

イソキノリンアルカロイド生合成系に特徴的な
bHLH 型転写因子の機能解析

山田 泰之

目次

要旨

略語

序論	1
第1章 オウレン CjbHLH1 の機能解析	9
第2章 ハナビシソウ CjbHLH1 ホモログの機能解析	36
まとめ	62
参考文献	66

謝辞

学術雑誌に発表した論文

要旨

高等植物が生産するイソキノリンアルカロイド (IQA)は、生産する植物種が限定されているため、その生合成系の発現制御に関する知見は少ない。オウレンが生産する IQA、ベルベリンの生合成系では WRKY 型転写因子である CjWRKY1 と bHLH 型転写因子である CjbHLH1 の 2 種類が機能していることが報告されていたが、CjbHLH1 によるベルベリン生合成系の制御の詳細は不明であった。本研究では、動植物に広く一般的な bHLH 型転写因子の IQA 生合成系における機能とその制御機構を明らかにすることを目的に、第 1 章でオウレンの CjbHLH1、第 2 章でハナビソウの CjbHLH1 ホモログの詳細な解析を行った。

第 1 章では、*CjbHLH1* ホモログの BLAST 検索の結果から、IQA 産生植物種にのみ *CjbHLH1* ホモログが広く分布していることを明らかとした。シロイヌナズナやイネといった IQA 非産生植物種には分布が見られなかったことから、CjbHLH1 およびそのホモログが IQA 産生植物種に特徴的な bHLH 型転写因子である可能性が示唆された。また、ベルベリン高生産性の培養細胞 156-S 株のプロトプラストを用いた *CjbHLH1* の一過的過剰発現がベルベリン生合成酵素遺伝子の発現に及ぼす影響を経時的に解析し、*CjbHLH1* 導入 6 時間後において生合成酵素遺伝子群の発現が上昇することを認めた。いくつかの生合成酵素遺伝子プロモーターを用いた一過的ルシフェラーゼレポーターアッセイでも同様に CjbHLH1 の転写促進活性が認められ、CjbHLH1 が転写活性化因子として機能していることが示された。また、細胞内局在性の解析から CjbHLH1 が核に局在すること、CjbHLH1 抗体を用いたクロマチン免疫沈降により CjbHLH1 がいくつかの生合成酵素遺伝子プロモーターに直接結合し、転写を促進していることが明らかとなった。さらに、*CjbHLH1* 遺伝子がメチルジャスモン酸 (MeJA) に対する応答性を示すことから、CjbHLH1 がジャスモン酸 (JA) シグナル伝達系で機能する転写因子であることが示唆された。一方で、他のアルカロイド生合成系の制御に関わり、JA シグナル伝達系の中心的役割を担うことが知られている MYC2 と CjbHLH1 の構造を比較し、両者が大きく異なることが判明した。したがって、オウレンには CjbHLH1 を介した JA シグナル伝達経路が存在する可能性が示唆された。

第 2 章では、IQA 産生植物種に特徴的な CjbHLH1 ホモログの機能をオウレン以外の植物で解析するために、代謝工学に適した材料とされるハナビシソウを用いて解析した。ハナビシソウから 2 種類の CjbHLH1 ホモログ、EcbHLH1-1, EcbHLH1-2 を単離するとともに、これらとともに核に移行すること、サンギナリン生合成酵素遺伝子プロモーターを用いた一過的発現系において転写促進活性を有することを明らかとし、EcbHLH1 が CjbHLH1 の機能的なホモログとして、冗長的にサンギナリン生合成系を制御している可能性を示唆した。一方、組織別発現解析の結果から、両遺伝子の発現組織の違いが明らかとなり、生理的機能分化の可能性も示唆された。そこで、RNAi により *EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* 遺伝子の特異的発現抑制を行った。RNAi 株におけるサンギナリン生合成酵素遺伝子の発現量やサンギナリン蓄積量を解析した結果、*EcbHLH1* の発現抑制により、一部の生合成酵素遺伝子の発現抑制の傾向が認められた。それぞれの遺伝子の発現量、あるいはサンギナリン蓄積量の相関を解析した結果、*EcbHLH1-2* の発現量とサンギナリンの蓄積量、あるいは一部のサンギナリン生合成酵素遺伝子の発現量との間に有意な相関性を認めた。一方、*EcbHLH1-1* の発現量とサンギナリン蓄積量との間には相関性は見られなかったが、*EcbHLH1-1* の発現量と一部のサンギナリン生合成酵素遺伝子の発現量との間には相関性が見られた、したがって、EcbHLH1-2 とともに EcbHLH1-1 も IQA 生合成系の制御因子として機能していると推測した。

以上の結果から、オウレンにおける CjbHLH1 とともに、ハナビシソウにおいても CjbHLH1 ホモログが IQA 生合成酵素遺伝子の発現調節を介して IQA 産生を制御していることが強く示唆された。本研究において明らかとなった IQA 産生植物種に特徴的な bHLH 型転写因子による IQA 生合成系発現制御は、IQA 生合成系の分子進化と多様性を議論する上で非常に重要であると考えられる。

略語

BA	benzyladenine
BBE	berberine bridge enzyme
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
CM	chorismate mutase
CNMT	(<i>S</i>)-coclaurine- <i>N</i> -methyltransferase
COI1	coronatine insensitive 1
CYP719A1	(<i>S</i>)-canadine synthase
CYP719A2/CYP719A3	(<i>S</i>)-stylophine synthase
CYP719A5	(<i>S</i>)-cheilanthifoline synthase
CYP80B1/CYP80B2	(<i>S</i>)- <i>N</i> -methylcoclaurine 3'-hydroxylase
CYP82N2v2	protopine-6-hydroxylase
DBOX	dihydrobenzophenanthridine oxidase
DHQ/SDH	3-dehydroquininate dehydratase/shikimate dehydrogenase
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
ERF	ethylene response factor
EST	expressed sequence tag
GAPDH	glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
GUS	β -glucuronidase
IQA	isoquinoline alkaloid
JA	jasmonate
JAZ	jasmonate ZIM domain
JID	JAZ interaction domain

LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry
LS	Linsmaier-Skoog
LUC	luciferase
MeJA	methyl jasmonate
MSH	(<i>S</i>)- <i>N</i> -methylstylophine 14-hydroxylase
NAA	1-naphthylacetic acid
NCS	(<i>S</i>)-norcoclaurine synthase
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyethylene glycol
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RNAi	RNA interference
SIM	selected ion monitoring
SMT	(<i>S</i>)-scoulerine-9- <i>O</i> -methyltransferase
SR	sanguinarine reductase
THBO	(<i>S</i>)-tetrahydroprotoberberine oxidase
TNMT	(<i>S</i>)-tetrahydroprotoberberine cis- <i>N</i> -methyltransferase
TYDC	tyrosine decarboxyrase
4'OMT	(<i>S</i>)-3'-hydroxy- <i>N</i> -methylcoclaurine-4'- <i>O</i> -methyltransferase
6OMT	(<i>S</i>)-norcoclaurine-6- <i>O</i> -methyltransferase

序論

一次代謝とは、生存に必須であるアミノ酸、核酸、タンパク質合成等の生化学的反応を指し、多くの生物に普遍的に見られる。一方、生存に必須ではなく一部の生物に特異的に見られる反応は、一次代謝と区別するために、二次代謝と呼ばれるようになった。しかし、生存に必須ではないという認識は、現在では必ずしも正しいとは言えない。実際、植物が生産する二次代謝産物の中には、外敵の食害、微生物の感染といった生物ストレスや、UVなどの非生物ストレスに対する防御、花粉や種子を運ぶ動物の誘引、植物体の形成など、生命維持において重要な役割を担うものも多いことが明らかとなってきた。人類はこれらの低分子化合物の有用性を古くから認識し、薬や毒物、香料、染料、調味料、着色料などとして利用してきた。しかし、医薬品の原料になるような有用二次代謝産物の多くは、生産する植物種が非常に限られていることから、植物体からの抽出だけに依存しない、安定かつ大量な供給システムの確立を目指した研究が現在も盛んに行われている。

高等植物が生産する二次代謝産物は、主にフェニルプロパノイド、テルペノイド、アルカロイドの3つに大別され、その数は45000種以上に及ぶと考えられている。中でも含窒素塩基性化合物であるアルカロイドは、非常に強い生理活性を持つものが多く、古来より薬や毒物の成分として利用されてきた。例えば、古代ギリシャの哲学者であるソクラテスは、末梢運動神経を麻痺させるコニインを含むドクニンジン (*Conium maculatum*)の抽出物を飲まされて処刑された。また、「絶世の美女」として知られるクレオパトラは、抗コリン作用を持つアトロピンを含むヒヨス (*Hyoscyamus niger*)の抽出物を用いて瞳を大きく見せていたとされる (Croteau et al., 2000)。

1806年にドイツの薬学者、Fridrich Serturmer が世界ではじめてモルヒネを単離して以来、様々な植物からアルカロイドが単離、同定されており、その数は12000種にもものぼる。代表的なものとしては、前述のモルヒネはケシ科のケシ (*Papaver somniferum*)が生産し、鎮痛作用を示す他、殺虫剤として用いられるニコチンは、タバコ (*Nicotiana tabacum*)、抗マラリア薬とし

て用いられてきたキニーネは、キナ (*Cinchona officinalis*)、抗腫瘍作用を示すビンブラスチンはニチニチソウ (*Catharanthus roseus*)にそれぞれ含まれる。これらのアルカロイドは、基本骨格構造や生合成起源により複数のグループに分類される。中でも、イソキノリン骨格を有するイソキノリンアルカロイド (IQA)は、最も多様な構造を持つグループの1つとして知られ、これまでにモルヒネを含む2500種以上のIQAが単離されており、薬理活性の高いものも多い。例えば、ケシが産生するコデインやノスカピンはそれぞれ鎮痛作用、抗腫瘍作用、同じくケシ科のハナビシソウ (*Eschscholzia californica*)が産生するサンギナリンは抗菌作用、キンポウゲ科のオウレン (*Coptis japonica*)が産生するベルベリンは抗菌作用や脂肪蓄積抑制作用を持つことが確認されている (Facchini, 2001; Kong et al., 2004)。

多くのアルカロイドはその複雑な構造のために、生合成の解析が困難であったが、1970年代に確立された植物組織培養技術、ならびに遺伝子工学技術の発達で、一部のアルカロイド生合成研究を飛躍的に発展させた (Sato, 2013)。いまだに生合成系が不明な植物アルカロイドが大半を占める中、モルヒネ、サンギナリン、ベルベリンを中心とした IQA 生合成経路の全貌はほぼ完全に解明されつつある (Hagel and Facchini, 2013)。当研究室でも、オウレン培養細胞を用いたベルベリン生合成系の研究が進められ、L-チロシンからベルベリンに至る13段階の反応を担う生合成酵素遺伝子のほぼ全てが単離・同定された (Sato et al., 1994; Takeshita et al., 1995; Morishige et al., 2000; Choi et al., 2002; Ikezawa et al., 2003; Minami et al., 2007; Matsushima et al., 2012)。また、(S)-scoulerine からサンギナリンに向かう生合成経路についても同様に、ほぼ全ての生合成酵素遺伝子がケシやハナビシソウから単離されている (Ikezawa et al., 2007; Ikezawa et al., 2009; Hagel et al., 2012; Takemura et al., 2013; Beaudoin et al., 2013) (Fig. 0-1)。現在ではこれらの情報を基に、生合成系の律速酵素遺伝子や分岐酵素遺伝子の過剰発現/発現抑制等により生合成経路を人為的に改変する代謝工学や、生合成経路を大腸菌や酵母などの微生物の中で再構築させる合成生物学が急速に発展しつつある (Sato et al., 2001; Fujii et al., 2007; Minami et al., 2008; Takemura et al., 2010; Nakagawa et al., 2011; Fossati et al., 2014)。一方で、IQA 生合成系の発現制御に関する知見は、高等植物が普遍的に生産する

アントシアニン等のフェニルプロパノイド生合成系に比べると非常に少ない。しかし、有用二次代謝産物の安定かつ大量供給系の確立という観点から考えると、律速酵素の同定が困難な生合成系を包括的に強化することが期待できる発現制御因子の単離、およびその制御機構の解明は非常に重要であると言える (Broun, 2004)。実際、二次代謝生合成系の発現制御因子を用いた代謝系の改変の事例としては、キンギョソウ (*Antirrhinum majus*) の Del と Ros1 という 2 種類の転写因子をトマト (*Solanum lycopersicum*) に導入することで、アントシアニンの産生量が飛躍的に向上した例などがあげられる (Butelli et al., 2008)。

アルカロイド生合成系の発現制御機構に関して先駆的な研究が行われてきたのは、ニチニチソウが産生するビンブラスチンに代表される、モノテルペノイドインドールアルカロイド (MIA) 生合成系である。MIA は、L-トリプトファンが脱炭酸されて生じるトリプタミンと、ゲラニルピルビン酸を前駆体として生合成されるモノテルペン的一种、セコロガニンが縮合して生成されるストリクトシジンから生合成される (Facchini and De Luca, 2008)。この縮合反応を担う酵素をコードする *strictosidine synthase (STR)* 遺伝子のプロモーターを用いた yeast one-hybrid スクリーニングにより単離された AP2/ERF 型の転写因子、octadecanoid derivative responsive Catharanthus AP-2 domain protein 2 (ORCA2)、およびアクチベーションタギング法により単離された ORCA3 はともに MIA 生合成系の転写活性化因子として機能していることが明らかとなっている (Menke et al., 1999; van der Fits and Memelink, 2000)。他にも MYB 様 DNA 結合ドメインを持つ転写活性化因子 box P-binding factor-1 (BPF-1) や、転写抑制因子である zinc finger Catharanthus transcription factor (ZCT) など、MIA 生合成系における複数の発現制御因子がニチニチソウから単離されている (van der Fits et al., 2000; Pauw et al., 2004)。

一方、IQA 生合成系の転写因子として当研究室で初めて単離されたのが、植物特異的な WRKY 型転写因子、CjWRKY1 である (Kato et al., 2007)。前述のニチニチソウにおいては、転写因子の単離にアルカロイド生産を誘導するメチルジャスモン酸 (MeJA) やエリシターが利用されていたのに対し、当研究室の加藤伸彦博士らは、細胞選抜により確立されたベルベリン高生産性オウレン培養細胞株 (以下、156-S 株) (Sato and Yamada, 1984) と無選抜のベルベリン低生産性オ

ウレン培養細胞株（以下、CjY株）における遺伝子発現量の比較と、オウレンプロトプラストを用いた一過的RNAi系（Dubouzet et al., 2005）を組み合わせることで、ベルベリン生合成系の転写活性化因子、CjWRKY1の単離に成功した。しかし、加藤博士らの実験結果では、*CjWRKY1*の発現量は156-S株よりもCjY株で高い傾向にあるなど、一部その詳細な機能について不明な点も多い。特に、ベルベリン生合成に関わる酵素遺伝子の発現量が顕著に高い156-S株において、*CjWRKY1*の発現量が必ずしも高くないという結果は、MIA生合成系において複数の転写因子が単離されているという事実と合わせて、ベルベリン生合成系の発現制御因子がCjWRKY1以外にも存在するという仮説を容易に想起させるものであった。

以上の結果・考察をふまえ、当研究室の古株靖久氏はCjWRKY1以外の複数の発現制御因子候補遺伝子をオウレンの expressed sequence tag (EST)ライブラリーから選抜し、一過的RNAiスクリーニングを行った（Fig. 0-2）。具体的には、候補遺伝子配列を標的とする double-stranded RNA (dsRNA)を、156-S株から単離したプロトプラストに一過的に導入し、ベルベリン生合成酵素遺伝子の1つである (*S*)-norcochlorine-6-O-methyltransferase (*6OMT*)の発現量を解析することで、その発現制御因子が*6OMT*の発現制御に関わるかどうかを判別した。その結果、bHLH型の転写因子をコードする遺伝子の発現抑制が*6OMT*の発現量を顕著に減少させることが見出され、この遺伝子は*CjbHLH1*と名付けられた。*CjbHLH1*の発現抑制は*6OMT*だけではなく、(*S*)-tetrahydroprotoberberine oxidase (*THBO*)を除く全ての生合成酵素遺伝子の発現量を顕著に減少させる一方、一次代謝やストレス応答に関わる遺伝子の発現量に影響を及ぼさないことから、*CjbHLH1*はベルベリン生合成系の転写活性化因子として機能している可能性が考えられた（Fig. 0-3）。一方で、古株氏の実験では*CjbHLH1*の一過的過剰発現においてもベルベリン生合成酵素遺伝子群の発現抑制が確認されており、その詳細な制御機構に関しては不明な点が多かった（古株靖久修士論文、平成17年度）。

本研究では、ベルベリン生合成系の転写因子として単離された*CjbHLH1*がどのような機構で同生合成系を制御しているのかを明らかにするために、第1章において*CjbHLH1*の詳細な機能解析を行った。その結果、*CjbHLH1*はIQA産生植物種に特徴的なbHLH型転写因子であるこ

と、核局在性や MeJA 応答性を示すこと、さらには一部の生合成酵素遺伝子プロモーターへの結合を介して転写制御を行っていることが明らかとなった。さらに、第 1 章の後半では、同時期に報告された MIA やニコチン生合成系の bHLH 型転写因子と CjbHLH1 との比較、および考察を行った。第 2 章においては、ベルベリンと一部生合成経路が共通しているサンギナリンを産生するハナビシソウに着目し、ハナビシソウの CjbHLH1 ホモログが CjbHLH1 と同様に IQA 生合成系の発現制御に関わるのかどうかを、オウレンでは作出が困難な安定形質転換体を用いて解析し、ハナビシソウ CjbHLH1 ホモログがサンギナリン生合成系の発現制御に関わることを示した。

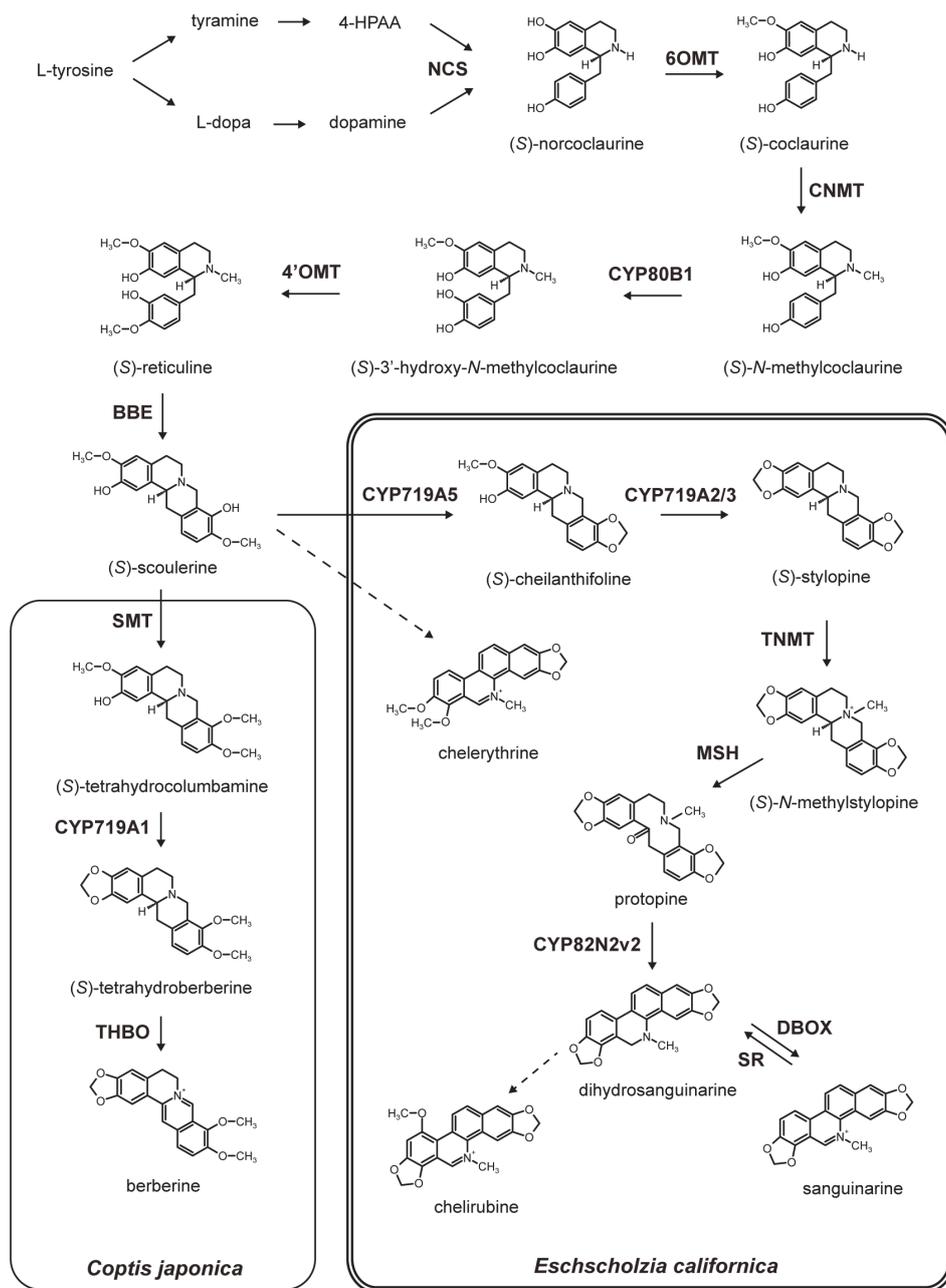


Fig. 0-1 ベルベリンおよびサンギナリン生合成経路

NCS, (S)-norcoclaurine synthase; 6OMT, (S)-norcoclaurine 6-O-methyltransferase; CNMT, (S)-coclaurine-N-methyltransferase; CYP80B1, (S)-N-methylcoclaurine 3'-hydroxylase; 4'OMT, (S)-3'-hydroxy-N-methylcoclaurine-4'-O-methyltransferase; BBE, berberine bridge enzyme; SMT, (S)-scoulerine-9-O-methyltransferase; CYP719A1, (S)-canadine synthase; THBO, (S)-tetrahydroprotoberberine oxidase; CYP719A5, (S)-cheilanthifoline synthase; CYP719A2/3, (S)-stylophine synthase; TNMT, (S)-tetrahydroprotoberberine cis-N-methyltransferase; MSH, (S)-N-methylstylophine 14-hydroxylase; CYP82N2v2, protopine-6-hydroxylase; DBOX, dihydrobenzophenanthridine oxidase; SR, sanguinarine reductase.

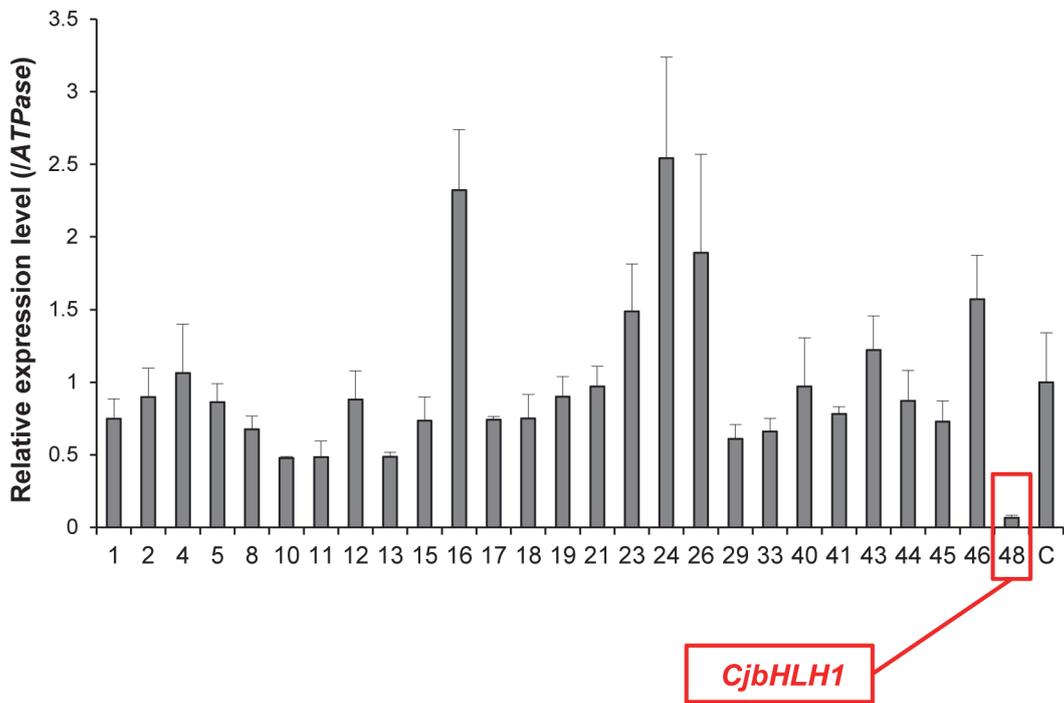
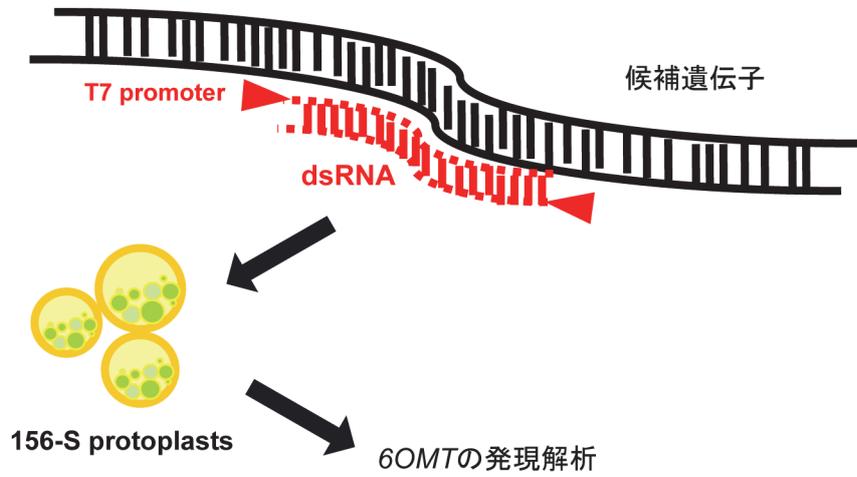


Fig. 0-2 一過的 RNAi スクリーニングによる *CjbHLH1* の単離

グラフは一過的 RNAi により各候補遺伝子の発現を抑制したオウレン 156-S 株プロトプラストにおける 6OMT の発現量を、コントロール (C) を 1 とした場合の相対発現量で示す (平成 17 年度古株靖久修士論文より一部改変)。

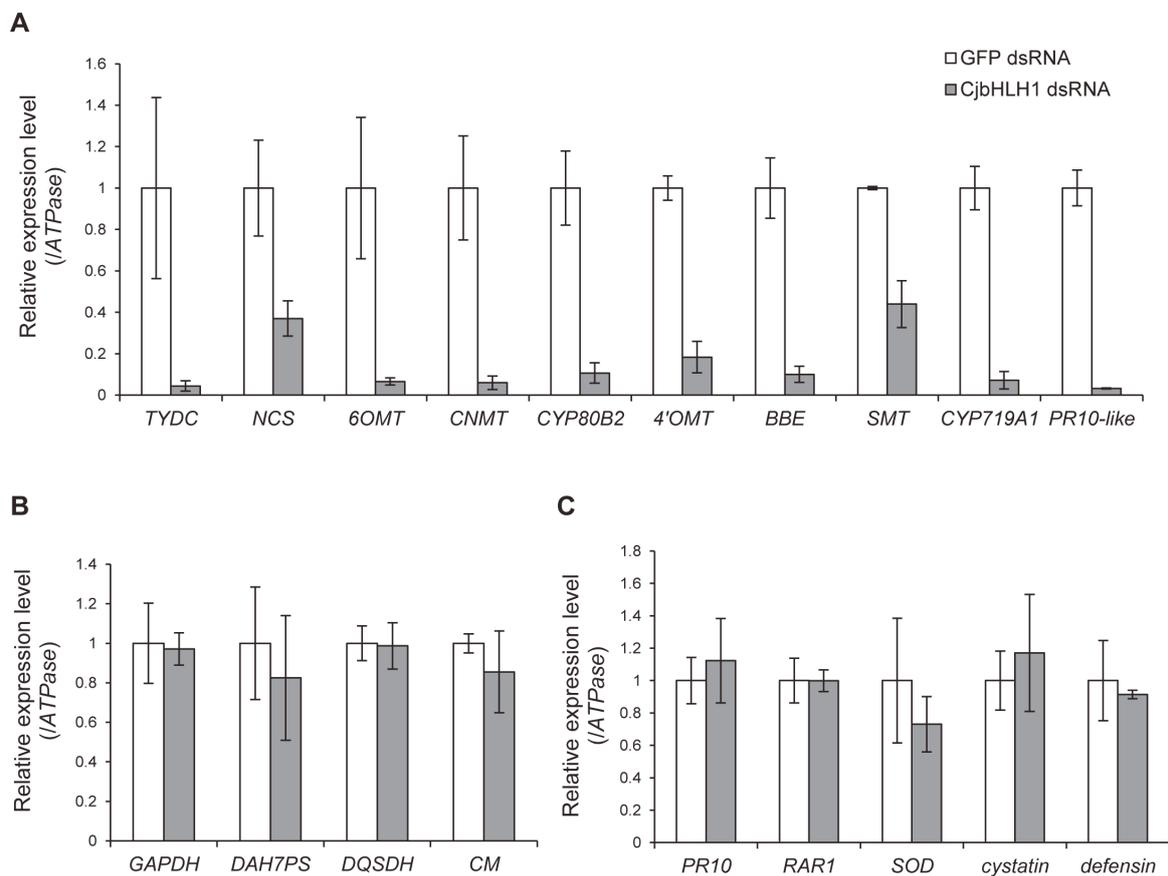


Fig. 0-3 *CjbHLLH1* の一過的発現抑制

A, ベルベリン生合成酵素遺伝子; B, 一次代謝遺伝子; C, ストレス応答遺伝子の発現量をそれぞれ示す。一過的 RNAi により *CjbHLLH1* の発現を抑制したオウレン 156-S 株プロトプラストにおける各遺伝子の発現量を *realtime*-PCR により解析した。*ATPase* 遺伝子の発現量を内部標準として補正を行い、コントロールの発現量を 1 とし各遺伝子の相対発現量を算出した (n=3, ±SD, 平成 17 年度古株靖久修士論文より一部改変)。

第1章 オウレン CjbHLH1 の機能解析

古株靖久氏による一過的 RNAi スクリーニングにより単離された CjbHLH1 は、植物に典型的な Group B に属する bHLH 型転写因子であり、その発現抑制が生合成系に及ぼす影響は大きく、*THBO* を除く全てのベルベリン生合成酵素遺伝子； *tyrosine decarboxylase (TYDC)*, *(S)-norcochlorine synthase (NCS)*, *6OMT*, *(S)-cochlorine-N-methyltransferase (CNMT)*, *(S)-N-methylcochlorine 3'-hydroxylase (CYP80B2)*, *(S)-3'-hydroxy-N-methylcochlorine-4'-O-methyltransferase (4'OMT)*, *berberine bridge enzyme (BBE)*, *(S)-scoulerine-9-O-methyltransferase (SMT)*, *(S)-canadine synthase (CYP719A1)* の発現量が顕著に低下することが明らかとなっていた。この結果から、CjbHLH1 は CjWRKY1 と同様にベルベリン生合成系を包括的に制御する転写活性化因子として機能していることが推察された。しかし、156-S 株プロトプラストにおける *CjWRKY1* の一過的過剰発現では、ベルベリン生合成酵素遺伝子の発現量が増加していたのに対し (Kato et al., 2007)、*CjbHLH1* の一過的過剰発現では、ベルベリン生合成酵素遺伝子群の発現量が一過的 RNAi の場合と同様に減少することが示されていた (古株靖久修士論文、平成 17 年度)。この結果は、CjbHLH1 によるベルベリン生合成系の発現制御機構が単純ではないことを示唆していると考えられたが、その制御機構に関してはほとんど明らかにされていなかった。そこで本章では、ベルベリン生合成系の発現制御に関わる CjbHLH1 の詳細な機能を解明することを目的とし、156-S 株プロトプラストを用いた一過的過剰発現、一過的レポーターアッセイ、クロマチン免疫沈降等の実験を行い、*CjbHLH1* の一過的過剰発現がベルベリン生合成酵素遺伝子の発現量に及ぼす影響が経時的に変化することや、CjbHLH1 が生合成酵素遺伝子のプロモーター領域に直接的に結合して転写を誘導することを示した。また、本研究の遂行中に報告された他のアルカロイド生合成系の発現制御に関わる bHLH 型転写因子との比較を行い、CjbHLH1 が IQA 生合成系に特徴的な bHLH 型転写因子である可能性について検証した。

[材料と方法]

オウレン培養細胞

当研究室で確立されたベルベリン高生産性のオウレン培養細胞 156-S 株は、3% sucrose, 10 μ M 1-naphthylacetic acid (NAA), 10 nM benzyladenine (BA)を含む Linsmaier-Skoog (LS)培地 (pH5.7)で、暗所、23°C, 90rpm で振盪培養し、3週間ごとに植え継ぎを行った。実験に使用する際は全て、植え継ぎ後 2~3 週間のものを使用した。ベルベリン低生産性の無選抜オウレン培養細胞 CjY 株は、3% sucrose, 100 μ M NAA, 1 μ M BA を含む LS 培地 (pH5.7)で、暗所、23°C, 90rpm で振盪培養し、2 週間ごとに植え継ぎを行った。実験に使用する際は全て、植え継ぎ後 1~2 週間のものを使用した。

アライメント解析

種々の bHLH 型転写因子の配列は NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)から取得し、SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)を用いて bHLH ドメインのみを抜き出した。配列のアライメントには Clustal W を使用した。bHLH ドメインを基にした分子系統樹は、Neighbor-Joining (NJ)法、およびブートストラップ法 (1000 回の反復試行)を利用し、MEGA 5.0 を用いて作成した (Kumar et al., 2008)。

PEG 法による一過的遺伝子導入

植え継ぎ後 2~3 週間の 156-S 培養細胞 10 g に、Millex GS 0.22 μ m でフィルター滅菌した 20 ml の酵素処理液[0.4% Cellulase Onozuka RS (Yakult), 0.2% Macerozyme R10 (Yakult), 0.01% Pectolyase (協和化成), 0.6 M sorbitol, 5 mM MES-KOH (pH5.5), 0.5 mM $MgCl_2$]を加え、28°C, 40 rpm で 6~16 時間振盪培養させることでプロトプラストを単離した。得られたプロトプラストは 80 μ m のナイロンメッシュに通し、W5 solution (pH5.8, 154 mM NaCl, 125 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 5 mM KCl, 5 mM glucose)で洗浄した後、 10^6 個/mlになるように MaCaM solution [5m MES-KOH (pH 5.8), 0.4 M mannitol, 20 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$]を加えた。PEG 法では、 10^5

個のプロトプラストに対し、10 μg のプラスミドを導入するよう溶液を調製した後、等量の PEG-MaCaN solution [40% PEG4000 (Sigma-Aldrich), 0.4 M mannitol, 0.1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$]を加えて、24°C, 40 rpm で 15 分間振盪培養した。再び W5 solution で洗浄した後、12 well あるいは 24 well プレート (IWAKI)に移して 24°C, 40 rpm で 24~72 時間振盪培養し、その後の解析に用いた。

定量的 RT-PCR

オウレン培養細胞、およびオウレンプロトプラストからの RNA 抽出には、RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)を使用し、操作は付属のマニュアルに従って行った。得られた total RNA は、DNase I (Invitrogen)処理により残存する DNA を除去した後、Oligo dT primer および Super Script III reverse transcriptase (Invitrogen)を用いた逆転写反応による cDNA 合成に用いた。得られた cDNA は RNase H (Invitrogen)処理により残存する RNA を除去した後、realtime-PCR 解析に用いた。Realtime-PCR には特異的 primer pair、および iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad)を使用し、解析には DNA Engine Opticon Continuous Fluorescence Detection System (MJ Research)あるいは CFX96 Real-time PCR Detection System (Bio-Rad)を用いた。測定した遺伝子の相対発現量は、*ATPase* 遺伝子を内部標準とし、 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法により値を算出した。解析に用いたプライマーの配列は Table 1-1 に示した。

Table 1-1 定量的 RT-PCR で用いたプライマーの配列

Gene		Oligonucleotide sequences (5' to 3')
<i>CjTYDC</i>	Forward	AATGAAACACGTGCCAATGA
	Reverse	AAACAACGTGTCGCTCCTCT
<i>CjNCS</i>	Forward	GACTGGGGCTTCTTCCAGTT
	Reverse	TGGCCATAACCTTCCATACC
<i>Cj6OMT</i>	Forward	GTGCATCCTTCACGACTGG
	Reverse	TGCATCATGGATGAGCTTCT
<i>CjCNMT</i>	Forward	ACCACACATGAGATGGCTGA
	Reverse	CCCAGCAGGAAACACGACT
<i>CjCYP80B2</i>	Forward	GAGGTTTTTGAGTTCTGATGTGG
	Reverse	GGACAATGAGGAGAGGTGGA
<i>Cj4'OMT</i>	Forward	GGAAGGACACCCTGATCAAA
	Reverse	TTCCTCCACCAACATCAACA
<i>CjBBE</i>	Forward	GACGAAGCACACCAGTGAAA
	Reverse	AACGTGAGCCAAAATCCATC
<i>CjSMT</i>	Forward	GGATTTCTTTCAGTATGCTGG
	Reverse	TCTCTATCCCGTCTCCAATC
<i>CjCYP719A1</i>	Forward	TGGTGAGGCCACTTCTCTCT
	Reverse	TCTTGCTCCTTGTTACG
<i>CjCM</i>	Forward	TTAATCCGCAAGAGGACA
	Reverse	CCATGAAACCCATCCATAGC
<i>CjGAPDH</i>	Forward	ATCAACGGGTTTGAAGGAT
	Reverse	CAGTGGTGATGAATGGATCG
<i>CjRAR1</i>	Forward	AGAATTGGGTGCGATGCTAC
	Reverse	GGCAACAGCTCCACTTTTC
<i>CjCystatin</i>	Forward	GGGTACAAGCCCATTGAAGA
	Reverse	TTTGTGACCTCCCTTTTT
<i>CjbHLH1</i>	Forward	TGCTTCCTCGGTTGCTATCT
	Reverse	TGCATCTATTGGTGCTCCTG
<i>CjATPase</i>	Forward	TCAACAGCCAAAGTTGTTG
	Reverse	AATTCAGTCTGCCCGTGATT
<i>CjActin</i>	Forward	GTCACACCGTCCCCATTTA
	Reverse	GTCACGGACGATTTCTCGTT

細胞内局在解析

Green fluorescent protein (GFP)の65番目のセリンをトレオニンに置換した synthetic GFP (sGFP)を CaMV35S プロモーター下で発現させるベクター、35S::*sGFP*は静岡県立大学の丹羽康夫博士から分与していただいた (Niwa et al., 1999)。 *CjbHLH1* 全長を増幅するプライマーに *BsrGI* サイトを付加し、 *CjbHLH1* の cDNA をテンプレートに PCR を行い、得られた PCR 産物を pGEM-T Easy vector (Promega)にサブクローニングした。得られたプラスミドはシーケンズにより配列確認した後、 *BsrGI* 処理により *CjbHLH1* 断片を切り出し、同じく *BsrGI* 処理した 35S::*sGFP* ベクターにライゲーションすることで、35S::*sGFP-CjbHLH1* ベクターを作成した。得られた 35S::*sGFP-CjbHLH1* および 35S::*sGFP* ベクターはパーティクルガン法によりタ

マネギ表皮細胞に、または PEG 法により 156-S 株プロトプラストにそれぞれ一過的に導入し、24 時間後に蛍光顕微鏡 BZ9000 (KEYENCE)により観察した。パーティクルガン法では 1.0 μm の金粒子 25 μl に対し 2.5 μg のプラスミドを使用し、チャンバー内真空度 28 inches Hg、ヘリウム圧 1100 psi の条件下で PDS-1000/He particle gun (Bio-Rad)を用いてタマネギ表皮切片にプラスミドを導入した。

MeJA 処理

CjY 株細胞 2 g に対し 20 ml の培地を添加し、2 週間培養した後、終濃度 100 μM になるよう MeJA を加え、0, 0.5, 1, 6, 24 時間後に細胞を回収し、RNA 抽出に用いた。コントロールには終濃度 0.1%DMSO を加えた細胞を用いた。

一過的ルシフェラーゼレポーターアッセイ

エフェクターコンストラクトには、当研究室の古株氏によって作成された *CjbHLLH1* 過剰発現ベクター (35S::*CjbHLLH1*)、およびコントロール用に作成した *GUS* 過剰発現ベクター (35S::*GUS*)を、生合成酵素遺伝子、*CYP80B2*, *4'OMT*, *CYP719A1* プロモーターの下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子 (*PpLUC*)を付加したレポーターコンストラクトは、当研究室の吉田紗由美氏、大柿麻衣氏、吉本忠司氏によって作成されたものを、リファレンスコンストラクトには、当研究室の加藤博士によって作成されたウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子 (*RrLUC*)過剰発現ベクター (35S::*RrLUC*)を使用した (吉田紗由美修士論文、平成 16 年度; 大柿麻衣修士論文、平成 18 年度; Kato et al., 2007; 吉本忠司修士論文、平成 20 年度)。50000 個の 156-S 株プロトプラストに対し、エフェクターコンストラクト 4 μg , レポーターコンストラクト 3 μg , リファレンスコンストラクト 0.05 μg を PEG 法により導入し、24 時間後に回収した後、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)を用いてルシフェラーゼ活性の測定を行った。活性の測定には Luminometer (BERTHOLD)を使用した。

クロマチン免疫沈降

1%ホルムアルデヒドを含む W5 solution で 10 分間架橋反応させた 156-S 株プロトプラスト 10^7 個に 20 ml の Extraction Buffer 1 [0.4 M sucrose, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl₂, 5 mM β-mercaptoethanol, protease inhibitor cocktail EDTA-free (Roche)]を加え、テフロンホモジナイザーで摩砕し、 $4000\times g$, 4°C で 20 分間遠心し、上清を取り除いた。ペレットに 1 ml の Extraction Buffer 2 [0.25 M sucrose, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 5 mM β-mercaptoethanol, protease inhibitor cocktail EDTA-free (Roche)]を加えて懸濁後、 $15000\times g$, 4°C で 10 分間遠心し、上清を取り除いた。ペレットに 300 μl の Extraction Buffer 2 を加えて再懸濁した後、300 μl の Extraction Buffer 3 [1.7 M sucrose, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM MgCl₂, 0.15% Triton X-100, 5 mM β-mercaptoethanol, protease inhibitor cocktail EDTA-free (Roche)]の上に重層し、 $15000\times g$, 4°C で 1 時間遠心し、上清を取り除いた。得られたペレットに 500 μl の Nuclei Lysis Buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 1% SDS, protease inhibitor cocktail EDTA-free (Roche)]を加え、Handy Sonic UR-20P (Tomy Seiko)によってソニケーションし、DNA を断片化した。 $15000\times g$, 4°C で 10 分間の遠心操作を 2 回行った後、上清に 10 倍希釈になるよう CHIP Dilution Buffer [1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl (pH 8.0), 167 mM NaCl]を加えた。これを 2 本の 2 ml チューブに分注し、それぞれに 0.1 mg のサケ精子 DNA でブロッキングした 40 μl の Dynabeads Protein A (Invitrogen)を加え、1 時間、低温室のローテーターでインキュベートした。Dynabeads を除去した後、60 μl は Input として回収し、1800 μl には CjbHLH1 抗体 5 μl を加え、残りの 1800 μl は何も加えずにコントロールとし、低温室のローテーターで一晩インキュベートした。翌日、0.1 mg のサケ精子 DNA でブロッキングした 40 μl の Dynabeads Protein A (Invitrogen)を加え、1 時間、低温室のローテーターでインキュベートした。その後、Dynabeads を回収し、Low Salt Wash Buffer [150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)], High Salt Wash Buffer [500 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)], LiCl Wash Buffer [0.25 M LiCl, 1% sodium deoxycholate, 1 mM

EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)], TE Buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA]の順で洗淨し、再度 TE Buffer で洗淨した後、65°Cで保温した 250 μ l の Elution Buffer (1% SDS, 0.1 M NaHCO₃)を加えて抗体と DNA の複合体を溶出した。再度溶出操作を行った後、終濃度 200 mM となるよう NaCl を加え、65°Cで一晩インキュベートし、タンパク質と DNA を解離した。その後、10 μ l の 0.5 M EDTA, 20 μ l の 1 M Tris-HCl (pH6.5), 1 μ l の Proteinase K (Invitrogen) を加えて 37°Cで 1 時間インキュベートし、フェノール・クロロホルム処理によりタンパク質を除去した後、エタノール沈殿により DNA 断片を回収した。回収した DNA 断片は 10 mM Tris-HCl (pH7.5)に溶解し、その後の PCR 解析に用いた。解析に用いたプライマーの配列は Table 1-2 に示した。

Table 1-2 クロマチン免疫沈降で用いたプライマーの配列

Target		Oligonucleotide sequences (5' to 3')
<i>CjCYP80B2pro</i>	Forward	AACCGGTGATAAGGGTATCCA
	Reverse	GTTCCGTTCTTGCAACTATGTG
<i>Cj4'OMTpro</i>	Forward	TCGGCACACCCCTAATTCAC
	Reverse	CTGGATATAGATGCATAGGTGAGAG
<i>CjCYP719A1pro</i>	Forward	AGAGGATCACGCTTCATCCC
	Reverse	AACCAAACGCACACTCGAGTC
<i>CjATPase</i>	Forward	ATTCAGCGGAGATGAAACAGCC
	Reverse	GGCATCACCAACGATACCAATAG

[結果]

CjbHLH1 の一次構造比較

研究開始当初、アルカロイド生合成系の bHLH 型転写因子に関する報告は、ニチニチソウの MIA 生合成系の制御因子と考えられていた CrMYC1 のみであった (なお、後に CrMYC1 は MIA 生合成系の制御因子ではないことが報告された) (Chatel et al., 2003) が、二次代謝に関わる bHLH としては、アントシアニン生合成系で機能するシロイヌナズナの GLABRA 3 (GL3) や ENHANCER OF GLABRA 3 (EGL3) など複数がすでに知られていた (Koes et al., 2005)。これらの bHLH 型転写因子と CjbHLH1 の類似性について検証するためにアミノ酸配列を用いて BLAST 検索を行ったところ、CjbHLH1 と相同性の高い遺伝子はモデル植物であるシロイヌナズナやイネには存在せず、60~80% と高い相同性を示す遺伝子がオダマキ (*Aquilegia formosa* × *Aquilegia pubescens*)、ユリノキ (*Liriodendron tulipifera*)、ウマノスズクサ (*Saruma henryi*, *Aristolochia fimbriata*) といった IQA 産生植物種の EST にのみ存在することが明らかとなった (Fig. 1-1)。シロイヌナズナの bHLH の中で最も CjbHLH1 と相同性が高かったのは、胚乳の形成を遅延させる働きを持つ RETARDED GROWTH OF EMBRYO 1 (RGE1) であり (Kondou et al., 2008)、その相同性は 20% 程度であった。また、AtRGE1 が二次代謝生合成系の制御に関わるといった報告は現在のところ存在しない。さらに、様々な bHLH 型転写因子の bHLH ドメインを基に分子系統樹を作成すると、CjbHLH1 とそのホモログは、前述のアントシアニン生合成系や後述する他のアルカロイド生合成系の bHLH 型転写因子とは異なるクレードに属していた (Fig. 1-2)。以上の結果から、CjbHLH1 とそのホモログは IQA 生合成経路を有するその産生植物種に特徴的な bHLH 型転写因子である可能性が示唆された。

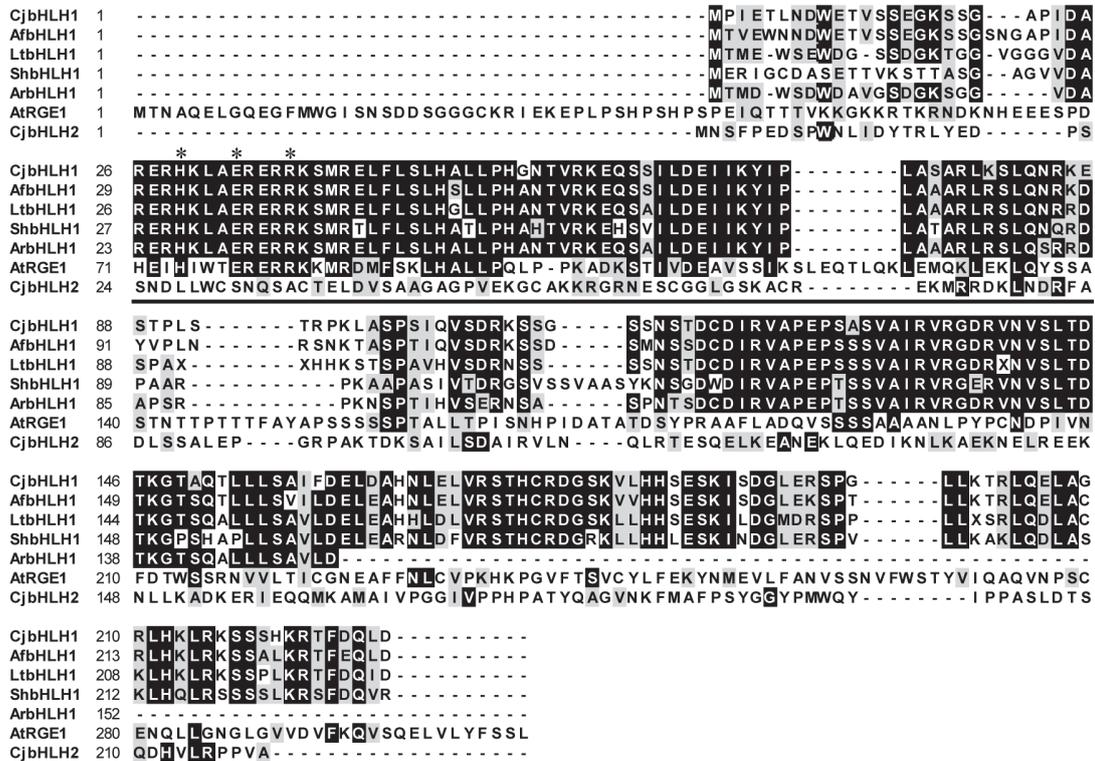


Fig. 1-1 CjbHLH1 ホモログのシーケンスアライメント

AfbHLH1, *Aquilegia formosa* × *Aquilegia pubescens* bHLH1 (GenBank, DT752478); LtbHLH1, *Liriodendron tulipifera* bHLH1 (FD498024); ShbHLH1, *Saruma henryi* bHLH1 (DT584473) ArbHLH1, *Aristolochia fimbriata* bHLH1 (FD755492). 黒、グレイのボックスはそれぞれ該当するアミノ酸残基が同一、類似であることを示す。黒下線は bHLH ドメインを、アスタリスクは DNA 認識に関わるアミノ酸残基をそれぞれ示す。

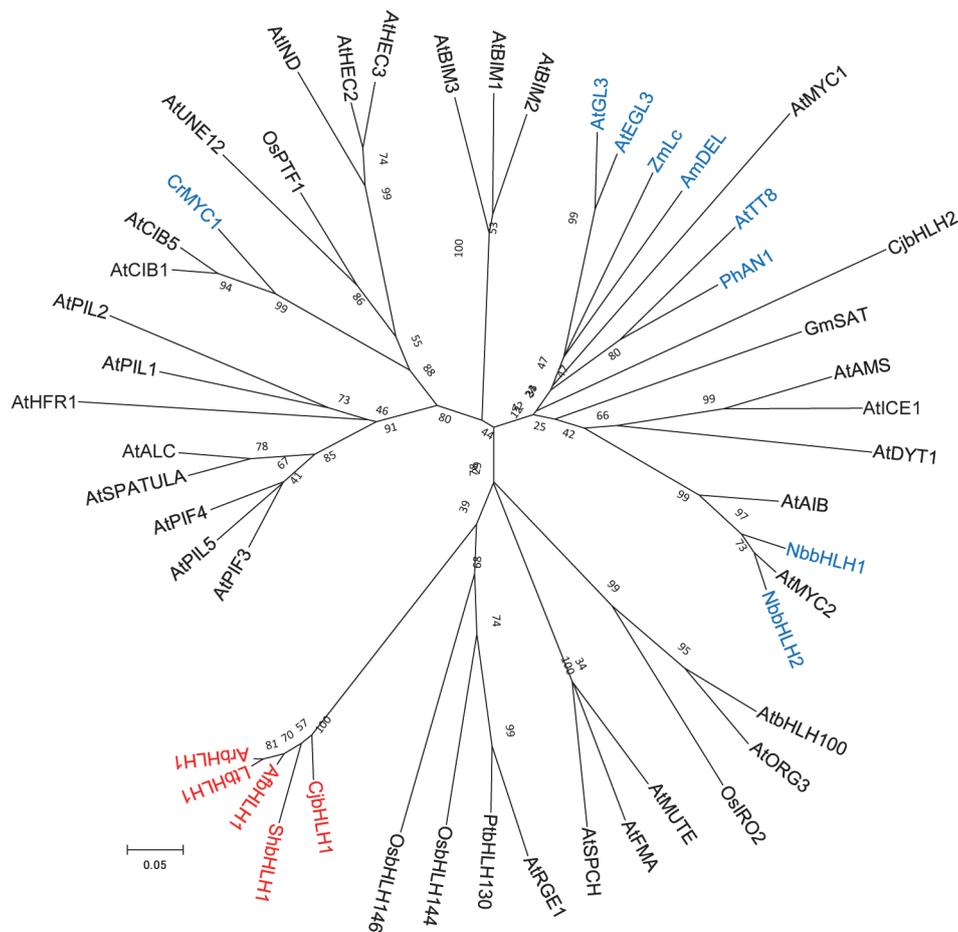


Fig. 1-2 種々の bHLH 型転写因子ドメインの分子系統樹

様々な植物種における bHLH 型転写因子の bHLH ドメインを基に分子系統樹を作成した。フェニルプロパノイドや他のアルカロイド生合成系の制御に関わる bHLH を青で、CjbHLH1 とそのホモログを赤でそれぞれ示す。AtGL3, Q9FN69; AtEGL3, Q9CAD0; AtMYC2, Q39204; AtPIF3 (Phytochrome-Interacting Factor 3), O80536; AtPIF4, Q8W2F3; AtMYC1, Q8W2F1; AtPIL5 (Phytochrome-Interacting factor 3-Like 5), Q8GZM7; AtAIB (ABA-Inducible bHLH-Type), Q9ZPY8; AtDYT1 (Dysfunctional Tapetum 1), O81900; AtSPATULA, Q9FUA4; AtHRF1 (Long Hypocotyl in Far-Red 1), Q9FE22; AtHEC2 (Hecate 2), Q9SND4; AtIND (Indehiscent), O81313; AtTT8 (Transparent Testa 8), Q9FT81; AtHEC3, Q9LXD8; AtMUTE, Q9M8K6; AtBIM1 (BES1-interacting Myc-like protein 1), Q9LEZ3; AtUNE12 (Unfertilized Embryo Sac 12), O22768; AtAMS (Aborted microspores), Q9ZVX2; AtCIB1 (Cryptochrome-Interacting basic-Helix-Loop-Helix 1), NP_195179; AtALC (Alcatraz), Q9FHA2; AtCIB5, NP_173950; AtRGE1, Q9FXA3; AtFAMA, Q56YJ8; AtSPCH (Speechless), Q700C7; AtbHLH100, Q9ZVB5; AtBIM2, Q9CAA4; AtICE1 (Inducer of CBF Expression 1) 822287; AtPIL1, Q8L5W8; AtPIL2, Q8L5W7; AtBIM3, Q9FMB6; CrMYC1, AAQ14331; ZmLc, P13526; PhAN1 (Anthocyanin 1), AAG25928; GmSAT (symbiotic ammonium transporter), AAC32828; AmDEL, AAA32663; OsIRO2, FAA00382; OsPTF1 (Pi starvation induced transcription factor 1), AAO73566; NbbHLH1, GQ859152; NbbHLH2, GQ859153.

*CjbHLH1*の一過的過剰発現

古株氏が行った *CjbHLH1* の一過的過剰発現では、ベルベリン生合成酵素遺伝子群の発現量が減少することが示されていた（古株靖久修士論文、平成 17 年度）。この時、*CjbHLH1* 過剰発現ベクターの 156-S 株プロトプラストへの導入から回収までに 72 時間の培養期間が設けられていたが、生合成酵素遺伝子の発現量はプロトプラスト化によって急激に上昇することから、培養期間を短くした方が *CjbHLH1* 過剰発現の効果が明白になると考えられた。そこで、*CjbHLH1* 過剰発現ベクターの導入後 6 時間でプロトプラストを回収し、生合成酵素遺伝子群の発現量を realtime-PCR により解析した (Fig. 1-3)。その結果、コントロールと比べて有意差が見られたのは *TYDC*, *NCS*, *CNMT*, *4'OMT*, *BBE* のみであったが、生合成酵素遺伝子の発現量の上昇傾向が見られた。一方、一次代謝やストレス応答に関わる遺伝子の発現量は、コントロールと比べて差は見られなかった。なお、*CjbHLH1* の発現量はベクター導入後 6 時間後でも十分に高い値を示した。*CjbHLH1* の一過的過剰発現が生合成酵素遺伝子の発現に及ぼす影響は、一過的発現抑制ほど顕著ではなかったものの、生合成酵素遺伝子の発現量が上昇していたことから *CjbHLH1* が確かにベルベリン生合成系の転写活性化因子として機能していることが強く示唆された。さらに、*CjbHLH1* 過剰発現ベクターの導入後 24, 72 時間でプロトプラストを回収し、生合成酵素遺伝子群の発現量の経時変化を解析した結果、24 時間では生合成酵素遺伝子の発現量はコントロールと比べて差は見られず、72 時間では逆にコントロールより減少していた (Fig. 1-4)。以上の結果から、生合成酵素遺伝子の発現量はプロトプラスト化によって経時的に上昇するが、*CjbHLH1* を過剰発現させた時、この経時的な発現上昇が抑えられていることが示唆された。

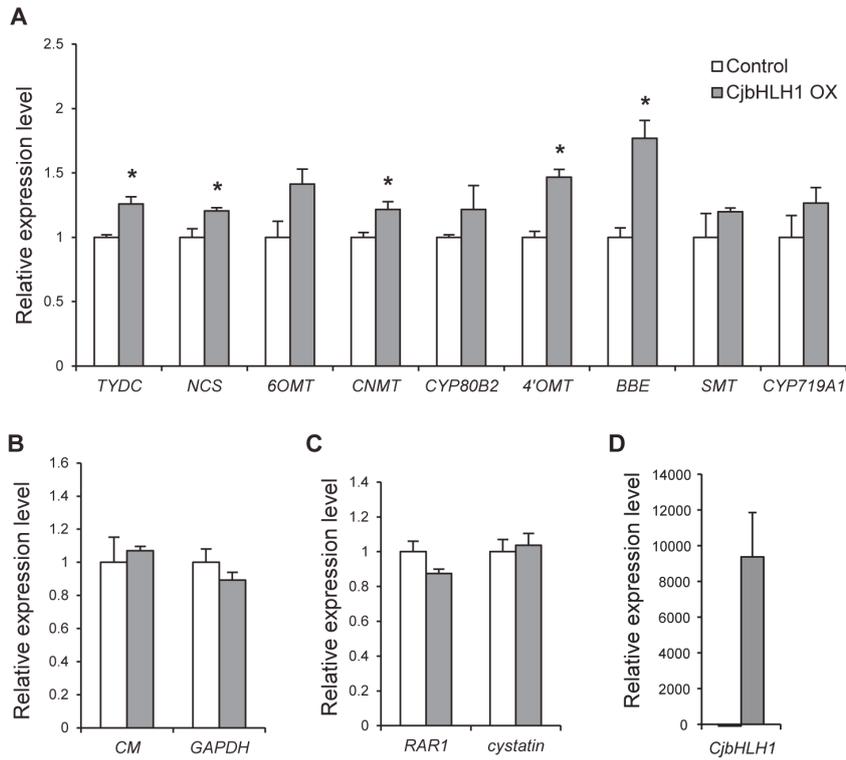


Fig. 1-3 *CjbHLH1* 過剰発現 6 時間後における各遺伝子の発現量

A, ベルベリン生合成酵素遺伝子; B, 一次代謝遺伝子; C, ストレス応答遺伝子; D, *CjbHLH1* の発現量を示す。*CjbHLH1* 過剰発現ベクター導入 6 時間後のプロトプラストにおける各遺伝子の発現量を realtime-PCR により解析した。各遺伝子の発現量は、コントロールの値を 1 として相対値を算出した (n=3, ±SD, Student's t test, * p<0.01)。

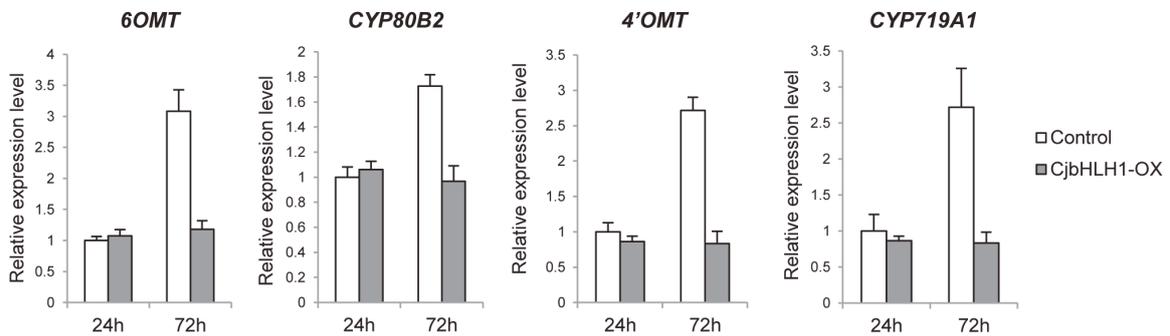


Fig. 1-4 *CjbHLH1* 過剰発現における生合成酵素遺伝子発現量の経時変化

CjbHLH1 過剰発現ベクター導入 24, 72 時間後のオウレン 156-S 株プロトプラストにおける生合成酵素遺伝子 (*6OMT*, *CYP80B2*, *4'OMT*, *CYP719A1*) の発現量を realtime-PCR により解析した。24 時間後のコントロールの値を 1 として相対発現量を算出した (n=3, ±SD)。

CjbHLH1 の細胞内局在性

CjbHLH1 は bHLH 型転写因子であることから、核に局在し機能していることが推察された。これを確かめるために、CjbHLH1 の N 末端側に sGFP を付加した融合タンパク質をタマネギ表皮細胞や 156-S 株プロトプラストにおいて発現させ、その細胞内局在性を解析した (Fig. 1-5)。蛍光顕微鏡観察の結果、タマネギ表皮細胞、156-S 株プロトプラストともに、核に sGFP の蛍光が観察されたことから、CjbHLH1 が核に局在していることが確認された。

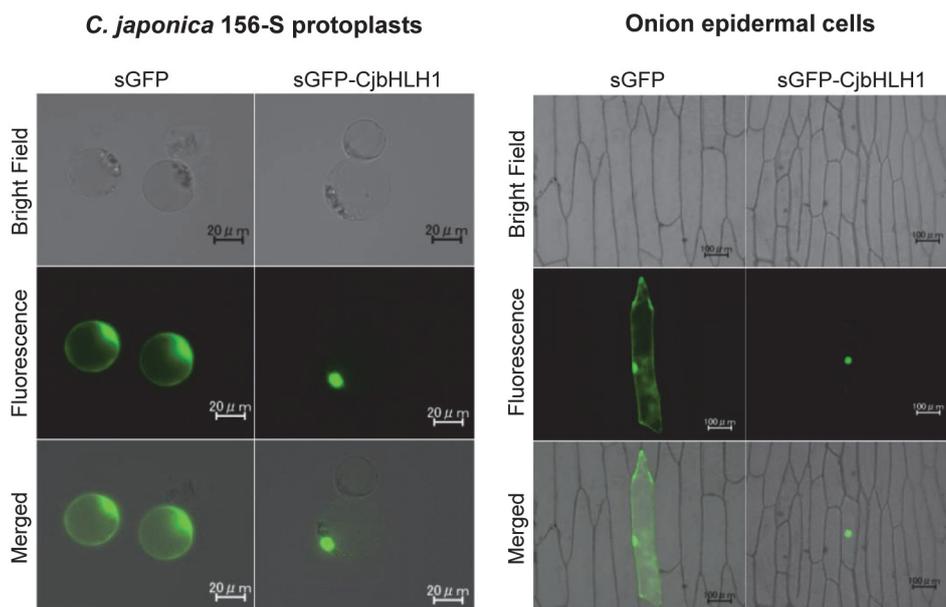


Fig. 1-5 CjbHLH1 の細胞内局在性

左がオウレン 156-S 株プロトプラスト、右がタマネギ表皮細胞における sGFP (コントロール)、および sGFP-CjbHLH1 融合タンパク質の細胞内局在性を示す。

CjbHLH1 の転写活性化能

CjbHLH1 の一過的過剰発現によりベルベリン生合成酵素遺伝子群の発現上昇傾向が認められたが、*CjbHLH1* の転写活性化能を別の実験で確認するために、当研究室で単離された *CYP80B2*, *4'OMT*, *CYP719A1* プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を融合したコンストラクトを用いた一過的ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った (Fig. 1-6)。解析の結果、*4'OMT*, *CYP719A1* プロモーターについては、コントロールと比べて有意にルシフェラーゼ活性の上昇が確認されたが、*CYP80B2* プロモーターに関しては有意な差は見られなかった。なお、前述した *CjbHLH1* 一過的過剰発現の実験では、ベルベリン生合成酵素遺伝子群の発現量に及ぼす影響が経時的に変化していたのに対し、一過的ルシフェラーゼレポーターアッセイでは、ルシフェラーゼ活性の経時的な変化は見られなかったため、ここでは 24 時間後の解析結果を示している。

4'OMT, *CYP719A1* のプロモーター領域には、bHLH の標的配列として知られる G-box/E-box 様配列が多数見られることから、*4'OMT*, *CYP719A1* のプロモーター領域を徐々に短くしたデリベーションコンストラクトを作成し、先ほどと同様に一過的ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った (Fig. 1-7)。その結果、*4'OMT*, *CYP719A1* プロモーターともに、いずれのデリベーションコンストラクトを用いた解析においてもルシフェラーゼ活性の上昇が見られた。特に、*4'OMT* プロモーターの 1st ATG から -164 bp, *CYP719A1* プロモーターの 1st ATG から -254 bp という最少プロモーター領域のみを含むデリベーションコンストラクトを用いた解析においてもルシフェラーゼ活性の有意な上昇が確認された。したがって、*4'OMT*, *CYP719A1* プロモーターの 1st ATG 近傍に、*CjbHLH1* の転写に関わる重要な領域が存在する可能性が示唆された。

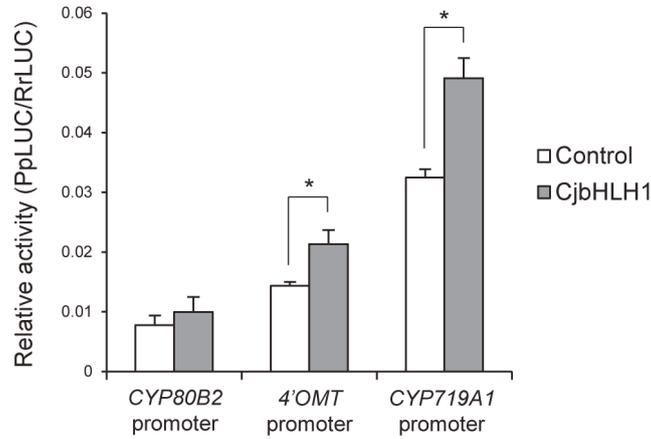


Fig. 1-6 CjbHLH1 の転写活性測定

各生成酵素遺伝子プロモーターに対する CjbHLH1 の転写活性を一過的ルシフェラーゼレポーターアッセイにより解析した。PpLUC, RrLUC の活性はそれぞれ 10 秒間測定し、その相対活性 (PpLUC/RrLUC) を算出した (n=3, ±SD, Student's t test, * p<0.01)。

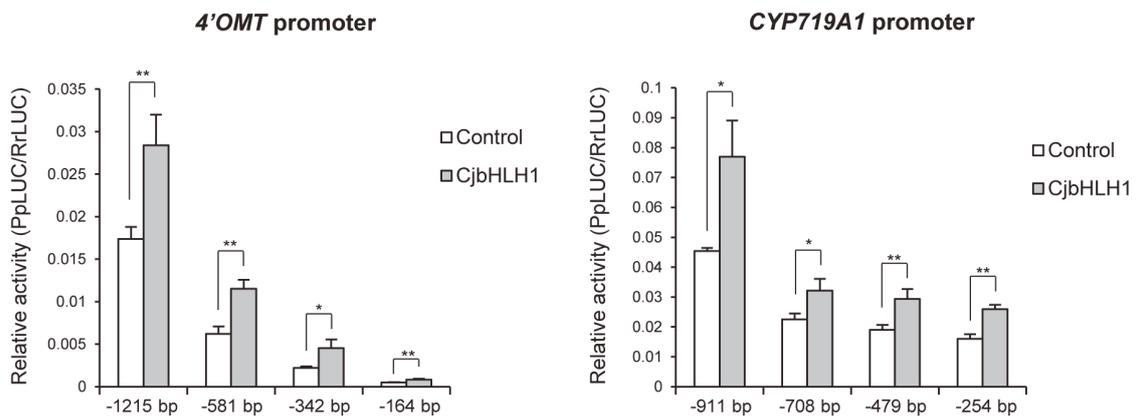


Fig. 1-7 CjbHLH1 の転写制御領域の解析

各生成酵素遺伝子のデリーションプロモーターに対する CjbHLH1 の転写活性を一過的ルシフェラーゼレポーターアッセイにより解析した。PpLUC, RrLUC の活性はそれぞれ 10 秒間測定し、その相対活性 (PpLUC/RrLUC) を算出した (n=3, ±SD, Student's t test, * p<0.05, ** p<0.01)。

CjbHLH1 の生合成酵素遺伝子プロモーターへの結合性

単離されている *CYP80B2*, *4'OMT*, *CYP719A1* プロモーターには bHLH や WRKY の標的となり得るシス因子相同配列が多数存在する (Fig. 1-8)。CjbHLH1 による転写促進活性が確認された *4'OMT*, *CYP719A1* プロモーターの 1st ATG 近傍の領域にも bHLH の標的となり得る G-box/E-box が複数存在し、CjbHLH1 がそれらに直接結合して転写を制御している可能性が考えられた。この可能性を検証するために、CjbHLH1 の特異的抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行った。CjbHLH1 特異的抗体は、当研究室の茶木香保里氏によって作成され、156-S 株プロトプラストから単離した核抽出タンパク質を用いたウェスタンブロッティングにより、この抗体が CjbHLH1 を特異的に認識することが確認されている (茶木香保里修士論文、平成 19 年度)。

CYP80B2, *4'OMT*, *CYP719A1* の 1st ATG から上流約 300 bp を増幅するようなプライマーを作成し、クロマチン免疫沈降により得られたゲノム DNA 断片をテンプレートに PCR を行ったところ、*4'OMT*, *CYP719A1* プロモーターのプライマーを用いた PCR では、CjbHLH1 抗体でのクロマチン免疫沈降産物で明瞭なシグナルを示すバンドの増幅が見られたのに対し、*CYP80B2* プロモーター、およびコントロールである *ATPase* 遺伝子のプライマーを用いた PCR では、明瞭なシグナルを示すバンド、あるいはバンドの増幅自体が見られなかった (Fig. 1-9)。また、*4'OMT* や *CYP719A1* プロモーターの最上流域に設計したプライマーを用いた PCR では、バンドの明瞭な増幅差は見られなかった。以上の結果から、CjbHLH1 は少なくとも *4'OMT* や *CYP719A1* 遺伝子の 1st ATG 近傍のプロモーター領域に直接結合し、転写を行っていることが示唆された。

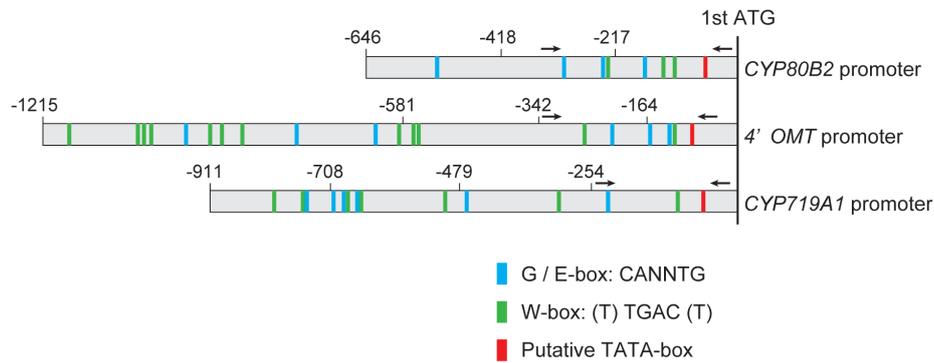


Fig. 1-8 各生成酵素遺伝子プロモーターに存在するシス因子相同配列

CYP80B2, *4'OMT*, *CYP719A1* 遺伝子の 1st ATG より上流に存在する G-box/E-box 相同配列を青で、W-box 相同配列を緑で、推定 TATA-box を赤で示す。図中の矢印は PCR に用いたプライマーの設計場所を示す。

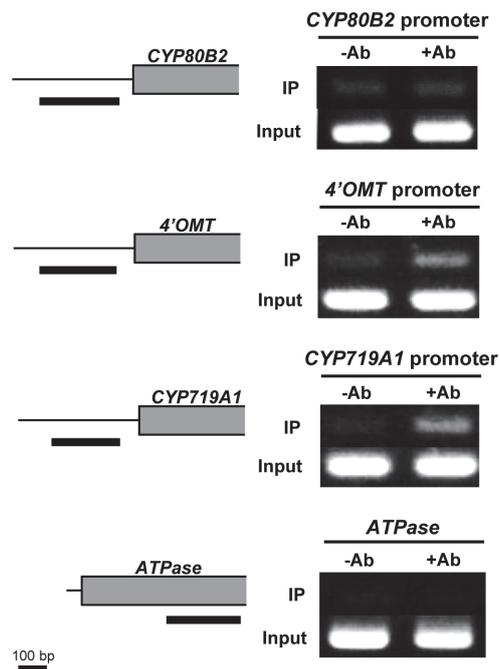


Fig. 1-9 CjbHLH1 抗体を用いたクロマチン免疫沈降

左が各遺伝子とそのプロモーター領域の模式図。黒線はプライマーの増幅領域を示す。右はクロマチン免疫沈降前 (Input) と後 (IP) の DNA をテンプレートに用いて行った PCR の結果を示す。-Ab では CjbHLH1 抗体を添加せずに、+Ab では CjbHLH1 抗体を添加してクロマチン免疫沈降を行った。

CjbHLH1 遺伝子の MeJA 応答性

MeJA は植物の防御応答に関わる植物ホルモンであり、アルカロイドの生産を誘導することが知られている。実際、オウレンの培養細胞に MeJA を処理することで、ベルベリン等のアルカロイドの蓄積量や生合成酵素遺伝子の発現量が上昇することが、先行研究において確認されている（池澤信博博士未発表データ）。そこで、*CjbHLH1* 遺伝子の MeJA に対する応答性を、ベルベリン低生産性の培養細胞 CjY 株を用いて解析した（Fig. 1-10）。その結果、*CjbHLH1* の発現量は MeJA 処理後 1 時間で顕著に増加し、その後コントロールに比べて高い状態を維持したまま徐々に低下し、MeJA 処理後 24 時間ではコントロールと同程度にまで減少していた。一方、ベルベリン生合成酵素遺伝子 *SMT* や *4'OMT* も発現上昇の程度に差はあったものの、MeJA 処理により一過的に発現量が上昇していた。したがって、*CjbHLH1* は生合成酵素遺伝子と同様に MeJA に対して応答性を示すことが明らかとなった。

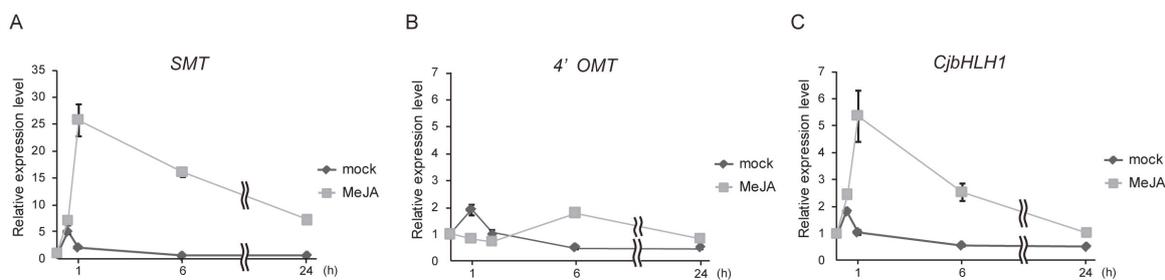


Fig. 1-10 *CjbHLH1* 遺伝子の MeJA 応答性の解析

MeJA 処理 0, 0.5, 1, 6, 24 時間後のオウレン培養細胞 CjY 株における *SMT* (A), *4'OMT* (B), *CjbHLH1* (C) 遺伝子の発現量を realtime-PCR により解析した。*CjActin* 遺伝子の発現量を内部標準として補正を行い、0 時間の値を 1 として値を算出した (n=3, \pm SD)。

アルカロイド生合成系の制御に関わる bHLH 型転写因子の構造比較

本研究の遂行中に、ニチニチソウの MIA 生合成系の発現制御に関わる bHLH 型転写因子、CrMYC2 や、タバコ (*Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana*) のニコチン生合成系の発現制御に関わる bHLH 型転写因子、NtMYC2a/b や NbbHLH1/2 が発見され、いずれもシロイヌナズナの AtMYC2 と相同性が高いことが報告された (Todd et al., 2010; Zhang et al., 2011; Shoji and Hashimoto, 2011; Zhang et al., 2012)。

MYC2 はジャスモン酸 (JA) シグナル伝達系において、早期に応答するマスター制御因子であり、その反応制御機構は詳細に解析されている。JA 非存在下では、リプレッサーである Jasmonate ZIM domain (JAZ) タンパク質が、novel interactor of JAZ (NINJA) とともに MYC2 と結合し、その活性を阻害している。一方、JA 存在下では、活性型の JA-Ile 縮合体が、Skp/Cullin/F-box (SCF) 型 E3 ユビキチンリガーゼの F-box タンパク質にあたる CORONATINE INSENSITIVE 1 (COI1) に結合し、26S プロテアソーム系を介した JAZ の分解を促進することで、活性阻害を解除された MYC2 による下流の JA 応答性遺伝子の発現上昇が引き起こされる (De Geyter et al., 2012)。さらに、ニコチンや MIA 生合成系の場合、MYC2 が直接生合成酵素遺伝子の発現を促進するか、あるいは AP2/ERF 型転写因子 (ORCA3 や NtERF189) を介して間接的に生合成酵素遺伝子の発現を促進することが明らかとなっている。

これらの MYC2 ホモログと CjbHLH1 との間の相違点を調べるために、構造比較を行った (Fig. 1-11)。AtMYC2 およびそのホモログには、C 末端側の bHLH ドメイン以外に、N 末端側に JAZ との相互作用ドメイン (JID; JAZ interaction domain) と転写活性化ドメイン (AD; Activation domain) が見られ、これらは高度に保存されている (Fernández-Calvo et al., 2011)。一方、CjbHLH1 とそのホモログの場合、N 末端側に bHLH ドメインが見られるだけで、JID などは見られないことから、JAZ と相互作用せず JA シグナル伝達系で機能している可能性が考えられた。また、CjbHLH1 ホモログはその構造の違いから MYC2 ホモログではないことは明らかであった。

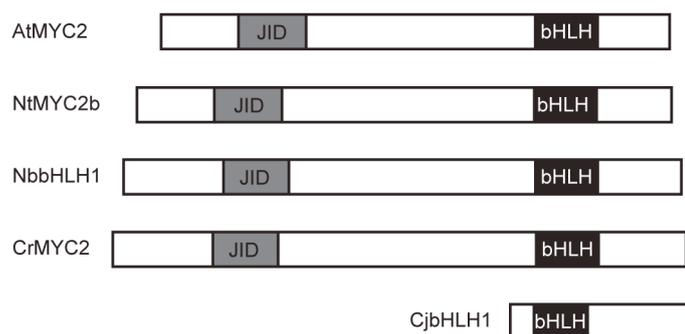


Fig. 1-11 各 bHLH 型転写因子のドメイン構成図

AtMYC2 とそのホモログ、および CjbHLH1 のドメイン構成図を模式的に示す。灰色、黒のボックスはそれぞれ JID, bHLH ドメインを示す。

薬用植物における *CjbHLH1* および *MYC2* ホモログの分布

近年の次世代シーケンサーの発展に伴い、多くの植物種のゲノムデータおよびトランスクリプトームデータの整備が盛んに進められており、有用二次代謝産物を産生する薬用植物についても、68 種類の植物のトランスクリプトームデータが現在 Web 上に公開されている (www.phytometasyn.ca/)。 *CjbHLH1* ホモログと *MYC2* ホモログがどういった植物種に存在するかを調べるために、これら 68 種の薬用植物における *CjbHLH1* ホモログおよび *MYC2* ホモログの分布を tBLASTn 検索 (e-value threshold: $1e-18$)により解析した (Table 1-3)。その結果、 *CjbHLH1* ホモログは 23 の植物種に、 *MYC2* ホモログは 61 の植物種に存在が確認された。特に、 *CjbHLH1* ホモログの存在が認められた 23 種類のうち 21 種については過去の知見から IQA 産生植物種であることが判明した。また、ベルベリン生合成酵素についても同様の解析を行った結果、IQA 生合成系に特徴的な *O*-メチルトランスフェラーゼであると考えられる *6OMT* や *4'OMT*、あるいは CYP719 ファミリーの 1 つである *CYP719A1* と *CjbHLH1* ホモログの分布が完全に一致、あるいは酷似していたことから、これらの生合成酵素と同様に *CjbHLH1* も IQA 産生植物種に非常に特徴的であることが示唆された。なお、 *CjbHLH1* とは異なり、ベルベリン生合成系に関わらない *CjbHLH2* のホモログは 57 種の植物種にその存在が認められた。

Table 1-3 68種の薬用植物における *CjbHLH1* ホモログ、*MYC2* ホモログの分布

	6OMT	4'OMT	CYP719A1	<i>CjbHLH1</i>	<i>CjbHLH2</i>	<i>MYC2</i>
<i>Abies balsamea</i>					●	
<i>Acacia victoriae</i>						
<i>Amsonia hubrichtii</i>						●
<i>Argemone mexicana</i>	●	●	●	●	●	●
<i>Arnica chamissonis</i>					●	●
<i>Arnica montana</i>					●	●
<i>Artemisia absinthium</i>					●	●
<i>Artemisia chamaemelifolia</i>					●	●
<i>Artemisia maritima</i>					●	●
<i>Berberis thunbergii</i>	●	●	●	●	●	●
<i>Cannabis sativa</i>					●	●
<i>Catharanthus longifolius</i>					●	●
<i>Catharanthus ovalis</i>					●	●
<i>Catharanthus roseus</i>					●	●
<i>Cedrela sinensis</i>						●
<i>Centella asiatica</i>					●	●
<i>Chelidonium majus</i>	●	●	●	●	●	●
<i>Chrysanthemum coronarium</i>					●	●
<i>Cinchona ledgeriana</i>					●	●
<i>Cissampelos mucronata</i>	●	●	●	●	●	●
<i>Citrus paradisi</i>					●	●
<i>Cocculus trilobus</i>	●	●	●	●	●	●
<i>Coleus forskohlii</i>					●	●
<i>Corydalis cheilanthisifolia</i>	●	●	●	●	●	●
<i>Dianthus superbus</i>						●
<i>Diospyros kaki</i>					●	●
<i>Eschscholzia californica</i>	●	●	●	●	●	●
<i>Euphorbia peplus</i>					●	●
<i>Glaucium flavum</i>	●	●	●	●	●	●
<i>Grindelia integrifolia</i>						●
<i>Helichrysum petiolare</i>					●	●
<i>Humulus lupulus</i>					●	●
<i>Hydrangea macrophylla</i>					●	●
<i>Hydrastis canadensis</i>	●	●	●	●	●	●
<i>Hypericum perforatum</i>					●	●
<i>Isodon rubescens</i>					●	●
<i>Jeffersonia diphylla</i>	●	●	●	●	●	●
<i>Lactuca sativa</i>					●	●
<i>Ligularia fischeri</i>					●	●
<i>Lippia dulcis</i>						●
<i>Lonicera japonica</i>					●	●
<i>Mahonia aquifolium</i>	●	●	●	●	●	●
<i>Marrubium vulgare</i>					●	●
<i>Matricaria recutita</i>					●	●
<i>Menispermum canadense</i>	●	●	●	●	●	●
<i>Nandina domestica</i>	●	●	●	●	●	●
<i>Nigella sativa</i>	●	●	●	●	●	●
<i>Papaver bracteatum</i>	●	●	●	●	●	●
<i>Petasites hybridus</i>					●	●
<i>Piper methysticum</i>	●	●	●	●	●	●
<i>Platanus occidentalis</i>	●	●		●	●	●
<i>Primula obconica</i>			●			
<i>Pseudolarix amabilis</i>			●		●	
<i>Rauwolfia serpentine</i>					●	●
<i>Rosmarinus officinalis</i>					●	●
<i>Sanguinaria canadensis</i>	●	●	●	●	●	●
<i>Saponaria vaccaria</i>			●			
<i>Silena vulgaris</i>						●
<i>Stylophorum diphyllum</i>	●	●	●	●	●	●
<i>Tabernaemontana elegans</i>						●
<i>Thalictrum flavum</i>	●	●	●	●	●	●
<i>Tinospora cordifolia</i>	●	●		●	●	●
<i>Tripterygium wilfordii</i>					●	●
<i>Valeriana officinalis</i>					●	●
<i>Vancouveria hexandra</i>	●	●		●	●	●
<i>Vinca minor</i>			●		●	●
<i>Xanthium strumarium</i>						●
<i>Xanthorhiza simplicissima</i>	●	●	●	●	●	●

●はホモログが存在することを示す。また、過去の知見等から IQA 産生植物種であると判明した植物を灰色で示している。

[考察]

bHLH 型転写因子は真核生物に普遍的に見られる転写因子ファミリーである。動物では、環境シグナルを検知して細胞周期や概日リズムの制御等に関わることが知られている一方、植物ではより広範囲な生理的応答や成長過程、すなわち光シグナル、ストレス応答、果実の形成、根の生長制御の他、アントシアニン生合成等の制御にも関わる (Stevens et al., 2008; Carretero-Paulet et al., 2010)。CjbHLH1 が既知の bHLH 型転写因子の中でもどういった機能を持つ bHLH と相同性が高いのかを調べるために、BLAST 検索を行ったところ、シロイヌナズナやイネに相同性の高い遺伝子は見られなかった。アミノ酸レベルで最も相同性が高かったシロイヌナズナの bHLH は AtRGE1 であり、胚乳の形成を遅延させる働きを持つことが報告されている (Kondou et al., 2008)。一方、イネの場合、OsHLH146 が最も相同性が高かったものの、その機能は未だ不明である。いずれも二次代謝生合成系との関わりは不明だが、アミノ酸レベルでの相同性は 20%程度と低く、CjbHLH1 と相同性の高いホモログがシロイヌナズナやイネには存在しないと考えられた。一方、検索対象を EST にまで広げた場合、興味深いことに、*CjbHLH1* と非常に相同性の高い遺伝子が、IQA 産生植物であるオダマキ、ユリノキ、ウマノスズクサといった植物の EST にのみ認められた。また、種々の bHLH 型転写因子の bHLH ドメインを基に作成した分子系統樹において、CjbHLH1 およびそのホモログは、シロイヌナズナやその他の植物において二次代謝生合成系の制御に関わる bHLH と異なるクレードに属していた。以上の結果から、CjbHLH1 が IQA 生合成系に特徴的な bHLH 型転写因子である可能性が示唆された。

先行研究における最大の疑問は、*CjbHLH1* の一過的発現抑制と一過的過剰発現がともにベルベリン生合成酵素遺伝子群の顕著な発現低下を引き起こすことであった。プロトプラスト化の影響を考慮し、*CjbHLH1* 一過的過剰発現の効果を過剰発現ベクター導入後 6, 24, 72 時間の 3 点で経時的に調べた結果、6 時間において生合成酵素遺伝子群の発現量の上昇傾向が認められた。また、一過的ルシフェラーゼレポーターアッセイにより CjbHLH1 が *4'OMT* や *CYP719A1* の転写活性化能を持つことも認められ、CjbHLH1 がベルベリン生合成系の転写活性化因子として機能していると結論づけた。一方で、過剰発現ベクター導入後 24 時間では生合成酵素遺伝子群の

発現量にコントロールとの明確な差は見られず、72 時間では逆に生合成酵素遺伝子群の発現量がコントロールよりも低下していた。一方、一過的ルシフェラーゼレポーターアッセイの場合、24 時間でも LUC の活性上昇は認められた (Fig. 1-6)。この違いは、一過的ルシフェラーゼレポーターアッセイでは、CjbHLH1 の足場となり得るプロモーター領域を含むコンストラクトが大量に存在することに起因すると考えられた。すなわち、*CjbHLH1* の一過的過剰発現の場合、仮に CjbHLH1 が何らかの修飾あるいは相互作用因子の作用により活性化されるとした時、過剰発現により大量に存在する不活性型の (過剰な)CjbHLH1 が活性型の CjbHLH1 の機能を拮抗的に阻害してしまったために、内在生合成酵素遺伝子の発現上昇が抑えられたが、一過的ルシフェラーゼレポーターアッセイの場合、活性型の CjbHLH1 が結合する足場となるプロモーターが大量に存在するため、LUC の高い活性が維持されたのではないかと推察される (Fig. 1-12)。今後、CjbHLH1 の修飾状態の解析や相互作用因子等の探索を行い、CjbHLH1 自身の制御に関する知見を深め、この仮説の当否を精査していく必要があると考えられる。なお、156-S 株における生合成酵素遺伝子の発現量がもともと高いために、*CjbHLH1* 一過的過剰発現の影響が小さい可能性も考えられたが、生合成酵素遺伝子や *CjbHLH1* の発現量が 156-S 株に比べて低い CjY 株のプロトプラストに *CjbHLH1* を一過的に過剰発現させた場合も、生合成酵素遺伝子の発現に及ぼす影響が極めて小さかったことから、やはり、CjbHLH1 自身の発現と活性を適切にコントロールしながら、ベルベリン生合成系全体の流れを調節するような機構が存在するのではないかと推察される。また、プロトプラスト化による生合成系への影響を排除するために、安定形質転換体の作出および解析が有効な解決手段の 1 つであると考えられるが、オウレンでは形質転換効率の低さや生育の遅さといった欠点があり、オウレン以外の植物種を用いた解析が必要である。

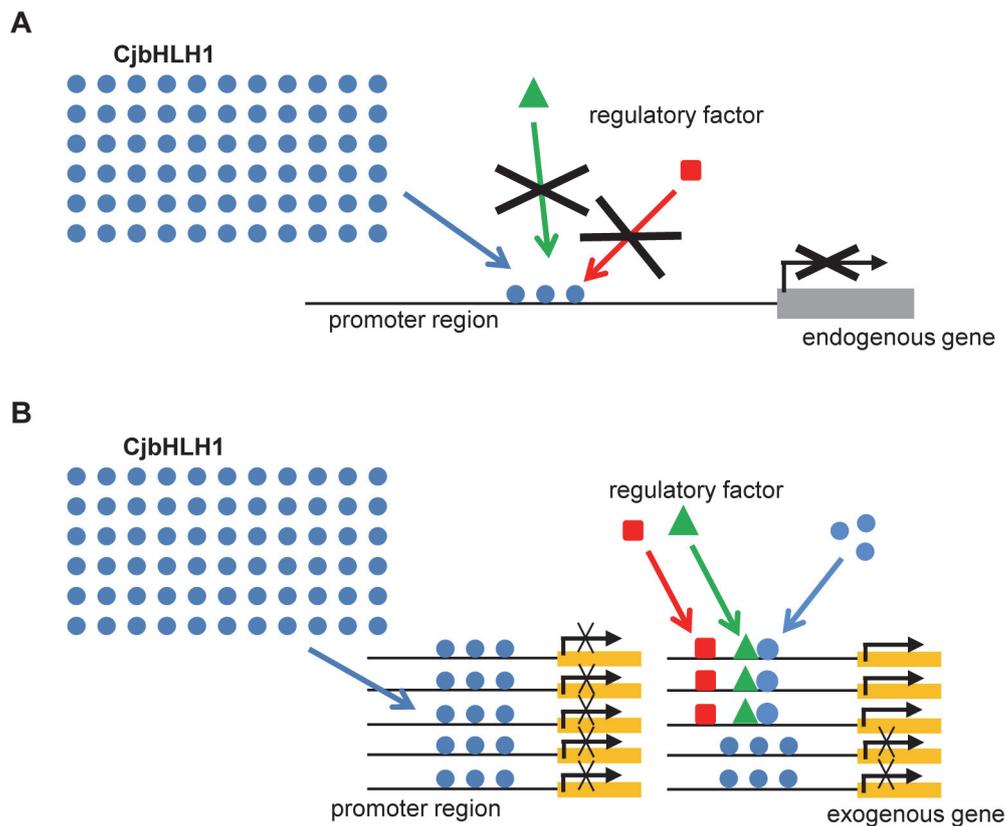


Fig. 1-12 *CjbHLH1* の過剰発現が生合成酵素遺伝子の発現に及ぼす影響に関する考察

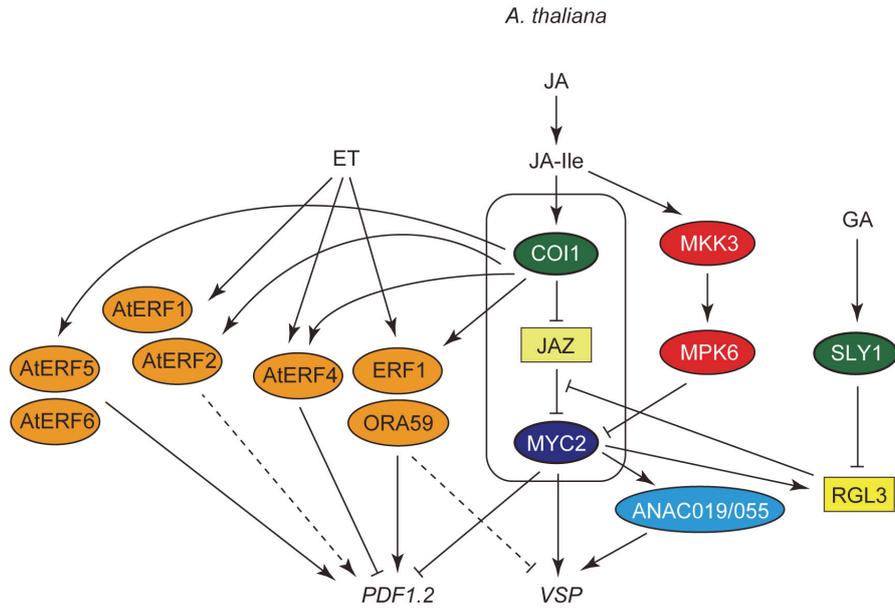
A, 内生生合成酵素遺伝子の場合、過剰に存在する *CjbHLH1* (●)が協調して機能する別の制御因子 (■や▲)の機能を結果的に阻害してしまったために、遺伝子の転写が正常に行われなくなると考えられる。B, 外来遺伝子の場合、足場となるプロモーター領域が増えるので、その一部に *CjbHLH1* と他の制御因子が協調的に働き、遺伝子の転写が正常に行われたと推察される。

一過的ルシフェラーゼレポーターアッセイ、およびクロマチン免疫沈降の結果から、CjbHLH1が少なくとも *4'OMT* や *CYP719A1* のプロモーター領域に結合し、転写を促進している可能性が示唆された。これらのプロモーター領域には、bHLH 型転写因子の標的配列である G-box (CACGTG)/E-box (CANNTG)が多数存在し、実際、LUC の活性が見られた *4'OMT*, *CYP719A1* プロモーター各々の 1st ATG から -164 bp, -254 bp の領域にも 1 つ以上の G-box/E-box が存在していた (Fig. 1-8)。しかし、具体的に CjbHLH1 がどのシス因子相同配列に結合しているかについては、E-box に変異を導入した上で一過的ルシフェラーゼレポーターアッセイを行うか、ゲルシフトアッセイ等の実験を行い確認する必要がある。また、今回 *CYP80B2* プロモーターへの CjbHLH1 の結合性を見出すことはできなかったが、単離されている *CYP80B2* プロモーターの配列が *4'OMT* や *CYP719A1* と比べて短いため、さらに上流の配列を単離した上で結合性の有無を確認する必要がある。

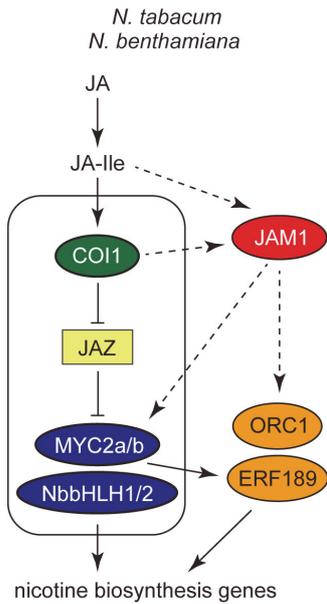
植物に MeJA を処理すると二次代謝産物の生産量が上昇することは古くから知られており、アルカロイドも例外ではない。実際、アルカロイド生合成関連遺伝子の単離に MeJA が用いられるケースが非常に多い。近年、アルカロイド生合成系の発現制御因子としてニチニチソウやタバコから単離された bHLH も全て MeJA 応答性を示すと同時に、シロイヌナズナの AtMYC2 と高い相同性を示した。MYC2 は COI1 や JAZ と複合体を形成し、JA シグナル伝達経路の中核を担う転写因子である。ニチニチソウでは実験的に調べられていないが、タバコの MYC2 は JAZ と結合することなどが報告されている (Shoji and Hashimoto, 2011; Zhang et al., 2012)。また、これらの MYC2 ホモログが AtMYC2 と同様に JID を有していることから、COI1, JAZ と複合体を形成して機能していると考えられる。MYC2 は非常に広範囲の遺伝子を制御するマスター転写因子であり (Kazan and Manners, 2013)、タバコやニチニチソウにおいても、アルカロイド生合成以外の遺伝子制御に関わる事が十分予想される。一方、CjbHLH1 はその構造の違いから明らかに MYC2 ホモログではなく、JID を持たないことから JAZ や COI1 と相互作用しない可能性が高い。しかし、*CjbHLH1* 遺伝子は MeJA に対する応答性を示すことから、MYC2 とは異なる機構で JA シグナル伝達経路に寄与している可能性が考えられた (Fig. 1-13)。

さらに、EST のみのデータベースではあるが、*CjbHLLH1* のホモログと考えられる bHLH が IQA 産生植物種に広く存在しており、IQA に特徴的だと言われている *6OMT* や *4'OMT*, *CYP719A1* の分布とほぼ重なっている点も興味深い。過去の知見から IQA を産生しているかどうか判断できなかった *Platanus occidentalis* や *Piper methysticum* にも、*CjbHLLH1* だけでなく *6OMT* や *4'OMT* と相同性の高い遺伝子が存在しており、逆にこれらの植物が IQA を産生している可能性もある。一方、*MYC2* ホモログはアルカロイドの産生・非産生に関係なく幅広い植物種に存在しており、*MYC2*-*COI1*-*JAZ* 複合体による JA シグナル伝達系の制御メカニズムが高度に保存されていることがうかがえる。IQA 産生植物種にも *MYC2* ホモログが存在するが、IQA 生合成系の制御に関わるかどうかは今後解析を行い検証する必要がある。なお、オウレン EST 中に *MYC2* ホモログの配列は確認できなかったが、縮重プライマーを用いた PCR によりオウレンの *MYC2* ホモログ (*CjMYC2*) の存在は確認済みである。しかし、156-S 株プロトプラストにおける *CjMYC2* の一過的発現抑制が、ベルベリン生合成酵素遺伝子群の発現量に大きな変化を及ぼさなかったことから、少なくともオウレン培養細胞において *CjbHLLH1* がベルベリン生合成系の制御の中心的存在である可能性は高い (山田未発表データ)。*CjbHLLH1* と *CjMYC2* の関係性については今後さらなる解析を行う必要がある。

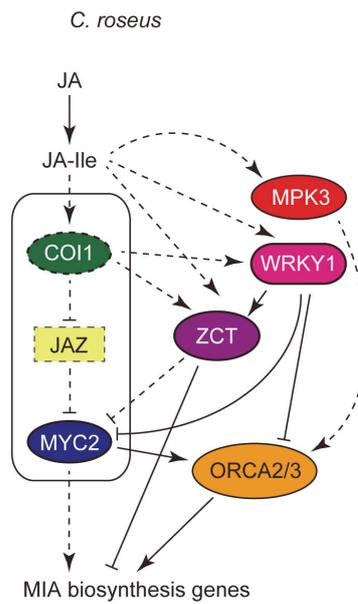
A



B



C



D

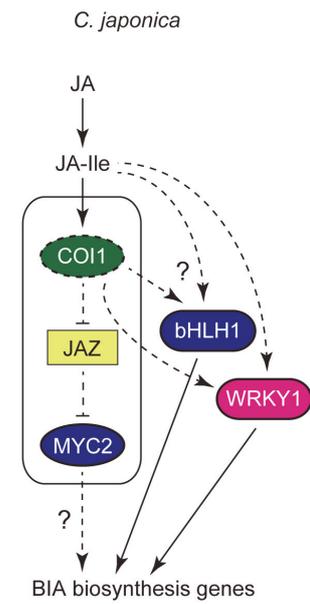


Fig. 1-13 JA シグナル伝達系における転写因子ネットワークの模式図

シロイヌナズナ (A)、タバコ (B)、ニチニチソウ (C)、オウレン (D)、における JA シグナル伝達系関連因子のネットワーク図を模式的に示す。タバコでは、MYC2 が直接あるいは間接的にニコチン合成酵素遺伝子を制御するが、ニチニチソウでは ORCA を介しての MIA 合成酵素遺伝子の制御のみ報告がある。オウレンでは MYC2 によるベンジルイソキノリンアルカロイド (BIA) 合成系の制御に関する知見は不十分である他、ERF に相当する転写因子も見つかっていない (Yamada and Sato, 2013 より引用)。

第2章 ハナビシソウ CjbHLH1 ホモログの機能解析

第1章において、オウレンから単離された bHLH 型転写因子である CjbHLH1 がベルベリン生合成系の転写活性化因子として機能していることを明らかにした。特に、CjbHLH1 のホモログが IQA 産生植物種の EST 中にのみ特徴的に見られるといった事実から、CjbHLH1 およびそのホモログが、IQA 生合成系の発現制御において重要な役割を担う可能性が示唆された。しかし、実際にこれらの IQA 産生植物種に存在する CjbHLH1 ホモログがオウレンの CjbHLH1 と同様に IQA 生合成系（オウレンの場合はベルベリン生合成系）の転写因子として機能しているかどうかは定かではない。

当研究室では、オウレンの培養細胞を用いたベルベリン生合成系の解析の他に、ケシ科のハナビシソウを用いたサンギナリン生合成系の解析も精力的に行われてきた。ハナビシソウは園芸植物であるため比較的容易に入手、栽培が可能である他、L-チロシンから重要中間体であるレチクリンまで共通の生合成経路をもっている、オウレンに比べて形質転換効率が良い、といった点から代謝工学を行うための適切な材料として利用されてきた (Sato et al., 2001)。実際、当研究室の乾貴幸博士らは、オウレンの *6OMT* 遺伝子をハナビシソウに導入することで、ベンゾフェナンスリジナルカロイド生合成系の律速段階を打破し、最終産物の産生量を増加させることに成功している (Inui et al., 2007)。また、同じく当研究室の竹村知也博士らは、ハナビシソウでの存在が確認されていないオウレンの *SMT* 遺伝子をハナビシソウに導入することで、既存の代謝経路を改変させることにも成功している (Takemura et al., 2010)。他にも、RNAi を用いた生合成酵素遺伝子の発現抑制による代謝経路の遮断と代謝中間物蓄積量の増加にも成功している (Fujii et al., 2007)。これらの実験は全てハナビシソウの形質転換培養細胞を用いて行われており、オウレンのプロトプラストを用いた一過的発現系では解析が難しいアルカロイドプロファイルや植物体における遺伝子の機能解析を可能としていた。

以上の点をふまえ、本章では、ハナビシソウの CjbHLH1 ホモログがオウレンと同様に IQA 生合成系の転写因子として機能しているかどうかを確認した。まず、ハナビシソウから 2 種類の

CjbHLH1 ホモログを単離するとともに、その発現抑制株を作出した。次いで、*CjbHLH1* ホモログの発現抑制株におけるサンギナリン生合成酵素遺伝子の発現量、ならびにサンギナリンの蓄積量を解析し、ハナビシソウにおいても *CjbHLH1* ホモログが IQA 生合成系を制御していることを明らかとした。

[材料と方法]

ハナビシソウ *CjbHLH1* ホモログの単離

CjbHLH1 とそのホモログに共通するアミノ酸配列をもとに作成した縮重プライマーを用いて PCR を行い、2 種類の *CjbHLH1* ホモログと思われる配列を得た。テンプレートには、MeJA 処理したハナビシソウ培養細胞由来の cDNA を用いた。さらに、得られた 2 種類の配列をそれぞれ特異的に増幅するようなプライマーを新たに作成し、Gene Racer™ Kit (Invitrogen) を用いて 3'RACE, 5'RACE を行い、2 種類の *CjbHLH1* ホモログ (*EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2*) の全長配列を取得した。単離に用いたプライマーの配列は Table 2-1 に示す。

RNAi ベクターの作成

EcbHLH1-1 のみ、*EcbHLH1-2* のみ、あるいは両遺伝子を標的とする 37 bp の塩基配列に 20 bp の *GUS* 遺伝子由来のスペーサー配列と *Bam*HI, *Sac*I サイトを付加したプライマーを用いて PCR を行い、得られた PCR 断片を pT7blue T vector (Novagen) へサブクローニングした。得られたプラスミドは配列確認後、*Bam*HI, *Sac*I 処理により RNAi 標的配列とスペーサー配列を含む DNA 断片のみを切り出し、同じく *Bam*HI, *Sac*I 処理した pBIE ベクター (35S プロモーターにエンハンサー配列を付加した E12 プロモーターを *GUS* 遺伝子上流に持つバイナリーベクター) に導入することで、各 37 bp RNAi ベクターを作成した。RNAi ベクターの作成に用いたプライマーの配列は Table 2-2 に示す。

Table 2-1 *EcbHLH1* 単離に用いたプライマーの配列

Primer name		Oligonucleotide sequences (5' to 3')
EcbHLH degenerate primer	Forward	GAYGARATHATHAARTAYATHCC
	Reverse	CCRTCNCCKRCARTGNGTNSWNCK
EcbHLH1-1 3'RACE primer		GCTGCTGCTAGACTTAGATCATTAC
EcbHLH1-2 3'RACE primer		CATCGTCTTCACCCAATTGGAATC
EcbHLH1-1 5'RACE first primer		CAACAAAACAGGCGATCTGTCTAG
EcbHLH1-1 5'RACE nest primer		CTCTAACTCGAATCGCCACTGA
EcbHLH1-2 5'RACE first primer		CTGGTGATTTGTCCAACCCATCA
EcbHLH1-2 5'RACE nest primer		ACCTCTAACTCGAATAGCAACCG

Table 2-2 RNAi ベクターの作成に用いたプライマーの配列

Primer name		Oligonucleotide sequences (5' to 3')
EcbHLH1-1 37 bp RNAi primer	Forward	CGGGATCCATCATCACCATTAATGAATTTGAATAGGTCAAAATCACGTGGTGATGTGGAGTATTC
EcbHLH1-1 37 bp RNAi primer	Reverse	GCGAGCTCATCATCACCATTAATGAATTTGAATAGGTCAAAATCAGAATACTCCACATCACCACG
EcbHLH1-2 37 bp RNAi primer	Forward	CGGGATCCAATGTGATAAGTAATTCAGCTACTAGTTCCTTTGACGTGGTGATGTGGAGTATTC
EcbHLH1-2 37 bp RNAi primer	Reverse	GCGAGCTCAATGTGATAAGTAATTCAGCTACTAGTTCCTTTGAGAATACTCCACATCACCACG
EcbHLH1-1/1-2 37 bp RNAi primer	Forward	CGGGATCCAGCAATTCCTTGATGAAATTATTAATATATACCATCGTGGTGATGTGGAGTATTC
EcbHLH1-1/1-2 37 bp RNAi primer	Reverse	GCGAGCTCCAGCAATTCCTTGATGAAATTATTAATATATACCATGAAATACTCCACATCACCACG

細胞内局在解析

EcbHLH1-1, *EcbHLH1-2*の全長を増幅するようなプライマー (Fw 側に *SaI* サイト, Rv 側に *NcoI* サイトをそれぞれ付加)を用いた PCR および pGEM-T Easy vector (Promega)へのサブクローニングを行い、得られたプラスミドの配列確認を行った後に、*SaI*, *NcoI* 処理により切り出した *EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2*の断片をそれぞれ、同じく *SaI*, *NcoI* 処理した 35S::*sGFP*ベクターにライゲーションすることで、35S::*EcbHLH1-1-sGFP*, 35S::*EcbHLH1-2-sGFP* ベクターを作成した。得られたプラスミドは第 1 章に記述した方法に従ってオウレン 156-S 株プロトプラストに一過的に導入し、24 時間後に蛍光顕微鏡 BZ9000 (KEYENCE)により観察した。

MeJA 処理

滅菌処理したハナビシソウ種子（タキイ種苗、大輪一重咲き）を 1% agar を含む 1/2 LS 培地上に播種し、23°C、連続光（50 ~ 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{photons}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ ）下で 1 週間ほど発芽、生育させた。得られた複数のハナビシソウ芽生えを 1% agar, 100 μM MeJA を含む LS 培地に移植し、0, 0.5, 1, 6, 24 時間後に回収し、RNA 抽出に用いた。コントロールには同量のエタノール [0.065%(v/v)] を含む LS 培地に移植した芽生えを用いた。

組織別遺伝子発現解析

ハナビシソウ種子（タキイ種苗、大輪一重咲き）を土壌に播種し、20°C、白色蛍光灯（100 ~ 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{photons}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ ）下で、16 時間明、8 時間暗のサイクルで 4 ヶ月間生育させた植物体から、葉身、葉柄、根をそれぞれ採取し、RNA 抽出に用いた。ハナビシソウ培養細胞野生株については、当研究室で継代維持された WT-6 株より RNA 抽出した。

ハナビシソウ形質転換細胞の作成

滅菌処理したハナビシソウ種子（タキイ種苗、大輪一重咲き）を 1% agar を含む 1/2 LS 培地上に播種し、23°C、連続光（50 ~ 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{photons}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ ）下で 1 週間ほど発芽、生育させた。得られた芽生えは、同じ組成の LS 培地を加えたアグリポットでさらに 2 ヶ月間生育させ、形質転換の材料とした。各 RNAi ベクターおよびコントロール用の pBIE ベクターをエレクトロポレーション法により導入したアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*)LBA4404 株を 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の kanamycin を含む LB 培地で 28 °C、2 日間暗所で前培養した後、3% sucrose, 10 μM NAA, 1 μM BA, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の acetosyringone を含む LS 培地 (pH5.2) に懸濁し、形質転換に用いた。アグロバクテリウム懸濁液に、5-10 mm の長さに切断したハナビシソウ植物体切片を 10 分程度浸潤させ、キムタオルで水分を除いた後、3% sucrose, 1% agar, 10 μM NAA, 1 μM BA を含む LS 培地 (pH5.2) に置床し 23 °C、2 日間、暗所で共存培養した。その後、切片を 3% sucrose, 1% agar, 10 μM NAA, 1 μM BA, 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamycin, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cefotaxime を含む LS 選抜

培地 (pH5.7)に移植することを約 3 週間毎に行い、形質転換細胞の選抜を行った。得られた培養細胞はさらに約 9 ヶ月の選抜後、LS 液体培地に移植し、約 3 週間毎に継代培養した。LS 液体培地の抗生物質の濃度は徐々に減らし、最終的に抗生物質を含まない状態で生育させた後、解析を行った。解析に使用する細胞は全て、植え継ぎ後 7 日目のものを用いた。

定量的 RT-PCR

ハナビソウ培養細胞、植物体、および芽生えからの RNA 抽出には、RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)を使用し、操作は付属のマニュアルに従って行った。得られた total RNA は、DNase I (Invitrogen)処理により残存する DNA を除去した後、Oligo dT primer および Super Script III reverse transcriptase (Invitrogen)を用いた逆転写反応による cDNA 合成に用いた。得られた cDNA は RNase H (Invitrogen)処理により残存する RNA を除去した後、realtime-PCR 解析に用いた。Realtime-PCR には特異的 primer pair、および iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) を使用し、解析には CFX96 Real-time PCR Detection System (Bio-Rad)を用いた。PCR 反応条件は、95 °C 3 min 1 サイクル、続いて 95 °C 10 sec, 60 °C 20 sec, 72 °C 20 sec を 40 サイクルで行った。測定した遺伝子の相対発現量は、*β-actin* 遺伝子を内部標準とし、検量線法により値を算出した。解析に用いたプライマーの配列は Table 2-3 に示す。

Table 2-3 定量的 RT-PCR に用いたプライマーの配列

Gene		Oligonucleotide sequences (5' to 3')
<i>EcbHLH1-1</i>	Forward	CTAGACAGATCGCCTGTTTTGTTG
	Reverse	GAGATAGATGACCCTTTAGATAATGAGATCC
<i>EcbHLH1-2</i>	Forward	GGTTGGACAAATCACCAGCTTTAC
	Reverse	AAGATAGAGGGGTTCCATAATGATAGCAAG
<i>EcNCS</i>	Forward	CTATCACGGAGAGCAACACTTG
	Reverse	TCCCAAGCACATATAACTTCA
<i>Ec6OMT</i>	Forward	CCTGTTCAACCCGTTGACTTAG
	Reverse	CCC AACCTTAATCAGAAATTTG
<i>EcCNMT</i>	Forward	TGAAGCCAGGCAAAATCTCCT
	Reverse	GGTGGCATTGTTGGATGAAC
<i>EcCYP80B1</i>	Forward	TCAAACAGTGGTAGGCGAGAGA
	Reverse	CAATGGAGTTGGTGGGTGAA
<i>Ec4'OMT</i>	Forward	CCTAGAAGAGGAATCAGAACATCCA
	Reverse	TCACCTTCTCCCTTCCACCA
<i>EcBBE</i>	Forward	GAGATTAGTAGGAGTTGGGGTGAGA
	Reverse	ATTGGAGGGATACTTTGTGGATG
<i>EcCYP719A5</i>	Forward	CCTGATCTTAGTGAGGATCATTGC
	Reverse	ATGCTAGCACTACATGCCATTTAC
<i>EcCYP719A2</i>	Forward	GTCGTAATTAATCACTTAACCGTGCTCG
	Reverse	GAAAGAAACAGAGCAAAATCTTATCCTTTTACC
<i>EcCYP719A3</i>	Forward	CCTCGTAACTAATATACCAGTGGGTG
	Reverse	GACAACCAAGCAAACCTTATTCTTGATC
<i>EcTNMT</i>	Forward	TTCAGTAGAGGCATGGAGGA
	Reverse	TCTTACTTCCAAGGCCAGG
<i>EcMSH</i>	Forward	TTCCATCACTTGGTTGGTTAGA
	Reverse	CCCAACTCTCAACTACTGAATCAA
<i>EcCYP82N2v2</i>	Forward	AACCGTCTTCCACTAAAGC
	Reverse	GGCTCTAACGTCCTTGATGG
<i>EcDBOX</i>	Forward	AACAACAGAGCATTCTCTCTC
	Reverse	AAAGAAGAATTACGTCGATACGG
<i>EcSR</i>	Forward	TGAGGAAGTGAAGAACAAGCA
	Reverse	GAACACACCGAGAAACAAAACA
<i>EcWRKY1</i>	Forward	GCATTTGACCCAAATCTGTTC
	Reverse	ACAACAAGGATGCAATGTGAAG
<i>EcMYC2</i>	Forward	AGCTGCCATTAATCTAGCAGCTG
	Reverse	CTGGGTCAATCTCACAATCTGATC
<i>EcCM</i>	Forward	TGCTAGAAAGGGCTCAGCAT
	Reverse	CCAAAGAACCATGAAAACCA
<i>EcDHQ/SDH</i>	Forward	TGGCATCTTCGGATTTTGT
	Reverse	GTTTTGCCTTACCATTTCG
<i>Ecβ-Actin</i>	Forward	GGTATTGTGCTGGATTCTGGTG
	Reverse	GTAGGATTGCGTGGGGTAGTG

一過的ルシフェラーゼレポーターアッセイ

エフェクターコンストラクトには、*EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* の cDNA 全長をそれぞれ *Bam*HI および *Sac*I サイトを用いて pBI221 ベクターに導入した過剰発現ベクター (35S::*EcbHLH1-1*, 35S::*EcbHLH1-2*)を、レポーターコンストラクトには、約 500 bp の *Ec6OMT*, (*S*)-cheilanthifoline synthase (*EcCYP719A5*), (*S*)-tetrahydroprotoberberine *cis-N-methyltransferase* (*EcTNMT*), *protopine-6-hydroxylase* (*EcCYP82N2v2*)プロモーター、および約 300 bp の *EcBBE* プロモーターをそれぞれハナビシソウゲノム DNA から単離し、*PpLUC* 遺伝子上流に挿入したベクターを解析に用いた。一過的ルシフェラーゼレポーターア

ッセイは、第 1 章に記述した通りに行った。

アルカロイド分析

LS 液体培地での培養を約 1 年続けたハナビシソウ形質転換培養細胞（新鮮重で 0.75 g）を 12.5 ml の LS 液体培地を含む 50 ml 三角フラスコに移植し、7 日間培養した。その後、細胞と培地をそれぞれ回収し、細胞には新鮮重 200 mg あたり 800 μ l の 0.01N HCl 酸性 methanol を加え、室温下で 24 時間アルカロイド抽出を行った。得られた抽出液は遠心により上清のみを回収し、5 倍希釈液 5 μ l を LC-MS 解析に供した。一方、培地中のアルカロイドは遠心により浮遊物を除去した後、3 ml の MilliQ 水で平衡化した SepPak plus C-18 column (Waters) に吸着させ、3 ml の MilliQ 水で洗浄後、3 ml の methanol により溶出した後、その 5 倍希釈液 5 μ l を LC-MS 解析に供した。LC-MS 解析は LC-MS 2020 system (SHIMADZU) を用いて以下の条件で行った。移動相は、アセトニトリル/水に酢酸を終濃度 1% (v/v) になるよう添加し、45 分間でアセトニトリル初期濃度 40% から最終濃度 80% になるようグラジエント分析した。カラムは TSKgel ODS-80Tm (250 mm 長、内径 4.6 mm、TOSOH) を使用した。流速は 0.5 ml/min、カラム内温度は 40 $^{\circ}$ C に設定し、UV 検出は 280 nm、イオン化は electron spray ionization (ESI) 法で行った。解析モードはポジティブイオンの SIM-SCAN とした。Sigma-Aldrich 社から購入した濃度既知のサンギナリンを標品とし、ピーク面積の比較から各サンプルにおけるサンギナリンの濃度を簡易定量した。

[結果]

ハナビシソウからの *CjbHLLH1* ホモログの単離

研究を開始時にはハナビシソウの EST データベースは充実しておらず、*CjbHLLH1* ホモログ遺伝子の存在も確認できなかったことより、縮重プライマーを用いたハナビシソウ *CjbHLLH1* ホモログの単離を試みた。その結果、*CjbHLLH1* ホモログであると考えられるが配列が少し異なる

2種類の DNA 部分配列を取得した。次いで、それぞれを特異的に増幅させるプライマーを用いて、5'および3'RACEを行うことで2種類の *CjbHLH1* ホモログの単離に成功した。2つの遺伝子をそれぞれ *EcbHLH1-1* (GenBank, AB910896), *EcbHLH1-2* (AB910897) と名付け、その後の解析を行った。*EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* はそれぞれ *CjbHLH1* との同一性が 74%, 66%であった。ともに bHLH ドメインと C 末端領域の相同性が高く、*CjbHLH1* のホモログであると考えられた (Fig. 2-1)。なお、現在 Web 上に登録されているハナビシソウのトランスクリプトームデータ (www.phytometasyn.ca/) においても、*EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* の 2 種類の存在を確認できる。

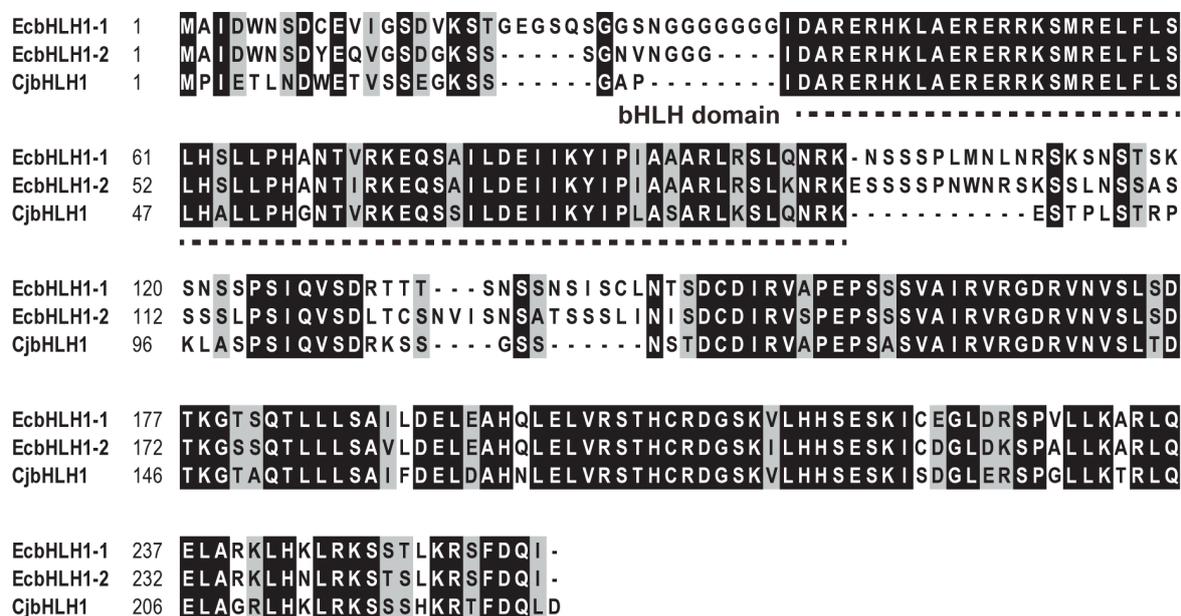


Fig. 2-1 *EcbHLH1* のシーケンスアライメント

EcbHLH1-1, *EcbHLH1-2*, *CjbHLH1* のアミノ酸シーケンスアライメント。黒、グレイのボックスはそれぞれ該当するアミノ酸残基が同一、類似であることを示す。黒点線は bHLH ドメインを示す。

一過的発現系を用いた *EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* の機能解析

EcbHLH1-1, *EcbHLH1-2* が *CjbHLH1* と同様に IQA 生合成系の転写因子として機能しているかどうかを確認するために、オウレン 156-S 株プロトプラストを用いた一過的発現系により、*EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* の細胞内局在性や転写活性化能の解析を行った。*EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* と sGFP との融合タンパク質をそれぞれ 156-S 株プロトプラストにおいて発現させ、その細胞内局在性を解析した結果、*EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* とともに *CjbHLH1* と同様に核に局在していることを確認した (Fig. 2-2A)。また、*EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* 過剰発現ベクターおよび *Ec6OMT*, *EcBBE*, *EcCYP719A5*, *EcTNMT*, *EcCYP82N2v2* プロモーターにそれぞれ *PpLUC* を付加したレポーターベクターを用いた一過的ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った結果、*Ec6OMT*, *EcBBE*, *EcCYP719A5* プロモーターでは *EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* とともに LUC の有意な活性上昇を引き起こすことが確認できた (Fig. 2-2B, C)。一方、*EcTNMT* プロモーターでは *EcbHLH1-1* の導入時のみ LUC の活性が見られ、*EcCYP82N2v2* プロモーターでは両転写因子とともに LUC の有意な活性上昇は認められなかった (Fig. 2-2C)。以上の結果から *EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* とともに転写活性化因子として機能していると考えられたが、全てのサンギナリン生合成酵素遺伝子の発現制御に関わるというわけではない可能性も示唆された。

EcbHLH1-1, *EcbHLH1-2* の MeJA 応答性

CjbHLH1 はベルベリン生合成酵素遺伝子とともに MeJA 応答性を示すが、サンギナリン生合成酵素遺伝子も同様に MeJA 応答性を示す (Ikezawa et al., 2007; Ikezawa et al., 2009)。そこで、*EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* がともに MeJA 応答性を示すかどうかを、ハナビシソウの芽生えを用いて解析した (Fig. 2-3)。その結果、*EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* とともに MeJA 処理後 1 時間で発現量が一過的に上昇し、その後 24 時間までに徐々に減少することが明らかとなり、*EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* とともに MeJA 応答性を示すことが確認できた。

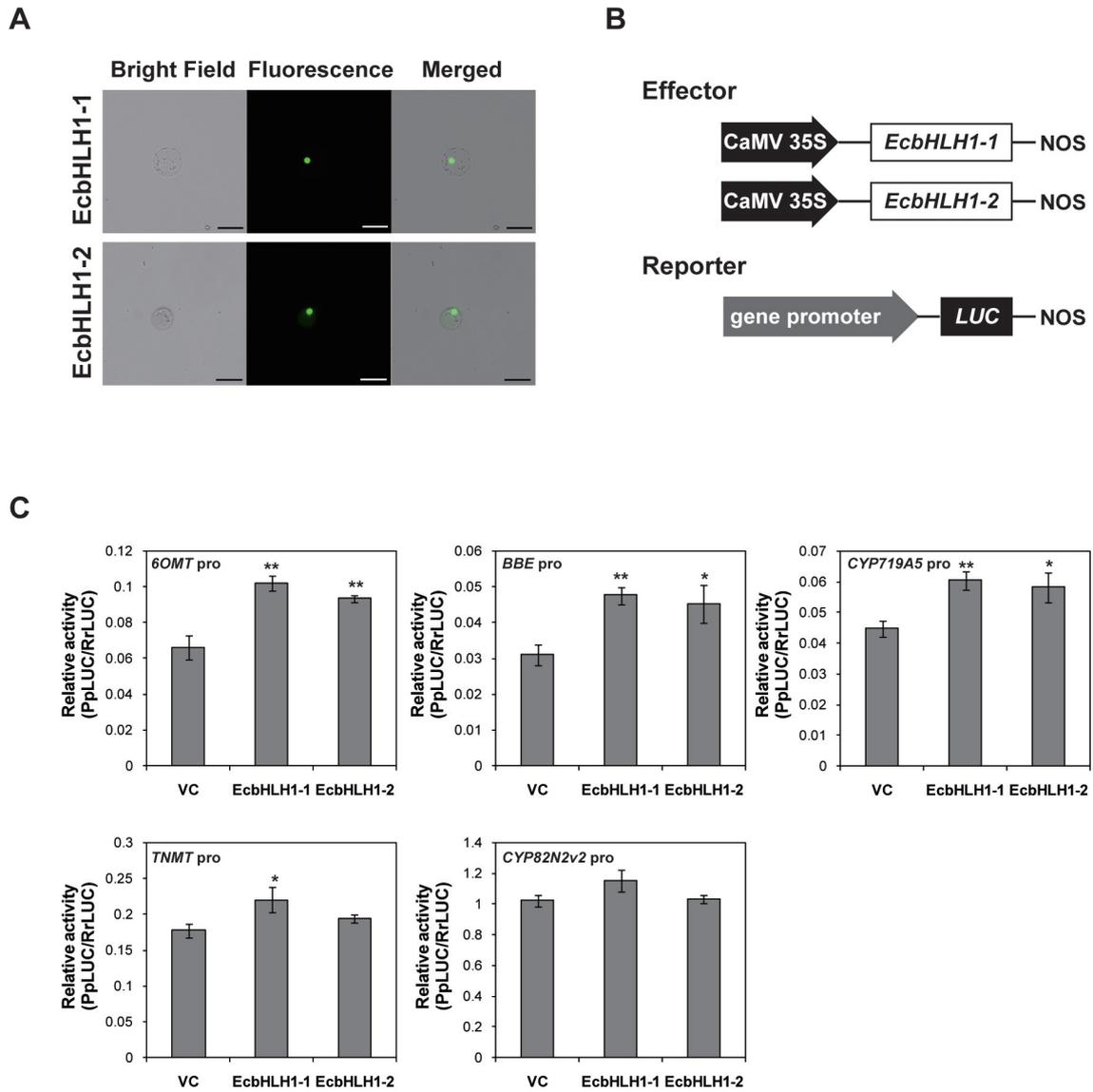


Fig. 2-2 156-S株プロトプラスト一過的発現系を用いた EcbHLH1 の機能解析

A, 156-S株プロトプラストにおける EcbHLH1-1-sGFP, EcbHLH1-2-sGFP の細胞内局在性を示す。B, 一過的リンフェラーゼレポーターアッセイに用いたエフェクター、レポーターコンストラクトの模式図を示す。C, 一過的リンフェラーゼレポーターアッセイにより測定した EcbHLH1-1, EcbHLH1-2 の転写活性を示す。PpLUC, RrLUC の活性はそれぞれ 10 秒間測定し、その相対活性 (PpLUC/RrLUC) を算出した (n=3, ±SD, Student's t test, * p<0.05, ** p<0.01)。

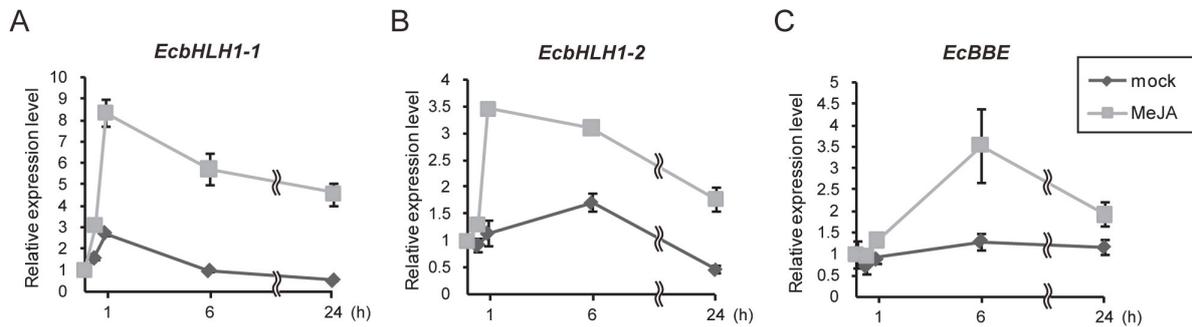


Fig. 2-3 *EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* 遺伝子の MeJA 応答性の解析

MeJA 処理 0, 0.5, 1, 6, 24 時間後のハナビシソウ芽生えにおける *EcbHLH1-1* (A), *EcbHLH1-2* (B), *EcBBE* (C) 遺伝子の発現量を realtime-PCR により解析した。β-Actin 遺伝子の発現量を内部標準として補正を行い、0 時間の値を 1 として値を算出した (n=3, ±SD)。

EcbHLH1-1, *EcbHLH1-2* の組織別発現解析

ハナビシソウでは、組織ごとに蓄積するアルカロイドのタイプが異なり、サンギナリンに代表されるベンゾフェナンスリジンアルカロイドは主に根に蓄積している。また、アルカロイドの蓄積と関連して、サンギナリン生合成酵素遺伝子の発現も根で高いことが確認されている (Ikezawa et al., 2007)。そこで、*EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* の発現量に組織特異性が見られるかどうかを確認した。ハナビシソウ植物体から葉身、葉柄、根を分離し、ハナビシソウ培養細胞とともに、これらの細胞中の *EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* の発現量を解析した (Fig. 2-4)。サンギナリン生合成酵素遺伝子である *EcCYP80B1* や *EcTNMT* の発現量は先行研究で示されていた通り、根で顕著に高い発現量を示した。一方、*EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* の発現プロファイルは組織により異なり、*EcbHLH1-1* は葉身で、*EcbHLH1-2* は根や培養細胞で比較的高い発現量を示し、*EcbHLH1-1* と *EcbHLH1-2* が生理的にやや異なる機能を有する可能性が示唆された。

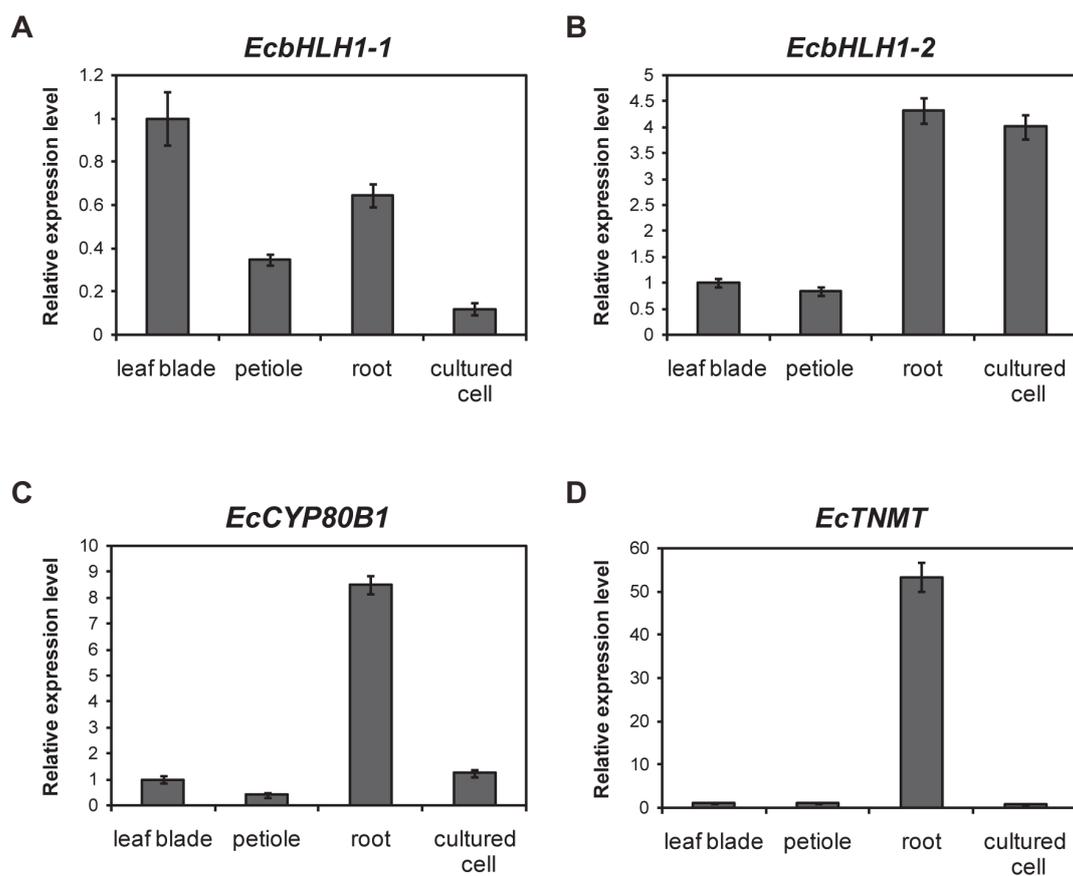


Fig. 2-4 *EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* の組織別発現解析

ハナビシソウ植物体の葉身、葉柄、根、および培養細胞における *EcbHLH1-1* (A), *EcbHLH1-2* (B), *EcCYP80B1* (C), *EcTNMT* (D) の発現量を realtime-PCR により解析した。β-Actin 遺伝子の発現量を内部標準として補正を行い、葉身における発現量を 1 として相対値を算出した (n=3, ±SD)。

ハナビシソウ *EcbHLH1* 発現抑制株の作出

2 種類の CjbHLH1 ホモログである *EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* がハナビシソウに存在し、それらが冗長的に転写活性化因子として機能しているものの、その植物体における機能が異なる可能性が示唆された。そこで、*EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* それぞれの機能をより詳細に解析するために、37 bp という短い配列を標的とした特異的 RNAi を用いることで、それぞれの遺伝子を特異的に発現抑制、あるいは同時に発現抑制した形質転換体の作出を試みた (Ifuku et al., 2005)。RNAi の標的となる配列は、*EcbHLH1-1* に特異的な配列、*EcbHLH1-2* に特異的な配列、およ

び *EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* に共通する配列の 3 種類をそれぞれ選択し (Fig. 2-5)、各 RNAi ベクターを作成後、アグロバクテリウム LBA4404 株を用いてハナビシソウ植物体切片への形質転換を行った。コントロールとして *GUS* 遺伝子発現ベクターを導入した形質転換体も作出した。得られた培養細胞は抗生物質を含む LS 寒天培地において約 9 ヶ月選抜培養した後、LS 液体培地で少なくとも 6 ヶ月以上培養を続け、安定して生育する株を選抜した。以降、コントロール株を VC 株、*EcbHLH1-1* 特異的 RNAi 株を 1-RNAi 株、*EcbHLH1-2* 特異的 RNAi 株を 2-RNAi 株、*EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* 両者の RNAi 株を 12-RNAi 株と呼ぶ。

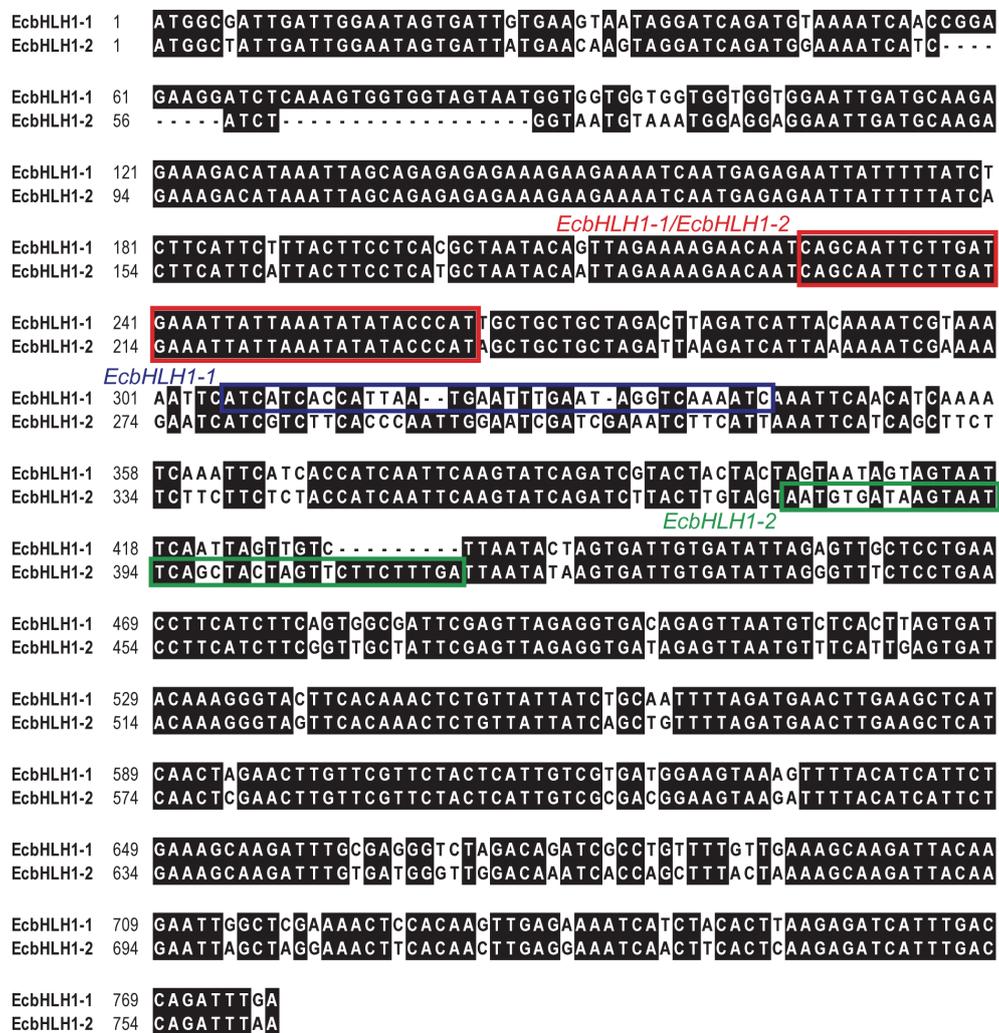


Fig. 2-5 37 bp RNAi の標的配列

青が *EcbHLH1-1* 特異的、緑が *EcbHLH1-2* 特異的、赤が *EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* 両方に特異的な配列をそれぞれ示す。

最初に、得られた形質転換培養細胞株の中から *EcbHLH1* の発現量が効果的に抑制された株を選抜するために、各 RNAi 株における *EcbHLH1-1*、あるいは *EcbHLH1-2* の発現量を VC 株と比較した。複数ある VC 株の中から *EcbHLH1-1*、*EcbHLH1-2* の発現量が中程度の株を 3 つ (VC4, VC6, VC7) 選抜し、以降の解析で用いた。それぞれの発現量を評価した結果、1-RNAi 株の中から *EcbHLH1-1* の発現量が明らかに抑制されていた細胞株を 3 株 (1-L7, 1-L14, 1-L16)、2-RNAi 株の中から *EcbHLH1-2* の発現量が明らかに抑制されていた株を 3 株 (2-L13, 2-L14, 2-L18)、12-RNAi 株の中から *EcbHLH1-1*、*EcbHLH1-2* の発現量が抑制されていた株を 2 株 (12-L1, 12-L2)、選抜した。また、これらの培養細胞株における導入遺伝子のゲノム DNA 内への挿入については、ゲノム DNA 抽出後の PCR により確認した。選抜した形質転換培養細胞の見た目の大きさや生育に目立った差は見られなかったが、培地の着色が RNAi 株で薄い傾向が見られた。なお、形質転換体の選抜と維持は本村幸也氏の協力のもとに行った (本村幸也修士論文、平成 25 年度)。

***EcbHLH1* 発現抑制株におけるサンギナリン生合成酵素遺伝子の発現解析**

次に、*EcbHLH1* 遺伝子の発現抑制がサンギナリン生合成酵素遺伝子の発現量に及ぼす影響を解析した。選抜した VC, 1-RNAi, 2-RNAi 株それぞれ 3 ラインは 2 連で、12-RNAi 株 2 ラインは 3 連で 7 日間培養し、各株計 6 サンプルにおけるサンギナリン生合成酵素遺伝子の発現量を realtime-PCR により解析した。まず、*EcbHLH1-1*、*EcbHLH1-2* の発現量を解析した結果、1-RNAi 株では *EcbHLH1-2* の発現量には VC 株と比べて変化はなく、*EcbHLH1-1* の発現量のみが顕著に減少していたのに対し、2-RNAi 株では *EcbHLH1-2* だけでなく *EcbHLH1-1* の発現量も減少していた (Fig. 2-6)。この点に関しては、*EcbHLH1-1* の発現量が *EcbHLH1-2* によって制御されている可能性や、*EcbHLH1-2* をターゲットにした RNAi の配列が *EcbHLH1-1* の抑制にも寄与してしまった可能性などが考えられた。一方、12-RNAi 株における *EcbHLH1-1*、*EcbHLH1-2* の発現量はある程度減少していたものの、当初のスクリーニング時に比べると減少の程度は弱くなっていた。また、VC 株における *EcbHLH1-1*、*EcbHLH1-2* の発現量のばらつき

は極めて大きく、中には RNAi 株と同程度にまで発現量が減少しているものもあった。

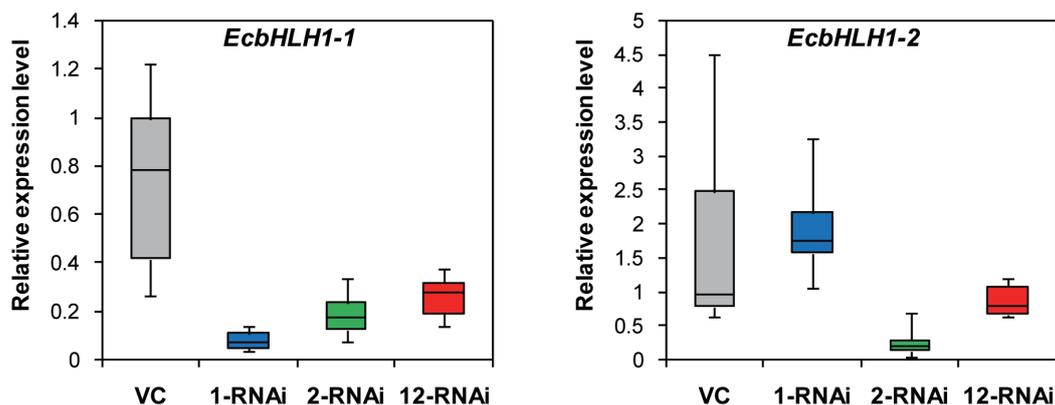


Fig. 2-6 各 RNAi 株における *EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* の発現量

VC 株、1-RNAi 株、2-RNAi 株、12-RNAi 株における *EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* の発現量を realtime-PCR により解析した。 β -Actin 遺伝子の発現量を内部標準とし、VC4-1 の値を 1 として値を算出し、箱ひげ図を用いて結果を示した (n=6)。

次いで、サンギナリン生合成酵素遺伝子の発現量を同様に解析した。全体的にライン間のばらつきが大きく、VC 株との発現量の差は予備的解析の結果 (本村幸也修士論文、平成 25 年度) よりも小さくなっていた (Fig. 2-7)。しかし、中央値の値を VC 株と比べると、1-RNAi 株では *EcCNMT*, *(S)*-stylophine synthase (*EcCYP719A2*), *EcCYP719A3*, *(S)*-*N*-methylstylophine 14-hydroxylase (*EcMSH*), *sanguinarine reductase* (*EcSR*) の値が、2-RNAi 株では *Ec6OMT*, *EcCNMT*, *EcCYP719A5*, *EcCYP719A2*, *EcCYP719A3*, *EcSR* の値がそれぞれ低下していた。一方、12-RNAi 株では VC 株と差を見出すことはできなかった。

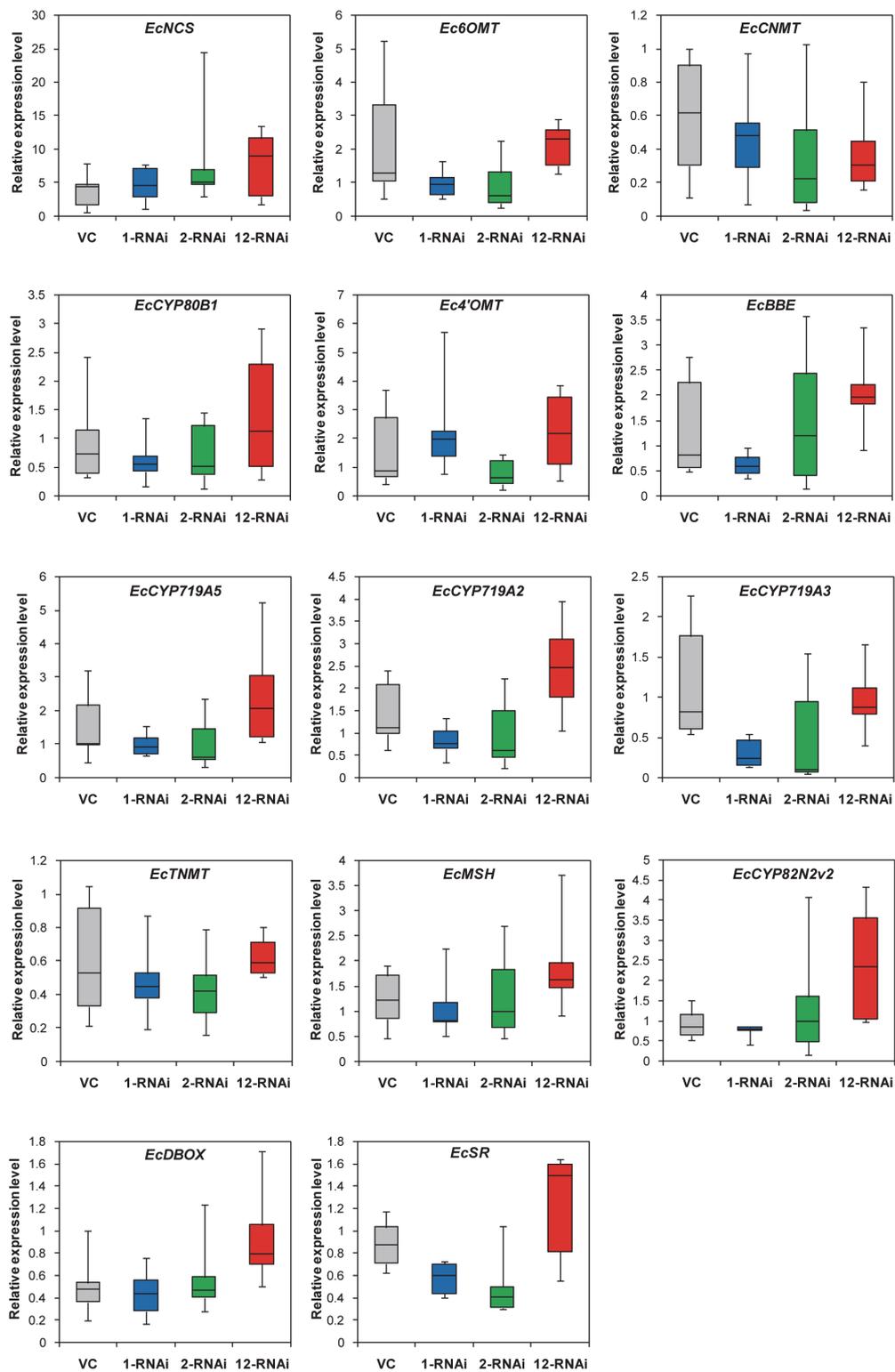


Fig. 2-7 各 RNAi 株におけるサンギナリン生合成酵素遺伝子の発現量

VC 株、1-RNAi 株、2-RNAi 株、12-RNAi 株におけるサンギナリン生合成酵素遺伝子の発現量を real-time-PCR により解析した。 β -Actin 遺伝子の発現量を内部標準とし、VC4-1 の値を 1 として値を算出し、箱ひげ図を用いて結果を示した (n=6)。

EcbHLH1 の発現低下がサンギナリン生合成酵素遺伝子の一部の発現に影響を与えていることが示唆されたが、Fig. 2-7 からは明白に結論づけることができなかったため、*EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* の発現量と各サンギナリン生合成酵素遺伝子の発現量の相関図を作成し、解析した (Fig. 2-8)。その結果、*EcbHLH1-1* の発現と、*Ec6OMT*, *EcCYP719A3*, *EcTNMT* の発現との間に有意に相関が見られた (それぞれ $R=0.573$, 0.732 , 0.497)。一方、*EcbHLH1-2* の発現に関しては、*Ec6OMT*, *Ec4'OMT*, *EcCYP719A3* の発現との間に有意な相関を認めた (それぞれ $R=0.716$, 0.506 , 0.624)。残りの遺伝子に関しては、有意な相関関係は確認できなかった。以上の結果から、VC, RNAi 各ライン内での遺伝子のばらつきが大きいものの、*EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* の発現変化によって一部のサンギナリン生合成酵素遺伝子の発現が制御されている可能性が示唆された。なお、一次代謝に関わる遺伝子や *CjWRKY1* のホモログであると考えられる *EcWRKY1*, *AtMYC2* のホモログであると考えられる *EcMYC2* についても同様に発現解析を行ったところ、*EcbHLH1-1* の発現と *EcMYC2* の発現との間に有意に相関が見られた他は、明らかな相関性は見られなかった (Fig. 2-9, 2-10)。

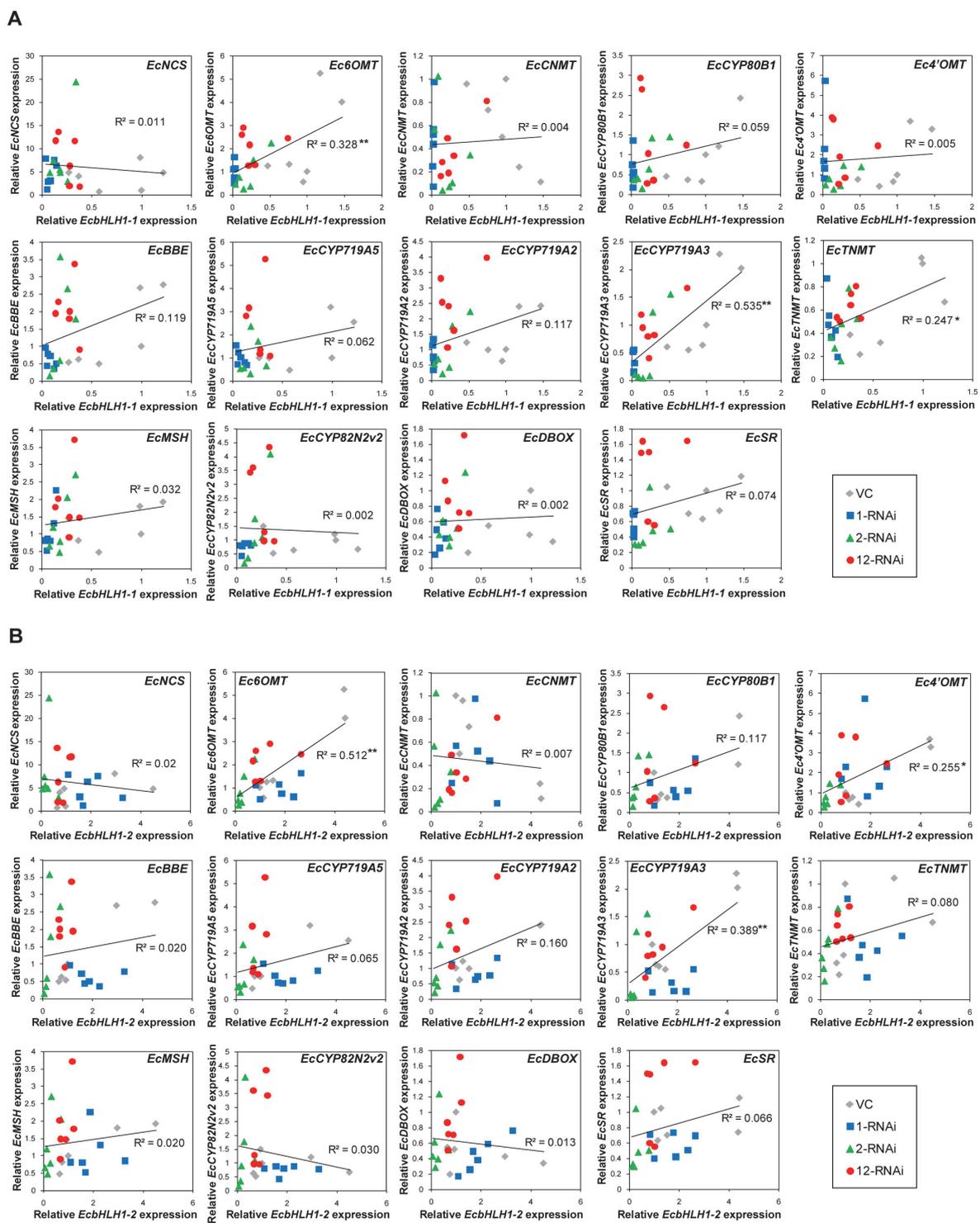


Fig. 2-8 *EcbHLH1* 遺伝子とサンギナリン合成酵素遺伝子の発現相関プロット

全 VC 株、および RNAi 株における *EcbHLH1-1* 遺伝子の発現量 (A)、および *EcbHLH1-2* 遺伝子の発現量 (B) を横軸に、サンギナリン合成酵素遺伝子の発現量を縦軸にとった時の相関プロットを示す。 (df=22, * p<0.05, ** p<0.01)。

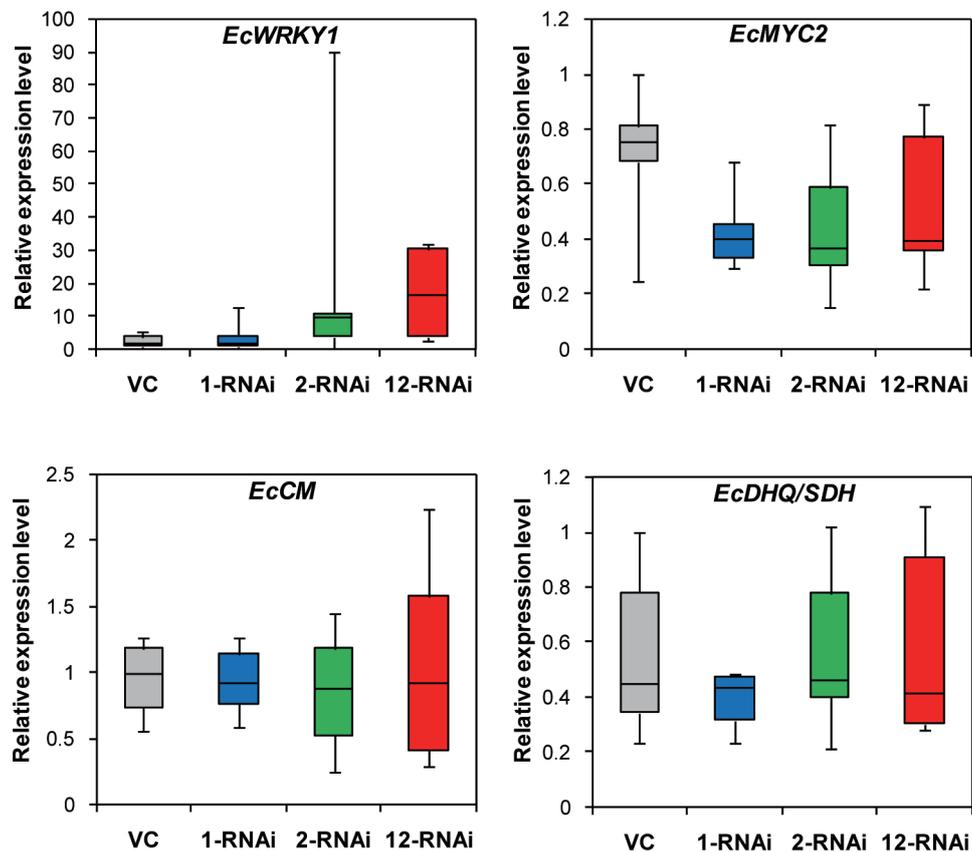


Fig. 2-9 各 RNAi 株における一次代謝遺伝子や関連すると推察される転写因子遺伝子の発現量

VC 株、1-RNAi 株、2-RNAi 株、12-RNAi 株における一次代謝遺伝子や *CjWRKY1* のホモログであると推測される *EcWRKY1*、*AtMYC2* のホモログであると推測される *EcMYC2* の発現量を realtime-PCR により解析した。 β -*Actin* 遺伝子の発現量を内部標準とし、VC4-1 の値を 1 として値を算出し、箱ひげ図を用いて結果を示した (n=6)。

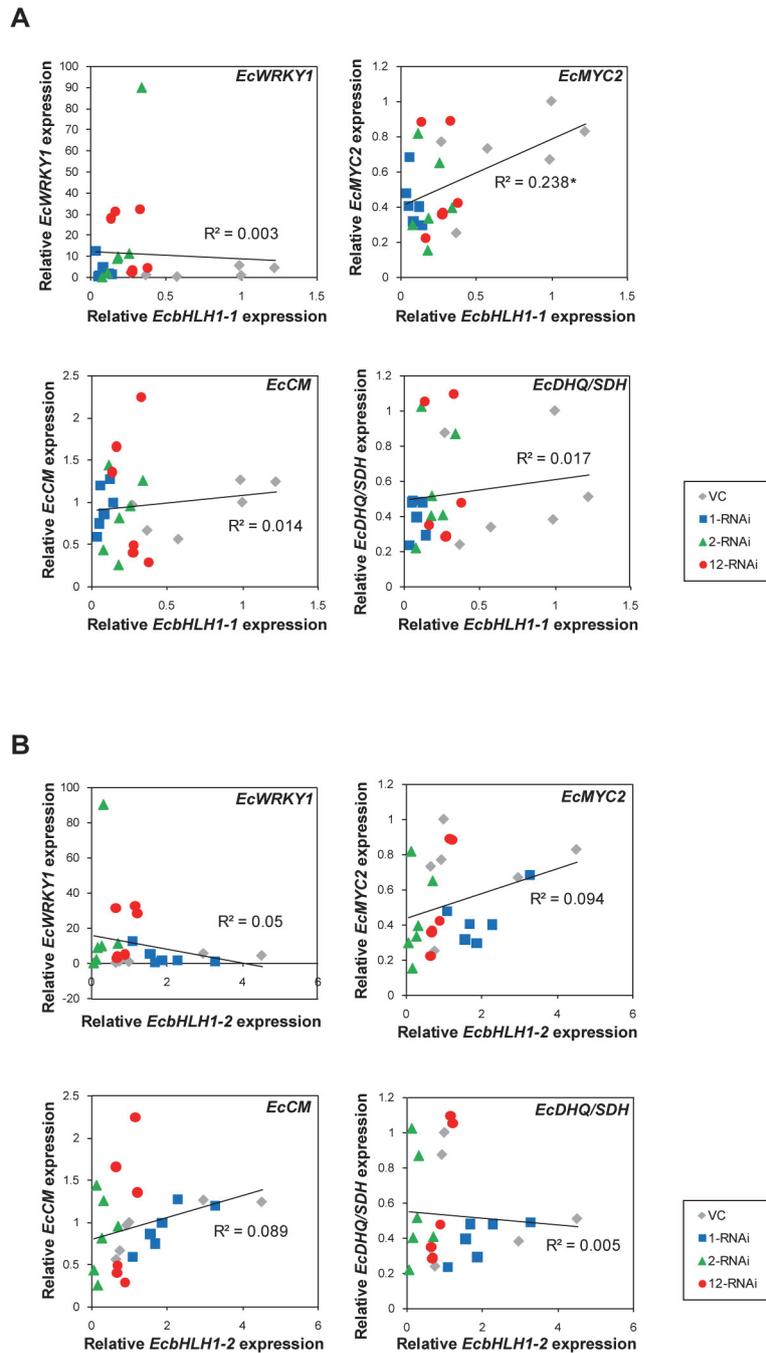


Fig. 2-10 *EcbHLH1* 遺伝子と一次代謝、および関連すると推察される転写因子遺伝子の発現相関プロット

全 VC 株、および RNAi 株における *EcbHLH1-1* 遺伝子の発現量 (A)、および *EcbHLH1-2* 遺伝子の発現量 (B) を横軸に、一次代謝遺伝子や *EcWRKY1*, *EcMYC2* 遺伝子の発現量を縦軸にとった時の相関プロットを示す。(df=22, * p<0.05, ** p<0.01)。

***EcbHLH1* 発現抑制株におけるサンギナリン蓄積量の解析**

EcbHLH1 遺伝子の発現低下に伴い、一部ではあるがサンギナリン生合成酵素遺伝子の発現低下が認められたことより、VC 株および各 RNAi 株のアルカロイド蓄積量を解析した。培養細胞と液体培地からそれぞれアルカロイドを抽出し、IQA 蓄積量を LC-MS 解析により測定した結果、アルカロイドプロファイルには大きな変化はなく、主産生 IQA であるサンギナリンの蓄積量を比較した (Fig. 2-11)。その結果、遺伝子発現解析の場合と同様に、VC 株におけるサンギナリン蓄積量はライン間で大きくばらついていた。一方、1-RNAi 株におけるサンギナリン蓄積量は VC 株とほぼ同程度であったのに対し、2-RNAi 株、および 12-RNAi 株において減少傾向が認められた。さらに、*EcbHLH1* の発現量とサンギナリン蓄積量との相関を解析した結果、*EcHLH1-2* の発現量とサンギナリン蓄積量との間に有意な相関性を認めた ($R=0.706$)。一方、*EcbHLH1-1* の発現量とサンギナリン蓄積量との間に相関性は見られなかった。また、*EcbHLH1-2* の発現量と相関を示した *Ec6OMT*, *Ec4'OMT*, *EcCYP719A3* の発現量とサンギナリン蓄積量との相関を調べたところ、*Ec4'OMT* の発現量とサンギナリン蓄積量との間に有意に相関を認めた ($R=0.453$)。以上の結果から、*EcbHLH1*、特に *EcbHLH1-2* がサンギナリン生合成系の発現制御に関わると結論づけた。

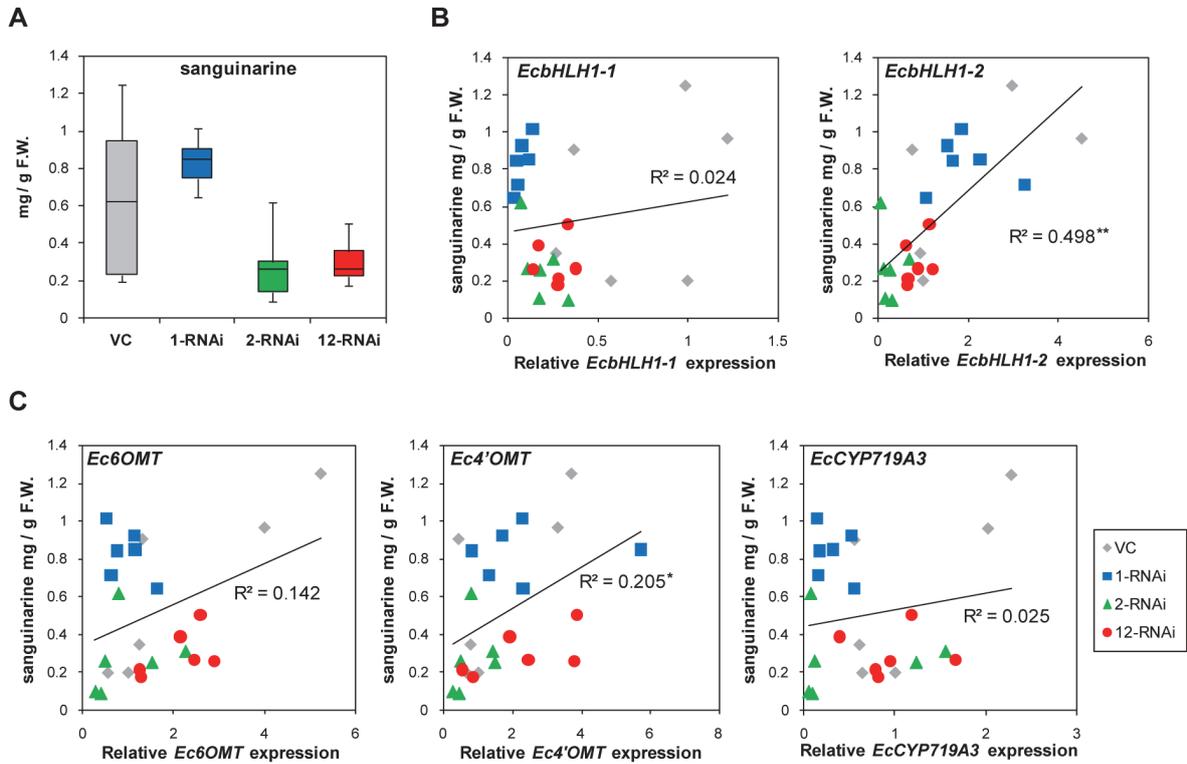


Fig. 2-11 各 RNAi 株におけるサンギナリンの蓄積量

A, VC 株、1-RNAi 株、2-RNAi 株、12-RNAi 株におけるサンギナリンの蓄積量を箱ひげ図で示す。細胞、培地におけるサンギナリンの蓄積量は標品のピークをもとに定量し、合計値をプラスチックに含まれる全サンギナリン量として値を算出した (n=6)。

B, 全 VC 株、および RNAi 株における *EcbHLH1-1* 遺伝子、および *EcbHLH1-2* 遺伝子の発現量を横軸に、サンギナリン蓄積量を縦軸にとった時の相関プロットを示す (df=22, ** p<0.01)。

C, 全 VC 株、および RNAi 株における *Ec6OMT*, *Ec4'OMT*, *EcCYP719A3* 遺伝子の発現量を横軸に、サンギナリン蓄積量を縦軸にとった時の相関プロットを示す (df=22, * p<0.05)。

[考察]

第1章において、CjbHLH1がベルベリン生合成系の発現制御因子として機能することを明らかとするとともに、CjbHLH1のホモログがIQA産生植物種に特徴的に存在することを見出した。一方で、これらのホモログがIQA生合成系の発現制御においてどのように機能しているかは不明であった。本研究において、ハナビソウから2種類のCjbHLH1ホモログ、EcbHLH1-1、EcbHLH1-2を単離するとともに、これらのホモログがともに核に局在すること、サンギナリン生合成酵素遺伝子に対して転写活性化能を有すること、また、その発現がMeJAによって誘導されることなどを明らかとした。なお、EcbHLH1-1、EcbHLH1-2はアミノ酸レベルで高い相同性を示すことから冗長的に機能している可能性が示唆された。一方、*EcbHLH1-1*、*EcbHLH1-2*の組織別発現解析の結果から、両遺伝子の発現プロファイルが異なり、*EcbHLH1-1*は主に葉身で、*EcbHLH1-2*は主に根で高い発現を示すことが明らかとなった。サンギナリンに代表されるベンゾフェナンスリジンアルカロイドは主に根で高蓄積していること、サンギナリン生合成酵素遺伝子の発現量も根で高いことから、根においてはEcbHLH1-2が主たる制御因子としてサンギナリン生合成系の制御に関わる可能性が考えられた。これに対し、地上部で発現量の高いEcbHLH1-1は、同じく地上部で高蓄積しているパビンアルカロイド生合成系の発現制御に関わる可能性が考えられた。

EcbHLH1-1とEcbHLH1-2の生理的機能を明らかとするために、37 bpを標的としたRNAiにより、それぞれの遺伝子の特異的、ならびに両者の同時発現抑制を試みた。*EcbHLH1-1*を特異的に抑制した1-RNAi株においては*EcbHLH1-1*のみの発現抑制を認めたが、*EcbHLH1-2*を特異的に抑制した2-RNAi株においては*EcbHLH1-2*だけでなく、*EcbHLH1-1*の発現量も低下していた。今回用いた配列は1つであり、想定外の発現抑制が起こったとともに、*EcbHLH1-2*の発現の低下が*EcbHLH1-1*の発現を抑制した可能性も考えられる。特に培養細胞においては、*EcbHLH1-2*の発現が*EcbHLH1-1*よりも高いと推測され、その影響が考えられる。なお、発現量が高かったこともあり、2-RNAi株における*EcbHLH1-2*の発現量の低下は弱かった。同様に、*EcbHLH1-1*、*EcbHLH1-2*の両者を抑制した12-RNAiにおける発現抑制は小さかった。標的配

列が短い 37 bp RNAi ではその発現抑制効果が弱いと考えられることから、より標的遺伝子の発現量が抑制された形質転換体を作成するためには、RNAi の標的配列の長さ、ならびに配列をより検討する必要がある。

得られた RNAi 株と VC 株における *EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2*、サンギナリン生合成酵素遺伝子の発現量、およびサンギナリン蓄積量を解析した結果から、弱いながら一部の生合成酵素遺伝子、サンギナリン蓄積量が RNAi 株において低下している傾向が認められた。さらに、各 *EcbHLH1* 遺伝子の発現量と生合成酵素遺伝子の発現量、あるいは各 *EcbHLH1* 遺伝子の発現量とサンギナリン蓄積量の相関をプロットすることにより、両者の相関性がより明白となった。特に *EcbHLH1-2* の発現量とサンギナリンの蓄積量の相関性は高く、*EcbHLH1-2* が培養細胞におけるサンギナリン生合成系発現制御の主因子である可能性が示唆された。一方、*EcbHLH1-1* の発現量とサンギナリン蓄積量との間に高い相関性は見られなかったものの、*Ec6OMT*, *EcCYP719A3*, *EcTNMT* の発現量との間に相関が見られた。一過的ルシフェラーゼレポーターアッセイの結果と合わせて *EcbHLH1-1* も発現制御因子としての機能を十分有する可能性が考えられた。*EcbHLH1-1* は前述したように地上部での IQA 生合成に関与していることが考えられる。地上部での発現が高く、パビンアルカロイド生合成酵素遺伝子ではないかと推定される *EcCYP719A9* や *EcCYP719A11* (Ikezawa et al., 2009) が *EcbHLH1-1* の標的遺伝子であると推測されることから、これらの遺伝子発現を解析することが必要である。しかし、これらの遺伝子は培養細胞において発現が低いことから、地上部を分化したシュート培養系や、再分化させた植物体の解析が必要である。

一方、*Ec6OMT*, *Ec4'OMT* の発現量とサンギナリン蓄積量との間にもある程度相関が見られた。したがって、これらの酵素がサンギナリン生合成経路の律速段階を担う可能性が考えられた。しかし、*EcbHLH1-1* の発現量と *Ec6OMT* の発現量との間には相関が認められる一方、*Ec4'OMT* の発現量との間には相関がなく、またサンギナリンの蓄積量とも相関しないことから、*Ec4'OMT* がより大きくサンギナリン生合成に関与すると考えられた。なお、これまでの研究から *Ec4'OMT* が *Ec6OMT* と同じ 6 位の O-メチル化活性を有すること、また、ハナビシソウ培養細胞において

オウレン *6OMT* 遺伝子の過剰発現によりサンギナリンの産生量が増加することが明らかとなり (Inui et al., 2007)、ハナビシソウ培養細胞では *4'OMT* の発現が *IQA* 生合成を律速していることと相関していると考えられた。

12-RNAi 株においては、サンギナリン生合成酵素遺伝子の発現量は VC 株とほとんど変わらなかったが、サンギナリンの蓄積量はある程度減少していた。すでに述べたように、12-RNAi 株における *EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* の抑制の度合は単独のものに比べると弱く、そのことが生合成酵素遺伝子の発現に影響したと考えられる。その 1 つの理由として、継代培養に伴う RNAi 効果の低下が考えられる。予備的に行った解析では、12-RNAi 株においても *EcbHLH1* の発現抑制とともに、*EcBBE* や *EcCYP719A2*, *EcCYP719A5* といった遺伝子の発現量の減少も確認されている (本村幸也修士論文、平成 25 年度)。培養変異に伴う生合成酵素遺伝子発現量やアルカロイドプロファイルの変化は以前から指摘されており (Takemura et al., 2010)、本研究においても、細胞の継代培養時の変化が細胞の安定性に大きな影響を与えてしまった可能性が考えられた。いかに安定した細胞株を確立し維持していくかは、形質転換培養細胞を用いた研究において大きな課題である。

EcbHLH1-1, *EcbHLH1-2* ともに、サンギナリン生合成系の発現制御因子として機能している可能性が示唆されたが、その標的となる遺伝子は、*CjbHLH1* がほぼ全てのベルベリン生合成酵素遺伝子の発現を包括的に制御していることと比べて、限定的であった。今回の解析における発現抑制がオウレンのプロトプラストを用いた一過的 RNAi に比べて弱かった可能性も考えられるが、ハナビシソウでは遺伝子が重複するとともに、組織別発現プロファイルに差が見られ、機能的にもより多様化した可能性も考えられる。

一次代謝に関わる遺伝子と *EcbHLH1* との関連は全くないと示唆された一方、*EcMYC2* と *EcbHLH1-1* の発現量の間には有意な相関が見られた。*EcMYC2* の機能に関してはほとんど解析を行っていないが、一過的ルシフェラーゼアッセイにより *IQA* 生合成酵素遺伝子に対する転写活性化能が認められる点や、植物体の葉で発現が高いことが明らかであることから (山田未発表データ)、*EcMYC2* も地上部において *EcbHLH1-1* とともに *IQA* 生合成系の制御に関わる可能性

も考えられる。一方、オウレンの CjWRKY1 のホモログとして単離した EcWRKY1 については EcbHLH1 との関連性は見られなかった。EcWRKY1 が IQA 生合成系の制御に関わるかどうかは今後の検討課題である。ケシの WRKY1 がモルヒネ生合成系の発現制御に関わることが最近報告されたが (Mishra et al., 2013)、このケシの WRKY1 のホモログと CjWRKY1 のホモログだと考えられる EcWRKY1 は全くタイプが異なる。

RNAi による *EcbHLH1* の発現抑制では、サンギナリン生合成系の遺伝子発現量やサンギナリン蓄積量に影響が見られたが、*EcbHLH1* の過剰発現による影響は解析できていない。RNAi 株の作出に先駆けて、*CjbHLH1* の過剰発現株を作出したものの、オウレンプロトプラストを用いた一過的過剰発現の場合と同様に、サンギナリン生合成酵素遺伝子の発現への影響はほとんど見られなかった。タバコの MYC2 に関しても過剰発現によるニコチン生合成系への影響がほとんど見られていない (Zhang et al., 2012)。転写因子の場合、転写後調節による制御機構が存在する可能性が高く (Kato et al., 2007)、制御系の全貌を明らかにしていくことが今後求められる。また、EcbHLH1 が IQA 生合成以外の制御にも関わる可能性がある。近年の次世代シーケンサー技術の発展に伴い、非モデル植物のゲノム配列の解明がより簡便になりつつある中で、EcbHLH1 の今後の解析に関しても、シス因子配列やターゲット遺伝子の同定など、より網羅的に解析を進めていくことが今後期待される。

まとめ

高等植物が生産する多様な二次代謝産物は、我々人類にとって非常に有用なものが多く、昔から様々な形で利用されてきた。中でも非常に強い生理活性を有するアルカロイドは、医薬品等の成分としての利用価値が高いとして注目されてきたが、生産する植物種が限られることから、生合成系、特にその生合成系の発現制御に関する知見は非常に限定されていた。ベルベリンやモルヒネに代表される IQA 生合成系の研究はオウレンやハナビシソウ、ケシなどを用いて精力的に進められており、特にオウレンが生産するベルベリンやハナビシソウが生産するサンギナリンの生合成酵素遺伝子はほぼ全て単離、同定されている (Sato, 2013)。これらの知見をもとに生合成系の発現制御に関わる転写制御因子の探索も進められ、すでに WRKY 型の転写因子である CjWRKY1 がベルベリン生合成系を包括的に制御する転写活性化因子として機能していることが明らかとされていた (Kato et al., 2007)。一方、ほぼ同時期に単離された bHLH 型の転写因子である CjbHLH1 については先行研究によってその解析が部分的に進められていたものの (古株 靖久修士論文、平成 17 年度)、156-S 株プロトプラストを用いた一過的 RNAi による *CjbHLH1* の発現抑制によりベルベリン生合成酵素遺伝子群の発現量が減少することから、CjbHLH1 が転写活性化因子である可能性が示唆されていた以外、目立った機能解析は行われていなかった。特に、*CjbHLH1* の一過的過剰発現においてもベルベリン生合成酵素遺伝子の発現量が減少するという結果は先の一過的 RNAi の結果と矛盾する点でもあり、より詳細な解析が必要とされていた。本研究では、動物や植物の様々なプロセスの発現制御に関わる bHLH 型転写因子の IQA 生合成系への関与とその制御機構を明らかにするためにオウレンの CjbHLH1、およびハナビシソウの CjbHLH1 ホモログの詳細な機能解析を行った。

第 1 章

本章では、主に 156-S 株プロトプラストを用いた一過的発現系を利用し、CjbHLH1 の詳細な機能解析を行った。BLAST を用いた *CjbHLH1* のホモログ検索の結果、シロイヌナズナやイネ

といった IQA 非産生植物種に相同性の高いホモログが見つからなかったのに対し、IQA 産生植物種であるオダマキ、ユリノキ、ウマノスズクサの EST にのみ相同性の高いホモログが存在していた。さらに、薬用植物種のトランスクリプトームデータを利用して同様の解析を行った場合も、IQA 産生植物種に *CjbHLLH1* のホモログが広く分布していることが明らかとなった。以上の結果から、*CjbHLLH1* が IQA 産生植物種に特徴的な bHLH 型転写因子である可能性が示唆された。さらに、*CjbHLLH1* の一過的過剰発現がベルベリン生合成酵素遺伝子の発現に及ぼす影響を経時的に解析した結果、*CjbHLLH1* 導入 6 時間において、ベルベリン生合成酵素遺伝子群の発現量がコントロールに比べてわずかに上昇する傾向を認めた。一方、24 時間、72 時間ではコントロールとほとんど変わらないかむしろ減少しており、プロトプラスト化という外的刺激により誘導されるベルベリン生合成酵素遺伝子の一過的な上昇が時間の経過とともに抑えられている可能性が示唆された。この原因については、一過的ルシフェラーゼレポーターアッセイにおいて *CjbHLLH1* の転写促進活性が確認されている点と合わせて、不活性な（あるいは過剰な）*CjbHLLH1* が活性型の *CjbHLLH1* の機能を拮抗的に阻害してしまったからではないかと推察している。詳細は不明だが、*CjbHLLH1* 自身の機能に何らかの影響を与えるような制御機構が存在している可能性が考えられる。また、細胞内局在性の解析により *CjbHLLH1* が核に移行し機能していること、*CjbHLLH1* 抗体を用いたクロマチン免疫沈降により *CjbHLLH1* が一部の生合成酵素遺伝子プロモーター領域に直接結合し、転写を促進していることが明らかとなった。さらに、*CjbHLLH1* 遺伝子の発現がアルカロイド産生を誘導することで知られる MeJA 処理により誘導されることから、*CjbHLLH1* が JA シグナル伝達系に関わる転写因子である可能性が考えられた。しかし、タバコのニコチン生合成系やニチニチソウの MIA 生合成系では、JA シグナル伝達系において JAZ や COI1 とともに中心的な役割を担う bHLH 型転写因子、MYC2 がその発現制御に関わることが明らかとされているのに対し (De Geyter et al., 2012)、IQA 生合成系の制御因子である *CjbHLLH1* は MYC2 とは全く異なるタイプの bHLH 型転写因子であり、IQA 産生植物種にのみ、*CjbHLLH1* ホモログによる MYC2 とは独立した JA シグナル伝達経路が存在する可能性が示唆された。

第2章

本章では、IQA代謝工学のモデル材料として利用されているハナビシソウに着目し、*CjbHLH1* ホモログの単離とその発現を RNAi により抑制した形質転換培養細胞株を作出し、機能解析を行った。縮重プライマーを用いてハナビシソウから *CjbHLH1* ホモログを単離した結果、2種類の相同性の高いホモログ遺伝子が単離され、それぞれ *EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* と名付けた。オウレン 156-S 株プロトプラストを用いた一過的発現解析の結果から、*EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* はともに核に移行し機能していること、ともにサンギナリン生合成酵素遺伝子プロモーターの転写促進活性を有すること、ハナビシソウ芽生えを用いた解析から、*EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* 遺伝子ともに MeJA に対する応答性を示すことが明らかとなった。以上の結果から、*EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* ともに *CjbHLH1* の機能的なホモログとして、冗長的に IQA 生合成系を制御している可能性が示唆された。一方で、ハナビシソウ植物体を用いた組織別発現解析の結果から、*EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* の発現が高い組織が異なることが明らかとなった。一過的ルシフェラーゼアッセイの結果でも、*EcbHLH1-1* のみ転写促進活性が見られる遺伝子プロモーターが存在したことから、両者の生理的な機能が異なる可能性が示唆された。特に、ハナビシソウ地上部で発現が高い *EcbHLH1-1* はパピナルカロイドの産生に関わる可能性が考えられる。さらに、*EcbHLH1-1*, *EcbHLH1-2* の発現抑制株を作出し、サンギナリン生合成酵素遺伝子の発現解析やサンギナリン蓄積量の解析を行った結果、それぞれの株内における遺伝子発現量のばらつきのために差は小さかったものの、サンギナリンの蓄積量が、*EcbHLH1-2* の発現抑制株で減少している傾向を認めた。また、*EcbHLH1-2* の発現量とサンギナリン蓄積量との間にも有意な相関性が確認されたことから、組織別発現解析の結果とも合わせて、*EcbHLH1-2* が培養細胞におけるサンギナリン生合成系の主たる制御因子として機能していると結論づけた。また、*EcbHLH1-2* の発現量と *Ec6OMT*, *Ec4'OMT*, *EcCYP719A3* といったサンギナリン生合成酵素遺伝子の発現量との間にも有意な相関性が見られた。このうち、*Ec6OMT*, *Ec4'OMT* の発現量はサンギナリン蓄積量とも相関が見られたことから、サンギナリン生合成経路の律速酵素遺伝子である可能性が示唆された。一方、*EcbHLH1-1* の発現量とサンギナリン蓄積量との間に大きな相関性は見られ

なかったが、*Ec6OMT*, *EcCYP719A3*, *EcTNMT*といったサンギナリン生合成酵素遺伝子の発現量との間に有意な相関性が見られたことから、*EcbHLH1-1* も **IQA** 生合成系の制御因子としての機能を有することが考えられた。サンギナリンの蓄積量への影響が見られなかったのは、*Ec6OMT* と同様の 6-*O*-メチル化活性を有する *Ec4'OMT* の遺伝子発現に対する *EcbHLH1-1* の効果が小さかったためと考えられた。

以上の様に、本研究によって **IQA** 生合成系に特徴的な **bHLH** 型転写因子が、実際に **IQA** 生合成酵素遺伝子の発現をコントロールし、**IQA** 産生制御に関わることが明らかとなった。ニコチン生合成系や **MIA** 生合成系で機能する **bHLH** 型転写因子である **MYC2** のホモログは、**IQA** 産生植物種にも広く存在するが、オウレン 156-S 株プロトプラストを用いた解析では、**MYC2** ホモログである **CjMYC2** の **IQA** 生合成系への関与は明確ではなく、**CjbHLH1** が主たるベルベリン生合成系の転写因子として機能していると考えられる。このように、種々のアルカロイド生合成系における転写制御ネットワークの違いは、アルカロイド生合成経路の多様化、ひいては二次代謝生合成系の進化と多様性を考える上でも重要な知見であると考えられる (Fig. 1-13)。また、今回解析した **CjbHLH1** や **EcbHLH1** を用いて代謝工学的解析を行うことも可能である。過剰発現による **IQA** 産生能の向上などを目指すには、これら転写因子自身の制御に関する知見について今後さらなる解析が必要であるが、**CjbHLH1**, **EcbHLH1** は **CjWRKY1** とともに研究の良いモデルとなると考えられる。

参考文献

- Beaudoin GA, Facchini PJ** (2013) Isolation and characterization of a cDNA encoding (*S*)-*cis*-*N*-methylstylophine 14-hydroxylase from opium poppy, a key enzyme in sanguinarine biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 431: 597-603
- Broun P** (2004) Transcription factors as tools for metabolic engineering in plants. *Curr Opin Plant Biol* 7: 202-209
- Butelli E, Titta L, Giorgio M, Mock HP, Matros A, Peterek S, Schijlen EG, Hall RD, Bovy AG, Luo J, Martin C** (2008) Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nat Biotechnol* 26: 1301-1308
- Carretero-Paulet L, Galstyan A, Roig-Villanova I, Martinez-Garcia JF, Bilbao-Castro JR, Robertson DL** (2010) Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in Arabidopsis, poplar, rice, moss, and algae. *Plant Physiol* 153: 1398-1412
- Chatel G, Montiel G, Pre M, Memelink J, Thiersault M, Saint-Pierre B, Doireau P, Gantet P** (2003) CrMYC1, a *Catharanthus roseus* elicitor- and jasmonate-responsive bHLH transcription factor that binds the G-box element of the strictosidine synthase gene promoter. *J Exp Bot* 54: 2587-2588
- Choi KB, Morishige T, Shitan N, Yazaki K, Sato F** (2002) Molecular cloning and characterization of coclaurine *N*-methyltransferase from cultured cells of *Coptis japonica*. *J Biol Chem* 277: 830-835

Croteau R, Kutchan TM, Lewis N (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan, B. Gruissem, W. & Jones, R. eds). American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD. 1250-1318

De Geyter N, Gholami A, Goormachtig S, Goossens A (2012) Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. *Trends Plant Sci* 17: 349-359

Dubouzet JG, Morishige T, Fujii N, An CI, Fukusaki E, Ifuku K, Sato F (2005) Transient RNA silencing of scoulerine 9-*O*-methyltransferase expression by double stranded RNA in *Coptis japonica* protoplasts. *Biosci Biotechnol Biochem* 69: 63-70

Facchini PJ (2001) ALKALOID BIOSYNTHESIS IN PLANTS: Biochemistry, Cell Biology, Molecular Regulation, and Metabolic Engineering Applications. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 29-66

Facchini PJ, De Luca V (2008) Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. *Plant J* 54: 763-784

Fernandez-Calvo P, Chini A, Fernandez-Barbero G, Chico JM, Gimenez-Ibanez S, Geerinck J, Eeckhout D, Schweizer F, Godoy M, Franco-Zorrilla JM, Pauwels L, Witters E, Puga MI, Paz-Ares J, Goossens A, Reymond P, De Jaeger G, Solano R (2011) The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell* 23: 701-715

Fossati E, Ekins A, Narcross L, Zhu Y, Falgout JP, Beaudoin GA, Facchini PJ, Martin VJ (2014) Reconstitution of a 10-gene pathway for synthesis of the plant alkaloid dihydrosanguinarine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Commun* 5: 3283

Fujii N, Inui T, Iwasa K, Morishige T, Sato F (2007) Knockdown of berberine bridge enzyme by RNAi accumulates (*S*)-reticuline and activates a silent pathway in cultured California poppy cells. *Transgenic Res* 16: 363-375

Hagel JM, Beaudoin GA, Fossati E, Ekins A, Martin VJ, Facchini PJ (2012) Characterization of a flavoprotein oxidase from opium poppy catalyzing the final steps in sanguinarine and papaverine biosynthesis. *J Biol Chem* 287: 42972-42983

Hagel JM, Facchini PJ (2013) Benzylisoquinoline alkaloid metabolism: a century of discovery and a brave new world. *Plant Cell Physiol* 54: 647-672

Ifuku K, Yamamoto Y, Ono TA, Ishihara S, Sato F (2005) PsbP protein, but not PsbQ protein, is essential for the regulation and stabilization of photosystem II in higher plants. *Plant Physiol* 139: 1175-1184

Ikezawa N, Iwasa K, Sato F (2009) CYP719A subfamily of cytochrome P450 oxygenases and isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Eschscholzia californica*. *Plant Cell Rep* 28: 123-133

Ikezawa N, Iwasa K, Sato F (2007) Molecular cloning and characterization of methylenedioxy bridge-forming enzymes involved in stylophine biosynthesis in *Eschscholzia californica*. *FEBS J* 274: 1019-1035

Ikezawa N, Tanaka M, Nagayoshi M, Shinkyo R, Sakaki T, Inouye K, Sato F (2003) Molecular cloning and characterization of CYP719, a methylenedioxy bridge-forming enzyme that belongs to a novel P450 family, from cultured *Coptis japonica* cells. *J Biol Chem* 278: 38557-38565

Inui T, Tamura K, Fujii N, Morishige T, Sato F (2007) Overexpression of *Coptis japonica* norcoclaurine 6-O-methyltransferase overcomes the rate-limiting step in Benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in cultured *Eschscholzia californica*. *Plant Cell Physiol* 48: 252-262

Kato N, Dubouzet E, Kokabu Y, Yoshida S, Taniguchi Y, Dubouzet JG, Yazaki K, Sato F (2007) Identification of a WRKY protein as a transcriptional regulator of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis japonica*. *Plant Cell Physiol* 48: 8-18

Kazan K, Manners JM (2013) MYC2: the master in action. *Mol Plant* 6: 686-703

Koes R, Verweij W, Quattrocchio F (2005) Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci* 10: 236-242

Kondou Y, Nakazawa M, Kawashima M, Ichikawa T, Yoshizumi T, Suzuki K, Ishikawa A, Koshi T, Matsui R, Muto S, Matsui M (2008) RETARDED GROWTH OF EMBRYO1, a new basic helix-loop-helix protein, expresses in endosperm to control embryo growth. *Plant Physiol* 147: 1924-1935

Kong W, Wei J, Abidi P, Lin M, Inaba S, Li C, Wang Y, Wang Z, Si S, Pan H, Wang S, Wu J, Wang Y, Li Z, Liu J, Jiang JD (2004) Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins. *Nat Med* 10: 1344-1351

Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K (2008) MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform* 9: 299-306

Matsushima Y, Minami H, Hori K, Sato F (2012) Pathway engineering of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in transgenic California poppy cells with ectopic expression of tetrahydroberberine oxidase from *Coptis japonica*. *Plant Biotechnology* 473-481

Menke FL, Champion A, Kijne JW, 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

Minami H, Dubouzet E, Iwasa K, Sato F (2007) Functional analysis of norcoclaurine synthase in *Coptis japonica*. *J Biol Chem* 282: 6274-6282

Minami H, Kim JS, Ikezawa N, Takemura T, Katayama T, Kumagai H, Sato F (2008) Microbial production of plant benzylisoquinoline alkaloids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7393-7398

Mishra S, Triptahi V, Singh S, Phukan UJ, Gupta MM, Shanker K, Shukla RK (2013) Wound induced transcriptional regulation of benzylisoquinoline pathway and characterization of wound inducible PsWRKY transcription factor from *Papaver somniferum*. *PLoS One* 8: e52784

Morishige T, Tsujita T, Yamada Y, Sato F (2000) Molecular characterization of the *S*-adenosyl-L-methionine:3'-hydroxy-*N*-methylcoclaurine 4'-*O*-methyltransferase involved in isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis japonica*. *J Biol Chem* 275: 23398-23405

Nakagawa A, Minami H, Kim JS, Koyanagi T, Katayama T, Sato F, Kumagai H (2011) A bacterial platform for fermentative production of plant alkaloids. *Nat Commun* 2: 326

Niwa Y, Hirano T, Yoshimoto K, Shimizu M, Kobayashi H (1999) Non-invasive quantitative detection and applications of non-toxic, S65T-type green fluorescent protein in living plants. *Plant J* 18: 455-463

Pauw B, Hilliou FA, Martin VS, Chatel G, de Wolf CJ, Champion A, Pre M, van Duijn B, Kijne JW, van der Fits L, Memelink J (2004) Zinc finger proteins act as transcriptional repressors of alkaloid biosynthesis genes in *Catharanthus roseus*. *J Biol Chem* 279: 52940-52948

Sato F (2013) Characterization of plant functions using cultured plant cells, and biotechnological applications. *Biosci Biotechnol Biochem* 77: 1-9

Sato F, Hashimoto T, Hachiya A, Tamura K, Choi KB, Morishige T, Fujimoto H, Yamada Y (2001) Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 367-372

Sato F, Tsujita T, Katagiri Y, Yoshida S, Yamada Y (1994) Purification and characterization of *S*-adenosyl-L-methionine: norcochlorine 6-*O*-methyltransferase from cultured *Coptis japonica* cells. *Eur J Biochem* 225: 125-131

Sato F, Yamada Y (1984) High berberine-producing cultures of *Coptis japonica* cells. *Phytochemistry* 23: 281-285

Shoji T, Hashimoto T (2011) Tobacco MYC2 regulates jasmonate-inducible nicotine biosynthesis genes directly and by way of the *NIC2*-locus *ERF* genes. *Plant Cell Physiol* 52: 1117-1130

Stevens JD, Roalson EH, Skinner MK (2008) Phylogenetic and expression analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor gene family: genomic approach to cellular differentiation. *Differentiation* 76: 1006-1022

Takemura T, Ikezawa N, Iwasa K, Sato F (2013) Molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 in sanguinarine biosynthesis from *Eschscholzia californica* cells. *Phytochemistry* 91: 100-108

Takemura T, Ikezawa N, Iwasa K, Sato F (2010) Metabolic diversification of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis through the introduction of a branch pathway in *Eschscholzia californica*. *Plant Cell Physiol* 51: 949-959

Takeshita N, Fujiwara H, Mimura H, Fitchen JH, Yamada Y, Sato F (1995) Molecular cloning and characterization of *S*-adenosyl-L-methionine:scoulerine-9-*O*-methyltransferase from cultured cells of *Coptis japonica*. *Plant Cell Physiol* 36: 29-36

Todd AT, Liu E, Polvi SL, Pammett RT, Page JE (2010) A functional genomics 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

van der Fits L, Zhang H, Menke FL, Deneka M, Memelink J (2000) A *Catharanthus roseus* BPF-1 homologue interacts with an elicitor-responsive region of the secondary metabolite biosynthetic gene *Str* and is induced by elicitor via a JA-independent signal transduction pathway. *Plant Mol Biol* 44: 675-685

Zhang H, Hedhili S, Montiel G, Zhang Y, Chatel G, Pre M, Gantet P, Memelink J (2011) The basic helix-loop-helix transcription factor CrMYC2 controls the jasmonate-responsive expression of the *ORCA* genes that regulate alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant J* 67: 61-71

Zhang HB, Bokowiec MT, Rushton PJ, Han SC, Timko MP (2012) Tobacco transcription factors NtMYC2a and NtMYC2b form nuclear complexes with the NtJAZ1 repressor and regulate multiple jasmonate-inducible steps in nicotine biosynthesis. *Mol Plant* 5: 73-84

大柿麻衣 平成 18 年度修士論文

古株靖久 平成 17 年度修士論文

茶木香保里 平成 19 年度修士論文

本村幸也 平成 25 年度修士論文

吉田紗由美 平成 16 年度修士論文

吉本忠司 平成 20 年度修士論文

謝辞

本研究を行うにあたり、非常に恵まれた研究環境を提供していただき、また常に適切な御指導と最大限の後押しを賜りました京都大学大学院生命科学研究科佐藤文彦教授に心より感謝いたします。

広い観点から有意義なご意見やご指摘をいただき、研究の遂行を支えてくださった京都大学大学院生命科学研究科遠藤剛准教授に深く感謝いたします。

日々の研究生活やセミナー等においてご助言、ご助力をいただき、また研究環境の整備に尽力してくださった京都大学大学院生命科学研究科伊福健太郎助教に深く感謝いたします。

当研究室に在籍時から現在まで、転写因子研究に関する様々な知見や実際の実験手法などを教えていただくとともに、ディスカッションにおいて的確なアドバイスや励ましの言葉を賜りましたサントリー生命科学財団生物有機科学研究所研究員の小山知嗣博士に心より感謝いたします。

sGFP 発現ベクターを分与していただきました静岡県立大学の丹羽康夫助教に深く感謝いたします。

本研究を行う上で、日常적으로お世話になりました京都大学大学院生命科学研究科全能性統御機構学分野の皆さまに深く感謝いたします。特に、4 回生時に実験の基本操作や知識だけでなく、研究生活を送る上での様々なアドバイスをくださった池澤信博博士、竹村知也博士、茶木香保里氏、吉本忠司氏、ハナビシソウ形質転換培養細胞の維持と解析に協力していただいた本村幸也氏、事務面で大変お世話になった平田陽子氏に心より御礼申し上げます。

最後に、研究生活を送る間、常に暖かく見守り支えていただいた両親に感謝します。

学術雑誌に発表した論文

Yamada Y, Kato N, Kokabu Y, Luo Q, Dubouzet JG, Sato F (2010) Identification of regulatory protein genes involved in alkaloid biosynthesis using a transient RNAi system. *Methods in Molecular Biology*, 643, 33-45, Springer.

doi: 10.1007/978-1-60761-723-5_3

http://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-60761-723-5_3#page-1

Yamada Y, Kokabu Y, Chaki K, Yoshimoto T, Ohgaki M, Yoshida S, Kato N, Koyama T, Sato F (2011) Isoquinoline alkaloid biosynthesis is regulated by a unique bHLH-type transcription factor in *Coptis japonica*. *Plant Cell Physiol* 52: 1131-1141

doi: 10.1093/pcp/pcr062

<http://pcp.oxfordjournals.org/content/52/7/1131.long>

Yamada Y, Koyama T, Sato F (2011) Basic helix-loop-helix transcription factors and regulation of alkaloid biosynthesis. *Plant Signal Behav* 6: 1627-1630

doi: 10.4161/psb.6.11.17599

<https://www.landesbioscience.com/journals/psb/article/17599/>

Yamada Y, Sato F (2013) Transcription factors in alkaloid biosynthesis. *Int Rev Cell Mol Biol* 305: 339-382

doi: 10.1016/B978-0-12-407695-2.00008-1

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124076952000081>

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Yasuyuki Yamada, Yasuhisa Kokabu, Kaori Chaki, Tadashi Yoshimoto, Mai Ohgaki, Sayumi Yoshida, Nobuhiko Kato, Tomotsugu Koyama and Fumihiko Sato

Isoquinoline Alkaloid Biosynthesis is Regulated by a Unique bHLH-Type Transcription Factor in *Coptis japonica*

Plant and Cell Physiology, 52:7, 1131-1141, 2011

Yasuyuki Yamada, Tomotsugu Koyama and Fumihiko Sato

Basic helix-loop-helix transcription factors and regulation of alkaloid biosynthesis

Plant Signaling & Behavior, 6:11, 1627-1630, 2011