

# ニコチン生合成のマスター遺伝子；低ニコチン変異体からのアプローチ

庄司 翼・橋本 隆

奈良先端科学技術大学院大学、バイオサイエンス研究科

〒630-0101 奈良県生駒市高山町 8916-5

Master genes for nicotine biosynthesis in tobacco; approach using low-nicotine mutants

Key words: alkaloids; jasmonates; nicotine; tobacco; transcription factors

Tsubasa Shoji & Takashi Hashimoto

Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology

Takayama 8916-5, Ikoma, Nara 630-0101, Japan

## 1. はじめに

植物が蓄積する多種多様の二次代謝産物は古来より医薬、嗜好品、染料などとして人類の健全な社会生活に貢献してきた。二次代謝に関する研究は、従来は天然物化学による化合物の単離・同定と生合成経路の推定、及び生化学による生合成酵素の特徴付けが主流であった。近年、分子生物学の発展を背景に、生合成酵素遺伝子のクローニングが盛んに行なわれ、それらがより普遍的な一次代謝酵素遺伝子から進化してきたことが明らかとなってきた。特に、進化的にも古く広範な植物種の存在するフラボノイド類の生合成は分子レベルでよく研究され、酵素遺伝子や制御機構がかなり解明されている。一方、アルカロイドなどの他の典型的な二次代謝産物は、被子植物がそれぞれの科や属に分岐した進化の後期段階で爆発的に生じたものであり、フラボノイド生合成とは異なる独自の制御機構をもつものと考えられる。

アルカロイドは含窒素性でしばしば塩基性を示す二次代謝産物の総称である。顕花植物の約 20% の種に見出され、その化学構造は分かっているものだけでも 12,000 種類に及ぶ (Roberts & Wink 1998)。多くのアルカロイドは、アミノ酸やヌクレオチド類から合成され、その前駆体や生合成経路によって区分されることが多い (Ziegler & Facchini 2008)。テルペノイドやフェニルプロパノイドの場合とは異なり、各々のアルカロイドグループは独立にその生合成経路を確立してきたとされている。

タバコ属植物特有のアルカロイドであるニコチン及びその類縁化合物は、その強い殺虫性から植物にとって防護物質としての意味をもっている (Baldwin et al. 1998)。タバコの葉が害

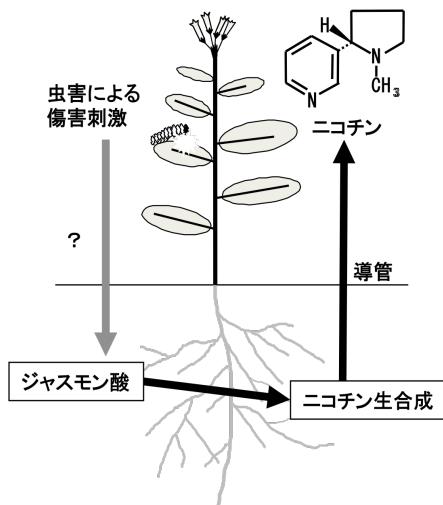


図 1 ニコチン生合成、蓄積の虫害による誘導

虫により食べられると、その情報が葉から根に伝達され、傷害ホルモンであるジャスモン酸がニコチン生合成遺伝子群を根の先端部分で活性化する。根端で合成されたニコチンの大部分は導管を伝わって地上部へ転流され、全草に蓄積する(Shoji & Hashimoto 2011a) (図1)。ニコチンはオルニチンとアスパラギン酸を前駆体とする反応経路によって合成される (図2)。オルニチンは対称ジアミンであるプトレッシンを経由してピロリジン環をもつ N-メチルピロリニウムカチオンに、アスパラギン酸は補酵素である NAD と共通の経路(Katoh & Hashimoto 2004)によってピリジン環をもつニコチン酸にそれぞれ変換される。経路の終盤は両環の縮合を含む複数の反応から構成されるとされているがその詳細は未解明である(De Boer et al. 2009, Kajikawa et al. 2009, Kajikawa et al. 2011)。

## 2. ニコチン制御遺伝子座にクラスター化するERF型転写因子遺伝子

1930年代にキューバ原産のタバコ系統がアルカリをほとんど含まないことが発見された。この低ニコチン系統は米国農務省で遺伝学的解析がなされ、2つの遺伝子座 *NICOTINE1* (*NIC1*) と *NICOTINE2* (*NIC2*) における半優性変異が原因であることが判明した(Legg et al. 1971)。この変異体においてほぼ全てのニコチン生合成遺伝子が発現抑制されていること(Hibi et al. 1994, Katoh et al. 2007, Shoji et al. 2009, Shoji et al. 2010, Kajikawa et al. 2011)から、*NIC1* と *NIC2* は制御遺伝子であることが推定された。

EST情報の蓄積を背景として、タバコ cDNA アレイを用いたマイクロアレイ解析が近年可能となった。我々は、野生型と *nic1nic2* 二重変異体の根における遺伝子発現をタバコマイクロアレイで網羅的に検索し、既知のニコチン合成、輸送に関わる全ての遺伝子が変異体で発現抑制されていることが確認されるとともに、APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR (AP2/ERF)ファミリー(Nakano et al. 2006)のグループIXaに属する転写因子遺伝子 *ERF189* の発現が変異体で見られないことを明らかとした(図3, Shoji et al. 2010)。IXa グループの ERF 遺伝子はタバコゲノムに少なくとも 25 遺伝子存在し、それらはアラビドopsis の AtERF1, AtERF2 に近いクレード1 と *ERF189* を含むクレード2 に分別される。*ERF189* を含めクレード2 の複数の遺伝子の発現は *nic2* 変異特異的に顕著に発現抑制されていた。ゲノムサザンと PCR の結果、この特異的な発現抑制はクレード2 に属する ERF のうち、複二倍体タバコ(*Nicotiana tabacum*)の祖先種の1つである *N. tomentosiformis* に由来する遺伝子が、*nic2* 変異体ゲノムで欠失していることに起因しており、これら欠失遺伝子（少なくとも 7 遺伝子）は変異の原因遺伝子座 *NIC2* に強く連鎖していることが分かった。一方、クレード1 やクレード2 に属しても

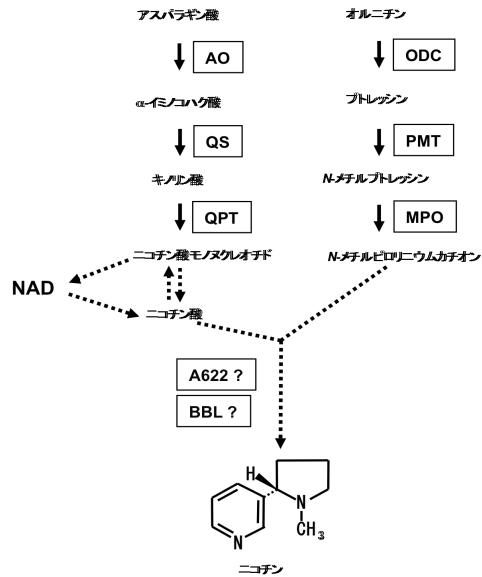


図2 ニコチン生合成経路  
ピリジン環とピロリジン環の合成以降、両環の縮合を含む部分は未解明である。PIPファミリーのNADH依存性酸化還元酵素A622とベルベリン架橋酵素ファミリーのBBLが関与することが提唱されている。NIC遺伝子により制御される遺伝子は四角で囲った。AO, aspartate oxidase (アスパラギン酸酸化酵素) ; QS, quinolinate synthase (キノリン酸合成酵素) ; QPT, quinolinate phosphoribosyltransferase (キノリン酸ホスホリボシル基転移酵素) ; ODC, ornithine decarboxylase (オルニチン脱炭酸酵素) ; PMT, putrescine N-methyltransferase (プトレッシンN-メチル基転移酵素) ; MPO, N-methylputrescine oxidase (N-メチルプトレッシン酸化酵素)

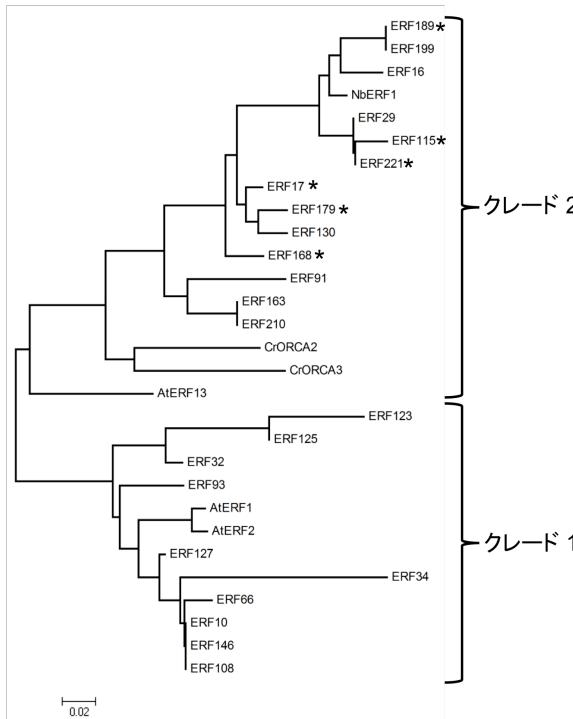


図3 AP2/ERFファミリーのグループXiaに属するタンパク質の分子系統樹  
DNA結合ドメインであるAP2/ERFドメインのアミノ酸配列をClustal Wによりマルチアライメントし、MEGA4を用いてNJ法で分子系統樹を作製した。*nic2*変異体において欠失が確認された遺伝子は\*印で示した（ただしドメイン内に停止コドンのあるERF104は図示していない）。*N. benthamianiana*のNbERF1、ニチニチソウ(*Catharanthus roseus*)のCrORCA2とCrORCA3、及び、アラビドブシスのAtERF1 (At4g17500)、AtERF2 (At5g47220)、AtERF13 (At2g44840)を加えた。

れている（全てもしくは大半）と考えられた。

### 3. ERF 転写因子によるニコチン生合成遺伝子の制御

タバコ形質転換毛状根を用いた解析で、  
クレード2のERF遺伝子がニコチン含量  
を左右するマスター制御因子であるこ  
とが示された(Shoji et al. 2010)。ERF189を過  
剰発現するとニコチン含量が野生型タバ  
コで約2-3倍に、*nic1nic2*変異体で野生型並  
みになった。逆に、クレード2のERFを特  
異的にRNA干渉法で発現抑制したり、ド  
ミナント抑制型のERF189やERF179を発  
現させたりするとニコチン合成が抑えら  
れた。この結果は、*N. benthamianan*の相同  
遺伝子NbERF1の発現抑制で得られる結果とも一致した(図3, Todd et al. 2010)。

ERF転写因子はニコチン生合成遺伝子プロモーター内の特定シス配列(図5)に結合し、転写活性化に働く(Shoji et al. 2010, De Boer et al. 2011, Shoji & Hashimoto 2011b, 2011c)。ERF189とグルコルチコイド受容体の融合タンパク質をタバコ毛状根で発現させて、デキサメタドン依存的にERF189を活性化させると、すべてのニコチン生合成遺伝子が転写誘導される

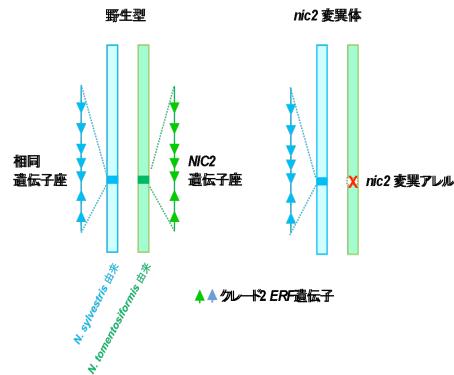


図4 クレード2 ERF遺伝子のクラスター化  
*N. tomentosiformis*由来の染色体領域に存在する  
*NIC2*遺伝子座と*N. sylvestris*由来の領域の相同遺  
伝子座にそれぞれクラスター化するクレード2 ERF  
遺伝子を模式した。

別の祖先種である*N. sylvestris*由來の  
ERF遺伝子などは変異の影響を受け  
なかつた。図4に示すように、クレー  
ド2のERFは、*N. tomentosiformis*に由  
來する*NIC2*遺伝子座とそれと相同な  
*N. sylvestris*に由來する遺伝子座そ  
ぞれにクラスター状に存在しており、  
*nic2*変異体では*NIC2*遺伝子座が失わ

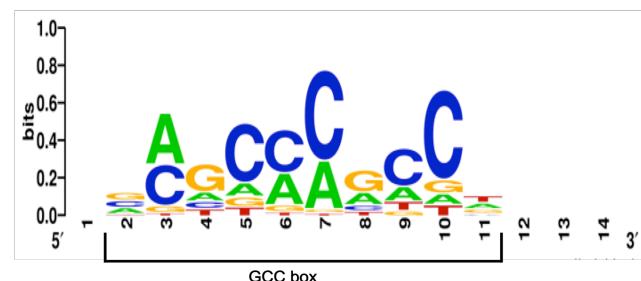


図5 ERF189の結合配列特異性  
PMTプロモーターに存在するGCC boxの周辺配列を順次一塩基置換したプローブを作製し、組換えERF189への結合性をEMSAで検討した(Shoji & Hashimoto 2011c)。得られたデータを100仮想配列で代表し、WebLogoを用いて配列ロゴとして表した。

(Shoji et al. 2010)。また、こうした誘導性の大半はシクロヘキシミド存在下でも起こることから、他の因子の翻訳を介さずに *ERF189* は生合成遺伝子を活性化することが分かった。生合成遺伝子の 1 つであるプロモーター内の GCC box が重要であることが知られていた(Xu & Timko 2004)。クレード 2 の ERF は、この *PMT* プロモーター内の GCC box へ *in vitro* で結合するとともに、一過的発現系を用いたトランスクレティベーション解析で、これら *ERF* は、この GCC box を介して *PMT* プロモーターを活性化することが示された(Shoji et al. 2010, De Boer et al. 2011)。一方、クレード 1 の *ERF* は *PMT* プロモーターの GCC 配列には結合せず、プロモーターを活性化することはなかった(Shoji et al. 2010)。

#### 4. ERF 転写因子レギュロンへの一次代謝遺伝子のリクルート

二次代謝産物の広義での合成系は、前駆体や代謝中間体を供給する一次代謝経路とそれに続く二次代謝に特異的な部分から構成される。ニコチン合成に特異的な *PMT* などとは異なり、ピリジン環合成に関わるキノリン酸ホスホリボシル基転移酵素(QPT)は、ニコチン合成に必要なニコチニ酸の供給と並行して、補酵素として重要な NAD 合成にも関わる一次代謝酵素である(Katoh & Hashimoto 2004)。

タバコには QPT をコードする 2 つの遺伝子 *QPT1* と *QPT2* (いずれも *N. tomentosiformis* に由来する) が存在する(Sinclair et al. 2000)。*QPT1* はすべての器官でジャスマン酸処理の有無にかかわらず構成的に発現するのに対して、*QPT2* は他のニコチニ酸合成遺伝子と同様にジャスマン酸応答性、根特異性を示し、かつ *NIC* 遺伝子の制御を受ける。実際、*ERF189* の過剰発現や機能抑制型 *ERF189* の発現は *QPT2* の発現にのみ影響を与えた(Shoji & Hashimoto 2011c)。*QPT2* 遺伝子のプロモーター領域には 3 つの機能的な *ERF189* 結合配列が存在し、いずれも *ERF189* による *QPT2* プロモーターの活性化に寄与することが、*in vitro* 結合解析、一過的発現系を用いたトランスクレティベーション解析、及び、タバコ形質転換毛状根を用いたプロモーター解析から分かった。一方、*QPT1* プロモーターは *ERF189* に結合せず、またその制御を受けなかった。

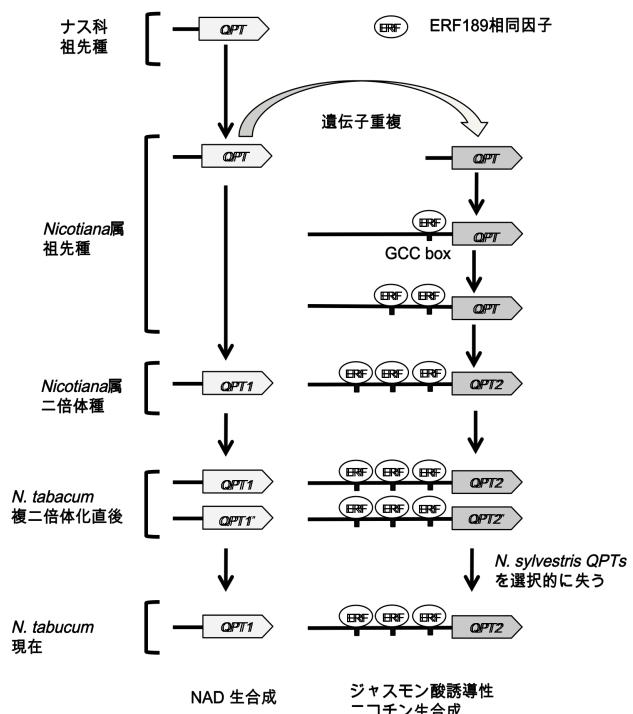


図6 タバコ *QPT* 遺伝子の進化

ナス科祖先種において、NAD合成系に関わる 1 つの *QPT* 遺伝子と *ERF189* 相同因子が存在したが、この時点では *ERF* は *QPT* を制御していなかった。タバコ属祖先種で、遺伝子重複により 2 つ目の *QPT* 遺伝子が生まれたと考えられる。2 つの内 1 つの *QPT* 遺伝子は 3 つの *ERF189* 結合配列を順次獲得し、ジャスマン酸応答性の *ERF189* とその相同因子の制御下に取り込まれた。*N. tabacum* の複二倍体化直後には 2 組の 2 つの *QPT* 遺伝子（計 4 つ）が存在したが、*N. sylvestris* 由来の遺伝子はのちに失われた。

トマト、アラビドプシスなどのゲノムには *QPT* 遺伝子は 1 コピーしか存在していない。タバコにおいて、遺伝子重複によって生じた互いに相同的な 2 つの *QPT* 遺伝子のうち、1 つの遺伝子がプロモーター領域に複数の ERF189 結合性シス配列を獲得することで、ERF が制御するニコチン生合成レギュロンに取り込まれ、ニコチン合成の獲得で必要となったピリジン環供給量の増加に対応したと考えられた(図 6)。

## 5. ERF 転写因子とジャスモン酸シグナル伝達系

植物は昆虫や草食動物から身を守るために防御物質としてアルカロイドをはじめとした二次代謝産物を蓄積する。そのため、タバコのニコチンと同様に傷害刺激に応答するジャスモン酸シグナルにより生合成が活性化される代謝産物が多い (Gundlach et al. 1992, Blechert et al. 1995, Yukimune et al. 1996)。高等植物は普遍的なコアとなるジャスモン酸シグナル経路を持っている(図 7, Browse et al. 2009, 庄司・橋本 2010)。ジャスモン酸非存在下では bHLH ファミリーの MYC2 転写因子に結合した JAZ リプレッサーがコリプレッサーを含む複合体を標的遺伝子近傍にリクルートする(Pauwels et al. 2010)。この複合体はクロマチン構造変換を促し、標的遺伝子の発現を積極的に抑制すると考えられている。活性型ジャスモン酸であるジャスモン酸イソロイシンが COI1 に結合すると、JAZ がユビキチン化を受けた後に分解される。そして、JAZ から解放された MYC2 は転写活性化因子として機能することが可能となる。

タバコにもジャスモン酸伝達系を構成する COI1, JAZ, MYC2 は保存されており、いずれの機能を阻害してもニコチンのジャスモン酸応答性は失われる(Shoji et al. 2008, Todd et al. 2010, Shoji & Hashimoto 2011c)。特に転写因子である MYC2 はニコチン生合成遺伝子プロモーター内の G box に結合して直接に転写活性化するばかりでなく(図 7)、ニコチン制御に関わるクレード 2 の *ERF* の発現も直接または間接に制御することが示された(Shoji & Hashimoto 2011c)。クレード 2 の *ERF* はいずれもジャスモン酸応答性を示すが(Shoji et al. 2010), その応答性は MYC2 に依存するものと考えられる。

## 6. 有用天然物生産に向けて

代謝改変のために、代謝流量に影響する律速段階の改変や新たな経路の付加などの手法がこれまでに試みられてきたが成功例は限られている(Yun et al. 1992)。多段階からなる経路全体を統括的にコントロールする制御因子を改変することで、最終産物の生産性を飛躍的に増大できる可能性がある(Broun 2004, Grotewold 2008)。本稿で紹介したニコチン生合成のマスター転写因子は、低ニコチン変異の原因遺伝子座にコードされていることからも、アルカロイ

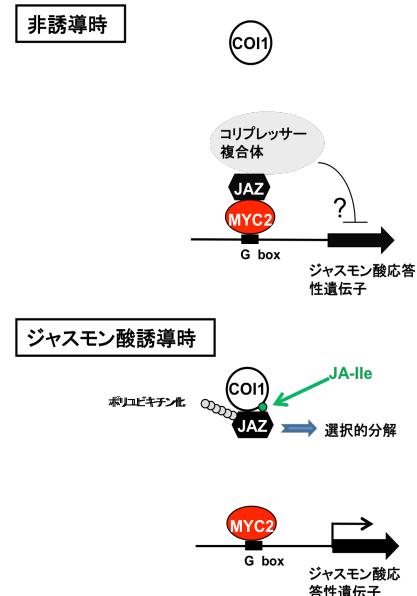


図7 ジャスモン酸シグナル伝達系  
COI1, JAZ, MYC2はタバコでも保存させており、ニコチン生合成のジャスモン酸誘導性にいずれも必要である。

ド量を植物体内で実際にコントロールしていることが裏付けされている。また、生合成遺伝子プロモーターの特定配列に直接働きかけることも明らかとされ、マスター転写因子を活用した新たな代謝改変の格好の標的になりえる。さらに、本因子と高い相同意を示すニチニチソウ (*Chatharanthus roseus*, キヨウチクトウ科) のジャスモン酸誘導性転写因子 ORCA が、タバコ (ナス科) のニコチン生合成とは進化的に独立であるインドールアルカロイド生合成を部分的に制御する点は特に興味深い(図 3, Menke et al. 1999, van der Fits & Memelink 2000, Shoji & Hashimoto 2011d)。相同因子が他のジャスモン酸応答性の有用生理活性天然物合成系 (Gundlach et al. 1992, Blechert et al. 1995, Yukimune et al. 1996)にもリクルートされている可能性もある。

## 引用文献

- Baldwin, I.T. 1998. Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attacks in native populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8113-8118.
- Blechert, S., Brodschelm, W., Hölder, S., Kammerer, L., Kutchan, T.M., Müller, M.J., Xia, Z.Q. & Zenk, M.H. 1995. The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4099-4105.
- Broun, P. 2004. Transcription factors as tools for metabolic engineering in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 202-209.
- Browse, J. 2009. Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Ann. Rev. Plant Biol.* 60: 183-205.
- De Boer, K., Lye, J.C., Aiken, C.D., Su, A.K. & Hamill, J.D. 2009. The *A622* gene in *Nicotiana glauca* (tree tobacco): Evidence for a functional role in pyridine alkaloid synthesis. *Plant Mol. Biol.* 69: 299-312.
- De Boer, K., Tilleman, S., Pauwels, L., Bossche, R.V., De Sutter, V., Vanderhaeghen, R., Hilson, P., Hamill, J.D. & Goossens, A. 2011. APETALA2/ETHYENE RESPONSE FACTOR and basic helix-loop-helix transcription factors cooperatively mediate jasmonate-elicited nicotine biosynthesis. *Plant J.* 66: 1053-1065.
- Grotewold, E. 2008. Transcription factors for predictive plant metabolic engineering: are we there yet? *Curr. Opin Biotechnol.* 19:138-144.
- Gundlach, H., Müller, M.J., Kutchan, T.M. & Zenk, M.H. 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2389-2393.
- Hibi, N., Higashiguchi, S., Yamada, Y. & Hashimoto, T. 1994. Gene expression in tobacco low-nicotine mutant. *Plant Cell* 6: 723-735.
- Kajikawa, M., Hirai, N. & Hashimoto, T. 2009. A PIP-family protein is required for biosynthesis of tobacco alkaloids. *Plant Mol. Biol.* 69: 287-298.
- Kajikawa, M., Shoji, T., Katoh, A. & Hashimoto, T. 2011. Vacuole-localized berberine bridge enzyme-like proteins are required for a late step of nicotine biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* 155: 2010-2022.

- Katoh, A. & Hashimoto, T. 2004. Molecular biology of pyridine nucleotide and nicotine biosynthesis. *Front. Biosci.* 9: 1577-1586.
- Katoh, A., Shoji, T. & Hashimoto, T. 2007. Molecular cloning of *N*-methylputrescine oxidase from tobacco. *Plant Cell Physiol.* 48: 550-554.
- Legg, P.G. & Collins, G.B. (1971) Inheritance of percent total alkaloids in *Nicotiana tabacum* L. II. genetic effects of two loci in Burley21 X LA Burley21 populations. *Can. J. Genet. Cytol.* 13: 287-291.
- Menke, F.L.H., Champion, A., Kijne, J.W. & Memelink, J. 1999. A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene Str interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. *EMBO J.* 18: 4455-4463.
- Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T. & Shinshi, H. 2006. Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. *Plant Physiol.* 140: 411-432.
- Pauwels, L., Barbero, G.F., Geerinck, J. & Tillemen, S. et al. 2010. NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signaling. *Nature* 464: 788-791.
- Roberts, M.F. & Wink, M. 1998. Alkaloids; biochemistry, ecology, and medicinal applications. Plenum, New York.
- 庄司 翼・橋本 隆 2010. ジャスモン酸応答；COI1-JAZ-MYC2 シグナリングカスケードの分子機構. 植物のシグナル伝達；分子と応答. pp. 92-98. 共立出版. 東京.
- Shoji, T. & Hashimoto, T. 2011a. Nicotine biosynthesis. In: Ashihara, H., Crozier, A., Komamine, A. (eds) Plant metabolism and biotechnology. pp. 191-216. Wiley, New York.
- Shoji, T. & Hashimoto, T. 2011b. Tobacco MYC2 regulates jasmonate-inducible nicotine biosynthesis genes directly and by way of the NIC2-locus ERF genes. *Plant Cell Physiol.* 52; 1117-1130.
- Shoji, T. & Hashimoto, T. 2011c. Recruitment of a duplicated primary metabolism gene into the nicotine biosynthesis regulon in tobacco. *Plant J. in press*
- Shoji, T. & Hashimoto, T. 2011d. Jasmonate-responsive transcription factors; new tools for metabolic engineering and gene discovery. In: Chandra, S., Lata, H., Varma, A. (eds) Biotechnology for medicinal plants; micropropagation and improvement. Springer, New York. *in press*
- Shoji, T., Inai, K., Yazaki, Y., Sato, Y., Takase, H., Shitan, N., Yazaki, K., Goto, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K. & Hashimoto, T. 2009. Multidrug and toxic compound extrusion-type transporters implicated in vacuolar sequestration of nicotine in tobacco roots. *Plant Physiol.* 149: 708-718.
- Shoji, T., Kajikawa, M. & Hashimoto, T. 2010. Clustered transcription factors regulate nicotine biosynthesis in tobacco. *Plant Cell* 22: 3390-3409.
- Shoji, T., Ogawa, T. & Hashimoto, T. 2008. Jasmonate-induced nicotine formation in tobacco is mediated by tobacco COII and JAZ genes. *Plant Cell Physiol.* 49: 1003-1012.
- Sinclair, S.J., Murphy, P.J., Birch, C.D. & Hamill, D. 2000. Molecular characterization of quinolinate phosphoribosyltransferase (QPRTase) in *Nicotiana*. *Plant Mol. Biol.* 44: 603-617.
- Todd, A.T., Liu, E., Polvi, S.L., Pammett, R.T. & Page, J.E. 2010. A functional genomic screen

- identifies diverse transcription factors that regulate alkaloid biosynthesis in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* 62: 589-600.
- van der Fits, L. & Memelink, J. 2000. ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science* 289: 295-297.
- Xu, B. & Tinko, M.P. 2004. Methyl jasmonate induced expression of the tobacco putrescine N-methyltransferase genes requires both G-box and GCC-motif elements. *Plant Mol. Biol.* 55: 743-761.
- Yukimune, Y., Tabata, H., Higashi, Y. & Hara, Y. 1996. Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nat. Biotechnol.* 14: 1129-1132.
- Yun, D.J., Hashimoto, T. & Yamada, Y. (1992) Metabolic engineering of medicinal plants: Transgenic *Atropa belladonna* with an improved alkaloid composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 11799-11803.
- Ziegler, J. & Facchini, P.J. 2008. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Ann. Rev. Plant Biol.* 59: 735-769.