

研究終了報告書

「収斂進化の理解に基づく植物特化代謝のデザイン」

研究期間: 2020 年 12 月～2024 年 3 月

研究者: 棟方 涼介

1. 研究のねらい

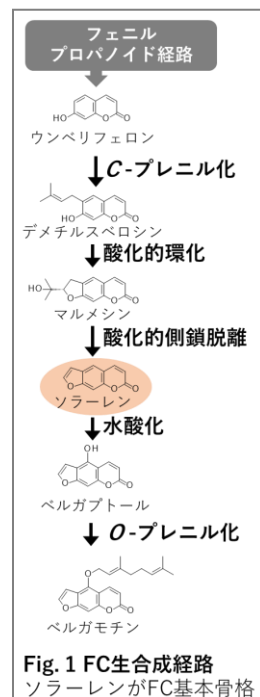
植物が生産する多様な代謝産物、特に特化代謝産物は古くから香料、染料色素、また医薬原料などとして人間の生活の質を多面的に支えてきた。近年は持続型社会の構築に向けて、植物特化代謝産物に再び注目が集まっている一方で、100 万種にも及ぶとされるこの天然資源の大部分が未利用なのが現状である(K. Saito et F. Matsuda, 2010)。植物特化代謝産物の活用拡大に向けて、本研究では収斂進化に着目した。本研究で着目する収斂進化とは、同じ特化代謝産物が、複数の植物系統において互いに独立に獲得されたという進化様式であり、この例は幅広い代謝物群で報告されてきた(R. Munakata *et al.*, 2020; E. Pichersky et E. Lewinsohn, 2011 他)。収斂進化の場合、複数の植物系統が同一最終産物の生合成経路を有していても、それを担う酵素遺伝子の配列は互いに大きく異なり、顕著な例だと全く別の酵素ファミリーに属する。これは、植物は 1 つの代謝物に対して遺伝子レベルで多様な生合成方法を獲得したことを意味する。さらに、植物は生合成後の分泌・蓄積様式についても収斂進化を遂げていることを示唆されている(S.S. Voo *et al.*, 2012; S. Reinold et K. Hahlblock, 1997)。したがって、植物界を俯瞰すると、1 つの特化代謝産物に対して、生産を担う生合成から細胞外分泌・蓄積に至るまでの一連の現象について、収斂進化に由来する遺伝的多様性を見出すことができると考えられる。さらに、この多様性を発掘し、合成生物学的な代謝工学に応用することで、植物特化代謝産物の利用可能性の飛躍的な向上に繋がると期待される。

そこで本研究では、フラノクマリン (Furanocoumarin: FC) 類に着目した。FC 類はフェノール系特化代謝産物の 1 群であり、植物においては食植昆虫や病原菌といった外敵に対する化学防御に貢献する他、人に対して毒性又は薬理活性を示す化合物も多く含む。植物界においてはミカン科、セリ科、クワ科、マメ科に主に見出される。代表者らの研究グループは、FC 生合成の初発酵素遺伝子の研究を通じて、植物界における FC 類の分布が主に収斂進化によって生じたことを提唱した(R. Munakata *et al.*, 2020)。本課題では FC 生産機構をモデルとして、植物特化代謝産物における生合成・分泌・蓄積様式の収斂進化の基礎的理解を深めること、さらにそれを基に、収斂進化の代謝工学への有用性を実証することを目的とする。

2. 研究成果

(1) 概要

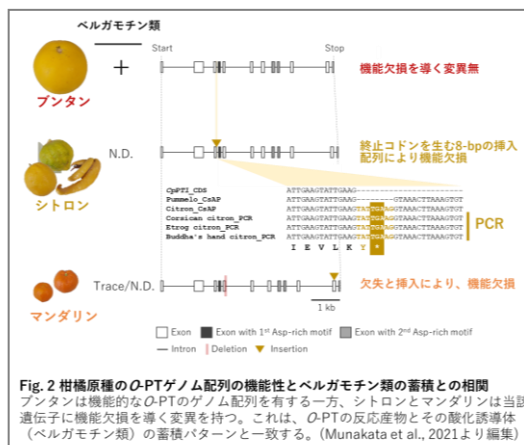
ミカン科、セリ科、クワ科を実験材料として FC 生合成 (Fig. 1) の収斂進化について解析を行った。従前、FC 生合成の収斂進化に関する知見は初発反応を担う C-プレニル化酵素 (C-PT) 遺伝子の解析例のみであった。そこで、FC 生合成の下流に位置する O-プレニル化酵素 (O-PT) に着目した。O-PT 遺伝子をセリ科及びミカン科からそれぞれ同定し、系統解析を行った結果、本酵素遺伝子はミカン科とセリ科で独立に獲得されたことが示唆された (5. 主な研究成果リスト)。なお、ミカン科柑橘類において、O-プレニル化を受けた FC 類は人に対して高い毒性を示すことが知られている。そのため O-プレニル化を触媒する酵素遺伝子の発見は柑橘育種においても重要な知見となった。さらに、クワ科を実験材料として、FC 生合成を担う酸化酵素遺伝子を同定、系統解析に供し、本酵素遺伝子がクワ科特異的に獲得されていることを示唆した (C. Villard et al., 2021; 棟方第 2 著者)。



(2) 詳細

研究テーマ A 「ミカン科の FC 生産機構の解明と分子進化解析」

従前、FC 生合成の収斂進化に関する知見は、初発反応を担う C-PT 遺伝子の解析例のみであった。そこで、FC 生合成の下流に位置する O-PT に着目した (Fig. 1, O-プレニル化反応)。O-プレニル化 FC 類を高蓄積するミカン科グレープフルーツを実験材料として、トランスクリプトーム解析や生化学的解析を行い、O-PT 遺伝子を植物で初めて同定した。さらに、本遺伝子に機能欠損型の変異がみられる柑橘種は O-プレニル化 FC 類を蓄積しないという相関も確認された (Fig. 2)。O-PT によって



生成するベルガモチンやその代謝下流産物 (ベルガモチン類) は人の薬物動態を攪乱する毒性成分として知られているため、本研究は柑橘育種においても重要な知見となった。また、O-プレニル化フェノール類は植物で約 300 種類知られている特化代謝産物であり、主に植物の外敵に対する化学防御に貢献する。O-プレニル化がフェノール類の機能性向上の鍵となるものの、その遺伝子は長年未知であり、本成果が初めての同定例となった。

続いて、セリ科からも FC 類に対する O-PT 遺伝子を同定した。ミカン科とセリ科の O-PT 遺伝子はいずれも C-PT と同じ UbiA ファミリーに属していたが、分子進化解析によって両科は互いに独立に O-PT を獲得したことを示唆し、植物代謝の収斂進化に新たな知見をもたらした。

研究テーマ B「クワ科特異的な FC 生合成酵素遺伝子の分子進化」(C. Villard et al., 2021)

FC 生合成の中で、第 2 反応段階に位置するマルメシン合成酵素については、遺伝子未知であった (Fig. 1, 酸化環化)。そこで、クワ科イチジクを実験材料として、トランスクリプトーム解析、生化学的解析、また 3D モデリング解析によって、この酵素遺伝子を発見した。さらに、本酵素は P450 ファミリーに属したことから、P450 に着目した分子系統樹解析とイチジク属のゲノム解析を行い、マルメシン合成酵素がクワ科特異的に獲得されたことを示唆した。本テーマは Alain Hehn 博士 (フランス・ロレーヌ大) の研究チームとの共同研究で、棟方は第 2 著者として遺伝子同定に貢献した。

3. 今後の展開

研究テーマ A ではミカン科を実験材料として、FC 類やその関連成分の生合成に関する知見を得た。FC 類は薬物動態攪乱や光毒性を示すことから、柑橘育種においては望ましくない成分である。本研究では FC の薬物動態かく乱作用を高める酵素遺伝子を同定し、さらに O-PT 遺伝子は生成物含量と相関する遺伝子多型が確認されている。そのため、これらの遺伝子は分子マーカーとして毒の少ない柑橘品種の育種を加速化させると期待できる。

4. 自己評価

【達成状況】

このさががけ研究を通じて、ミカン科やクワ科から FC 生合成における新規遺伝子を同定できた。特にミカン科では、まだ非公開ながら予期していなかった良い研究計画も生まれた他、各植物科について、新規の研究計画によるアプローチも含めて FC 生合成の解明に近づけたことは評価できると考える。

しかしながら、当初予定していた計画を完了するには至らなかった。特に、このさががけ研究の目的の一つとして収斂進化の遺伝的多様性を活用して、複数の植物系統の FC 生産機構を融合させた新規の物質生産系を創出することを挙げていたが、各植物科における個々の生産機構の解明の途中までしか研究が進めることができなかった。これらに関しては、自身の研究遂行能力の向上やアプローチの再考も含めて、今後の課題として取り組んでいきたい。

【研究の進め方】

現職に就くための帰国と同時にコロナ禍が始まったこともあり、はじめは自身の研究環境の整備と、並行してさががけの研究を推進した。そのため、初めは思うように進まないこともあったが、研究室メンバーやさががけ領域の方々のサポートに助けられ、また研究費の一部を技術補佐員の雇用経費に充てることができたため、計画を比較的円滑に進めることができた。また、RNA-seq 解析を予定通り行い候補遺伝子を多数得ることができた。さらに、海外渡航費にも充てて国際的な研究活動も推進できた。このように、研究実施体制や研究費執行に関しては一定の評価をしている。加えて、他のさががけ研究者との共同研究も始動することができ、このネットワークを今後も大事にして研究を発展させたいと考えている。

【波及効果】

本研究で見出された酵素遺伝子は、クマリン類に着目した低毒性・高機能性の柑橘品種の作出において分子マーカーとして役立つと期待できる。また、クワ科やセリ科など他の植物系統の研究が進むことで、柑橘と同様に育種における貢献が期待される。また、今後は生合成のみならず輸送や蓄積も含めて植物の特化代謝産物の生産機構をより統合的に捉えることで、将来的には、より多種またより多量の植物特化代謝産物を社会に届けるための基盤技術を開発したいと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 1件

1. Ryosuke Munakata, Alexandre Olry, Tomoya Takemura, Kanade Tatsumi, Takuji Ichino, Cloé Villard, Joji Kageyama, Tetsuya Kurata, Masaru Nakayasu, Florence Jacob, Takao Koeduka, Hirobumi Yamamoto, Eiko Moriyoshi, Tetsuya Matsukawa, Jérémy Grosjean, Célie Krieger, Akifumi Sugiyama, Masaharu Mizutani, Frédéric Bourgaud, Alain Hehn, Kazufumi Yazaki, “Parallel evolution of UbiA superfamily proteins into aromatic O-prenyltransferases in plants”, 2021, ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.***, 118 (17), e2022294118.

O-プレニル化フェノール類は、植物で約 300 種類知られる二次代謝産物であり、主に外敵に対する化学防御に貢献する。本論文では柑橘類を実験材料として、この代謝産物グループの生合成の鍵となる O-プレニル化酵素遺伝子を植物で初めて同定した。柑橘類において、本酵素は人に対する毒性成分の生合成も担うため、柑橘育種においても重要な知見となった。加えて、O-プレニル化酵素は植物系統毎に独立に獲得されたことを強く示唆し、植物代謝の進化に新たな知見を与えた。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

国内学会シンポジウム企画

- 1) 棟方涼介、「植物の化学防御物質フラノクマリンの生合成・蓄積の空間的局在性」、シンポジウム「植物特化代謝産物の空間的な局在性とダイナミクス」、日本農芸化学会京都大会、2022 年 3 月(京都、オンライン)、シンポジウム世話人及び口頭発表

国内学会シンポジウム招待講演

- 2) 棟方涼介、「クマリン類から見る植物代謝の進化」、シンポジウム「植物進化の戦略分子」、日本植物学会第 87 回大会、2023 年 9 月(札幌、現地)
- 3) 棟方涼介、「植物二次代謝産物の高機能化を担う UbiA プレニル化酵素 ~新規遺伝子探索から酵素・代謝工学にむけて~」、シンポジウム「タンパク質工学による創薬化学の新展開」、

日本薬学会第 142 年会、2022 年 3 月 (名古屋、オンライン)

- 4) 棟方涼介、「合成生物学を用いた植物プレニル化ポリフェノールの微生物生産」、シンポジウム「植物バイオテクノロジー × 合成生物学」、第 39 回 日本植物バイオテクノロジー学会、2022 年 9 月 (堺、ハイブリッド)

国際学会招待講演

- 5) Ryosuke MUNAKATA, “Biosynthesis of furanocoumarins causing grapefruit-drug interactions”, IRN France-Japan Frontiers in Plant Biology Symposium 2023, Kyoto (on site)
- 6) Ryosuke MUNAKATA, “Repeated evolution of furanocoumarin biosynthesis in plants”, IRN France-Japan Frontiers in Plant Biology Symposium 2021, Lyon (online).