

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440144

研究課題名(和文)植物アルカロイド合成を制御する転写因子の機能解析

研究課題名(英文)Transcription factors regulating alkaloid biosynthesis in plants

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・准教授

研究者番号：40343272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物は生理活性を有するアルカロイドやテルペノイドなどの天然物を生合成・蓄積する。多種多様な天然物が特定の種や属など系統特異的に存在する。傷害ホルモンであるジャスモン酸により誘導されることから類推されるように、代謝物やその生合成経路・酵素の多様性とは対照的に、代謝系の制御は共通性の高い機構に依存している。

分子遺伝学的アプローチにより、経路や酵素が全く異なるニコチン(タバコ属)とステロイドアルカロイド(ナス属など)の合成系が、共通なJA応答性マスター転写因子により包括的に制御されることを解明した。

研究成果の概要(英文)：Steroidal glycoalkaloid (SGA) alpha-tomatine with anti-nutritional activity, accumulates in tomato. Tomato genes encoding Jasmonate-Responsive Ethylene Response Factors (JREs), mostly clustered on chromosome 1, were induced with methyl jasmonate treatment. Expression of SGA biosynthesis genes and accumulation of SGAs were markedly increased and decreased by overexpression and dominant suppression of JREs, respectively, implicating that JREs positively regulate SGA biosynthesis genes at transcript level. Transient transactivation assay in tomato fruits demonstrated that JREs activated the promoters of SGA biosynthetic DWF5 and GAME4 genes. The JRE-dependent activation of the promoters were clearly cancelled by mutations at JRE-binding sites found in proximal upstream regions of the genes. Putative JRE-binding elements predicted in promoter regions were found to be enriched significantly among a series of JRE-regulated genes.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：ステロイドアルカロイド トマト 転写因子

1. 研究開始当初の背景

移動することができない植物は、環境からの種々のストレスに常にさらされなければならない。昆虫などの動物による摂食は、植物の生存にとって大きな脅威である。摂食を防ぐために、植物は毒性二次代謝産物を合成、蓄積する能力を獲得してきた。特に自然環境に生育する野生種には毒性成分に富むものが多く、その蓄積の抑制は栽培化に必要であった。

虫害などの傷害刺激に対する応答を担うジャスモン酸(JA)は、数多くの二次代謝産物の合成を誘導することが知られている。実際、必ずしも防御物質としての機能が確かめられていない代謝産物であっても、そのJA誘導性から防御への関与が推定されていることが多い。JAシグナルの受容から遺伝子発現にいたるシグナル伝達経路は、いくつかのモデルケースで明らかにされ、すくなくともシグナル受容に近い上流部分はよく保存された共通因子によって担われていることが分かっている。一方、天然物化学を中心に明らかとされてきた多種多様な二次代謝産物は、特異的な種や属に分布する特徴を持つ。これら種々雑多な代謝系が、いずれもJA応答性を共通して示す仕組みはよく理解されていない。

ナス科植物には強い薬理活性を示すアルカロイド(“ナス科アルカロイド”と総称される)を蓄積するものが多い。ベラドンナ(*Atropa belladonna*)などのナス科薬用植物は、ブトレッシンに由来するトロパン系アルカロイドに富むことが知られている。ブトレッシンから始まる経路で合成されるアルカロイドには、タバコ(*Nicotiana tabacum*)において蓄積されるニコチンなども知られている。一方、含窒素ステロイド骨格をもつステロイド性グルコアルカロイド(steroidal glycoalkaloid; SGA)(但し、真性アルカロイドではない)も、トマト(*Solanum*

lycopersicum)やポテト(*Solanum tuberosum*)などナス科植物に比較的広く分布することが知られている

2. 研究の目的

ニコチンはタバコ属植物に特異的に分布しているのに対して、ERF189型転写因子は広く双子葉植物に存在している。ニコチンを合成しない植物種においてERF189型転写因子はいったい何をしているのだろうか? トマトを用いてこの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トマトを形質転換した。転写産物量はqRT-PCRにより測定した。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結合性を解析した。

4. 研究成果

タバコとともにナス科に属するトマトは、緑黄色野菜の代表格であり、植物科学上のモデル植物でもある。ニコチンを合成しないトマトにも7つのERF189型遺伝子JA-responsive ERF1(JRE1)-JRE7が存在する。タバコの場合と同様に、JRE1-JRE6遺伝子は、トマトの第1染色体上の特定領域にクラスター化し、いずれもJAにより転写誘導される。JRE3, JRE4, JRE6のドミナント抑制型を発現させた形質転換トマト毛状根において、多数のSGA生合成系遺伝子が発現抑制されていることが、cDNAマイクロアレイ解析などで明らかとなった。一方、JRE4を過剰発現させたトマト形質転換体においてSGA生合成系遺伝子の顕著な発現上昇が確かめられた。SGA生合成経路はメバロン酸経路によるイソプレノイド合成、コレステロール合成、アグリコンであるトマチジン合成、配糖化によるSGA合成の4段階から構成される。JREの機能改変は、4段階すべての酵素遺伝子の発現量を変化させるとともに、SGA及びその代謝中間体の蓄積も変化させる。JREはSGA

生合成系を正に制御する因子であると考えられる。

ERF189 型転写因子は JA 誘導性二次代謝産物の生合成制御を担っている。ナス科植物の例に加えて、ナス科以外の植物種においても ERF189 型転写因子の機能が解析されている。ニチニチソウ (*Catharanthus roseus*, キョウチクトウ科) では ERF189 型因子である ORCA2 及び ORCA3 がインドールアルカロイドの生合成を制御する (van der Fits & Memelink 2000)。また、クソニンジン (*Artemisia annua*, キク科) は、抗マラリア薬として利用されるセスキテルペンであるアルテミシンを生合成するが、その制御因子として同定された AaERF1 及び AaERF2 も ERF189 型因子である (Yu et al. 2011)。インドールアルカロイドとアルテミシンのいずれも JA 誘導性を示す点で、ニコチンや SGA と共通している。ERF189 型転写因子は、系統的に異なる複数の種において、経路が全く異なる生合成系を標的として制御していることが分かってきた。構造遺伝子は ERF189 型特異的なシス配列をそのプロモーター領域内に獲得することで、進化的に保存されている ERF189 型転写因子の制御下にリクルートされ、転写因子のもとで複数の構造遺伝子が共発現するレギュロンが確立されたと考えられる。

転写因子を用いることで生合成系遺伝子の効率的な同定が期待される。転写因子の変異や機能改変体では、低ニコチン変異体の場合のように、生合成系全体が影響を受けている場合も多い。近年、cDNA マイクロアレイや RNA-seq 解析などでトランスクリプトームを比較的簡単に解析できるようになってきた。タバコやトマトを用いた解析でも既知の生合成系遺伝子に加えて、機能未知の二次代謝系酵素遺伝子や膜輸送に関与するトランスポーター遺伝子も多く検索されてきた。これらの中には新規の生合成系遺伝子が含まれ

ることが期待できる。解析されていない植物種においても ERF189 型転写因子の標的遺伝子群や代謝物解析を行うことで、新規の防御物質生合成系の同定に繋がる可能性がある。トマトの未成熟果実やポテトの芽に含まれる SGA は、しばしば食中毒の原因となったり、苦味やえぐ味の原因となったりする。制御因子の改変により SGA 蓄積を抑制することの意義は大きい。また、多種多様な野生種が有する有用形質を栽培種に導入しようとする場合、毒性成分の蓄積を抑制できることは一般的にも重要である。酵素遺伝子を用いた従来の代謝工学では困難であった二次代謝産物の飛躍的な生産性の改良が、1つ(もしくは比較的少数)の転写因子の導入により達成される可能性がある。

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 7 件)

Kajikawa M, Sierro N, Kawaguchi H, Bakaher N, Ivanov NV, Hashimoto T, Shoji T* (2017) Genomic insights into the evolution of the nicotine biosynthesis pathway in tobacco. *Plant Physiol.* 174: 999-1011 査読あり

Thagun C, Imanishi S, Kudo T, Nakabayashi R, Ohyama K, Mori T, Kawamoto K, Nakamura Y, Katayama M, Nonaka S, Matsukura C, Yano K, Ezura H, Saito K, Hashimoto T, Shoji T* (2016) Jasmonate-responsive ERF transcription factors regulate steroidal glycoalkaloid biosynthesis in tomato. *Plant Cell Physiol.* 57: 961-975. 査読あり

Shoji T*, Hashimoto T (2015) Stress-induced expression of NICOTINE2-locus genes and their homologs encoding Ethylene Response Factor transcription factors in tobacco.

Phytochemistry 113:41-9. 査読あり

Kato K, Shitan N, Shoji T, Hashimoto T* (2015) NUP1 transports both tobacco alkaloids and vitamin B6. *Phytochemistry* 113:33-40. 査読あり

Kato K, Shoji T, Hashimoto T* (2014) Tobacco nicotine uptake permease regulates expression of the key transcription factor gene for nicotine biosynthesis pathway. *Plant Physiol.* 166: 2195-2204 査読あり

Shitan N*, Kato K, Shoji T (2014) Alkaloid transporters in plants. *Plant Biotechnol.* 31: 453-463. 査読あり

Shoji T*, Koeduka T, Sugiyama F (2014) Deep impact of plant metabolism. *Plant Biotechnol.* 31: 351-352. 査読なし

[学会発表](計 14 件)

Shoji T Conserved transcription factors regulating defense chemistry in plants: jasmonate-responsive ERF transcription factors involved in alkaloid regulation in Solanaceae crops. 2nd International Symposium of Phytochemicals in Medicines and Foods 2017 年 4 月 9 日 中国・福州

庄司翼、梶川昌孝、川口治彦、橋本隆 タバコはいかにニコチンを合成することになったのか? : 二次代謝生合成系の分子進化 2016 年度日本農芸化学学会 2017 年 3 月 18 日 京都府京都市

庄司翼 多種多様な天然物の生合成・蓄積を制御する共通の仕組み 第二回 NAIST-SUNBOR 合同セミナー"植物の代謝・形態形成。微生物相互作用" 2017 年 2 月 20 日 京都府木津川市

Shoji T Seeking transcription factors regulating defense chemistry in plants:

Jasmonate-Responsive ERF transcription factors involved in steroidal glycoalkaloid regulation in tomato. NAIST Bio International Student Workshop 2016 2016 年 11 月 17 日 奈良県生駒市

庄司翼、Thagun Chonprakun、中安大、四方雅仁、岡部佳弘、有泉亨、水谷正治、江面浩、橋本隆 ステロイド性アルカロイド生合成を制御する転写因子 JRE4 の機能欠損トマト変異体 2016 年度日本植物細胞分子生物学会 2016 年 9 月 1 日 長野県上田市

Thagun C, Imanishi S, Kudo T, Nakabayashi R, Ohyama K, Mori T, Kawamoto K, Sasaki Y, Nakamura Y, Nonaka S, Matsukura C, Yano K, Ezura H, Saito K, Hashimoto T, Shoji T Transcriptional regulation of steroidal glycoalkaloid biosynthesis in tomato 2015 年度日本植物生理学会 2016 年 3 月 19 日 岩手県盛岡市

庄司翼、Thagun Chonprakun、四方雅仁、岡部佳弘、今泉亨、江面浩、橋本隆 TILLING 法によるトマト JRE4 遺伝子変異体の単離 平成 27 年度形質転換植物デザイン研究拠点成果報告会 2015 年 12 月 19 日 茨城県つくば市

庄司翼、橋本隆 ナス科毒性アルカロイド合成の分子制御 植物バイオ第 160 委員会第 11 回研究会 2015 年 10 月 23 日 京都府木津川市

庄司翼、Sierro Nicolas、Bakaher Nicolas、Ivanov Nikolai、Peitsch Manuel、橋本隆 タバコ NIC2 遺伝子

座のゲノム構造 日本植物細胞分子生物学会 2015年8月11日 東京・文京区

庄司翼 二次代謝系を制御するキーネガティブレギュロノーム 第1回ネガティブワールド研究会 2015年3月24日 東京・千代田区

Thagun C、今西俊介、中林亮、大山清、森哲哉、河本晃一、野中聡子、松倉千昭、江面浩、齋藤和季、橋本隆、庄司翼 Jasmonate-responsive transcription factors control the steroidal glycoalkaloid biosynthesis in tomato 2014年度日本植物生理学会 2015年3月17日 東京・世田谷区

庄司翼、加藤啓太、Seddon Teoh、谷本裕樹、竹内敦子、土反伸和、金谷重彦、垣内喜代三、橋本隆 Novel genes possibly involved in late steps of nicotine biosynthesis in tobacco 2014年度日本植物生理学会 2015年3月17日 東京・世田谷区

加藤啓太、庄司翼、橋本隆 Cross-talk between JA and auxin in nicotine metabolism in tobacco 2014年度日本植物生理学会 2015年3月17日 東京・世田谷区

Thagun C、今西俊介、中林亮、大山清、森哲哉、河本晃一、野中聡子、松倉千昭、江面浩、齋藤和季、橋本隆、庄司翼 トマトのステロイドグリコアルカロイド生合成を制御するマスター転写因子 2014年度日本植物細胞分子生物学会 2014年3月17日 岩手県盛岡市

〔図書〕(計 2 件)

Shoji T (2016) Alkaloid biosynthesis and regulation in plants. In Plant specialized metabolism: genomics, biochemistry, and biological function, CRC Press, pp85-118.

Shoji T, Hashimoto T (2015) Polyamine-derived alkaloids in plants: molecular elucidation of biosynthesis. In Polyamines, a universal molecular nexus for growth, survival and specialized metabolism, Springer, pp189-200.

〔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/?cate=34&id=102>

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 准教授
研究者番号: 40343272