

# 薬用植物ムラサキのシコニン生産系をモデルとした脂質分泌機構の研究

巽 奏

2020

## 序論

植物は自らをとりまく環境に適応し、個々の戦略に基づいて生存するために、極めて多様な化学構造を有する天然有機化合物を進化させてきた。近年のバイオインフォマティクス解析によると、これら二次代謝産物の数は 100 万種を越えるとされ、高い生理活性を有するものも多い。こうした二次代謝産物が的確にその生理機能を発揮するためには、厳密な時空間的制御が重要であり、実際多くの植物において二次代謝産物は、決められた細胞・組織に輸送、あるいは蓄積されるようプログラムされている。しかし、これら高度に制御された二次代謝産物の輸送・蓄積に関する分子機構は未だに不明な点が多い。特に脂溶性物質の蓄積機構は、液胞に蓄積する多くの水溶性代謝産物に比して、知見が少ないのが現状である。

薬用植物のムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon*) は、根の表皮細胞でナフトキノン系赤色色素であるシコニンを生産し、細胞外に分泌する。本研究では、ムラサキの培養細胞と毛状根を用い、その高いシコニン生産性、光照射や培地成分など明確な生産制御因子が既知、さらにシコニン自体の視認性といった複数の利点を活かし、シコニン生産系を分泌型脂溶性二次代謝産物のモデルと位置づけ、その輸送機構を生化学的あるいは細胞生物学的側面から解析することを目的とした。

## 第 1 章 ムラサキの高効率遺伝子導入法の構築

実用植物であるムラサキにおいては、モデル植物のシロイヌナズナなどと異なり高効率の遺伝子導入法が従前確立されておらず、分子生物学手法による研究推進の障壁となっていた。そこで本章では、国内の関連機関との共同研究への展開も視野に入れ、国産のアグロバクテリウム *Rhizobium rhizogenes* A13 株をキャリアとして、ムラサキ無菌シュートから毛状根を誘導することで、外来遺伝子を効率良く導入する手法を確立した。また、一般にムラサキ毛状根におけるシコニン生産性は、クローン間によってばらつきが大きいことから、転写誘導系としてデキサメタゾンおよびエストラジオールを用いた発現誘導系をムラサキ毛状根において構築した。本手法により、同一クローン内で標的遺伝子の寄与を定量的に評価することが可能となった。本章で作成した遺伝子導入法および誘導発現制御系は、ムラサキの分子生物学的研究の推進に向け有力なメソッドロジーとして利用価値の高いものであると考える。本手法を用いることによって、今後の分子遺伝学的アプローチによるシコニンの

生合成酵素の生化学的機能、および輸送因子の分子実態が解明されることが期待される。

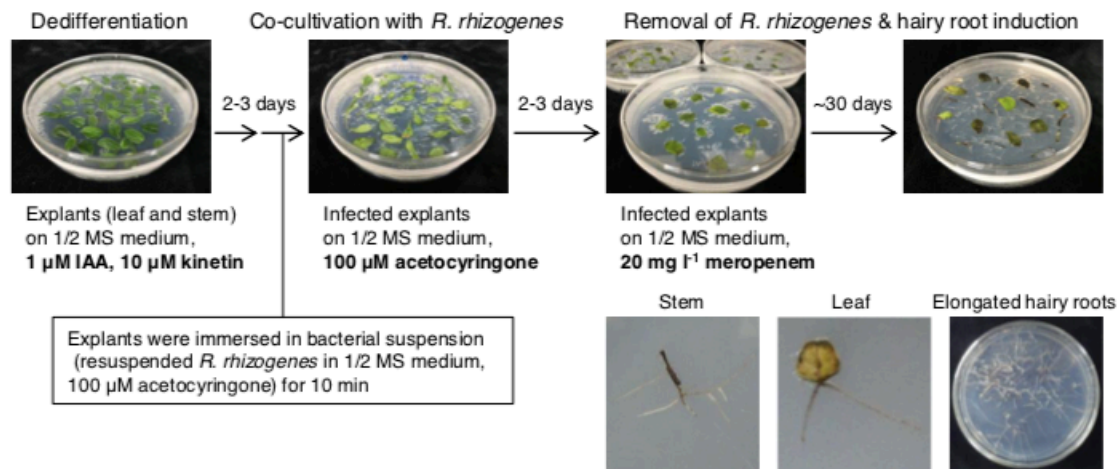


Fig. 1 本章で確立したムラサキへの遺伝子導入法のスキーム  
(Tatsumi, K., *et al.*, Plant Biotech. 2020, in press より)

## 第2章 シコニンの細胞内輸送機構の解析

本章では、シコニン生産・分泌時に細胞内で生じているイベントを明らかにするために、主にムラサキ毛状根を用いて解析を行った。まず、シコニン生合成酵素の細胞内局在解析により、シコニンの基本炭素骨格を形成する反応は小胞体 (ER) で行われることを示した。さらに、ムラサキ毛状根の電子顕微鏡観察から、特にシコニン生産が特異的に認められる細胞層である表皮細胞において、ER が顕著に発達することを見出した。これらの知見を従前の細胞外分泌研究の知見と合わせて解釈することで、シコニンはその輸送過程において ER の持つ分泌機能を利用して細胞外へ分泌されていると推測した。そこで、シコニンが ER から蓄積部位であるアポプラストへ輸送される際、どのような経路を利用しているのか、またどのような因子が関与するののかについて明らかにするため、小胞輸送の中でも細胞外方向へ向かうエキソサイトーシス経路に着目し、その阻害剤がシコニン分泌に与える影響を調べた。その結果、ARF/GEF 阻害剤である brefeldin A (BFA) をムラサキ毛状根に処理した際に、シコニンの自家蛍光が BFA ボディと思われる細胞内構造に蓄積した。また一方で、アクチン重合阻害剤である cytochalasin D を処理した場合には細胞内に一様にシコニンが蓄積する様子が観察された。この結果から、シコニンは少なくとも部分的に膜交通経路の一種であるエキソサイトーシスを共有して、アクチンフィラメント依存的に細胞外へと分泌されることが示唆された。

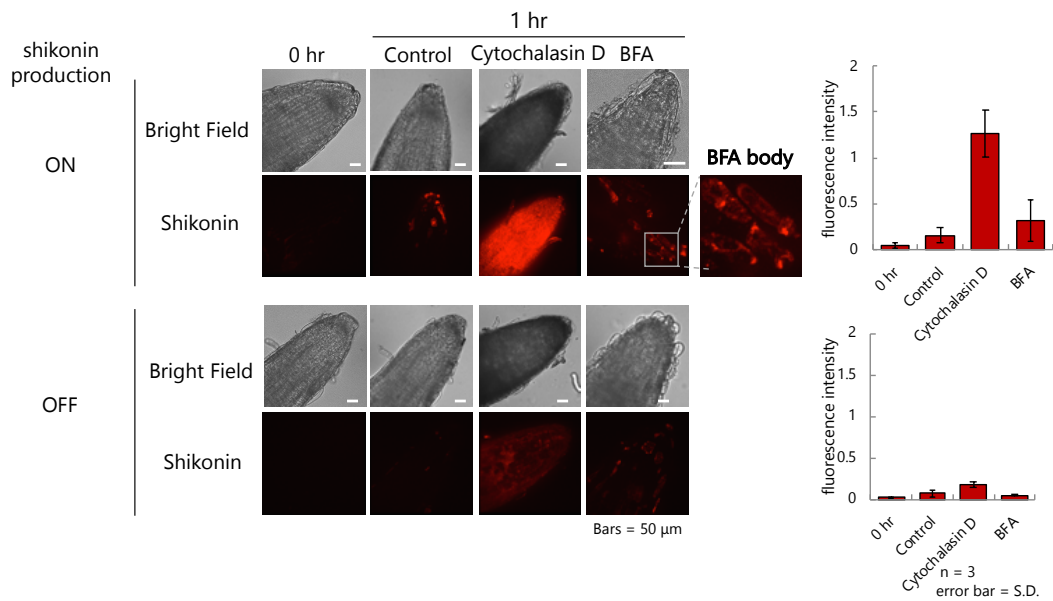


Fig. 2 小胞輸送阻害剤を用いたムラサキ毛状根の共焦点顕微鏡写真  
(Tatsumi, K., *et al.*, *Frontiers Plant Sci.* 2016, **7**: 1066 より改変)

### 第3章 シコニンの細胞外蓄積に関与する脂質分子の同定

化合物としてのシコニンは、その疎水性から水系の溶媒内では速やかに結晶化し固体として沈殿するが、細胞から分泌された際には、細胞の外側表面に赤い油滴として蓄積する。本章ではこのことに着目し、その蓄積機構に何らかの脂質が関与すると考えて、その分子を明らかにすることを目指した。ムラサキ培養細胞を用いて種々の脂質分析を行うことで、シコニンとともに細胞外へ分泌される脂質を同定した。さらに *in vitro* 系でシコニン含有脂質一重膜小胞を作成することで、実際にシコニンがマトリックス脂質と共存し、油滴となることを示した。