

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570041

研究課題名(和文)植物含窒素化合物の中心代謝から特異代謝への代謝アロケーション調節機構の解明

研究課題名(英文)Regulatory mechanism in metabolic allocation of nitrogen-containing compounds from central metabolisms to specialized metabolisms in plants

研究代表者

山崎 真巳 (Yamazaki, Mami)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70222370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物の化学多様性は、種、系統等に固有の多様な物質代謝(特異代謝)を有することによる。これらの特異代謝は種を超えて普遍的に存在する中心代謝の産物・中間体から派生する。これまで中心代謝から特異代謝への代謝配分の制御のしくみについてはよく知られていなかった。アミノ酸(リジン、オルニチンおよびトリプトファン)の代謝経路からキノリチジンアルカロイド、ニコチンアルカロイドおよびインドールアルカロイドなどの生合成への分岐点となるアミノ酸脱炭酸及びそれに続く酸化反応について、各触媒酵素を分子生物学的に解析するとともにそれぞれの触媒酵素遺伝子の発現制御やタンパクレベルでの代謝配分調節機構について調べた。

研究成果の概要(英文)：Most of plant alkaloids are produced from amino acids. In this study, the molecular basis of metabolite allocation from amino acid metabolism (central metabolism) to alkaloid biosynthesis (specialized metabolism) was investigated. Quinolizidine alkaloids (QA) and lycopodium alkaloids (LA) are derived from lysine. is lysine decarboxylation. The cDNAs encoding lysine/ornithine decarboxylase (L/ODC) catalyzing the first step QA and LA biosynthesis were isolated from several species and characterized using recombinant protein expressed in *E. coli*. The enzymes from QA/LA-producing plants exhibited relatively higher lysine-decarboxylase activities comparing to those of other species. It is suggested that this difference leads the change in metabolic allocation from lysine metabolism to alkaloid biosynthesis.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：アルカロイド アミノ酸 リジン オルニチン トリプトファン 特異代謝 二次代謝

1. 研究開始当初の背景

植物は、多様な化合物を大量に生産している。それらは生物学的・生態学的な意味をもつばかりでなく、人類にとっても重要な天然化合物資源である。その化学多様性は、種、系統等に固有の特異代謝（二次代謝）の多様性に因る。これらの特異代謝は種を超えて普遍的に存在する中心代謝（一次代謝）における中間体から派生する。この中心代謝から特異代謝への代謝配分（代謝アロケーション）の制御のしくみについてはよく知られていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、植物体内でのアミノ酸やポリアミンなどの中心代謝から含窒素化合物（主に生理活性アルカロイド）を生じる特異代謝への代謝アロケーション制御について、その制御機構の分子基盤を明らかにすることを目的とする。特にアミノ酸のリジン、オルニチンあるいはトリプトファンを前駆体として生合成される植物アルカロイドについて中心代謝から特異代謝への分岐点となる反応段階の酵素タンパク質に関する分子生物学的解析を行った。

3. 研究の方法

リジンを前駆体として生合成されるキノリチジンアルカロイドおよびリコポディウムアルカロイドを生産するマメ科植物およびヒカゲノカズラ科植物からリジンの脱炭酸を触媒する酵素遺伝子を単離し、組換えタンパク質を用いて基質特異性ならびに基質特異性決定に必須なアミノ酸残基を明らかにした。トリプトファンを前駆体として生合成されるモノテルペノイドインドールアルカロイド（カンプトテシン）を生産するアカネ科チャボイナモリの毛状根において、トリプトファンの脱炭酸を触媒するトリプトファン脱炭酸酵素(TDC)について、RNAi 法による遺伝子抑制を行い、代謝変動を解析した。さらにトリプトファンの脱炭酸によって生じるトリプタミンのアルカロイドへの取り込み段階を触媒するストリクトジジン合成酵素(STR)に点変異導入により基質特異性を变化させたタンパク質を導入し代謝変動を解析した。各触媒酵素を分子生物学的に解析するとともにそれぞれの触媒酵素遺伝子の発現制御やタンパクレベルでの代謝配分調節機構について調べた。

4. 研究成果

(1) リジン由来のキノリチジンアルカロイドを生産するホソバルピナス (*Lupinus angustifolius*) からリジン脱炭酸酵素遺伝子の単離と機能解析を行った。ホソバルピナスのアルカロイド生産品種 (Fest) と非生産品種 (Unihervest) の発現遺伝子を PCR-select cDNA subtraction 法により比較し、ピター品種特異的に発現する遺伝子配列

をプロファイリングしたところ、オルニチン脱炭酸酵素(ODC)と相同性を示す DNA 配列が得られた。オルニチンはリジンより炭素鎖 1 つ短いアミノ酸である。オルニチン由来のアルカロイドであるニコチンを生産するタバコは ODC を有し、タバコ ODC はリジン脱炭酸活性(LDC 活性)を副反応としてわずかながら示すことが知られている。そこで得られた配列情報をもとに全長 ORF を含む cDNA を単離した。これを大腸菌で発現させた組換えタンパク質を用いて触媒酵素活性を測定した結果、ホソバルピナス由来の ODC ホモログの組換えタンパク質は、タバコの酵素に比べてリジンを効率よく脱炭酸する活性を有することが明らかになり、これを La-L/ODC と命名した。

(2) L/ODC の種間での比較と分子系統解析

ホソバルピナスの他にキノリチジンアルカロイドを生産するマメ科のクララ、イヌエンジュ、クソエンドウならびにリジン由来のリコポディウムアルカロイドを生産するヒカゲノカズラから ODC ホモログ酵素も同様にリジンを効率よく脱炭酸する活性を有することが明らかになりこれらを L/ODC と呼ぶこととした。これらのリジンを効率よく脱炭酸する L/ODC の推定アミノ酸配列を他の ODC の配列と比較した。アミノ酸配列に基づく L/ODCs の分子系統樹を作成すると、系統樹全体は種の系統関係を反映した形に分岐し、キノリチジンアルカロイド生産植物の L/ODC は同じクレードにまとまった。さらにこれらの活性中心付近のアミノ酸に共通な特徴のあることがわかった。ホソバルピナスの La-L/ODC の活性中心近傍の 344 番目のアミノ酸残基はフェニルアラニン(F)であった。この残基は他のキノリチジンアルカロイド生産植物の L/ODC にも共通であった。他の多くの植物および動物では当該残基はヒスチジン(H)でダイズではチロシン(Y)であった。

(3) 上記の結果を基に La-L/ODC に点変異を導入し活性を測定した。F344H 変異酵素ではリジンに対する K_m 値が著しく増加しリジンへの親和性が著しく低下した。タンパク質の立体構造モデリング解析を行うと F344H 変異により、活性中心の₃₁₀-ヘリックス構造が伸びて酵素のキャピティーサイズが小さくなりオルニチン(プトレシン)より大きなリジン(カダベリン)が入れなくなる。このことからリジン由来のアルカロイド生産植物の酵素では基質キャピティーが広がりリジンが入りやすくなってアルカロイド前駆体のカダベリンを生成できるようになり、それがアルカロイド生産につながったと推測された。これらのことから、1アミノ酸残基の変異による酵素の反応特性の変化が、中心代謝の

アミノ酸代謝から特異代謝への代謝配分を決定することが明らかになった。この変異はもとの ODC 活性を保持したまま起ったことが示唆された。

(4) トリプトファン由来のモノテルペノイドインドールアルカロイドであるカンプトテシンを生産するアカネ科チャボイナモリを用いて、トリプトファンからアルカロイドへの代謝分岐点を触媒するトリプトファン脱炭酸酵素(TDC)の遺伝子抑制を行った。具体的には RNAi 法により TDC 遺伝子の発現を抑制した毛状根を作出した。さらにこれらの遺伝子抑制毛状根の代謝物を LC-FTMS ならびに LC-TOFMS を用いて網羅的に分析した。遺伝子抑制を行った毛状根で最終産物のカンプトテシンが減少し、同様に減少する代謝物ピークも複数見られた。これらのピークについては精密質量から推定される分子組成から生合成中間体候補の分子構造を推定することができた。

(5) 多様な植物モノテルペノイドインドールアルカロイドの共通生合成中間体であるストリクトシジンは、トリプトファンの脱炭酸により生じるトリプタミンとモノテルペノイドのセコログニンが縮合することにより生産される。この反応はストリクトシジン合成酵素(STR)により触媒される。点変異導入により基質特異性を変更したニチニチソウの STR(mSTR)をチャボイナモリに導入した毛状根を作出した。これらに 6 位が F, Cl, Br で置換されたトリプタミンを添加したところ、これらの置換トリプタミンがそれぞれ対応するカンプトテシン誘導体に変換された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- (1) Somnuk Bunsupa, Kana Komastu, Ryo Nakabayashi, Kazuki Saito and Mami Yamazaki: Revisiting anabasine biosynthesis in tobacco hairy roots expressing plant lysine decarboxylase gene by using ¹⁵N-labeled lysine. *Plant Biotech.* (査読有) **31**, 511-518 (2014)
DOI: 10.5511/plantbiotechnology.14.1008a
- (2) Takashi Asano, Kanae Kobayashi, Emi Kashihara, Hiroshi Sudo, Ryosuke Sasaki, Yoko Iijima, Koh Aoki, Daisuke Shibata, Kazuki Saito, Mami Yamazaki: Suppression of camptothecin biosynthetic genes results in metabolic modification of secondary products in hairy roots of *Ophiorrhiza pumila*. *Phytochemistry* (査読有) **91**, 128-139 (2013)
DOI: 10.1016/j.phytochem.2012.04.019
- (3) Mami Yamazaki, Keiichi Mochida, Takashi

Asano, Ryo Nakabayashi, Motoaki Chiba, Udomson Nirin, Yasuyo Yamazaki, Dayan B Goodenowe, Ushio Sankawa, Takuhiro Yoshida, Atsushi Toyoda, Yasushi Totoki, Yoshiyuki Sakaki, Elsa Góngora-Castillo, C Robin Buell, Tetsuya Sakurai, Kazuki Saito: Coupling Deep Transcriptome Analysis with Untargeted Metabolic Profiling in *Ophiorrhiza pumila* to Further the Understanding of the Biosynthesis of the Anti-Cancer Alkaloid Camptothecin and Anthraquinones. *Plant and Cell Physiology* (査読有) **54**, 686-696 (2013)
DOI: 10.1093/pcp/pct040

- (4) Somnuk Bunsupa, Kae Katayama, Emi Ikeura, Akira Oikawa, Kiminori Toyooka, Kazuki Saito, and Mami Yamazaki: Lysine decarboxylase catalyzes the first step of quinolizidine alkaloid biosynthesis and coevolved with alkaloid production in Leguminosae. *Plant Cell* (査読有) **24**, 1202-1216 (2012)
DOI: 10.1105/tpc.112.095885
- (5) Somnuk Bunsupa, Mami Yamazaki, Kazuki Saito: Quinolizidine alkaloid biosynthesis: recent advances and future prospects. *Frontiers in Plant Science* (査読有) **3**, 239 (2012)
DOI: 10.3389/fpls.2012.00239

〔学会発表〕(計 39 件)

- (1) Somnuk Bunsupa, Kaori Aoyagi, Kazuki Saito, Mami Yamazaki: Cloning and Characterization of Copper Amine Oxidase from Quinolizidine-alkaloid Accumulating *Lupinus angustifolius*. 第 55 回日本植物生理学会年会, 2014 年 3 月 18-20 日, 富山大学 (富山市)
- (2) Nirin Udomsom, Miki Tokoro, Ryosuke, Imai, Kazuki Saito, Mami Yamazaki: Molecular Cloning and Characterization of ERF Transcription Factors Possibly Involved in Camptothecin Biosynthesis in *Ophiorrhiza pumila*. 第 55 回日本植物生理学会年会, 2014 年 3 月 18-20 日, 富山大学 (富山市)
- (3) 三村徹郎, 姉川彩, 山本浩太郎, 大西三輪, 深城英弘, 山崎真巳, 高橋勝利: 質量顕微鏡による植物代謝産物の分布解析. 第 55 回日本植物生理学会年会, 2014 年 3 月 18-20 日, 富山大学 (富山市)
- (4) 丸山瑛, Bunsupa Somnuk, 斉藤和季, 山崎真巳: リコポジウムアルカロイド産生植物におけるリジン脱炭素酵素遺伝

- 子の機能解析 .日本生薬学会第 60 回年会, 2013 年 9 月 7-8 日, 北海道医療大 (当別町)
- (5) 青柳香里 ,Bunsupa Somnuk ,斉藤和季 ,山崎真巳 : キノリジンアルカロイド含有品種特異的に発現するアミノ酸化酵素の機能解析 . 日本生薬学会第 60 回年会, 2013 年 9 月 7-8 日, 北海道医療大 (当別町)
- (6) Mami Yamazaki, Takashi Asano, Keiichi Mochida, Kazuki Saito: Gene Mining for Camptothecin Production in *Ophiorrhiza pumila*. TERPNET2013 11th International Meeting on Biosynthesis , Function and Biotechnology of Isoprenoids in Terrestrial and Marine Organisms, 2013 年 6 月 1-5 日, コリンバリ (ギリシャ)
- (7) Somnuk Bunsupa , 山崎真巳 , 斉藤和季 : Transcriptome mining of genes associated with quinolizidine alkaloids biosynthesis in *Lupinus angustifolius*. 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 27-30 日, パシフィコ横浜 (横浜市)
- (8) 山崎真巳 , 山本天心 , 中林亮 , 斉藤和季 : 改変ストリクトシジン合成酵素を用いた非天然型カンプトテシン誘導體清算の試み . 日本薬学会第 133 年会 (横浜) , 2013 年 3 月 27-30 日, パシフィコ横浜 (横浜市)
- (9) Somnuk Bunsupa, Hideki Ueno, Akira Maruyama, Madoka Yamashita, Akira Oikawa, Ryosuke, Sasaki, Kazuki Saito, Mami Yamazaki: Cloning and Characterization of Plant Lys Decarboxylase: Diversity and Molecular Evolution. 第 54 回日本植物生理学会年会, 2013 年 3 月 21-23 日, 岡山大学 (岡山市)
- (10) Bunsupa Somnuk, Mami Yamazaki, Kazuki Saito: Transcriptome mining and functional characterization of genes associated with quinolizidine alkaloids biosynthesis in *Lupinus angustifolius*. 新学術領域研究「生合成マシナリー」第 3 回公開シンポジウム, 2012 年 12 月 3 日, 東京大学 (東京都)
- (11) Somnuk Bunsupa, Mami Yamazaki, Kazuki Saito: Deep transcriptome sequencing of alkaloids-producing and non-producing cultivars of *Lupinus angustifolius* reveals biosynthesis and related pathways. *Frontiers in Plant Biology: From Discovery to Applications*. 2012 年 10 月 3-5 日, ゲント大学 (ベルギー)
- (12) 山崎真巳 : 薬用植物の特異代謝研究におけるデータベースとオミクスの利用 . 日本生薬学会第 59 回年会, 2012 年 9 月 17-18 日, かずさアカデミアホール (木更津市)
- (13) 川原田美季, 千葉基昌, 斉藤和季, 山崎真巳 : カンプトテシンを高生産するチャボイナモリ毛状根特異的に発現する MYB 様転写因子 OpMYB1 について . 日本生薬学会第 59 回年会, 2012 年 9 月 17-18 日, かずさアカデミアホール (木更津市)
- (14) Somnuk Bunsupa, Hideki Ueno, Akira Maruyama, Kae Katayama, Kazuki Saito, Mami Yamazaki: Molecular cloning and characterization of lysine decarboxylase from *Sophora flavescens* and *Lycopodium clavatum*. 日本生薬学会第 59 回年会, 2012 年 9 月 17-18 日, かずさアカデミアホール (木更津市)
- (15) Nirin Udomsom, Miki Tokoro, Kazuki Saito, Mami Yamazaki: ERF Transcription Factors specifically expressed in hairy root of *Ophiorrhiza pumila* producing Camptothecin. 日本生薬学会第 59 回年会, 2012 年 9 月 17-18 日, かずさアカデミアホール (木更津市)
- (16) 山崎真巳 , 川原田美季 , Udomsom Nirin , 斉藤和季 : カンプトテシン生産特異的に発現する転写調節因子について . 第 30 回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム, 2012 年 8 月 3-5 日, 奈良先端大 (生駒市)
- (17) Somnuk Bunsupa, Hideki Ueno, Akira Maruyama, Kazuki Saito, Mami Yamazaki: Functional characterization of lysine decarboxylase from cadaverine-derived alkaloid-producing plants. 第 30 回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム, 2012 年 8 月 3-5 日, 奈良先端大 (生駒市)
- (18) Somnuk Bunsupa, Mami Yamazaki, Kazuki Saito: Deep-transcriptome analysis in *Lupinus angustifolius*: Mining and characterization of genes involved in quinolizidine alkaloid biosynthetic pathway. The International Conference of Natural Product Biosynthesis. 8th US-Japan Seminar: Enzymology · Structural Biology · Drug Discovery · Genome Mining 2012 年 6 月 17-22 日, 淡路夢舞台 (淡路市)
- (19) 斉藤和季, ブンスパ ソムヌク, 山崎真巳 : メタボロミクスによる植物成分

生合成のゲノムマイニング：キノリチジンアルカロイド生合成の初発酵素遺伝子の同定 .日本農芸化学会 2012 年度大会，2012 年 3 月 23-25 日，京都女子大（京都市）

- (20) 山本浩太郎，大西美輪，姉川彩，七條千津子，山崎真巳，深城英弘，三村徹郎：ニチニチソウ細胞における二次代謝産物の合成と液胞機能の解析．第 53 回日本植物生理学会年会，2012 年 3 月 16-18 日，京都産業大（京都市）
- (21) Somnuk Bunsupa, Keiichi Mochida, Mami Yamazaki, Kazuki Saito: Deep-Transcriptome Analysis of *Lupinus anagustifolius* and Its Application to the Identification of Genes Associated with Quinolizidine Alkaloids Biosynthesis. 第 53 回日本植物生理学会年会，2012 年 3 月 16-18 日，京都産業大（京都市）

〔図書〕(計 3 件)

- (1) Supaart Sirikantaramas, Mami Yamazaki, and Kazuki Saito: Camptothecin: Biosynthesis, Biotechnological Production and Resistance Mechanism(s). In “Advance in Botanical Research - New Light on Alkaloid Biosynthesis and Future Prospects Vol. 68”, ed. N. Giglioli-Guivarc’h, Springer Cham Heiderberg NewYork Dordrecht London, pp.139-161 (2014) DOI: 10.1016/B978-0-12-408061-4.00005-5
- (2) Takashi Asano, Kazuki Saito and Mami Yamazaki: Camptothecin Production and Biosynthesis in Plant Cell Culture. In “50 Years of Phytochemistry Research Recent Advances in Phytochemistry volume 43”, ed. David R Gang, Springer International Publishing Switzerland, pp. 43-54 (2013) DOI: 10.1007/978-3-319-00581-2
- (3) 巖佐庸，倉谷滋，齋藤成也，塚谷裕一編 岩波 生物学辞典 第 5 版 岩波書店 (2013) ISBN978-4-00-080314-4 [分野別編集および執筆を担当]

〔その他〕

(1) 公開シンポジウム等

Mami Yamazaki: Evolution of Alkaloid Biosynthesis in Plants: Catalytic Reactions and Self-Resistance. International symposium on “Deep Impact of Plant Metabolism; Going Beyond Diversity” (国際シンポジウム「植物代謝力：多様性

の向こうへ」) 2013 年 11 月 22 日奈良先端大（生駒市）

山崎真巳：毒にも薬にもなる植物代謝の不思議 .日本植物学会第 77 回大会・日本植物細胞分子生物学会第 31 回大会合同公開シンポジウム「植物科学の最前線」2013 年 9 月 15 日，北海道大(札幌市)

Mami Yamazaki: Multiple and specialized controls in plant secondary metabolisms. 日本学術振興会 地球環境・食糧・資源のための植物バイオ第 160 委員会第 6 回研究会「メタボロン：植物二次代謝のダイナミクス」, 2013 年 9 月 12 日，北海道大（札幌市）

(2) プレスリリース

「苦い豆」の原因遺伝子を解明-薬用植物アルカロイドのバイオ生産や創薬に手がかり - 2012年3月13日（千葉大 / 理研）

(3) ホームページ等

研究室ホームページ：
<http://www.p.chiba-u.jp/lab/idenshi/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 真巳 (YAMAZAKI, Mami)
千葉大学・大学院薬学研究院・准教授
研究者番号：7 0 2 2 2 3 7 0