

各報道機関 御中

## ベンジルイソキノリンアルカロイド生合成を制御する転写因子ファミリーの探索

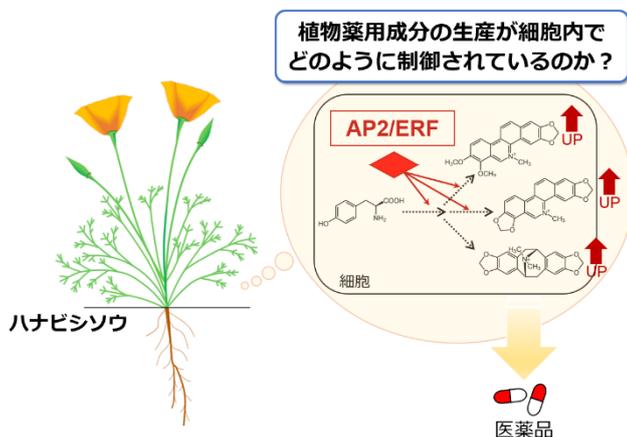
### ～植物薬用成分の生産に関わる新たな制御因子候補の同定～

神戸薬科大学 医薬細胞生物学研究室の山田泰之助教、土反伸和教授らは、京都大学、大阪府立大学との共同研究で、ケシ科のハナビシソウが作る薬用成分、ベンジルイソキノリンアルカロイドの生合成を制御する新たな転写因子の探索を行い、その候補となる制御因子を同定しました。

#### 【本研究成果の要旨とポイント】

- 植物が生産するベンジルイソキノリンアルカロイドは医薬品の原料にもなる薬用成分ですが、その生産がどのように植物細胞で制御されているか、詳細なメカニズムは明らかになっていません。
- 本研究では、ベンジルイソキノリンアルカロイドを作るケシ科のハナビシソウという植物のゲノム情報から、AP2/ERF と呼ばれる転写因子ファミリーを134個見出し、それらの分類や網羅的な遺伝子発現解析などを行いました。
- 上記の解析から、4つのAP2/ERF転写因子について、ベンジルイソキノリンアルカロイド生産の制御に関わる可能性を明らかにしました。

本研究成果は、薬用植物がどのようなメカニズムでベンジルイソキノリンアルカロイド生産を制御しているかを解明する重要な足がかりになるとともに、薬用成分をより効率的に生産するための応用研究にもつながることが期待されます。本研究成果は、2020年10月22日に英国の科学誌「Scientific Reports」のオンライン版に掲載されました。



#### お問い合わせ先

**神戸薬科大学 企画・広報課（報道関連）**

〒658-8558 神戸市東灘区本山北町4丁目19-1

TEL: 078-441-7505 FAX: 078-414-8081

E-mail: kikaku@kobepharm-u.ac.jp

URL: <https://www.kobepharm-u.ac.jp>

**医薬細胞生物学研究室（研究関連）**

〒658-8558 神戸市東灘区本山北町4丁目19-1

TEL: 078-441-7544 FAX: 078-441-7544

E-mail: yyamada@kobepharm-u.ac.jp

## 【概要】

神戸薬科大学 医薬細胞生物学研究室の山田泰之助教、土反伸和教授らは、京都大学の西田昇平大学院生（当時）、佐藤文彦教授（現大阪府立大学 客員研究員）らと共同で、薬用成分の生合成を制御する新たな転写因子の探索を行い、その候補因子を同定しました。

モルヒネやベルベリンに代表されるベンジルイソキノリンアルカロイド（以下、BIA）は、医薬品原料にもなる有用化合物です。近年、その需要は拡大しており、さらなる効率的な生産システムの構築が必要です。これまでの研究から、植物内で BIA が生合成される仕組みの理解は進んでいますが、その生合成の制御に関する知見は多くありません。

今回、我々は BIA を作るケシ科のハナビシソウという植物に着目しました。ハナビシソウは以前の研究において、ドラフトゲノム配列の解読と解析が進められ、その情報がデータベース上に公開されています。

過去の研究から、APETALA2/Ethylene Responsive Factor, 通称 AP2/ERF と呼ばれる転写因子が BIA 生合成の制御に関わる可能性が示されていました。AP2/ERF は、植物にのみ見られる重要な転写因子ファミリーで、ストレスや防御応答、花の形成など、様々な機能を持つことが報告されています。我々は、ハナビシソウのゲノムから 134 個の AP2/ERF 転写因子を見出し、その遺伝子やアミノ酸配列の特徴を調べました。一般に、AP2/ERF ファミリーは配列の特徴から複数のグループに分類することが可能で、ハナビシソウの 134 個の転写因子についても同様の分類を行いました。さらに、植物ホルモンであるメチルジャスモン酸（以下、MeJA）という化合物が、BIA の生産を増大させることが知られていることから、MeJA 処理により遺伝子の発現が誘導されるものを網羅的に調べました。その結果、約 20 の遺伝子が MeJA 応答性を示し、そのうち 10 個が特定のグループに属していました。それらの AP2/ERF が実際に BIA 生合成に関わる酵素遺伝子の転写を誘導するかどうかを調べ、一部にその誘導活性があることを見出しました。

今後、本研究から見出した AP2/ERF 転写因子の詳細な解析を進めることで、医薬品原料として有用な BIA のより効率的な生産が可能になることが期待されます。

本研究成果は、2020 年 10 月 22 日に英国の科学誌「Scientific Reports」のオンライン版に掲載されました。

## 【研究の背景】

植物は、特化代謝産物と呼ばれる様々な低分子化合物を生産し、それらは医薬品や嗜好品などに利用されています。これら有用化合物の中には、生産する植物種が限られている、植物中の含量が少ない、などの理由から入手が困難なものも多く存在します。

ベンジルイソキノリンアルカロイド（以下、BIA）は抗菌・整腸作用のあるベルベリンや鎮痛薬のモルヒネなど、医薬品成分になる多様な有用化合物を含みます。これまで、薬用植物オウレンや、モルヒネを生産するケシ、本研究で用いたハナビシソウなどを用いて、BIA の高生産を目指した生合成研究が盛んに行われてきました。その結果、主要な BIA の生合成経路は徐々に明らかになってきましたが、BIA の生合成がどのように植物細胞内で制御されているか、その詳細は明らかになっていませんでした。我々は、以前の研究において、植物特有の APETALA2/Ethylene Responsive Factor（以下、AP2/ERF）と呼ばれる転写因子ファミリーの関与を示すデータを得ていましたが、具体的にどのような AP2/ERF 転写因子が BIA 生合成に関わるかは不明でした。

前述のハナビシソウは、サンギナリンなど多様な BIA を生産するケシ科の園芸植物です。栽培が容易で、遺伝子操作が可能であるといったメリットも持ちます。我々は、以前の研究において、BIA 生合成研究を

さらに迅速に進めていくために、ハナビシソウの膨大なゲノム情報を簡易的に取得し、そのデータ整備を行いました。今回、我々は、ハナビシソウゲノム情報の中から、BIA 生産に関わる AP2/ERF 転写因子の網羅的探索を行いました。

## 【研究の手法と結果】

我々ははじめに、AP2/ERF に広く保存されているドメイン<sup>\*1</sup>の配列を利用し、ハナビシソウ (*Eschscholzia californica*) から 134 個の AP2/ERF 転写因子 (EcAP2/ERF) を単離しました。モデル植物 (シロイヌナズナやイネ) を用いた研究から、AP2/ERF は 5 つのサブファミリー (AP2, RAV, DREB, ERF, Soloist) に分かれることが知られています。アミノ酸配列の比較解析から、ハナビシソウの 134 個の EcAP2/ERF は、20 個の AP2、5 個の RAV、47 個の DREB、60 個の ERF、2 個の Soloist に分類されました。さらに、DREB と ERF サブファミリーは、11 のグループ (グループ I~IV が DREB、グループ V~X と VI-L が ERF) に分かれることが知られていることから、分子系統樹を作成して詳細な分類を行いました (図 1)。

続いて、BIA 生合成に関わる AP2/ERF を単離するために、我々は、植物ホルモンであるジャスモン酸に着目しました。ジャスモン酸は植物の防御反応に関わる様々な化合物の生産を促進します。実際、BIA 生合成に関わる酵素遺伝子の発現もジャスモン酸によって誘導されています。我々は、ジャスモン酸の類縁体であるメチルジャスモン酸 (以下、MeJA) をハナビシソウに処理した際の、EcAP2/ERF 遺伝子の発現の変化を、RNA シーケンスにより網羅的に解析しました (図 2)。その結果、MeJA 応答性を示した EcAP2/ERF が約 20 個見つかり、さらにその半分に相当する 10 個が、グループ IX に属していました。グループ IX の AP2/ERF は他の特化代謝生合成の制御にも関わることが知られており、有力な候補であると考えられました。

最後に、グループ IX に属する EcAP2/ERF が、実際に生合成酵素遺伝子の転写を促進するかどうかを、転写調節領域とルシフェラーゼ<sup>\*2</sup> を利用したレポーターアッセイ系により調べました (図 3)。その結果、4 つの AP2/ERF が転写を促進する活性を持つことを確認しました。

## 【今後の展開】

本研究から、グループ IX に属する 4 つの AP2/ERF 転写因子がハナビシソウの BIA 生合成を制御している可能性が示されました。今後、これら AP2/ERF 転写因子の機能をより詳しく調べることで、植物が BIA 生産を制御する詳細なメカニズムの理解がより進むと予想されます。さらに、本研究成果は、植物の BIA 生産性を向上させるための応用研究の発展にも貢献すると期待されます。

## 【論文情報】

〈雑誌名〉

Scientific Reports

〈論文タイトル〉

Genome-wide identification of AP2/ERF transcription factor-encoding genes in California poppy (*Eschscholzia californica*) and their expression profiles in response to methyl jasmonate

〈著者〉

Yasuyuki Yamada, Shohei Nishida, Nobukazu Shitan, Fumihiko Sato

〈DOI〉

<https://doi.org/10.1038/s41598-020-75069-7>

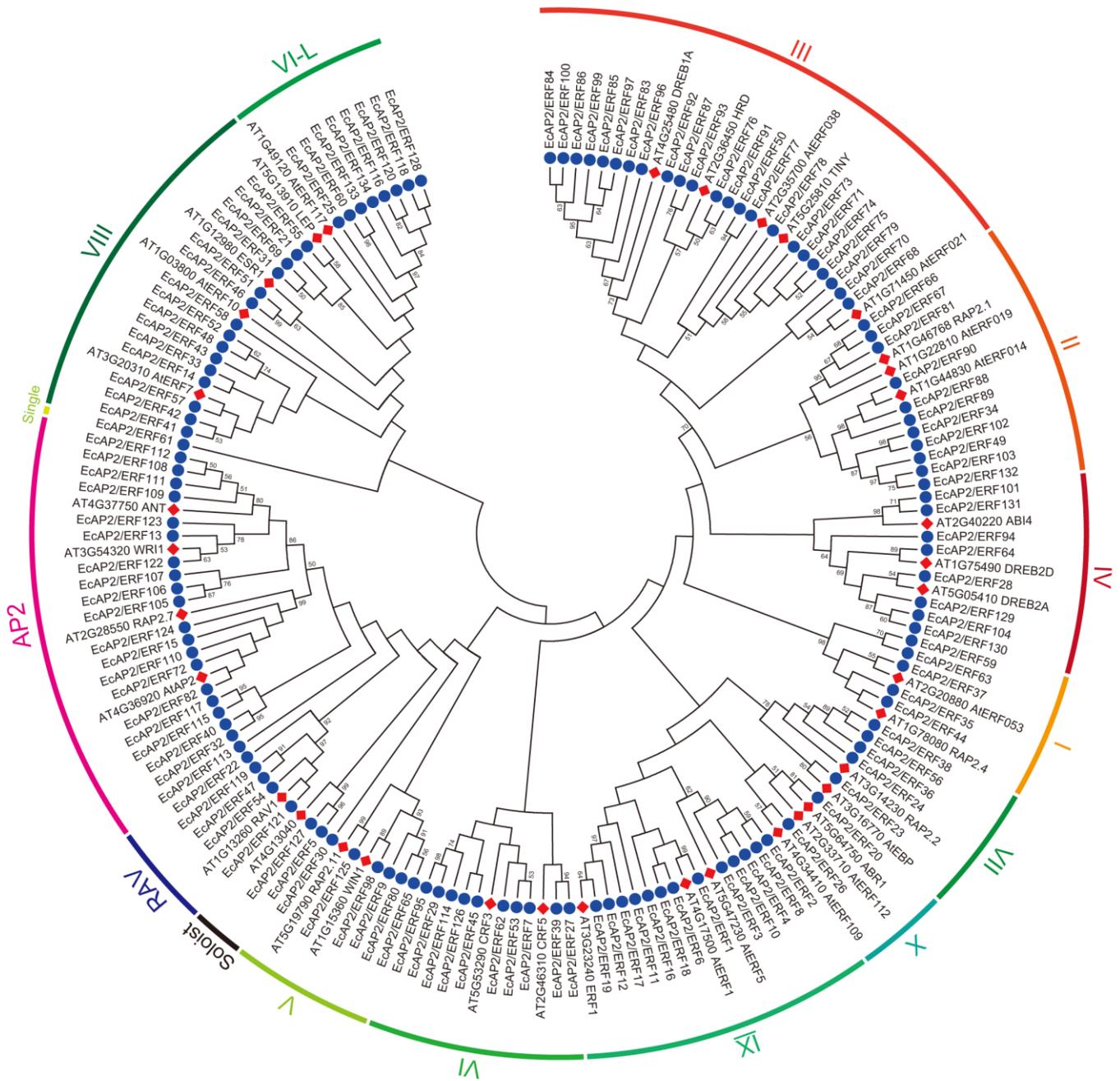


図1 AP2/ERFのドメイン配列を元に作成した分子系統樹

青●がハナビシソウの EcAP2/ERF、赤◆がシロイヌナズナの主要な AP2/ERF。外枠はサブファミリーおよびグループ（グループ I~IV が DREB、グループ V~X, VI-L が ERF）を示している。

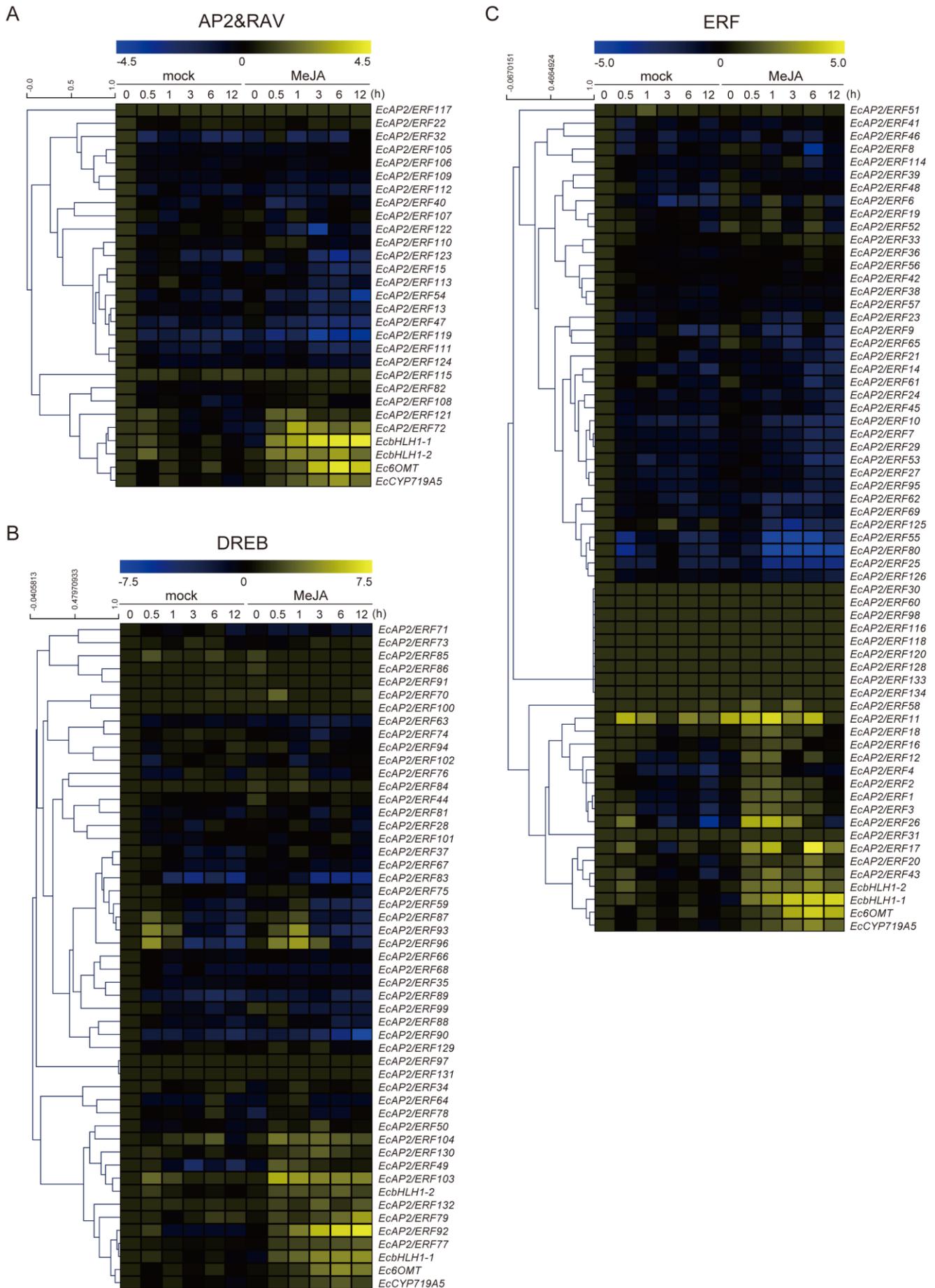


図2 ハナビシソウ *EcAP2/ERF* 遺伝子の MeJA 応答性

A: AP2&RAV サブファミリー, B: DREB サブファミリー, C: ERF サブファミリー

MeJA 未処理 (mock) の 0 h をベースに発現量を相対化し、階層的クラスタリング解析を行った。各ヒートマップ図は、黄色が濃くなるほど遺伝子の発現量が高くなっていることを示す。

A 生合成酵素 6OMT の転写調節領域

B 生合成酵素 CYP719A5 の転写調節領域

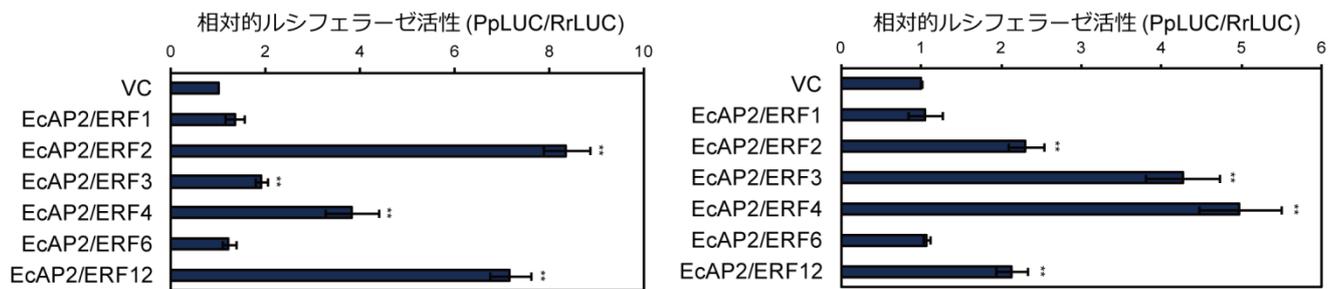


図3 グループ IX に属する EcAP2/ERF の転写誘導活性の確認

A: 生合成酵素 6OMT 遺伝子の転写調節領域, B: 生合成酵素 CYP719A5 遺伝子の転写調節領域

EcAP2/ERF2, EcAP2/ERF3, EcAP2/ERF4 および EcAP2/ERF12 の各生合成酵素遺伝子に対する転写誘導活性が、コントロール (VC) と比べて優位に高いことを示す (\*\* $P < 0.01$ )。

<用語説明>

※1) ドメイン

タンパク質の構成単位の一つで、立体構造や機能などに影響を及ぼす領域。AP2/ERF 転写因子の場合、DNA の結合に必要で、進化的に高度に保存されている AP2/ERF ドメインを持つ。

※2) ルシフェラーゼ

ホタルなどが発光する際、その発光反応を触媒する酵素。

以上