

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590146

研究課題名(和文) 新たな天然薬用資源としての高等植物の潜在的二次代謝能の顕在化とその応用

研究課題名(英文) Induction of latent biosynthetic activities of secondary metabolites in higher plants as the novel medicinal resources of natural products

研究代表者

黒崎 文也 (KUROSAKI, FUMIYA)

富山大学・医学薬学研究部(薬学)・教授

研究者番号：70143865

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)：本研究は、植物ホルモンの一種であるメチルジャスモン酸の刺激に呼応して高等植物の二次代謝活性が誘導される機構を解明し、それを有用物質生産に応用することを目的としたものである。細胞内情報伝達関連因子として、高等植物に特異的な単量体GTP結合タンパクであるRac型GTPaseをコードした遺伝子をクローニングし、これがジャスモン酸刺激の伝達に寄与することを示した。次いで、Rac型GTPase遺伝子を導入・過剰発現させることで細胞内情報伝達系を改変した植物体を作成し、この組み換え体の二次代謝能が顕著に活性化されることを見出した。

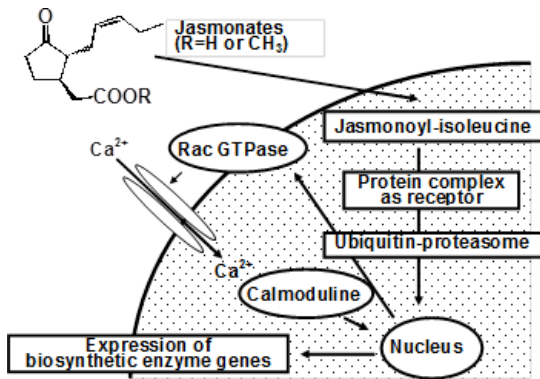
研究成果の概要(英文)：The aim of the present study is the elucidation of the signal transduction mechanism of the induction of secondary metabolic activity induced by the stimulation of a plant hormone, jasmonic acid. Several cDNA cloned encoding Rac GTPase, a family of monomeric GTP-binding proteins specifically observed in higher plants, were isolated, and a homologue of which translate product should function in jasmonate-signaling was identified. Several medicinal plants were transformed by the Rac GTPase gene, and it was found that these transgenic plants showed high productivities of the useful natural products. These results suggested that the engineering of jasmonates-signaling processes in plant cells by transformation with appropriate genes would be a novel method for the transcriptional activation of several biosynthetic enzymes involved in secondary metabolism of various useful plants.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：植物 バイオテクノロジー 物質生産 遺伝子 有用資源 情報伝達機構

1. 研究開始当初の背景

(1) 高等植物の二次代謝は多彩であり貴重な医薬資源であるが、最近、植物を特殊な条件下に置いた場合にのみ、いわゆる「ストレス化合物」として新規天然物が生成することが広く知られるようになった。同時に、これらの現象の多くが植物ホルモンの一種であるジャスモン酸の添加によって再現できることが示されている。



(図1)

(2) ジャスモン酸は高等植物の二次代謝能を誘導あるいは活性化する機能を有することが知られているが、この植物ホルモンの細胞内情報伝達機構については ubiquitin-proteasome 系を介して核内にメッセージが届くことが示されているにとどまっております、このホルモンによる刺激がどのようにして二次代謝関連遺伝子の発現に結びつくかは不明のままであった。

(3) しかしながら、最近我々はジャスモン酸で誘導される二次代謝能の誘導に calmodulin をキートとする細胞内 Ca カスケードの活性化が必須であって、これには Rac 型と呼ばれる植物に特異的な単量体 GTP 結合タンパクが関わっていることを見出し報告している(図1)。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は「高等植物細胞の情報伝達系を制御・改変することによって植物が潜在的に保有している天然物生合成関連遺伝子群の転写活性を誘導し、通常の状態の植物には見られない天然物の生合成能を顕在化すること」である。

(2) ジャスモン酸をはじめとする外部刺激に呼応した天然物の生合成酵素遺伝子群の発現機構は、植物種・化合物種に依存することなく良く保存されていることが明らかにされている。本研究は、ジャスモン酸シグナルの細胞内情報伝達機構を解明し、このプロセスに関わる機能タンパクの遺伝子を導入した植物細胞を作製することで植物ホルモンによる刺激の伝達過程を細胞内に再現し、潜在的に埋蔵されている誘導性二次代謝物の生合成活性を誘導することを目的として

いる。

(3) 更に、普段はマスクされており観察することができない潜在的二次代謝能を顕在化することによって、その結果生成する未知天然物を「新規な薬用資源」として利用することを旨とするものである。

3. 研究の方法

(1) まず、Rac 型 GTPase 遺伝子、*Sdrac-1*、*Sdrac-2* を単離し、GST との融合タンパクを生成する組換えベラドンナを作成した。これにジャスモン酸刺激を加えマイクロゾーム画分の GST 活性を測定して、*Sdrac-1*、*Sdrac-2* の膜構造への移動について検討した。

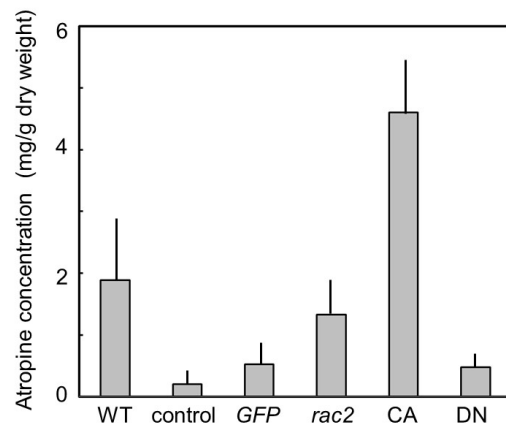
(2) *Sdrac-2* あるいはこの遺伝子の翻訳産物のアミノ酸配列に変異を導入し常時活性型とした変異体である *Sdrac-2-CA*、更に常時不活性型とした *Sdrac-2-DN* を導入したベラドンナのアトロピン含量を HPLC で定量し、有用物質生産能への効果について検討した。

(3) *Aquilaria* 属植物の芳香性セスキテルペン生合成をモデルとして、まず、ジャスモン酸刺激を与えた *A. microcarpa* の培養細胞から  $\delta$ -guaiene synthase 遺伝子をクローニングし、大腸菌での過剰発現によって得られた組み換えタンパクを用いて酵素反応の生成物を GC-MS により解析した。

(4) 様々な細胞内情報伝達阻害剤で処理した際の  $\delta$ -guaiene synthase 遺伝子発現レベルの変化を RT-PCR によって観察し、このプロセスに関与するモジュレーターを特定した。次いで、Rac GTPase 及びその変異遺伝子を導入・過剰発現させた *A. microcarpa* の培養細胞を作成して、組み換え植物の  $\delta$ -guaiene synthase 遺伝子の転写活性を検討した。

4. 研究成果

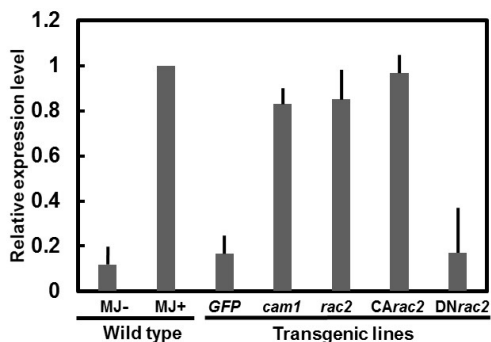
(1) *GST-Sdrac-1*、*GST-Sdrac-2* 組換えベラドンナはジャスモン酸刺激に応答し、両 GTPase とともに 5 - 30 分程度のうちに膜構造へ移行す



(図2)

ることが明らかとなった。続いて GFP をレポーターとする GFP-Sdrac-2、GFP-Sdrac2-CA、GFP-Sdrac2-DN を導入したペラドンナを作成し蓄積されるアトロピンを HPLC によって定量したところ、圃場栽培したものと比較して組換え体における含有量が顕著に増加していることが確認された(図2)。このことから、Sdrac-2 遺伝子はそのソースである *Scoparia dulcis* のみならず、他の植物の二次代謝産物の生合成能をも活性化させることが明らかとなった。

(2) *A. microcarpa* 培養細胞からクローニングした  $\delta$ -guaiene synthase 遺伝子を大腸菌で過剰発現させ GST との融合タンパクとして得た後に、基質である farnesyl diphosphate とインキュベートし生成物を GC-MS で解析した。その結果、 $\delta$ -guaiene、 $\alpha$ -guaiene、 $\beta$ -elemene の 3 種類の生成物が確認された。これらの観察から、*A. microcarpa* が潜在的に保有している  $\delta$ -guaiene synthase は *A. sinensis* 由来のものと同様した触媒特性を



(図3)

示すことが明らかとなった。また、 $\delta$ -guaiene synthase 遺伝子の発現は、calmodulin 阻害剤や Rac GTPase 阻害剤の存在下で抑制された。更に、Rac GTPase 遺伝子、あるいはその常時活性型 (CA) 遺伝子を過剰発現させた組み換え体においては、ジャスモン酸非存在下でも  $\delta$ -guaiene synthase 遺伝子の顕著な発現が観察された(図3)。これらの結果より、Rac GTPase を利用した細胞内情報伝達系の改変によって高等植物が潜在的に保有している二次代謝活性が効率よく顕在化することが示された。

(3) 今回の研究で得られた結果より、

- 1 ジャスモン酸による植物二次代謝活性誘導に関わる細胞内プロセスにおいて Rac 型 GTPase が重要な役割を担っていること。
- 2 Rac 型 GTPase を導入・過剰発現させることで、通常発現している二次代謝能であるペラドンナのアトロピン生成が顕著に活性化されること。
- 3 Rac 型 GTPase を導入・過剰発現させることで、通常は発現していない *A. microcarpa* の芳香性セスキテルペン生合成能が誘導されること。

がそれぞれ示された。

これらの結果は、細胞内情報伝達系の改変によって、植物の潜在的二次代謝能のみならず、通常発現している天然物生産能も活性化されることを示している。これは同時に、植物由来の有用物質生産において、本法が幅広い植物種の多彩な天然物生産に普遍的に応用できる新規な方法論であることを強く示唆するものであると思われる。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計21件)

- 1 Lee, J. B. Hirohashi S. Yamamura Y. Taura F. & Kurosaki F. Induction, cloning and functional expression of a sesquiterpene biosynthetic enzyme,  $\delta$ -guaiene synthase, of *Aquilaria microcarpa* cell cultures. *Nat. Prod. Commun.* **9**, 1231-1236 (2014) 査読有 <http://www.naturalproduct.us/>
- 2 Yamamura Y. Mizuguchi Y. Taura F. & Kurosaki F. Transcriptional activation of a geranylgeranyl diphosphate synthase gene, GGPPS2, isolated from *Scoparia dulcis* by the treatment with methyl jasmonate and yeast extract. *J. Nat. Med.* **68**, 748-753. (2014) 査読有 DOI 10.1007/s11418-014-0855-7
- 3 Asano K. Lee J. B. Yamamura Y. & Kurosaki F. Enhanced accumulation of atropine in *Atropa belladonna* transformed by Rac GTPase gene isolated from *Scoparia dulcis*. *Transgenic Res.* **22**, 1249-1255 (2013) 査読有 DOI 10.1007/s11248-013-9733-4
- 4 Nomura T. Shiozawa M. Ogita S. & Kato Y. Occurrence of hydroxycinnamoylputrescines in xylogenic bamboo suspension cells. *Plant Biotech.* **30**, 447-453 (2013) 査読有 DOI:10.5511/plantbiotechnology.13.07.04a
- 5 Kato Y. Nomura T. Ogita S. Takano M. & Hoshino K. Two new  $\beta$ -glucosidases from ethanol-fermenting fungus *Mucor circinelloides* NBRC 4572: enzyme purification, functional characterization, and molecular cloning of the gene. *Appl. Microbiol. Biotech.* **97**, 10045-10056 (2013) 査読有 DOI:10.1007/s00253-013-5210-5
- 6 Kenmotsu Y. Asano K. Yamamura Y. & Kurosaki F. Cloning and expression of putative Rac/Rop GTPase genes, *Am-rac1* and *Am-rac2*, involved in methyl jasmonate-induced transcriptional activation of farnesyl diphosphate synthase in cell cultures of *Aquilaria microcarpa*. *Plant Mol. Biol. Rep.* **31**,

- 539-546 (2013) 査読有  
DOI:10.1007/s11105-012-0529-0
- 7 Nomura T. Ogita S. & Kato Y. A novel lactone-forming carboxylesterase: molecular identification of a tuliposide A-converting enzyme in tulip, *Plant Physiol.* **159**, 565-578 (2012) 査読有  
DOI:10.1104/pp.112.195388
- 8 Ogita S. Ohki S. Nomura T. & Kato Y. A  $\beta$ -glucosidase activity potentially involved in cell division and wall development of *Phyllostachys* bamboo suspension cells. *Am. J. Plant Sci.* **3**, 1066-1072 (2012) 査読有  
DOI: 10.4236/ajps.2012.38127
- 9 Ogita S., Kikuchi, N., Nomura T. & Kato Y. The mutated acetolactate synthase gene from rice as a non-antibiotic selection marker for transformation of bamboo cells. *Am. J. Plant Sci.* **3**, 368-372 (2012) 査読有  
DOI:10.4236/ajps.2012.33044
- 10 Kenmotsu Y. Yamamura Y. & Kurosaki F. Expression of specific calmodulin genes isolated from tissue cultured cells of *Aquilaria microcarpa* in response to methyl jasmonate and yeast extract. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **48**, 627-631 (2012) 査読有  
DOI 10.1007/s11627-012-9473-9
- 11 Taniguchi Y. Tajika H. Takao Y. Tatsuo Y. Yamamura Y. Kurosaki F. Fujino H. Setoyama T. & Nakazawa M. Accumulation of sennosides in leaflets, flowers and fruits of *Cassia alata*. *Jpn. J. Pharmacognosy* **66**, 77-80 (2012) 査読有  
[http://www.jsphcg.or.jp/jsp\\_e-pub.htm](http://www.jsphcg.or.jp/jsp_e-pub.htm)
- 12 Kenmotsu Y. Ogita S. Kato Y. Yamamura Y. Takao Y. Tatsuo Y. Fujino H. Kadota S. & Kurosaki F. Methyl jasmonate-induced enhancement of expression activity of *Am-FaPS-1*, a putative farnesyl diphosphate synthase gene from *Aquilaria microcarpa*. *J. Nat. Med.* **65**, 194-197 (2011) 査読有  
DOI 10.1007/s11418-010-0451-4
- 13 Mitamura T. Yamamura Y. & Kurosaki F. Modification and translocation of Rac/Rop guanosine 5'-triphosphate-binding proteins of *Scoparia dulcis* in response to stimulation with methyl jasmonate. *Biol. Pharm. Bull.* **34**, 845-849 (2011) 査読有  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/34/6/34\\_6\\_845/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/34/6/34_6_845/_pdf)
- 14 Ogita S. Kikuchi N. Nomura T. & Kato Y. A practical protocol for particle bombardment-mediated transformation of *Phyllostachys* bamboo suspension cells. *Plant Biotech.* **28**, 43-50 (2011) 査読有  
DOI:10.5511/plantbiotechnology.10.1101a
- 15 Fukuta Y. Nanda S. Kato Y. Yurimoto H. Sakai Y. Komeda H. & Asano Y. Characterization of a new (R)-hydroxy-nitrile lyase from Japanese apricot *Prunus mume* and cDNA cloning and secretory expression of one of the isozymes in *Pichia pastoris*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **75**, 214-220 (2011) 査読有  
DOI:10.1271/bbb.100187
- 16 Shigetomi K. Omoto S. Kato Y. & Ubukata M. Asymmetric total synthesis of 6-tuliposide B and its biological activities against tulip pathogenic fungi. *Biosci. Biotech. Biochem.* **75**, 718-722 (2011) 査読有  
DOI:10.1271/bbb.100845
- [学会発表](計8件)
- 1 廣橋峻, 李貞範, 山村良美, 田浦太志, 黒崎文也: *Aquilaria microcarpa* 培養細胞における $\delta$ -guaiene synthase 遺伝子転写活性の誘導. 日本薬学会大 135 年会, 2015, 3, 25-28, 神戸.
- 2 馬淵彩香, 山村良美, 黒崎文也: 薬用植物スコパリア由来の NADPH: シトクローム P450 還元酵素の単離と解析 第 31 回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会, 2013, 9, 10-12, 札幌.
- 3 黒崎文也, 李貞範, 山村良美: メチルジヤスモン酸による植物二次代謝能活性化機構の解明と物質生産への応用. 日本生薬学会第 60 回年会, 2013, 9, 7-8, 札幌.
- 4 Yamamura Y. Mabuchi A. & Kurosaki F.: Molecular cloning and functional characterization of an NADPH: cytochrome P450 reductase from a tropical plant *Scoparia dulcis*. 61<sup>st</sup> international Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA), 2013, 9, 1-5. Muenster, Germany.
- 5 高尾泰昌, 辰尾良秋, 山村良美, 黒崎文也, 藤野廣春, 吉田尚利: 園内に保有する薬用植物の品質評価~ 第 1 報キハダ属の品質評価~. 日本生薬学会第 59 回年会, 2012, 9, 17-18, 千葉.
- 6 江守佑介, 山村良美, 黒崎文也: *Scoparia dulcis* のジテルペン生合成に關与する ent-kaurene synthase 遺伝子のクローニングと解析. 日本生薬学会第 58 回年会, 2011, 9, 24-25, 東京.
- 7 井上幸枝, 山村良美, 黒崎文也: 薬用植物 *Scoparia dulcis* 由来のチトクローム P450 分子種のクローニングと発現解析.

日本生薬学会第 58 回年会, 2011, 9, 24-25, 東京.

- 8 監物慶英, 沢登亮吾, 高尾泰昌, 辰尾良秋, 藤野廣春, 山村良美, 黒崎文也 : メチルジャスモン酸で誘導される *Aquilaria microcarpa* のセスキテルペン生合成活性に関わる情報伝達関連遺伝子群のクローニングと発現解析. 日本生薬学会第 58 回年会, 2011, 9, 24-25, 東京.

## 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)・教授  
研究者番号 : 7 0 1 4 3 8 6 5

### (2) 研究分担者

加藤 康夫 (KATOH, Yasuo)  
富山県立大学・工学部・教授  
研究者番号 : 2 0 2 5 4 2 3 7

萩田信二郎 (OGITA, Shinjiro)  
富山県立大学・工学部・准教授  
研究者番号 : 5 0 3 6 3 8 7 5

### (3) 連携研究者

なし