

植物二次代謝産物の輸送蓄積機構の解明と大量生産への基盤構築

士反 伸和

(神戸薬科大学 生薬化学)

研究の目的

植物二次代謝産物は抗腫瘍活性など多様な生理活性を示し、医薬品などに用いられるものも多い¹⁾。しかし、希少植物を原料とするものや植物中の含量が少ないなど、天然物から抽出、確保できる化合物は限られている。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。その成果として二次代謝産物を生産する培養細胞や、生合成酵素の過剰発現植物などが作出されてきたが、大量生産に至った例は少ない²⁾。このような中で私たちは、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点に着目した。植物における二次代謝産物の輸送機構の解明に長年取り組んだ結果、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、安定した生産に必須であることを明らかとしてきた³⁾。近年においては、タバコ培養細胞を材料に液胞へのニコチンアルカロイドの輸送を解析し、世界で初めて液胞局在型アルカロイドトランスポーター（Nt-JAT1）の単離に成功した⁴⁾。本研究ではこれらの成果を発展させ、ニコチン輸送における本トランスポーターの制御機構を解明することを目指した。さらに、トランスポーターを過剰発現した培養細胞を作出しアルカロイド生産への影響を解明することで、植物培養細胞を用いた実用的な有用物質生産系を確立するために必要となる基礎的知見を得ることを目的とした。

方法

Nt-JAT1 の制御因子の探索には、yeast two-hybrid 法を用いた。まずタバコ培養細胞 BY-2 を 50 μ M メチルジャスモン酸で処理することでニコチン生産を誘導し、48 時間後の細胞を用いて cDNA library を作成した。この library を用い、Nt-JAT1 の C 末端 25 アミノ酸を bait（餌）とし、Nt-JAT1 と相互作用するタンパク質のスクリーニングを行った。ポジティブクローンの選抜の指標としてロイシン非含有培地での生育、GFP 蛍光の二点を用い、1) スタンプ：コロニーのレプリカ培養、2) ストリーク：スタンプで生育良好コロニーの画線培養、3) スポット：ストリークで生育および GFP 蛍光が良好のコロニーについてスポット培養、の 3 つのステップからなる段階的な選抜を行った。最終的に得られた候補コロニーについて、インサートとして保持している cDNA の配列を解析した。

またトランスポーターの過剰発現培養細胞の作出においては、まず Nt-JAT1 ならびにその相同タンパク質である Nt-JAT2 の GFP 融合コンストラクトを作出した。これらコンストラクトをアグロバクテリウム（LBA4404 株）による形質転換法によって BY-2 培養細胞に導入した。発現した融合タンパク質の細胞内局在は Zeiss LSM700 を用いて GFP 蛍光を観察することで行った。

結果

Nt-JAT1 の制御因子を探索するために、yeast two-hybrid 法を用いて、タバコ培養細胞 cDNA library より Nt-JAT1 と相互作用するタンパク質をコードするクローンをスクリーニングした。形質転換酵母コロニー約 12 万をスクリーニングし、スタンプ培養、ストリーク培養、スポット培養からなる段階的な選抜過程においてロイシン非含有培地での生育、GFP 蛍光の強弱を検討した結果、最終的にクローン No. 326、759、778、870 の 4 つの候補クローンを得た (図 1)。これらの各クローンについて、PCR によるインサートの配列解析を試みた。その結果、クローン No. 870 については PCR で特定の配列が増幅せず配列解析することができなかつた。また、クローン No. 759 および 778 からは、それぞれ約 700 bp および約 1400 bp からなる遺伝子が増幅された。これらの遺伝子の産物に対して BLAST を用いた相同性検索を行ったところ、いずれも hypothetical proteins がヒットしたため、機能推定には至らなかつた。選抜培地での生育と GFP の結果からもっとも強い候補であるクローン No. 326 からは、約 1500 bp の塩基配列が増幅され、SEC12P-LIKE 2 PROTEIN をコードすると予想された。培養細胞において No. 326 遺伝子は全培養期間を通じて恒常的に発現していた。モデル植物シロイヌナズナにおいて SEC12P-LIKE 2 PROTEIN は ER に局在し、リン酸トランスポーターの発現を制御することが報告されている⁵⁾。これらの解析より、タバコのニコチン輸送を担う Nt-JAT1 の活性制御因子の候補として 3 つの遺伝子を単離することができ、特にクローン No. 326 のコードするタンパク質は強い候補であることが示唆された。

次に、トランスポーターの過剰発現によるアルカロイド生産への影響を解析するため、タバコ BY-2 細胞を用い、Nt-JAT1 ならびに相同タンパク質である Nt-JAT2 の GFP 融合タンパク質の過剰発現を試みた。Nt-JAT1-GFP については過剰発現体を得ることができなかつたが、Nt-JAT2-GFP においては 2 クローンの発現株 (OX1、3) を得ることができた。発現タンパク質の細胞内局在を観察したところ、液胞に局在していることが確認された (図 2)。

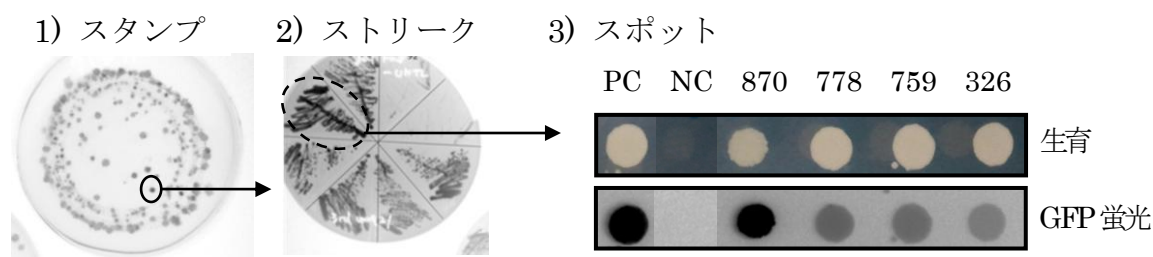


図 1 Nt-JAT1 制御タンパク質のスクリーニング

結論

以上の解析より、液胞アルカロイドトランスポーターの活性を制御する因子の候補として No. 326、759、778 の3つのクローンを単離することができた。特にクローン No. 326 がコードする SEC12P-LIKE 2 PROTEIN は、活性制御因子として強い候補であると期待される。また、アルカロイドトランスポーター Nt-JAT2-GFP の高発現株を得ることに成功した。今後、これらトランスポーター並びに活性制御因子の解析をさらに進め、既存の培養細胞研究や代謝工学に、より効率的なトランスポーターの発現や活性制御を加えることで、培養細胞を用いた実用的な二次代謝産物の生産に繋げていきたい。



図 2 BY-2 細胞における Nt-JAT2-GFP の液胞局在

文献

- 1) Croteau, R., Kutchan, T. M., and Lewis, N. G. (2000) *In Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Buchanan, B., Grissem, W., and Jones, R., (eds.), American Society of Plant Physiologists, Maryland, pp. 1250-1318.
- 2) Yazaki, K. (2004) *In Handbook of Plant Biotechnology*, Vol. 2, Christou, P., and Klee, H. (eds.), John Wiley & Sons, pp. 811-857.
- 3) Shitan, N., and Yazaki, K. (2007) *Curr Pharm Biotechnol.* 8: 244-252.
- 4) Morita, M., Shitan, N., Sawada, K., Van Montagu, M. C. E., Inzé, D., Rischer, H., Goossens, A., Oksman-Caldentey, K.-M., Moriyama, Y., and Yazaki, K. (2009) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106: 2447-2452.
- 5) González, E., Solano, R., Rubio, V., Leyva, A., and Paz-Ares, J. (2005) *Plant Cell* 17: 3500-3512.