

植物における新たな生活環制御に関わるテルペノイドの生合成研究



東京農工大学大学院 グローバルイノベーション研究院 宮崎 翔

はじめに

テルペノイドは50,000を超える分子を擁する一大化合物群であり、植物だけでなく哺乳類、昆虫、菌類などの幅広い生物群に存在し、医薬品、香料、色素、天然ゴムなど、人類との関わりをもつ化合物が多く含まれる。テルペノイドは炭素数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り、イソプレン単位の数でヘミ (C5)、モノ (C10)、セスキ (C15)、ジ (C20)、セスタ (C25)、トリ (C30)、セスクア (C35)、テトラ (C40) テルペンに分類される。植物においてはホルモンとして生体内の生活環に必須とされる一次代謝産物としてだけでなく、外敵生物に対する忌避作用、環境変化に対する抗酸化作用を示す生存戦略上有利に働く特化代謝産物としても重要な役割を担う化合物群の一つである。著者は天然物化学的手法・遺伝子工学的的手法を駆使することで、植物の成長制御活性を有するテルペノイド化合物の生合成経路や、新たな作用機序の解明研究を展開した。以下にその概要を紹介する。

1. ジテルペノイド型植物ホルモン、ジベレリンの起源物質の解明

ジテルペノイドのジベレリン (以下、GA) は1938年に東京大学農芸化学教室の藪田貞治郎先生、住木論介先生によってイネの徒長を引き起こすイネばか苗病菌から、その原因物質として単離された。その後、植物自身も作っていることが判明した日本人が命名した植物ホルモンある。GAは草丈の伸長や、種子の発芽、開花など顕花植物の生活環において多様な作用を示し、これまでに130種を超えるGA類が報告されている。GAの生合成研究はイネやシロイヌナズナの利用で飛躍的に進み、分子レベルで詳細な研究が行われてきた。ところが、驚くべきことにコケ植物におけるモデル藨類であるヒメツリガネゴケではGA類が検出されず、ゲノム情報からも生合成経路途中の*ent*-カウレン酸 (以下、KA) 合成までの酵素遺伝子の存在を確認できるのみであった (図1)。そこで、著者らはKAまでの一部のGA生合成経路を保有している意義を解明すべく、まずKAまでの生合成経路を *in vitro* 及び *in planta* 試験によって機能同定し、ヒメツリガネゴケにおけるKAまでの部分GA生合成経路の存在を証明した^{1,2)}。生理活性を持つと想定されたKA代謝産物の構造解明に向け作出したKA合成能欠損変異体では、ヒメツリガネゴケ生活環の一部である細胞分化に異常を認め、外部投与したKAで正常に回復するのに対し、GA投与で回復しなかった²⁾。すなわち、GAと構造の異なるKA代謝物が細胞分化制御能を有することが強く示唆された。そのため著者らは生理活性KA代謝物追跡の準備を整えるべく、画像解析により細胞分化活性を数値・定量化する生物検定法の構築と、GAよりも低極性のKA代謝物を解析対象に据えられるMSを用いた高感度検出系を構築した^{3,4)}。また、植物体内にお

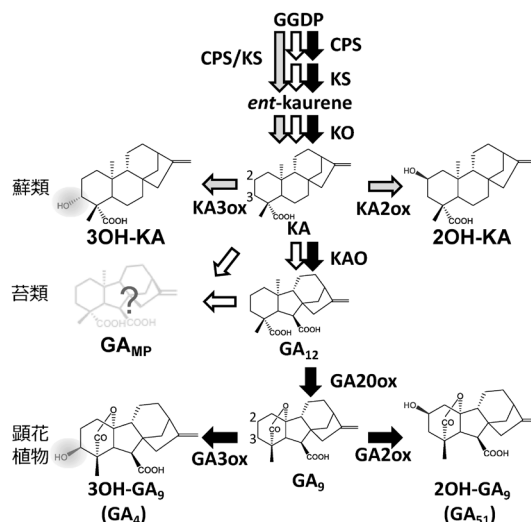


図1. 著者らが明らかにしたGA起源物質類の生合成経路
藨類ヒメツリガネゴケはKAから3位に水酸基を導入して活性型分子3OH-KAを合成し、2位に水酸基を導入して不活性化を制御する (灰色矢印)。顕花植物も水酸基を3位と2位を導入して、それぞれ活性化と不活性化を制御する (黒矢印)。藨類ゼニゴケはGA₁₂下流に活性型の生理活性物質 (GA_{MP}) を合成する (白矢印)。

けるKA代謝反応の証明に極めて効果的なツールとなる、安定同位体¹³CをKA分子内に5つ導入した¹³C₅-KAの酵素的合成を達成した。これらの準備を整えて“もの取り”に挑んだ。KA投与に伴い細胞分化異常からの回復を認めた試料から化合物群を分離・精製し、分化活性を有する画分の特定と、¹³C₅-KA代謝物のMS検出の組み合わせにより、最終的に活性型KA代謝物として3OH-KAを同定した (図1)⁵⁾。3OH-KAはKAと比べて、分化活性が大きく上昇した。

他方、RNA-seq解析から、KA分子内2位に水酸基を付与して2OH-KAを生産するKA2位水酸化酵素 (KA2ox) を特定した (図1)。2OH-KAはKAと比べて細胞分化活性が大きく低下し、KA2ox欠損変異体が細胞分化を生じやすい形質であることから、KA2oxはKA不活性化経路で機能することを証明した。

3OH-KAが最終活性産物であるか検証するため、KA合成能欠損変異体に3OH-KAを再投与して代謝物を追跡したが、新たな活性物質の存在を認めなかった。さらにKA2oxの発現はKA投与に反応しないが、3OH-KA投与で増加した結果を踏まえて、3OH-KAがGA起源物質として機能していると結論した。

興味深いことに、藨類ゼニゴケではヒメツリガネゴケで見つからなかったGA酵素遺伝子群の一部が存在して機能するため、KAからGA前駆体GA₁₂まで合成されていた。よって、ヒメツリガネゴケと同様にゼニゴケも生理活性型GAを合成しないものの、前駆体GA₁₂もしくはその代謝物までは合成し、成長制

御物質 (GA_{MP}) として使っていることが明らかとなった⁶⁾。

本成果は、「植物ホルモンは植物で普遍的に存在している」という概念から外れるコケ植物蘚類から、GAの起源物質とも換言できる活性物質3OH-KAを同定することに成功しただけでなく、生合成経路における活性制御機構はGA生合成経路でも見られる3位水酸化による活性化、2位水酸化による不活性化であり、GA生合成調節の原型とも言うべき機構であることを提唱した⁷⁾。

2. ジベレリン様活性を有するセスキテルペノイド型化合物の作用機序解明

GAが糸状菌であるイネばか苗病菌から単離されたことを起点としたGA生産生物の探索研究から、東京大学の田村三郎先生らによってGAと同様に植物を徒長させる物質としてセスキテルペノイドのヘルミントスポロール類が1963年に糸状菌から単離された(図2)。著者らはなぜGAと同様の生物活性を当該化合物類が保有するのか解明するため、入手が叶った化合物類を用いて研究を開始した。入手したヘルミントスポロール類緑体(H-acid)に関して、イネやシロイヌナズナを用いて試験したところ伸長成長・発芽の促進活性が確認できた。次に、H-acidが受容体に作用していることを検証した。すなわち、GAの受容体(GID1)と情報伝達因子(DELLA)のGA依存的な相互作用を酵母内で再現した酵母2ハイブリッド法で、H-acidによる相互作用を検証したところ、GAと同様にH-acidによってGIDとDELLAの相互作用促進活性が見られた。植物体内ではDELLAがGA依存的に分解されることでGAシグナルが伝達されるため、根でのDELLA-GFP融合タンパク質の分布を観察したところ、H-acidの投与によりGFPの分解、すなわちDELLAの分解が誘導されることを確認した。これらのことから、セスキテルペノイドのヘルミントスポロール類がGA受容体アゴニストとして機能することを証明した⁸⁾。

3. コケ植物で機能するイソプレレン合成酵素の同定

イソプレレンは、重合体のポリイソプレレンが天然ゴムの主成分として産業的に利用されているが、多くの樹木や草本科植物が生合成して気相放出する非メタン系揮発性炭化水素(Biogenic Volatile Organic Carbon)の主成分としても認知されている。イソプレレンの放出は主に放出植物の耐暑性に関わることが報告されているが、その生理機能の全貌は明らかにされていない。一方、蘚類はイソプレレン生産・放出能を持つ種属内での割合が苔類、シダ類、裸子・被子植物類に比べて多いが、生理機能や生合成は未解明であった。そこで、蘚類ハイゴケからGC-MSを用いて揮発性物質を分析したところイソプレレンが検出された。次にハイゴケのゲノム情報からイソプレレン合成酵素と類似する遺伝子を探索したが、ジテルペン合成酵素遺伝子のみが候

補として挙げられた。この中から、タンパク質の立体構造予測と基質ポケットサイズを指標とした選抜から、既知イソプレレン合成酵素の基質ポケットサイズと類似する候補酵素を1つ見出した。組換え酵素と基質を反応させて分析したところ、イソプレレンの生産が確認できた。興味深いことに被子植物イソプレレン合成酵素はモノテルペン合成酵素より派生した酵素であるのに対し、ハイゴケイソプレレン合成酵素はジテルペン合成酵素から進化的に派生した酵素と示唆された⁹⁾。

おわりに

著者らは、天然物化学、遺伝子工学、生化学の手法を駆使することで、植物の生活環に関与するテルペノイド類の構造、生理・生物活性、生合成機構の一端を明らかにすることができた。研究を進めていくにつれて、生命現象の本質は変わっていないが、これまで理解されていたことの中にも未知の現象が隠れていたり、これまでの理解では解釈できない現象も現れたり、天然物化学の奥深さを実感している。個別の生物種における生命現象を追及しながら、木を見ながらも森を見ていくマクロな視点で研究を進展させ、化学と生物を結びつける天然物化学・農芸化学的な応用研究の基盤となるユニークな研究を展開して参りたい。

(引用文献)

- 1) Miyazaki et al., *FEBS Lett.*, **585**, 1879-1883 (2011)
- 2) Miyazaki et al., *Plant Signal Behav.*, **10**, e989046-1-989046-4 (2015)
- 3) Miyazaki et al., *Methods Mol Biol.*, **1924**, 35-43 (2019)
- 4) Miyazaki et al., *Biochem Biophys Rep.*, **2**, 103-107 (2015)
- 5) Miyazaki et al., *Mol. Plant.*, **11**, 1097-1100 (2018)
- 6) Sun et al., *Plant Cell*, **35**, 4111-4132 (2023)
- 7) 宮崎翔: 化学と生物 **57**, 72-73 (2019)
- 8) Miyazaki et al., *Biosci Biotechnol Biochem.*, **81**, 2152-2159 (2017)
- 9) Kawakami et al., *FEBS Lett.*, **597**, 2133-2142 (2023)

謝辞 本研究は主に著者が東京大学大学院農学生命科学研究科と東京農工大学グローバルイノベーション研究院在籍時に行われたものです。懇切丁寧なご指導を賜りました東京大学・中嶋 正敏先生に深く感謝申し上げます。学生時代からお世話になり、研究の面白さと厳しさを教えて頂いた東京農工大学・川出 洋先生に心からお礼申し上げます。また、これまで著者がお世話になりました研究室主宰者の東京農工大学・夏目 雅裕先生、東京大学・浅見 忠男先生、慶應義塾大学・犀川 陽子先生には自由かつ活発な雰囲気の中で研究できる機会を与えて頂き厚く御礼申し上げます。大学院生時より共同研究者としてお世話になりました、岡山理科大学・林 謙一郎先生、東京大学・岡田 憲典先生に心よりお礼申し上げます。東京大学、東京農工大学、慶應義塾大学でお世話になった先生方、研究員、学生の方々にも心よりお礼申し上げます。東京農工大学グローバルイノベーション研究院では女性未来育成機構の研究支援制度により円滑に研究を進めることができました。御礼申し上げます。最後に、本奨励賞にご推薦頂きました日本農芸化学会関東支部支部長、東京大学大学院農学生命科学研究科・伏信 進矢先生に心よりお礼申し上げます。

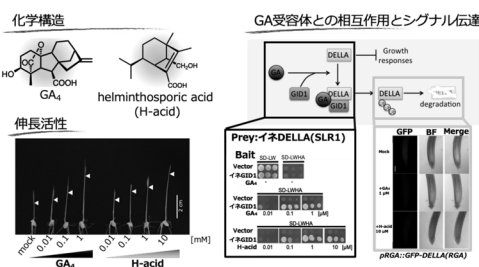


図2. 著者らが明らかにしたH-acidのGA受容体アゴニスト活性