

《農芸化学奨励賞》

植物のイソプレノイド生合成酵素遺伝子の機能と発現制御機構に関する研究



東京大学生物生産工学研究センター 助教 岡田 憲典

はじめに

イソプレノイドは炭素数5個のイソプレンを構成単位とする天然有機化合物の総称である。前駆物質のポリプレニル-二リン酸は、プレニルトランスフェラーゼによりイソペンテニル-二リン酸(IPP)がその異性体のジメチルアリル-二リン酸(DMAPP)に縮合することで得られ、つづく環化と種々の修飾を受けてさまざまなイソプレノイド化合物へと変換される。植物には環状イソプレノイドが多く存在し、特に炭素数20個のゲラニルゲラニル-二リン酸(GGPP)から派生する環状ジテルペンには、植物ホルモンのジベレリン、製ガン剤のタキソール、抗菌性物質のファイトアレキシンのように、有用な生理活性物質が含まれる。イソプレノイドの生産は植物体内で厳密に制御されていることから、植物がもつこの制御機構を解明することは、有用物質生産の観点からも重要である。本研究では、ジテルペン生産の鍵となるGGPP合成酵素(GGPS)を生合成経路の中心として、その上流・下流のイソプレノイド生合成関連酵素遺伝子について、それらの発現制御機構の解明に向けた先駆的な研究を進めた。以下に各研究成果の概要を記す。

1. 葉緑体内のジテルペン生産におけるイソプレノイド初期生合成経路の実態

GGPPは、ジテルペン型植物ホルモンのジベレリンやテトラテルペンのカロテノイド色素などの前駆体基質として葉緑体内で合成される。しかし、シロイヌナズナに複数存在するGGPSホモログは、葉緑体だけでなくミトコンドリアにも局在することが示唆されていた。そこでこれら遺伝子群の詳細な解析を行い、GGPS活性を保持する6個が各々葉緑体(GGPS1, GGPS3, GGPS9)、小胞体(GGPS2, GGPS4)、ミトコンドリア(GGPS6)に局在することを明らかにした。すなわち、シロイヌナズナではジテルペンなどの化合物の生合成に必要な基質GGPPを各オルガネラで個別に生産していることが考えられた(図1)。

90年代の後半に、大腸菌においてメチルエリスリトールリン酸(MEP)を介したIPP・DMAPP合成の新規経路が発見されると、植物においてもこのMEP経路の存在が示唆され始めた。筆者はシロイヌナズナのMEP経路で働くホモログ遺伝子の抑制株を作製し、これが白化するとともにジベレリンの前駆体である*ent*-kaureneの蓄積量が減少することを示すことで、本経路がシロイヌナズナ葉緑体内でのGGPP生産の上流経路であることを明らかにした。また、細胞質のメバロン酸経路ではDMAPP合成にIPP異性化酵素(IPI)が必須であるが、MEP経路末端ではIPPとDMAPPが同時に供給されるため、MEP経路でのIPIの働きは不明であった。筆者は、シロイヌナズナに2種存在するIPIがどちらも葉緑体には存在せず、IPI1は主に細胞質に、IPI2はミトコンドリアに局在することを突き止めた。さらにIPI二重変異体を作製し、この変異体ではメバロン酸からステロールへの代謝が顕著に抑制されるが、MEPの前

駆体のデオキシキシルロースからトコフェロールへの代謝はほとんど影響を受けないことを明らかにした。すなわち、シロイヌナズナではIPIがMEP経路の存在する葉緑体でほとんど必要とされないことがわかった。

2. イネの誘導的ファイトアレキシン生合成遺伝子クラスター

イネにいち菌などの病原菌が感染すると、ジテルペン型ファイトアレキシンが生産誘導されることは以前から知られていた。その生合成経路についてはGGPPからの2段階の環化反応を担う6種の環化酵素遺伝子が同定されていたが、以降の反応経路は未解明の状態だった。筆者は、いち菌感染をミミックするキチンエリクター処理後のマイクロアレイ解析の結果を足がかりとして、イネの主要なファイトアレキシンの一つであるモミラクトンの生合成経路後半を明らかにした(図2)。処理後24時間までの経時的マイクロアレイの結果、モミラクトン生合成に関わる環化酵素遺伝子(*OsCPS4*, *OsKSL4*)は処理後8時間をピークとする一過的な発現を示した。そこで、これらの遺伝子と同調的な発現を示す遺伝子を選抜した。興味深いことに、選抜された遺伝子のうちP450酸化酵素遺伝子と脱水素酵素遺伝子は、4番染色体の*OsCPS4*と*OsKSL4*の近傍に座落して遺伝子クラスターを構成していた。これがモミラクトン生産に関与する生合成遺伝子クラスターであることを証明するため、クラスター内のP450遺伝子(*CYP99A2*・*CYP99A3*)をRNAi法により抑制し、これらがモミラクトン生産に必須であることを明らかにした。さらに、生合成中間体のピマラジエン誘導体がクラスター内の脱水素酵素*OsMAS*によってモミラクトンAに変換されることも証明した。これらの結果から、イ

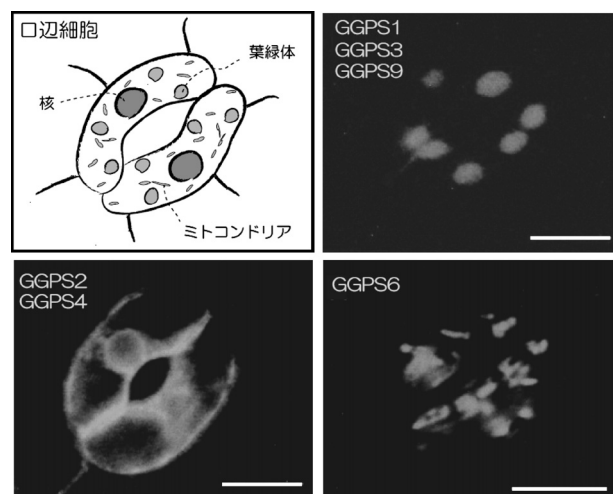


図1 シロイヌナズナの口辺細胞におけるGGPS-GFPの細胞内局在性。

ゲラニルゲラニル-二リン酸合成酵素はシロイヌナズナにおいて、葉緑体(右上)、小胞体(左下)、ミトコンドリア(右下)に局在する。

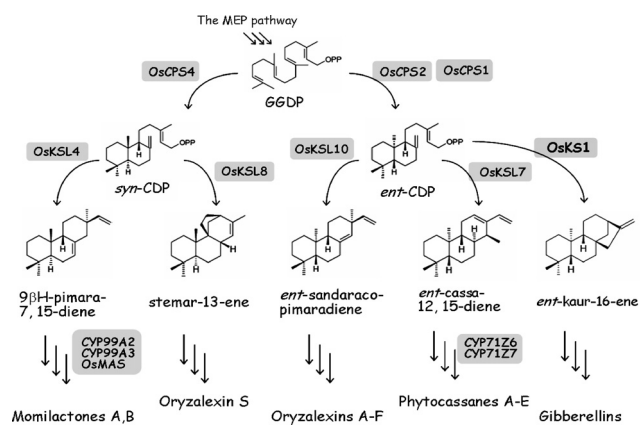


図2 イネのジテルペン型ファイトアレキシン合成経路。MEP 経路を経て合成された GGPP は環化酵素により 4 種類の骨格をもつジテルペン炭化水素に変換され、P450 酸化酵素などによる酸化を受けたのち、14 種類のファイトアレキシンが合成される。

ネ 4 番染色体上にはエリクターにより同調的に誘導を受ける、ジテルペン環化酵素・P450 酸化酵素・脱水素酵素の遺伝子群から構成される機能的なモミラクトン合成遺伝子クラスターが存在することを明らかにした。高等植物における合成遺伝子クラスターの実証は、トウモロコシのベンゾキサジノン類、カラスミギのアベナシンに次いで 3 例目であるが、誘導的に調節される合成遺伝子クラスターとしては初めての報告となった。

3. ジテルペン型ファイトアレキシン生産のマスター制御因子の発見

次にモミラクトン合成遺伝子クラスターの誘導メカニズムの解明に着手した。まず、クラスター内のジテルペン環化酵素遺伝子 *OsKSL4* のプロモーター解析から、この遺伝子のエリクター応答性シスエレメントを同定し、bZIP 型転写因子として知られる TGA ファクターが制御に関与する可能性を突き止めた。イネには 13 個の TGA ファクターが存在するが、*OsKSL4* 遺伝子の発現制御に関与する TGA ファクターは *OsKSL4* 遺伝子と同調的な発現を示すと予想し、先に行ったマイクロアレイ結果からその候補を絞り込んだ。最終的には *Tos17* 挿入変異体の解析から、*OsTGAP1* と名づけた TGA ファクターが *OsKSL4* の発現誘導に必要であり、モミラクトン生産の制御因子であることを発見した。さらに *OsTGAP1* の恒常的発現株では、定常状態でモミラクトン生産が強く誘導されることはないが、キチンエリクター処理を行うと劇的な *OsKSL4* 遺伝子の発現誘導とモミラクトンの生産誘導が引き起こされることを見いだした。すなわち、この転写因子による発現誘導には、何らかの活性化機構が存在するものと思われる。興味深いことに、この発現誘導の活性化は、モミラクトン合成遺伝子クラスター内のほかの四つの合成遺伝子にも見られ、さらにはモミラクトン以外の主要ジテルペン型ファイトアレキシンであるファイトカサンの生産とその合成酵素遺伝子の劇的な発現誘導も同時に観察された。加えて、この研究の過程で MEP 経路で働く七つの遺伝子すべてがキチンエリクターにより同調的な誘導を受け、これらの発現が *OsTGAP1* の影響を受けることも判明した。以上のことから、本研究において *OsTGAP1* がキチンエリクター誘導性のジテルペン型ファイトアレキシン生産を合成の上流から制御するマスター転写因子であることを示すこと

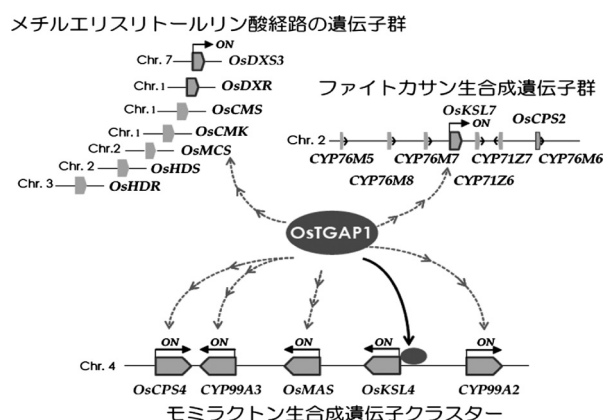


図3 *OsTGAP1* は、モミラクトン合成遺伝子クラスター内の合成遺伝子すべての発現をキチンエリクター依存的に誘導するだけでなく、上流の MEP 経路遺伝子や、もう一つのジテルペン型ファイトアレキシン・ファイトカサンの合成遺伝子の発現誘導にもかかわる。

ができた (図 3)。

おわりに

今後は、*OsTGAP1* によるジテルペン型ファイトアレキシン合成遺伝子クラスターの同調的な発現制御機構のより詳細な解析を進めるとともに、MEP 経路遺伝子群などクラスター遺伝子以外の発現に対する *OsTGAP1* の作用メカニズムも明らかにしたい。今回の発見により、*OsTGAP1* の恒常的な発現がイネの病害抵抗性においてプライミング効果を付与し、イネの耐病性に寄与する可能性を示すことができた。さらにこの病害応答が強化されたイネを利用することで、有用イソプレノイド化合物の大量生産に発展させることも期待できる。植物のもつ力を最大限に利用しつつ農芸化学の掲げる「基礎から応用までの一貫研究」を志し、これまで以上にこの分野の発展のために努力したい。

本研究は、理化学研究所国際フロンティア研究システム時代の神谷勇治先生 (現・理研 PSC) のもとで開始した後、東京大学芸大学生物学科を経て、東京大学生物生産工学研究センター環境保全工学研究室の山根久和先生のご指導のもと行われたものであり、現在も温かいご指導ご激励をいただいておりますお二人の先生には心から厚く御礼申し上げます。受賞対象となった主要な研究成果は環境保全工学研究室の研究メンバーのこれまでの努力の賜物であり、ご協力いただきました野尻秀昭先生、羽部 浩先生 (現・産総研)、および研究室員の皆様から感謝申し上げます。また、イネのファイトアレキシン生産については、共同研究を行っております山形大学の佐々武史先生、豊増知伸先生、東京農工大学の川出 洋先生、茨城大学の長谷川守文先生に深く感謝いたします。さらに理研 PSC の山口信次郎博士、笠原博幸博士、東京大学生物生産工学研究センター・葛山智久先生、東京農大・藪田五郎先生、矢島 新先生、明治大学の渋谷直人先生、明治製菓の古賀仁一郎博士、梅村賢司博士をはじめ多くの共同研究者の方々に深く感謝いたします。また、卒論生時代よりご指導を賜っております島根大学・松田英幸先生、川向 誠先生、中川 強先生、関西学院大学の田中克典先生の諸先生、先輩・後輩の方々に深く感謝いたします。最後になりましたが、本賞にご推薦いただきました日本農芸化学会関東支部長の清水 誠先生に厚く御礼申し上げます。