

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05820

研究課題名(和文)ナス科植物をモデルとしたペルオキシソーム輸送体ABCD1の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of the peroxisomal transporter ABCD1 in Solanaceae plants

研究代表者

土反 伸和 (SHITAN, Nobukazu)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20547880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物の代謝産物は、オルガネラを動きながら生合成されている。中でもペルオキシソームは、二次代謝産物などの生合成に関わっており、その中間体輸送にABCD1輸送体の関与が示唆されているが、輸送機能や環境応答の知見はほとんどない。本研究では、ペチュニアとタバコを材料にABCD1の解析を行なった。タバコ培養細胞においてABCD1遺伝子は酵母エキスやジャスモン酸処理で発現が誘導された。タバコ植物体ではどの組織でも一定量の発現が観察された。ペチュニア植物体でもどの組織でも発現が観察されたが、とくに葉と花弁での発現が高い傾向が観察された。これらはナス科植物における二次代謝生産機構に新たな知見を提供した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

代謝産物は、化合物の同定や生合成経路に関する多くの先行研究があるが、代謝産物の細胞内での空間制御機構の知見は少ない。本研究では、タバコとペチュニアというアルカロイドやベンゼノイド(香気成分)を生産するナス科植物でのペルオキシソーム輸送体を解析した。ABCD1が香気成分生産部位で比較的に発現が高いことなどを明らかにしており、植物の生産する有用産物の生合成機構の理解に新たな知見を提供した。今後、ABCD1をさらに解明、また活用していくことで、植物の環境適応の理解が進むとともに、より香気成分生産を促進させた植物の分飼育種などにつながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Most plant metabolites are biosynthesized via several organelles. Peroxisomes are involved in the biosynthesis of secondary metabolites. The involvement of ABCD1 transporters in the intermediates transport has been suggested, but little is known about the transport function and environmental responses. In this study, we examined ABCD1 using petunia and tobacco as models. In cultured tobacco cells, ABCD1 gene expression was induced by yeast extract and jasmonic acid treatment. In tobacco plants, a constant expression level was observed in all tissues. In petunia plants, the ABCD1 gene was also expressed in all tissues, especially in leaves and petals. These findings provide new insights into the mechanism of metabolites biosynthesis in Solanaceae plants.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：タバコ ペチュニア ABCD1 ペルオキシソーム 輸送体

1. 研究開始当初の背景

植物は様々な生理活性物質（二次代謝産物や植物ホルモン）を生産し、環境に適応している。医薬品としての有用性などから生合成酵素に関する研究が国内外で進められた結果、最終産物や生合成中間体が器官間や細胞内オルガネラ間を極めてダイナミックに移動していることが明らかとなってきた。そこで、生合成に加えて輸送をも制御することは有用産物の大量生産に繋がると期待され、輸送機構が大きな注目を集めてきている。当研究者はブラックボックスであったこの領域にいち早く着目し、薬用植物オウレンやタバコを用い、微生物や昆虫に対する防御物質であるベルベリンやニコチンなどのアルカロイド輸送と転流を解析し、内在性アルカロイドを基質とする ABC (ATP-binding cassette) 輸送体を報告するとともに、MATE 輸送体や PUP 輸送体なども報告し、二次代謝産物の輸送蓄積機構の理解を進めてきた。

最終産物の輸送がわかってきた一方で、細胞内オルガネラ間の代謝物の輸送機構の知見は少ない。当研究者は、研究分担者である山口大学 肥塚博士とともに、受粉媒介者の誘引のために香気成分であるフェニルプロパノイドを生産・放出するペチュニアを研究してきており (PLoS One 2018)、その過程で、細胞内輸送、特にペルオキシソームを介した生合成の重要性に着目するに至った。ペルオキシソームは、傷害や感染応答に関わる植物ホルモンであるジャスモン酸やサリチル酸、昆虫への誘引や毒性に関わるフェニルプロパノイドやアルカロイドなどの生産に関わるものの、その輸送の知見は少なく、また環境応答における役割も不明な点が多い。我々は、ペルオキシソームの膜輸送は植物の環境適応にいかに関わっているかについて大きな関心を持ち、その解明を試みたいと考えた。そのきっかけとなる分子が ABC 輸送体 ABCD1 である。ABCD1 は、モデル植物シロイヌナズナの変異体解析から見出されたペルオキシソーム局在の膜タンパク質で、その変異体では、ペルオキシソームに運ばれ酸化を受けるはずの脂肪酸が細胞内に蓄積し、種子は発芽異常を示す。本変異体は他にも、ジャスモン酸やフェニルプロパノイドの減少と、ジャスモン酸前駆体 OPDA の増加が観察されたことから、OPDA やシナモイル CoA などのペルオキシソームへの輸送を担うとされている。しかし、ABCD1 の輸送能は証明されておらず、基質特異性などの輸送特性、また、その輸送が植物の環境適応にどのように関わっているかは不明であった。

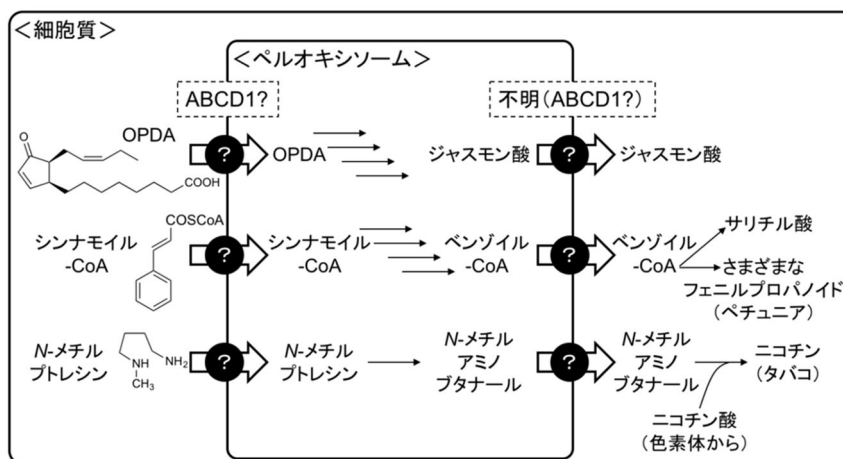


図1 ペルオキシソームを介した代謝モデル図

2. 研究の目的

本研究では、ナス科植物タバコやペチュニアを材料に、ABCD1 の機能解析を通じて、ペルオキシソーム膜輸送を介した植物の環境適応機構を解明することを目指した。これら植物からの ABCD1 遺伝子の単離、またエリシター処理や植物ホルモン処理時の応答、植物体での発現部位と香気成分生産との関連などを解析する。また、発現抑制体の作出や、ヘテロ発現系を用いた解析なども進めることで、ペルオキシソーム輸送を介した代謝生産の制御と環境適応機構を解明し、より効率的な物質生産系に繋がる基礎的知見を得ることを目指した。

3. 研究の方法

(1) ABCD1 遺伝子の単離と解析

タバコ培養細胞 BY-2、タバコ植物体 (*Nicotiana glauca*)、ペチュニア植物体 (*Petunia hybrida*) それぞれから RNA を抽出した。各 RNA について、逆転写反応により cDNA を作成し、ABCD1 遺伝子の単離を行なった。得られた遺伝子配列について、既報のシロイヌナズナ ABCD1 やオオムギの HvABCD1、HvABCD2 とアミノ酸相同性の比較や重要なアミノ酸の保存性などを検討した。

(2) ABCD1 遺伝子の発現解析

タバコ培養細胞 BY-2 を一般にエリシターとして用いられる酵母エキストラクト、また植物ホルモンであるジャスモン酸で処理をした。一定時間後に細胞をサンプリングし発現解析に用いた。またタバコ植物体およびペチュニア植物体の各組織についてもサンプリングし、発現解析に用いた。それぞれの細胞や組織から RNA を抽出後、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて逆転写し cDNA とした。それら cDNA に対して、ABCD1 を認識するプライマーおよび Thunderbird Next SYBR qPCR Mix (TOYOBO) と LightCycler96 (Roche, Basel, Switzerland) によって発現変化を検討した。リファレンスとしては *EF1a* や *UBQ* を用いた。

(3) ABCD1 発現酵母の作出

タバコおよびシロイヌナズナの ABCD1 遺伝子を出芽酵母発現用ベクター pDR196 に組み込み、ベクターを構築した。その際、ABCD1 の 5' に His タグ配列を付加したものも作成した。これらベクターを出芽酵母に形質転換し、これら ABCD1 配列を認識する抗体を用いてタンパク質の発現を確認した。

(4) ABCD1 を発現抑制したペチュニア形質転換体の作出

ABCD1 発現抑制用 RNAi ベクターを構築し、ペチュニアに形質転換を行なった。得られた形質転換体の葉より RNA を抽出後、cDNA を作成し、リアルタイム PCR により発現が抑制しているかを検討した。

4. 研究成果

(1) ABCD1 遺伝子の単離と解析

タバコ培養細胞 BY-2、タバコ植物体 (*Nicotiana glauca*)、ペチュニア植物体 (*Petunia hybrida*) から ABCD1 遺伝子を単離した。タバコの *Nicotiana tabacum* では本遺伝子は 2 つ存在することがゲノム配列から想定され、そのうちの 1 つを *NtABCD1* と命名した。*NtABCD1*、*NsABCD1*、*PhABCD1* はそれぞれ 4035, 4035, 4038 bp の ORF であり、それぞれ 1344, 1344, 1345 アミノ酸をコードしていた。*NtABCD1* と *NsABCD1* はアミノ酸レベルで 100% 一致し、*PhABCD1* とは 95% と極めて高い相同性を示した。また、シロイヌナズナの *AtABCD1* とは 76%、オオムギの *HvABCD1*、2 とは 72、70% の相同性を示した。膜貫通領域の予測プログラムより、それらの構造は 1 2 回の膜貫通ヘリックスと 2 個の ATP 加水分解領域 (ABC ドメイン) を有することが推定された。また、*AtABCD1* はチオエステラーゼ活性を有すること、その活性に重要なアミノ酸が報告されているが、それらアミノ酸は *NtABCD1* や *PhABCD1* でも保存されていることを確認した。これら高いアミノ酸相同性や、ゲノム中に基本的には 1 分子しか存在しないことが推定されることから (*Nicotiana tabacum* は複二倍体なため 2 分子が推定される)、これら ABCD1 は植物種間で同様の機能を有することが想定された。

(2) ABCD1 遺伝子の発現解析

タバコ培養細胞 BY-2 をエリシターとして酵母エキストラクトで処理したところ、1.3 倍程度ではあるが発現の誘導が観察された。また、ジャスモン酸で処理したところ、2.5 倍程度の誘導が観察された。これらのことから、病原菌感染時や虫害応答時に、タバコ ABCD1 はなんらかの代謝産物をペルオキシソーム内に輸送すること、その輸送および代謝が虫害応答などに重要な可能性が示された。

タバコ (*Nicotiana glauca*) 植物体では、根、茎、葉、萼、花の各組織で発現し、とくに萼において高い発現が観察された。また蕾のステージ (S、M、L) と開花では、ステージ M において発現が高かった。これら発現特性から、ABCD1 は各組織で発現、機能しており、香気成分やアルカロイドなど二次代謝産物の生産との強い相関はない可能性が考えられた。

ペチュニア (*Petunia hybrida*) 植物体では、根、茎、葉、萼、花管、花弁、雄蕊、雌蕊など各組織で発現しており、とくに、香気成分を生合成および放出する花弁において最も高い発現を示した。しかし、花のステージごとの発現を検討したところ、開花前のステージ 2 が最も発現が高く、その後減少していき、開花 0~3 日は同程度の発現を示し、老化段階で顕著な減少を示した。このことから、花弁における香気成分の生合成と強い相関は想定されず、むしろ細胞分裂の盛んな部位、時期において発現が高いことから、細胞に必要な成分の生産に普段から関与していることが推定された。

(3) ABCD1 発現酵母の作出

タバコおよびシロイヌナズナの ABCD1 遺伝子を昆虫細胞やピキア酵母、出芽酵母発現用ベクターなどに導入し、各生物での発現を試みた。昆虫細胞やピキア酵母では明確な発現が観察されなかったが、出芽酵母ではウェスタンブロットによって予想サイズにバンドが観察され、発現していると考えられた。

(4) ABCD1 を発現抑制したペチュニア形質転換体の作出

ペチュニアの形質転換体を作成し、葉の RNA を抽出し発現レベルを比較検討した。その結果、複数のラインにおいて発現が顕著に抑制されていることを確認した。

以上の遺伝子単離および発現特性については、Plant Gene に論文として報告した。また、作出した酵母やペチュニアの形質転換体を用いてさらに解析を進めることで、植物 ABCD1 による環境適応機構がさらに解明されていくと期待される。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Shitan Nobukazu, Yazaki Kazufumi	4. 巻 15
2. 論文標題 Dynamism of vacuoles toward survival strategy in plants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 183127 ~ 183127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2019.183127	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 Shitan Nobukazu, Nishitani Shiori, Inagaki Akiko, Nakahara Yoko, Yamada Yasuyuki, Koeduka Takao	4. 巻 33
2. 論文標題 Gene expression analysis of the ATP-binding cassette transporter ABCD1 in petunia (<i>Petunia hybrida</i>) and tobacco (<i>Nicotiana spp.</i>)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Gene	6. 最初と最後の頁 100391 ~ 100391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.plgene.2022.100391	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 土反伸和、西谷詩織、中原洋子、山田泰之、肥塚崇男
2. 発表標題 タバコおよびペチュニアにおけるABC輸送体ABCD1の遺伝子発現解析
3. 学会等名 第38回 日本植物バイオテクノロジー学会（つくば）大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nobukazu Shitan
2. 発表標題 Transporters of specialized metabolites-their identifications and application to synthetic biology-
3. 学会等名 in “Plant Metabolic Engineering for Production of Value-added Metabolites” Universiti Tunku Abdul Rahman, Malaysia (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土反伸和、西谷詩織、稲垣明子、中原洋子、山田泰之、肥塚崇男
2. 発表標題 ナス科植物におけるABC輸送体Dサブファミリー-ABCD1の遺伝子発現解析
3. 学会等名 第1回トランスポーター研究会関西西部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田泰之、西谷詩織、中原洋子、肥塚崇男、土反伸和
2. 発表標題 タバコおよびペチュニアにおけるペルオキシソーム輸送体 ABCD1 の発現解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021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
研究分担者	肥塚 崇男 (KOEDUKA Takao) (30565106)	山口大学・大学院創成科学研究科 ・准教授 (15501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------