

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07702

研究課題名(和文) アルカロイド生産におけるウラシル輸送体の生理的役割と一次代謝維持機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of physiological roles of uracil transporter in alkaloid production and central metabolites maintenance

研究代表者

土反 伸和 (Shitan, Nobukazu)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20547880

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)：植物は様々な特化代謝産物を生産している。その中には有用な生物活性を示すことから医薬品原料として用いられるものも多い。我々は特化代謝の効率的な生産に関わる輸送体の研究を進めてきており、本研究では、タバコのアルカロイド生合成酵素と同様に発現誘導される色素体局在のウラシル輸送体に着目した。本輸送体を過剰発現するタバコ毛状根および培養細胞を作出し、代謝物を網羅的に解析したところ、フェニルアラニンなど複数のアミノ酸が増減するとともに、アルカロイド生産性の変化も示唆された。これら結果から、ウラシル輸送体の*vivo*における役割を初めて明らかとするとともに、効率的な特化代謝生産に繋がる重要な知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物が生産する化合物の中にはモルヒネなど有用なものも多い。一方で、それらの供給はいまだに植物資源に依存しているものもあり、生育の遅さなどから安定供給系の開発が求められている。本研究では、植物がそれら有用化合物を生産する際に、細胞内の効率的な物質輸送に関わると推定される葉緑体局在型のウラシル輸送体の研究を行った。タバコのウラシル輸送体を培養細胞などに過剰発現させた結果、アミノ酸やアルカロイドなどの生産が変化することが示唆された。本研究成果を今後に応用していくことで、植物で有用物質をより効率的に生産していくことが可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Plants produce a variety of specialized metabolites. Many of them are used as raw materials for pharmaceuticals due to their useful biological activity. We have been investigating transporters involved in the efficient production of specialized metabolites, and in this study we focused on a plastid-localized uracil transporter, whose expression is induced similarly to those of tobacco alkaloid biosynthetic enzymes. Tobacco hairy roots and cultured cells overexpressing this transporter were produced and metabolites were comprehensively analyzed. The data suggested an increase or decrease in multiple amino acids, such as phenylalanine, as well as altered alkaloid productivity. These results revealed for the first time the role of uracil transporters *in vivo* and provide important insights that lead to efficient specialized metabolites production.

研究分野：植物細胞分子生物学

キーワード：タバコ アルカロイド ウラシル輸送体 ニコチン 培養細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物は様々な生理活性物質(二次代謝産物、近年では特化代謝産物とも言われる)を生産し、外敵から身を守るための防御物質として、または他の生物や同種の生物などのコミュニケーションなどに用いている。それらの中には強い生物活性を示すものも多く、中には医薬品原料に用いられるものも存在する。そのような有用性から、植物細胞内における生合成に関する研究が国内外で進められてきたところ、それら特化代謝の最終産物や生合成中間体が器官間や細胞内オルガネラ間を極めてダイナミックに移動していることが新たに明らかとなってきた。そこで、生合成に加えて輸送も制御することは有用産物の大量生産に繋がると期待され、そこに関わる輸送機構が近年に大きな注目を集めてきている。我々は輸送の重要性にいち早く着目し、薬用植物オウレンを用い、内在性アルカロイドを基質とする ABC 輸送体 CjABCB1 を世界に先駆けて単離・報告した(Shitan et al., PNAS. 2003)。さらに、タバコのニコチンアルカロイドをモデルに、ニコチンが根から葉へと転流される機構を解析し、培養細胞を用いた網羅的遺伝子解析などから、葉でのニコチン蓄積に働く 2 つの MATE 型輸送体(NtJAT1、NtJAT2)(Morita et al., PNAS. 2009, Shitan et al., Plos One 2014)を報告するとともに、共同研究として、根でのニコチン輸送体 MATE1 や NUP1 を報告(Shoji et al., Plant Phys. 2009, Kato et al., Phytochemistry 2015)するなど、植物体におけるアルカロイドの転流・蓄積機構を解明してきた。

一方で、細胞内オルガネラ間の代謝物の輸送機構や、その輸送能が代謝生成に果たす役割の知見は少ない。また、アミノ酸などの中心代謝産物から特化代謝産物が生産されるには、大きな代謝コストがかかることされている。しかし、その際に生育に必須な中心代謝産物がどのように維持されるか、という知見は殆どない。それら細胞内の代謝輸送動態を解き明かすことで、植物の生育を阻害せず、かつ有用な代謝産物の生産を向上させる方法が見出されると期待される。

我々は、タバコ植物の培養細胞に対して、特化代謝産物の生産を誘導する植物ホルモン・メチルジャスモン酸で処理した際の網羅的遺伝子解析から、アルカロイド生合成遺伝子と同様に発現誘導されるウラシル輸送体(NCS1)を見出していた。本輸送体は色素体(葉緑体)に同在しており、またウラシルなどピリミジン系化合物の輸送能を有することが強く示唆された。また、培養細胞において過剰発現させると、培養細胞の生育が著しく阻害されるという予備的知見を得ていた。これらは、「色素体へのウラシル輸送体を介した輸送機能が、中心代謝であるピリミジン代謝のみならず代謝全体に影響を与えること、また特化代謝であるアルカロイドの生産量の制御に何らかの関わりを有する」という可能性を示している。本輸送体を更に解析することで、中心代謝の輸送を介した、特化代謝生産時の代謝経路全体の動態解明や、中心代謝の維持機構が解明されると期待された。

2. 研究の目的

上記のタバコ植物ウラシル輸送体が中心代謝、特化代謝の生産にどのような影響を与えるのかを解明するため、ウラシル輸送体を過剰発現する毛状根、培養細胞を作出し解析する。特に、培養細胞においては、恒常的なウラシル輸送体の過剰発現が生育を著しく阻害することが予備的に明らかになっていることや、ウラシル輸送体の輸送機能による代謝産物の変化を時間依存的に調べることが機能推定に重要なことから、誘導プロモーターで過剰発現する培養細胞を作出する。これら形質転換体について、細胞増殖を観察するとともに、細胞内の代謝産物の変動を orbitrap (Thermo) を用いて網羅的に定量する。既知の代謝マップと照らし合わせて代謝産物の増減を把握し、ウラシル輸送体の細胞内における生理的役割を解明する。これら解析から、特化代謝生産時に、本輸送体を介したピリミジン系化合物など中心代謝産物の維持機構と、アルカロイド生産時の代謝動態を詳細に明らかとすることを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

タバコのウラシル輸送体について、恒常的に過剰発現するベクターとして pGWB2-NtNCS1 を作成した。また、誘導プロモーターのベクターとしては、dexamethasone 応答性で下流の遺伝子の発現を誘導できる pTA7001 を用いて、pTA7001-NtNCS1 ベクターを作出した。これらベクターおよび元ベクターをアグロバクテリウム (*Agrobacterium rhizogenes* or *A. tumefaciens*) に導入した。さらに、pGWB2-NtNCS1 および元ベクターを含むアグロバクテリウム (*A. rhizogenes*) をタバコ植物の葉に感染させ、数週間の培養により形質転換毛状根を作出した。培養細胞については、pTA7001-NtNCS1 を保持するアグロバクテリウム (*A. tumefaciens*) を感染させ、数週間の培養により、形質転換された培養細胞を作出した。

毛状根については、液体培地で培養を行い、増殖を調べるとともに代謝産物の変化を解析した。培養細胞についても、液体培地で数週間、継代培養を行なったのち、dexamethasone 処理を行いウラシル輸送体の発現を誘導したのち、24、48 時間などで細胞をサンプリングした。ウラシル輸送体の発現は特異的な抗体を用いたウェスタン解析により行なった。

代謝物の解析においては、液体窒素下でそれぞれの細胞を破碎し、メタノールで代謝物を抽出し、精製して分析を行った(図1)。また LC 分析の基本条件としては以下の通りとした。

< LC 分析条件 >

カラム : TOSOH TSK-gel ODS-100V 5 μ m 3x50 mm

温度 : 40

流速 : 0.3 ml/min

溶離液：A 液 0.1%ギ酸添加水

B 液 0.1%ギ酸添加アセトニトリル

グラジエント (%B)：0 min:3%、15 min 97%、20 min 97%、20.1 min 3%、25 min 3%

注入量：5 μ l

網羅的な代謝物の MS 分析は、以下の図 2 の条件を基本として行った。

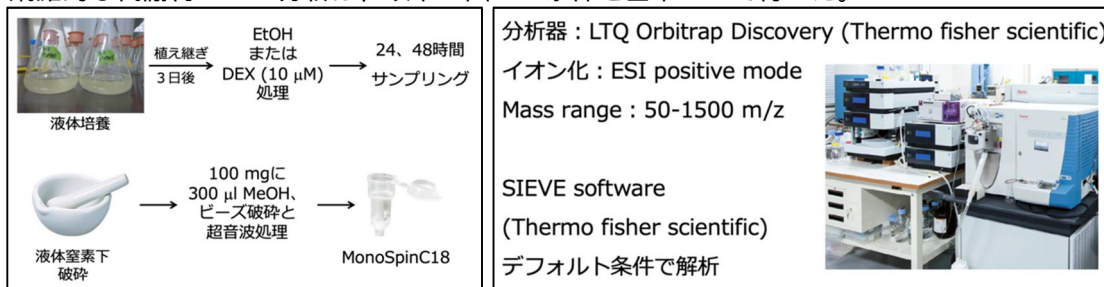


図 1 代謝物の抽出方法

図 2 代謝物の分析条件

これら条件で分離された代謝物を、LTQ Orbitrap XL (Thermo fisher Scientific) ESI positive mode で解析した。コントロールと比較して大きく変動している代謝物の同定には、SIEVE software (Thermo fisher Scientific) を用いた。化合物の同定は、m/z および MS/MS スペクトルなどから推定した。

4. 研究成果

形質転換をおこなったところ、複数の毛状根のラインの作出に成功した。これらからいくつかのラインを選び、タンパク質を抽出、ウェスタン解析を行ったところ、ウラシル輸送体が過剰発現していることを確認した。それら毛状根について液体培養を行い、一定期間の培養後にサンプリングし、代謝物の網羅的な解析を行った。その結果、元ベクターを導入したコントロール毛状根に比べ、複数の代謝物が増減していることが明らかになった。代謝物としては、m/z から推定される代謝物も含めて、phenylalanine、nicotinic acid などが有意にコントロールよりも増加していた。また有意ではないが、NAD や glutathione なども増加傾向がある代謝物として見出された。特化代謝産物としては、アルカロイドである b Buchananine と m/z が一致する化合物が有意に増加していた。一方、減少していた代謝物としては、ウラシル輸送体の過剰発現により減少した複数のピークはあるものの m/z などから同定に至ったものは極めて少なかった。その中でも特筆すべきものとしては、特化代謝である nicotyrine と推定される化合物が有意に減少していた。これらのことから、色素体に局在するウラシル輸送体は、細胞内の phenylalanine など中心代謝に関わるとともに、nicotyrine などの特化代謝産物の生産にも影響を与えることが示唆された。

培養細胞においても、アグロバクテリウムを介して pTA7001-NtNCS1 ベクターを形質転換し、複数の形質転換培養細胞を作出した。これら細胞におけるウラシル輸送体の誘導発現は、dexamethasone 処理 (10 μ M) 後の細胞からタンパク質を抽出し、ウェスタン解析により確認した。誘導により高発現する培養細胞を選抜し、液体培養を行った。それら細胞について、比較対象のコントロールとしては ethanol を添加し、ウラシル輸送体の誘導としては dexamethasone を添加し、24 時間、48 時間後の細胞をサンプリング、代謝物を抽出し orbitrap を用いたメタボローム解析を行った。SIEVE を用いた差分解析により、有意に増減しているピークを複数同定することに成功した。中でも、m/z および MS/MS フラグメントの結果などから、GABA と推定される代謝物のピークは有意に増加しており、一方で aspartic acid と推定されるピークは有意に減少していた。また、glutamine、pyroglutamic acid、glutamic acid などと推定されるピークも減少傾向を示していた。これら結果から、ウラシル輸送体がアミノ酸を中心として代謝物の生産に影響を与えることが明らかとなった。

これら毛状根および培養細胞を用いた解析から、ウラシル輸送体が細胞内の中心代謝、特に aspartic acid などのアミノ酸や nicotinic acid などの窒素を含む化合物群の代謝に影響を与えることが明らかとなった。これまで植物のこのウラシル輸送体ファミリーについては、酵母や大腸菌に発現させた際の取り込み能の解析など *in vitro* における機能のみが報告されていたが、本研究から新たに *in vivo* における機能が明らかになっており、本輸送体の解析が今後大きく進展すると期待される。また、毛状根を用いた解析からアルカロイドの生産にも影響を与えることが強く示唆されており、細胞内輸送を介した中心代謝と特化代謝の繋がりが見えてきた。本輸送体のみならず、細胞内オルガネラの輸送を介した代謝動態の解析が今後さらに進むことで、有用な特化代謝の生産性向上へとつながることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ikuko Amano, Sakihito Kitajima, Hideyuki Suzuki, Takao Koeduka, Nobukazu Shitan	4. 巻 13
2. 論文標題 Transcriptome analysis of Petunia axillaris flowers reveals genes involved in morphological differentiation and metabolite transport	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0198936.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0198936	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nobukazu Shitan, Kazufumi Yazaki	4. 巻 15
2. 論文標題 Dynamism of vacuoles toward survival strategy in plants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 183127 ~ 183127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.bbamem.2019.183127	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 土反伸和
2. 発表標題 二次代謝産物の輸送体研究 ~これまでとこれから~
3. 学会等名 第7回二次代謝フロンティア研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 土反伸和
2. 発表標題 薬用植物における二次代謝輸送機構の解明
3. 学会等名 第8回バイオフィンガナル研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 土反伸和、南翔太、津山濯、グーセンス アラン、鈴木秀幸、林田南帆、高部圭司、森山芳則、矢崎一史
2. 発表標題 ジャスモン酸で誘導されるタバコNCS1型輸送体T408の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2017年度大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 後藤弓絵、岡部友紀、南翔太、林田南帆、中原洋子、矢崎一史、土反伸和
2. 発表標題 タバコ毛状根を用いた Nt-NCS1 輸送体の解析
3. 学会等名 第11回トランスポーター研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 土反伸和、南翔太、津山濯、森山芳則、矢崎一史
2. 発表標題 ジャスモン酸誘導性タバコ輸送体NtNCS1の機能解析
3. 学会等名 第13回メタボロームシンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土反伸和
2. 発表標題 Transporters of secondary metabolites -Identification, characterization, and possible application to synthetic biology-
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 水谷 正治、土反 伸和、杉山 暁史	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 328
3. 書名 基礎から学ぶ植物代謝生化学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----