

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14439

研究課題名(和文) AP2/ERF型転写因子によるイソキノリンアルカロイド生合成系の発現制御

研究課題名(英文) AP2/ERF transcription factors involved in the regulation of isoquinoline alkaloid biosynthesis

研究代表者

山田 泰之 (Yamada, Yasuyuki)

神戸薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：20770879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、将来的な有用物質生産制御系の確立と発展につながる、イソキノリンアルカロイド(IQA)生合成系の発現制御機構のより詳細な解明を目的に、IQA生合成系の制御に関わる植物特有のAP2/ERF転写因子の機能解析を行った。  
IQAの1つであるベルベリンを生産する薬用植物オウレンから単離された5つのAP2/ERF転写因子、GIXEが生合成酵素遺伝子の発現調節に関わることや、DNAに直接的に結合することを明らかにし、さらに、表現型解析のための形質転換培養細胞を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物が生産する二次代謝産物の一種であるイソキノリンアルカロイドは、ベルベリンやモルヒネなど医薬品原料として有用なものも多い。しかし、植物中の含量が少なく、化学合成も不採算であることから、安定供給系の確立が求められている。

本研究は、ベルベリンを生産し、生薬としても利用される薬用植物オウレンから、ベルベリンの生産制御に関わる転写因子を単離しその機能解析を行った。

本研究の進展は、有用物質の効率的生産系の確立を目指した応用研究に繋がるのみならず、二次代謝全般の発現制御や進化的研究の発展にも繋がること期待される。

研究成果の概要(英文)：Plants produce various specialized metabolites. Alkaloids are often used as important pharmaceuticals, however, their accumulation in plants is often very low. To improve the production, I have elucidated the biosynthesis of isoquinoline alkaloids (IQAs) in medicinal plants at the molecular level as a model.

In this study, I isolated five novel AP2/ERF transcription factors involved in the regulation of IQA biosynthesis from *Coptis japonica* and characterized them.

Transient expression analysis revealed that five AP2/ERF transcription factors control the expression of IQA biosynthetic enzyme genes using *C. japonica* protoplasts. Furthermore, electrophoresis mobility shift assay suggested the direct interaction of AP2/ERF proteins with promoter sequence of IQA biosynthetic enzyme genes. We also generated and established the transgenic cultured cells in which AP2/ERF genes were over-expressed to analyze their phenotype.

研究分野：農芸化学

キーワード：イソキノリンアルカロイド オウレン 転写因子 AP2/ERF 発現制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

植物が生産する二次代謝産物、中でもアルカロイドは強い生物活性を持ち、医薬品などの原料として利用されている。近年、医薬品の需要は急速に高まってきているが、資源の枯渇や主な輸入先である中国の輸出規制も進んでおり、薬用資源の確保は急務の課題である。そこで、有用アルカロイドを安定して供給するために、生合成研究が進められてきたが、生合成系の発現制御機構の全容は明らかとなっていなかった。

申請者はモルヒネやベルベリンに代表されるイソキノリンアルカロイド(**IQA**)生合成系の発現制御研究を進め、複数の転写因子を単離・同定してきた<sup>1</sup>。近年は、植物特有の**AP2/ERF**転写因子の関与を見出し、候補因子の絞り込みを行っていたが、詳細な機能や既知転写因子との関連性などは未解明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、候補となる**AP2/ERF**遺伝子の発現を改変したオウレンやハナビシソウにおける生合成関連遺伝子の発現解析や**IQA**蓄積量の解析を行い、未解明であった**IQA**生合成系の発現制御に関わる**AP2/ERF**転写因子の分子機能を明らかにすることを目的とした。さらに、既知の**bHLH**や**WRKY**転写因子との相互作用解析や発現相関解析を行うことで、**IQA**生合成系の制御に関わる転写因子群のシグナルカスケードの解明を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) オウレン培養細胞を用いた**AP2/ERF**の機能解析

ベルベリン高生産性の培養細胞(以下**156-S**株)から調整したプロトプラストを用いた一過的遺伝子導入系を利用し、オウレン**AP2/ERF**遺伝子の一過的発現抑制や過剰発現を行い、ベルベリン生合成酵素遺伝子や**bHLH**、**WRKY**遺伝子の発現への影響をルシフェラーゼレポーターアッセイや定量的**PCR**により解析した。

### (2) **AP2/ERF**タンパク質の**DNA**結合性の解析

大腸菌において**GST**融合型の**AP2/ERF**リコンビナントタンパク質を発現させ、**GST**セファロースを用いて精製した。得られた精製タンパク質と生合成酵素遺伝子プロモーターの配列プローブを用いたゲルシフトアッセイにより、**DNA**結合性を解析した。

### (3) オウレン**AP2/ERF**遺伝子導入したハナビシソウ安定形質培養細胞株の確立

アグロバクテリウムを用いてオウレン**AP2/ERF**過剰発現ベクターをハナビシソウへと形質転換し、培養細胞株を確立した。得られた細胞株を液体培養に移し、**DNA**抽出と**PCR**による導入遺伝子の存在確認を行った。

## 4. 研究成果

オウレンから単離した5つの**AP2/ERF**転写因子がいずれもサブグループ**IX**に属していたことから、これらを**GIXE**(**Group IX AP2/ERF**)と名付けた。イソキノリンアルカロイド生合成系における**GIXE**転写因子の機能を明らかにするために、上記の「研究方法」に記載した実験を行い、以下の結果を得た。

### (1) **GIXE**の一過的発現抑制

5つの**GIXE**遺伝子の発現を一過的に発現抑制したところ、相互の発現に影響が見られた。さらに、5つ全ての**GIXE**遺伝子の発現が抑制された時、多くの生合成酵素遺伝子の発現が同時に低下していた。したがって、これら5つの**GIXE**転写因子は転写活性化因子として冗長的に機能している可能性が考えられた。また、既知の転写因子である**CjWRKY1**の発現も低下していた。一方、別の既知転写因子である**CjbHLH1**の発現に影響は見られなかった。また、**CjWRKY1**や**CjbHLH1**の発現を抑制した場合、複数の**GIXE**遺伝子の発現が低下していた。したがって、**GIXE**と**CjWRKY1**は相互に関与し、**CjbHLH1**は**GIXE**の発現を制御している可能性が示唆された(図1)。

### (2) **GIXE**の一過的過剰発現

**156-S**プロトプラストにおいて**GIXE**遺伝子を一過的に過剰発現させた結果、複数の**GIXE**の過剰発現により生合成酵素遺伝子や**CjWRKY1**遺伝子の発現が上昇することが明らかとなった。(1)の結果と合わせて、**GIXE**転写因子がベルベリン生合成酵素遺伝子群の発現制御に関わる転写活性化因子であることが強く示唆された。

### (3) **GIXE**の**DNA**結合性の解析

**GST-GIXE**融合タンパク質を発現させるベクターを作出し、大腸菌**BL21**株における発現誘導条件の検討を行い、4つの**GST-GIXE**タンパク質の可溶化と精製を行った。なお、1つはタンパク質の可溶化や安定性に問題が見られたため、配列の精査やベクターの変更など条件の改善が必要であると考えられた。さらに、生合成酵素遺伝子プロモーターへの結合性をゲルシフトアッセイにより解析した結果、**AP2/ERF**転写因子の標的配列である**GCC-box**様配列を含むプローブにおいて結合性が確認された。

#### (4) GIXEを導入したハナビシソウ安定形質培養細胞株の確立

植物体レベルでの機能解析を行うために、安定形質転換体の作出が比較的容易なハナビシソウを用いた。GIXEが冗長的に機能している可能性があることから、転写因子の機能を抑制型に変換するSRDXドメインを付加したのも同時に形質転換した。得られた形質転換培養細胞株を液体培養に移して生育・維持し、その一部を回収して導入遺伝子の確認を行った。PCRの結果、いずれの細胞株においても導入遺伝子の存在が確認された。

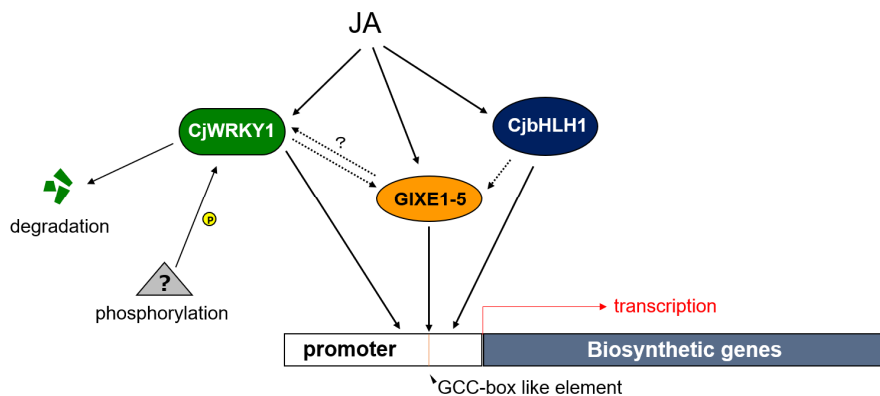


図1 GIXE 転写因子群によるイソキノリンアルカロイド生合成系の発現制御

#### <引用文献>

1. Yamada Y., Sato F. "Transcription Factors in Alkaloid Biosynthesis", *International Review of Cell and Molecular Biology*, **305**, 339-382 (2013)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田泰之, 堀健太郎, 土反伸和, 佐藤文彦
2. 発表標題 ケシ科ハナビシソウのドラフトゲノムデータを利用したイソキノリンアルカロイド生合成関連遺伝子のマイニング -ドラフトゲノムデータを利用した生合成関連遺伝子の探索-
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八田裕人, 山田泰之, 森祐貴, 佐藤文彦, 土反伸和
2. 発表標題 オウレンのベルベリン生合成系の発現制御に関わる転写因子GIXEのプロモーターのDNA結合性の解析
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田泰之, 堀健太郎, 西田昇平, 花枝大喜, 土反伸和, 佐藤文彦
2. 発表標題 ケシ科ハナビシソウのイソキノリンアルカロイド生産に関わる遺伝子の探索と機能解析
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田泰之, 土反伸和, 佐藤文彦
2. 発表標題 オウレンのイソキノリンアルカロイド生合成系を制御するAP2/ERF型転写因子
3. 学会等名 日本植物細胞分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田泰之, 堀健太郎, PURWANTO Ratmoyo, 西田昇平, 土反伸和, 佐藤文彦
2. 発表標題 ハナビシソウドラフトゲノムデータを利用したアルカロイド生合成関連遺伝子のマイニング
3. 学会等名 日本生薬学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田泰之, 土反伸和, 佐藤文彦
2. 発表標題 オウレンのイソキノリンアルカロイド生合成におけるERF転写因子の機能解析
3. 学会等名 植物化学調節学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田泰之, 堀健太郎, 土反伸和, 佐藤文彦
2. 発表標題 ハナビシソウドラフトゲノムデータを利用したイソキノリンアルカロイド生合成関連遺伝子のマイニング
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019年

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