

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07447

研究課題名(和文) 二次代謝を制御する転写因子群の機能多様性の解明

研究課題名(英文) Functional diversity of transcriptional regulators for specialized metabolism

研究代表者

庄司 翼 (Shoji, Tsubasa)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授

研究者番号：40343272

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)：タバコの根において、ニコチン経路に含まれる一連の生合成遺伝子は1対のJA応答性ERF転写因子ERF189とERF199によって協調的に転写活性化される。N. benthamianaの葉においてERF189を一過的に過剰発現することでアルカロイド合成・蓄積を誘導できた。ERF189を構成的もしくは葉特異的に過剰発現することで葉におけるアルカロイド蓄積を増大することができたが、植物の生育には悪い影響があることが分かった。一方、ゲノム編集技術によりERF189とERF199を破壊した場合、植物の生育には影響を与えることなく、顕著なアルカロイド蓄積の抑制がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、数多くの酵素反応から構成される複雑な天然物の生産性を植物体で向上させる方策として、少数の酵素反応ステップを増強することで代謝改変が試みられてきた。しかし、多くの場合1つの反応ステップが増強されてもまた別の段階が律速となり、最終代謝産物の生産性を大幅に増大することは困難であった。マスター制御遺伝子を用いて、天然物代謝系全体の活性を包括的に増大させることにより、従来の代謝工学ではなし得なかった高レベルな生産性の増強が可能になる。

研究成果の概要(英文)：The toxic alkaloid nicotine is produced in the roots of Nicotiana species and primarily accumulates in leaves as a specialized metabolite. A series of metabolic and transport genes involved in the nicotine pathway are coordinately upregulated by a pair of jasmonate-responsive AP2/ERF-family transcription factors, NtERF189 and NtERF199, in the roots of tobacco. We explore the potential of manipulating the expression of these transcriptional regulators to alter nicotine biosynthesis in tobacco. Transient overexpression of NtERF189 led to alkaloid production in the leaves of N. benthamiana and N. glauca. Constitutive and leaf-specific overexpression of NtERF189 increased the accumulation of foliar alkaloids in transgenic tobacco plants but negatively affected plant growth. By contrast, in a knockout mutant of NtERF189 and NtERF199 obtained through CRISPR/Cas9-based genome editing, alkaloid levels were drastically reduced without causing major growth defects.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：転写因子 ジャスモン酸 二次代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

植物は生理活性を有するアルカロイドやテルペノイドなどの二次代謝物を防御物質として合成・蓄積する。多くの二次代謝産物は、特定の種や属など系統特異的に見いだされる。また、病害・傷害などの生物的ストレスや塩害などの非生物的ストレスなどに応答して、二次代謝はダイナミックに制御される。

数多くの防御性二次代謝物の合成が、傷害ホルモンであるジャスモン酸(JA)により誘導されることから類推されるように、代謝物やその生合成経路や酵素の多様性とは対照的に、代謝系の制御は共通性の高い機構に依存している。研究代表者は、clade II, subgroup IXa に属する AP2/ERF ファミリー転写因子であるタバコ ERF189 とトマト JRE4 が、それぞれタバコ属のニコチンと主にナス属に蓄積するステロイドグリコアルカロイド(SGA)の生合成系を包括的に制御するマスター転写因子であることを明らかとした(Plant Cell 2010, PCP 2016)。

## 2. 研究の目的

多段階からなる複雑な二次代謝系を包括的に制御するマスター転写因子の存在が近年明らかとなってきた。特定のサブファミリーに属する転写因子群は、さまざまな植物種において、系統特異的な防御性二次代謝系を制御する。ナス科薬用植物より転写因子をクローニングし、アルカロイド生合成系を制御する転写因子を同定する。転写因子の機能強化により、植物における有用アルカロイド高生産系の確立を目指す。また、clade II, subgroup IXa に属する AP2/ERF ファミリーの機能未知因子の機能解析をシロイヌナズナとトマトを用いて分子遺伝学のおこなう。マスター転写因子を起点とした制御因子・生合成遺伝子・代謝産物の三位一体での代謝系解明は、従来の天然物化学にはないトップダウン型のアプローチを提案するものである。

## 3. 研究の方法

- (1)タバコ (*Nicotiana tabacum*)、タバコ属野生種 (*N. alata*, *N. benthamiana*, *N. glauca*)、トマト (*Solanum lycopersicum*) の植物体を材料とした。植物は温室において栽培した。
- (2) *Agrobacterium* の感染により外来遺伝子を導入することで形質転換植物や毛状根を作出した。また、*N. alata* 及び *N. benthamiana* の葉に *Agrobacterium* 菌液を浸潤させることで外来遺伝子を一過的に発現させた。
- (3) 遺伝子発現を、特異的プライマーを用いた qRT-PCR により解析した。
- (4) タバコ・アルカロイドを、GLC を用いて定量分析した。
- (5) 耐虫性アッセイは東京理科大学、トマト TILLING スクリーニングは筑波大学、SGA 測定は神戸大学、代謝プロファイリングは理化学研究所にそれぞれ協力していただいた。

## 4. 研究成果

- (1) トマト JRE3 の機能解析  
JRE4 に最も近いホモログであるトマト JRE3 をコードする遺伝子は、*JRE4* や相同な *JRE1*, *JRE2*, 及び *JRE5* とともに遺伝子クラスターを構成している(PCP 2016)。全ての *JRE* が JA によって誘導されるのに対して、*JRE3* を含む *JRE4* 以外の *JRE* は塩ストレス処理によっても顕著に誘導される(Plant J 2018)。JA 及び塩ストレス応答性転写因子 *JRE3* の制御機能について洞察を得るために、トマト毛状根においてエスタジオール処理依存的に *JRE3* を過剰発現させた時に発現誘導される遺伝子群をマイクロアレイ解析によって検索した。いずれの SGA 生合成遺伝子も検索されなかったことから、*JRE3* は SGA 生合成を制御する *JRE4* とは機能が異なることが確認された。*JRE3* によって制御される遺伝子として、マレイン酸蓄積に関わるマレイン酸合成酵素と液胞膜

局在ジカルボン酸トランスポーターをコードする遺伝子などが検索された。これら遺伝子のストレス応答性について解析を行った。本成果は Plant Biotechnol. (2019) などとして発表した。

#### (2) タバコ *QPT2* 遺伝子はトマトにおいて JRE4 によって制御される

相同な ERF 転写因子であるタバコ ERF189 とトマト JRE4 は、それぞれニコチンと SGA の生合成系を包括的に制御する。キノリン酸ホスホリボシル基転移子酵素 (QPT) は、タバコゲノムにおいてタンデムに並ぶ 2 つの遺伝子 *QPT1* と *QPT2* にコードされている。ERF189 によって制御される *QPT2* はニコチン生合成の出現に伴い、遺伝子重複によって新たに獲得されたと考えられている。ニコチン生合成に寄与するタバコ *QPT2* は、ニコチン生合成しないトマトにおいても発現するのかを検討した。*QPT2* プロモーターレポーター遺伝子を導入したトマト毛状根を作出し、トマトにおいてレポーターは、タバコへ導入した場合と同様の細胞特異性やホルモン応答性を示すことが分かった。さらに、一過的発現系や JRE4 機能欠損変異体を用いた解析などによって、トマトにおいて *QPT2* プロモーターは JRE4 転写因子によって活性化されていることを明らかにした。一方、タバコ *QPT1* に相当するトマト *QPT* は、JRE4 によって制御されないことが分かった。機能的に保存されたトランス因子の存在により、異種植物であるトマトにおいてもニコチン生合成遺伝子は発現し得ることを示した。本成果は J. Plant Res. (2019) などとして発表した。

#### (3) トマト JRE4 は SGA 生合成の主要な転写制御因子である

トマトにおいて一連の SGA 生合成遺伝子は JRE4 を含む JRE 転写因子によって制御されることが明らかとされたが (PCP 2016)、植物体内において各々の JRE が実際にどれだけ機能的に重要なのかは未解明であった。EMS 処理を施した変異集団において TILLING 法を用いて JRE4 の機能欠損系を検索し、DNA 結合ドメイン内の保存アミノ酸残基に置換を生じた変異系を得た。この系統において SGA 生合成遺伝子の発現及び SGA 蓄積量が顕著に低下していた。また、*Spodoptera litura* の幼虫の成長は *jre4* 変異体において増加し、SGA 蓄積を含む JRE4 に依存した防御応答は耐虫性を付与していることが示された。JRE4 は SGA 生合成を制御する主な制御因子であり、トマトの虫害に対する防御に寄与することが示された。本成果は Plant J. (2018) などとして発表した。

#### (4) 転写因子を用いたニコチン生合成の改変

タバコの根において、ニコチン経路に含まれる一連の生合成遺伝子は 1 対の JA 応答性 ERF 転写因子 ERF189 と ERF199 によって協調的に転写活性化される。これら転写因子の発現改変のニコチン生合成への影響を解析した。*N. alata* および *N. benthamiana* の葉において ERF189 を一過的に過剰発現することでアルカロイド合成・蓄積を誘導できた。また、この誘導は bHLH ファミリー転写因子 MYC2 を共発現することでより増大した。ERF189 を構成的もしくは葉特異的に過剰発現することで葉におけるアルカロイド蓄積を増大することができたが、植物の生育には悪い影響があることが分かった。一方、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術により *ERF189* と *ERF199* を破壊した場合、植物の生育には影響を与えることなく、顕著なアルカロイド蓄積の抑制がみられた。ニコチン経路の改変は広範な含窒素及び含炭素化合物の蓄積に影響を及ぼすことが代謝プロファイリングによって分かった。本成果は PCP (2020) などとして発表した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ayman A, Thagun C, Imanishi S, Hashimoto T, Shoji T	4. 巻 36
2. 論文標題 Identification of gene regulated by a jasmonate- and salt-inducible transcription factor JRE3 in tomato	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 29-37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Shoji T, Hashimoto T	4. 巻 132
2. 論文標題 Expression of a nicotine biosynthesis gene depends on JRE4 transcription factor in heterogeneous tomato	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Plant Research	6. 最初と最後の頁 173-180
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Nakayasu M, Shioya N, Shikata M, Thagun C et al.	4. 巻 94
2. 論文標題 JRE4 is a master transcriptional regulator of defense-related steroidal glycoalkaloids in tomato	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant J.	6. 最初と最後の頁 975-990
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Hayashi S, Watanabe M, Kobayashi M, Tohge T, Hashimoto T, Shoji T	4. 巻 -
2. 論文標題 Genetic manipulation of transcriptional regulators alters nicotine biosynthesis in tobacco	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Ayman A, Thagun C, Imanishi S, Hashimoto T, Shoji T	4. 巻 36
2. 論文標題 Identification of genes regulated by a jasmonate- and salt-inducible transcription factor JRE3 in tomato	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 29-37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Shoji T	4. 巻 10
2. 論文標題 The recruitment model of metabolic evolution: jasmonate-responsive transcription factors and a conceptual model for the evolution of metabolic pathways	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 e560
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----