



神戸薬科大学薬学部 准教授 士 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

### はじめに

植物は環境に応答するため、さまざまな二次代謝産物を生産し、その数は20万種類を超える。それらの多くは高い生理活性を有し、化粧品や医薬品原料としても用いられてきた。そこで、その安定かつ大量な供給を目的に、生合成酵素や遺伝子の研究が数多くされてきたが、大量生産に成功した例は多くはない。筆者は、植物における安定生産には生合成のみならず、生産産物の生理活性への自己耐性、細胞質からの輸送体による隔離、の2つが協調することが重要であるとの視点を持ち(図1)、薬用植物を中心に研究を進めた。実際に、耐性に関わる分子を同定するとともに、内在性アルカロイド輸送体を初めて同定し輸送蓄積機構を解明するなど、二次代謝産物の生産機構を解明してきた。各研究成果の概略を、以下に記す。

### 1. 自らが生産する二次代謝産物に対する自己耐性機構

植物は自らが生産する二次代謝産物の高い生理活性に対し、独自の耐性機構を有している。耐性に関わる分子を同定することを目的に、出芽酵母を用いた機能スクリーニングを試みた。マメ科植物クララのcDNAライブラリーを出芽酵母に導入し、クララの主要プレニル化フラボノイドであるソフォラフラボンG (SFG) を含有する培地で生育した菌から耐性付与遺伝子を単離した(図2)。得られた遺伝子SfRPT2 (*Sophora flavescens* regulatory particle triple-A ATPase2) はプロテアソーム構成因子であり、本タンパク質がSFGに耐性を付与することを明らかとした。アミノ酸相同性の高いシロイヌナズナAtRPT2ではSFG耐性を付与しないことから、SfRPT2による耐性はクララが独自に獲得してきたことが示唆された。またキンポウゲ科オウレンも、自ら生産するベルベリンアルカロイドに耐性を示すが、同様の機能スクリーニングにより、ガラクトキノール合成酵素CjGolS (*Coptis japonica* galactinol synthase) が耐性を付与することを明らかとした。これら研究は、自ら生産する生理活性物質への耐性に関わる分子実体を同定できたものであり、またプロテアソームに二次代謝産物への耐性付与という新たな機能があるという知見を提供した。

### 2. 植物二次代謝産物の輸送機構の解析

植物は二次代謝産物を生産後、最終的に薬用部位など蓄積器官の細胞の液胞などに蓄積するか、細胞外(土壌中など)に排

出する。この膜輸送による二次代謝産物の隔離または排出は、生産した化合物の細胞毒性から自らの身を守る毒性回避機構の一つであり、また、虫や微生物などへの防御など環境適応に重要な役割を果たす。筆者は、生化学的ならびに分子細胞生物学的にその輸送機構の解明に取り組んだ。

第一に、動物における植物アルカロイドのベルベリンの輸送機構を検討し、ヒトのがん細胞などで高発現し、多様な化合物を排出することで多剤耐性に関わるヒトABC (ATP-binding cassette) 輸送体ABCB1/MDR1 (multidrug resistance1) およびMRP1 (multidrug-resistance associated protein1) が本化合物を輸送することを明らかとした。本結果より、植物においてもABC輸送体がアルカロイド輸送に関わる可能性が示された。

第二に、薬用植物オウレンにおけるベルベリン輸送を解析した。オウレン培養細胞は、ベルベリンを生産して液胞に蓄積するとともに、培地に添加したベルベリンも積極的に細胞内に吸収するが、この細胞膜での取り込みにABCB1/MDR型のABC輸送体が働くことを明らかとした。さらに、オウレンのABCB1/MDR輸送体遺伝子*Cjabcbl/Cjmdr1*, *Cjabcbl2*を単離し、アフリカツメガエル卵母細胞や出芽酵母を用いた機能解析により、ベルベリン取り込み活性を証明した。両分子は、オウレン植物体のベルベリン蓄積部位である根茎の道管付近の細胞に発現していた。以上の結果を総合して、オウレンにおいてベルベリンが根から根茎へと転流される際、根茎の道管付近の細胞の細胞膜上で発現するCjABCB1 および2がベルベリンを積極的に細胞内に取り込むことで、根茎へのベルベリン高蓄積に働いていると考えられた(図3)。これら輸送体の発現を抑制した組換えオウレン植物体ではベルベリン蓄積が低下しており、その輸送機能が二次代謝生産に重要な役割を果たすことも示された。また、生化学的な解析から、細胞内でのベルベリンの液胞蓄積にはプロトンアンチポーターが働くことを明らかとした。以上の結果は、植物における二次代謝産物の転流に対する輸送体の関与を明らかとするとともに、その分子実体を初めて同定したものであり、二次代謝産物の輸送蓄積機構に関する基礎的知見の発展に大きく貢献できたと考えている。

第三に、虫害耐性に関わる輸送体の解析を行った。タバコにおいてニコチンは、根において生合成され、その後道管を介

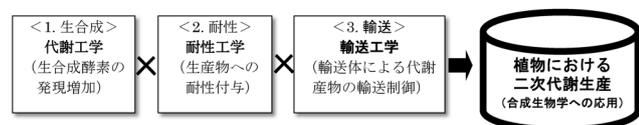


図1 植物の二次代謝生産における耐性と輸送の役割  
植物二次代謝産物の生産には、生合成酵素による「1. 生合成」に加え、生産した生理活性物質への細胞内での「2. 耐性」、また産物を液胞や細胞外に隔離する「3. 輸送」が重要な役割を果たす。

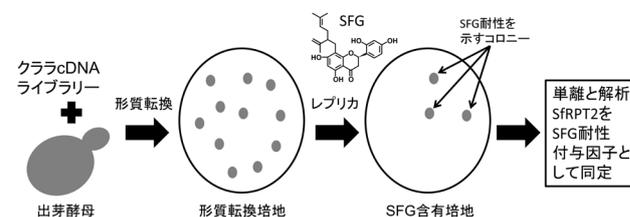


図2 植物cDNAライブラリーと酵母細胞を用いた機能スクリーニングによる耐性付与遺伝子の単離

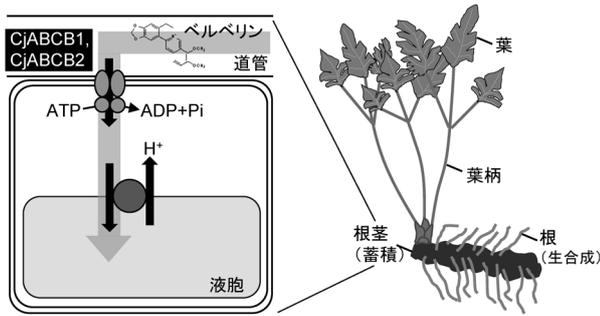


図3 オウレンにおけるベルベリン転流モデル

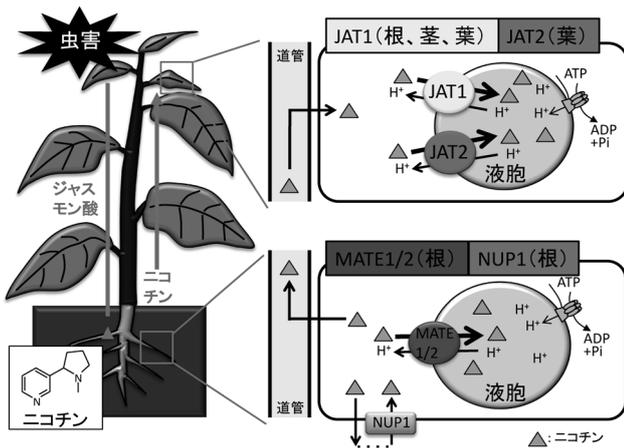


図4 タバコにおけるニコチン転流と虫害耐性モデル

して地上部へと転流され、最終的に葉の液胞に高濃度で蓄積される。ニコチンは昆虫などに対して神経毒として働くため、その蓄積は虫害耐性などにおいて重要な役割を果たす。そこで、ニコチンの転流や蓄積に関わる輸送体の探索を行った。タバコ培養細胞のトランスクリプトーム解析からニコチン輸送体候補として複数の MATE (multidrug and toxic compound extrusion) 型輸送体を同定し解析したところ、JAT1 (jasmonate-inducible alkaloid transporter1) と名付けた MATE の 1 種は根・茎・葉において発現していた。またその発現は、ニコチン生産を誘導するメチルジャスモン酸の処理によって全ての組織で増加した。葉における JAT1 の細胞内局在を明らかにするため、シヨ糖密度勾配によって細胞膜や液胞膜などを分離し、JAT1 に特異的な抗体および各膜の指標酵素の抗体でウェスタン解析を行ったところ、本タンパク質は葉において液胞膜に局在することが判明した。その輸送機能の解析を、出芽酵母を用いた細胞輸送系ならびにプロテオリポソームを用いた輸送解析により行ったところ、JAT1 はプロトンアンチポーターとしてニコチンを輸送することが明らかとなった。一方、JAT2 と命名した輸送体は葉に特異的に発現しており、その発現はメチルジャスモン酸処理によって顕著に誘導された。本タンパク質も、液胞膜に局在するとともに、ニコチンや他のタバコアルカロイドの輸送能を有することが示された。これら結果より、根から転流されてきたニコチンを JAT1 および JAT2 が葉の液胞内に輸送

することで、ニコチン転流および液胞への高蓄積に関わることが示唆された(図4)。さらに、MATE1/2 や NUP1 という輸送体についても、出芽酵母を用いた細胞輸送アッセイを行い、その輸送機能解析を行った。その結果、根で発現する MATE1/2 が液胞内にニコチンを輸送すること、根の細胞膜で発現する PUP (purine uptake permease) 型輸送体 NUP1 が細胞内にニコチンを取り込むことも明らかとした。これらは、発現する組織や細胞内局在の異なる複数の輸送体が協調して単一分子の輸送転流に働くことで、植物の虫害耐性に関わることを示した初めての報告であり、輸送体を介した植物の環境応答の理解に大きく貢献することができた。

おわりに

これら一連の研究から、二次代謝の安定生産に不可欠な「耐性」と「輸送」のメカニズムについて、多くの基礎的知見が得られた。近年では、これら成果を一つの礎として、二次代謝産物の輸送研究もさらに進められており、二次代謝生産の研究領域の拡大にも繋がっている。またこれら耐性や輸送の研究成果は、合成生物学において微生物に生合成酵素とともに耐性・輸送体の分子実体を導入し、耐性や細胞外への排出などを付与することで、効率的な安定生産という応用的側面へと繋がることも期待される。今後さらに実用的な物質生産を目指し研究を進めることで、基礎から応用に渡る農芸化学の研究分野に貢献していきたい。

本研究は、京都大学大学院農学研究科、京都大学生存圏研究所、神戸薬科大学薬学部で行われたものです。本研究を行う機会を与えてくださり、学生時代から現在に至るまで、温かいご指導ご鞭撻を賜りました京都大学教授 矢崎一史先生に心より御礼申し上げます。また、本研究を遂行する上で、常に温かいご指導と多くの有意義なご助言を賜りました佐藤文彦先生(現京都大学教授)、故・守安正恭先生(神戸薬科大学特別教授)に深謝いたします。輸送研究を進める上で多くのご協力を賜りました植田和光先生(現 京都大学)、森山芳則先生(現 岡山大学)、表弘志先生(現 岡山大学)、Cyrille Forestier 博士(現フランス MESR)に心より御礼申し上げます。また、植物体における機能解析に多大なご協力を賜りました、Alain Goossens 博士(現 ゲント大学)、橋本隆先生(現 奈良先端科学技術大学院大学)、庄司翼先生(現 奈良先端科学技術大学院大学)、吉松嘉代先生(現 独立行政法人医薬基盤研究所)、竹川薫先生(現 九州大学)に深く感謝いたします。学生時代、研究員時代を通して長年に渡り数々の激励と温かいご助言を賜りました遠藤剛先生(現 京都大学)、伊福健太郎先生(現 京都大学)、高林厚史先生(現 北海道大学)に感謝申し上げます。さらに、全ての方のお名前を挙げることはできませんが、実験技術や試料などをご支援くださった先生方に心より感謝いたします。また本研究は、これまでに共に研究を行ってきた研究室のメンバー、卒業生の皆さまのご協力によって成り立っており、この場を借りて深く感謝申し上げます。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました矢崎一史先生、ならびにご支援賜りました学会の諸先生方に厚く御礼申し上げます。