

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590117
 研究課題名（和文） 器官特異的遺伝子発現システムを利用した高品位薬用資源植物の作製
 研究課題名（英文） Development of highly productive medicinal plants utilizing tissue-specific gene expression systems
 研究代表者 黒崎 文也（KUROSAKI FUMIYA）
 富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）・准教授
 研究者番号：70143865

研究成果の概要：高等植物の二次代謝能の活性化にかかわる細胞内情報伝達系構成因子のうち、GTP 結合タンパク質をコードする遺伝子を単離し器官特異的に過剰発現させて、物質生産への応用の可能性を検討した。ヘテロ三量体 G タンパクの α サブユニット遺伝子は刺激に対して殆んど応答しなかったが、単量体 GTPase 遺伝子の一部は転写レベルが上昇し、これを根組織で発現させた組み換え植物の分泌活性が顕著に上昇することを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：薬用資源学・細胞内情報伝達系・遺伝子組み換え植物

1. 研究開始当初の背景

様々な外来遺伝子を植物細胞に導入・発現させることで有用化合物の生産能に人為的な改変を加える「メタボリックエンジニアリング」の試みは、これまでも数多くなされてきた。しかしながら、植物細胞内の有用物質合成の場が、ある特定部位にそれぞれ限定されているにもかかわらず、植物個体の特定器官でのみ目的遺伝子を発現させることは、現時点では技術的に極めて困難である。その結果、いわゆる遺伝子組み換え植物においてはコードしたタンパクがあらゆる器官

で過剰に生産されることとなり、外来遺伝子の導入・発現が十分な効果を挙げないケースが多い。その結果、実用化されている組み換え植物の事例は、殺草剤耐性の付与など植物個体全体での発現が望まれるものに限定されているのが現状である。

2. 研究の目的

本研究は、高等植物細胞への外来遺伝子の導入にあたって、その発現部位を制御することにより遺伝子の過剰発現による負の効果を緩和・低減し、組み換え植物への形質付与

の効果を飛躍的に向上させることを目的としたものである。また、代表者は理化学研究所のグループから毛状根を形成しながら外来遺伝子の発現を促すベクターを恵与され、これがシロイヌナズナやイネなどのモデル植物にとどまらず一般の薬用植物にも広く応用可能であることを示している。今回の研究では、器官特異的に外来遺伝子を発現させるシステムを用いて、標的遺伝子を宿主植物内の特定器官でのみ選択的に発現させ、外来遺伝子の導入・発現に伴う負の効果を抑制することを目指している。今回の研究では GTP 結合タンパク質をコードした遺伝子を導入することとし、形質転換の効果を「器官選択的な発現」によって高い精度で制御することとした。これらの新規な手法を用いることにより、高品位の薬用植物群を作製することを目的とした。

3. 研究の方法

ニンジン(*Daucus carota*)あるいは *Scoparia dulcis* から調製した RNA から逆転写反応によって cDNA を調整し、既知の GTP 結合タンパク遺伝子の塩基配列から設計したプライマーを用いてコア構造を得た。その塩基配列をもとに、RACE 法によって heterotrimer 型 G タンパク α サブユニット遺伝子と単量体 G タンパク遺伝子、すなわち ADP-ribosylation factor (ARF) 遺伝子ならびに Rac/Rop GTPase 遺伝子、の全長の配列を決定した。クローニングした遺伝子について、ゲノミックサザンブロット法によるコピー数の確認、RT-PCR 法による細胞内での発現特性の解析、更には、一部のものについては大腸菌で過剰発現させたタンパクについて生化学的諸性質の検討を行った。また ARF 遺伝子については、これを *rol* cluster を含む発現ベクターに導入し、*Agrobacterium* 法によってベラドンナ (*Atropa belladonna*) 葉組織の形質転換を行なった。ベラドンナ組み換え体の cell line を毛状根として確立し、その細胞生物学的諸性質を検討した。

4. 研究成果

(1) GTP 結合タンパク遺伝子のクローニング

高等植物の heterotrimer 型 GTP 結合タンパク質が二次代謝能発現に寄与する可能性を検討する目的で、このタンパク複合体の α サブユニットをコードしている遺伝子のクローニングを試みた。ニンジンおよび *S. dulcis* の幼植物体より調整した RNA から逆転写によって得た cDNA を鋳型として、RACE 法によって $G\alpha$ 遺伝子 (GenBank Accession No., EF095216, EU489474) をそれぞれクローニングした。この遺伝子がコードするタンパクの

アミノ酸配列は、他の植物や動物、微生物などの heterotrimer 型 G タンパクの α サブユニットと高い相同性を示した。しかしながらこれらがコードするタンパクは、コレラ毒素に対する結合サイトを有するものの、百日咳毒素との結合部位を持たないことが示された。

続いて、 $G\alpha$ 遺伝子の場合と同様に、RACE 法によってニンジン幼植物体より 2 種類の ARF 遺伝子 (GenBank Accession No., AY874441, DQ222228) を単離しその全長の塩基配列を決定した。ORF 部分のアミノ酸配列を他の生物由来のものと比較すると、よく保存された 3 箇所の GTP 結合サイトを含むもののその近傍の相同性は必ずしも高くはないことが明らかとなった。この遺伝子が大腸菌で過剰発現させて得られた組み換えタンパクは GTPase に対して加水分解活性を示し、またその結合活性は GTP に特異的であった。

更に、*S. dulcis* の幼植物体を材料として RACE 法により 2 種類の Rac/Rop 型 GTPase 遺伝子 (*Sdrac-1* 並びに *Sdrac-2*, GenBank Accession No., FJ159428, FJ1550362) をクローニングし、その全長の配列を決定した。これらがコードするアミノ酸配列を解析した結果、両者とも様々な植物由来の Rac/Rop GTPase との相同性が極めて高いことが確認された。

(2) サザンブロット法による解析

ニンジン、あるいは *S. dulcis* のゲノム DNA を制限酵素処理したサンプルについて、今回クローニングした遺伝子のそれぞれの ORF 部分をプローブとしてサザンハイブリダイゼーション解析を行った。

GTP 結合タンパク α サブユニットにおいては、ニンジンゲノムの解析では $G\alpha$ が 2 つの類似した遺伝子によって構成されている可能性が示されたのに対し、*S. dulcis* の $G\alpha$ はシングルコピー遺伝子として存在していることが明らかとなった。また、ARF においては数種類のサイズのバンドが観察され、この遺伝子群が multigene family を形成していることが示唆された。更に、多くの植物で multigene family としてゲノム中に存在するとされている Rac/Rop 型 GTPase 遺伝子ではいずれの場合も一つのメインシグナルと共に 2-3 個の弱くハイブリダイズするシグナルが検出されたことから、この G タンパクは複数の遺伝子から構成されるものの、その構成遺伝子数は他の植物と比較して少ないことが示唆された。

(3) 発現特性の解析

今回クローニングした GTP 結合タンパク遺伝子の発現特性を RT-PCR によって半定量

的に解析した。

ニンジンおよび *S. dulcis* 由来の $G\alpha$ 遺伝子について RT-PCR 解析を行なった結果、ニンジン $G\alpha$ は高温処理や長期間にわたる塩ストレスに対してネガティブな反応を示すものの、ほとんどの外部刺激に対して、これらの $G\alpha$ 遺伝子は転写レベルでの応答を示さないことが明らかとなった。他の真核生物と同様に、植物の heterotrimer 型 G タンパク質も多くの細胞内シグナル伝達系に関与していることが示されている。しかしながら、今回得られた結果、すなわち $G\alpha$ 遺伝子のコピー数が極めて少ないこと、および外部刺激に対する転写レベルでの応答性が希薄なことを考慮すると、高等植物の情報伝達系ではこのタイプの G タンパクは特異性の低い mediator あるいは amplifier として機能しており、標的となるエフェクターや最終的な細胞内イベントを決定する役割を担っているのは、カスケード下流にある monomer 型 G タンパクやキナーゼ類などである可能性が示唆された。

また、ニンジンからクローニングした二つの ARF 遺伝子について同様に解析をおこなったところ、一方は低温、糸状菌菌糸壁、エチレンなどの刺激に対して反応しないが、もう一方はエチレンに特異的に応答することが明らかとなった。これらのことより、本研究でクローニングした2種類の ARF 遺伝子のひとつは constitutive に発現しているものの、もう一方の遺伝子はエチレンに特異的に反応し、両者が異なった役割を果たしていることが示唆された。

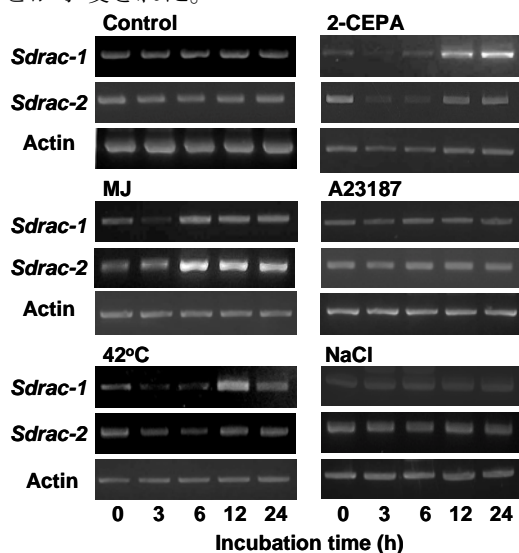


図1. RT-PCRによる *Sdrac1*, *Sdrac-2* の発現解析

続いて様々な外部刺激に対する *Sdrac-1*, *Sdrac-2* の発現変化を RT-PCR によって解析し

たところ、どちらの遺伝子も methyl jasmonate (MJ) やエチレン刺激 (2-CEPA) に対して顕著な転写活性の増加が見られたのに対し、Ca イオノフォア A23187 処理には応答しないことが示された(図1)。これらの結果から、*S. dulcis* の細胞内伝達カスケードの中で *Sdrac-1*, *Sdrac-2* がコードする Rac/Rop 型 GTPase は、プライマリーな外部刺激物質の受容と二次メッセンジャーである Ca レベルの上昇との間にある何らかの細胞内プロセスにおいて転写活性の上昇を伴って機能している可能性が示唆された。

(4) 組み換え植物の作成とその諸性質

本研究でクローニングした2種類の ARF 遺伝子のうち、エチレンに反応するものについてこれをカリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーターの下流に配置し、根形成活性を有する *rol* cluster とともに共発現させることによって形質転換体を毛状根として得ることを試みた。発現ベクターとして pBCR82 に ARF 遺伝子を導入したものを構築し、コントロール用の空ベクターとしては pBCR90 を用いることとした。これらを用いて市販の *Agrobacterium tumefaciens* に導入した。宿主植物としては *Atropa belladonna* を選び、無菌発芽させた葉組織に *A. tumefaciens* を感染させた。得られた毛状根を cephotaxime 含有培地で継代培養して除菌を行ない、Murashige-Skoog 液体培地中へ移行した(図2)。安定して継代培養が可能になったところで、ARF 遺伝子の過剰発現によ

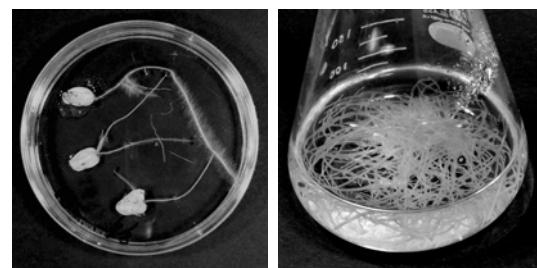


図2. ARF 導入による形質転換ベラドンナ毛状根の作成(左)と培養(右)

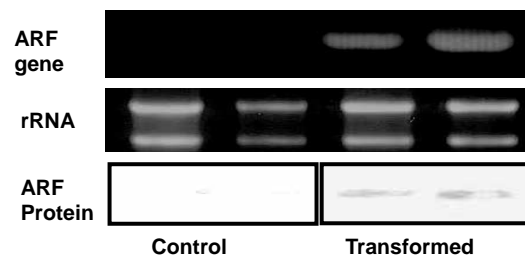


図3. ベラドンナ形質転換体での ARF 遺伝子の発現とタンパクの生成

る形質転換体の生化学的、細胞生物学的変化を比較・検討した。

空ベクターを導入して毛状根形成を誘導したものと ARF 遺伝子を導入したものについてそれぞれ 2 種類ずつ cell line を確立し、RT-PCR による ARF 遺伝子の発現を確認したうえで市販の ARF 抗体による Western blot 解析を行なった。その結果、pBCR82-ARF で形質転換を行なったものを選択的に ARF 遺伝子の発現とそのタンパクの生成・蓄積が検出された(図 3)。次いで、これらの培養の細胞外タンパク量の変化を Bradford 法によって経時的に測定したところ、pBCR82-ARF を導入した形質転換体において、細胞外へのタンパク分泌活性が著しく上昇していることが確認された(図 4)。

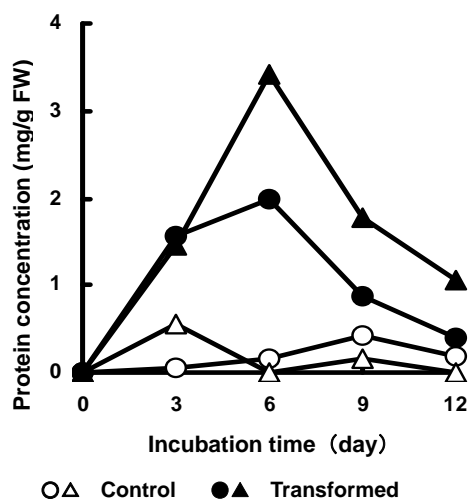


図4. 形質転換毛状根培養細胞の分泌活性

近年、微生物や昆虫細胞などへの外来遺伝子の導入によっては十分な生産量が確保できないサイトカインやワクチンあるいは抗原タンパクなどを、高等植物細胞を利用して生産させる試みが広く行なわれている。今回の研究では、ARF タンパクをコードする 600 bp 程度の遺伝子を発現ベクター中に挿入し目的遺伝子と共発現させ毛状根の cell line を作成することによって、目的遺伝子の translate を効率よく培地中に分泌させる可能性が示唆された。本研究によって、高等植物細胞を外来タンパク生産のチャンパーとして利用する際に目的物質の回収性を向上させるための一つの方法論が示されたと考えられる。

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 14 件)

- ① Mitamura, T., Shite, M., Yamamura, Y., Kurosaki, F. (2009) Cloning and characterization of a gene encoding Rac/Rop-like monomeric guanosine 5'-triphosphate-binding protein from *Scoparia dulcis*. *Biol. Pharm. Bull.* 32, In press. (査読有)
- ② Shite, M., Yamamura, Y., Hayashi, T., Kurosaki, F. (2008) Cloning and characterization of *Sdga* gene encoding α -subunit of heterotrimeric GTP-binding protein complex in *Scoparia dulcis*. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 2150-2153. (査読有)
- ③ Kobayashi, Y., Matsuo, M., Sakamoto, K., Wakasugi, T., Yamada, K., Obokata J. (2008) Two RNA editing sites with *cis*-acting elements of moderate sequence identity are recognized by an identical site-recognition protein in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Res.* 36, 311-318. (査読有)
- ④ Nakano T., Andoh T., Tayama M., Kosaka M., Lee J.-B., and Kuraishi Y. (2008) Effects of topical application of tacrolimus on acute itch-associated responses in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 31: 752-754. (査読有)
- ⑤ Nakano T., Andoh T., Lee J.-B., Kuraishi Y. (2008) Different dorsal horn neurons responding to histamine and allergic itch stimuli. *Neuroreport* 19, 723-726. (査読有)
- ⑥ Tsujii K., Andoh T., Lee J.-B., Kuraishi Y. (2008) Activation of proteinase-activated receptors induces itch-associated response through histamine-dependent and -independent pathways in mice. *J. Pharmacol. Sci.* 108, 385-388. (査読有)
- ⑦ Asakura, Y., Seki, H., Muranaka, T., Yamamura, Y., Kurosaki, F. (2008) Enhanced secretory activity of *Atropa belladonna* hairy root culture over-expressing ADP-ribosylation factor gene. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 1465-1468. (査読有)
- ⑧ Kanekiyo K., Hayashi K., Lee J.-B., Takenaka H., and Hayashi T. (2008) Structure and antiviral activity of an acidic polysaccharide from an edible blue-green alga, *Nostoc flagelliforme*. *Yakugaku Zasshi* 128, 725-731. (査読有)
- ⑨ Asakura, Y., Kurosaki, F. (2007) Cloning and expression of *Dcga* gene encoding α -subunit of GTP-binding protein in carrot seedlings. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 1800-1804. (査読有)
- ⑩ Asakura, Y., Ishigaki, E., Sugiyama, R., Kurosaki, F. (2007) Cloning and expression of cDNAs encoding ADP-ribosylation factor in carrot seedling. *Plant Science* 172, 189-195. (査読有)

- ⑪ Saitoh, D., Asakura, Y., Kasidimoko, N. K., Shite, M., Sugiyama, R., Lee, J.-B., Hayashi, T., Kurosaki F. (2007) Cloning and expression of calmodulin gene in *Scoparia dulcis*. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 1161-1163. (査読有)
- ⑫ Lee J.-B., Hou X., Hayashi K., Hayashi T. (2007) Effect of partial desulfation and oversulfation of sodium spirulan on the potency of anti-herpetic activities, *Carbohydr. Polym.* 69, 651-658. (査読有)
- ⑬ Ohta Y., Lee J.-B., Hayashi K., Fujita A., Park D.-K., Hayashi T. (2007) In Vivo anti-influenza virus activity of an immunomodulatory acidic polysaccharide isolated from *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans, *J. Agric. Food Chem.* 55, 10194-10199. (査読有)
- ⑭ Kanekiyo K., Hayashi K., Takenaka H., Lee J.-B., Hayashi T. (2007) Anti-herpes virus target of an acidic polysaccharide, nostoflan, from an edible alga *Nostoc fragelliforme*. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 1573-1575. (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

- ① 李貞範, 林京子, 林利光 : 海藻由来硫酸化多糖の生物活性. 第 17 回天然薬物の開発と応用シンポジウム, 2008, 11, 13-14, 福岡.
- ② 水越悠輔, 李貞範, 林京子, 林利光 : ツルムラサキ (*Basella rubra*) 由来抗ウイルス活性多糖に関する研究. 日本生薬学会第 55 回年会, 2008, 9, 19-20, 長崎.
- ③ Lee J.-B., Suzuki S., Nkembo KM., Kayagi K., and Hayashi T. : Methyl jasmonate influences secondary metabolism and protein expression in *Scoparia dulcis*. 7th Joint Meeting of GA, AFERP, ASP, PSE & SIF, 2008, 8, 3-8, Athens, Greece.
- ④ Ohta Y., Lee J.-B., Hayashi K., Takeshita A., and Hayashi T. Usefulness of algal polysaccharides for viral infectious diseases. 7th Joint Meeting of GA, AFERP, ASP, PSE & SIF, 2008, 8, 3-8, Athens, Greece.
- ⑤ Hayashi K., Kanekiyo K., Ohta Y., Lee J.-B., Takenaka H., and Hayashi T. : Anti-influenza A virus activity of an acidic polysaccharide from a blue-green alga *Nostoc flagelliforme*. 7th Joint Meeting of GA, AFERP, ASP, PSE & SIF, 2008, 8, 3-8, Athens, Greece.
- ⑥ Shite M., Yamamura Y., Kurosaki F.: Signal transduction mechanisms involved in induced biosynthesis of defense-related compound in carrot. 5th International Conference on Plant Metabolomics, 2008, 7, 15-18, Yokohama.
- ⑦ Yamamura Y., Kurosaki F.: Real-time analysis of cell wall degrading enzymes expression in plant-pathogenic fungus *Fusarium*

verticillioides upon infection. 5th International Conference on Plant Metabolomics, 2008, 7, 15-18, Yokohama.

- ⑧ 李貞範, 小泉誠志, 林京子, 田中茂男, 林利光 : 緑藻ヒトエグサ *Monostroma nitidum* 由来硫酸化多糖の構造と生物活性. 日本薬学会第 128 年会, 2008, 3, 26-28, 横浜.
- ⑨ Rattananthongkom Ariya, 李貞範, 林京子, 林利光 : 空心蓮子草 *Alternanthera philoxeroides* 由来ウイルス活性物質の作用特性. 日本薬学会第 128 年会, 2008, 3, 26-28, 横浜.
- ⑩ 竹下亜澄, 李貞範, 林京子, 林利光 : 褐藻イトヨレモク *Sargassum trichophyllum* 由来生物活性多糖の探索. 日本薬学会第 128 年会, 2008, 3, 26-28, 横浜.
- ⑪ 志手真人, 山村良美, 林利光, 黒崎文也 : メチルジャスモン酸で誘導される *Scoparia dulcis* のジテルペン合成活性化に関わる情報伝達関連遺伝子群のクローニング. 日本薬学会第 128 年会, 2008, 3, 26-28, 横浜.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒崎 文也 (KUROSAKI FUMIYA)
富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・准教授
研究者番号 : 7 0 1 4 3 8 6 5

(2) 研究分担者

山田 恭司 (YAMADA KYOJI)
富山大学・大学院理工学研究部(理学)・教授
研究者番号 : 7 0 2 0 0 7 1 4
李 貞範 (LEE JUNG-BUM)
富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・助教
研究者番号 : 4 0 3 3 2 6 5 5

(3) 連携研究者

なし