

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570055

研究課題名(和文) タバコアルカロイド制御遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Molecular characterization of regulatory genes for nicotine biosynthesis in tobacco

研究代表者

庄司 翼 (Shoji, Tsubasa)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：40343272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナAtERF1はGCCを含む配列を連続する3つのベータ鎖によって認識しているのに対して、同じサブグループに属するタバコERF189やニチニチソウORCA3は類似するが異なる配列を認識する。これら同種の転写因子がDNA結合特異性をどのように多様化させ、それぞれの植物系統で異なる防御代謝を制御するに至ったのかを解明した。DBDのアミノ酸置換変異解析の結果、2つの異なるDNA-タンパク質相互作用が認識の配列特異性と結合親和性に働くことが推定された。対象とした同種のERF転写因子は比較的少数のアミノ酸置換変異によってDNA結合特異性を多様化されてきたことが考察された。

研究成果の概要(英文)：Transcription factors (TFs) recognize target DNA sequences with distinct DNA-binding domains (DBDs). The DBD of Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 (AtERF1) uses three consecutive beta-strands to recognize a GCC-containing sequence, but tobacco (*Nicotiana tabacum*) ERF189 and periwinkle (*Catharanthus roseus*) Octadecanoid-derivative Responsive Catharanthus AP2-domain protein 3 (ORCA3) of the same TF subgroup appear to target similar but divergent DNA sequences. Here, we examined how DNA-binding specificities of these TFs have diverged in each plant lineage to regulate distinct defense metabolisms. Extensive mutational analyses of these DBDs suggest that two modes of protein-DNA interactions independently contribute to binding specificity and affinity. Divergent DNA-binding specificities of the ERFs may have arisen through mutational changes of these amino acid residues.

研究分野：植物分子生物学

科研費の分科・細目：植物生理分子

キーワード：転写因子 アルカロイド タバコ ジャスモン酸

## 1. 研究開始当初の背景

含窒素塩基性天然物であるアルカロイドとして、これまでに1万種以上の化学構造が知られている。ニコチン(タバコ)、カフェイン(コーヒー)、モルヒネ(ケシ)、アトロピン(ベラドンナ)、ピンブラスチン(ニチニチソウ)など多くの生理活性物質がアルカロイドに含まれ、医薬、麻薬、毒物として利用されるものも多い。各アルカロイドは、特定の種や属にだけ蓄積される二次代謝産物でもある。また、多くの場合、限定された組織や生育条件でのみ合成されることも知られている。多様な生合成経路の確定、及び、生合成酵素遺伝子クローニングが急速に進展する一方で、生合成がいかに時空間的制御されるのかに関する知見は限られてきた。

タバコ属植物に見出されるニコチン及びその類縁化合物(タバコアルカロイド)は、その毒性と喫煙習慣性がよく知られている。一方、植物にとっては防虫性の化学防御物質としての役割がある。タバコの葉が害虫により食べられると、そのシグナルが葉から根に伝達され、傷害ホルモンであるジャスモン酸を介した情報伝達系によりタバコアルカロイド生合成遺伝子群が根の先端部分で活性化される。根端で合成されたニコチンの大部分は導管を伝わって地上部へ転流され、全草に蓄積する。これまでにJAシグナルがCOI1受容体、JAZ転写抑制因子、MYC2転写因子を介する伝達系に依存することや低ニコチン品種の原因遺伝子座 *NIC2* に存在する複数のERF型転写因子が既知の全構造遺伝子をコントロールするマスター遺伝子(*NIC2*-locus *ERF*)であることなど、生合成遺伝子の発現制御に関する知見を得てきた。

二次代謝の制御遺伝子としてRとC1遺伝子などが植物色素アントシアニンを含むフラボノイド生合成系に共通して働くことが知られている。一方、ニコチンを含むアルカロイドは色素のように形質を簡便に判別で

きないことなどから、変異体とその原因遺伝子の同定は困難だった。低ニコチンタバコ変異株の原因遺伝子として、植物体内でアルカロイド量を実際に決めている因子が同定された意義は大きい。特に、インドールアルカロイド生合成や抗マラリア薬アルテミシン生合成を制御する転写因子とタバコ *NIC2*-locus ERF が構造的に相同であることから、類縁因子が広く植物に利用されている可能性がある。

## 2. 研究の目的

タバコアルカロイド生合成系を制御するマスター転写因子 ERF189 が上流のジャスモン酸情報伝達系によってどのように制御されているのか? また、ERF189のDNA結合配列特性は相同因子とどう違い、その違いはどのようにして生じたのか? 以上のような問題の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

アグロバクテリウムを用いてタバコへの遺伝子導入を行った。転写産物量はqRT-PCRによって測定した。常法により遺伝子コンストラクトの作成、組換えタンパク質の大腸菌における発現と精製を行った。EMSA法を用いてDNA結合特異性を解析した。

## 4. 研究成果

### MYC2型bHLH転写因子によるタバコアルカロイド制御メカニズムの解明

高等植物は普遍的なコアとなるジャスモン酸シグナル経路を持っている。ジャスモン酸非存在下ではbHLHファミリーのMYC2転写因子に結合したJAZリプレッサーがコリプレッサーを含む複合体を標的遺伝子近傍にリクルートする。この複合体はクロマチン構造変換を促し、標的遺伝子の発現を積極的に抑制すると考えられている。活性型ジャスモン酸であるジャスモン酸イソロ

イシンがCO11 に結合すると、JAZ がニコチン化を受けた後に分解される。そして、JAZ から解放されたMYC2 は転写活性化因子として機能することが可能となる。

タバコにもジャスモン酸伝達系を構成するCO11, JAZ, MYC2 は保存されており、いずれの機能を阻害してもニコチンのジャスモン酸応答性は失われる(Shoji et al. 2008, Todd et al. 2010, Shoji & Hashimoto 2011)。特に転写因子であるMYC2 はニコチン生合成遺伝子プロモーター内のG box に結合して直接に転写活性化するばかりでなく、ニコチン制御に関わるERF の発現も直接または間接に制御することが示された(Shoji & Hashimoto 2011)。クレード2 のERF はいずれもジャスモン酸応答性を示すが(Shoji et al. 2010)、その応答性はMYC2 に依存するものと考えられる。

#### タバコアルカロイド制御転写因子のDNA結合特異性を決定する構造学的基盤の解明と分子進化に関する考察

転写因子はそれぞれ特有のDNA結合ドメイン(DBD)を介して特異的配列を認識する。シロイヌナズナAtERF1はGCCを含む配列を連続する3つのβ鎖によって認識しているのに対して、同じサブグループに属するタバコERF189やニチニチソウORCA3は類似するが異なる配列を認識する。本研究では、これら同種の転写因子がDNA結合特異性をどのように多様化させ、それぞれの植物系統で異なる防御代謝を制御するに至ったのかを解明した。DBDのアミノ酸置換変異解析の結果、2つの異なるDNA-タンパク質相互作用が認識の配列特異性と結合親和性に働くことが推定された。1番目のβ鎖内のよく保存されたArgがLysに置換されたERF189ではGCC配列の2番目のGC対との相互作用が緩慢になっていた。一方、ORCA3では最初の2つのβ鎖にある塩基性アミノ酸の数が増えていることで陰性に荷電したDNAのリン酸バックボーンへの結合が増し、より多くのGCC様配列を認識できるようになったことが推定され

た。対象とした同種のERF転写因子は比較的小数のアミノ酸置換変異によってDNA結合特異性を多様化されてきたことが考察された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

Maliwan N, Kato K, Shoji T, Hashimoto T\* (2014) Molecular evolution of *N*-methylputrescine oxidase. *Plant Cell Physiol.* 55: 436-444. 査読有り

Shoji T\*, Mishima M Hashimoto T (2013) Divergent DNA-binding specificities of a group of ETHYLENE RESPONSE FACTOR transcription factors involved in plant defense. *Plant Physiol.* 162; 977-990. 査読有り

Shoji T & Hashimoto T (2013) Smoking out the masters; transcriptional regulators for nicotine biosynthesis in tobacco. *Plant Biotechnol.* 30: 217-224. 査読有り

Pakdeechanuan P, Teoh S, Shoji T, Hashimoto T\* (2012) Non-functionalization of two CYP82E nicotine *N*-demethylase genes abolishes nornicotine formation in *Nicotiana langsdorffii*. *Plant Cell Physiol.* 12: 2038-2046. 査読有り

Pakdeechanuan P, Shoji T, Hashimoto T\* (2012) Root-to-shoot translocation of alkaloids is dominantly suppressed in *Nicotiana alata*. *Plant Cell Physiol.* 53; 1247-1254. 査読有り

Shoji T\* & Hashimoto T\* (2012) DNA binding and transcriptional activation properties of tobacco

NIC2-locus ERF189 and related proteins. *Plant Biotechnol.* 29; 3542-3545. 査読有り

庄司翼、橋本隆 (2011) ニコチン生合成のマスター転写因子 *化学と生物* 11: 778-783. 査読有り

庄司翼、橋本隆 (2011) ニコチン生合成のマスター遺伝子: 低ニコチン変異体からのアプローチ *BSJ-Review* 2: 30-37. 査読なし

[学会発表](計 13 件)

加藤啓太、庄司翼、土反伸和、橋本隆  
タバコ Nicotine Uptake Permease transporter の機能解析 2013 年度日本植物生理学会 2014 年 3 月 23 日 富山市

庄司翼、橋本隆  
Salt-induced expression of NICOTINE2-locus genes encoding ETHYLENE RESPONSE FACTOR family transcription factors in tobacco 2013 年度日本植物生理学会 2014 年 3 月 23 日 富山市

Maliwan Naconsie、加藤啓太、庄司翼、橋本隆

アミン酸化酵素 MP01 と DAO(MP02)の機能と分子進化 2013 年度日本植物細胞分子生物学会 2013 年 9 月 8 日 札幌市

Maliwan Naconsie、庄司翼、橋本隆  
Characterization of tobacco MP02 reveals the function in polyamine catabolism, rather than nicotine biosynthesis by its homolog MP01 2013 年度日本植物生理学会 2013 年 3

月 22 日 岡山市

加藤啓太、庄司翼、土反伸和、橋本隆  
Cross-talk between JA and auxin in nicotine metabolism in tobacco 2012 年度日本植物生理学会 2013 年 3 月 22 日 岡山市

庄司翼、西川渉太、中林亮、鈴木実、河本晃一、野中聡子、松倉千昭、斉藤和季、橋本隆  
トマト NIC2 型転写因子はどの代謝経路を標的とするのか? 2012 年度日本植物生理学会 2013 年 3 月 22 日 岡山市

Seddon Teoh, Pathaalaporn Packdeenacaun, 庄司翼、橋本隆  
Inactivation of two CYP82E nicotine N-demethylase genes abolishes nornicotine formation in *Nicotiana glauca* 2012 年度日本植物細胞分子生物学会 2012 年 8 月 4 日 生駒市

加藤啓太、庄司翼、土反伸和、橋本隆  
タバコ植物における Purine Permease Like transporter の機能解析 2012 年度日本植物細胞分子生物学会 2012 年 8 月 4 日 生駒市

庄司翼、橋本隆  
化学防御に関わる ERF 転写因子の進化 2012 年度日本植物細胞分子生物学会 2012 年 8 月 4 日 生駒市

庄司翼  
タバコのニコチン蓄積と発現制御に関する研究(受賞講演) 2012 年度日本植物細胞分子生物学会 2012 年 8 月 4 日 生駒市

庄司翼  
NIC2 型転写因子のトマトにおける標的代謝系の検索 2012 年度日本植

物細胞分子生物学会 2012 年 8 月 4 日  
生駒市

Shoji T Regulation of alkaloid biosynthesis: evolutionary perspectives 奈良先端未来開拓コロキウム(Deep impact of plant metabolism: going beyond diversity) 2013 年 11 月 22 日 生駒市

Shoji T Jasmonate-induced nicotine biosynthesis in tobacco Workshop sponsored by IPSR "Jasmatate signaling and plant defense against insect herbivores" 2012 年 2 月 11 日 倉敷市

[ 図書 ] ( 計 4 件 )

Shoji T (2014) ATP-binding cassette and multidrug and toxic compound extrusion transporters in plants: a common theme among diverse detoxification mechanisms. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 309: 309-346.

Shoji T & Hashimoto T (2014) Polyamine-derived alkaloids in plants: molecular elucidation of biosynthesis. In *Polyamines, a universal molecular nexus for growth, survival and specialized metabolism*, Springer, 印刷中

Shoji T & Hashimoto T (2013) Biosynthesis and regulation of tobacco alkaloids In *Herbaceous Plants: Cultivation Methods, Grazing*

*and Enviromental Impacts*, Nova Biomedical, pp37-67

Shoji T & Hashimoto T (2012) Jasmonate-responsive transcription factors: new tools for metabolic engineering and gene discovery. In *Biotechnology for Medicinal Plants: Micropropagation and Improvement*, Springer pp345-357.

[ 産業財産権 ]  
出願状況 ( 計 0 件 )

取得状況 ( 計 0 件 )

[ その他 ]  
ホームページ等  
[Http://bsw3.naist.jp/hashimoto/Member/Shoji.html](http://bsw3.naist.jp/hashimoto/Member/Shoji.html)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

庄司 翼 (SHOJI TSUBASA)  
奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス研究科 助教  
研究者番号 : 40343272