

包括的転写制御による植物イソプレノイドの代謝工学

高橋 征司^{1*}・古山 種俊²・中山 亨¹

研究対象としての植物の魅力の一つに、構造的多様性に富んだ二次代謝産物とそれらの応用可能性の広がりがある。通常の個体維持に必要とされる一次代謝産物に加え、多種多様な二次代謝産物を合成するのは、自律移動の自由を持たない植物が、絶えず変化を続ける外界環境に対応する必要があるためであると考えられている。また、その構造多様性から、二次代謝産物の中にはそれを摂取する動物にとって有用な生理活性や薬理活性を示すものも多い。したがって、それら植物二次代謝産物の生理機能や生合成機構の解明と、それを応用した代謝工学は、植物のストレス耐性能の付与、および高付加価値な二次代謝産物高生産系の構築において非常に重要な課題である。

植物二次代謝産物はその基本構造をもとに大きく3つのグループ、すなわちイソプレノイド、アルカロイド、フェニルプロパノイドに分けることができる。なかでも、イソプレノイドはもっとも構造多様性に富むグループであり、自然界に23,000種以上存在する。その分布は植物界に特に多く、感染防御物質や動物に対する摂食阻害物質として、多様な生物的ストレスに対する応答機構に関与しているものが多い。また、動物の体内で抗酸化物質や生理活性物質として機能するものも多く、歴史的に

医薬や栄養補助食品として利用されてきている。さらに、天然高分子材料の代表格である天然ゴムも、*cis*-1,4-ポリイソプレンを基本骨格とするイソプレノイドである。このように産業的重要性の高いイソプレノイドであるが、基本的な細胞機能維持に不可欠なものが非常に多いのもその特徴である。そのため、イソプレノイドは一次と二次の中間的な代謝物であると表現されることもある。電子伝達に不可欠なキノン類、光合成における光捕集分子であるクロロフィルやカロテノイド、糖鎖生合成における担体脂質であるドリコール、膜脂質であるステロール（図1）など、これらはすべて細胞内において必須の分子であり、その欠損は重篤な生育障害を引き起こす。また、植物ホルモンのうち、アブシジン酸、ジベレリン、ブラシノステロイド、サイトカイニン、ストリゴラクトンはイソプレノイドに属し、それらの代謝調節は非常に重要である。したがって、イソプレノイドの代謝工学では、いかにこれら必須イソプレノイドの代謝への影響を最小限に留めて目的の代謝産物の量的変化を導くかが鍵となる。本稿ではそのための方法論として転写因子による包括的代謝制御を適用した例について紹介する。

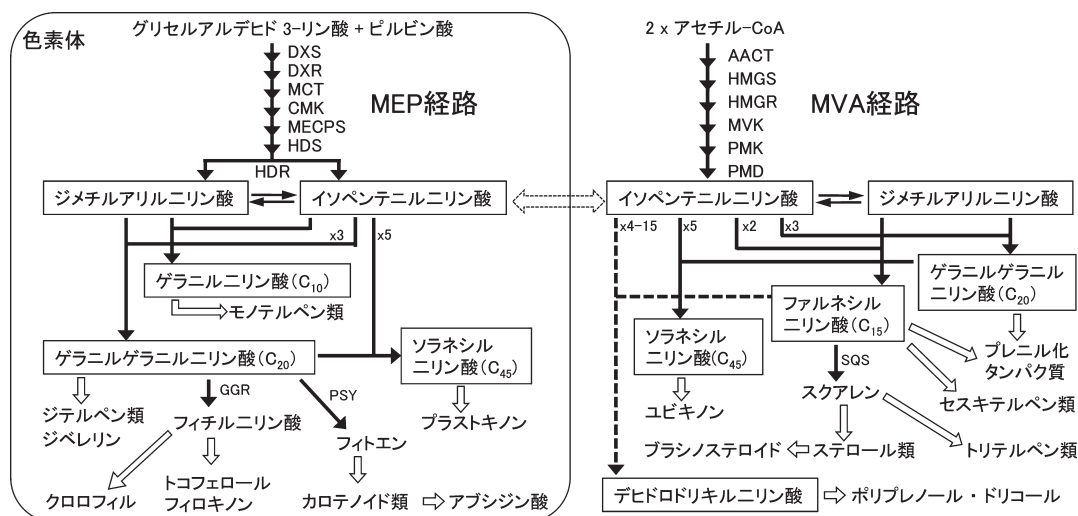


図1. 高等植物におけるイソプレノイド生合成経路の一部。代謝のハブ化合物となる直鎖状プレニルニリン酸を囲いで示す。

*著者紹介 ¹東北大学大学院工学研究科バイオ工学専攻（准教授） E-mail: takahasi@seika.che.tohoku.ac.jp

²東北大学多元物質科学研究所

酵素の過剰発現によるイソプレノイド代謝制御

イソプレノイドは炭素数5のイソペンテニル二リン酸 (IPP) を構造単位として生合成される化合物の総称である。イソプレノイドの生合成過程は大きく以下の3段階に分けることが出来る¹⁾。(1) IPP 生合成, (2) IPP の head-to-tail 型重合による直鎖状プレニル二リン酸の生合成, (3) IPP または直鎖状イソプレノイドの環化, 修飾, 転移 (図1)。イソプレノイドの代謝工学においては, 段階 (3) において目的とする二次代謝産物の生合成酵素 (群) をコードする遺伝子の発現を増強させることが多い。カロテノイドの代謝改変の例としてよく知られる「Golden Rice」では, 通常ほとんどカロテノイドが蓄積しないイネの胚乳において, β -カロテン (プロビタミンA) 生合成に関与する3段階の酵素, フィトエン合成酵素 (PSY), リコペン- β -シクラーゼ, フィトエン不飽和化酵素 (PDS) の遺伝子を発現させることで, カロテノイドが高蓄積した黄色の米を作出することに成功している²⁾。その一方で, 全身的な PSY の高発現は他の代謝経路への基質の供給を限定するため, クロロフィルや α -トコフェロールの減少³⁾や, ジベレリンの減少による植物の矮小化⁴⁾も報告されている。そこで, 前述の (1) や (2) の段階を増強することによる代謝工学の戦略も進められている。特に, (1) で供給される IPP はすべてのイソプレノイドの基本単位であるため, その代謝制御が注目されている。

IPP 生合成経路には, メバロン酸 (MVA) を経由する MVA 経路と, 2-C-メチル-D-エリトリール-4-リン酸 (MEP) を経由する MEP 経路の2種類が存在しており, 生物種によって保有する経路が異なっている。植物以外の真核生物は MVA 経路, 大部分の真性細菌は MEP 経路によって IPP を生合成しているが, 高等植物は細胞内で2つの経路を併せ持つ (図1)。細胞質の MVA 経路で生合成された IPP はステロール, ユビキノン, ドリコールなどの生合成に供され, 色素体 (葉緑体) 内の MEP 経路で生合成された IPP はクロロフィル, カロテノイド, トコフェロールなどの生合成に供される。高等植物における IPP 供給の増強とそれによる下流のイソプレノイド高蓄積化のため, 各生合成経路の律速段階と予想される酵素の過剰発現体の作製が報告されている。MEP 経路では, 1-デオキシ-D-キシルロース 5-リン酸 (DXP) 合成酵素 (DXS)⁵⁾, DXP 還元酵素 (DXR)⁶⁾, 1-ヒドロキ

シ-2-メチル-(E)-ブテニル 4-リン酸還元酵素 (HDR)⁷⁾などを過剰発現させた例があるが, それらは下流の総カロテノイド量や総クロロフィル量を 1.3~1.6 倍程度に増加させるにとどまった。これは, IPP 以降の生合成経路の律速段階で制御されているのに加え, MEP 経路自体が多段階で厳密に制御されていることによる。加えて, DXSをはじめ MEP 経路の酵素は転写レベルに加えタンパク質レベルでもフィードバック制御を受けている⁸⁾。従って, MEP 経路におけるある一段階の酵素の過剰発現だけでは IPP 供給の増強には不十分であると考えられていた。

共発現遺伝子ネットワーク解析

代謝経路の複数のステップの酵素遺伝子を同時に過剰発現させた形質転換植物を作製するのは非常に煩雑で, 各遺伝子の発現バランスをコントロールするのも難しい。そこで, それらの代謝経路の複数の遺伝子発現を包括的に制御しうる転写因子を用いた代謝工学のアプローチが提案されている。前述の様に, 植物の二次代謝産物は環境応答に関与するものが多いため, 外界刺激に応答してその生合成経路における各酵素の遺伝子発現が協調的に活性化される例が多い。それらが, ある少数の転写因子により包括的に制御されている場合, その転写因子の発現制御を介した効果的な代謝経路活性化の系が期待できる。

二次代謝経路の包括的発現制御に関与しうる転写因子を見いだす手法の一つに, 共発現遺伝子解析がある。協調的な発現制御を受けている遺伝子群は, 発現組織特異性や環境応答性などの種々の条件における発現パターンに類似性が見られる可能性が高い。さらには, それらの発現制御に関与する転写因子の発現 (もしくは転写活性) パターンも類似性を示すことが期待される。したがって, ある代謝経路における機能既知の酵素と発現挙動が近い遺伝子群を探索することにより, その経路に関与する未知の酵素や調節タンパク質の遺伝子が見いだされる可能性がある。このような発想に基づく手法が, 共発現遺伝子解析と呼ばれている。発現挙動の類似性が高い遺伝子を探索する手法として, マイクロアレイ解析データが用いられる。特に高等植物で最初に全ゲノムの解読が終了したシロイヌナズナにおいて, 戦略的なアレイデータの収集と公開が進められており, それらをデータセットにしたさまざまな遺伝子発現解析データベースが開発され

ている。一例として、ATTED-II (<http://atted.jp/>)^{9,10)}では、遺伝子間の発現挙動の類似性を1から-1のピアソンの積率相関係数で示し、ある遺伝子に対し相関性の高い遺伝子リストをランキング表示させることが出来る。複数の遺伝子間の相関性を示す場合、リスト表示だけでは全体を俯瞰しにくいいため、ある閾値以上の相関係数を持つ遺伝子同士を線でつなぐネットワーク図で示す。このような統計に基づく共発現遺伝子ネットワーク図に加え、各遺伝子の構造・機能情報（推定も含む）を考慮することで、*in silico*で解析候補を絞り込むことができる。前述のように、このようなアプローチは植物二次代謝に関与する酵素やそれを包括的に制御する転写因子の同定において非常にうまく機能する場合が多く、グルコシノレート、フラボノイド、ステロール、プラシノステロイドなどの代謝に関連する未知遺伝子の発見に繋がっている¹¹⁾。

MEP経路を制御する転写因子の探索

これまでに、高等植物のIPP生合成経路を包括的に制御する転写因子は同定されていなかった。また、IPP生合成経路を中心とした共発現遺伝子ネットワークを作成し考察した報告¹²⁾はあるが、それを利用し新規な機能遺伝子同定に至った例もなかった。そこで筆者らは、シロイヌナズナのイソプレノイド生合成酵素群をガイドとした共発現遺伝子ネットワーク解析を行うこととした。はじめに、配列相同性から推定されるものも含め、前述のイソプレノイド生合成の段階(1)と段階(2)の酵素遺伝子を中心とした遺伝子の集合に対し、共発現遺伝子ネットワークを構築させた。各遺伝子間の相関係数は、シロイヌナズナの約2.3万遺伝子が解析可能なAffymetrix社のATH1 GeneChipを用いて収集された58実験条件(1388アレイスライド)のデータを基にATTEDで算出されたものを用いた。相関係数0.6以上の遺伝子ペアを収集し、ネットワーク図を作製した結果、MEP経路および色素体内で機能する(推定も含む)遺伝子群と、MVA経路および色素体以外で機能する遺伝子群という二つのグループに分かれることがわかった(図2)。両者を比較した場合、色素体グループの方が相互に密なネットワークを形成する。次に、これらの二つのネットワークグループに属する遺伝子群に対して0.6以上の相関係数を示す転写因子遺伝子を探索した。その結果、色素体グループとネットワークを形成した転写因子は同時に複数の酵素遺伝子と相関を示すのに対し、色素

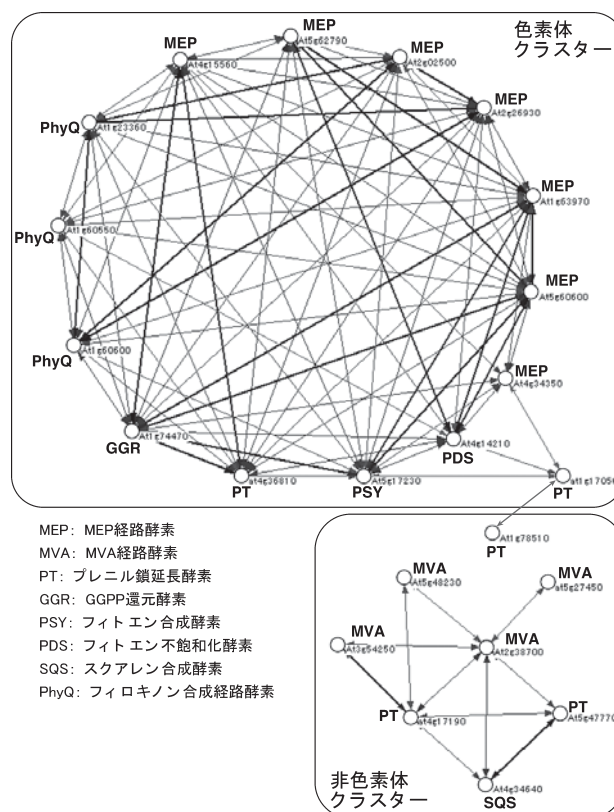


図2. シロイヌナズナのイソプレノイド生合成酵素遺伝子群の共発現遺伝子ネットワーク解析。相関係数0.6以上を示す遺伝子間を矢印で結んで表現している。

体以外のグループとネットワークを形成した転写因子は1~2個の酵素遺伝子としか相関を示さないことがわかった。これらの結果は、色素体内のイソプレノイド代謝経路はより協調的な発現制御をうけている可能性を示唆している。

共発現遺伝子ネットワーク解析により絞り込まれた候補転写因子の機能を迅速に解析するため、シロイヌナズナT87培養細胞においてこれらを過剰発現させ、MEP経路の酵素遺伝子を中心とした発現解析を行った。このなかで、bHLH (basic helix-loop-helix) 型転写因子であるPIF5 (phytochrome-interacting factor 5)¹³⁾およびtype-B Response Regulator型転写因子であるARR14 (Arabidopsis Response Regulator 14)¹⁴⁾に関し、各転写因子の過剰発現レベルに応じて、MEP経路の多段階の酵素遺伝子の発現上昇がみられた。興味深いことに、上記の二種を含めほとんどの候補転写因子の過剰発現細胞ではDXSの発現が強く抑制されていた。これは、DXS (図1)がMEP経路の特に重要な律速段階であり、DXSの発現制御を

介し色素体内イソプレノイド代謝を調節する別の転写制御機構が存在することを示している。しかし、PIF5やARR14の過剰発現体ではDXS以外のMEP経路の酵素遺伝子の発現上昇を受け、色素体内イソプレノイドであるクロロフィル、カロテノイドの蓄積量が対照株の2～3倍程度まで上昇していた。ここで、過剰発現細胞ではカロテノイド生合成における律速酵素とされるPSYおよびPDS、クロロフィルの側鎖に供されるフィチルニリン酸の生合成を触媒するゲラニルゲラニルニリン酸還元酵素(GGR)(図1)の発現量は有意な変化を示さなかった。また、詳細なカロテノイド分析の結果、前述の律速酵素以降で分岐した複数の生合成経路に由来するカロテノイド群の蓄積量が同時に上昇していた。以上の結果は、MEP経路の増強とそれによるIPP供給の上昇が下流の代謝物の蓄積をもたらしたことを示唆している。PIF5は赤色光受容体である phytochrome B を介した光に応答した遺伝子発現制御に関与する転写因子である¹³⁾。また、ARR14は植物における詳細な機能は不明であったが、同じファミリーに属する転写因子がサイトカイニン応答の遺伝子発現に関与するため、関連性が示唆されていた¹⁴⁾。これらはいずれもIPP生合成への関与は報告がなく、共発現遺伝子ネットワーク解析により新たに機能を見いだすことができた。

今後の展開

共発現遺伝子ネットワーク解析により見いだされた転写因子の過剰発現の効果は、MEP経路の一段階の酵素

遺伝子の過剰発現よりも効果的であることが示された。植物のMEP経路の酵素遺伝子を制御する転写因子の報告はこれまでになく、転写因子の過剰発現のみでイソプレノイド生合成能を包括的に向上させることが可能な新規な代謝工学ツールとしての応用展開が期待される。また、この手法でIPP生合成が増強された細胞に対し、テルペノイドやカロテノイドなどの個別の代謝経路における律速酵素の過剰発現を付加することで、宿主植物への影響がより少ない有用イソプレノイド高生産系の開発が期待できる。今後、これらの転写因子を介したイソプレノイド代謝制御の詳細な分子機構と、それらの上位に存在するシグナル伝達機構の解明を推進することで、より高度な代謝制御が達成できると期待される。

文 献

- 1) Takahashi, S. *et al.*: *The Chemical Record*, **6**, 194 (2006).
- 2) Ye, X. *et al.*: *Science*, **287**, 303 (2000).
- 3) Shewmaker, C. K. *et al.*: *The Plant Journal*, **20**, 401 (1999).
- 4) Fray, R. G. *et al.*: *The Plant Journal*, **8**, 693 (1995).
- 5) Leon, P. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **276**, 22901 (2001).
- 6) Rodriguez-Concepcion, M. *et al.*: *Plant Mol. Biol.*, **62**, 683 (2006).
- 7) Botella-Pavia, P. *et al.*: *Plant J.*, **40**, 188 (2004).
- 8) Guevara-Garcia, A. *et al.*: *Plant Cell*, **17**, 628 (2005).
- 9) Obayashi, T. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **35**, D863 (2007).
- 10) Obayashi, T. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **37**, D987 (2009).
- 11) Saito, K. *et al.*: *Trends Plant Sci.*, **13**, 36 (2008).
- 12) Wille, A. *et al.*: *Genome Biol.*, **5**, R92 (2004).
- 13) Khanna, R. *et al.*: *Plant Cell*, **16**, 3033 (2004).
- 14) Tajima, Y. *et al.*: *Plant and Cell Physiology*, **45**, 28 (2004).