

機関番号：34512

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21880048

研究課題名（和文）ニコチンをモデルとした植物のアルカロイド転流と防御機構の解明

研究課題名（英文）Comprehensive understanding of alkaloid translocation and plant defense mechanism.

研究代表者

士反 伸和 (SHITAN NOBUKAZU)

神戸薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：20547880

研究成果の概要（和文）：植物は外敵から身を守るため、アルカロイドなど生理活性物質を生産し蓄積する。本研究ではニコチンおよびタバコ植物をモデルに、未解明のアルカロイド転流を研究した。C215 輸送体は葉の液胞膜に局在しニコチンを輸送すること、高発現させるとニコチン生産が増加することを明らかとした。T408 輸送体は葉緑体に局在し、その機能がニコチン生産に重要であることを明らかとした。これら結果から、今後は有用アルカロイドの高生産や虫害に強い植物の育種への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Alkaloids play a key role in the plants defense mechanism. The major alkaloid of the *Nicotiana* species, nicotine, is translocated from the root to the vacuoles of leaves. In this study, two transporters, C215 and T408, were analyzed. C215 is expressed in the tonoplast of leaves, and transported nicotine. Overexpression of C215 induced the nicotine production. T408 is localized to plastid and play an important role in nicotine synthesis. These knowledge might enhance the production of valuable secondary metabolites and the molecular breeding of plant which is more resistant to insects.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,150,000	345,000	1,495,000
2010 年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,160,000	648,000	2,808,000

研究分野：植物生化学

科研費の分科・細目：農学・応用生物化学

キーワード：植物、アルカロイド、トランスポーター、ニコチン、転流

1. 研究開始当初の背景

植物が生産するアルカロイドは、その強い細胞毒性によって捕食生物や微生物・真菌による感染から植物を保護する役割を担っている。しかしながら、アルカロイドは植物に対しても毒性を示すため、植物細胞はこれら生理活性物質を特異的な器官やオルガネラに輸送・蓄積し毒性を回避する機構を有している。タバコのアルカロイドであるニコチン

は、傷害応答等により根でその生産が誘導され、葉に転流されて液胞の中に高蓄積することで昆虫に対する防御を担っている。このニコチンが転流される現象は 15 年以上も前に同定されているにもかかわらず、その輸送転流機構はこれまで全く明らかとされていなかった。ベルギーの Gent 大学 D. Inzé 博士のグループは、BY-2 細胞とトランスクリプトームを用いて、ニコチン生産をジャスモン酸

で誘導した際に発現誘導される遺伝子の網羅的な解析を報告したが、研究代表者はその中に、ニコチン生合成酵素と同調して発現誘導されるトランスポーターとして3つのMATE型トランスポーター (Nt-JAT1、C215、T449) 及び1つのプリンパーミエース (T408) が存在することを見出した。さらに、これら4つのトランスポーターの内 MATE 型トランスポーター-Nt-JAT1 を解析し、本トランスポーターが葉の液胞膜に局在し、プロトンアンチポーターとしてニコチンを輸送することを明らかとした。すなわち、根から転流されてきたニコチンを葉の液胞に輸送することにより、Nt-JAT1 はニコチン転流及び虫害耐性に寄与していることを明らかとしてきた。

2. 研究の目的

ニコチン輸送体の有力候補として着目したトランスポーターには、Nt-JAT1 以外にも MATE 型トランスポーター (C215、T449)、プリンパーミエース (T408) の3つが存在する。すでに、C215 が通常条件では殆ど発現せず虫害時に葉のみで高発現すること、T449 は通常条件で根において中程度の発現をするが、虫害時にその発現部位が茎特異的に変わることを見出している。本研究ではこれら3種類のトランスポーターについて、その細胞内局在膜の同定とニコチン輸送機能を生化学的に解明し、発現組織特異性と組織内発現部位の解析を進める。それら解析から、根から葉への転流において未解明な、根における導管へのローディング、茎における効率的な移動、葉における導管からのアンローディングに関わるトランスポーターを同定し、ニコチン転流と昆虫への防御応答機構を統合的に解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ①C215 の局在解析

C215 トランスポーターの局在を解析するために、GFP を C 末に結合した融合タンパク質の発現コンストラクトを作成した。本コンストラクトをアグロバクテリウムに導入し、BY-2 細胞に形質転換を行った。得られた形質転換培養細胞を用いて、コンフォーカル蛍光顕微鏡で局在の解析を行った。

(1) ②C215 のニコチン輸送能解析

C215 のニコチン輸送能の解析は出芽酵母の細胞輸送系を用いて行った。恒常的高発現プロモーターである PMA1 プロモーターの下流に C215 を挿入したプラスミドを作成し、出芽酵母 AD12345678 株に形質転換を行った。コントロール酵母、C215 発現酵母をニコチン処理し、一定時間後に細胞内のニコチンを抽出し HPLC により定量を行った。

(1) ③C215 の植物での機能解析

植物および培養細胞での機能を解析するため、過剰発現ならびに発現抑制用のコンストラクトを作成した。アグロバクテリウムを

介して、これらをタバコ植物体ならびに培養細胞に形質転換を行った。得られた C215 過剰発現体については、まず高発現体であることを RT-PCR により確認を行った。さらに、ニコチンによる根の伸長阻害への影響、葉におけるニコチン含量の測定を行い、植物体における過剰発現の影響を検討した。また C215 過剰発現培養細胞については、ジャスモン酸処理をした際の細胞内ニコチンを抽出し、HPLC により定量を行った。

(2) ①T408 の組織発現の検討

コントロール条件下ならびにジャスモン酸処理下での T408 の植物体各組織 (根、茎、葉) での発現レベルについて、半定量 RT-PCR を用いて解析した。

(2) ②T408 の全長クローニング

T408 の配列を調べたところ、5' 末が欠けていることが判明した。そこで 5' RACE により全長配列を明らかにした後、全長を PCR により増幅し、各発現用ベクターに組み込みを行い、次からの解析に備えた。

(2) ③T408 の局在解析

T408 はその配列からプラスチド局在が示唆された。そこで、タバコ緑葉よりプラスチドを単離しタンパク質を抽出した。粗抽出タンパク質と共に SDS-PAGE に用い、プラスチド、細胞膜、液胞膜の抗体を用いたウェスタンブロットを行った。また、T408-GFP 融合タンパク質の安定発現植物体を作成した。この形質転換体を用いてコンフォーカル蛍光顕微鏡観察を行い、その細胞内局在を検討した。

(2) ④T408 の細胞内機能の推定

T408 の機能を推定することを目的に、過剰発現、発現抑制した植物体ならびに培養細胞を作成した。これらについて、植物体などの表現系を観察するとともに、細胞内での代謝産物の変化を、Orbitrap を用いたメタボローム解析や HPLC 解析によって検討を行った。

4. 研究成果

(1) ①C215 の局在解析

C215-GFP を発現した培養細胞について、コンフォーカル蛍光顕微鏡で観察を行った。その結果、GFP の蛍光は液胞膜と示唆される部分に観察された (Fig. 1)。さらに確証を得るため、長時間の FM4-64 色素の処理により液胞膜を染色して観察を行った。その結果、FM4-64 により染色された液胞膜の蛍光と C215-GFP の蛍光は明瞭に一致したことから、本タンパク質は液胞膜に局在することが明らかとなった。

(1) ②C215 のニコチン輸送能解析

ニコチンをコントロール、C215 酵母に処理して細胞内のニコチン含量を定量した。時間的な変化を調べたところ、6 時間、8 時間での培養において、細胞内の含量は C215 酵母で有意に低く、本タンパク質が Nt-JAT1 同様に酵母では細胞膜に局在し、細胞外にニコチ

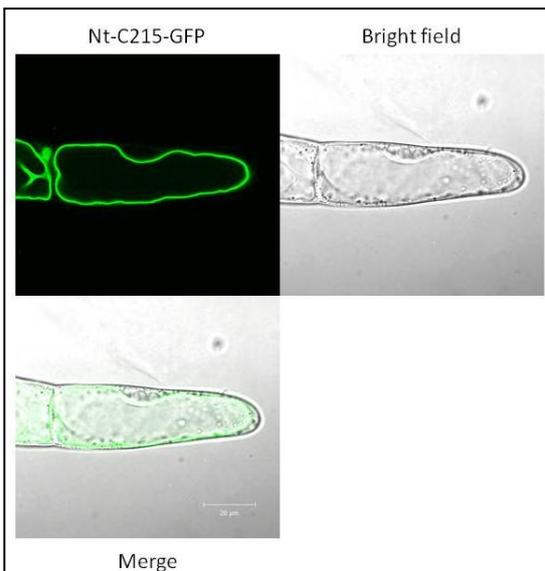


Fig. 1 BY-2細胞におけるNt-C215-GFP融合タンパク質の蛍光観察

Nt-C215の細胞内局在を明らかにするため、タバコBY-2細胞にNt-C215-GFP融合タンパク質を発現させ、共焦点レーザー顕微鏡(LSM-700)を用いてGFPの蛍光観察を行った。その結果、Nt-C215-GFP融合タンパク質の蛍光はタバコBY-2細胞の液胞膜と思われる部位に観察された。

ンを排出している可能性が示唆された。またその細胞内含量はNt-JAT1発現酵母と同様であったことから、ニコチン排出能はNt-JAT1とほぼ同程度であることが推定された。さらに基質特異性を検討するため、タバコの別アルカロイドであるアナバシンを処理したところ、Nt-JAT1ならびにC215で細胞内含量が有意にコントロールより低く、これら類似のアルカロイドも輸送基質となることが示唆された。

(1) ③C215の植物での機能解析

得られた過剰発現植物体について、RT-PCRにより、C215が高発現していることを確認した。それら植物体について、ニコチンによる根の伸長阻害への耐性を検討したが、差は観察されなかった。また、葉におけるニコチン含量についても野生株と差はなく、C215の植物体における機能は明らかとならなかった。タンパク質レベルでの発現上昇を検討する必要がある。一方、得られた過剰発現の培養細胞については、ジャスモン酸処理した細胞から抽出、定量したところ、過剰発現した培養細胞においてニコチン含量の増加が観察された。このことから、本タンパク質がニコチンの生産に関わること、さらに高発現させることでアルカロイド生産を増加させられることが示唆された。

(2) ①T408の組織発現の検討

コントロール植物体、ジャスモン酸処理した植物体を用いてT408の組織発現を検討した。T408はコントロールでも各組織において発現が観察され、ジャスモン酸処理で根における発現が有意に上昇することが明らかとなった。ニコチンを生産する根において、ニ

コチン生産誘導時に発現が上昇することから、本遺伝子産物がニコチン合成に関与することが示唆された。

(2) ②T408の全長クローニング

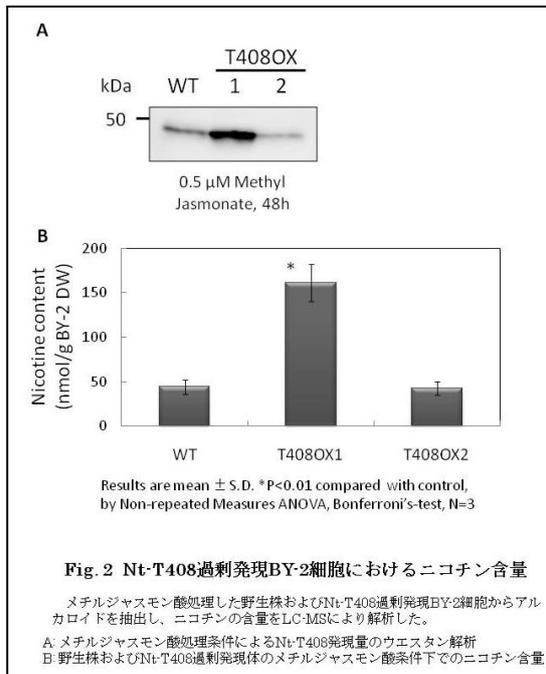
5' RACEにより全長のクローニングを行った結果、本遺伝子は全長2024bp、Open reading frame (ORF) 1740bp、579アミノ酸残基のタンパク質をコードする遺伝子であることが判明した。さらにBLAST解析を行ったところ、本遺伝子産物は植物においては全く未解明なトランスポーターであるNCS1 (nucleobase cation symporter1)ファミリーに属することが明らかとなった。

(2) ③T408の局在解析

緑葉からプラスチドを単離しT408の局在をウェスタン解析で検討したところ、プラスチド画分にT408タンパク質由来のバンドを確認した。本画分にプラスチド以外の混入がないことは細胞膜、液胞膜、プラスチドの指標酵素の抗体を用いて確認しており、この結果からT408はプラスチドに局在することが示唆された。さらに、T408-GFP安定発現の植物体からプロトプラストを単離し、融合タンパク質の局在をコンフォーカル蛍光顕微鏡で観察したところ、蛍光はプラスチドの自家蛍光と一致したことから、本タンパク質のプラスチド局在が強く示唆された。

(2) ④T408の細胞内機能の推定

植物体などでの機能を推定するため、T408過剰発現ならびに発現抑制株を作出した。過剰発現植物体、発現抑制植物体におけるT408の発現をウェスタン解析により検討したところ、若干の発現上昇、低下が観察された。培養細胞については、明確に発現が上昇した形質転換体を得た。この細胞株とコントロール細胞より細胞内の代謝産物を抽出し、Orbitrapを用いてメタボローム解析を試みた。コントロールと比較して増減した代謝産物はあったものの、細胞の状態による差が大きく、T408の過剰発現によって変動する代謝産物、すなわち基質とされるものの同定にはいたらなかった。しかしながら、ジャスモン酸処理時のニコチン含量を定量したところ、T408を過剰発現するラインにおいて、明確な生産量の増加が観察された (Fig. 2)。このことから、本タンパク質がニコチン生産に重要な役割を果たすことが強く示唆された。



5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 13 件)

①発表者: 土反 伸和, 伊藤 慎悟, 南 翔太, 伊藤 梢, 森田 匡彦, 澤田 啓介, Alain Goossens, Dirk Inzé, 守安 正恭, 森山 芳則, 矢崎 一史

発表演題: ジャスモン酸誘導性タバコ MATE 型トランスポーターNt-C215 のクローニングと機能解析

学会名: 第 52 回日本植物生理学会年会

発表月: 2011 年 3 月

発表場所: 仙台

②発表者: 南 翔太, 土反 伸和, 森田 匡彦, 澤田 啓介, 伊藤 慎悟, Alain Goossens, Dirk Inzé, 守安 正恭, 森山 芳則, 矢崎 一史

発表演題: タバコ BY-2 細胞における新規トランスポーターNtT408 の機能解析

学会名: 第 52 回日本植物生理学会年会

発表月: 2011 年 3 月

発表場所: 仙台

③発表者: 土反 伸和, 森田 匡彦, 伊藤 慎悟, 南 翔太, 澤田 啓介, Montagu MV, Dirk Inzé, Rischer H, Alain Goossens, Oksman-Caldentey KM, 森山 芳則, 矢崎 一史

発表演題: Cloning and characterization of multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporters from *Nicotiana tabacum*

学会名: 第 33 回日本分子生物学会年会

発表月: 2010 年 12 月

発表場所: 神戸

④発表者: 南 翔太, 土反 伸和, 森田 匡彦, 澤田 啓介, 伊藤 慎悟, Dirk Inzé,

Alain Goossens, 守安 正恭, 森山 芳則, 矢崎 一史

発表演題: Functional analysis of jasmonate-inducible nucleobase cation symporter-1 (NCS-1) transporter from *Nicotiana tabacum*

学会名: 第 33 回日本分子生物学会年会

発表月: 2010 年 12 月

発表場所: 神戸

⑤発表者: 南 翔太, 土反 伸和, 森田 匡彦, 澤田 啓介, 伊藤 慎悟, Alain Goossens, Dirk Inzé, 守安 正恭, 森山 芳則, 矢崎 一史

発表演題: 培養細胞を用いた二次代謝産物の細胞内輸送機構の解析

学会名: 日本生薬学会第 57 回年会

発表月: 2010 年 9 月

発表場所: 徳島

⑥発表者: Shitan N., Morita M., Ito S., Minami S., Sawada k., Montagu MV., Inze D., Rischer H., Goossens A., Oksman-Caldentey KM., Moriyama Y., Yazaki K.

発表演題: Involvement of multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporters in nicotine translocation in *Nicotiana tabacum*

学会名: Plant Membrane Biology 15th International workshop

発表月: 2010 年 9 月

発表場所: オーストラリア, アデレード

⑦発表者: 南 翔太, 土反 伸和, 森田 匡彦, 澤田 啓介, 伊藤 慎悟, Alain Goossens, Dirk Inzé, 守安 正恭, 森山 芳則, 矢崎 一史

発表演題: BY-2 細胞におけるジャスモン酸誘導性新規トランスポーターの解析

学会名: 第 28 回日本植物細胞分子生物学会大会

発表月: 2010 年 9 月

発表場所: 仙台

⑧発表者: 南 翔太, 土反 伸和, 森田 匡彦, 澤田 啓介, 伊藤 慎悟, Alain Goossens, Dirk Inzé, 守安 正恭, 森山 芳則, 矢崎 一史

発表演題: ジャスモン酸誘導性タバコ新規トランスポーターNt-T408 のクローニング及び機能解析

学会名: 第 5 回トランスポーター研究会

発表月: 2010 年 7 月

発表場所: 東京

⑨発表者: 土反 伸和, 伊藤 慎悟, 南 翔太, 森田 匡彦, 澤田 啓介, Alain Goossens, Dirk Inzé, 守安 正恭, 森山 芳則, 矢崎 一史

発表演題: タバコ MATE 型トランスポーター Nt-C215 の発現特性と生理機能

学会名: 第 5 回トランスポーター研究会

発表月：2010年7月

発表場所：東京

⑩発表者：土反 伸和、南 翔太、森田 匡彦、澤田 啓介、伊藤 慎吾、Alain Goossens、Dirk Inzé、守安 正恭、森山 芳則、矢崎 一史

発表演題：ジャスモン酸誘導性タバコトランスporter-T408のクローニングと機能解析

学会名：第51回日本植物生理学会年会

発表月：2010年3月

発表場所：熊本

⑪発表者：南 翔太、土反 伸和、森田 匡彦、澤田 啓介、伊藤 慎悟、Alain Goossens、Dirk Inzé、守安 正恭、森山 芳則、矢崎 一史

発表演題：ニコチン生産時に発現誘導されるタバコ新規トランスporterのクローニング及び機能解析

学会名：日本薬学会 第130年会

発表月：2010年3月

発表場所：岡本

⑫発表者：南 翔太、土反 伸和、森田 匡彦、澤田 啓介、伊藤 慎悟、Dirk Inzé、Alain Goossens、守安 正恭、森山 芳則、矢崎 一史

発表演題：Cloning and characterization of jasmonate-inducible transporter from *Nicotiana tabacum*

学会名：第32回日本分子生物学会年会

発表月：2009年12月

発表場所：横浜

⑬発表者：土反 伸和、伊藤 慎吾、森田 匡彦、澤田 啓介、南 翔太、Alain Goossens、Dirk Inzé、守安 正恭、森山 芳則、矢崎 一史

発表演題：ニコチン転流に関わるタバコ MATE型トランスporterの機能解析

学会名：第27回日本植物細胞分子生物学会大会

発表月：2009年7月

発表場所：神奈川

[その他]

ホームページ等

http://www.kobepharma-u.ac.jp/rsch/rsch_04b.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土反 伸和 (SHITAN NOBUKAZU)

神戸薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：20547880

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし