

薬用植物ニチニチソウをモデルとした

アルカロイド代謝の場としての異形細胞分化過程の解析 (要約)

鵜崎 真妃

固着生活を送る植物は周囲の環境に適応するために様々な生理機能を発達させている。その一つに、種及び環境特異的に行われる代謝である特化（二次）代謝がある。生命活動に必要な代謝である一次代謝とは異なり、特化代謝は植物の生存には必須ではないとされているが、特化代謝産物は環境への適応や、病原菌や草食動物に対する防御等、植物が自らが置かれた環境でより優位に生きるために重要な役割を担っているとも考えられている (Erb and Kliebenstein 2020)。

植物の特化代謝産物は細胞種特異的に合成・蓄積される例が多く知られている。例えば、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)のグルコシノレートはS細胞とその周辺の師部組織において合成され (Nintemann et al. 2018)、S細胞特異的に蓄積されるとされている (Koroleva et al. 2000)。抗マラリア薬として使用される、クソニンジン (*Artemisia annua*) の合成するアルテミシニン は glandular trichome と呼ばれる特殊な細胞において合成・蓄積されることが報告されている (Olsson et al. 2009)。ケシ (*Papaver somniferum*) の合成するモルヒネなどのベンジルイソキノリンアルカロイドは乳管細胞とその周囲の師部組織において特異的に合成され、乳管細胞特異的に乳液として蓄積されると考えられている (Onoyovwe et al. 2013)。

上述した細胞のように、内容物が特殊である細胞や形態が周囲の細胞と異なる細胞を総称して異形細胞と呼ぶ (Foster 1955)。上述したシロイヌナズナのS細胞、クソニンジンの glandular trichome、ケシの乳管細胞に加え、シロイヌナズナのグルコシノレートを分解する酵素を蓄積するミロシン細胞 (Shirakawa et al. 2014)、オオカナダモ (*Egeria densa*) のもつ蛍光物質を蓄積する異形細胞 (Hara et al. 2015)、ゼニゴケ (*Marcantia polymorpha*) のもつテルペノイドを蓄積するオイルボディ細胞 (Kanazawa et al. 2020, Suire 2000) など、異形細胞の多くが特化代謝と深い関わりをもつ。異形細胞の中でも特に細長い形態を示し乳液を蓄積するものは、乳管細胞と呼ばれる場合が多い。特化代謝産物が異形細胞に蓄積されるのは、植物自身にとっても毒性を持ち得る

代謝産物を他の細胞と隔離するためであると考えられているが、その生理的意義は未解明である。

ニチニチソウは抗がん剤として使用されるビンブラスチンやビンクリスチン、抗高血圧剤として使用されるセルペンチンやアジュマリシン等を含む 130 種類以上の多様なモノテルペノイドインドールアルカロイドを合成する薬用植物である (van Der Heijden et al. 2004)。ニチニチソウの MIA 代謝は複数の細胞種を横断して行われることが知られている (Miettinen et al. 2014, St-Pierre, Vazquez-Flota and De Luca 1999)。まず Internal phloem associated parenchyma (IPAP) 細胞においてゲラニルニリン酸からロガニン酸が合成され (Miettinen et al. 2014, Salim et al. 2014, Asada et al. 2013, Geu-Flores et al. 2012, Collu et al. 2001)、表皮細胞へと運搬される (Payne et al. 2017)。表皮細胞においてロガニン酸から合成されたセコロガニンと (Murata et al. 2008, Irmiler et al. 2000, Madyastha et al. 1973)、トリプトファンから合成されたトリプタミン (Noe, Mollenschott and Berlin 1984) が縮合することでストリクトシジンが合成され、表皮細胞の液胞に蓄積される (de Waal, Meijer and Verpoorte 1995, Treimer and Zenk 1979)。ストリクトシジンが複数の反応を受けたのち、中間体が異形細胞・乳管細胞へと運搬される (Carqueijeiro et al. 2020, Caputi et al. 2018, Qu et al. 2018, Tatsis et al. 2017, Levac et al. 2016, Stavrinides et al. 2016, Stavrinides et al. 2015, Qu et al. 2015, Besseau et al. 2013, Guirimand et al. 2010, Liscombe, Usera and O'Connor 2010, Geerlings et al. 2000, Luijendijk, Stevens and Verpoorte 1998, St-Pierre and De Luca 1995, De Carolis and De Luca 1993, Abdelrahman, De Luca et al. 1987, Pfitzner and Stockigt 1982, Hemscheidt and Zenk 1980)。異形細胞・乳管細胞においても複数の反応が起こり、ビンブラスチンやビンクリスチン、セルペンチンといった最終産物がこれらの細胞に蓄積されることが考えられている (Yamamoto et al. 2021, Carqueijeiro et al. 2016, Qu et al. 2015, Costa et al. 2008, St-Pierre et al. 1998, Vazquez-Flota et al. 1997, Power, Kurz and De Luca 1990)。また、一細胞メタボローム解析により、表皮細胞で合成される MIA も異形細胞・乳管細胞に蓄積されていることが明らかになっており、異形細胞・乳管細胞がこれまで想定されていた以上に重要な役割を持っている可能性が示された (Yamamoto et al. 2019, Yamamoto et al. 2016)。

ニチニチソウの MIA 代謝が複数の細胞を経由して行われる生理学的理由は未解明

である。ところで、ニチニチソウを含む複数の植物において、カルス化を誘導することで細胞の脱分化に伴い特化代謝能が失われる例が報告されている (Datta and Saivastav 1997, Kutchan et al. 1983)。このことは、細胞種特異的に行われる植物特化代謝において細胞の分化が重要な役割を持つことを示唆している。本研究では、ニチニチソウにおいて個体の成長に伴う MIA 代謝の変動と異形細胞との関係性を明らかにし、細胞の代謝的な分化過程を明らかにすることで、植物特化代謝が細胞種特異的に行われる生理学的理由を明らかにすることを目標とした。

第二章では本葉の展開過程を材料とし、蛍光を指標として異形細胞・乳管細胞の数や分布の変化を調べた。さらに、異形細胞・乳管細胞の放つ蛍光はこれらの細胞に蓄積されているセルペンチンに由来することを明らかにしたうえで、各本葉に蓄積するセルペンチン量を分析した。その結果、異形細胞と乳管細胞はセルペンチンを蓄積し始める時期が異なっていることを発見し、葉の展開に伴う異形細胞・乳管細胞の代謝的な分化について考察した。

第三章では、種子の成熟・吸水・発芽の過程での乳管細胞で起こる形態変化や、MIA 代謝の開始過程を解析した。その結果、種子の登熟過程で乳管細胞は形態的に分化しており、未知化合物が特異的に蓄積していること、この化合物の乳管細胞特異的な蓄積は種子の登熟・休眠に伴って失われることが明らかになった。また、登熟後の種子の吸水・発芽に伴い乳管細胞が伸長しており、細胞内構造も大きく変化していること、発芽後 12 時間目から MIA 代謝が開始されることも明らかになった。MIA 代謝経路の全体が一斉に開始されるわけではなく、経路の一部は発芽後 36 時間目以降に活性化されていることも発見し、これには細胞の分化が関与していることも示唆された。

第三章で取得した種子発芽過程の時系列トランスクリプトーム解析結果において、特に *HLI* という MIA 合成酵素遺伝子が興味深い発現変動を示していたことから、第四章では *HLI* を制御する新規転写因子の探索を行った。その結果、HL1 の代謝産物であるカサランチンの生合成に影響を与える新規転写因子を発見することに成功した。

本研究では、異形細胞・乳管細胞の「代謝的な分化」の理解に資する結果を得た。今後、一細胞レベルのトランスクリプトーム解析及びメタボローム解析や、各細胞の

細胞内環境の解析、さらには本研究で発見した新規転写因子の作用機序の解析を通じて、本研究の結果に基づき新たに立てられた仮説を検証するとともに、植物特化代謝が細胞種特異的に行われる生理的理由の解明を目指したい。

引用文献

- Abdelrahman, M. (1977) Patterns of Hormones, Respiration and Ripening Enzymes during Development, Maturation Ripening of Cherry Tomato Fruits. *Physiologia Plantarum*, 39, 115-118.
- Asada, K., V. Salim, S. Masada-Atsumi, E. Edmunds, M. Nagatoshi, K. Terasaka, H. Mizukami & V. De Luca (2013) A 7-Deoxyloganetic Acid Glucosyltransferase Contributes a Key Step in Secologanin Biosynthesis in Madagascar Periwinkle. *The Plant Cell*, 25, 4123-4134.
- Besseau, S., F. Kellner, A. Lanoue, A. M. K. Thamm, V. Salim, B. Schneider, F. Geu-Flores, R. Höfer, G. Guirimand, A. Guihur, A. Oudin, G. Glevarec, E. Foureau, N. Papon, M. Clastre, N. Giglioli-Guivarc'h, B. St-Pierre, D. Werck-Reichhart, V. Burlat, V. De Luca, S. E. O'Connor & V. Courdavault (2013) A Pair of Tabersonine 16-Hydroxylases Initiates the Synthesis of Vindoline in an Organ-Dependent Manner in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiology*, 163, 1792-1803.
- Caputi, L., J. Franke, S. C. Farrow, K. Chung, R. M. E. Payne, T. D. Nguyen, T. T. Dang, I. Soares Teto Carqueijeiro, K. Koudounas, T. Duge de Bernonville, B. Ameyaw, D. M. Jones, I. J. C. Vieira, V. Courdavault & S. E. O'Connor (2018) Missing enzymes in the biosynthesis of the anticancer drug vinblastine in Madagascar periwinkle. *Science*, 360, 1235-1239.
- Carqueijeiro, I., A. L. Guimaraes, S. Bettencourt, T. Martinez-Cortes, J. G. Guedes, R. Gardner, T. Lopes, C. Andrade, C. Bispo, N. P. Martins, P. Andrade, P. Valentao, I. M. Valente, J. A. Rodrigues, P. Duarte & M. Sottomayor (2016) Isolation of Cells Specialized in Anticancer Alkaloid Metabolism by Fluorescence-Activated Cell Sorting. *Plant Physiol*, 171, 2371-8.
- Carqueijeiro, I., K. Koudounas, T. Duge de Bernonville, L. J. Sepulveda, A. Mosquera, D. P. Bomzan, A. Oudin, A. Lanoue, S. Besseau, P. Lemos Cruz, N. Kulagina, E. A. Stander, S. Eymieux, J. Burlaud-Gaillard, E. Blanchard, M. Clastre, L. Atehortua, B. St-Pierre, N. Giglioli-Guivarc'h, N. Papon, D. A. Nagegowda, S. E. O'Connor & V. Courdavault (2020) Alternative splicing creates a pseudo-strictosidine beta-d-glucosidase modulating alkaloid synthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol*.
- Collu, G., N. Unver, A. M. G. Peltenburg-Looman, R. Van Der Heijden, R. Verpoorte & J. Memelink (2001) Geraniol 10-hydroxylase 1, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *FEBS Letters*, 508, 215-220.
- Costa, M. M. R., F. Hilliou, P. Duarte, L. G. Pereira, I. Almeida, M. Leech, J. Memelink, A. R. Barceló & M. Sottomayor (2008) Molecular Cloning and Characterization of a Vacuolar Class III Peroxidase Involved in the Metabolism of Anticancer Alkaloids in *Catharanthus roseus*.

Plant Physiology, 146, 403-417.

- Datta, A. & P. S. Saivastav (1997) Variation in Vinblastine Production by *Catharanthus roseus* during in vivo and in vitro differentiation. *Phytochemistry*, 46, 3.
- De Carolis, E. & V. De Luca (1993) Purification, characterization, and kinetic analysis of a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase involved in vindoline biosynthesis from *Catharanthus roseus*. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 5504-5511.
- De Luca, V., J. Balsevich, R. T. Tyler & W. G. Kurz (1987) Characterization of a novel N-methyltransferase (NMT) from *Catharanthus roseus* plants : Detection of NMT and other enzymes of the indole alkaloid biosynthetic pathway in different cell suspension culture systems. *Plant Cell Rep*, 6, 458-61.
- de Waal, A., A. H. Meijer & R. Verpoorte (1995) Strictosidine synthase from *Catharanthus roseus*: purification and characterization of multiple forms. *Biochem J*, 306 10.
- Erb, M. & D. J. Kliebenstein (2020) Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy. *Plant Physiol*, 184, 39-52.
- Foster, A. S. (1955) Plant Idioblasts: Remarkable Examples of Cell Specialization. *Plant Science Bulletin*, 1, 184-192.
- Geerlings, A., M. M. Ibanez, J. Memelink, R. van Der Heijden & R. Verpoorte (2000) Molecular cloning and analysis of strictosidine beta-D-glucosidase, an enzyme in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *J Biol Chem*, 275, 3051-6.
- Geu-Flores, F., N. H. Sherden, V. Courdavault, V. Burlat, W. S. Glenn, C. Wu, E. Nims, Y. Cui & S. E. O'Connor (2012) An alternative route to cyclic terpenes by reductive cyclization in iridoid biosynthesis. *Nature*, 492, 138-142.
- Guirimand, G., V. Courdavault, A. Lanoue, S. Mahroug, A. Guihur, N. Blanc, N. Giglioli-Guivarc'H, B. St-Pierre & V. Burlat (2010) Strictosidine activation in Apocynaceae: towards a "nuclear time bomb"? *BMC Plant Biology*, 10.
- Hara, T., E. Kobayashi, K. Ohtsubo, S. Kumada, M. Kanazawa, T. Abe, R. D. Itoh & M. T. Fujiwara (2015) Organ-Level Analysis of Idioblast Patterning in *Egeria densa* Planch. Leaves. *PLOS ONE*, 10, e0118965.
- Hemscheidt, T. & M. H. Zenk (1980) Glucosidases involved in indole alkaloid biosynthesis of *Catharanthus* cell cultures. *FEBS Lett*, 110, 187-91.
- Irmeler, S., G. Schröder, B. St-Pierre, N. P. Crouch, M. Hotze, J. Schmidt, D. Strack, U. Matern & J. Schröder (2000) Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme activities and identification of cytochrome P450 CYP72A1 as secologanin synthase. *The Plant Journal*, 24, 797-804.
- Kanazawa, T., H. Morinaka, K. Ebine, T. L. Shimada, S. Ishida, N. Minamino, K. Yamaguchi, S. Shigenobu, T. Kohchi, A. Nakano & T. Ueda (2020) The liverwort oil body is formed by

- redirection of the secretory pathway. *Nat Commun*, 11, 6152.
- Koroleva, O. A., A. Davies, R. Deeken, M. R. Thorpe, A. D. Tomos & R. Hedrich (2000) Identification of a new glucosinolate-rich cell type in Arabidopsis flower stalk. *Plant Physiology*, 124, 599-608.
- Kutchan, T. M., S. Ayabe, R. J. Krueger, E. M. Coscia & C. J. Coscia (1983) Cytodifferentiation and alkaloid accumulation in cultured cells of *Papaver bracteatum*. *Plant Cell Rep*, 2, 281-4.
- Levac, D., P. Cázares, F. Yu & V. De Luca (2016) A Picrinine N-Methyltransferase Belongs to a New Family of γ -Tocopherol-Like Methyltransferases Found in Medicinal Plants That Make Biologically Active Monoterpenoid Indole Alkaloids. *Plant Physiology*, 170, 1935-1944.
- Liscombe, D. K., A. R. Usera & S. E. O'Connor (2010) Homolog of tocopherol C methyltransferases catalyzes N methylation in anticancer alkaloid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 18793-8.
- Luijendijk, T. J. C., L. H. Stevens & R. Verpoorte (1998) Purification and characterisation of strictosidine β -d-glucosidase from *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36, 419-425.
- Madyastha, K. M., R. Guarnaccia, C. Baxter & C. J. Coscia (1973) S-Adenosyl-l-methionine:Loganic Acid Methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 248, 2497-2501.
- Miettinen, K., L. Dong, N. Navrot, T. Schneider, V. Burlat, J. Pollier, L. Woittiez, S. van der Krol, R. Lugan, T. Ilc, R. Verpoorte, K. M. Oksman-Caldentey, E. Martinoia, H. Bouwmeester, A. Goossens, J. Memelink & D. Werck-Reichhart (2014) The seco-iridoid pathway from *Catharanthus roseus*. *Nat Commun*, 5, 3606.
- Murata, J., J. Roepke, H. Gordon & V. De Luca (2008) The Leaf Epidermome of *Catharanthus roseus* Reveals Its Biochemical Specialization. *The Plant Cell*, 20, 524-542.
- Nintemann, S. J., P. Hunziker, T. G. Andersen, A. Schulz, M. Burow & B. A. Halkier (2018) Localization of the glucosinolate biosynthetic enzymes reveals distinct spatial patterns for the biosynthesis of indole and aliphatic glucosinolates. *Physiol Plant*, 163, 138-154.
- Noe, W., C. Mollenschott & J. Berlin (1984) Tryptophan decarboxylase from *Catharanthus roseus* cell suspension cultures: purification, molecular and kinetic data of the homogenous protein. *Plant Mol Biol*, 3, 281-8.
- Olsson, M. E., L. M. Olofsson, A. L. Lindahl, A. Lundgren, M. Brodelius & P. E. Brodelius (2009) Localization of enzymes of artemisinin biosynthesis to the apical cells of glandular secretory trichomes of *Artemisia annua* L. *Phytochemistry*, 70, 1123-1128.
- Onoyovwe, A., J. M. Hagel, X. Chen, M. F. Khan, D. C. Schriemer & P. J. Facchini (2013) Morphine biosynthesis in opium poppy involves two cell types: sieve elements and laticifers. *Plant Cell*, 25, 4110-22.
- Payne, R. M. E., D. Xu, E. Foureau, M. I. S. Teto Carqueijeiro, A. Oudin, T. D. D. Bernonville, V. Novak, M. Burow, C.-E. Olsen, D. M. Jones, E. C. Tatsis, A. Pendle, B. Ann Halkier, F. Geu-Flores, V.

- Courdavault, H. H. Nour-Eldin & S. E. O'Connor (2017) An NPF transporter exports a central monoterpene indole alkaloid intermediate from the vacuole. *Nature Plants*, 3, 16208.
- Pfützner, A. & J. Stockigt (1982) Partial-Purification and Characterization of Geissoschizine Dehydrogenase from Suspension-Cultures of *Catharanthus-Roseus*. *Phytochemistry*, 21, 1585-1588.
- Power, R., W. G. W. Kurz & V. De Luca (1990) Purification and characterization of acetylcoenzyme A: Deacetylindoline 4-O-acetyltransferase from *Catharanthus roseus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 279, 370-376.
- Qu, Y., M. E. A. M. Easson, R. Simionescu, J. Hajicek, A. M. K. Thamm, V. Salim & V. De Luca (2018) Solution of the multistep pathway for assembly of corynanthean, strychnos, iboga, and aspidosperma monoterpene indole alkaloids from 19E-geissoschizine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, 3180-3185.
- Qu, Y., M. L. Easson, J. Froese, R. Simionescu, T. Hudlicky & V. De Luca (2015) Completion of the seven-step pathway from tabersonine to the anticancer drug precursor vindoline and its assembly in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 6224-9.
- Salim, V., B. Wiens, S. Masada-Atsumi, F. Yu & V. De Luca (2014) 7-Deoxyloganetic acid synthase catalyzes a key 3 step oxidation to form 7-deoxyloganetic acid in *Catharanthus roseus* iridoid biosynthesis. *Phytochemistry*, 101, 23-31.
- Shirakawa, M., H. Ueda, A. J. Nagano, T. Shimada, T. Kohchi & I. Hara-Nishimura (2014) FAMA is an essential component for the differentiation of two distinct cell types, myrosin cells and guard cells, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 26, 4039-52.
- St-Pierre, B. & V. De Luca (1995) A Cytochrome P-450 Monooxygenase Catalyzes the First Step in the Conversion of Tabersonine to Vindoline in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol*, 109, 131-139.
- St-Pierre, B., P. Laflamme, A.-M. Alarco, V. D & E. Luca (1998) The terminal O-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A-dependent acyl transfer. *The Plant Journal*, 14, 703-713.
- St-Pierre, B., F. A. Vazquez-Flota & V. De Luca (1999) Multicellular compartmentation of *catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. *Plant Cell*, 11, 887-900.
- Stavrinos, A., Evangelos, E. Foureau, L. Caputi, F. Kellner, V. Courdavault & Sarah (2015) Unlocking the Diversity of Alkaloids in *Catharanthus roseus*: Nuclear Localization Suggests Metabolic Channeling in Secondary Metabolism. *Chemistry & Biology*, 22, 336-341.
- Stavrinos, A., E. C. Tatsis, L. Caputi, E. Foureau, C. E. M. Stevenson, D. M. Lawson, V. Courdavault & S. E. O'Connor (2016) Structural investigation of heteroyohimbine alkaloid synthesis reveals active site elements that control stereoselectivity. *Nature Communications*, 7, 12116.
- Suire, C. (2000) A comparative, transmission-electron microscopic study on the formation of oil-bodies in

- liverworts. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, 209-232.
- Tatsis, E. C., I. Carqueijeiro, T. Duge de Bernonville, J. Franke, T. T. Dang, A. Oudin, A. Lanoue, F. Lafontaine, A. K. Stavrinides, M. Clastre, V. Courdavault & S. E. O'Connor (2017) A three enzyme system to generate the Strychnos alkaloid scaffold from a central biosynthetic intermediate. *Nat Commun*, 8, 316.
- Treimer, J. F. & M. H. Zenk (1979) Purification and properties of strictosidine synthase, the key enzyme in indole alkaloid formation. *Eur J Biochem*, 101, 225-33.
- van Der Heijden, R., D. I. Jacobs, W. Snoeijer, D. Hallard & R. Verpoorte (2004) The Catharanthus alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. *Curr Med Chem*, 11, 607-28.
- Vazquez-Flota, F., E. De Carolis, A. M. Alarco & V. De Luca (1997) Molecular cloning and characterization of desacetoxyvindoline-4-hydroxylase, a 2-oxoglutarate dependent-dioxygenase involved in the biosynthesis of vindoline in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Mol Biol*, 34, 935-48.
- Yamamoto, K., D. Grzech, K. Koudounas, E. A. Stander, L. Caputi, T. Mimura, V. Courdavault & S. E. O'Connor (2021) Improved virus-induced gene silencing allows discovery of a serpentine synthase gene in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiology*.
- Yamamoto, K., K. Takahashi, L. Caputi, H. Mizuno, C. E. Rodriguez-Lopez, T. Iwasaki, K. Ishizaki, H. Fukaki, M. Ohnishi, M. Yamazaki, T. Masujima, S. E. O'Connor & T. Mimura (2019) The complexity of intercellular localisation of alkaloids revealed by single-cell metabolomics. *New Phytol*, 224, 848-859.
- Yamamoto, K., K. Takahashi, H. Mizuno, A. Anegawa, K. Ishizaki, H. Fukaki, M. Ohnishi, M. Yamazaki, T. Masujima & T. Mimura (2016) Cell-specific localization of alkaloids in *Catharanthus roseus* stem tissue measured with Imaging MS and Single-cell MS. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 3891-6.