるその意義は大きく、関連分野にも大きな波及効果があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We clarified that the digestive fluid of *Drosera adelae* contains at least 26 species of proteins, including S-like ribonuclease DA-1, cysteine protease (named CYP1), α -1,3-glucanase (GLU1), class I chitinase (CHI1), hevein-like protein (HEL1), thaumatin-like protein (TLP1) and two S1 type nucleases (DAN1 and DAN2). All proteins except the DAN2 were found to be expressed only in the glandular tentacles. Furthermore, gene expressions of the da-1, Cyp1, Glu1 and Hel1 were suggested to be epigenetically regulated by promoter DNA methylation. Importantly, the current study also showed that proteins that are present in the digestive fluids of carnivorous plants are closely related with the proteins that are secreted from roots of non-carnivorous plants.

研究分野：進化生物学

キーワード：食虫植物 消化酵素 遺伝子発現 エピジェネティクス モウセンゴケ 捕虫葉

1. 研究開始当初の背景

食虫植物の祖先にあたる植物(食虫機能をもたない“一般の植物”と考えられている)は、長い年月をかけて、(i)昆虫などを捕らえるための器官(捕虫葉または捕虫器官とよばれる)と(ii)捕らえた獲物を消化して吸収する能力、の2つを獲得したと考えられている(文献1)。最近になって、一部の食虫植物のゲノム配列が解読され、食虫植物の進化・系統学的な位置やゲノムの特徴などが明らかになり始めた(文献2-4)。しかし、捕虫器官の形成に関わる遺伝子はまだ同定されていない。一方、獲物の消化に関わる機能が進化的にどのように獲得されたかが、明らかになり始めた(文献5-9)。これは我々の研究の成果であり、以下にその概要を述べる。

我々は、*Drosera adelae* (和名：ツルギバモウセンゴケ) (図1) を主に用いて、消化酵素の遺伝子について研究を行ってきた(文献5-7)。ツルギバモウセンゴケは大型のモウセンゴケで、他のモウセンゴケと同様に“粘着式”とよばれる捕虫様式をもち、腺毛と呼ばれる組織の先端部にある腺細胞群(図1)から消化酵素を含む粘液(消化液)を分泌して昆虫を捕らえ、消化・吸収する。我々は、この植物の消化液中に、S様遺伝子産物様(以下“S様”と略記)リボヌクレアーゼが大量に含まれていることを見出し報告した(文献5)。この酵素をDA-I、その遺伝子を *da-I* とそれぞれ命名し、*da-I* の発現制御機構について解析した結果、この遺伝子が、腺毛特異的に発現していることと、その発現にはエピジェネティックな制御が関与しているらしいことを見出した(文献7)。

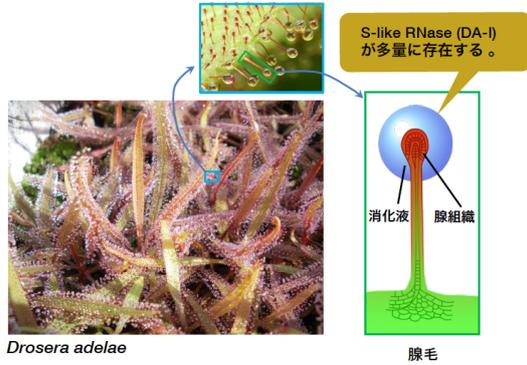


図1. ツルギバモウセンゴケとその腺毛

S様リボヌクレアーゼ遺伝子は、植物がリン酸飢餓に陥った場合や障害を受けた時にはじめて発現が誘導される自己防御遺伝子である。我々は文献5のなかで、食虫植物は、基本的に自己防御遺伝子の機能を転用して獲物の消化に利用しているのではないかという仮説を立てた。そして、この仮説を検証するために、消化液に含まれるタンパク質をLC-MS/MS(液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析装置)で解析し、約40種類のタンパク質を同定した。そして、数種類の機能未知のタンパク質を除けば、すべてが自己防御遺伝子の産物であることと、DA-Iを含む6種のタンパク質が多量に含まれていることを明らかにした。さ

らに、これらのなかでS様リボヌクレアーゼとシステインプロテアーゼだけが栄養分の獲得に寄与できる酵素であることも明らかにした(表1)。一方、遺伝子の構造と発現を解析した結果からは、6遺伝子全てが腺毛特異的に発現していることと、S様リボヌクレアーゼ遺伝子 *da-I* とシステインプロテアーゼ遺伝子 *Cysp1* を含む4種の遺伝子は、腺毛以外の器官ではプロモ

表1. ツルギバモウセンゴケの消化液中の主要タンパク質と遺伝子発現

主要タンパク質 (遺伝子名)	通常植物での 発現誘導因子	遺伝子発現および発現制御機構		
		遺伝子発現	プロモーター のメチル化	エピジェネテ ィック制御
・S様リボヌクレアーゼ (<i>da-I</i>) ¹	リン酸飢餓	腺毛特異的	腺毛以外の全器官	可能性大
・システインプロテアーゼ (<i>Cysp1</i>) ²	病原菌感染	腺毛特異的	腺毛以外の全器官	可能性大
・β-1,3グルコナーゼ (<i>Glu1</i>) ²	病原菌感染	腺毛特異的	腺毛以外の全器官	可能性大
・ヘベイン様タンパク質 (<i>He11</i>) ²	傷害	腺毛特異的	腺毛以外の全器官	可能性大
・クラス I キチナーゼ (<i>Chi1</i>) ²	病原菌感染	腺毛特異的	全器官で無	無
・ソーマチン様タンパク質 (<i>Tlp1</i>) ²	病原菌感染	腺毛特異的	全器官で無	無

¹文献7 ²データベース登録済み

ーターが高度にメチル化されているが、腺毛では全くメチル化されていないことが明らかになった(表1)。つまり、これら4遺伝子の発現制御には、エピジェネティックな制御が関与していることが強く示唆された(*da-I*については文献7で発表済み)。さらに興味深いことに、腺細胞内だけで脱メチル化酵素DMEが高発現していることも明らかになった。

上記の他にタンパク質レベルの研究としてこれまでに2つの研究を実施した。(1)食虫植物のS様リボヌクレアーゼの酵素学的な特徴を明らかにするために、上記のDA-Iの他に、“落とし穴式”の捕虫様式をもつクロユキノシタ、アミメヘイシソウおよびウツボカズラ・ピカルカラータ、並びに“ワナ式”の捕虫様式をもつハエトリソウとムジナモを用いて、それぞれのS様リボヌクレアーゼの遺伝子を同定・クローン化し、大腸菌内で発現させて精製し、酵素の反応速度の解析をした(表2)。その結果、共生微生物が多いほどこの酵素の活性は低く、少ない場合に

は活性が高いという合理的な相関があることが明らかになった (文献 8)。(2) 食虫植物には保存されていて、非食虫植物には保存されていないアミノ酸残基を同定し、ツルギバモウセンゴケの S 様リボヌクレアーゼ DA-I を用いて、各種の変異タンパク質を作製し、保存残基の生物学的意義を追究した。その結果、各残基は、活性部位の高次構造を最適化し、酵素活性を最大化する機能をもっていることが解明された (文献 9)。

表2. S様リボヌクレアーゼの活性^{1, 2}

酵素名 (由来植物名)	K_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$)
• DM-I (ハエトリソウ)	271.2
• DA-I (ツルギバモウセンゴケ)	188.4
• NB-I (ウツボカズラ・ピカルカラータ)	64.1
• AV-I (ムジナモ)	29.6
• CF-I (フクロユキノシタ)	16.6
• SL-I (アミメヘシソウ)	9.3

¹文献8 ²文献9

2. 研究の目的

(1): 研究開始当初の背景に記した、消化液に含まれるタンパク質の LC-MS/MS (液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置) を用いた解析結果を精査するとともに補足解析を行う。また、遺伝子発現とその制御機構の解析に関しても、統計的に見て疑問の余地のないレベルまで解析を行い、論文として発表する。(2): ツルギバモウセンゴケに含まれる S 様リボヌクレアーゼ以外の核酸分解酵素の遺伝子構造解析、プロモーターを含む遺伝子領域における DNA メチル化解析、遺伝子発現解析、ならびに酵素の性状解析を行う。その他、我々の解析によりその存在が明らかになっているシステムプロテアーゼについても酵素機能の解析を進める。

3. 研究の方法

試料中のタンパク質の種類と多寡に関する解析: これまでと同様に LC-MS/MS を用いて解析を行った。

遺伝子発現とその制御機構の解析: LC-MS/MS により得られた構造情報をもとに 2 種の核酸分解酵素の遺伝子構造を決定し、一方で器官別のトランスクリプトーム解析 (RNA seq による) を行い、腺毛、葉の本体、根、花茎における各遺伝子の発現の態様を解明した。

プロモーターおよび遺伝子のメチル化状態の解析: バイサルファイト法を用いて解析した。

タンパク質の合成と性状解析: 大腸菌または細胞外タンパク質合成システムを用いて、対象酵素を大量に合成して、各種条件下で酵素活性の解析を行った。

4. 研究成果

研究目的(1)に関しては、すべての目的を達成した。消化液には少なくとも 26 種類のタンパク質が含まれていることが明らかになり、その他については、すでに解明していたことが統計的に見ても間違いないことが確認された。そしてそれらを纏めて、論文として *Journal of Experimental Botany* 誌に発表することができた (文献 10: 72 巻 5 号の表紙を飾った)。そのほかこの研究を通して、食虫植物の消化酵素の起源に関わるとされる重要な発見をした。具体的には、消化液に含まれるタンパク質と通常の植物において根から分泌されるタンパク質が非常に似ていることが明らかになった (図 2)。つ



図 2. 食虫植物の捕虫・食虫器官と非食虫植物の根における分泌タンパク質の共通性 一般の植物が根の機能のために用いている遺伝子と同一機能をもった遺伝子を、食虫植物は捕虫葉で発現させている。

まり、一般の植物が根の機能のために用いている遺伝子（有機物分解や生体防御に関わる酵素やタンパク質が作られる）と同じ機能をもった遺伝子を、食虫植物は捕虫葉で発現させていることが確認された。長い進化の過程で、食虫植物は遺伝子発現機構の変更というあまりコストのかからない方法で新規機能を葉に賦与することに成功したものと考えられる。

研究目的(2)に関しては、2種のS1型ヌクレアーゼを消化液中に見出し、タンパク質構造の決定、プロモーターおよび遺伝子構造の決定、同領域の器官別メチル化状態の解析、遺伝子発現の器官特異性、および酵素としての性状の解析を行った。なお、これらの酵素をDAN1とDAN2、遺伝子を*Dan1*、*Dan2*とそれぞれ命名した。さらに消化液に比較的多量に存在するシステインプロテアーゼ(CYSP1:表1)に関しても、酵素機能を調べるためにタンパク質調製を試みた。

その結果、*Dan1*については、以下の点が明らかになった。①腺毛での発現は見られるものの、葉の本体、根、花茎では発現していない、即ち腺毛特異的な遺伝子発現をしている。②プロモーターは上記の全器官で非メチル化の状態にあり、この点がS様ヌクレアーゼ *da-I*とは異なる。③アミノ酸残基が保存されている部位が食虫植物のS1型ヌクレアーゼには7箇所、非食虫植物の同酵素には3箇所ある。なお、食虫植物のS1型ヌクレアーゼとしては、ツルギバモウセンゴケのDAN1、ハエトリソウの酵素2種、ウツボカズラ・ラフレシアーナの酵素1種の計4種を用い、非食虫植物の酵素としては、オオムギ、シロイヌナズナ、トマト、セロリを含む7種の植物に由来する12種の酵素を用いて、1次構造の比較解析を行った。④この酵素の至適pHは4.0付近で、Zn²⁺、Mn²⁺、またはCa²⁺要求性である。基質としてはDNAよりもRNAを好む。①と②の結果からは、*Dan1*の発現制御には*da-I*の発現制御で推定されるようなエピジェネティックな機構ではなく、腺毛特異的な転写因子が関与している可能性が示唆される。なお、*Chi1*や*Tlp1*(表1)の発現制御機構もこれと同様と考えられるため、少なくともツルギバモウセンゴケの消化液中の酵素の発現にはエピジェネティックな機構と腺毛特異的な転写因子が関与する機構の2つがあるのかもしれない。また、④の結果にDA-Iの存在を併せると、ツルギバモウセンゴケの消化液中に存在する核酸分解酵素はRNA分解を主に行っている可能性が浮かび上がる。以上の結果は *Annals Botany* 誌に発表した(文献11:131巻2号の表紙を飾った)。

DAN2に関しても、DAN1と同様の解析を進めた。これまでに、*Dan2*は上記の全器官で遺伝子発現しているが、腺毛での発現レベルは*Dan1*に比べてかなり低いことが明らかになった。また、*Dan2*のプロモーターは*Dan1*プロモーターと同様、解析した全器官でメチル化されていないことが明らかになった。なお、至適pHとカチオン要求性に関しては、DAN1に似ているが少し異なる点もあることが明らかになりつつある。以上から、DAN1は獲物の消化のために用意された酵素で、DAN2は、獲物の消化“にも”用いられる偏在的な酵素ではないかと推察される。システインプロテアーゼに関しては遺伝子レベルでの解析は終え、タンパク質レベルの実験に着手しているが、これまでのところ調製した標品の活性にバラツキがあるため、合成条件の検討を行っている。

参考文献

1. Ellison and Adamec eds. *Carnivorous Plants: Physiology, Ecology, and Evolution*. Oxford Univ. Press, 2018.
2. Ibarra-Laclette *et al.*, Architecture and evolution of a minute plant genome. *Nature* **498**, 94-98, 2013.
3. Fukushima *et al.*, Genome of the pitcher plant *Cephalotus* reveals genetic changes associated with carnivory. *Nat. Ecol. Evol.* **1**, e0059, 2017.
4. Ellison and Gotelli. Energetics and the evolution of carnivorous plants—Darwin’s ‘most wonderful plants in the world’. *J. Exp. Bot.* **60**, 19-42, 2009.
5. Okabe *et al.*, An S-like ribonuclease gene is used to generate a trap-leaf enzyme in the carnivorous plant *Drosera adelae*. *FEBS Lett.* **579**, 5729-5733, 2005.
6. Okabe *et al.*, Structural analysis of the gene encoding *Drosera adelae* S-like ribonuclease DA-I. *J. Adv. Sci.* **17**, 218-224, 2005.
7. Nishimura *et al.*, S-like ribonuclease gene expression in carnivorous plants. *Planta* **238**, 955-967, 2013.
8. Nishimura *et al.*, Structural and functional characteristics of S-like ribonucleases from carnivorous plants. *Planta* **240**, 147-159, 2014.
9. Arai *et al.*, Functional analyses of carnivorous plant-specific amino acid residues in S-like ribonucleases. *BBRC* **465**, 108-112, 2015.
10. Arai *et al.*, Organ-specific expression and epigenetic traits of genes encoding digestive enzymes in the lance-leaf sundew (*Drosera adelae*). *J. Exp. Bot.* **72**, 1946-1961, 2021.
11. Yu and Arai (equal contribution) *et al.*, Expression and function of an S1-type nuclease in the digestive fluid of a sundew *Drosera Adelae*. *Ann. Bot.* **131**, 335-346, 2023.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Meng Yu, Naoki Arai, Tadahiro Ochiai, Takashi Ohyama	4. 巻 131
2. 論文標題 Expression and function of an S1-type nuclease in the digestive fluid of a sundew, <i>Drosera adelae</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Botany	6. 最初と最後の頁 335 ~ 346
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/aob/mcac150	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 Arai Naoki, Ohno Yusuke, Jumyo Shinya, Hamaji Yusuke, Ohyama Takashi	4. 巻 72
2. 論文標題 Organ-specific expression and epigenetic traits of genes encoding digestive enzymes in the lance-leaf sundew (<i>Drosera adelae</i>)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 1946 ~ 1961
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jxb/eraa560	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Naoki Arai, Tadahiro Ochiai, Hirofumi Doi, Takashi Ohyama
2. 発表標題 Carnivory of the protocarnivorous plant <i>Roridula</i>
3. 学会等名 The 2022 ASCB/EMBO meeting (in Washington, DC) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒井直樹, 落合由裕, 土居寛文, 大山隆
2. 発表標題 植物の食虫性の進化
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 于萌, 荒井直樹, 落合由裕, 大山隆
2. 発表標題 食虫植物 <i>Drosera adelae</i> の消化液に存在するS1型エンドヌクレアーゼの機能
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 落合由裕, 大野友輔, 荒井直樹, 大山隆
2. 発表標題 モウセンゴケ <i>Drosera adelae</i> の消化液に存在するシステインプロテアーゼの構造と機能
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 于萌, 荒井直樹, 落合由裕, 大山隆
2. 発表標題 食虫植物 <i>Drosera adelae</i> の消化液中に存在するS1ヌクレアーゼ
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒井直樹, 大野友輔, 大山隆
2. 発表標題 ツルギバモウセンゴケの消化酵素遺伝子: 器官特異的な遺伝子発現の制御機構.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 于萌, 荒井直樹, 大山隆
2. 発表標題 食虫植物Drosera adelaeの消化液中に存在するデオキシリボヌクレアーゼ
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020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
---------	---------