

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25712012

研究課題名(和文)ニコチンをモデルとした植物アルカロイド転流の包括的解明と物質生産への基盤構築

研究課題名(英文)Elucidation of alkaloid translocation mechanism in plants and application to metabolic engineering.

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) 15,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物は外敵から身を守るため、アルカロイドなど生理活性物質を生産する。これら物質は特定の器官や細胞内小器官に蓄積されるが、その輸送機構の知見は限られている。本研究では、根で生合成され葉に蓄積されるタバコのニコチンをアルカロイド転流のモデルとして、輸送体の解析を行った。葉の液胞膜に局在するJAT2や根の細胞膜に局在するNUP1など複数の輸送体を同定・解析し、ニコチンの転流機構について多くの成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Plants produce various metabolites including secondary metabolite, such as alkaloids, to adapt to their environment. Most secondary alkaloids are stored in a particular organelle of a specific organ, however, our knowledge of transport mechanism is limited. In this study, we investigated nicotine translocation mechanism from roots to leaves in *Nicotiana tabacum*. We identified and characterized some transporters, i.e., JAT1, JAT2, and NUP1. These transporters are related to nicotine transport, biosynthesis, and defense mechanism in tobacco. Application of these new knowledge to metabolic engineering might be useful for high production of valuable compounds in future.

研究分野：植物細胞分子生物学

キーワード：アルカロイド 輸送 植物 タバコ ニコチン MATE トランスポーター

## 1. 研究開始当初の背景

植物が生産する二次代謝産物は極めて多彩な化学構造や生理活性を有し、医薬品原料などに用いられている。しかし近年、乱獲による資源の枯渇、主な輸入先である中国の輸出規制などが進み、植物由来の薬用資源の確保は日本における急務の課題となっている。そこで植物を用いた安定供給を目的として、これまでに生合成酵素や培養細胞に関する研究が進められてきたものの、生合成酵素の過剰発現などのみで大量生産に至った例は少ない。これは、生産された二次代謝産物が器官間や細胞内オルガネラ間をダイナミックに移動し、蓄積器官の液胞などに集積されるという視点が欠けていたためである。これら輸送・蓄積は、自らが作り出した代謝産物の生理活性(毒性)から植物が身を守る防御機構であり、二次代謝産物の生産に必須である。そのため、植物を用いた安定生産系の確立には、代謝生成(生合成)と輸送体による液胞などへの隔離が協調することが決定的に重要である。しかしながら、タバコのニコチンが根から葉へ転流される現象など70年も前から知られていたにも関わらず、輸送の分子メカニズムはまったく明らかとなっていなかった。

我々はこの未解明な領域について解明を進めてきた。薬用植物オウレンにおける薬用部位(根茎)への抗菌アルカロイドの蓄積に、ABC(ATP-binding cassette)輸送体が関与することを報告し(Sakai, Shitan et al., JXB 2003) その分子実体としてCjMDR1を単離、根茎でのアルカロイド蓄積に働くことを証明した(Shitan et al., PNAS 2003)。

我々はその後、多くの薬用アルカロイドを生産するナス科植物のモデルとして、タバコにおいてニコチンが根から葉の液胞へと転流される機構の解析を進めてきた。タバコは、強い細胞毒性を示すニコチンを葉の液胞に蓄積することで、その毒性を回避するとともに、昆虫から身を守る防御物質として用いている。我々はベルギーのグループと共同研究を行い、ニコチンを生産する培養細胞のトランスクリプトーム解析によりニコチン輸送体候補として3つのMATE型輸送体(Nt-JAT1、JAT2、MATE1)を見出した。さらにJAT1について解析を行い、本タンパク質が根から転流されてきたニコチンを葉の液胞に輸送することにより、ニコチン転流及び液胞への高蓄積に寄与していること(Morita, Shitan et al., PNAS 2009)やMATE1の根の液胞膜におけるニコチン輸送能などを明らかとした。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記の成果をさらに発展深化させ、根から葉への転流において未解明な、根における導管へのローディング、葉における導管からのアンローディングに関わるトランスポーターを同定する。また、葉の液胞

内へのニコチン輸送の新たな分子の同定や、花へのニコチン輸送体の同定についても行う。これら解析から、アルカロイドの転流機構を包括的に解明することを目的として解析を行った。

## 3. 研究の方法

本研究は植物二次代謝の輸送機構を多面的に解析したもので、用いた研究方法は多岐にわたる。主な研究方法としては、分子生物学的な手法によるベクター構築や遺伝子発現解析、GFP融合タンパク質の共焦点顕微鏡観察、酵母細胞などを用いた細胞輸送解析などであり、一般的な実験手法に準拠して行った。

## 4. 研究成果

本研究によって得られた新たな知見について、以下、4つに分けて記述する。

### (1) 根における導管へのローディング

根においては、細胞内で生合成されたニコチンは何らかの機構により導管へと運ばれる(ローディング)と考えられる。我々は、葉においては液胞膜に発現するJAT1が、根においては液胞膜以外に局在するという予備的データを得ていた。そこで、JAT1の特異的な抗体を用いて、根における細胞内局在の解析を試みた。

土で栽培したタバコ植物体より根の切片を作成し、JAT1特異的な抗体を用いて免疫染色を行った結果、特異的な細胞、細胞内小器官に偏在することを観察した。本結果より、JAT1は根においては液胞以外の生体膜、特に導管付近の細胞においては細胞膜に局在し、導管へのニコチンローディングに関与している可能性が示された。

### (2) 葉における導管からのアンローディング

葉においては、根から導管を介して運ばれてきたニコチンを何らかの機構で細胞内に取り込んでいる可能性がある。我々は、その輸送体候補として、プリンパーミエースであるNUP1(nicotine uptake permease1)に着目した。本輸送体は、すでにアメリカのグループによりニコチンを取り込むことが報告されていた(2011 PNAS)が、我々も解析を行い、根の細胞膜に発現すること、ニコチンなどのタバコアルカロイドのみならずピリドキシンなどのビタミンB6なども輸送基質として取り込む活性を有することを報告した(Kato, Shitan et al., Phytochemistry 2015)。

さらに我々は、タバコの他のプリンパーミエースが葉におけるニコチン取り込みにはたらく可能性を考え、タバコゲノムよりプリンパーミエースを探索し、それらのタバコ植物における発現をリアルタイムPCRにより検討した。複数のプリンパーミエースを見出し

たが、NUP1 と相同性の高いプリンパーミエースがゲノム中に極めて多いという特徴を有することがわかり、またそれらの中に、比較的葉においても発現の高い分子が存在することを明らかとした。

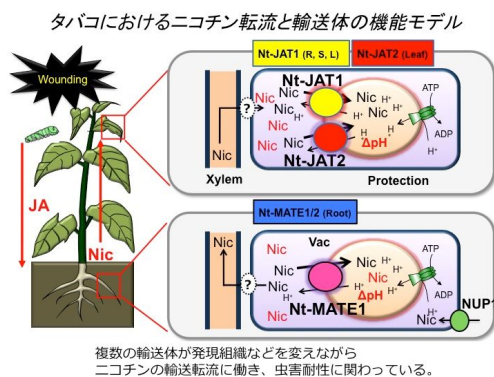
### (3) 葉の液胞内への輸送体の同定

すでに葉の液胞内への輸送体として JAT1 を報告していたが、我々はさらなる分子として JAT2 を同定していた。以前の科研費（若手スタートアップ）における研究からの続きとして解析を行い、JAT2 は JAT1 とはアミノ酸相同性が 30%程度しかないものの、同じ MATE 型輸送体に属することを明らかとした。また、根におけるニコチン生産を誘導する植物ホルモンであるジャスモン酸によって短時間で強く誘導され、植物体ではジャスモン酸処理時においてのみ発現し、その発現は葉にほぼ限定されることを示した。酵母細胞を用いた輸送解析からニコチンなどのアルカロイドを輸送基質とし、また植物細胞では液胞膜に局在することを明らかとした。

これら成果より、JAT2 の機能として、虫害などによってニコチン生産が増加し、より多くのニコチンが葉へと運ばれてきた際に、JAT1 と共に葉の液胞膜に発現し液胞内へのニコチン輸送を行い、その結果として虫害応答にはたらくと推定された( 図 1 )( Shitan et al., Plos One 2014 )。

### (4) 花へのニコチン輸送体の同定

*Nicotiana attenuata* などの植物においては、花にニコチンを送ることで、虫や鳥による受粉効率を上昇させることが報告されている。我々は、この花へのニコチン輸送にはたらく分子種を同定することを目的に、花よりタンパク質を単離、JAT1 や JAT2 に対する抗体を用いてウェスタン解析を行った。その結果、JAT2 の発現は極めて低かったが、JAT1 に関しては花の各ステージにおいて高い発現を示していることを明らかとした。本結果より、JAT1 は花へのニコチン輸送を通じて、受粉にも関わる輸送体であることが示唆された ( Shitan et al., Plant signaling behavior 2015 )。



< 図 1 タバコにおけるニコチン転流と輸送モデル >

以上の研究より、タバコのニコチン転流における輸送機構をさらに解明することに成功した( 図 1 )。これら成果は以下に示すように計 6 件の論文・総説として報告した。

本研究課題を進める過程で、アルカロイドなど二次代謝産物の輸送体に関する知見や技術を多岐にわたり修得しており、それらを包括的にまとめた総説( Plant Biotechnology 2014、Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 2016 )は、今後輸送解析を始める研究者に役立つ情報となると考えている。また、これら輸送研究の成果により、研究者は農芸化学会の奨励賞を受賞しており、タバコのニコチン輸送に関する内容は以下の URL に示す日本語の要旨にまとめてある ( [http://www.jsbba.or.jp/wp-content/uploads/file/award/2015/award\\_2015\\_shitan.pdf](http://www.jsbba.or.jp/wp-content/uploads/file/award/2015/award_2015_shitan.pdf) )。

### 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 6 件 )

Shitan N.

Secondary metabolites in plants: transport and self-tolerance mechanisms

*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 75: 982-984 (2016) 査読あり

doi: 10.1080/09168451.2016.1151344.

Shitan N., Hayashida M., Yazaki K.

Translocation and accumulation of nicotine via distinct spatio-temporal regulation of nicotine transporters in *Nicotiana tabacum*.

*Plant Signaling and Behavior* 10(7): e1035852. (2015) 査読あり

doi: 10.1080/15592324.2015.1035852.

Kato K., Shitan N., Shoji T., Hashimoto T.

Tobacco NUP1 transports both tobacco alkaloids and vitamin B6.

*Phytochemistry* 113: 33-40 (2015) 査読あり

doi: 10.1016/j.phytochem.2014.05.011.

Shitan N., Kato K., Shoji T.

Alkaloid transporters in plants. (Review)

*Plant Biotechnology* 31, 453-463 (2014) 査読あり

doi:

10.5511/plantbiotechnology.14.1002a

Shitan N., Minami S., Morita M., Hayashida M., Ito S., Takanashi K.,

Omote H., Moriyama Y., Sugiyama A., Goossens A., Moriyasu M., Yazaki K. Involvement of the leaf-specific multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter Nt-JAT2 in vacuolar sequestration of nicotine in *Nicotiana tabacum*. *PLoS One* 9(9): e108789 (2014) 査読あり  
doi: 10.1371/journal.pone.0108789.

Takanashi K., Shitan N., Yazaki K. The multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family in plants (Review) *Plant Biotechnology* 31, 417-430 (2014) 査読あり  
doi: 10.5511/plantbiotechnology.14.0904a

[学会発表](計10件)

Shitan N., Minami S., Morita M., Hayashida M., Tsuyama T., Moriyama Y., K Takabe., Goossens A. Yazaki K. Nicotine translocation and accumulation via distinct spatio-temporal regulation of nicotine transporters in *Nicotiana tabacum* 17th International Workshop on Plant Membrane Biology Annapolis, USA, June 5-10 (2016) (poster)

土反 伸和、大谷 彩、脇野 真菜、大谷 綾香理、後藤 弓絵、加藤 啓太 タバコ植物におけるニコチン輸送プリンパーミアーゼの探索と組織発現解析 第38回日本分子生物学会年会 神戸、2015年12月1-4日(発表1日)

土反 伸和 植物二次代謝生産における自己耐性と輸送の分子機構に関する研究 2015年度日本農芸化学会関西支部 第490回講演会 大阪 農芸化学奨励賞受賞講演 2015年7月4日

土反 伸和、大谷彩、脇野真菜、加藤啓太 タバコプリンパーミアーゼ遺伝子の組織発現解析 第10回トランスポーター研究会年会 東京、2015年6月20-21日(発表20日)

土反 伸和、南 翔太、森田 匡彦、林田 南帆、伊藤 慎悟、高梨 功次郎、杉山 暁史、表 弘志、森山 芳則、Alain Goossens、守安 正恭、矢崎 一史 葉特異的な発現をするタバコ MATE 型トラ

ンスポーターNt-JAT2の機能解析 日本農芸化学会 2015年度大会 岡山、2015年3月26-29日(28日発表)

土反 伸和 植物二次代謝生産における自己耐性と輸送の分子機構に関する研究 2015年度日本農芸化学会大会 岡山 奨励賞受賞講演 2015年3月26日

大谷彩、脇野真菜、加藤啓太、土反 伸和 タバコ植物体におけるプリンパーミアーゼ遺伝子の組織発現解析 日本薬学会 第135年会 神戸、2015年3月25-28日(27日発表)

脇野真菜、大谷彩、加藤啓太、土反 伸和 シロイヌナズナにおける PUP 型輸送体遺伝子の発現解析 日本薬学会 第135年会 神戸、2015年3月25-28日(27日発表)

土反 伸和、南 翔太、加藤 啓太、森田 匡彦、庄司 翼、Alain Goossens、橋本 隆、矢崎 一史 タバコ植物におけるニコチン転流機構の解明 第20回天然薬物の開発と応用シンポジウム 東京、2014年11月5-6日 (発表6日、優秀発表賞受賞)

加藤 啓太、庄司 翼、土反 伸和、橋本 隆 タバコ植物における purine permease like transporter の機能解析 第55回日本植物生理学会年会 富山、2014年3月18日

[図書](計1件)

土反伸和 輸送工学でものづくり バイオメディア 生物工学会誌(日本生物工学会) 第93巻 P. 294 (2015)

[その他]

ホームページ  
[http://www.kobepharma-u.ac.jp/edrs/faculty\\_member\\_list/natural\\_medicinal\\_chemistry.html](http://www.kobepharma-u.ac.jp/edrs/faculty_member_list/natural_medicinal_chemistry.html)

6. 研究組織

(1) 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