

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23780109

研究課題名（和文）新奇トランスポーターを介したニコチン生合成中間体の細胞内輸送と生理機能の解明

研究課題名（英文）Functional analysis of novel transporter involved in intra-cellular transport of nicotine biosynthetic intermediates.

研究代表者

士反 伸和 (SHITAN NOBUKAZU)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：20547880

研究成果の概要（和文）：植物は多様な生理活性物質を生産するが、その過程で最終産物や生合成中間体が組織間や細胞内の小器官間をダイナミックに移動している。本研究では、タバコ植物およびニコチン生産をモデルに、細胞内での物質輸送に関わると予想される輸送体 T408 の形質転換体を作成し、その輸送能ならびにニコチン生産量の検討を行った。培養細胞において T408 の発現を変化させたところ、ニコチン生産量の有意な増加が観察され、細胞内輸送を制御することにより代謝産物の生産量を変化させられる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Plants produce a large number of secondary metabolites. Some metabolites are often highly accumulated in particular organs of medicinal plants. The movement of biosynthetic intermediates within the organelles in a cell is also suggested. However, little is known how metabolites are transported across membranes and how these movements are involved in metabolite production. Tobacco T408 is a plastid-localized transporter which might regulate intermediate transport in a cell. We altered expression level of T408 by producing stable transformants of tobacco plants and cultured cells. Transgenic cultured cells produced higher level of alkaloids than control cells under jasmonate treatment. These data suggested that productions of secondary metabolites are increased by regulating the expression level of specific transporter in a cell.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：植物生化学

科研費の分科・細目：農芸化学・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

植物は20万種類を超える二次代謝産物を生産する。医薬品原料などの有用性から生合成酵素や培養細胞に関する研究が進められ、生合成酵素の過剰発現植物などが作出されてきたが、植物での大量生産に至った例は少ない。これまでの研究から、二次代謝産物は最終産物のみならず生合成中間体までも

が器官間、組織間、細胞内オルガネラ間をダイナミックに移動することが明らかとなってきた。そのため生合成酵素だけでなく、代謝産物の空間的な動態をも制御することが植物を用いた有用物質生産には必要であるが、その輸送機構はほとんどわかっていない。

申請者はタバコおよびニコチンをモデルとして、この輸送機構を解明してきた。タバ

コにおいて生合成されたニコチンは、根から地上部に輸送されて葉の液胞に高蓄積される(転流)。ベルギーのグループは、タバコ BY-2 培養細胞を用いて、植物ホルモン・ジャスモン酸でニコチン生産を誘導した際に発現誘導される遺伝子を解析したが、申請者はその中に、ニコチン生合成酵素と同調して発現するトランスポーターとして MATE (Multidrug and toxic compound extrusion) 型トランスポーター Nt-JAT1 並びに NCS1 型トランスポーター T408 が存在することを見出した。さらに 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 は植物体におけるニコチン転流に寄与することを明らかとしてきた。さらに申請者は細胞内での輸送の解析に着手してきた。ニコチンは、プラスチドでアスパラギン酸を出発物質としてキノリン酸まで生合成され、細胞質に輸送されたキノリン酸から NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) を経て、NAD の分解産物であるニコチン酸を基質に生合成される。また、細胞質で生合成された NAD はプラスチドへ輸送されプラスチド NAD の供給源になっているが、キノリン酸や NAD の細胞内輸送に関わるトランスポーターはわかっていない。申請者は上記トランスクリプトームで見出したトランスポーター T408 を解析し、本タンパク質が 1) 根、茎、葉全ての組織で発現し、葉において発現が高いこと 2) 根や培養細胞などでニコチン生産誘導時に強く発現誘導されること、3) プラスチドに局在すること、4) NCS1 (Nucleobase Cation Symporter1) ファミリーに属すること、などを明らかとしてきた。バクテリアの NCS1 は核酸分解産物を取り込みリサイクリング (Salvage pathway) による核酸の供給に関わることも報告されており、申請者は、「T408 がプラスチドへ NAD の分解産物を輸送しリサイクリング経路に供することで、葉においては特に光合成に必要なプラスチド NAD 及び NADP の供給に寄与すること、根においてはニコチン生産へ代謝経路が流れた際にプラスチド NAD 供給量を補償し安定したニコチン生産に寄与する」という仮説を打ち立てた。

2. 研究の目的

本研究では、T408 の機能を明らかとするために、

- (1) T408 の発現を変化させた形質転換植物・培養細胞の作出と発現変化の解析
- (2) ヘテロ発現系として昆虫細胞、酵母細胞での発現

胞での発現

(3) 形質転換体を用いた基質の検討とニコチンなどアルカロイド生産能の解析を行うこととした。これら解析から、ニコチン生産における T408 の細胞内輸送機構とその生理的役割を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 形質転換植物・培養細胞の作出と発現解析

T408 の過剰発現、発現抑制、GFP 融合タンパク質発現用のコンストラクトを作出した。このコンストラクトをアグロバクテリウムに導入し、タバコ植物体および BY-2 培養細胞に形質転換を行った。得られたシュートまたは培養細胞を、選抜マーカーとしてハイグロマイシンを含む培地で培養し、生育の良い植物個体または培養細胞を複数得た。

得られた植物体ならびに培養細胞から、破碎バッファーを用いて細胞を破碎した上で膜タンパク質を抽出した。このタンパク質濃度をブラッドフォード法で測定した上で、SDS-PAGE を行い、T408 特異的抗体または GFP 抗体を用いたウェスタンブロットにより期待した発現変化ができていないかを確認した。

(2) ヘテロ発現系として昆虫細胞、酵母細胞での発現

T408 を高発現させるための昆虫細胞用ウイルス、酵母発現用ベクターを作成した。昆虫細胞としては Sf9 を使用し、細胞にウイルスを感染させた。感染させてから 48 時間後に細胞とウイルスを回収した。ウイルスは 4℃ で保存し、大量発現に備えて十分量を確保できるようにした。酵母における発現においても、出芽酵母に T408 発現用ベクターを導入し、選抜培地で生育してきた細胞を解析に用いた。

昆虫細胞からは PBS (1% triton) バッファーを用いてタンパク質を抽出し、同様に T408 を発現できているかを評価した。

(3) 形質転換体を用いた基質の検討とニコチンなどアルカロイド生産能の解析

形質転換した植物体 (T0 世代) から種子を得、得られた世代 (T1 世代) の植物を用いて、輸送基質の検討を行った。研究過程で、2012 年にシロイヌナズナの NCS1 トランスポーターの論文において (Witz et al., 2012 Plant Cell)、ウラシルなど核酸関連の化合物を輸送することが報告された。そこで本研究では同様の輸送機能をタバコ NCS1 が有しているかを明らかとするため、細胞毒性を有する 5-フルオロウラシル (5FU) を含む培地で植物を生育させ、根の伸長や新鮮重を測定することで輸送基質とするか試みることにした。ま

タバコ植物に対してどの程度の 5FU 濃度が生育阻害を示すかを明らかにするため、複数の濃度で 5FU を含有する培地でタバコ幼植物体を生育させ、その生育程度を定量評価した。比較的到低濃度の 5FU 培地を用いて、コントロール植物と T408-GFP 発現植物を生育させ、その根の伸長を調べた。また、植物においては、細胞内に取り込まれた 5FU の抽出方法と HPLC での定量方法が確立されていなかったため、動物細胞での論文を参考にしつつ、各種有機溶媒による抽出、また HPLC による検出を試みた。

昆虫細胞においても、5FU 含有培地で培養を行い、T408 による取込み能を検討したが、細胞量と検出感度の問題から定量が行えなかったため、酵母の細胞輸送系を主に用いて解析することとした。一晩生育させ、再度にベクターコントロール株ならびに T408 発現酵母株とで生育を揃えた後、5FU を 50 μM の濃度で添加し、4 時間後における細胞内の 5FU 濃度の測定を試みた。酵母細胞からの 5FU 抽出条件と HPLC による定量条件の検討も行った。

T408 がアルカロイド生産に果たす役割の解明としては、BY-2 培養細胞を中心に行った。得られた形質転換培養細胞を液体培地で生育させ、ジャスモン酸で処理した 4 8 時間後に細胞をサンプリングした。アルカロイドを抽出した後に HPLC を行い、ニコチンなど各種アルカロイドの定量と T408 などタンパク質の発現を比較し、その発現量とアルカロイド生産との関連を調べた。

4. 研究成果

(1) 形質転換植物・培養細胞の作出と発現解析

過剰発現、発現抑制、GFP 融合タンパク質のコンストラクトを植物および培養細胞に形質転換した。植物体として得られた T0 世代の発現解析をウェスタンブロットで行い、過剰発現株として 3 ライン、発現抑制株として 4 ライン、GFP 融合タンパク質の発現株として 4 ラインを得ることができた。さらにそれら植物体より種子を得、次世代 (T1 世代) における発現を解析した。その結果、特に過剰発現株と GFP 融合タンパク質の発現株において、引き続いて発現変化していることが確認できた。培養細胞についても形質転換を行い、選抜培地で複数のラインを得ることができた。それらについてもウェスタンブロットで解析したところ、過剰発現株として 3 ライン、発現抑制株として 6 ライン、GFP 融合タンパク質の発現株として 3 ラインを得ることに成功した。

(2) ヘテロ発現系として昆虫細胞、酵母細胞での発現

T408 の機能解析を目的として、ヘテロな発現系である昆虫細胞、酵母細胞での T408 発現を試みた。

昆虫細胞においては、Sf9 細胞を宿主として T408 ウィルスの感染を行った。複数回のウィルス感染を行い、細胞からタンパク質を抽出してウェスタンブロットを行ったところ、明確に T408 抗体で一本のバンドを得ることができた。このことから、昆虫細胞において T408 を比較的到高発現させることができたと考えられる。さらに 5FU を用いて細胞輸送実験を行ったが、細胞量と検出感度の問題から輸送実験は断念した。

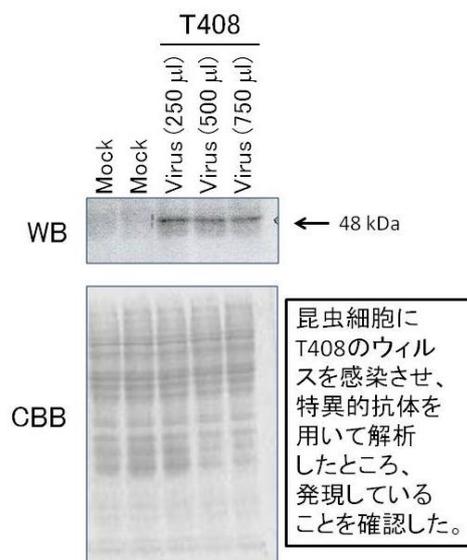


図 1 昆虫細胞における T408 発現の確認

酵母細胞においては、T408、T408-GFP 発現用のベクターを導入し、形質転換体を得た。ウェスタンブロットにより、これらタンパク質が発現していることを確認した。

(3) 形質転換体を用いた基質の検討とニコチンなどアルカロイド生産能の解析

T408 がシロイヌナズナの NCS1 トランスポーター同様に核酸に関連した化合物の輸送能を有しているか明らかにするため、T408 を発現する酵母での細胞輸送実験を行った。酵母における 5FU 処理濃度の最適値や処理時間の検討と共に、細胞からの抽出に適した溶媒条件などを試験した。それら解析から、効率的な 5FU の抽出および検出条件をほぼ確立することができた。

形質転換植物を用いた実験においては、コントロール株と形質転換株とを用いて、根の伸長や地上部の新鮮重を定量比較することを目指した。まず 5FU の濃度を変えてタバコ植物への阻害程度を比較したところ、10 μM 以上から根の生育は著しく阻害されることが明らかとなった (図 2)。

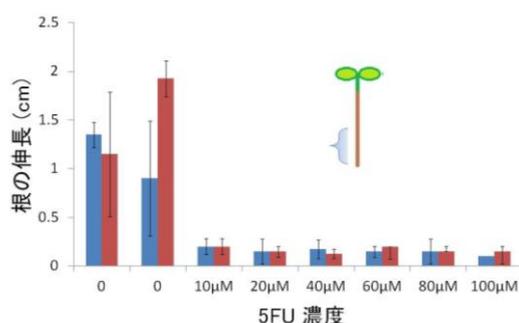


図2 5FUによる根の伸長阻害の検討
(コントロール2ラインでの解析)

そのため、根の伸長実験は10 μM以下を基準に行った。コントロール株とT408-GFP過剰発現株とで根の伸長と地上部の新鮮重を検討したが、有意な差は観察されなかった。GFPを付加したT408が機能を保持しているかなどさらに検討する必要があるが、過剰発現によっては5FU耐性という表現系は示さない可能性が考えられた。今後は、細胞内に取り込まれた5FU含量やクロロフィル含量の定量を行うことで5FUの取り込みや細胞への影響を評価する。

T408の発現を変化させた培養細胞においては、アルカロイド含量とT408発現との相関を検討した。T408を発現抑制した細胞とコントロール細胞をジャスモン酸処理し、48時間後のアルカロイド含量を定量したところ、T408発現抑制株でのニコチン含量が有意に増加していることが明らかとなった。本結果より、細胞内で核酸に関連した化合物の色素体(葉緑体)への輸送が、アルカロイドの生合成と関わるということが強く示唆された。

以上の結果ならびにシロイヌナズナにおけるNCS1の役割より、T408が細胞内で核酸に関連した化合物を色素体(葉緑体)に運んでいる可能性が考えられる。特に、その発現量を培養細胞で変えた場合にアルカロイド生産が変わる点は興味深い。これまでに報告されたニコチン生合成経路と、核酸の生合成経路とでは、一部においてアミノ酸など同じ化合物が用いられている。これら化合物を一次代謝系と二次代謝系のどちらに優先的に用いるか、細胞内での空間的な存在部位を制御することで、より効率的なアルカロイド生産へと導いていく可能性が示されたと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

(1) Shitan N., Sugiyama A., Yazaki K.
Functional Analysis of Jasmonic

Acid-Responsive Secondary Metabolite Transporters

Methods in Molecular Biology

査読有、印刷中

[学会発表] (計3件)

(1) 土反伸和、南翔太、宮坂萌菜、林田南帆、Alain Goossens、Dirk Inze、守安正恭、矢崎一史

タバコ NCS1 型トランスポーターNt-T408 のクローニングと機能解析

第54回日本植物生理学会年会

岡山、2013年3月23日

(2) 土反伸和、矢崎一史、杉山暁史

アルカロイド輸送能の改変植物を用いた環境適応機構の解明と物質生産

第223回生存圏シンポジウム、

京都、2013年3月13日

(3) 塩見裕子、南翔太、横田美咲、土反伸和、

江口咲百合、Alain Goossens、Dirk Inzé、

矢崎一史、守安正恭

タバコ新規トランスポーターNt-T408 のクローニング及び発現解析

第7回トランスポーター研究会

京都、2012年6月9日

[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・講師

研究者番号：20547880

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし