

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770046

研究課題名（和文） タバコアルカロイド合成の制御遺伝子の同定

研究課題名（英文） Molecular identification of the master regulators 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

研究成果の概要（和文）：

植物由来の天然物は古来より医薬、嗜好品、染料として利用されてきた。特に、12,000種類余の構造が知られるアルカロイドは、多くの有用生理活性物質を含んでいる。我々は、低ニコチンタバコ品種に利用されてきた遺伝子座にERF型転写因子が存在することを解明した。この転写因子はインドールアルカロイド合成のマスター遺伝子ORCA3 と高い相同性を示す。マスター遺伝子を利用した次世代代謝工学が期待される。

研究成果の概要（英文）：

Tobacco (*Nicotiana tabacum*) synthesizes nicotine and related pyridine alkaloids in the root, and their synthesis increases upon herbivory on the leaf via a jasmonate-mediated signaling cascade. Regulatory NIC loci that positively regulate nicotine biosynthesis have been genetically identified, and their mutant alleles have been used to breed low-nicotine tobacco varieties. Here, we studied that the NIC2 locus, comprises clustered transcription factor genes of an ethylene response factor (ERF) subfamily; in the *nic2* mutant, at least seven ERF genes are deleted altogether. The NIC2-locus ERFs are close homologs of ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional activator of indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*, indicating that the NIC2/ORCA3 ERF subfamily was recruited independently to regulate jasmonate-inducible secondary metabolism in distinct plant lineages.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：植物分子生物、生理学

科研費の分科・細目：基礎生物学、植物生理、分子

キーワード：アルカロイド、転写因子、ジャスモン酸、タバコ、ニコチン

1. 研究開始当初の背景

植物が蓄積する多種多様の二次代謝産物は古来より医薬、嗜好品、染料などとして人類の健康で健全な社会生活に貢献してきた。近年の分子生物学の発展により、いくつかの二次代謝産物に関わる酵素遺伝子がクローニングされ、それらがより普遍的な一次代謝酵素遺伝子から進化してきたことが明らかとなった。一方、生合成系が全体として時間的、空間的、及び植物の分化形態形成や環境応答と関連して、どのように制御されているのかは、ほとんどわかっていない。

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)**はその強い薬理活性から防虫物質として機能する。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。また、タバコアルカロイド蓄積量が著しく低下した変異体の存在から**2つの遺伝子座NIC1とNIC2が生合成系遺伝子の包括的コントロールに関わる**ことも分かっている。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**。

研究代表者らはタバコアルカロイドを標的に研究を進めており、これまでに生合成酵素遺伝子の発現制御などに関する知見を得てきた。特に(1) *NIC*が複数の構造遺伝子を転写レベルでコントロールする制御遺伝子であること(2) ジャスモン酸シグナルがCOI1受容体とJAZ転写抑制因子を介する伝

達系に依存すること、及び(3) COI1とJAZの下流に位置すると推定されるbHLH型転写因子が生合成遺伝子プロモーター上の重要シス配列E-Boxに直接結合することなどを明らかとしてきた。一方、転写制御機構の詳細、*NIC*遺伝子とジャスモン酸伝達系の関連、及び、*NIC*制御遺伝子の分子の実体が未解明である。

2. 研究の目的

タバコアルカロイド生合成遺伝子プロモーター上のシス配列E-boxに結合するbHLH型転写因子NtMYCの生合成制御因子としての機能を明らかにする。具体的にはRNAi法及びCRES-T法による*NtMYC*機能抑制形質転換体を作成し、生合成系に与える影響を評価する。特に複数の*NtMYC*相同遺伝子が存在することから、どのメンバーが生合成系制御に機能しているのかを明らかにする必要がある。また、遺伝学的な制御遺伝子*NIC*が*NtMYC*自体である可能性もある。*nic*変異体における*NtMYC*の配列解析等により、そうした可能性を検証する。さらに、ゲノムプロジェクト等で得られた情報を参考に遺伝連鎖解析を行い*NIC*遺伝子の分子クローニングを目指す。

3. 研究の方法

マイクロアレイ解析により低ニコチン変異体で発現が抑制させている遺伝子を検索した。

転写産物量を定量的RT-PCRで計測した。

アグロバクテリアの感染によって遺伝子を植物に導入した。

転写因子によるプロモータの活性化を一過的発現系を用いて解析した。

EMSA法を用いて転写因子の特定配列への *in vitro* 結合能を確認した。

標的プロモーター配列とGUSレポーター遺伝子を連結した融合遺伝子をタバコに導入しレポーター活性を定量するとともに、活性染色により組織特異性を検討した。

4. 研究成果

クラスター化した転写因子によるニコチン生合成の制御

NIC2 遺伝子座 (*B* 遺伝子座とも呼ばれていた) に特定のサブファミリーに属する複数の *ERF* 型転写因子がクラスター化して存在し、*nic2* 変異体では少なくとも7つの *ERF* 遺伝子が欠失していることを明らかとした。これら *ERF* 遺伝子はニチニチソウにおいてインドールアルカロイド生合成に関わるジャスモン酸誘導性転写活性化因子 *ORCA3* と高い相同性を示し、この *NIC2/ORCA3* *ERF* サブファミリーがジャスモン酸誘導性の二次代謝の制御に異なる植物系統で独立に用いられるようになったことが考察された。

タバコ培養根において過剰発現、発現抑制、及び、ドミナント抑制型の発現を行い、これら *ERF* 遺伝子が生合成のマスター制御因子であることを示すと同時に、*ERF* はニコチン生合成遺伝子のプロモーター内に存在する *GCC box* を認識し、生合成の既知の全構造遺伝子を特異的に活性化することを明らかとした。いずれの *ERF* 遺伝子も生合成器官である根で発現するとともに、ジャスモン酸によ

って誘導されたが、それらの誘導の時間依存的パターンは遺伝子メンバー間で異なっていた。互いに高い相同性を示す *ERF* 遺伝子群は遺伝子重複によって生じた後、それぞれが転写因子として機能分化したと考えられた。

さらに、低ニコチン品種において発現抑制される遺伝子として、上述の制御遺伝子に加えて、新規生合成酵素遺伝子と液胞膜局在型の新規ニコチントランスポーター遺伝子を同定した。

ニコチンを含むアルカロイドは植物色素のように形質を簡便に判別できないことから、その変異体と原因遺伝子の同定は困難であった。本研究により、低ニコチンタバコ変異体の原因遺伝子として、植物体内でアルカロイド蓄積量を決めている因子が同定された意義は大きい。転写因子を利用したジャスモン酸誘導性の二次代謝産物の代謝工学への応用や制御を受ける新規生合成遺伝子の効率的同定などへの応用も期待される。

遺伝子重複によって生じた新たな酵素遺伝子がどのように二次代謝の制御系に取り込まれるようになったのかは興味深い問題である。

一次代謝系酵素のニコチン生合成レギュロンへの取り込み

タバコにおいて *NAD* 合成とニコチンのピリジン環合成に関わるキノリン酸ホスホリボシル基転移酵素 (*QPT*) をコードする2つの遺伝子 *QPT1* と *QPT2* が、どのようにニコチン生合成のマスター転写因子であるジャスモン酸応答性転写因子 *ERF189* によって制御されるのかを解析した。 *QPT1* は構成的に発現するのに対して、*QPT2* は他のニコチン生合成遺伝子と同様にジャスモン酸応答性や根特異的発現を示し、*ERF189* の制御を受けることが分かった。

QPT2 遺伝子のプロモーター領域には3つの機能的なERF189結合配列が存在し、いずれもERF189による*QPT2*プロモーターの活性化に寄与することが、*in vitro*結合解析、一過的発現系を用いたトランスアクティベーション解析、及び、タバコ形質転換毛状根を用いたプロモーター解析から分かった。一方、*QPT1*プロモーターはERF189に結合せず、またその制御を受けなかった。

遺伝子重複によって生じた2つの*QPT*遺伝子のうち、1つの遺伝子がプロモーター領域に複数のERF189結合性シス配列を獲得することでニコチン生合成レギュロンに取り込まれ、ニコチン合成の獲得で必要となったピリジン環供給量の増加に対応したことが考察された。

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5件)

- ① Shoji T, Hashimoto T (2011) Recruitment of a duplicated primary metabolism gene into the nicotine biosynthesis regulon in tobacco. **Plant J** 印刷中 査読有
- ② Shoji T, Hashimoto T (2011) Tobacco MYC2 regulates jasmonate-inducible nicotine biosynthesis genes directly and by way of the *NIC2*-locus *ERF* genes. **Plant Cell Physiol** 印刷中 査読有
- ③ Kajikawa M, Shoji T, Katoh A, Hashimoto T (2011) Vacuole-localized berberine bridge enzyme-like proteins are required for a late step of nicotine biosynthesis in tobacco. **Plant Physiol** 155: 2010-2022. 査読有
- ④ Shoji T, Kajikawa M, Hashimoto T (2010) Clustered transcription factor genes regulate nicotine biosynthesis in tobacco. **Plant Cell** 22: 3390-3409. 査読有
- ⑤ Shoji T, Inai K, Yazaki Y, Sato Y et al. (2009) Multidrug and toxic compound extrusion-type transporters implicated in vacuolar sequestration of nicotine in tobacco roots. **Plant Physiol** 149: 708-718. 査読有

[学会発表] (計6件)

- ① 庄司翼、梶川昌孝、橋本隆
複数の転写因子が低ニコチンタバコ品種では欠失している 2010年度日本植物生理学会 2011年3月 仙台(震災のため中止、要旨発表を持って成立)
- ② 庄司翼、橋本隆
クラスター化した転写因子がタバコのニコチン生合成を制御している 2010年度日本植物生理学会 2011年3月 仙台(震災のため中止、要旨発表を持って成立)
- ③ 庄司翼、梶川昌考、橋本隆
クラスター化したERF型転写因子がタバコのニコチン生合成を制御している 2010年日本農芸化学学会 2011年3月 京都(震災のため中止、要旨発表を持って成立)
- ④ 加藤啓太、庄司翼、橋本隆
Novel genes involved in nicotine biosynthesis in tobacco 2010年日本農芸化学学会 2011年3月 京都(震災のため中止、要旨発表を持って成立)
- ⑤ 加藤啓太、庄司翼、橋本隆
ニコチン生合成に関与するタバコ新規酵素遺伝子候補の解析 2010年度日本農芸化学学会関西支部大会 2010年10月 25

日 大阪

- ⑥ Phattharaporn P, Shoji T, Hashimoto T
Genetic analysis of alkaloid composition and
translocation in wild Nicotiana species 7th
Solanaceae Meeting Oct 6, 2010, Dundee,
UK

[図書] (計 2 件)

- ① 「Shoji T, Hashimoto T (2011) Nicotine
biosynthesis. In: Ashihara H, Crozier A,
Komamine A (ed) Plant metabolism
and biotechnology, Wiley, New York. pp.
191-216.
- ② 「庄司 翼, 橋本 隆 (2010) ジャスモン
酸応答 : COI1-JAZ-MYC2 シグナリング
カスケードの分子機構 植物におけるシ
グナル研究, 共立出版 pp.92-98.

[その他]

ホームページ等

[http://bsw3.naist.jp/hashimoto/Member/S
hoji.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

