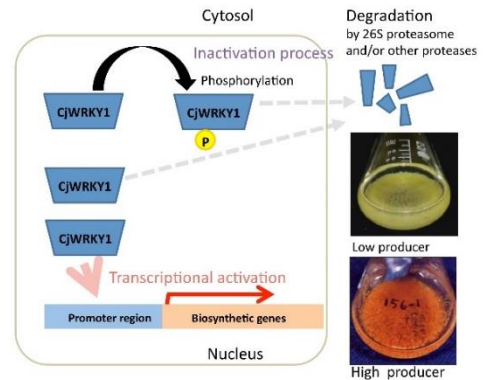


# 植物が有用物質生産を制限する仕組みとは

## —ベルベリン合成を制御する転写因子の働きを解明—

### 概要

植物は様々な有用な二次代謝産物を産生しますが、これらの需要は医薬品などで増大しており、生産性の向上が急務です。細胞培養法ならびに代謝工学<sup>1</sup>は生産能向上の有力な手法であり、特に、生合成系を制御する転写因子<sup>2</sup>の過剰発現による生合成系全体の活性化に大きな期待が寄せられています。一方、転写因子の効果は、期待されるほどではないということがよく知られていました。本研究では、有用医薬品であるベルベリンアルカロイドを産生するオウレン培養細胞系を用い、ベルベリン



ン生合成系を制御する転写因子 CjWRKY1 の活性がどのように制御されているかを解析しました。その結果、まず、アルカロイドの生合成活性と転写因子 CjWRKY1 の蓄積に良い相関があること、また、CjWRKY1 の転写活性化能に、CjWRKY1 の WRKY ドメインを構成するチロシンのリン酸化、核局在性と、プロテアゾーム系、並びに非プロテアゾーム系のタンパク質分解が関与していることが明らかになりました。このことは、従来、転写因子を人為的に過剰発現しても、その制御する生合成遺伝子の発現、さらには、アルカロイドの蓄積を引き起こせなかったことの原因の一部が判明できたといえます。現在、より多くの有用アルカロイドの生合成を誘導するための CjWRKY1 タンパク質の活性の向上を検討中です。

これらの成果は、2016年8月24日18時（日本時間）、Scientific Reports オンライン版 ([www.nature.com/articles/srep31988](http://www.nature.com/articles/srep31988)) に掲載されました。

<sup>1</sup> 代謝工学： 代謝系において反応を律速する酵素を多く発現させる、あるいは、反応系に新たな経路を付け加える、あるいは、反応系を遮断する、あるいは、生合成系全体を制御する転写因子の発現を制御するなどの改変により、目的とする化合物を大量に生産する、あるいは、新たに生産する技術。他種の遺伝子を組み合わせ、新たな代謝系や遺伝子発現制御系を構築する合成生物学とともに、物質生産性向上の有力な手法。

<sup>2</sup> 転写因子： 遺伝子の発現には、遺伝子（DNA）からタンパク質をコードする mRNA を合成する RNA ポリメラーゼの作用が必要ですが、その RNA ポリメラーゼが遺伝子のどこから転写を開始するのか、また、何時、どのような内的・外的刺激で転写を開始するのかは、それぞれの遺伝子に必要な転写因子と呼ばれるタンパク質により制御されています。二次代謝の発現には、ここで取り上げた WRKY 以外に bHLH や ERF など様々な転写因子が連携して mRNA の合成を制御しています。

## 1. 背景

植物が産生する様々な二次代謝産物の中でも、含窒素化合物であるアルカロイド<sup>3</sup>は、顕著な生理活性を示し、モルヒネやビンブラスチン等医薬品としても用いられるものが多く存在します。これらのアルカロイドの中で、チロシンから合成されるイソキノリンアルカロイドは、モルヒネの他に、ベルベリン等の有用医薬品を含むとともに、その構造の多様性が知られる化合物です。これらの化合物を経済的に調製するために、有機合成や、細胞培養法、また、最近の微生物による生産等、多くの試みがなされていますが、現状としては、栽培される、あるいは天然に自生する植物からの抽出によって、生産されています。

我々は、これまで、植物におけるこれら化合物の生合成系について解析を進め、多くの生合成系酵素遺伝子を単離するとともに、その生合成酵素遺伝子の発現を制御する転写因子の解析、さらには、代謝工学による物質生産を検討してきました。代謝工学的手法による物質生産においては、生合成酵素遺伝子の導入とともに、生合成系全体を制御する転写因子の過剰発現を用いた物質生産の向上が試みられてきています。全体の活性化において、転写因子の過剰発現に対する期待は高いですが、実際には、その活性化は不十分であり、生産性の向上は十分ではありませんでした。

今回、我々は、ベルベリンを産生するオウレン培養細胞を用い、何故、多くの場合、転写因子の過剰発現が有効ではなく、植物細胞における有用物質生産が制限されているのか、つまり、よりたくさん有用物質を作る細胞を得ることが困難なのかということの制御機構の一端を明らかにすることに成功しました。

## 2. 研究手法・成果

生合成遺伝子の発現制御には、転写因子と呼ばれるタンパク質が関与しています。転写因子である CjWRKY1 タンパク質が実際にどの程度蓄積しているかを、CjWRKY1 に対する特異的な抗体を作成し、CjWRKY1 の蓄積をアルカロイドの生産性の異なる 2 つの細胞株で比較してみました。その結果、ベルベリンを作るオウレン 156-S 細胞 (図 1 参照) では、CjWRKY1 がタンパク質として蓄積する一方、ベルベリンを作らない CjY 細胞では、CjWRKY1 の蓄積が起こらないことが明らかになりました (図 2 参照)。

このことから、CjWRKY1 の活性が転写後制御<sup>4</sup>されていることが明らかになりました。さらに、CjWRKY1 の転写後制御を調べるために、そのタンパク質の修飾を質量分析計、あるいは、リン酸化タンパク質を認識する抗体を用いて解析しました。その結果、CjWRKY1 の活性の調節に、CjWRKY1 のリン酸化 (図 3 参照) が明らかになり、リン酸化によって、通常は核に局在化しているタンパク質が細胞質に輸送されるとともに、DNA 結合性を低下させ、転写活性化能を失うことが明らかになりました。また、タンパク質の分解についても、プロテアゾーム阻害剤、あるいは、プロテアゾーム非依存型タンパク質分解酵素阻害剤を用いた阻害実験から、これら 2 つの独立したタンパク質分解系が CjWRKY タンパク質の分解 (図 4 参照) に

<sup>3</sup> アルカロイド: 窒素を含む一群の低分子有機化合物群、モルヒネやベルベリン、アトロピン、キニーネ、カフェイン、ニコチンなどの生理活性物質がふくまれ、有用医薬品としても利用されているものが多い。多くの場合、特有の植物種において、アミノ酸類から生合成される。

<sup>4</sup> 転写後制御: タンパク質 (ここでは、転写因子) の機能が発揮されるためには、mRNA の合成だけでは、不十分で、当然、活性のあるタンパク質としての蓄積が必要です。転写因子の場合には、その作用の場である核への局在や、標的遺伝子配列への結合・転写活性化能等が重要です。転写後制御には、リン酸化やタンパク質分解等、様々な制御が知られています

関与していることを明らかにしました。

このことは、従来、転写因子を人為的に過剰発現しても、なかなか、うまく下流の生合成遺伝子の発現、さらには、アルカロイドの蓄積の誘導を引き起こせなかったことのしくみの一部が判明できたといえます（図5参照）。

### 3. 波及効果、今後の予定

現在、どのようにすれば、CjWRKY1の安定性と活性を高め、より多くの有用アルカロイドを作ることができるようになるのか検討中です。また、WRKYタンパク質は、植物の二次代謝のみならず、植物防御応答にも関与することが知られていることから、WRKYタンパク質の安定性と活性の向上は、植物の有用物質生合成系の生産性向上のみならず、植物の防御応答の改善にも寄与することが期待されます。

### 4. 研究プロジェクトについて

本研究成果は、日本学術振興会科学研究費補助金〔基盤研究（S）（26221201）〕の支援を受けて行われました。

#### <論文タイトルと著者>

タイトル：Tyrosine phosphorylation and protein degradation control the transcriptional activity of WRKY involved in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis

著者：Yasuyuki Yamada（山田泰之）、Fumihiko Sato（佐藤文彦）

掲載誌：Scientific Reports (doi:10.1038/srep31988).

【参考図】

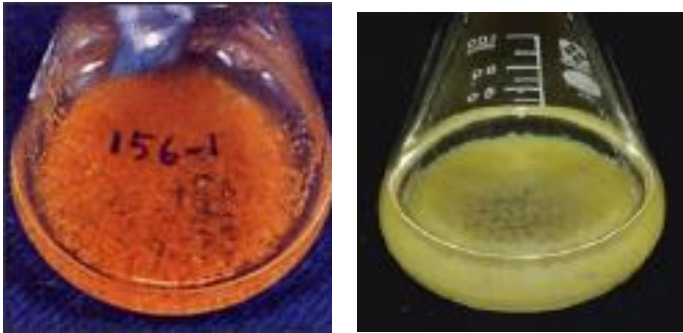


図1 ベルベリンを作るオウレン 156-S 細胞(左)、ほとんど作らない CjY 細胞(右)

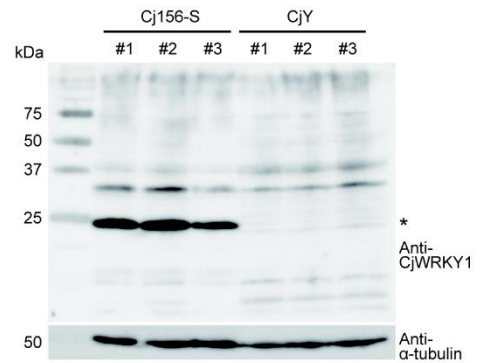


図2 ベルベリンアルカロイドを作るオウレン細胞 156-S では、\*で示す転写因子 WRKY1 タンパク質の蓄積が認められるが、作らない細胞 CjY では、その蓄積が検出されない。

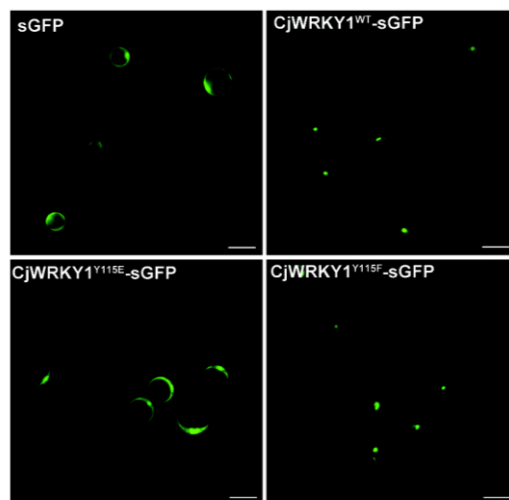


図3 オウレン細胞から回収した CjWRKY1 タンパク質において標的遺伝子との結合に必要な WRKY ドメインを構成するチロシン(Y)のリン酸化が認められた。このリン酸化を模倣したタンパク質(CjWRKY1 Y115E-sGFP)は、野生型 CjWRKY1WT-sGFP が示す核への局在を失うのみならず、転写活性化能も失われていた。

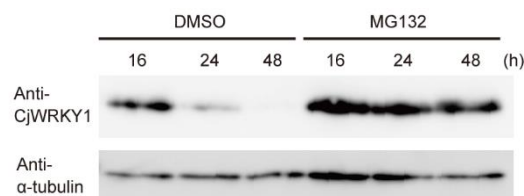


図4 CjWRKY1 は細胞中で活発に分解されていることが、プロテアソーム阻害剤である MG132 を添加することにより認められました。同様な効果は、非プロテアソーム型タンパク質分解酵素阻害剤の添加によっても認められ、複数の経路で、CjWRKY1 が分解されることが明らかとなりました。

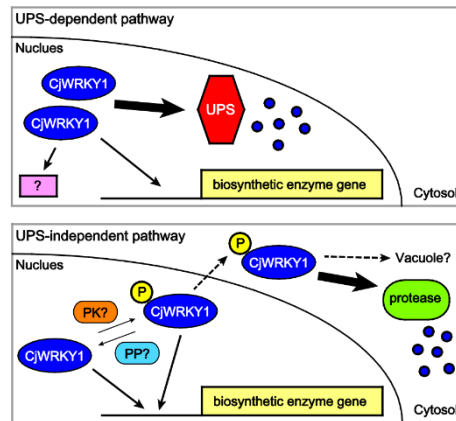


図5 本研究で解明された転写因子 CjWRKY1 の活性制御機構

CjWRKY1 は WRKY の活性ドメインであるチロシンのリン酸化により、その転写活性化能と核局在性を失うとともに、活発なプロテアゾーム系(UPS)あるいは、細胞質 (cytosol) あるいは、液胞(vacuole)におけるタンパク質分解酵素 (protease) によってタンパク質分解され、その活性を失うことが明らかになりました。