

薬用植物の統合オミクスによるアルカロイド生合成メカニズムの分子進化解明  
Integrative omics approaches for understanding of molecular evolution of  
plant alkaloid biosynthesis

山崎真巳

千葉大学大学院薬学研究院

Mami Yamazaki

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

人類は、有史以前より植物を「くすり」として生活の中で利用してきた。これは植物体内で生産される化合物（代謝物）の化学多様性とその生理活性の多様性を利用したものである。代謝物の多様性は、植物に共通な一次代謝（中心代謝）から派生して種や系統に特異的に現れる二次代謝（特異代謝、特化代謝）の多様性によってもたらされる。演者は、これらの二次代謝の多様性のしくみとそれらがどのように出現したか、その分子進化の過程を解明したいと考えた。研究対象の二次代謝という生命現象の多様性は、言い換えれば生物の複雑性でもあり、これらを理解するためには2000年以降に発展した統合オミクス科学がたいへん有効であった。また近年シークエンスの技術が飛躍的に進歩し、多くの植物種のゲノム情報が利用できるようになって二次代謝の分子進化の過程を推定することが可能になった。本講演では、植物科学全般の潮流の中での自身の研究の軌跡について述べたい。

1. 成分変種に特異的に発現する遺伝子の探索と機能解析

1990年頃には植物分野にも分子クローニングと遺伝子エンジニアリング等の分子生物学が展開されていたが、1992年にScience誌に発表されたディファレンシャルディスプレイ(DD)法[1]は特に興味をひいた。DD法は特定の条件下で特異的に発現するmRNAをランダムにPCR増幅して単離する技術で予備的な遺伝子情報がなくても特異的な断片を得ることが可能で未知の遺伝子を単離できるかもしれない。これを同一種でありながらアントシアニン含有の異なる成分変種であるアカジソとアオジソに適用し、アカジソ特異的に発現するアントシアニン5-O-グルコシル転移酵素を同定した[2]。さらにアントシアニン合成酵素の触媒機能[3]や酵素遺伝子の発現を制御する転写調節因子による制御[4, 5]を明らかにした。これらは後にモデル植物シロイヌナズナのアントシアニン過剰生産株 *pap1-D* におけるメタボロームとトランスクリプトームの統合解析からの触媒酵素遺伝子の推定[6]につながる。

2. 代謝分岐点の触媒酵素の分子進化とアルカロイド生産

次に分子内に窒素原子を含むアルカロイドの生合成を研究ターゲットとすることにした。キノリチジンアルカロイドは、アミン酸のリジンを生合成前駆体とすることがわかっていたが生合成に関わる触媒酵素等は不明であった。そこでホソバルピナスのアルカロイドを生産する“ビター品種”とほぼ生産しない“スイート品

種”を用いて、ビター品種特異的に発現する遺伝子をプロファイリングすると、オルニチン脱炭酸酵素(ODC)ホモログ遺伝子がビター品種特異的に発現していた。この脱炭酸酵素はオルニチンに加えてリジンをも脱炭酸する活性を有する二機能性酵素(L/ODC)であることが明らかになった [7]。キノリチジンアルカロイド生産種の酵素ではホソバルピナスの酵素の 344 番目の残基が Phe あるいは Tyr であり、これが酵素の二機能性に関与することが示された。さらにこれらのアミノ酸残基はアルカロイド生産種において正の選択圧を受けて分子進化したことが推定された [8]。さらにアルカロイドを生産しないシロイヌナズナを宿主としてホソバルピナス由来の L/ODC 遺伝子を導入発現させると  $\delta$ -バレロラクタムおよびペレチエリンなどリジン由来の単純なアルカロイドが生産され、L/ODC による代謝拡張が可能であることが示されアルカロイド生合成の分子進化が再現された [9]。

### 3. アルカロイド生産と自己耐性機構の平行進化と収斂進化

分子内に窒素原子を含むアルカロイドは著しい生理活性あるいは毒性を示すものが多く、これは医薬品資源として重要な点であるが、生産者の植物はどのようにして自身の有毒物質に耐えているのだろうか。この疑問に対してトポイソメラーゼ I を強力に阻害して強い細胞毒性を示すカンプトテシンを対象として研究を行った。はじめは細胞外への排出を担う輸送体があるのだろうと探索を行ったが、見つからず、カンプトテシンの標的タンパクであるトポイソメラーゼ I を調べることになった。カンプトテシンを生産する植物種キジュ、クサミズキ、チャボイナモリおよびリュウキュウイナモリのトポイソメラーゼ I にはカンプトテシン結合に関わるアミノ酸残基に共通の変異がみられ、カンプトテシン生合成は自己耐性機構と平行進化し複数の種の間で収斂進化したことを明らかになった [10]。

### 4. チャボイナモリをアルカロイド生合成のモデル植物に

前述のカンプトテシンは、ヌマミズキ科のキジュ、クロタキカズラ科のクサミズキ、アカネ科のチャボイナモリおよびリュウキュウイナモリ等の種が生産することが知られている。このうちチャボイナモリは日本産の小型草本で実験に使いやすく *Agrobacterium* を介した形質転換が可能で毛状根はカンプトテシンをよく生産する。この毛状根におけるトランスクリプトームと代謝物プロファイリングを行い、カンプトテシン生合成遺伝子の探索を行った [11]。さらに、染色体レベルのゲノム情報を得ることに成功した [12]。このゲノム情報を基盤として高精度のトランスクリプトームとメタボロームの統合解析、遺伝子クラスター解析ならびに MIA 生産植物・非生産植物との間での比較ゲノム解析を行うことによりカンプトテシン生合成遺伝子を推定した。生合成遺伝子候補のゲノム編集による機能解析をすすめている。

### 5. 薬用植物のトランスクリプトームとメタボロームの統合解析

この間に身近になったオミクス解析を薬用植物に応用展開した。ゲノム情報のない約 40 種の薬用植物について *de novo* トランスクリプトーム解析を行い、その結果をメタボロームデータと合わせて統合解析した。その結果、センブリ [13]、ス

イカズラ [14]、トリカブト [15]、レンギョウ [16]、セイヨウムラサキ [17]、サンシュユ [18] およびアカメガシワ [19] 等の薬用植物種についてはそれぞれの薬用二次代謝物の蓄積パターンと相関して発現する遺伝子群をプロファイルした有用物質生産に関与する遺伝子を推定することができた。また津川らとの共同研究により安定同位体標識を用いた精密メタボローム解析の方法論とデータベースを開発した [20]。

以上のように、薬用資源植物を研究対象として二次代謝の分子機構解明と分子進化の推定を行ってきた。これらの知見は、将来、植物代謝工学、合成生物学などに応用展開されることにより植物バイオテクノロジー分野の学術的発展に大きく貢献し植物の持続可能な利用につながると期待される。

最後に、本研究は、故村越勇先生ならびに齊藤和季先生のご指導を受けて始めたものであり、また多くの方々との共同研究によって成果を得たものです。ここに心より感謝いたします。

#### [参考文献]

1. Liang P and Pardee AB. *Science*. 1992 Aug 14;257(5072):967-71.
2. Yamazaki M, et al., *J. Biol. Chem.*, 274, 7405-7411 (1999)
3. Saito K, et al., *Plant J.*, 17, 181-190 (1999)
4. Yamazaki M, et al., *Phytochemistry*, 62, 987-995 (2003)
5. Yamazaki M, et al., *FEBS J.*, 275, 3494-3502 (2008)
6. Tohge T, et al., *Plant J.*, 42, 218-235 (2005)
7. Bunsupa S, et al., *Plant Cell*, 24, 1202-1216 (2012)
8. Bunsupa S, et al., *Plant Physiology*, 171, 2432-2444 (2016)
9. Shimizu Y, et al., *Plant J.*, 100, 505-521 (2019)
10. Sirikantaramas S et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 105, 6782-6786 (2008)
11. Yamazaki M, et al., *Plant Cell Physiol.*, 54, 686-696 (2013)
12. Rai A, et al., *Nature Commun.* 12, 405 - 405 (2021)
13. Rai A, et al., *Plant Cell Rep.*, 35, 2091-111 (2016)
14. Rai A, et al., *J. Nat. Med.*, 71, 1-15 (2017)
15. Rai M, et al., *Molecules*, 22, 2155 (2017)
16. Sun L, et al., *J. Nat. Med.*, 72, 867-881 (2018)
17. Rai A, et al., *Planta Med.*, 84, 920-934 (2018)
18. Rai A, et al., *DNA Research*, 27, 1-15 (2020)
19. Rai M, et al., *Int J Mol Sci.* 22, 8835 (2021)
20. Tsugawa H, et al., *Nature Methods*, 16, 295-298 (2019)