

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24710235

研究課題名(和文)ポストゲノム解析の統合による、植物液胞新規代謝機能の解明

研究課題名(英文) Study on new metabolisms in plant vacuole by integration of the post-genome analysis

研究代表者

大西 美輪(Ohnishi, Miwa)

神戸大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10437501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：液胞は植物細胞特有の細胞内小器官であり、植物細胞体積の約8割を占め、さまざまな物質を蓄積していることが知られている。本研究では、薬用植物として著名なニチニチソウの液胞に蓄積するアルカロイドの生合成に着目した。既存研究から、アルカロイドは、植物の様々な組織や細胞小器官を経て合成されることが示されていた。研究代表者らは、実際に蓄積するアルカロイドやその中間体の分布を、新技術を用いて解析した結果、これまでの報告とは異なるアルカロイドの分布を確認することができ、ニチニチソウ液胞における新規の代謝機能の存在が示唆された。今後、効率のよいアルカロイド生合成システムの開発につなげたい。

研究成果の概要(英文)：Vacuole is an important organelle in the plant cell. It occupies about 80% of the plant cell volume. It is known that a variety of substances are accumulated in the vacuole. In this study, we focused on the biosynthesis of alkaloids that are accumulated in the vacuole of *Catharanthus roseus*, this is one of famous medical plants. From previous studies, alkaloids have been shown to be synthesized through various tissues and organelles. We analyzed the localization of alkaloids and their intermediates by using new technology. There are some different results from previous reports. These results suggest the existence of novel metabolic functions in the vacuole of *Catharanthus roseus*. In the future, we would like to apply the present new knowledge to the development of efficient alkaloid biosynthesis system.

研究分野：植物生理学

キーワード：液胞 ニチニチソウ 二次代謝 ポストゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

液胞は植物細胞特有のオルガネラで、植物の生活環を通して、多彩な働きをしていることが知られている。種子ではタンパク質を貯蔵する器官として存在し、発芽に必要なエネルギーを供給している。細胞分裂後、成熟した細胞において液胞は細胞体積の約 8 割を占めることから、植物全体の成長にも大きく貢献している。また、動くことができない植物は、さまざまな環境ストレスを回避するため、細胞内に取り込まれた有害な塩や重金属、不要タンパク質を液胞内に隔離・分解したり、フラボノイドやアルカロイドなどの防御物質を液胞に蓄積することで、紫外線や捕食動物などから身を守っている。植物の成長にとって重要な糖や有機酸などを貯蔵することで、必要時には、液胞から細胞質に、または次世代への供給へとつながる。これらの機能から、液胞にはさまざまな物質が蓄積していることが考えられ、個々の物質について存在が報告されてきた。二次代謝産物も液胞に蓄積される重要な化合物である。

これまで細胞質の恒常性を維持するため、物質の貯蔵、分解の器官と考えられていた液胞であるが、近年、液胞は物質の生合成に関わる反応の場であることが報告されてきている。研究代表者らも、モデル植物であるシロイヌナズナの液胞のプロテオーム解析から (Shimaoka et al.2004) 貯蔵、分解だけでなく、酸化還元や、物質の生合成に関わる酵素群を液胞に見出している。研究代表者は、これまでに確立した液胞の単離技術と、プロテオーム解析、メタボローム解析といったポストゲノム解析を統合させることで、液胞の新たな機能を解明することができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

ニチニチソウ (*Catharanthus roseus*) は薬用成分である多彩なアルカロイドを生合成することが知られており、その生合成機構の多くが酵素・遺伝子レベルで明らかになっている。しかし、細胞内のどこで、その生合成機構が働いているかについては不明な点が多い。本研究では、二次代謝産物の蓄積場所として考えられる液胞に着目し、研究代表者の所属する研究室で開発されたインタクト液胞の単離技術に、メタボロミクス、プロテオミクスの手法を組み合わせることで、ニチニチソウ液胞の二次代謝に関わる酵素や基質の同定と、液胞の代謝新規機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

材料として、ニチニチソウ培養細胞と植物体を用いた。ニチニチソウ液胞の新規代謝機能を解明するため、ニチニチソウより液胞または細胞を単離して、ポストゲノム解析 (プロテオーム解析、メタボローム解析、トランスクリプトーム解析) 行なった。また、メタ

ボローム解析、トランスクリプトーム解析については、新技術を用いることで、液胞や細胞を単離することなく、オルガネラ、細胞、組織レベルで、代謝産物や酵素の局在を明らかにし、また二次代謝の生合成に関与する新規因子の探索を目指した。

4. 研究成果

平成 24 年度は、ニチニチソウの培養細胞の単離液胞を用いて、解析を進めていたが、用いた培養細胞系統において、アルカロイドの生合成能が安定しないことが判明した。そこで、ニチニチソウ植物体から培養細胞の再構築を行なった。

先行研究において、ニチニチソウのアルカロイド生合成に関与する酵素の発現解析から、アルカロイドはニチニチソウ葉において、いくつかの組織間を移動しながら、さらに細胞内のオルガネラ間の移動も経ながら合成されていることが推測された。最終的に合成されたアルカロイドは、異形細胞と呼ばれる特殊な細胞に蓄積すると考えられており、その異形細胞は UV 照射により、蛍光を発する。そこで、我々は、その蛍光と異形細胞特有の細胞サイズや細胞内構造といった特徴を利用し、蛍光セルソーター (FACS : (Fluorescence activated cell sorter)) を用いて、異形細胞を精度よく単離することに成功した。(図 1)

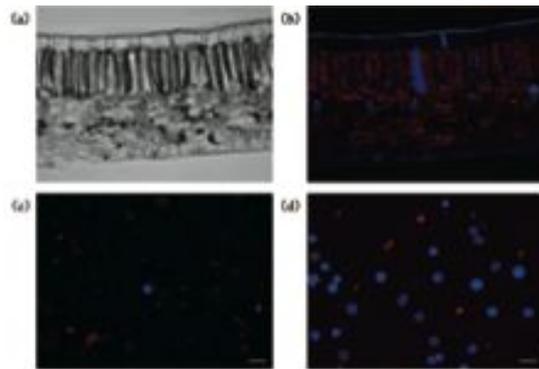


図 1 青く光る異形細胞と異形細胞プロトプラストの分離。ニチニチソウ葉の切片 (a)、UV で励起されて青く光る異形細胞 (b)、分離前のプロトプラスト (c)、FACS で分離・濃縮された異形細胞プロトプラスト (d)。

平成 25 年度は、単離した異形細胞を用いて、遺伝子発現解析を行なった結果、テルペノイドインドールアルカロイド (TIA) 合成経路の後半で働く酵素である D4H や PRX1 が、異形細胞において、高発現していることを確認した。また、新技術である一細胞質量分析法を用いて、茎の異形細胞、乳管細胞、表皮細胞の代謝産物を分析した結果、異形細胞において、複数の TIA が検出された (図 2)。

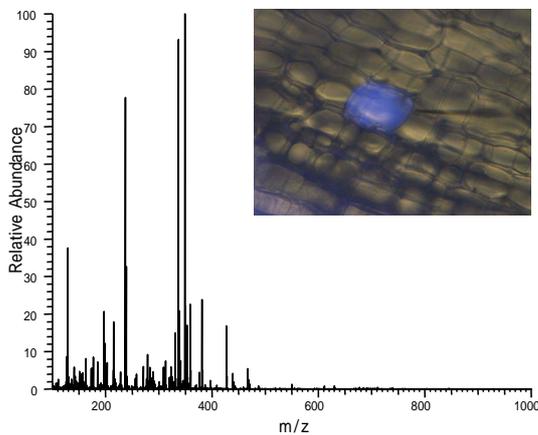


図2 一細胞質量分析法による異常細胞のメタボローム解析
写真：青く光るニチニチソウ茎の異常細胞にキャピラリーを突き刺して、細胞内液を回収する。
グラフ：異常細胞で検出されたマススペクトル。

さらに、組織における TIA の分布を確認するため、質量顕微鏡を用いた解析を行なった(図3)。ニチニチソウ茎切片において、複数の TIA について、組織ごとの分布を確認することができた。

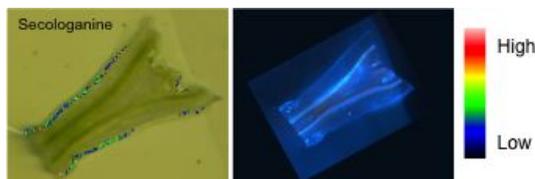


図3 質量顕微鏡によるニチニチソウ茎切片における TIA の分布解析
Secologanin は表皮細胞に局在していた。
右下：UV 励起で青色蛍光を発する異常細胞。

異常細胞の特徴と高分解能の質量分析を用いた新技術との組み合わせにより、TIA の網羅的解析が可能となり、これまでに報告されている遺伝子発現解析による TIA 合成経路の解明に対して、組織レベル、細胞(オルガネラ)レベルでの各 TIA の局在から、TIA 合成経路の解析を進めた。

単離した異常細胞を用いても、メタボローム解析、プロテオーム解析を行なった。

平成26年度は、一細胞トランスクリプトーム解析の技術を利用して、異型細胞や皮層細胞を含む微小組織からの RNA の抽出、cDNA の合成を行い、RNAseq を行うことで、組織レベルでの遺伝子発現量を比較することを試みた。

現在、RNAseq 解析を進めており、一細胞質量分析法や質量顕微鏡を利用して、ポストゲノム解析を行なった結果、既存研究とは異なる代謝物質の分布が確認されており、特に異常細胞の液胞において、新規の代謝機能の存在が示唆される。今後さらに詳細な解析を進めることで、ニチニチソウ異常細胞の液胞にアルカロイドが蓄積される過程を明らかに

し、効率のよいアルカロイド生合成システムの開発につなげたいと考えている。

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 9 件)

Ohnishi M., Kadohama N., Suzuki Y., Kajiyama T., Shichijo C., Ishizaki K., Fukaki H., Iida H., Kambara H., Mimura T. Involvement of Ca^{2+} in vacuole degradation caused by a rapid temperature decrease in *Saintpaulia palisade* cells: A case of gene expression analysis in a specialized small tissue. (2015) *Plant & Cell Physiology* in press. 査読有

Okazaki Y., Nishizawa T., Takano K., Ohnishi M., Mimura T., Saito K. (2015) Induced accumulation of glucuronosyldiacylglycerol in tomato and soybean under phosphorus deprivation. *Physiologia Plantarum* in press. 査読有

Anegawa A., Ohnishi M., Takagi D., Miyake C., Shichijo C., Ishizaki K., Fukaki H., Mimura T. (2015) Altered levels of primary metabolites in response to exogenous indole-3-acetic acid in wild type and auxin signaling mutants of *Arabidopsis thaliana*: A capillary electrophoresis-mass spectrometry analysis. *Plant Biotechnology Plant Biotechnology* 32(1) : 65-79. 査読有

Kanno S., Kurita Y., Ohnishi M., Mimura, T. Autoradiography of Pi Distribution in Barley Seedlings. *Bio-protocol* (2014) 4(13): e1175. <http://www.bio-protocol.org/e1175> 査読有

Kurita Y., Kanno S., Ohnishi M., Mimura, T. Extraction of Ions from Leaf Sections. *Bio-protocol* (2014) 4(13): e1174. <http://www.bio-protocol.org/e1174> 査読有

Kurita Y., Baba K., Ohnishi M., Anegawa A., Shichijo C., Kosuge K., Fukaki H., Mimura T. (2014) Establishment of a shortened annual cycle system; a tool for the analysis of annual re-translocation of phosphorus in the deciduous woody

plant (*Populus alba* L.). Journal of Plant Research 127: 545-551. 査読有

Yoshida K., Ohnishi M., Fukao Y., Okazaki Y., Fujiwara M., Song C., Nakanishi Y., Saito K., Shimmen T., Suzaki T., Hayashi F., Fukaki H., Maeshima M., Mimura T. (2013) Studies on vacuolar membrane microdomains isolated from Arabidopsis suspension-cultured cells: Local distribution of vacuolar membrane proteins. Plant & Cell Physiology 54 (10): 1571-1584. 査読有

Nagai M., Ohnishi M., Uehara T., Yamagami M., Miura E., Kamakura M., Kitamura A., Sakaguchi S., Sakamoto W., Shimmen T., Fukaki H., Reid R.J., Furukawa A., Mimura T. (2013) Ion gradients in xylem exudate and guttation fluid related to tissue ion levels along primary leaves of barley. Plant Cell & Environment 36 (10): 1826-1837. 査読有

Kadohama N., Goh T., Ohnishi M., Fukaki H., Mimura T., Suzuki Y. (2013) Sudden collapse of vacuoles in Saintpaulia sp. palisade cells induced by a rapid temperature decrease. PLoS One 8 (2): e57259. 査読有

[学会発表](計 15 件)

山本 浩太郎、大西 美輪、姉川 彩、高橋 勝利、水野 初、七條 千津子、石崎 公庸、山崎 真巳、深城 英弘、升島 努、三村 徹郎：ニチニチソウ茎組織における Terpenoid indole alkaloid の分布解析、日本植物生理学会、2015.3.16、東京農業大学

大西 美輪、角浜 憲明、鈴木 祥弘、梶山 智晴、七條 千津子、石崎 公庸、深城 英弘、飯田 秀利、神原 秀記、三村 徹郎：急激な温度変化で生じるセントポーリア葉の傷害誘導メカニズム、日本植物生理学会、2015.3.16、東京農業大学

Yamamoto K., Ohnishi M., Anegawa A., Takahashi K., Mizuno H., Shichijo C., Ishizaki K., Yamazaki M., Fukaki H., Masujima T., Mimura T.: Cell-specific localization of terpenoid indole alkaloids revealed by new metabolome analyses., The 2nd

International Symposium on Plant Environmental Sensing., 2015.3.13, AIST, Odaiba.

Ohnishi M., Kadohama N., Suzuki Y., Kajiyama T., Shichijo C., Ishizaki K., Fukaki H., Iida H., Kambara H., Mimura T.: Mechanism of cell injury induced by a rapid temperature decrease in Saintpaulia sp. Leaves., The 2nd International Symposium on Plant Environmental Sensing., 2015.3.13, AIST, Odaiba, Tokyo

Yamamoto K., Ohnishi M., Anegawa A., Takahashi K., Iwasaki T., Mizuno H., Yamazaki M., Masujima T., Mimura T.: Novel metabolome analyses of terpenoid indole alkaloids synthesis in Catharanthus roseus., THE 38th NAITO CONFERENCE ON Molecule-based biological systems., 2014.10.7, CHATERAISE Cateaux Kingdom SAPPORO, Hokkaido

大西 美輪、角浜 憲明、高橋 勝利、七條 千津子、石崎 公庸、深城 英弘、鈴木 祥弘、三村 徹郎：急激な温度変化で生じるセントポーリア葉の傷害誘導メカニズム、日本植物学会、2014.9.12. 明治大学生田キャンパス（神奈川県）

大西 美輪、角浜 憲明、高橋 大輔、七條 千津子、石崎 公庸、深城 英弘、上村 松生、鈴木 祥弘、三村 徹郎：急激な温度変化で生じるセントポーリア葉の傷害誘導メカニズム、日本植物生理学会、2014.3.18、富山大学（富山県）

山本 浩太郎、大西 美輪、姉川 彩、高橋 勝利、岩崎 哲史、水野 初、七條 千津子、石崎 公庸、山崎 真巳、深城 英弘、升島 努、三村 徹郎：ニチニチソウ組織における Terpenoid indole alkaloid 合成機構の解明、日本植物生理学会、2014.3.18、富山大学（富山県）

大西 美輪、角浜 憲明、七條 千津子、石崎 公庸、深城 英弘、鈴木 祥弘、三村 徹郎：急激な温度変化で生じるセントポーリア葉の傷害誘導メカニズム、日本植物学会、2013.9.13、北海道大学（北海道）

山本 浩太郎、大西 美輪、姉川 彩、高橋 勝利、岩崎 哲史、水野 初、七條 千津子、石崎 公庸、山崎 真巳、深城 英弘、升島 努、三村 徹郎：ニチニチソウ葉組織の単一細胞種を

用いた二次代謝機構の解析、日本植物学会、2013. 9.13、北海道大学（北海道）

山本 浩太郎、大西 美輪、姉川彩、高橋勝利、岩崎哲史、七條千津子、山崎真巳、深城英弘、三村徹郎：ニチニチソウ細胞における二次代謝機能の解析、日本植物生理学会、2013.3.23、岡山大学（岡山県）

山本 浩太郎、大西 美輪、姉川 彩、高橋 勝利、岩崎 哲史、七條 千津子、山崎 真巳、深城 英弘、三村 徹郎：二次代謝の理解から応用研究へ、若手フロンティア研究会 2012、2012.12.25、神戸大学（兵庫県）

Yamamoto K., Ohnishi M., Anegawa A., Takahashi K., Yamazaki M., Fukaki H., Mimura T.: Terpenoid indole alkaloids synthesis in *Catharanthus roseus*. *New Frontiers of Metabolism Research in Biomedical Sciences*, 2012.9.27, Tokyo

大西 美輪、姉川 彩、杉山 裕子、金谷 重彦、Patrick G. Hatcher、七條千津子、深城 英弘、三村 徹郎：植物液胞のポストゲノム解析、日本植物学会、2012.9.16、兵庫県立大学（兵庫県）

山本 浩太郎、大西 美輪、姉川 彩、七條 千津子、山崎 真巳、深城 英弘、三村 徹郎：ニチニチソウ細胞における二次代謝産物合成機構の解析、日本植物学会、2012.9.16、兵庫県立大学（兵庫県）

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 美輪 (OHNISHI, Miwa)
神戸大学・大学院理学研究科・特命助教
研究者番号：10437501

(2) 研究協力者

神戸大学
山本 浩太郎 (YAMAMOTO Kotaro)
姉川 彩 (ANEGAWA, Aya)
三村 徹郎 (MIMURA, Tetsuro)
深城 英弘 (FUKAKI, Hidehiro)
石崎 公庸 (ISHIZAKI, Kimitsune)
七條 千津子 (SHICHIJO, Chizuko)

村上 明男 (MURAKAMI, Akio)
理化学研究所
升島 努 (MASUJIMA, Tsutomu)
水野 初 (MIZUNO, Hajime)
産業技術総合研究所
高橋 勝利 (TAKAHASHI, Katsutoshi)
千葉大学
山崎 真己 (YAMAZAKI, Mami)