

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14830

研究課題名（和文）イソキノリンアルカロイド生合成系におけるジャスモン酸シグナル伝達の分子機構解明

研究課題名（英文）Analysis of jasmonate-signaling involved in the regulation of isoquinoline alkaloid biosynthesis in California poppy

研究代表者

山田 泰之（Yamada, Yasuyuki）

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：20770879

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：医薬品原料として重要な植物二次代謝（特化代謝）産物の効率的な供給方法の確立は喫緊の課題である。申請者は、モルヒネに代表されるイソキノリンアルカロイド（以下IQA）の生産を調節する仕組み、特に植物ホルモンの1つであるジャスモン酸（以下JA）によってIQAの生産が誘導される仕組みを詳細に明らかにすることを目的に、本研究を行った。

IQA生合成研究のモデルであるケシ科ハナビシソウから、JAシグナル伝達に関わる複数の制御因子（CO11やMYC2）を単離し、それらが実際にIQAの生産調節に関わることを示した。さらに、これら因子と既知の転写因子群が協調的にJAシグナルを伝達する仕組みの一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、IQAに特異的なbHLHやAP2/ERF転写因子群がJAシグナル伝達系に担う機能の一端を明らかにした。JAシグナルは植物普遍的に存在し、植物二次代謝生合成系においても極めて重要である。IQA生合成系におけるJAシグナル伝達系の共通性や特異性を明らかにすることで、IQA生合成制御メカニズムの進化や生物学的意義の解明にも繋がることを期待される。

また、JAはIQAに限らず様々な二次代謝産物の産生を誘導することが知られており、本研究のさらなる発展は医薬品原料として重要な様々な植物二次代謝産物の効率的な供給系の開発に繋がることも期待される。

研究成果の概要（英文）：It is quite important to establish an efficient supply system for plant secondary metabolites (specialized metabolites), which are pharmaceutically important raw materials including alkaloids, terpenoids, and phenylpropanoids. The production of isoquinoline alkaloid (IQA) is induced by jasmonate (JA), one of the plant hormones. In this study, we tried to elucidate the detailed regulatory mechanisms of IQA biosynthesis induced by JA. California poppy (*Eschscholzia californica*) produces various IQAs. The expression of IQA biosynthesis in California poppy is reported to be regulated by a unique-type of bHLH transcription factors (TFs) and AP2/ERF TFs. In addition to these TFs, we isolated homologous genes of CO11, JAZ, and MYC2, which are core components of JA-signaling, and revealed the signaling cascade of CO11, MYC2, and other TFs.

研究分野：植物二次代謝

キーワード：イソキノリンアルカロイド ハナビシソウ 遺伝子発現制御 ジャスモン酸シグナル

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物が生産する二次代謝(特化代謝)産物は、医薬品原料などとして広く利用されている。近年、医薬品の需要は急速な高まりを見せており、薬用資源の効率的な供給方法の確立は喫緊の課題である。有用化合物の生合成経路や発現制御機構の解明、および生合成遺伝子の発現調節による代謝改変(代謝工学)は、この課題解決の糸口の一つであるが、発現制御に関する知見は乏しく、植物細胞において有用化合物の大量生産に至った例も限られる。

申請者は morphine や berberine に代表されるイソキノリンアルカロイド(IQA)生合成系の発現制御に関する研究を進め、これまでに複数の転写因子を単離・同定してきた¹。一般に、IQA産生は植物ホルモンであるジャスモン酸(JA)により誘導され、これら転写因子遺伝子の発現もJA応答性を示すことから、これらはJAシグナル伝達系において機能する転写因子群であると考えられた。しかし、JAシグナルがどのようなカスケードにより下流へと伝達され、IQA生合成遺伝子群の発現とIQA産生を誘導しているのかは不明であった。特に、IQA産生植物種には他の二次代謝生合成系には見られないユニークなbHLHが機能しており、IQA生合成系の発現制御に関わるJAシグナルカスケードも、他の二次代謝生合成系と異なる可能性も考えられた。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、IQA生合成系の遺伝子発現制御やIQA産生に関わるJAシグナル伝達系を分子レベルで詳細に解き明かすことを目的とした。具体的には、植物において高度に保存されているJAシグナル伝達系の中核を担うCORONATINE-INSENSITIVE1(COI1)、Jasmonate ZIM domain(JAZ)、MYC2がIQA生合成系のJAシグナル伝達に寄与するかどうかを、変異体などを用いて解析するとともに、JA応答性の新規発現制御因子や、既知の制御因子との相互作用因子などを探索し、その機能を明らかにすることで、IQA生合成系のJAシグナルカスケードを分子レベルで解明することを試みた。

3. 研究の方法

(1) ハナビシソウ *COI1* 発現抑制株の作出と解析

ハナビシソウ *COI1* 遺伝子を標的としたRNAiベクターを作成し、アグロバクテリウムを介してハナビシソウに形質転換し、培養細胞株を樹立した。MeJA処理0, 1, 6, 24時間後に細胞を回収し、qRT-PCRによる遺伝子発現解析とアルカロイドの分析を行った。

(2) ハナビシソウ MYC2 ホモログの機能解析

ハナビシソウゲノム中に存在するbHLHファミリーの分類によって単離されたMYC2ホモログ(*EcMYC2*)について、生合成酵素遺伝子プロモーター::Luciferaseベクターを用いたレポーターアッセイによる転写誘導活性の確認を行った。また、ハナビシソウJAZタンパク質との相互作用をBimolecular fluorescence complementation(BiFC)法により解析した。さらに、アグロインフィルトレーション法を用いて*EcMYC2*をハナビシソウ植物体に過剰発現し、qRT-PCRによる生合成遺伝子の発現解析を行った。

(3) JA 応答性 AP2/ERF 転写因子の機能解析

ハナビシソウゲノム中から見出された、JA応答性の6つのAP2/ERF(ERF)転写因子について、(2)と同様にアグロインフィルトレーション法を用いた過剰発現と遺伝子発現解析を行った。また、DEX誘導プロモーターを用いて*ERF*の発現誘導を植物体レベルで行い、qRT-PCRによる組織別遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

近年、申請者らはケシ科ハナビシソウのドラフトゲノム解読とデータベース整理を行い、ハナビシソウの様々な遺伝子ファミリーのカタログ化と実験系の整備を行ってきた^{2,3}。その結果、ハナビシソウからCOI1ホモログ(*EcCOI1*)、MYC2ホモログ(*EcMYC2*)、JAZホモログ(*EcJAZ1*, *EcJAZ3*)などを単離し、一過的発現用のベクターなどを作製してきた。本研究では、IQA生合成系の遺伝子発現制御に関わるJAシグナルカスケードの詳細を明らかにするために、上記の「研究方法」に記載した内容の実験を行い、以下の結果を得た。

(1) *EcCOI1* 発現抑制株の作出と解析

JA処理の有無に関わらず、*EcCOI1*の発現が顕著に抑制された3つの培養細胞株を選抜し、解析を行った結果、*EcCOI1*の抑制により、IQA生合成酵素や転写因子遺伝子のJAによる発現誘導が顕著に抑制されていた。特にIQA生合成系の上流で機能する生合成酵素遺伝子の発現量に顕著な差が見られた。また、*EcMYC2*や*EcERF*の発現はJA処理の早期に誘導が起こるが、*EcCOI1*発現抑制株ではJAによる一過的発現誘導が抑制されていた。一方、IQA産生植物にユニークなbHLH遺伝子(*EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2*, *EcbHLH48*)は、他の転写因子遺伝子に比べてJAによる発現誘導のタイミングが遅いこと、*EcCOI1*発現抑制株においてその誘導が抑制されることが示された。さらに、IQA蓄積量の解析の結果、生合成経路の中間体に相当するIQAの一部が*EcCOI1*発現抑制株において減少していた。以上より、*EcCOI1*が、IQA生合成系の遺伝子発現調節に関

わる JA シグナルカスケードの中核として機能し、下流における JA 応答性転写因子ネットワークの形成に関わる可能性が示唆された。

(2) EcMYC2 の機能解析

MYC2 の標的遺伝子として知られる *lipoxygenase2* (*LOX2*) や *LOX3* 遺伝子プロモーターをハナビシソウから単離し、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行ったところ、確かに EcMYC2 が転写誘導活性を有することを明らかにした。また、EcMYC2 と EcJAZ1, EcJAZ3 との相互作用が BiFC 法により確認され、EcMYC2 は一般的な MYC2 と同様の機能を有する可能性が示された。そこで、IQA 生合成酵素遺伝子 *Ec6OMT*, *EcBBE*, *EcCHS* プロモーターを用いて同様にレポーターアッセイを行った結果、いずれも有意な転写誘導活性が認められ、EcMYC2 が IQA 生合成酵素遺伝子の発現制御に関わる可能性が示された。また、*EcMYC2* の一過的過剰発現においても、ほぼ全ての IQA 生合成酵素遺伝子の有意な発現上昇が見られたほか、3 つの *EcbHLH1* 遺伝子群や *EcERF* 遺伝子の発現も有意に上昇していた。IQA 生合成酵素遺伝子プロモーター中のシス因子相同配列を探索した結果、MYC2 の標的である E-box や ERF の標的である GCC-box が複数見られたが、一部どちらかが存在しないケースも確認された。したがって、EcMYC2 は、IQA 生合成酵素遺伝子の発現を E-box を介して直接的に、あるいは他の転写因子を介して間接的に制御している可能性が示唆された。

(3) JA 応答性 EcERF 転写因子群の機能解析

ハナビシソウのゲノム解析から、JA 応答性を示す Group IX に属する ERF 転写因子群が IQA 生合成系の遺伝子発現制御に関わる可能性が示唆されていた⁴。そこで、候補として単離された 6 つの EcERF の機能を調べるために、ハナビシソウ実生における一過的過剰発現を行った。その結果、5 つの *EcERF* の過剰発現により、IQA 生合成酵素遺伝子群の発現が有意に上昇していた。また、IQA 生合成系にユニークな bHLH である *EcbHLH1-1* や *EcbHLH1-2* の発現も有意な上昇が認められたが、*EcbHLH48* など一部発現の変化が見られないものも存在した。さらに、各 *EcERF* の過剰発現により発現が上昇していた生合成酵素遺伝子のセットは完全には一致しておらず、各 EcERF 転写因子が認識する DNA 配列を詳細に解析していくことが今後必要であると考えられた。さらに、組織特異的に産生される IQA 生合成系の制御機構を明らかにすることを目的に、DEX 誘導プロモーターの下流に *EcERF* を導入したベクターをハナビシソウに形質転換し、得られた誘導ラインの DEX 処理を行い、組織ごとの遺伝子発現解析を行った。その結果、ハナビシソウ植物体の地上部と地下部のいずれかのみで発現が上昇する生合成酵素遺伝子が確認され、組織ごとに制御ネットワークが異なる可能性も示唆された。

以上の結果から、ハナビシソウにおいて JA シグナルは、EcCOI1-EcJAZ-EcMYC2 により伝達され、EcMYC2 が IQA 生合成系にユニークな bHLH1 や ERF の発現、ならびに生合成酵素遺伝子の発現を制御している可能性が考えられた。また、EcERF も IQA 生合成系にユニークな bHLH1 の発現制御に関わる可能性があり、転写因子群によるシグナルカスケードの存在が示唆された。また、これら制御因子ネットワークによる発現調節の仕組みが植物組織ごとに異なる可能性も示唆され、今後さらなる調節機構の解明と生産制御システムへの応用研究が進むと期待される。

< 引用文献 >

1. **Yamada Y.**, Sato F. “Transcription Factors in Alkaloid Engineering.” *Biomolecules*. 11(11):1719 (2021)
2. **Yamada Y.**, Hirakawa H., Hori K., Minakuchi Y., Toyoda A., Shitan N., Sato F. “Comparative analysis using the draft genome sequence of California poppy (*Eschscholzia californica*) for exploring the candidate genes involved in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis.” *Bioscience, Biotechnology Biochem.*, 85(4), 851-859 (2021)
3. Becker A., **Yamada Y.**, Sato F. “California poppy (*Eschscholzia californica*), the Papaveraceae golden girl model organism for evodevo and specialized metabolism.” *Front. in Plant Sci.*, 14, 1084358 (2023)
4. **Yamada Y.**, Nishida S., Shitan N., Sato F. “Genome-wide identification of AP2/ERF transcription factor-encoding genes in California poppy (*Eschsholzia californica*) and their expression profiles in response to methyl jasmonate.” *Sci. Rep.*, 10(1), 18066 (2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Becker Annette, Yamada Yasuyuki, Sato Fumihiko	4. 巻 14
2. 論文標題 California poppy (<i>Eschscholzia californica</i>), the Papaveraceae golden girl model organism for evodevo and specialized metabolism	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2023.1084358	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 該当する
1. 著者名 Yamada Yasuyuki, Nishida Shohei, Shitan Nobukazu, Sato Fumihiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Genome-Wide Profiling of WRKY Genes Involved in Benzylisoquinoline Alkaloid Biosynthesis in California Poppy (<i>Eschscholzia californica</i>)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2021.699326	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 Urui Miya, Yamada Yasuyuki, Ikeda Yoshito, Nakagawa Akira, Sato Fumihiko, Minami Hiromichi, Shitan Nobukazu	4. 巻 20
2. 論文標題 Establishment of a co-culture system using <i>Escherichia coli</i> and <i>Pichia pastoris</i> (<i>Komagataella phaffii</i>) for valuable alkaloid production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbial Cell Factories	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12934-021-01687-z	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 Yamada Yasuyuki, Urui Miya, Oki Hidehiro, Inoue Kai, Matsui Haruyuki, Ikeda Yoshito, Nakagawa Akira, Sato Fumihiko, Minami Hiromichi, Shitan Nobukazu	4. 巻 13
2. 論文標題 Transport engineering for improving the production and secretion of valuable alkaloids in <i>Escherichia coli</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metabolic Engineering Communications	6. 最初と最後の頁 e00184 ~ e00184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mec.2021.e00184	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 Yamada Yasuyuki, Sato Fumihiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Transcription Factors in Alkaloid Engineering	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1719 ~ 1719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom11111719	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 -

[学会発表] 計12件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 山田泰之, 西田昇平, 辰己泰基, 土反伸和, 佐藤文彦
2. 発表標題 ベンジルイソキノリンアルカロイド生合成系の遺伝子発現制御に関わるAP2/ERF転写因子の機能解析
3. 学会等名 第39回日本植物バイオテクノロジー学会(堺)大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 萌子、武富 萌華、土反 伸和、三浦 謙治、山田 泰之
2. 発表標題 ケシ科ハナビソウにおける一過性遺伝子発現系の確立
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安田 彩乃、土反 伸和、山田 泰之
2. 発表標題 ハナビソウのアルカロイド生合成に関わるN-methyltransferase の探索と機能解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 潤井みや, 山田泰之, 池田義人, 中川 明, 佐藤文彦, 南 博道, 土反伸和
2. 発表標題 大腸菌とビキア酵母の共培養による効率的なスチロピナルカロイドの生産
3. 学会等名 第38回日本植物バイオテクノロジー学会つくば大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田泰之, 潤井みや, 松井治幸, 井上開, 大木秀浩, 佐藤文彦, 南 博道, 土反伸和
2. 発表標題 輸送工学を利用した効率的なアルカロイド生産系の確立
3. 学会等名 第38回日本植物バイオテクノロジー学会つくば大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田泰之, 潤井みや, 松井治幸, 井上開, 大木秀浩, 佐藤文彦, 南 博道, 土反伸和
2. 発表標題 輸送工学による効率的なイソキノリンアルカロイド生産系の構築
3. 学会等名 日本生薬学会第67回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 玉垣絵美, 佐藤文彦, 土反伸和, 山田泰之
2. 発表標題 エンゴサクにおけるアルカロイド生合成に関わるO-methyltransferaseの機能解析 -corydaline生合成系の解明を目指して-
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 潤井みや、山田泰之、池田義人、中川 明、佐藤文彦、南 博道、土反伸和
2. 発表標題 有用物質生産を目指した微生物共培養系の確立と輸送工学を用いた増産への応用
3. 学会等名 膜シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamada Y., Urui M., Oki H., Inoue K., Matsui H., Ikeda Y., Nakagawa A., Sato F., Minami H., Shitan N.
2. 発表標題 Transport Engineering Enabled High Production and Secretion of Valuable Plant Alkaloids in Escherichia coli
3. 学会等名 Metabolic Engineering 14, July 13-14, 2021(web) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 潤井みや、山田泰之、池田義人、中川明、佐藤文彦、南博道、土反伸和
2. 発表標題 植物有用産物の効率的生産を目指した複合微生物培養系の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度京都大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田泰之
2. 発表標題 輸送工学を用いた植物有用アルカロイドの効率的微生物生産系の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度京都大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 潤井みや、山田泰之、池田義人、中川明、佐藤文彦、南博道、土反伸和
2. 発表標題 アルカロイド生産性大腸菌とピキア酵母の共培養系の確立と増産への応用
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会（名古屋）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------