

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350972

研究課題名(和文) モミラク톤を分子基点とする植物の自己防御機構の進化の解明

研究課題名(英文) Evolution of chemical defense using momilactones in land plant

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：モミラク톤は稲のジテルペン型のファイトアレキシンやアレロケミカルの一つであるが、稲とは進化分類学的にかけ離れた蘚類ハイゴケも同じモミラク톤を化学防御に利用することが近年わかってきた。本研究では、ハイゴケのモミラク톤生合成経路の初発段階を触媒するsyn-ピマラジエン合成酵素，HpDTC1のクローニング・機能解析に成功した。HpDTC1の遺伝子発現は各種生物・非生物ストレスによって強く誘導され、その転写制御に関わる信号系は、蘚類に共通する生体防御応答である可能性が示唆された。本研究の成果は、陸上植物の化学防御系の進化について新たな知見を与えると期待される。

研究成果の概要(英文)：Momilactones has been extensively investigated as important diterpenoid-type phytoalexins and allelochemicals in rice. Interestingly, the moss *Hypnum plumaeforme*, evolutionally distinct plant from rice, produce momilactones in response to stress response in chemical defense system. In this study, we identified HpDTC1 encoding pimaradiene synthase in the first committed step of momilactone biosynthesis in the moss, and demonstrate that HpDTC1 transcriptional regulation is mediated by both biotic and abiotic stresses. Further, proHpDTC1::GUS reporter analysis in transgenic moss *Physcomitrella patens* revealed the stress signaling is commonly conserved among moss plants. Our study demonstrates the molecular basis of momilactones biosynthesis in the moss leading to the ancestral chemical defense system in plant evolution.

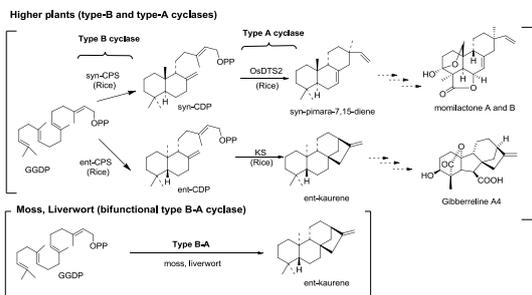
研究分野：生物有機化学

キーワード：モミラク톤 化学防御 蘚類 ジテルペン

1. 研究開始当初の背景

高等植物は病原菌の感染や生物・非生物ストレスに応答して、全身獲得抵抗性反応や過敏細胞死などにより、自己防御を行うと共に、自己防御物質として抗菌活性や細胞毒性などを示すファイトアレキシンを生産することが知られている。これまでに重要な穀物である稲の生体防御システムが最も詳細に研究されており、エリシター（病原菌）処理や紫外線などのストレス処理（細胞障害）により、ジテルペン型のファイトアレキシンの生産が誘導される。それらの中で、イネのファイトアレキシンの一つであるモミラク톤は、その生合成酵素遺伝子、発現誘導機構、生理活性などが詳細に検討されている。

近年の分子生物学的手法の進展に伴い、シロイヌナズナや稲などから、ジテルペン環化酵素遺伝子のクローニングと機能解析が報告されてきた。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、Type-B の単機能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、Type-A の環化酵素が、環化反応を触媒し、多様な骨格が構築される。ジテルペン型のファイトアレキシンにおいても、GGDP を基質として、CDP を経て、その炭素骨格が構築される。



一方、下等植物である蘚苔類(コケ類)のジテルペン骨格の構築は、ent-kaurene 合成酵素のみが報告されている。この蘚苔類の ent-kaurene 合成酵素では、被子植物とは異なり、単一のポリペプチドに、Type-B と Type-A の両活性を有する多機能型 (Type B-A)の環化酵素により、一段階の酵素反応で環状ジテルペンの炭素骨格が構築されることが報告されている。すなわち、被子植物では、この蘚苔類の多機能型 (Type B-A)から、単機能型へ機能分化していったと推定されている。

2. 研究の目的

ハイゴケ (*Hypnum plumaeforme* Wilson) は、比較的身近に見られる大型の蘚類であり、ほふく性の性質から和名で「ハイゴケ」と呼ばれる。日本では、日当たりの良い道端や岩の上、樹幹の下部などで、ごく普通に見つけることができる。我々は、2007年に、蘚類ハ

イゴケがファイトアレキシンとしてモミラク톤類を生産することを見出した。さらに、モミラク톤は蘚類ヒメツリガネゴケ・苔類ツツソロイゴケ・被子植物(タバコ・シロイヌナズナ)などの幅広い植物種に発芽阻害・生育阻害を示すが、ハイゴケ自身はモミラク톤により生育阻害を受けず、耐性を示す。ハイゴケのモミラク톤生産は、重金属や紫外線などやストレス関連ホルモン(ジャスモン酸)などに関連したストレス処理により顕著に誘導される。これらのことから、モミラク톤は、ハイゴケにおいてアレロケミカルとして機能することが示唆された。稲ではモミラク톤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、その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、ピマラジエン合成酵素遺伝子の誘導がされると報告されている。

我々は、ハイゴケでのモミラク톤生合成遺伝子を同定し、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、陸上植物におけるファイトアレキシン・アレロケミカルによる自己防御機構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。一般的にアレロケミカルやファイトアレキシンは、植物の属・種に特異的な2次代謝産物であると考えられており、異なる植物種で共通した化合物が、それら防御物質としての生理機能を示す例は殆どない。実際これまでモミラク톤がイネ以外から同定された例はなく、進化的にかけ離れた被子植物イネと蘚類ハイゴケの両植物が、モミラク톤をファイトアレキシンとして生合成することは、極めて興味深い。イネでのモミラク톤の生合成経路とその制御機構については研究が進展しており、ハイゴケでのモミラク톤の生合成遺伝子・その発現制御機構が解明できれば、共通のファイトアレキシン分子を基点として、陸上植物での自己防御機構、特に化学物質を利用した陸上植物の自己防御系、すなわち化学防御系の進化について、新たな知見が得られると期待できる。また、下等植物で明確な生理機能を示すアレロケミカルの存在はこれまでに例がないことから、本研究は、下等植物での2次代謝物の生理機能を遺伝子レベルで解明する初めての研究であり、陸上植物の自己防御機構(アレロケミカル生合成)の進化の解明という点でも、学術的価値が高いと考えられる。

3. 研究の方法

(1) *HpDTC1* のジテルペン環化酵素のクローニング

ハイゴケにおいてもモミラク톤類の生合成鍵中間体は、ピマラジエン骨格のジテルペン炭化水素と推定した。ハイゴケのピマラジエン合成酵素を同定するために、次世代シーケンサーで、塩化銅処理(障害処理)により変動する cDNA の発現解析した。解析した遺伝子断片のなかで、蘚類ヒメツリガネゴケ

のジテルペン環化酵素 PpCPS/KS に高い類似性を示し、かつ塩化銅処理で誘導される遺伝子断片の配列を得た。最終的に、TAIL-PCR によって、*HpDTC1* と命名した全長遺伝子の配列を決定した。

(2) ジテルペン環化酵素 *HpDTC1* の機能解析

HpDTC1 のアミノ酸配列の解析から、*HpDTC1* は蘚類に特徴的な多機能ジテルペン環化酵素とわかった。PCR により増幅した *HpDTC1* ORF を pCold I 発現ベクターの Kpn I と EcoRI サイトに挿入し、発現ベクターを構築した。大腸菌で発現させた *HpDTC1* は His タグ融合タンパクであり、Ni カラムで精製した。また、PCR によりジテルペン環化酵素のモチーフである DIDD および DDLFD に変異を入れた変異タンパクを発現させた。これら野生型および変異型の組み換え酵素タンパク質を用いて、酵素反応を行い、得られた酵素反応物を GC-MS で同定した。

(3) ハイゴケのストレス誘導によるモミラクトン生産と *HpDTC1* 遺伝子発現の応答
ハイゴケ茎葉体を塩化銅、ジャスモン酸、12-oxo phytodienoic acid (OPDA) およびキトサンで処理した。それらのストレスにより誘導されるモミラクトン生産量を LC-MS で、*HpDTC1* 遺伝子の発現量は Real-Time PCR で定量した。

(4) 蘚類ヒメツリガネゴケにおける *HpDTC1* 遺伝子の発現応答

ハイゴケのゲノム DNA から *HpDTC1* のプロモーター領域 3.4kbp を TAIL-PCR によりクローニングした。このプロモーター領域を pPIG1b-NGG レポータープラスミドに挿入し、*HpDTC1* の GUS レポーター遺伝子を構築して、ヒメツリガネゴケに形質転換した。この形質転換体に対して、塩化銅処理を含む各種ストレス処理や植物病原菌の感染実験を行い、*HpDTC1* プロモーターの応答性を、レポーター遺伝子である GUS 酵素活性を指標に評価した。

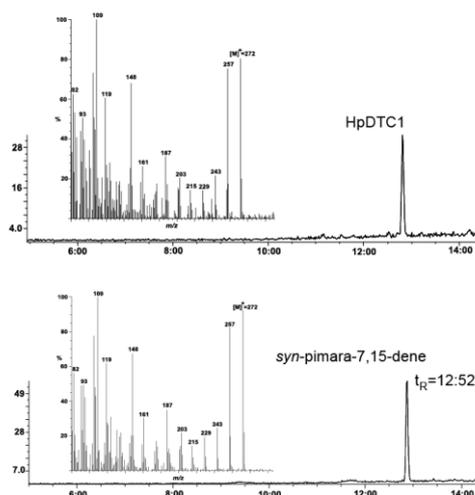
(5) ハイゴケの生産するモミラクトンの生理的役割の解析

ハイゴケ茎葉体をストレス処理してモミラクトンを蓄積させた。この茎葉体を含む培地の上で、灰色カビ病菌を接種して、ハイゴケへの感染実験を行い、ハイゴケにおけるモミラクトン類のファイトアレキシンとしての生理的意義を検証した。また、ハイゴケ抽出物を含む培地上で、蘚類ヒメツリガネゴケ、苔類ゼニゴケおよびハイゴケ茎葉体を成育させて、ハイゴケの生産するモミラクトン類のアレロケミカル活性を検討した。

4. 研究成果

蘚類ハイゴケは、進化分類学的に遠く離れた植物種であるイネと同じく、化学防御系にファイトアレキシン・アレロケミカルとしてモミラクトンを利用する。陸上植物の化学防御機構の進化過程について考察するためには、ハイゴケのモミラクトン生合成経路の遺

伝子とその転写調節機能は、非常に有用である。本研究ではハイゴケのモミラクトン生合成経路では、イネと同様にピマラジエンが鍵生合成中間体であると仮定して、ハイゴケから、その骨格構築に関わる環化酵素としてピマラジエン合成酵素遺伝子のクローニングと機能解析を実施した。ストレス処理（塩化銅）処理したハイゴケの無菌培養体の RNA-seq 解析により、ストレスにより発現誘導されるジテルペン環化酵素遺伝子 *HpDTC1* を同定し、RACE-PCR により *HpDTC1* の全長 cDNA をクローニングした。*HpDTC1* は裸子植物の多機能性ジテルペン環化酵素と高い相同性(40-43%)を示す 856 アミノ酸の ORF をコードしており、Type-B 環化酵素の活性モチーフ DIDD と Type-A 環化酵素の活性モチーフ DDLFD とジテルペン環化酵素のコンセンサスモチーフ SAYDTAWVA を保持していることから、いずれも蘚類に特徴的な多機能性ジテルペン環化酵素と推定された。この *HpDTC1* 遺伝子を pColdI ベクターにサブクローニングし、大腸菌で組換え酵素タンパクを調製し、GGDP を基質として環化酵素活性を測定したところ、*syn-pimara-7,15-diene* を反応生成物として同定した。また、変異酵素の解析から、*HpDTC1* は GGDP を基質として、*syn*-CDP を反応中間体とする多機能型環化酵素であることを証明できた。

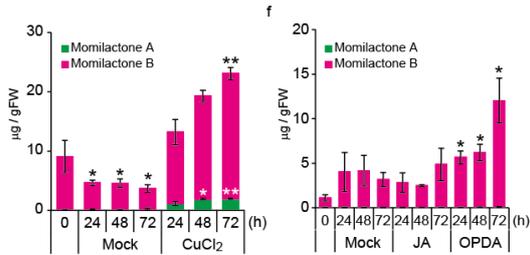
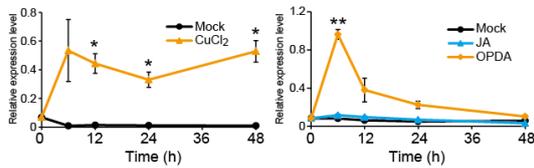


HpDTC1 の酵素反応物の GC-MS クロマトグラム

HpDTC1 は *syn-pimaradiene* 合成酵素であった。

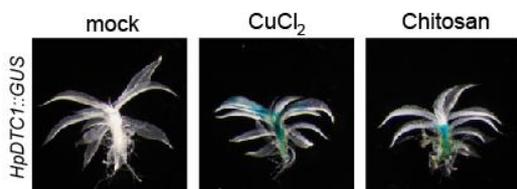
ハイゴケにおいてもモミラクトンの生合成は、イネと同様にストレスや障害応答により誘導されると考えられる。そこで、ハイゴケ茎葉体を塩化銅、ジャスモン酸、OPDA、キトサンで処理し、継続的にサンプリングして、モミラクトンの蓄積量と *HpDTC1* 遺伝子の発現量を測定した。その結果、塩化銅処理やキトサン処理によって、速やかに *HpDTC1* の遺伝子発現が誘導され、モミラクトンの蓄積が観察された。一方、被子植物において障害シグナルに関わるホルモンであるジャスモン酸は、*HpDTC1* の発現とモミラクトン生産に影響を与えなかったが、ジャスモン酸の生合成

中間体である OPDA は、*HpDTC1* 遺伝子発現を誘導し、モミラク톤を蓄積させた。また、灰色カビ病菌を感染させたところ、同様に *HpDTC1* の発現誘導とモミラク톤蓄積が観察された。



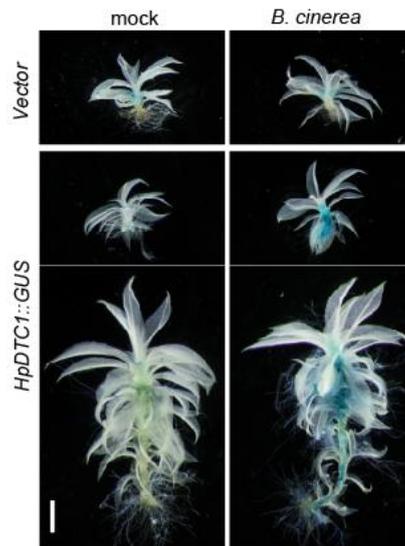
ハイゴケ茎葉体のストレス処理による *HpDTC1* 遺伝子の誘導とモミラク톤合成の経時変化

ハイゴケの *HpDTC1* 遺伝子がストレス応答性を示したことから、この *HpDTC1* の関係するストレス応答性のシグナル経路が、モミラク톤合成能をもたない他の蘚類にも存在し、蘚類に共通する生体防御応答に関わるのかどうかを検討した。*HpDTC1* 遺伝子のプロモーター領域の制御下に GUS レポーター遺伝子を発現する蘚類ヒメツリガネゴケの形質転換体を構築して発現解析を行った。その結果、塩化銅やキトサン処理によって、ヒメツリガネゴケでも *HpDTC1* プロモーターが活性化されることが明らかとなった。また、灰色カビ病菌の感染によっても *HpDTC1* プロモーター活性が上昇した。これらのことから、*HpDTC1* が関わるストレスシグナルの経路は、蘚類に共通する生体防御応答である可能性が示唆された。



各種ストレスによる *HpDTC1* プロモーター活性の誘導

モミラク톤は、その強い抗菌活性と植物成長阻害活性からファイトアレキシンとアレロケミカルとしての役割を示すことが推測されている。ハイゴケの茎葉体をストレス処理したのち、乾燥による枯死させた茎葉体を培地中に加えた後、新鮮なハイゴケの茎葉体を植えて培養した。



灰色カビ病菌感染による *HpDTC1* プロモーター活性の誘導

培養 5 日間後に灰色カビ病菌によるハイゴケ植物体の感染死を観察したところ、枯死させた植物体を含む培地では、感染死の減少、保護作用が観察された。このことから、ハイゴケで蓄積されたモミラク톤は、その植物体コロニー内で病原菌の侵入・感染を低下させる役割を担う可能性が示された。



灰色カビ病菌に対するハイゴケ茎葉体の感染死保護作用

本研究では、蘚類ハイゴケからモミラク톤生合成経路の初発酵素である syn-ピマラジエン合成酵素を同定し、その生理機能を解析することができた。また、*HpDTC1* のストレス応答性に関わるシグナル系が、蘚類に共通して存在する生体防御系に関わる可能性が示された。このように進化的にかけ離れたハイゴケとイネが、いつ、どのようにモミラク톤合成能を獲得したのか？また、その生合成遺伝子群はイネと同様にクラスターを保持しているのかどうか、植物の外敵や生存競争に利用される適応代謝産物モミラク톤などの化学防御系の進化について、ハイゴケとイネとの生合成経路・調節機構の比較することで、その陸上植物の防御機構の進化について新たな知見が得られると確信している。

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 1 件)

HpDTC1, a Stress-Inducible Bifunctional Diterpene Cyclase Involved in Momilactone

Biosynthesis, Functions in Chemical Defence in the Moss *Hypnum plumaeforme* Kazunori Okada, Hiroshi Kawaide, Koji Miyamoto, Sho Miyazaki, Ryosuke Kainuma, Honoka Kimura, Kaoru Fujiwara, Masahiro Natsume, Hideaki Nojiri, Masatoshi Nakajima, Hisakazu Yamane, Yuki Hatano, Hiroshi Nozaki, Ken-ichiro Hayashi, Scientific Reports 6, Article number: 25316 (2016) doi:10.1038/srep25316

[学会発表] (計 14 件)

①Chemical Defense System of moss *Hypnum plumaeforme* using Diterpenoid Phytoalexins Momilactones, Ken-ichiro Hayashi, Syo Miyazaki, Manami Shimane, Yuki Hatano, Ryosuke Kainuma, Kaoru Fujiwara, Kazunori Okada, Hiroshi Kawaide, Hisakazu Yamane, Hiroshi Nozaki, The Inaugural Symposium of the Phytochemical Society of Asia 2015, 平成 27 年 8 月 30 日～9 月 2 日, 徳島県・徳島市

②Functions and stress responses of the biosynthetic genes for momilactones in the moss *Hypnum plumaeforme*, Kaoru Fujiwara, Honoka Kimura, Hiroshi Kawaide, Ken-ichiro Hayashi, Hiroshi Nozaki, Koji Miyamoto, Hisakazu Yamane, Hideaki Nojiri, Kazunori Okada, TERPNET2015, 平成 27 年 6 月 1 日～6 月 5 日, カナダ・バンクーバー

③ Evolution of modular diterpenoid metabolism in non-model plant systems, Hiroshi Kawaide, TERPNET2015, 平成 27 年 6 月 1 日～6 月 5 日, カナダ・バンクーバー

④植物の適応代謝産物モミラクトンは、収斂進化により獲得されてきたのか？, 藤原薫, 宮本皓司, 山根久和, 野尻秀昭, 野崎 浩, 林謙一郎, 川出 洋, 岡田憲典, 第 25 回イソプレノイド研究会, 平成 27 年 9 月 14 日, 宮城県・仙台市

⑤蘚類ハイゴケの生産するアレロパシー物質モミラクトンの生合成遺伝子の探索, 藤原薫, 野尻秀昭, 野崎 浩, 林謙一郎, 川出 洋, 岡田憲典, 第 25 回日本蘚苔類学会, 平成 27 年 8 月 4 日～8 月 6 日, 長野県・佐久穂町

⑥蘚類ハイゴケにおけるモミラクトン生合成遺伝子のストレス応答性の解析, 藤原薫, 野尻秀昭, 野崎 浩, 林謙一郎, 川出 洋, 岡田憲典, 第 56 回植物生理学会年会, 平成 27 年 3 月 16 日, 東京都

⑦陸上植物界における ent-kaurene 合成酵素の分子進化, 嶋根真奈美, 夏目雅裕, 野崎 浩,

林謙一郎, 川出 洋, 第 49 回植物化学調節学会大会, 平成 26 年 10 月 17 日～10 月 19 日, 京都府・京都府・京都市

⑧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, 木村穂乃香, 宮崎 翔, 嶋根真奈美, 貝沼遼介, 安藤朋子, 夏目雅裕, 林謙一郎, 野崎 浩, 岡田憲典, 川出 洋, 第 49 回植物化学調節学会大会, 平成 26 年 10 月 17 日～10 月 19 日, 京都府・京都市

⑨蘚類ハイゴケにおけるモミラクトン A 生合成遺伝子の同定, 藤原薫, 宮崎 翔, 宮本皓司, 山根久和, 野尻秀昭, 野崎 浩, 林謙一郎, 川出 洋, 岡田憲典, 第 14 回東京大学生命科学シンポジウム, 平成 26 年 4 月 26 日, 東京都

⑩ The phytoalexin momilactone biosynthesis in the moss *Hypnum plumaeforme*, Honoka Kimura, Sho Miyazaki, Manami Shimane, Ryosuke Kainuma, Tomoko Ando, Masahiro Natsume, Ken-ichiro Hayashi, Hiroshi Nozaki, Kazunori Okada, Hiroshi Kawaide, 第 7 回植物化学調節学会・アメリカ植物調節学会合同大会, 平成 26 年 6 月 13 日～6 月 17 日, 米国・サンフランシスコ

⑪菌類およびコケ・シダ類における生理活性テルペノイドの生合成研究, 川出 洋, 第 49 回植物化学調節学会大会, 平成 26 年 10 月 17 日～10 月 19 日, 京都府・京都市

⑫蘚類ハイゴケにおけるモミラクトン A 生合成遺伝子の単離と機能解析, 藤原薫, 宮崎 翔, 宮本皓司, 竹村哲雄, 山根久和, 野尻秀昭, 野崎 浩, 林謙一郎, 川出 洋, 岡田憲典, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 平成 26 年 3 月 27 日～3 月 30 日, 東京都

⑬Biosynthetic pathways of momilactones, a specialized diterpene compound produced in evolutionally diverse plants moss and rice, Kaoru, Fujiwara, Sho Miyazaki, Koji Miyamoto, Hisakazu Yamane, Hideaki Nojiri, Ken-ichiro Hayashi, Hiroshi Nozaki, Kazunori Okada, 第 55 回日本植物生理学会年会, 平成 26 年 3 月 18 日～3 月 20 日, 富山県・富山市

⑭ハイゴケとイネに共通する生体防御物質 (アレロケミカル) の発見と蘚類の生体防御の進化に関する考察, 林謙一郎, 波多野友希, 貝沼遼介, 嶋根真奈美, 安藤朋子, 宮崎 翔, 西村直樹, 岡田憲典, 川出 洋, 野崎 浩, 2013 年度日本蘚苔類学会大会, 平成 25 年 8 月 5 日～8 月 7 日, 岡山県・岡山市

[その他]

プレスリリース
コケにおける化学物質を利用した防御システムを発見
ー植物のストレス応答進化の解明につながる成果ー

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・(連合) 農学研究科・准教授
研究者番号：20291916

(3) 研究分担者

林 謙一郎 (Hayashi, Kenichiro)
岡山理科大学・理学部・教授
研究者番号：30289136

(4) 連携研究者

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