

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 189

氏名 山本若太郎

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： Norwich （国名： イギリス ）2. 研究課題名（和文） ニチニチソウ異形細胞における組織・器官別代謝分化の解析3. 派遣期間： 平成 29 年 6 月 14 日 ~ 令和 元年 6 月 13 日

4. 受入機関名及び部局名

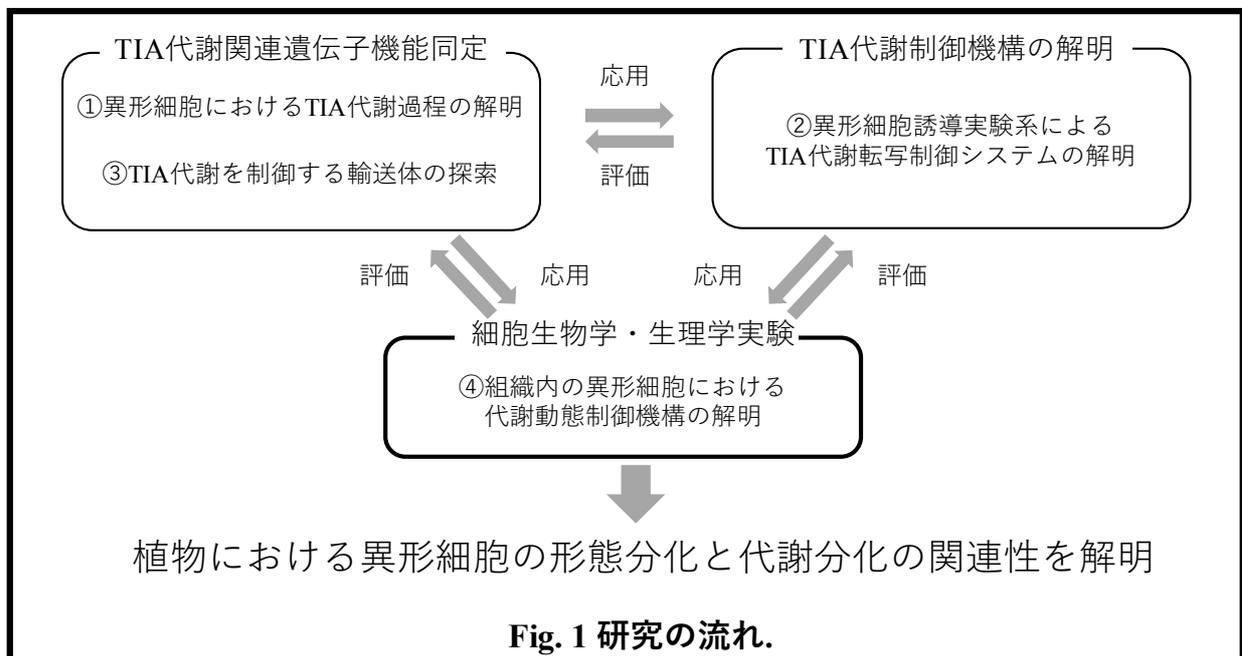
John Innes Centre, Norwich Research Park5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

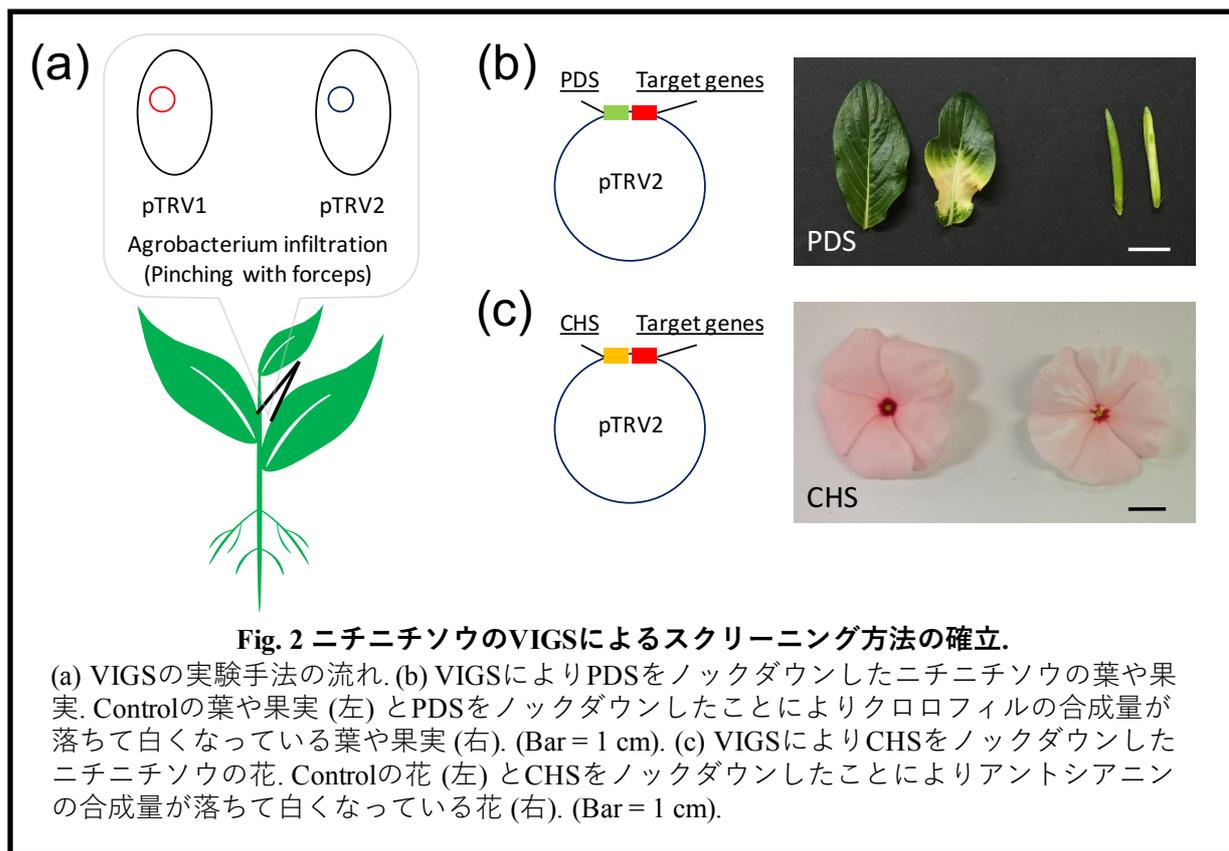
<研究目的>

本研究は、ニチニチソウ異形細胞における Terpenoid Indole Alkaloid (TIA) 代謝機構の理解から、植物における乳管細胞 (Laticifer cell) を含む異形細胞 (Idioblast cell) の形態分化と代謝分化の関連性を解明することを目指すものである (Fig. 1)。



『①異形細胞における TIA 代謝過程の解明』、『②異形細胞誘導実験系による TIA 代謝転写制御システムの解明』を行う。さらに、『③TIA 代謝を制御する輸送体の探索』にも挑戦し、『④組織内の異形細胞における代謝動態制御機構の解明』に繋げる。

はじめに、①、②、③、④の研究計画で用いる *in vivo* での遺伝子のスクリーニング方法の確立を行った。既存のニチニチソウで行われている Virus-induced gene silencing (VIGS) のベクターを用いて、目的遺伝子の発現がノックダウンされている部位がわかるようにするために、pTRV2 ベクターにマーカー遺伝子 (PDS : Phytoene desaturase, CHS: Chalcone synthase) の配列を組み込んだ新規ベクターを作成した (Fig. 2)。



今回作成した新規ベクターを用いて、ニチニチソウの異形細胞で行われている TIA 代謝や異形細胞の分化に関わる遺伝子を *in vivo* でスクリーニング、機能解析を行った。

①異形細胞における TIA 代謝過程の解明

これまで、ニチニチソウ組織毎でアルカロイドの代謝が異なることを明らかにしてきた (Fig. 3a)。さらに、ニチニチソウ茎組織と葉原基・葉組織の異形細胞では、異なる TIA を蓄積することも明らかにした (Fig. 3b-d, Yamamoto et al., 2016 and Yamamoto et al., 2019)。すなわち、同じ異形細胞でも組織毎に異なる代謝分化が生じていると考えられる。

ニチニチソウは、組織別トランスクリプトームデータや一部ドラフトゲノムデータを使用できる植物である。これらの既存のデータや今回の海外特別研究員のプロジェクトで新たに取得した RNA-seq データを用いて、クラスター解析や Self-Organizing Maps (SOM) 解析をすることによって、ニチニチソウの TIA 生合成関連遺伝子と共発現している新規合成酵素の候補を取得した (Fig. 4)。

これまで Cytochrome P450 や Alcohol dehydrogenase などの酵素が、ニチニチソウの TIA 生合成に関与することが報告されている (Caputi et al., 2018)。この TIA 生合成に関わる可能性が高い酵素遺伝子に着目し、候補遺伝子を選別した。組換え大腸菌に発現させた酵素を精製して行う *in vitro* でのスクリーニング法とともに、VIGS による *in vivo* でのスクリーニング法にも試みた。その結果、VIGS

によるスクリーニング法により直接 TIA の生合成に影響を与えている酵素遺伝子を同定した (Fig. 5)。Alstonine synthase (AS) ホモログをノックダウンした植物体では Ajmalicine を蓄積することが明らかになり、この酵素は Ajmalicine からの代謝を制御していると考えられる。現在、*in vitro* の解析も含め、この酵素の機能解析を進めている。

今後、海外特別研究員のプロジェクトで取得したオミクスデータを用いて、さらなる遺伝子のスクリーニングを進め、ニチニチソウの TIA 生合成に関与する遺伝子を同定していく予定である。

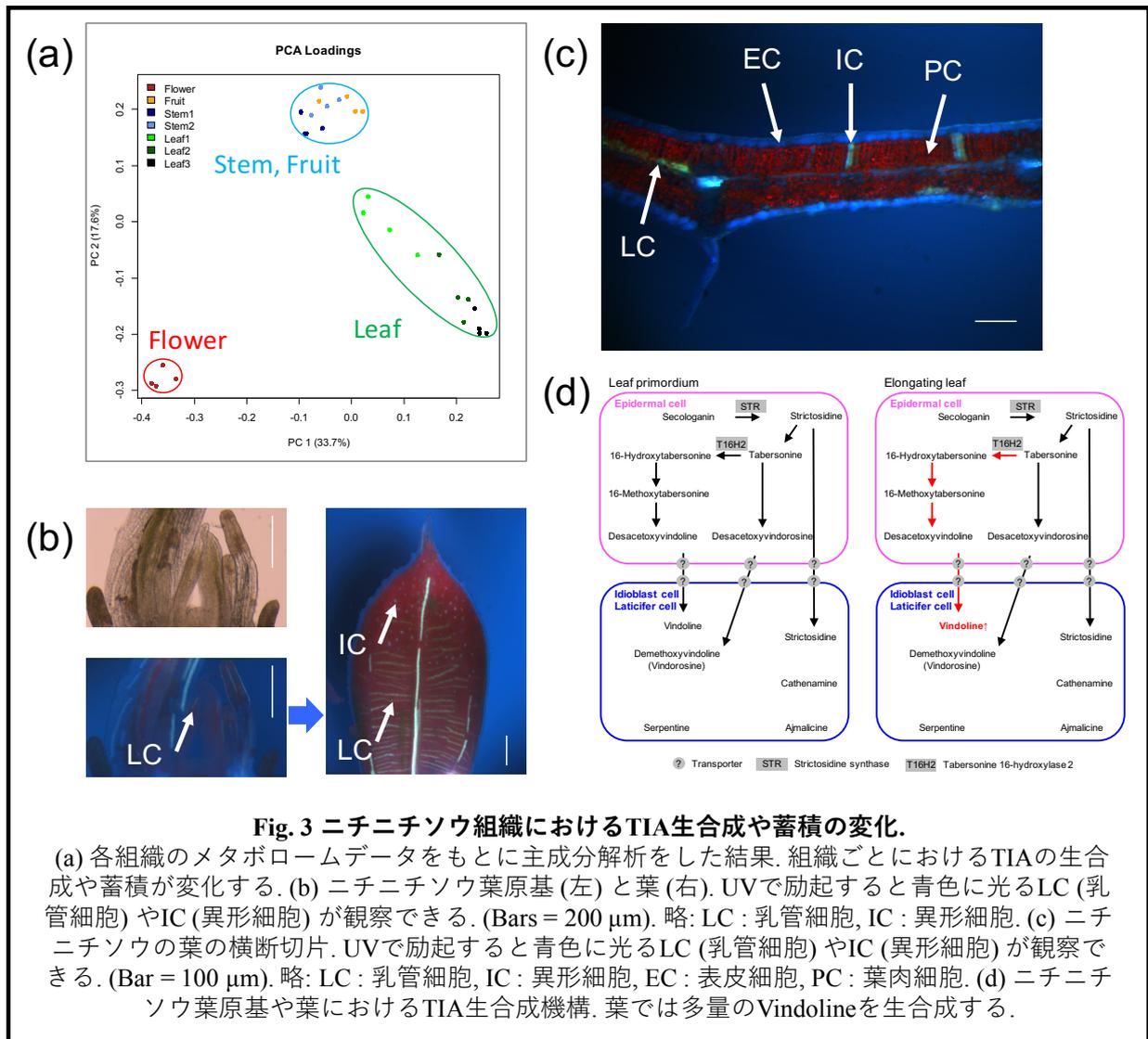
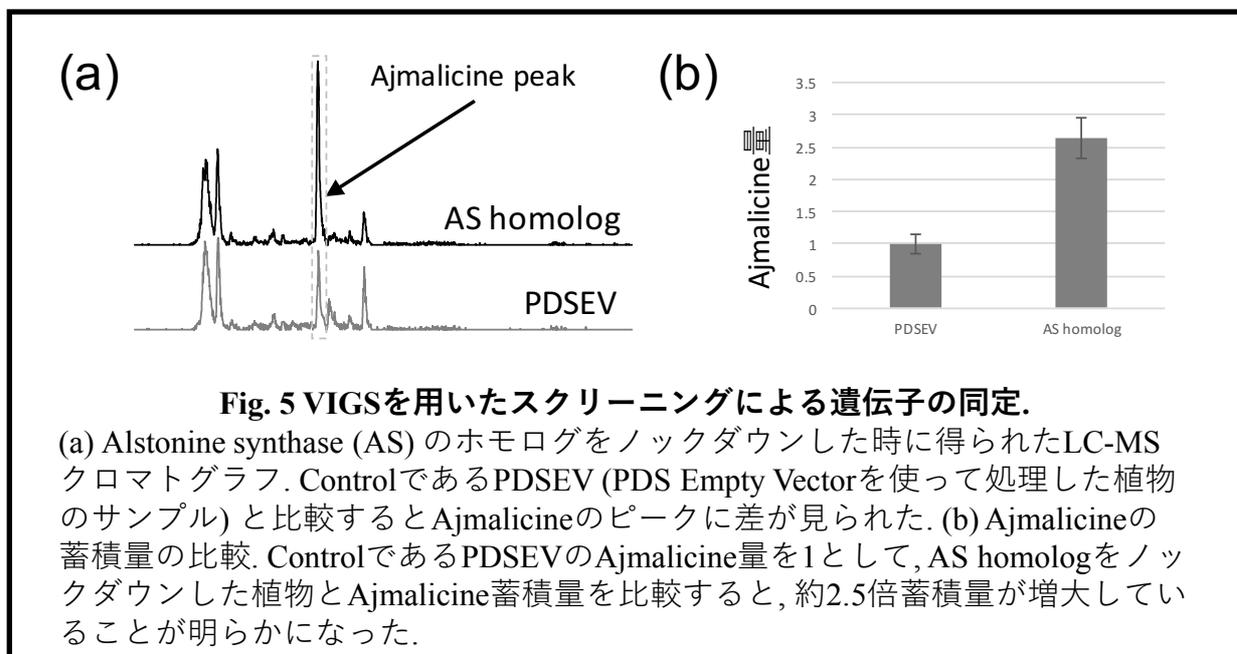
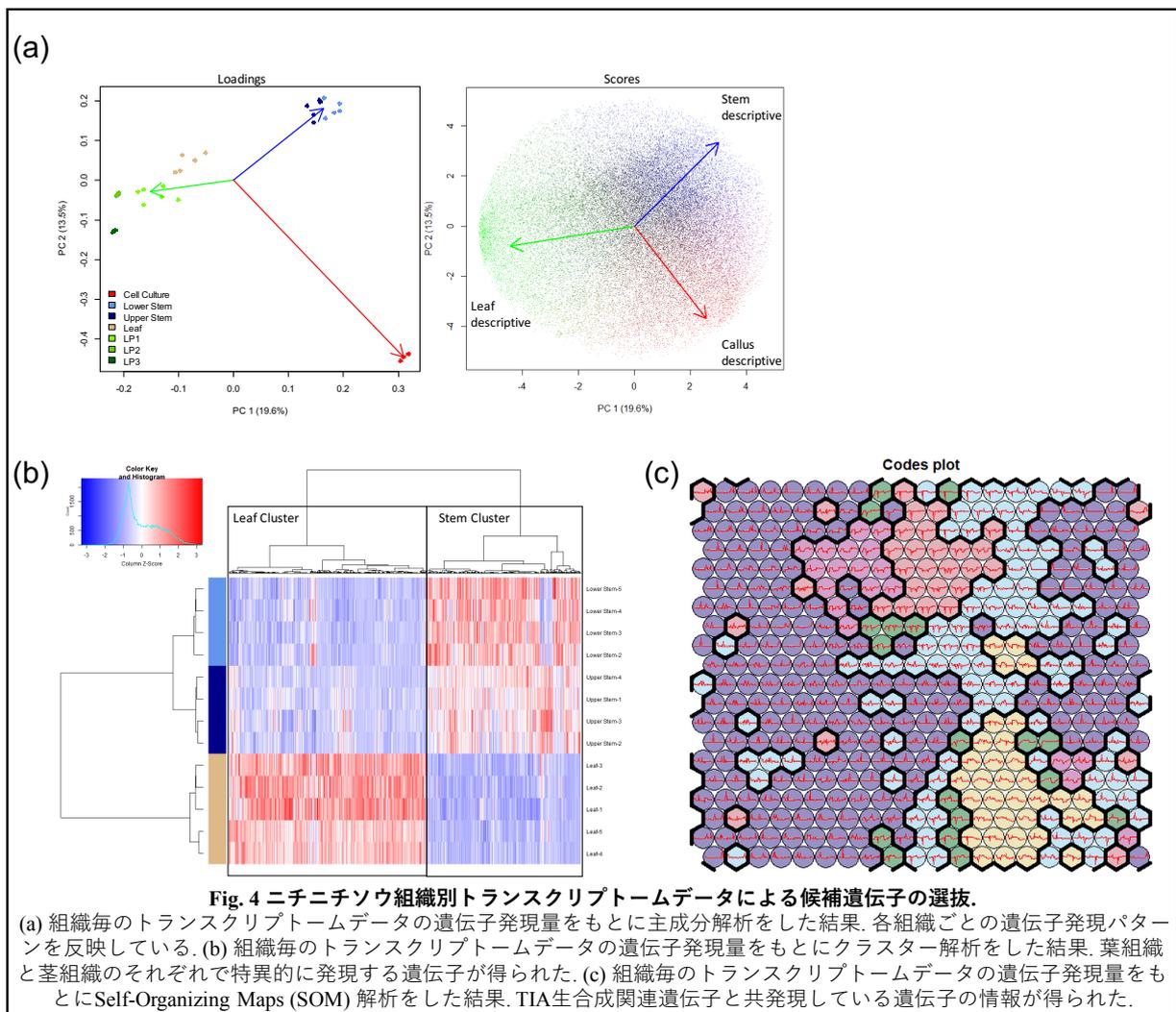


Fig. 3 ニチニチソウ組織におけるTIA生合成や蓄積の変化.

(a) 各組織のメタボロームデータをもとに主成分解析をした結果、組織ごとにおけるTIAの生合成や蓄積が変化する。(b) ニチニチソウ葉原基(左)と葉(右)。UVで励起すると青色に光るLC(乳管細胞)やIC(異形細胞)が観察できる。(Bars = 200 μm)。略: LC: 乳管細胞, IC: 異形細胞。(c) ニチニチソウの葉の横断切片。UVで励起すると青色に光るLC(乳管細胞)やIC(異形細胞)が観察できる。(Bar = 100 μm)。略: LC: 乳管細胞, IC: 異形細胞, EC: 表皮細胞, PC: 葉肉細胞。(d) ニチニチソウ葉原基や葉におけるTIA生合成機構。葉では多量のVindolineを生合成する。



② 異形細胞誘導実験系による TIA 代謝転写制御システムの解明

これまで ERF や bHLH などの転写因子が、アルカロイドやイリドイドの生合成に関与していることが報告されている (Van Der Fits et al., 2000, Van Moerkercke et al., 2015)。現在、Self-Organizing Maps 解析によって、TIA 合成酵素遺伝子と共発現している転写因子についても、候補遺伝子を選抜し、VIGS によるスクリーニングを行っている (Fig. 2-4)。現在、様々な転写因子の Gene silencing を行っているが、TIA の生合成や異形細胞の形態形成に影響を与えている遺伝子は同定できていない。

今後、さらなる遺伝子のスクリーニングが必要になると考えられる。

③TIA 代謝を制御する輸送体の探索

RNA-Seq のデータを元に TIA 輸送体の探索も行っている。①、②の研究計画同様、RNA-Seq のデータを利用した **Self-Organizing Maps** 等の解析を通して、候補遺伝子を得た。現在、様々な輸送体の **Gene silencing** を行っているが、TIA の輸送に正確に影響を与えている遺伝子は同定できていない。今後、さらなる遺伝子のスクリーニングが必要になると考えられる。

④組織内の異形細胞における代謝動態制御機構の解明

TIA 合成酵素のホモログの探索を行うために、これまで同定されているニチニチソウ TIA 合成酵素やそのホモログを VIGS によりノックダウンすることにより、**in vivo** での TIA 生合成の制御機構の詳細を調べた。その結果、**AS** ホモログのような酵素遺伝子を見つけることにも成功している (Fig. 5)。現在は、ノックダウンの実験系を用いて、**in vivo** での遺伝子の機能解析を行っているが、さらなる機能の詳細を **in vivo** で調べるために、ニチニチソウでの過剰発現系の検討や安定的な形質転換のための実験系の開発にも試みた。今後、これらの分子生物学的技術をニチニチソウに応用することにより、植物体内での TIA 生合成機構の解明に迫りたいと考えている。

今回の海外特別研究員のプロジェクトでは、TIA を生合成する植物 (カギカズラなど) の収集も行った。今後、このたび収集した植物も含め、様々な植物種における異形細胞の形態形成や TIA 生合成と異形細胞の関連性について調べていく予定である。