

ジンチョウゲ科植物の細胞内情報伝達系の改変による フレグランス構成成分生合成活性の誘導

富山大学大学院医学薬学研究部

黒 崎 文 也

Several lines of evidence suggested that Rac/Rop GTPases in *Aquilaria microcarpa* play roles in jasmonates-induced activation of sesquiterpene biosynthesis in the plant cells. The expression of farnesyl diphosphate synthase gene of *A. microcarpa* was markedly increased even in the absence of methyl jasmonate in the cells over-expressing a calmodulin gene and a Rac/Rop GTPase gene. These findings suggest that calmodulin and Rac/Rop GTPase proteins should function as a key mediator in jasmonate-signaling in higher plant cells.

1. 緒 言

Jasmonic acid (JA) 及びそのメチルエステル体である methyl jasmonate (MJ) は「jasmonate」と称される植物ホルモンの一種で、植物の成長、発達ならびに乾燥、傷害、微生物の感染等の多彩な外的ストレスに対する防御応答において重要な役割を担うメッセンジャー分子である¹⁾。また、jasmonateを細胞外から人為的に添加することによって、様々な二次代謝産物の生合成が活性化することが良く知られている²⁾。最近の研究によれば、JAは植物細胞内に取り込まれた後 isoleucine と接合体を形成し、SCF ubiquitin E3 ligaseの構成成分である COI1 タンパクに認識される。その後、転写抑制因子である JAZがユビキチン化され、次いでプロテアソームによる分解を引き金としてカスケードに関わる様々な因子の転写が開始されることが示されている³⁾。しかしながら、その後、どのような機構によって多様な細胞の反応が誘導されるかについては殆んど知見が無い。我々のグループはこれまでの研究でMJをはじめとする外部刺激に呼応した二次代謝産物生合成能活性化にはCa²⁺カスケードの活性化が必須であり、更に、これらのプロセスにはCa²⁺結合タンパクである calmodulin (CAM) や monomer型GTP結合タンパクの一種である Rac/Rop GTPase などの機能分子が関与することを報告している⁴⁾。また、これらの現象が、植物種や化合物種に依存せず幅広く保存されていることに着目して、情報伝達関連因子の遺伝子を植物に導入・発現させ、細胞内情報伝達機構を人為的に操作することで、二次代謝能を活性化させる可能性を提案している⁴⁾。

今回の研究の材料として用いたのは東南アジア原産のジンチョウゲ科木本植物である *Aquilaria microcarpa* で、機械的傷害や微生物の感染といったストレスにさらされることにより、幹の内部に芳香性セスキテルペンを多く含む樹脂状の「沈香」を形成する。通常の状態ではマスクされている *Aquilaria* 植物のセスキテルペン生合成能を発現させるために様々な試みがなされているが、最近 Okudera 等⁵⁾ によって MJ 刺激を与えることでセスキテルペン群の生合成が誘導されることが示された。本研究では、jasmonate を引き金とする *A. microcarpa* のセスキテルペン生合成発現に関わる細胞内情報伝達機構を解明し、その応用として、*Aquilaria* 細胞内に潜在的に存在している二次代謝能を顕在化させるための方法論を開発することを目的とした。

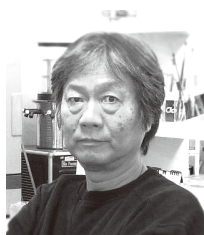
2. 実 験

2.1 RACE法によるFaPS並びにAm-racのクローニング

A. microcarpa のカルスから RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) によって total RNA を抽出し、次いで逆転写反応によって cDNA を合成した。3'-RACE のための cDNA については GeneRacer Kit (Invitrogen)、また、5'-RACE のための cDNA は 5'/3' RACE Kit 2nd Generation (Roche) をそれぞれ用いて作製した。データベースを検索して設計したプライマーを組み合わせ PCR を行い、増幅された DNA 断片を精製した後に pGEM-T Easy Vector (Promega) に組み込んだ。その後、One Shot Top10 Chemically Competent Cell (Invitrogen) を形質転換して、目的の遺伝子の存在が確認できたプラスミドの塩基配列を決定した。

2.2 RT-PCRによる発現解析

Murashige-Skoog (MS) 寒天培地上に *A. microcarpa* のカルス (100 mg) をとり、yeast extract (Difco, 1 mg/mL)、MJ (和光純薬、100 µM)、Ca²⁺-ionophore A23187 (和光純薬、10 µM) の溶液 (100 µL) を滴下することで刺激を加え、25℃、暗所でインキュベートした。外部刺激を与えた後、経時的にカルスを回収し、前述の方法で total RNA を調製



Induction of biosynthetic activity of sesquiterpene compounds by artificial modification of signal-transduction processes of *Aquilaria* plant cells

Fumiya Kurosaki

Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences for Research
University of Toyama

した。得られたRNAを逆転写し、次いで、目的遺伝子の翻訳領域及び3'側非翻訳領域に対応するプライマーでPCRを行い、生成物を電気泳動で分析して発現量を解析した。コントロールにはtotal RNAあるいは恒常的に発現することが確認されている*Am-cam2*を用いた。

2.3 阻害剤存在下でのMJ刺激に対する*Am-FaPS1*の発現解析

プロテアソーム阻害剤であるMG-132 (Calbiochem, 10 or 2.5 μ M)、rac阻害剤であるNSC 23766 (Calbiochem, 100 or 25 μ M)、Ca²⁺チャネル阻害剤であるverapamil hydrochloride (Sigma, 100 or 25 μ M)、また、CAM阻害剤であるN-(6-aminoethyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W-7, BIOML Res. Lab., 100 or 25 μ M)をそれぞれ含んだ2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 3 μ M、N⁶-benzyladenine 3 μ M入りのMS寒天培地を作製し、その上に*A. microcarpa*のカルス（100mg）を静置して、25℃、暗所で4日間プレインキュベーションを行った。次いでMJ（100 μ M）100 μ Lを滴下し6時間インキュベーションを行い、total RNAの逆転写によって得たcDNAを鋳型としてPCRを行った。また、コントロールには*Am-cam2*を用いた。

2.4 *Am-rac2*への変異の導入

Am-rac2 (GenBank accession no. JF922915)を用いて、植物に恒常的活性型、恒常的不活性型の*Am-rac2*タンパクを発現させるために*Am-rac2*のORFに1塩基置換を行った。

2.4.1 恒常的活性型*Am-rac2*の作製

*Am-rac2*のGTPの加水分解を担う領域にあるG15をVに置換するためのプライマーを設計し、Quick Change II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)を用いてプロトコルに従い反応を行った。得られた恒常的活性型*Am-rac2*を*CArac2*とした。

2.4.2 恒常的不活性型*Am-rac2*の作製

*Am-rac2*のGDP/GTP結合領域であるD121をAに置換するためのプライマーを設計し、*CArac2*と同様の手法で恒常的不活性型*Am-rac2*を得て、これを*DNrac2*とした。

2.5 形質転換植物体の作成

*A. microcarpa*より単離したCAM遺伝子*Am-cam1*、並びに、*Am-rac2*、*CArac2*、*DNrac2*を発現させた形質転換植物を作るにあたり、CMV35Sプロモーター支配下にそれぞれの目的遺伝子を配置したpBI-OX-GW (GFP selective) (Inplanta Innovations)を構築した。コントロールとしては*GFP*のみを発現するものを用いた。エンターベクター内のORF部分をLR clonase (Invitrogen)を用いてpBI-OX-GWに組み入れ、これを、37℃、5分間の

凍結融解法によって*Agrobacterium tumefaciens* 4404 (Invitrogen)に導入した。

植物への遺伝子導入にあたっては形質転換した*A. tumefaciens*菌液にカルスを3分間浸漬し、次いで菌液を濾紙に吸収させた後、2,4-dichlorophenoxyacetic acid 3 μ M、N⁶-benzyladenine 3 μ Mを含むMS寒天培地上に静置した。これらを25℃、暗所で3日間共培養した後、cefotaxime (和光純薬、500 μ g/mL)、kanamycin (和光純薬、50 μ g/mL)、2,4-dichlorophenoxyacetic acid 3 μ M、N⁶-benzyladenine 3 μ Mを含むMS培地上に25℃暗所で4日間静置することで殺菌を行った。*GFP*、*Am-cam1*、*Am-rac2*、*CArac2*、*DNrac2*を組み込んだ*A. microcarpa*のカルス（100mg）から前述の手法でtotal RNAを抽出し、逆転写によってcDNAを得てPCRを行い、生成物の電気泳動によって発現量を解析した。定量的評価にあたっては、Image Jを用いてバンドの濃度を数値化し相対値として表した。

3. 結果

3.1 *FaPS*のクローニングと諸性質の解析

3.1.1 *FaPS*のクローニング

*A. microcarpa*のセスキテルペン生合成活性を評価するにあたり、まず前駆物質であるファルネシル二リン酸生合成酵素、*FaPS*、をコードする遺伝子を単離することを試みた。これまでに報告されている*FaPS*遺伝子配列中でよく保存されている領域からプライマーを設計し、RACE法によりクローニングを行った。縮重プライマーにより、まずコア構造を得た後に3'側および5'側の配列をそれぞれ決定した。得られた配列をデータベースに報告されている配列と比較検討してところ、既知の*FaPS*遺伝子配列と高い相同性を示し、新規の*FaPS*遺伝子であることを確認した。*Am-FaPS1*と名付けた遺伝子 (GenBank accession no. HM067872) は全長1310塩基であり、342アミノ酸をコードしていた。

3.1.2 アミノ酸配列の特徴と比較

*Am-FaPS1*と他の植物の*FaPS*のコードするアミノ酸配列を比較したところ、いずれの対象に対しても高い相同性を示し、*FaPS*として機能するために必要とされている鎖長決定領域や活性部位覆部領域、Mg²⁺結合部位も確認された。アミノ酸配列の系統樹解析ではいずれの*FaPS*も高い相同性を示し、*Am-FaPS1*は特にトウダイグサ科のタカトウダイ (*E. pekinensis*)と最も高い相同性を示した (Fig. 1)。

3.1.3 RT-PCRによる発現解析

外部刺激に対する*Am-FaPS1*の発現応答についての知見を得るために、*A. microcarpa*のカルスを様々な試薬で処理し、発現変化をRT-PCRを用いて経時的に観察した。本実験で用いた試薬の中でMJがもっとも顕著な転写活性

の活性化を誘導し、処理後3時間から発現の上昇が観察され高いレベルに維持されていた (Fig. 2)。Yeast extract は植物の防御応答に関連する二次代謝産物の生合成を誘導することが知られているが、処理後3時間からMJと同様に転写活性の上昇が観察された。Ca²⁺-ionophore A23187 処理では転写活性の上昇は見られたものの、処理後6時間をピークとして24時間には処理前と同程度にまで減少した⁶⁾。

3.2 MJ誘導性 *Am-FaPS1* の発現に及ぼす様々な情報伝達阻害剤の効果

今回のこれまでの実験で、MJが *A. microcarpa* における *Am-FaPS1* の発現を顕著に活性化させることが明らかとなった。我々のグループはゴマノハグサ科植物である

Scoparia dulcis のジテルペン化合物の生合成をモデルとして、MJ添加による植物二次代謝能活性化の細胞内情報伝達機構についての提案を行なっている。しかしながら、MJによる *S. dulcis* のジテルペン生合成活性化は、いわば「既存の生合成活性の上昇」というべきものであるが、本研究の対象とした *A. microcarpa* のセスキテルペン生合成の誘導は「高等植物が潜在的に保有している二次代謝活性の顕在化」であり、*S. dulcis* の場合とは区別すべきものと考えられる。この「潜在的な生合成能の顕在化」においても、我々が既に提案した機構と類似する細胞内イベントが関与するか否かを検討するために、様々な情報伝達関連因子阻害剤の存在下で *A. microcarpa* のカルスにMJ外部刺激を与え、*Am-FaPS1* の発現変化をRT-PCRによって観察した (Fig. 3)。その結果、Rac/Rop GTPase、Ca²⁺-チャンネル

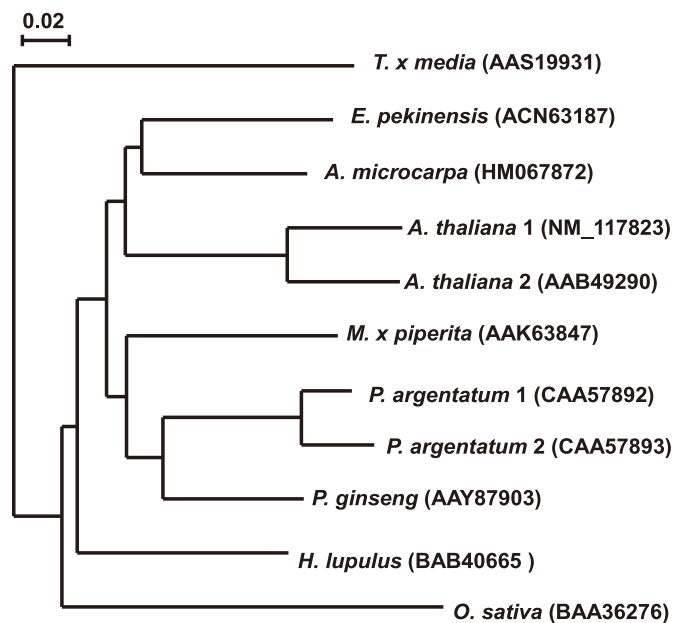


Fig. 1 *FaPS* アミノ酸配列の系統樹による比較。カッコ内は GenBank accession number を示す。

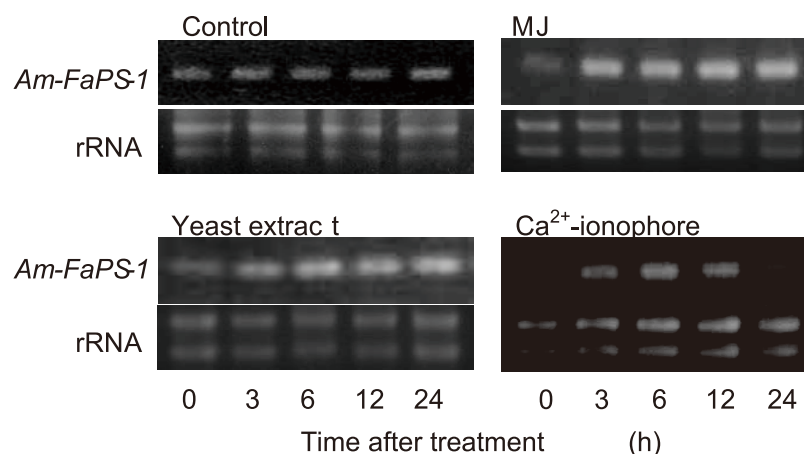


Fig. 2 RT-PCR による *Am-FaPS1* の発現解析。MJ、yeast extract、Ca²⁺-ionophore 処理による発現量の変化。Control は H₂O による処理。

ル、CAM、ユビキチン-プロテアソームの阻害剤で処理を行なったいずれの場合においても、これらの試薬の濃度に依存して、MJ 添加による *Am-FaPS1* 発現が阻害されることが明らかとなった⁷⁾。

3.3 *Am-rac* のクローニングと諸性質の解析

3.3.1 *Am-rac* のクローニング

MJ 刺激に応答した植物細胞の二次代謝物産生に到るシグナル伝達経路の中で Rac/Rop 型 GTPase が重要な因子として機能している可能性が示唆されたことから、情報伝達にこれをコードする遺伝子を *A. microcarpa* より単離することを試みた。縮重プライマーによってコア構造を得た後に、3' 側および 5' 側の配列をそれぞれ決定して 2 つのクローンを単離した。*Am-rac1* と名づけた遺伝子 (GenBank accession no. JF 922914) は全長 1235 塩基であり 210 アミノ酸をコードし、*Am-rac2* (GenBank accession no. JF 922915) は全長 1124 塩基であり 198 アミノ酸をコードしていた。

3.3.2 アミノ酸配列の特徴と比較

Am-rac1 及び 2 がコードするタンパクと他の植物の Rac/Rop G タンパクのアミノ配列を比較したところ、ほとんどの対象に対して非常に高い相同性を示し、また G タンパクとして機能するために必須とされている 4 つの GTP 結合部位やエフェクター結合領域も確認された。一般に small GTPase は、原形質膜への移行・局在のためのプレニル化を受けるコンセンサス配列である C-X-X-L を C 末端に持つとされている。*Am-rac* 翻訳産物のアミノ酸配列を見ると、*Am-rac2* にはプレニル基との結合のためのコンセンサスなモチーフが含まれているのに対し、*Am-rac1* にはこれが含まれていないことが明らかとなった。したがって *Am-rac1* がコードするタンパクは、他の Rac/Rop GTPase とは異なる活性化機構をもつ可能性が示唆された。

3.3.3 RT-PCR による発現解析

A23187、yeast extract、MJ で *A. microcarpa* を刺激した際の *Am-rac* 遺伝子の発現活性を RT-PCR で確認したところ、A23187 では発現に変化がなく、yeast extract の添

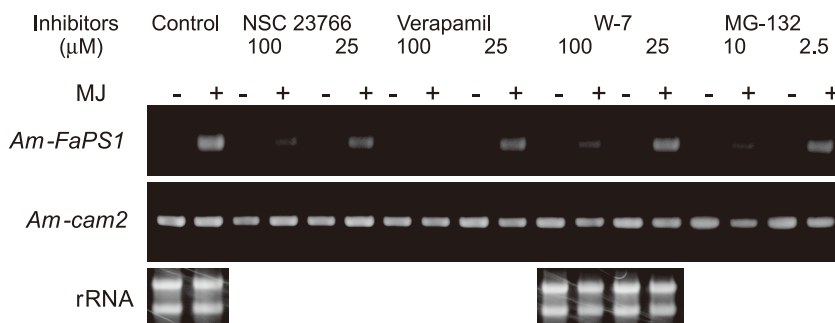


Fig. 3 MJ 誘導性 *Am-FaPS1* 発現に対する様々な阻害剤の添加効果。NSC 23766 (rac 阻害剤)、verapamil (Ca^{2+} チャンネル阻害剤)、W-7 (CAM 阻害剤)、MG-132 (プロテアソーム阻害剤) の存在下で MJ 刺激を与えた際の *Am-FaPS1* の発現変化。

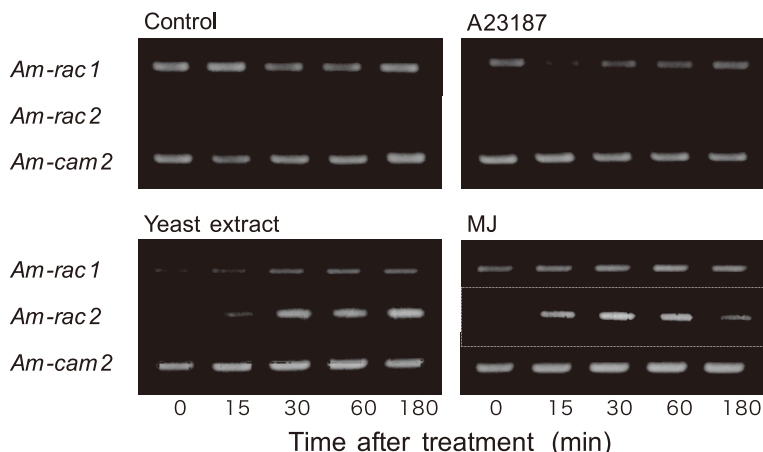


Fig. 4 RT-PCR による *Am-rac1*、*Am-rac2* の発現解析。MJ、yeast extract、 Ca^{2+} -ionophore 処理による発現量の変化。Control は H_2O による処理。

加においては3時間にわたって発現が緩やかに上昇した。また、MJ処理の場合は、30–60分で発現レベルが最大となり、その後低下することが確認された (Fig. 4)。

3.4 組換え *A. microcarpa* における *Am-FaPS1* の発現解析

次に、MJ応答性CAM遺伝子である *Am-cam1*、同じくMJ応答性Rac/Rop GTPase遺伝子である *Am-rac2* を *A. microcarpa* で過剰発現させることにより、*Am-FaPS1* の発現レベルを高く維持できる可能性を検討した。また、Rac/Rop GTPaseは1アミノ酸を置換することにより恒常活性型 (CA)、及び、恒常不活性型 (DN) のRac/Rop GTPaseを作製することが可能であるとされているが、今回の実験ではCA型とDN型のRac/Rop GTPaseの導入による効果についても検討した (Fig. 5)。その結果、*Am-cam1* を導入した組換え体ではMJ非存在下においても *Am-FaPS1* 転写活性の顕著な上昇が見られ、CAM遺伝子とその翻訳産物がMJ刺激によるセスキテルペン生合成誘導のシグナル伝達のなかで大きく寄与していることが示唆された。また、*Am-rac2* を過剰発現させた組換え体ではcontrolと比べて *Am-FaPS1* の転写活性の上昇は見られたものの、CAMの組換え体ほど顕著な活性化は観察されなかった。更に、*CArac2* を導入した組換え体においても、変異を導入していない *Am-rac2* と比較して大きな差は認められなかった。また、*DNrac2* 組換え体では *Am-FaPS1* 転写活性がやや抑制されることが見出された⁷⁾。

4. 考 察

沈香の基源植物の一つである *A. microcarpa* のセスキテルペン生合成に寄与する *FaPS* をコードした遺伝子 *Am-FaPS1* をクローニングし、外部刺激に対する発現応答をRT-PCRによって検討した。その結果、MJで刺激することにより *Am-FaPS1* の強い転写活性の誘導・上昇が見られ、セスキテルペン生合成の活性化が強く示唆された (Fig. 2)。また、植物の防御応答に関わる二次代謝産物の生合成を誘導することが知られている yeast extract で処理した場合も同様に *Am-FaPS1* の発現が顕著に上昇することが明らかとなった。MJのシグナル伝達に関わっている因子について更なる知見を得るために、以前の研究で関与が示唆された様々な情報伝達関連因子の阻害剤を用いて、MJ刺激に対する *Am-FaPS1* の発現量の変化を観察した。その結果、ユビキチン-プロテアソーム、Rac/Rop GTPase、 Ca^{2+} -チャンネル、CAMの阻害剤を用いたいずれの実験系においても *Am-FaPS1* の発現量はcontrolと比べて用量依存的に減少していた (Fig. 3)。これらのことから、MJの細胞内シグナル伝達には上記の諸因子が関与しており、*Am-FaPS1* の転写活性の活性化にはユビキチン-プロテアソームとRac/Rop GTPaseが関与する Ca^{2+} の細胞内流入、更にはCAMの活性化が不可欠であることが示唆された。

植物二次代謝能の誘導あるいは活性化におけるこれらの因子を物質生産に応用することを目的として、*Am-cam1*

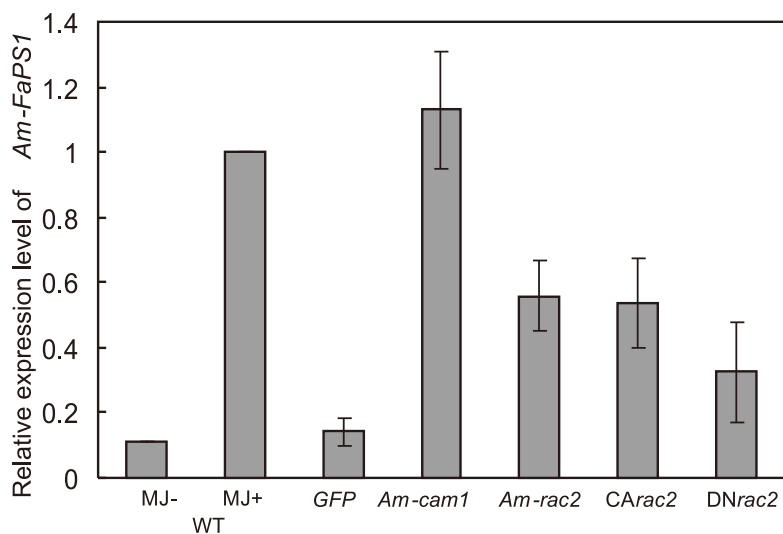


Fig. 5 4つの組換え体につき、それぞれ *Am-FaPS1* の発現量の平均値と標準偏差を求め、MJ (+) を 1.0 とした相対値で表した。

遺伝子、*Am-rac2*遺伝子、*CArac2*、*DNrac2*遺伝子を*A. microcarpa*のカルスに組み込み、*Am-FaPS1*の発現の変化をRT-PCRにより解析した (Fig. 5)。その結果、*Am-FaPS1*の発現量は*Am-cam1*を導入・過剰発現させた mutantで最も大きくなり、MJ 刺激を与えた場合と同等あるいはそれ以上の転写活性の上昇が認められた。一方、*Am-rac2*、*CArac2*の mutantsではMJ (－) と比べて発現量は上昇しているもののMJ (+) やCAM遺伝子を導入したもののほどではないことが認められた。これより、MJ によるシグナル伝達経路にはRac/Rop GTPase 関与の機構以外にも複数の経路が存在し、これら別の転写制御機構とRac/Rop GTPase系とが複雑に相互作用して*Am-rac*導入変異体での*Am-FaPS1*の発現に影響を与えた可能性が考えられる。

(引用文献)

- 1) Shan X, Yan J, Xie D.; Comparison of phytohormone signaling mechanisms, Curr. Opin. Plant Biol., 15, 84-91, 2012.
- 2) Gundlach H, Muller MJ, Kutchan TM, Zenk MH.; Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures, Pro. Nat. Acad. Sci. USA, 89, 2389-2393, 1992.
- 3) Creelman RA, Mullet ME.; Biosynthesis and action of jasmonates in plants, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48, 355-381, 1997.
- 4) Asano K, Lee JB, Yamamura Y, Kurosaki F.; Enhanced accumulation of atropine in *Atropa belladonna* transformed by Rac GTPase gene isolated from *Scoparia dulcis*, Transgenic Res., DOI. 10.1007/s11248-013-9733-4.
- 5) Okudera Y, Ito M.; Production of agarwood fragrant constituents in *Aquilaria* calli and suspension cultures, Plant Biotechnol., 26, 307-315, 2009.
- 6) Kenmotsu Y, Ogita S, Katoh Y, Yamamura Y, Takao Y, Tatsuo Y, Fujino H, Kadota S, Kurosaki F.; Methyl jasmonate-induced enhancement of expression activity of *Am-FaPS-1*, a putative farnesyl diphosphate synthase gene from *Aquilaria microcarpa*, J. Nat. Med., 65, 194-197, 2011.
- 7) Kenmotsu Y, Asano K, Yamamura Y, Kurosaki F.; Cloning and expression of putative Rac/Rop GTPase genes, *Am-rac1* and *Am-rac2*, involved in methyl jasmonate-induced transcriptional activation of farnesyl diphosphate synthase in cell cultures of *Aquilaria microcarpa*, Plant Mol. Biol. Rep., 31, 539-546, 2013.