植物アルカロイド生合成の調節機構と代謝工学†

橋本 隆, 山田 康之

(奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科)

Key words: alkaloids; nicotine; scopolamine; regulation; metabolic engineering

1. はじめに

高等植物は 10 万種以上の二次代謝産物を蓄積し、われわれは古来より毒、薬、染料、香辛料、嗜好品などとして利用している。分離・分析技術が進歩し、多種多様な植物種が調査されるとともに、同定される二次代謝産物の種類は今後も増え続けると予想される。これらの二次代謝産物は限られた植物種に限られた化合物が蓄積し、それら化合物の生合成経路も非常に変化に富んでいる。したがって、二次代謝を総論的に扱うのは困難である一方、代謝経路の進化、植物にとっての二次代謝の役割、代謝経路の制御など、いくつかの点で少なからぬ二次代謝産物に類似する事柄が明らかになりつつある。本ミニレビューでは筆者らが研究している 2 種類のアルカロイド生合成に関して、生合成の制御と経路の分子進化を概説し、有用アルカロイドの代謝工学に向けたアプローチを紹介する。

2. 生合成経路と構造遺伝子

アルカロイドは塩基性窒素を含有する化合物の総称であり、テルペン類について 2 番目に種類が多い (12,000 種以上の構造が知られている)。アルカロイドには動物の神経系に作用する化合物が多く、漢方薬のみならず西洋医薬にも植物由来のアルカロイドが多く含有される。ここでは、ニコチンとスコポラミンを取り上げる。

対称ジアミンであるブトレッシンはアルギニンまたはオルニチンに由来し、すべての生物でより高次のポリアミンへと代謝されるが、数種の植物では種々のア

ルカロイドへと代謝が分岐する。タバコ属ではニコチンがブトレッシンから派生し、他の数種のナス科薬草では薬理作用の強いヒヨスチアミンやスコポラミンなどのトロパンアルカロイドが合成される⁽¹⁾ (図 1)。これらアルカロイド生合成経路の数種の酵素遺伝子をクローニングし、そのアミノ酸配列を決定したところ、これら生合成酵素は一般の植物がもつ (一次) 代謝酵素から分子進化したものと推察された (表)。

また、トロパン経路の分岐点に位置し互いに逆の立

図 1 ニコチンとスコポラミンの生合成経路

PMT, putrescine N-methyltransferase; TR-I, tropine-forming tropinone reductase; TR-II, pseudotropine-forming tropinone reductase; H6H, hyoscyamine 6β-hydroxylase.

† Regulatory Mechanisms and Metabolic Engineering of Plant Alkaloid Biosynthesis
Takashi HASHIMOTO and Yasuyuki YAMADA (Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology)

表 クローニングされたニコチン・トロパンアルカロイド経路の遺伝子

酵素名	植物	アミノ酸配列ホモロジー	文献
Putrescine <i>N</i> -methyltransferase	タバコ, ペラドンナ	Spermidine synthase	7, 13
Tropinone reductase	ヒヨス, ダツラ	短鎖型脱水素・還元酵素ファミリー	17
Hyoscyamine 6 β -hydroxylase	ヒヨス, ペラドンナ	α -ケトグルタル酸依存型酸素添加酵素ファミリー	8, 18
A622*	タバコ	還元酵素のサブファミリー	13

* ニコチン生合成に関与すると推測されるが機能は不明

体配置をもつアルコールを生成する一対の還元酵素 (TR-I と TR-II) をキメラ酵素作製⁽²⁾, X線構造解析⁽³⁾, 点突然変異導入⁽⁴⁾により詳細に解析したところ, 両酵素はほとんど同じ立体構造をとり, 基質結合ドメインの五つのアミノ酸残基を両酵素間で交換すると, 反応の立体特異性がほぼ完全に逆転することが明らかとなった. このことから, いくつかのアミノ酸変異が蓄積すると新しい反応を触媒する酵素が分子進化することが理解できる.

3. 生合成細胞

スコポラミン生合成経路の二つの酵素遺伝子 (PMT と H6H; 図 1 参照) は若い根の導管に隣接する内鞘細胞で特異的に発現しており, 根で合成されたトロパンアルカロイドが導管を通過して地上部へと転流するのを助けている⁽⁵⁻⁸⁾. しかし, 経路の中間体トロピンを合成する酵素遺伝子 (TR-I) は内鞘細胞ではなく, それを取り囲む内皮細胞や皮層細胞で発現している⁽⁹⁾. このことは, 経路の中間体が根の異なる細胞層間で移動する可能性を示唆している. 同様に生合成経路がある組織の複数の異なる細胞層に分断されて局在することがインドール系アルカロイドでも報告されており⁽¹⁰⁾, 中間産物の細胞間移動という現象は案外多くの生合成系で起こっているのかもしれない. この可能性は, ある生合成経路の少数の酵素の細胞局在を調べただけでは, 経路全体の制御を理解するには不十分であることを警告している.

一方, ニコチン生合成酵素遺伝子 PMT は根端組織では内皮のみで特異的に発現しており, 分化した根では根全体で発現しているものの木部, 皮層, 最外層の内皮で発現していた⁽¹¹⁾. この分化に伴う生合成細胞の変化は, 内皮最外層のスペリン層 (exoderm) の分化と対応していた. 根端では細胞間隙 (apoplast) を通した物質の移動を妨げるスペリン層が発達していないの

で, 根端で合成されたニコチンは根から分泌され, 根圏土壤へと放出されると考えられる. 一方, スペリン層が発達した根の分化組織で合成されたニコチンは根の中心柱へと向かい, 木部から地上部へと転流されるのかもしれない. 根を液体培養すると, トロパンアルカロイドに比べニコチンは培地中に分泌されやすいことが知られている.

4. 発現制御

生合成植物にとってアルカロイドが虫害に対する植物の防御反応の一端を担っていることがいくつかの例で知られるようになった. 例えば, ニコチンはアブラムシ・毛虫などに対して殺虫作用があり, 虫による葉の傷害が根でニコチン生合成遺伝子群を活性化させ, 根で合成されたニコチンが葉に運ばれて殺虫作用を発揮するものと考えられる. なぜ, 根で合成し, 葉に運ぶ必要があるのか合理的な解釈ができていない. タバコの祖先がニコチン生合成能を獲得したときには, 根を土壤中の害虫から防除することが大切だったのかもしれない. 現在のタバコにおいても根の防御が重要であるかどうかは, 代謝工学により葉でのみニコチンを作り出すタバコを作出すれば判明するかもしれない.

葉での虫害が根での遺伝子活性化をもたらすには, 傷害シグナルが地上部から根へと移動する必要がある. このシグナルは植物の傷害ホルモンのジャスモン酸である可能性がある. ニコチン生合成遺伝子 (PMT など) は通常のタバコの根である程度発現しているが, タバコの葉または根をジャスモン酸で処理すると, 発現レベルが 3~4 倍上昇する⁽¹¹⁾. このジャスモン酸による遺伝子誘導は別の植物ホルモンであるエチレンでタバコを同時に処理すると見られなくなることから, エチレンがジャスモン酸のシグナル伝達系に阻害的に働いている⁽¹²⁾ (図 2).

タバコには低ニコチン系統が知られており, 低ニコ

図2 虫害に対するニコチン生成の発現制御モデル

タバコ品種の育種母体と知られ利用されている。元来は1920年代にドイツで発見された低ニコチン葉巻系統がアメリカでシガレット品種に戻し交雑したものであり、われわれが *NIC1*, *NIC2* と呼ぶ二つの独立した遺伝子座の2重変異をもつ *nic* 変異をもつタバコでは複数のニコチン生成遺伝子の発現が顕著に低下している以外には形態などに野生型と比べて違いが見られないことから、*NIC* はニコチン経路特異的に作用する制御遺伝子であると推測される⁽¹³⁾。ジャスモン酸誘導性の多くのタバコ遺伝子のうち、ニコチン生成に関連する遺伝子のみが *NIC* 制御下にあることから、ジャスモン酸シグナル伝達系が分岐して *NIC* 遺伝子に働くモデルと、ニコチン生成遺伝子の発現には *NIC* とジャスモン酸シグナルの両方が必要であるモデルが考えられる。ニコチン生成遺伝子のプロモーター領域を詳細に調べることでこれら二つのモデルを検証することができる。現在、*NIC* 遺伝子のクローニングを目指して研究を推進しているところである。

5. 代謝工学

筆者らはクローニングしたアルカロイド生成遺伝子を植物で強制発現させたり、発現抑制させることにより、アルカロイド代謝の改変を試みている。ヒオスチアミンからスコポラミンへの2段階の酸化反応を触媒する2機能性酵素 H6H⁽¹⁴⁾ を薬用植物ベラドンナで強制発現させた⁽¹⁵⁾。野生型ベラドンナでは側根のみで弱い H6H 活性が認められ、ヒオスチアミンを主ア

ルカロイドとして蓄積する。H6H 遺伝子を構成的な発現をする CaMV 35S プロモーターを用いて全草で高レベル発現させると、地上部のヒオスチアミンはスコポラミンにはほぼ100%変換されていた。根での変換効率は20~60%であるので、根から葉へアルカロイドが転流する間にスコポラミンへの変換が進むのであろう。スコポラミンはヒオスチアミンより市場価値が高いため、代謝工学により有用アルカロイドを効率的に生産する薬用植物を分子育種することに成功した。このスコポラミン型ベラドンナの子孫は野外試験でも同じ形質を保持しており、さらに耐虫性が有意に向上していた(シカゴ大 J. Bergelson 教授との共同研究)。スコポラミンにも防虫作用があるのかもしれない。

一方、スコポラミン経路の初発酵素である PMT を同様に強制発現させたベラドンナを作出したが、*N*-methylputrescine 含量が増大したのみで、他のアルカロイドの蓄積にはほとんど影響を与えなかった⁽¹⁶⁾。おそらく、スコポラミン生成経路には数多くの律速となる反応段階が存在するのであろう。これに対し、比較的経路が短いニコチン生成では PMT を強制発現させたタバコでニコチン含量が有意に増大した⁽¹⁶⁾。

遺伝子工学的手法を用い代謝経路を特定の反応でストップさせ、特定の代謝産物の含量を低下させることは原理的には簡単である。ただし、複数の経路が分岐している場合、ある経路を遮断すると他の関連した経路に影響を与えることがある。例えば、PMT をアンチセンス法により発現抑制したタバコではニコチン含量は野生株の2%にまで激減していたが、プトレッシンやスペルミジンの含量が増大した⁽¹⁶⁾。ニコチン経路の初発反応をストップさせたために、PMT の基質であるプトレッシンが蓄積し、一部ポリアミン経路へと代謝されたものと考えられる。この低ニコチンタバコ系統では連続した2枚の葉が根元でつながりシート状になったり、花粉の稔性が低下したりするといった異常が観察され、ポリアミンの蓄積との関連が疑われる。

6. おわりに

近年、植物二次代謝の酵素遺伝子が次々とクローニングされるようになった。今後、生成酵素遺伝子を強制発現させたり、発現抑制させた植物における二次代謝の変動が多く報告されるようになるであろう。われわれが世界に先駆けて H6H 強制発現ベラドンナで

示したように、直接の酵素反応生成物が付加価値の高い化合物であれば代謝工学は成功する可能性が高い。しかし、上記 PMT の例のように代謝経路の一部を補強することにより経路の最終産物の生産性を向上させるのは困難と予想される。これは、二次代謝においてはほとんどすべての反応が律速となっていると考えられるからである。

これを解決するには二つの方策がある。一つ目は複数の、あるいは経路すべての酵素遺伝子を用いて代謝工学を行うことである。経路を再構築する場合には植物を用いる必要はなく、大腸菌などで植物の有用二次代謝産物を合成できるようになるかもしれない。二つ目は生合成経路特異的な制御遺伝子を利用することである。このような特異的制御遺伝子は植物ではフラボノイド系を除いてほとんど知られていないが、タバコの *NIC* 遺伝子のようにその存在は多くの二次代謝経路で予想される。制御遺伝子を本来発現している組織と異なる場所で発現させることにより、目的産物を生合成する細胞数を増大させ、植物が蓄積する有用産物の含量を増大させる方法である。

生合成酵素遺伝子と制御遺伝子のクローニングが進展するに伴って代謝調節機構の理解も深まり、植物二次代謝工学の新しいアイデアが生まれ、成功例も増えていくに違いない。

- (1) T. Hashimoto and Y. Yamada: *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **45**, 257-285 (1994).
- (2) K. Nakajima, T. Hashimoto, and Y. Yamada: *J. Biol. Chem.*, **269**, 11695-11698 (1994).
- (3) K. Nakajima, A. Yamashita, H. Akama, T. Nakatsu, H. Kato, T. Hashimoto, J. Oda, and Y. Yamada: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 4876-

- 4881 (1998).
- (4) K. Nakajima, H. Kato, J. Oda, Y. Yamada, and T. Hashimoto: *J. Biol. Chem.*, **274**, 16563-16568 (1999).
- (5) T. Hashimoto, A. Hayashi, Y. Amano, J. Kohno, H. Iwanari, S. Usuda, and Y. Yamada: *J. Biol. Chem.*, **266**, 4648-4653 (1991).
- (6) T. Kanegae, H. Kajiya, Y. Amano, T. Hashimoto, and Y. Yamada: *Plant Physiol.*, **105**, 483-490 (1994).
- (7) K. Suzuki, Y. Yamada, and T. Hashimoto: *Plant Cell Physiol.*, **40**, 289-297 (1999).
- (8) K. Suzuki, D.-J. Yun, X.-Y. Chen, Y. Yamada, and T. Hashimoto: *Plant Mol. Biol.*, **40**, 141-152 (1999).
- (9) K. Nakajima and T. Hashimoto: *Plant Cell Physiol.*, **40**, 1099-1107 (1999).
- (10) B. St-Pierre, F. A. Vazquez-Flota, and V. De Luca: *Plant Cell*, **11**, 887-900 (1999).
- (11) T. Shoji, Y. Yamada, and T. Hashimoto: *Plant Cell Physiol.*, **41**, 831-839 (2000).
- (12) T. Shoji, K. Nakajima, and T. Hashimoto: *Plant Cell Physiol.*, **41**, 1072-1076 (2000).
- (13) N. Hibi, S. Higashiguchi, T. Hashimoto, and Y. Yamada: *Plant Cell*, **6**, 723-735 (1994).
- (14) T. Hashimoto, J. Matsuda, and Y. Yamada: *FEBS Lett.*, **329**, 35-39 (1993).
- (15) D.-J. Yun, T. Hashimoto, and Y. Yamada: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 11799-11803 (1992).
- (16) F. Sato, T. Hashimoto, A. Hachiya, K. Tamura, K. Choi, T. Morishige, H. Fujimoto, and Y. Yamada: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 367-372 (2001).
- (17) K. Nakajima, T. Hashimoto, and Y. Yamada: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 9591-9595 (1993).
- (18) J. Matsuda, S. Okabe, T. Hashimoto, and Y. Yamada: *J. Biol. Chem.*, **266**, 9460-9464 (1991).