

# ニコチン転流に関与するタバコトランスポーターの解析

稲井 康二

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 植物遺伝子機能学講座

(橋本 隆 教授)

平成 19 年 6 月

## 目次

序論	3
材料と方法	11
結果	23
考察	54
謝辞	61
参考文献	62
論文目録	71

## 序論

植物は多種多様の二次代謝産物を生合成している。呼吸や光合成を含むエネルギー代謝や生体成分の生合成などの生物の生命維持活動に必須である一次代謝はほとんどの細胞において機能しているのとは異なり、生命維持活動に必須ではない二次代謝は、特定の植物群において組織および時期特異性を有している。高等植物において、一次代謝から分岐または、そこから派生した経路である二次代謝経路が高度に発達し、高等植物が生合成する二次代謝産物は5万種類を越え、それぞれは生合成機構や化学構造からテルペノイド類、アルカロイド類、フェノール類の3種類に大別される。植物体にとって植物二次代謝産物は病虫害や病原菌からの防御をはじめ、誘引物質または共生細菌との相互作用などの外的環境との相互作用に重要な役割を果たしている(Dixon et al., 1995)。

アルカロイドは低分子量の含窒素塩基性化合物の総称であり、その窒素原子はアミノ酸に由来する(Hashimoto and Yamada, 1994; Kutchan, 1995)。ピロリジン、トロパンアルカロイドはオルニチンに由来し、ピペリジン、キノチリジン、インドリジンアルカロイドはジリンに由来、そしてピリジンアルカロイドはニコチン酸に由来する。アルカロイドには12000種以上の化学構造が知られており、テルペン類について種類が多い化合物である。その多様な化学構造と薬理活性をもつことから医薬品や嗜好品、毒物として利用されている。たとえば、purine alkaloidの1つであるcaffein、さらにその前駆体でありココアなどの主成分である theophylline は筋弛緩作用をもち気管支喘息に対して、また taxol など抗がん剤としての作用を持ち医薬品として重要とされる。

本研究ではタバコ (*Nicotiana tabacum*) における主要アルカロイドであるニコチンに着目した。ニコチンの薬理活性としてはアセチルコリン受容体に作用し、中枢および末梢神経を興奮させる作用をもち、また中毒症状を示すことから近年では禁煙風習が世界的に広まっている。またニコチンは喫煙としての目的だけでなく殺虫剤として農業的にも利用されていた。

ニコチンそのものは、1928年に Jean Nicot によって単離され、その構造は1893年に Pinner によって解明された。そのニコチンの化学構造はピペリジン環とピリジン環が融合した構造をしている(Schevelbein, 1982)。その生合成経路は、タバコと同じナス科の薬用植物であるペラドンナやヒヨスなどで生合成されるトロパンアルカロイドのヒヨスアミンやスコポラミンなどに共通点を示す。タバコ植物体内で生合成されるニコチンのピペリジン環は対称ジアミンであるオルニチン由来のプトレシンに由来している。プトレシンは全ての生物でより高次のスペルミンやスペルミジンなどのポリアミンと代謝される。タバコ植物体でのニコチン生合成に特化した生合成経路は、ポリアミン生合成経路と分岐して、putrescine *N*-methyltransferase (PMT) が触媒するプ

トレシンへの *N*-メチル基転移反応からはじまる (Hashimoto et al., 1989)。この反応の生成物である *N*-methylputrescine は、*N*-methylputrescine oxidase (MPO)が触媒する酸化脱アミノ化を受け、4-methylaminobutanal に変換される(Heim et al., 2007; Katoh et al., 2007)。動物やマメ科植物の diamine oxidase (DAO)は putrescine も基質とするが、タバコを含め同様に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を生合成する *Hyoscyamus niger* や *Brugmansia candida* x *aurea hybrid* などから精製された DAO は、methylputrescine により高い基質特異性を示す (Mizusaki et al., 1972; Hashimoto et al., 1990; Walton and McLauchlan, 1990; Haslam and Young, 1992; Boswell et al., 1999)。生合成された 4-methylaminobutanal は、自発反応により *N*-methyl- $\Delta^1$ -pyrrolinium cation となる。その後、NAD の代謝中間体のニコチン酸から派生する化合物と縮合することでニコチンが生合成される。しかしながら、外部から投与したニコチン酸はニコチンのピリジン環に取り込まれるが、ニコチン酸が生合成の直接の前駆体であるかどうかは未だ解明されていない (図 1; Steppuhn et al., 2004)。

多くの *Nicotiana* 属ではニコチンを主なアルカロイドとして生合成しているが、それと類縁化合物であるノルニコチン、アナバシン、アナタピンなどのアルカロイドも生合成している (図 1; Saito et al., 1985)。ノルニコチンはニコチンの酸化脱メチル化反応で生合成される。アナバシンはニコチン酸由来 (NAD の代謝中間体) のピリジン環とリジンに由来し、 $\Delta^1$ -ピペリジウムカチオンを経て、ニコチンと類似した様式で生成される。アナタピンはニコチン酸 (NAD の代謝中間体) 由来の代謝物が縮合することで生成される。また、より少量のアルカロイドとして anataline や  $\alpha,\beta$ -dipyridyl といったタバコアルカロイドがアナバシン、アナタピンから生成されている (図 1、Gossens et al., 2003; Hakkinen et al., 2004)。これらのニコチンのタバコアルカロイドは、種によって生合成される量が異なり、それぞれの種で異なる生合成制御を受けていることが示されている。

ニコチン生合成経路を解明する試みは、商業用品種の低ニコチン品種である LA Burley21 を用いて行われてきた。LA Burley21 は、キューバ品種において見つかった低ニコチン品種の特性を野生型の Burley21 品種に戻し交雑によって導入した品種である。LA Burley21 の特徴は、野生型と比較したとき、形態学的違いはないが、低ニコチン含量のため病害虫に感受性を示す (Legg et al., 1969)。LA Burley21 の低ニコチン含量という特性は、遺伝学的解析により 2 つの不完全優性の遺伝子座の変異によることが分かっている (Legg et al., 1971)。この二つの独立した遺伝子座 (*Nic1*、*Nic2*) では、*nic1* の変異の方が低ニコチン形質を示し、*nic1nic2* の二重変異体でもっとも低ニコチン形質を示す (図 2; Legg et al., 1971)。 *nic* 変異体においてニコチン生合成経路の鍵酵素といえる PMT の活性や、ニコチンのピリジン環生合成の上流に位置する quinolinate phosphoribosyl transferase (QPT)の活性が低下していることから、*Nic* は複数

ニコチン生合成酵素遺伝子の発現を制御する遺伝子であると考えられ、その後のニコチン生合成経路の解明に用いられるようになった(Hibi et al., 1994; Saunders, 1979)。*nic1nic2* 変異体を用いたディファレンシャルスクリーニング法により *PMT* および NADPH 依存型還元酵素の一種である *A622* が単離されている(Hibi et al., 1994)。*A622* は NADPH 依存型の還元酵素としての活性をもち、*PMT* と非常に類似した発現様式をもつことからニコチン生合成に深く関与する酵素遺伝子であると考えられている(Shoji et al., 2002; Sinclair et al., 2004)。*N. sylvestris* の cDNA マイクロアレーを用いた野生型と *nic1nic2* 変異体の根における発現解析より *MPO1* と *MPO2* が単離されている。*MPO* は前記の様に *N*-methylputrescine により高い基質特異性を示すとともに、*PMT* と非常に類似した発現様式をもつことが示されている(Heim et al., 2007; Katoh et al., 2003, 2007)。同様に、蛍光ディファレンシャルディスプレイ法によって野生型と *nic1nic2* 変異体の根における発現解析により、quinolinate synthase と相同性を持つ遺伝子が単離された(稲井、修論、2000)。

ニコチン生合成経路の分子生物学的解明は、*nic1nic2* 変異体を用いた解析だけでなくタバコ培養細胞 BY-2 を用いても行われている。タバコ BY-2 細胞は植物の研究に有益な植物培養細胞であり、細胞複製までに 13~14 時間という短さ、高度な同調系の確立、アグロバクテリウムを用いた形質転換効率の高さといった特性を持つ(Nagata et al., 1992)。タバコ由来の細胞として特性も有し、傷害ホルモンのジャスモン酸処理によりニコチン生合成が誘導されるという特性を持っている(Blechert, 1995, Gossens et al., 2003)。この特性を利用しタバコ BY-2 細胞にてディファレンシャルディスプレイ解析を行い、ornithin decarboxylase や *PMT* 遺伝子が同定されている(Imanishi et al., 1997)。

タバコ植物におけるニコチンは、虫害に対する防御物質として機能している。事実、ニコチンの有する強い毒性は害虫駆除に対する農薬として利用されてきた背景もある。ニコチンは、タバコの根において生合成されており *PMT* をはじめとして前述のニコチン生合成酵素遺伝子群は根特異的あるいは、根において強く発現している(Hibi et al., 1994; Shoji et al., 2000a, 2002, Cane et al., 2005)。また、根におけるニコチン生合成酵素遺伝子群の発現および、それに伴うニコチン生合成量はタバコの葉への傷害刺激や虫害によって増大される(Baldwin et al., 1994; Sinclair et al., 2004; Cane et al., 2005)。タバコの葉への傷害によって根における内在性のジャスモン酸生成量を増大させることや、タバコ BY-2 細胞、タバコの根においてジャスモン酸処理によってニコチン生合成の活性化されることからニコチン生合成酵素遺伝子はジャスモン酸シグナル経路を経て活性化されていると考えられている(Gundlach et al., 1992; Shoji et al., 2002; Cane et al., 2005)。さらに、*nic1nic2* 変異体においては、傷害やジャスモン酸処理によるニコチン生合成酵素遺伝子群の発現の活性化が低下する(Shoji et al., 2000, 2002;

Cane 2005; Katoh et al., 2007)。このことから *Nic* 遺伝子は、これらの遺伝子のジャスモン酸シグナルにも関与することを示している。

タバコ植物体におけるニコチンは根器官で生合成され導管を通り植物体全体に運ばれ、特に葉の液胞内に蓄積する (図 3; Wink and Robert, 1998)。PMT や A622 の酵素は根端領域では、epidermis や cortex に存在し、分化領域では cortex の最外層、導管を取り囲む parenchyma 細胞に存在している (Shoji et al., 2000a, 2002)。これらの局在様式は、根特異的にニコチン生合成が起きているということだけでなく、ニコチン生合成が導管を介した葉への長距離輸送と密接に関係していることを表していると考えられる。

アルカロイドはその薬理活性、毒性の強さから考えて潜在的に生合成する植物にとっても毒性を示すはずであるが、アルカロイドを生合成する植物体は自身の代謝産物の毒性を免れる解毒機能を有している。その機能は、植物細胞の中でもっとも大きな細胞内小器官である液胞が担っていると考えられている。液胞は、成熟した植物細胞内では 80% 以上を占めることもあり、物質の蓄積を担っている機関である。植物にとって液胞へ毒性アルカロイドを隔離し溜め込むことで、解毒機構をもつとともに防御物質として蓄積していると考えられる。アルカロイドはその窒素原子の働きにより塩基性の化合物である。そのため弱い塩基性をもつアルカロイドは、細胞質における中性の pH では疎水性の性質をもつため、脂質二重膜の液胞膜を単純拡散によって透過できる。液胞膜上に存在する  $H^+$ -ATPase (V-ATPase) および  $H^+$ -pyrophosphatase (V-PPase) といった 2 種類の  $H^+$ ポンプが存在し、それぞれ ATP や PPi を基質とした加水分解エネルギーにより  $H^+$ を液胞内へ能動輸送している (Maeshima, 2000)。これらの働きによって液胞内は細胞質よりも酸性の性質を保っている。この性質により液胞内に入り込んだ塩基性アルカロイドは、プロトン化を受けてイオン化し親水性がまして膜を透過できずに液胞内部に蓄積するイオントラップ機構によって蓄積する場合がある (Wink and Roberts., 1998)。それに対して、細胞質 pH の状態では電化を持つアルカロイドは脂質二重膜を透過することはできないため、輸送体を介した機構によって蓄積している (Deus-Newmann and Zenk, 1986) (Otani et al., 2005)。

植物体レベルでアルカロイドの輸送に関して見てみると、他の代謝物と同様に sink、source 器官の関係を持ち輸送され蓄積していることが分かる。特定の器官や組織 (source) で生合成されたアルカロイドは、その他の器官 (sink) に長距離輸送され蓄積している。Lupanine や senecionine、swainsonine など篩管を通り、ニコチンやトロパンアルカロイド、rutacridone などは導管にて輸送されている (Wink and Roberts., 1998)。その長距離輸送は生合成細胞および維管束の組織によって制御されている。細胞膜局在性を示す multidrug resistance type ATP-binding cassette transporter である CjMDR1 は、ベルベリン輸送体として維管束導管付近において強く発現し、根組織で生合成され導

管を通じて運ばれてきたベルベリンをシンク組織である根茎でアンローディングされる際に機能するとされている (Shitan et al., 2003)。しかしながら、アルカロイド輸送体の分子的な報告は、この CjMDR1 以外ほとんど存在しない、さらに、生合成細胞から排出、分泌する輸送体の存在はその研究の困難さからも報告例はない。

これまでの研究では、高等植物の二次代謝生合成は高度に調節されていることが知られている。前述のようにニコチンは *Nic* 遺伝子によって生合成酵素遺伝子群の発現が厳しく制御されている。また、フラボノイド生合成の調節遺伝子はそれぞれの特化した経路の酵素に関して制御しているだけでなく特異的な輸送体遺伝子についても制御していることが知られている (Nesi et al., 2000, 2001; Walker et al., 1999; Sharma et al., 2005; Mathews et al., 2003)。

本研究では、蛍光ディファレンシャルディスプレイ法によって *nic1ni2* 変異体の葉においてジャスモン酸誘導性の低下した新規転写因子様遺伝子である *Jasmonate early inducible 1 (JEI1)* 遺伝子の発現解析および、*nic1nic2* 変異体の根において *Nic* 遺伝子によって遺伝子発現が厳密に制御されたトランスポーター様遺伝子 (*NtMATE1*、*NtMATE2*) の機能解析を行い、ニコチン生合成に関して未知なる部分であるニコチン生合成関連遺伝子発現制御とニコチン輸送に関して考察した。

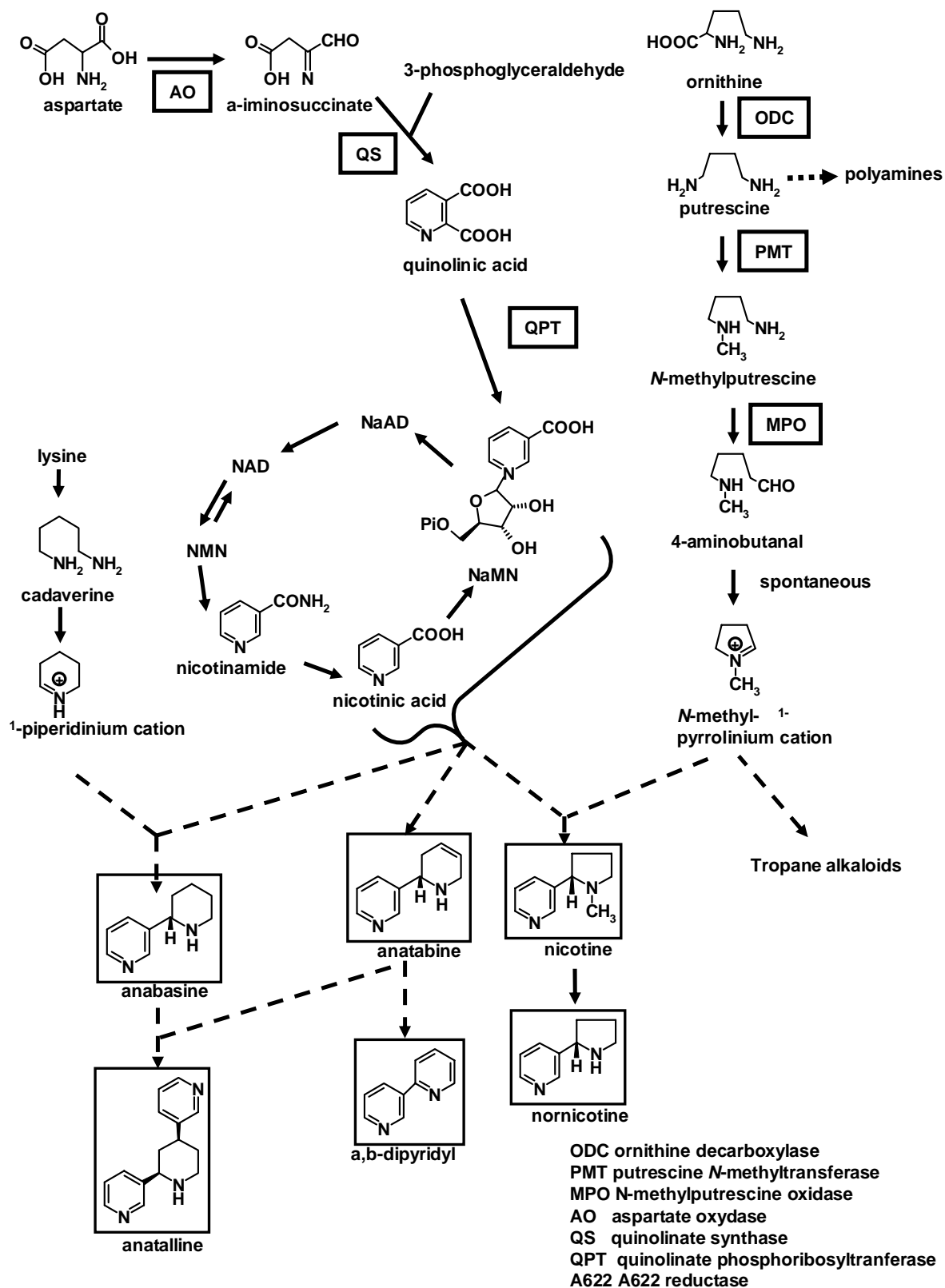


図1 ニコチン生合成経路図

ニコチンは *N*-methyl-<sup>1</sup>-pyrrolinium cation と NAD 生合成の代謝中間体が縮合することで生合成される。四角で囲ったニコチン生合成酵素は *Nic* によって遺伝子発現制御されている。*Nicotiana* 属ではノルニコチン、アナバシン、アナタピンなどのニコチンアルカロイドも生合成されている。



A



wild type

*nic1nic2*

B

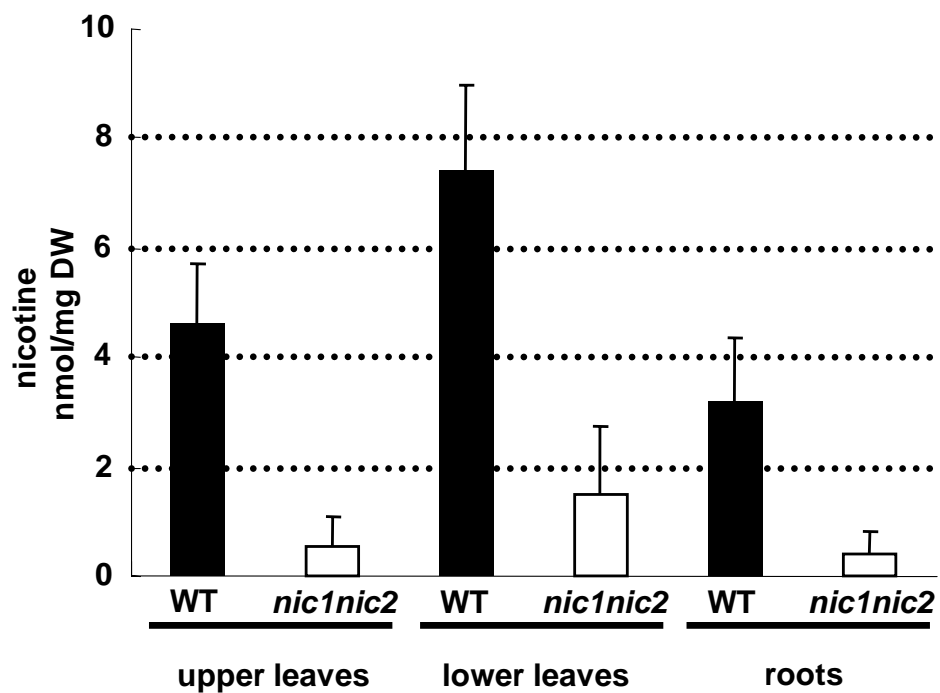


図2 *N. tabacum* cv. Burley21 の野生型と *nic1nic2* 変異体の表現型とニコチン含量

A 野生型と *nic1nic2* 変異体の表現型の比較

B 野生型と *nic1nic2* 変異体の上位葉、下位葉および根におけるニコチン含量の比較

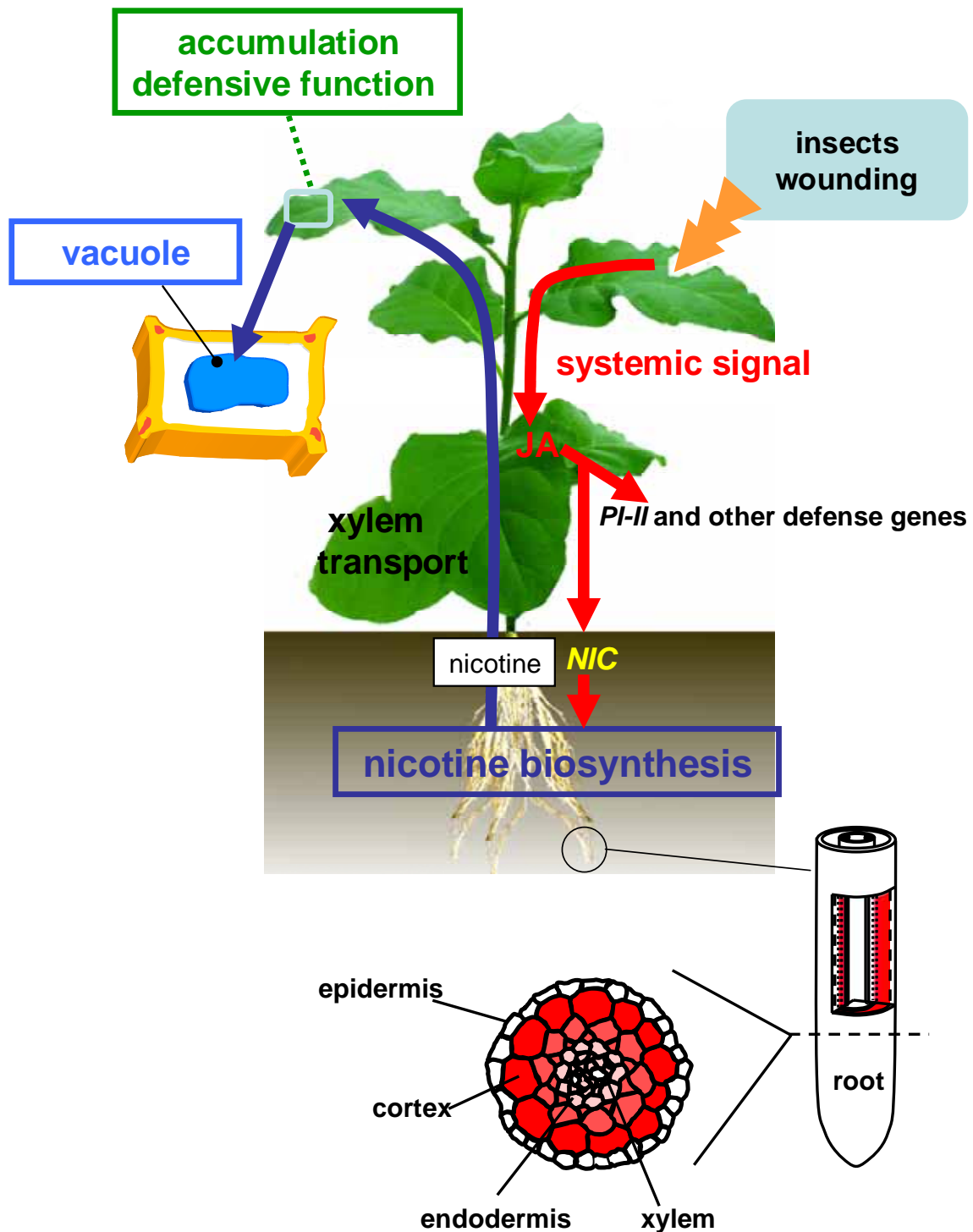


図3 タバコ植物体におけるニコチン生合成

ニコチンはタバコの根で生合成され地上部へ転流され葉の液胞に蓄積する。植物体が傷害ストレスを受けるとジャスモン酸を介したシグナルによってニコチン生合成が活性化される。ニコチン生合成酵素 PMT や A622 は *Nic* 依存的に根の cortex、endodermis、parenchyma 細胞に発現する。

## 材料と方法

### 植物材料

発現解析には *Nicotiana tabacum* cv. Burley 21 および低ニコチン変異株である *N. tabacum* cv. Burley 21 の *nic1Nic2*, *Nic1nic2*, *nic1nic2* の 4 遺伝型のタバコ植物体を用いた。それぞれの種子を一晩吸水させたのに、20%次亜塩素酸ナトリウムで5分滅菌後、滅菌水で3回以上洗浄したのち、0.3% (W/V) gellan gum、1.5% (W/V) sucrose を含む 1/2 B5 培地(Gamborg et al., 1968)に播種した。発芽後、同様の培地を入れた Agripot に植物体を移し 26°C の恒温室内にて明期 16 時間/暗期 8 時間の条件で 4 週間培養した。*N. tabacum* cv. NC95 の野生型と *nic1nic2* 変異体も同様の方法で培養した。

ゲノミックサザン解析に用いた *N. tabacum* cv. Burley 21、*N. tabacum* cv. SR-1、*N. sylvestris*、*N. tomentosiformis* は前述と同様に無菌的に播種した後、播種後 2 週間以上培養した芽生えを Metro-Mix 350 : vermiculite : Loamy soil = 1 : 2 : 1 の培養土に移し、28 °C の温室して培養した。

培養細胞における解析には *N. tabacum* cv. Bright Yellow No.2 由来の培養細胞ライン、タバコ BY-2 細胞(Nagata et al., 1992)を用いた。タバコ BY-2 細胞は液体培養条件下では 27 °C 180rpm 暗所での培養を行い、一週間ごとに 100 ml の改変 LS 培地に 1ml ずつ継代培養した。固体培地での培養条件は 1.5% Agar を含む改変 LS 培地 (1X MS salt、0.2g l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.1g l<sup>-1</sup> myoinositol、1mg l<sup>-1</sup> thiamine-HCl、0.2mg l<sup>-1</sup> 2,4-dichlorophenoxyacetic acid、30g l<sup>-1</sup> sucrose、pH5.8、以下 MLS 培地と略す)にて 27 °C 暗所にて培養し、約 2 週間ごとに継代培養を行った。

### Genomic southern blot 法による解析

*N. tabacum* cv. Burley 21、*N. tabacum* cv. SR-1、*N. sylvestris*、*N. tomentosiformis* の 4 種類の *Nicotiana* 属からゲノム DNA を 2% (W/V) cetyl trimethyl ammonium bromide (CATB)、1.4 M NaCl、20 mM EDTA、0.2% (w/v) 2-mercaptoethanol、Tris-HCl, pH8.0 を用いた CTAB 法により調整した。抽出したゲノム DNA を *Hind*III、*Eco*RI、*Bam*HI、*Xba*I で処理し、0.8% agarose gel を 1X TBE buffer で電気泳動により分離した。分離後 Hybond-N<sup>+</sup>メンブレンへ 0.4 M NaOH、1 M NaCl で DNA を変性、18 時間トランスファーさせた。その後メンブレンを 1.5 M NaCl、0.5 M Tris, pH7.0 で中和後、UV cross link させた。プローブ、ハイブリダイゼーションおよび検出には northern blot 法と同様の手順で行った。

## 障害処理およびメチルジャスモン酸処理

植物体に対する各処理に関しては以下のように行った。障害処理方法として無菌状態で培養した植物体の第 5、6 葉の主脈に対して対象にルレットを用いて傷をつけた (Baldwin and Ohnmeiss, 1994; Cane et al., 2005)。処理後、24、36、48 時間ごとに植物体の傷をつけた葉および根を回収した。メチルジャスモン酸処理方法としてコットンボールに 0.5 ml の 100  $\mu$ M のメチルジャスモン酸を吸わせたものを Agripot 内に入れ密封した (Shoji et al., 2000)。処理後、24、36、48 時間ごとに植物体の第 5、6 葉および根を回収した。また、処理前の植物体の葉および根を処理 0 時間として回収した。JEL1 遺伝子の葉における発現誘導性に関しては、葉を切り取り滅菌水また 20  $\mu$ M のメチルジャスモン酸の入ったシャーレに移した。傷害処理は滅菌水中で葉を切断することで処理を行った。

タバコ BY-2 細胞に対するメチルジャスモン酸処理として、7 日間培養した細胞を 10 ml 回収し 2,4-D を含まないホルモン無添加の MLS 培地 (以下、HF-MLS 培地と略す) で 2 度洗浄した後 HF-MLS 培地で 10 倍希釈し、通常の液体培養条件下にて 12 時間以上培養を行い、その後 dimethyl sulfoxide (DMSO) にて 50 mM に希釈したメチルジャスモン酸ストック溶液を 1/1000 量加え培養した。各時間培養した培養細胞を Miracloth (Calbiochem) を用いてろ過し細胞と培液体培地に分別を行った。液体培地はチューブに移し、液体窒素下で凍結後 -80  $^{\circ}$ C にて保存した。細胞は蒸留水で洗浄後アルミホイルに包み、液体窒素下で凍結後 -80  $^{\circ}$ C にて保存した。メチルジャスモン酸を加える前の培養細胞を処理 0 時間として回収した。

## Northern blot 法による発現解析

各植物体およびタバコ BY-2 細胞からの total RNA 抽出には QIAGEN Rneasy plant Mini kit (Qiagen) を用いた。各サンプルの 10  $\mu$ g total RNA を formaldehyde を含む 1% agarose gel を用いて電気泳動により分離させた。電気泳動後、Hybond-N<sup>+</sup>メンブレン (Amersham Pharmacia) に 10X SSC でトランスファーさせた。メンブレンを UV-cross link 後ハイブリダイゼーションに用いた。ハイブリダイゼーションには ULTRAhyb<sup>TM</sup> Ultrasensitive Hybridization buffer (Ambion) を用いた。42  $^{\circ}$ C で 30 分間プレインキュベートした後、各遺伝子のプローブを添加し 42  $^{\circ}$ C で 16 時間インキュベートした。その後 2X SSC、0.1% SDS で 42  $^{\circ}$ C 15 分間、0.1X SSC、0.1% SDS で 55  $^{\circ}$ C 15 分間、2 回洗浄を行い、余分なプローブを落とした。その後 BAS2500 image analyzer (Fuji Firm) を用いてシグナルを検出した。

*NtMATE1/2*に関しては、ORF領域を 5'-TATTTGCTTATGCGGTGAACTTCCC-3',

5'-TTGAAGCCAAGGCAATCTCAG-3'のプライマーセットにより増幅を行い、アガロースゲルで電気泳動後、ゲルからDNA断片を回収しDNAプローブとして用いた。*PMT*に関しては、(Hibi et al., 1994)を参考にしプローブ作成を行った。また*PI-III*に関しては、(Balandin et al., 1995)を参考にしプローブ作成を行った。*JEII*遺伝子は、ORF領域を5'-GTGGGAGATAAAGGAAAATG-3', 5'-GAACGAAATGAAGTGAAAGG-3'のプライマーセットで増幅し、同様にプローブを作製した。

各遺伝子断片に対して Random Primer DNA Labeling Kit ver. 2.0 (TaKaRa) を用いて<sup>32</sup>P-dCTP で標識した。標識後、sephadex G-50 (Amersham Pharmacia) を用いてプローブの精製を行った。

rRNA の検出には total RNA を電気泳動後 ethidium bromide による染色、または、UV-cross link 後のメンブレンを 0.02% (w/v) methylene blue、0.5M sodium acetate, pH 5.2 による染色を用いた。

## RT-PCR 法による発現解析

各サンプルから抽出したtotal RNAから一本鎖cDNAを合成しRT-PCR解析を行った。一本鎖cDNA合成にはSuperScriptII Rnase H-Reverse Transcriptase(Invitrogen)で行った。RT-PCRの温度設定は94°C 30秒、55°C 30秒、72°C 30秒に統一して行った。使用したプライマーセットは、*JEII*遺伝子と*NtMATE1/2*遺伝子に関してはノーザンプロット解析に用いたプライマーセットを使用した。*WIPK*遺伝子は、5'-ATCCTCGCCAGCAGTTAGCA-3', 5'-GGTCCGAGCAAGAAAATCCA-3'、*PI-II*遺伝子は5'-AGTTAGTTTCGTCGCTCATC-3', 5'-AAACGGGCAACTTATGGTAG-3'、*AO*遺伝子は5'-AATGAACGTGACCGTGGTAG-3', 5'-GCACATTAACACCCCACTCA-3'、*SPDS*遺伝子は、5'-GCTGGTTATTGGAGGAGGAG-3', 5'-GGCAAATGATGGCAAACAGA-3'、*ODC*遺伝子は、5'-CGTCTCATTCCACATCGGTAGC-3' , 5'-GGTGAGT AACAATGGCGG AAGT-3'、*SAMS*遺伝子は、5'-CCAGATTGCCAGGACTTGA-3', 5'-GAGAAGTCGGGGTTCATCACG-3'、*PMT*遺伝子は、5'-GCCATGATAATGGCAACGAG-3', 5'-TTAGCAGCGAGATAAGGGAA-3'、*A622*遺伝子は、5'-GTTTCTAGCCCCTCCAC CTT-3', 5'-TCATCCTCCTGATTCTTACCTTTAGAG-3'、*QS*遺伝子は5'-CGGTGGAGCAAAA GTAAGTG-3', 5'-GAAACGGAACAATCAAAGCA-3'、*QPT*遺伝子は5'-TCACTGCTA CAGTGCATCCT-3', 5'-TTAGAGCTTTGCCGACACCT-3'、*18S rRNA*遺伝子は5'-CCAGGTCCAGACATAGTAAGG-3', 5'-GATGACTCGCGCTTACTAGG-3'の各プライマーセットによって行った。

## $\beta$ -glucuronidase (GUS) レポーター遺伝子による発現解析

*NtMATE1* の組織、器官特異性発現解析をするために *NtMATE1* プロモーターに GUS 遺伝子を繋げたものを *N. tabacum* cv. SR-1 に形質転換した T<sub>2</sub> 世代を用いた (佐藤、修論、2004)。

形質転換タバコの種子を無菌播種し 5 日間培養したものを回収し、50mM potassium phosphate buffer, pH7.0 に浸し、その後染色液 (Shoji et al., 2000) に浸し 5 分間脱気を 2 回行った。脱気後 37 °C にて 1 時間反応させた。その後、100%、80%、70%、50%、20%のエタノールで各 30 分間ずつ処理を行い、10% glycerol でスライドガラスにマウントし、顕微鏡下で観察を行った。根の切片の作成は、染色後、20mM phosphate buffer, pH7.0 でリンスし、30 分間浸した。サンプルを 5% Agarose、1mM DTT、20mM phosphate buffer, pH7.0 に抱埋し DTK-1500 microslicer (DohanEM, Kyoto) でスライスした。スライスしたサンプルを 10% glycerol でスライドガラスにマウントし顕微鏡下で観察した。

## NtMATE1-GFP 融合タンパク質の細胞内局在解析

*NtMATE1* タンパク質の細胞内局在性を解析するために CaMV35S プロモーター制御下で *NtMATE1*-GFP (Green Fluorescent Protein) 融合タンパク質を恒常的発現する vector を以下の手順で作成した。*NtMATE1* の ORF 配列に制限酵素修飾配列を付加した DNA 断片を 5'-GGTCGACATGGGAAAAAGCATGAAG-3', 5'-CCATGGCTTCCTTGTTTAGAGGTCC-3' プライマーセット用によって増幅した。増幅した DNA 断片は、pGEM-T に TA クローニング後、シークエンスを確認した。この vector から *SalI* と *NcoI* で処理し ORF 領域を切り出し、pAVA393 (von Arnim et al., 1998) の *XhoI* と *NcoI* 領域に挿入することによって *NtMATE1* タンパク質の C 末端側に GFP5 を融合したタンパク質を発現できるようにした。その後、CaMV35S プロモーターから CaMV35S ターミネーター領域までを *HindIII* で切り出し、あらかじめ *HindIII* で処理しておいた pBIN19 (Frisch et al., 1995) に挿入した。このコンストラクションを *A. tumefaciens* strain EHA105 へ導入した。タバコ BY-2 細胞への導入は前述と同様の手順で行った。*NtMATE1*-GFP 融合タンパク質を発現する BY-2 細胞の選抜は実体蛍光顕微鏡を用いて行った。

実際の細胞内局在解析には、共焦点レーザー顕微鏡 Zeiss LSM510 confocal microscope (Wetzlar, Germany) を用いた。さらに液胞膜を染色、観察するため液体培養した形質転換 BY-2 細胞に *N*-3-triethylammoniumpropyl)-4-

(6-(4-(diethylamino)phenyl)hexatrienyl)-pyridinium dibromide (FM4-64; Molecular Probes Inc., Eugene, OR, U.S.A.) を 32  $\mu$ M 加え 12 時間インキュベートした後に観察を行った (Kutsuna and Hasezawa, 2002)。

## NtMATE1 過剰発現 BY-2 細胞の作出

NtMATE1 過剰発現 BY-2 細胞を得るために、CaMV35S プロモーター制御下で NtMATE1 タンパク質を過剰発現する vector を以下の手順で作成した。NtMATE1 の ORF 配列に制限酵素修飾配列を付加した DNA 断片を 5'-GGTCGACATGGGAAAAAGCATGAAG-3', 5'-TCTAGATCATTCCCTTGTTTAGAGGTCC-3'プライマーセット用によって増幅した。増幅した DNA 断片は、pGEM-T に TA クローニング後、シーケンスを確認した。この vector から *SalI* と *XbaI* で処理し ORF 領域を切り出し、pAVA319(von Arnim et al., 1998)の *XhoI* と *XbaI* 領域に挿入した。その後、CaMV35S プロモーターから CaMV35S ターミネーター領域までを *HindIII* で切り出し、あらかじめ *HindIII* で処理しておいた pBIN19(Frisch et al., 1995)に挿入した。このコンストラクションを *A. tumefaciens* strain EHA105 へ導入した。

タバコ BY-2 細胞への形質転換方法は、(An, 1985)を参考に以下の手順で行った。7 日間液体培養したタバコ BY-2 細胞を MLS 培地に 4 ml 継代し 4 日間液体培養した。培養後 4 ml をシャーレに移し、YEB 培地で 28 °C、2 日間液体培養した *A. tumefaciens* 100  $\mu$ l を加えた。その後 28 °C 暗所で 2 日間共存培養を行った。共存培養後、100 ml の MLS 培地で 2 回洗浄した後、100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> の kanamycin および 250  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> carbenicillin を加えた MLS 固形培地上で 28 °C 暗所で選抜培養を行った。約 1 ヶ月後、生育してきた kanamycin 耐性 BY-2 細胞を新しい選抜培地で二次選抜を行った。その後選抜された BY-2 細胞から total RNA を抽出しノーザンブロット解析によって *NtMATE1* 過剰発現 BY-2 細胞を選抜した。その後の解析に用いるためにこれらの細胞は、抗生物質を除いた MLS 培地にて液体培養、継代を行った。

## NtMATE 発現抑制タバコ植物体の作出

NtMATE 発現抑制タバコ植物体を得るために、CaMV35S プロモーター制御下で恒常的にタバコ植物体内で RNA interference (RNAi)-based gene silencing を起こすための vector を以下の手順で作成した。*NtMATE1* の 3'-UTR 領域および ORF の C 末端を含む部分配列に異なる 4 種類の制限酵素修飾配列を付加した 2 種類の DNA 断片を 5'-CTCGAGAAGGTGGAGTGCGC-3', 5'-GGTACCTCAAGCTCTTTGCAA-3'のプライマーセットと 5'-TCTAGAAAGGTGGAGTGCGC-3', 5'-ATCGATTCAAGCTC

TTTGCA-3'のプライマーセットで PCR 法によって増幅した。各増幅 DNA 断片は、pGEM-T (promega)に TA クローニング後、シーケンスを確認した。これら DNA 断片を植物 RNAi 用 vector である pHANNIBAL(Wesley et al., 2001)のそれぞれの制限酵素ペア領域に挿入した。DNA 断片を挿入した pHANNIBAL からセンス鎖、 pdk intron、アンチセンス鎖を含む領域を *XhoI* と *XbaI* で処理後、あらかじめ *XhoI* と *XbaI* で処理した pUC18 に挿入した。その後 *BamHI* と *SacI* で処理後、あらかじめ *BamHI* と *SacI* で処理し  $\beta$ -glucuronidase 遺伝子を除去した pBI121 へ挿入した。このコンストラクトを *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 へ導入した。また、同様に Vector のみを導入した control となる形質転換植物体を得るために pBI121 を *A. tumefaciens* strain LBA4404 へ導入した。タバコ植物体への形質転換方法は以下の手順で行った。温室で育てた *N. tabacum* cv. SR-1 の葉を 10% 次亜塩素酸ナトリウム、1% tween-20 で 15 分間滅菌した後、滅菌水で洗浄したものを形質転換材料とした。形質転換方法にはリーフディスク法(Horsch et al., 1985)を用いた。T0 世代の植物体を 20 ライン得た後、根から total RNA を抽出しノーザンプロット解析により発現量の低下しているラインを選抜した。その自家受粉により T1 世代の種子を得た。これらの種子を用いて解析を行った。

## 抗 NtMATE 抗体の作成と精製

抗 NtMATE 抗体を作成するため NtMATE1 タンパク質の N 末端側の推定親水性領域に glutathione S-transferase( GST )タンパク質を融合したタンパク質を大腸菌より発現、精製し抗原とした。NtMATE1 タンパク質の N 末端側 (+1 bp ~ +120 bp) の領域に制限酵素修飾配列を付加した DNA 断片を 5'-GGGATCGATGGGAAAAAGCATG-3', 5'-GAATTCTCACCTAAGGCGTCGAAAGTAG-3' プライマーセットによって増幅後、*BamHI* と *EcoRI* で処理し、pGEM6P-1( GE. Healthcare Bio-Sciences )の *BamHI* と *EcoRI* の領域に挿入した。その後挿入配列をシーケンスにより確認した。これにより GST タンパク質の C 末端側に NtMATE の N 末端側親水性領域を融合させたタンパク質を大腸菌で発現させるコンストラクションを作成した。このコンストラクションを *Escherichia coli* strain BL21 へ導入した。形質転換大腸菌を LB 培地にて 37°C 前培養した後、1/100 量を 2X YT 培地に移し培養を行った。OD<sub>600</sub> = 0.6 になったときに 0.1 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside ( IPTG ) を加えタンパク質の発現を誘導させた。誘導 3 時間後、菌体を回収した。回収した菌体より 1X Phosphate-Buffered Saline( PBS; 137 mM NaCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ) 0.1% Triton X-100 溶液中で超音波処理により全タンパク質を抽出した。その後 12,000 x g で 10 分間遠心後、上清を回収しこれを全可溶性タンパク質とした。このタンパク質から Gultathione



Sepharose 4B ( GE. Healthcare Bio-Sciences, Little Chalfont, UK ) を用いて GST 融合タンパク質を精製した。精製後、PD-10 カラム ( GE. Healthcare Bio-Sciences, Little Chalfont, UK ) を用いて脱塩処理後、Q Sepharose Fast Flow カラムを用いて分離を行い共雑タンパク質の除去を行った。融合タンパク質のみのフラクションを回収し、限外濾過により濃度  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  になるように濃縮を行った。濃縮した融合タンパク質を SDS PAGE により確認した後にこれを抗原としてウサギに免疫した。抗血清の作成は QIAGEN に委託した。

作製した抗血清を以下の 3 段階の手順で精製を行った。まず、Protein A Sepharose fast flow ( GE. Healthcare Bio-Sciences, Little Chalfont, UK ) を用いて全 IgG 画分を精製した。2 段階目として、抗原に GST 融合タンパク質を使用したことから抗 GST 抗体を除去するために、あらかじめ大量に精製 GST タンパク質を結合させておいた Gultathione Sepharose 4B と全 IgG 画分をインキュベートし、その Flow-through を回収した。3 段階目として、(Lieberherr et al., 2005) を参考したアフィニティー精製を行った。抗原とした  $50\mu\text{g}$  GST 融合タンパク質を SDS-PAGE 後 Hybond-P membrane ( GE. Healthcare Bio-Sciences, Little Chalfont, UK ) にプロテイングし、そのメンブレンに対して 10 ml の抗血清を加え  $25^\circ\text{C}$  にて 8 時間インキュベートした。その後 Tris-buffered saline buffer ( TBS;  $137 \text{ mM NaCl}$ ,  $2.68 \text{ mM KCl}$ ,  $25 \text{ mM Tris}$ ,  $\text{pH } 7.4$  ) で 10 分間 5 回以上洗浄した。メンブレン上の抗原と結合した抗 NtMATE 抗体を  $2 \text{ mL } 0.1 \text{ M Glycine}$ ,  $0.15 \text{ M HCl}$  (  $\text{pH } 2.5\text{--}3.0$  ) で 1 分間溶出しすぐにその溶液を  $450 \mu\text{L } 0.5 \text{ M HEPES}$ ,  $\text{pH } 8.5$  で中和した。この作業を 5 回繰り返しタンパク質の多い画分をまとめ、これを精製抗 NtMATE 抗体として解析に用いた。

### シヨ糖連続密度勾配法による細胞内局在性の解析

無菌状態で生育させた *N. tabacum* cv. Burley 21 の根または液体培養 4 日目のタバコ BY-2 細胞を回収し、 $50\text{mM } 2\text{-}[4\text{-(2-Hydroxyethyl)-1-piperadinyll}] \text{ ethansulfonic acid}$  (HEPES)-KOH,  $\text{pH } 7.5$ 、 $5\text{mM EDTA}$ 、 $1\text{mM phenylmethylsulfonylfluoride}$ 、 $1\text{mM Dithiothreitol (DTT)}$ 、 $2\text{mM MgCl}_2$ 、 $0.25\text{M sorbitol}$ 、complete protease inhibitor (Roche, Meylan, France) にて  $4^\circ\text{C}$  で摩砕し、その後二重の Miracloth でろ過を行った。ろ液を  $7000\text{g } 15 \text{ 分間 } 4^\circ\text{C}$  で遠心し共雑物の除去を行い、これを全タンパク質画分とした。その後、 $100,000\text{g } 60 \text{ 分間 } 4^\circ\text{C}$  遠心し、可溶性タンパク質画分と全膜タンパク質画分とに分離させた。全膜タンパク質を  $50\text{mM HEPES-KOH}$ ,  $\text{pH } 7.2$ 、 $1\text{mM DTT}$ 、 $1\text{mM EGTA}$  で懸濁し、 $10 \text{ ml}$  の  $10\% \sim 50\%$  のシヨ糖連続勾配 (  $50\text{mM HEPES-KOH}$ ,  $\text{pH } 7.2$ 、 $1\text{mM DTT}$ 、 $1\text{mM EGTA}$ 、 $10\% \text{--}50\% \text{ sucrose}$  ) に重層させ、 $100,000\text{g } 16 \text{ 時間 } 4^\circ\text{C}$  で遠心した。その後、上層から  $0.8 \text{ ml}$  ずつ 13 fractions に回収した。回収した各画分を 6X SDS loading

buffer( 0.35 M Tris-HCl, pH 6.8、10.28% (w/v) SDS、36% (v/v) glycerol、0.6 M DTT、0.012% bromophenol blue ) と混ぜ、100 °C 5 分間処理し、SDS-PAGE 用サンプルとした。

SDS-PAGE で分離後 Hybond-P membrane に転写し、Blocking buffer ( 1X TBS、1% Bovine Serum Albumin (BSA)、0.1% TritonX-100 ) で室温にて 1 時間以上浸しブロッキング処理をした。その後 Blocking buffer に一次抗体を加えたもので室温にて 1 時間以上穏やかに振とうした。その後メンブレンを washing buffer( 1X TBS、0.1% TritonX-100 ) で 4 回洗浄した。二次抗体反応として Blocking buffer に Anti-Rabbit Ig, HRP-Linked Whole Ab Donkey ( GE. Healthcare Bio-Sciences ) を加えたもので室温にて 1 時間穏やかに振とうした。Washing buffer にて 4 回以上洗浄した後 ECL-Plus kit ( GE. Healthcare Bio-Sciences, Little Chalfont, UK ) にてタンパク質を検出した。各抗体に関しては以下の通りである。抗 NtMATE 抗体は 1000 倍に希釈したもの、抗 P-ATPase 抗体および抗 V-ATPase 抗体は 3000 倍に希釈したもの、抗 Anti-BiP 抗体は 10000 倍に希釈したものをを用いた。二次抗体には、抗ラビット IgG-HRP 抗体 ( GE. Healthcare Bio-Sciences ) を 20000 倍希釈したものをを用いた。

### 免疫電子顕微鏡法による NtMATE の局在解析

野生型および NtMATE1 過剰発現タバコ BY-2 細胞を 3 日間培養したもの、または MeJA 処理を行ったものを flat specimen carrier に置き、高圧凍結装置( EM-PACT; Leica Microsystem ) にて凍結した。凍結したサンプルを 1% glutaraldehyde、1% OsO<sub>4</sub> を含む anhydrous acetone を用いて -80 °C で 3、4 日間固定した。サンプルの入っているチューブを automatic freeze-substitution system (EM-AFS; Leica Microsystems) を用いて 3 段階に分けて 4 °C まで加温した ( step 1; -20 °C まで 3 °C h<sup>-1</sup>、step 2; 4 °C まで 1 °C h<sup>-1</sup>、step 3; 4 °C で 2 h )。その後 100% acetone、100% methanol で洗浄し LR White resin に抱埋した。超薄切片の作成は、Follet-Gueye et al., 2003 に従った。超薄切片のグリッドを .5 M NaIO<sub>4</sub> で 30 分間処理しその後、DW で 10 分間 2 回洗浄した。その後 0.1N HCL で処理し DW で洗浄し、0.1 M glycine、0.1% Triton X-100 で 15 分間処理した。TBS で洗浄後 TBS、10% BSA でブロッキング処理を室温で 30 分間行った。一次抗体反応として精製した NtMATE 抗体を TBS で 50 倍に希釈もので一晩処理した。TBS で洗浄後、二次抗体反応として goat anti-rabbit IgG に直径 18 nm colloidal gold particles で標識したものをを用いた。その後 TBS で洗浄後、DW でリンスした。4% aqueous uranyl acetate で染色した後、透過電子顕微鏡 ( model 1010EX; JEOL ) 80 kV で観察した。透過電子顕微

鏡写真は Gatan DualView camera と Gatan Digital Micrograph software を用いて撮影した。

## アルカロイドの抽出方法

アルカロイドの抽出は以下の手順で行った。回収、凍結したタバコの組織およびタバコ BY-2 細胞を 2 日間凍結乾燥させた。凍結乾燥させたサンプル 10 mg ml<sup>-1</sup> に 0.1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を加えガラスホモジナイザーで摩砕し 20 分間超音波処理を行った。その後 12,000g 10 分間遠心し上清を回収して余分な組織片を取り除いた。上清 1 ml に対して 25% NH<sub>4</sub>OH を 0.1 ml 加えよく混ぜ合わせ中和した。中和後のサンプルを 12,000g 10 分間遠心し上清を Extrelut-1 column (Merck) に入れた。その後 10 分間室温で放置した後、1 ml の chloroform を加え室温 10 分間放置し 6 ml の chloroform を入れアルカロイドを溶出した。溶出したサンプルを 37 °C で乾燥し 0.1% dodecane (Wako) を含む ethanol で溶出しガスクロマトグラフィー用のサンプルとした。また、タバコ BY-2 細胞、タバコ毛状根の培地および導管液は、直接 Extrelut-1 column に入れ同様の手順にてサンプル調整を行った。

## ガスクロマトグラフィーによるタバコアルカロイドの測定

ガスクロマトグラフィーは GC-14A (Shimadzu) を用いた。全アルカロイドの測定には Rtx-5 Amine capillary column (Restek; I.D. 0.25mm, df 0.50 μm, 30 m) を用いた。ガスクロマトグラフィーの昇温条件は以下の通りである。

100 °C, 10 min, 150 °C, 25°C min<sup>-1</sup>, 170 °C, 1 °C min<sup>-1</sup>, 300°C, 30°C min<sup>-1</sup>, 300 °C, 10 min, インジェクター 250°C、ディテクター 300°C。

ニコチン光学異性体を分離、測定するために、GC-14A に supelco Chira-dex120( 60 m) を用いた。ガスクロマトグラフィーの昇温条件は以下の通りである。

80 °C, 5min, 150 °C, 10 °C min<sup>-1</sup> 170°C, 2°C min<sup>-1</sup>, 190°C 10°C min<sup>-1</sup>, 190°C 10min、インジェクター 220°C、ディテクター 300°C。

## 発現抑制毛状根の作出

無菌培養した pBI121 形質転換タバコと NtMATE-RNAi #24 のリーフディスクを培養した *Agrobacterium rhizogenes* strain 15834 と Murashige & Skoog (MS) 培地 (Murashige and Skoog, 1962) 上で 2 日間共存培養させた。その後リーフディスクを 250 μg ml<sup>-1</sup> claforan を含む MS 培地上で毛状根を発根させた。毛状根をリーフディスクよ

り切り出し  $250 \mu\text{g ml}^{-1}$  claforan を含む B5 培地( 3% sucrose )上で生育させた後、pBI121 と RNAi line で生育速度が同じものを選び、固形 B5 培地 ( 3% sucrose ) 上で継代培養によりクローンを増やし、その後すべてを液体 B5 培地 ( 3% sucrose ) で  $28^\circ\text{C}$  で 2 週間振とう培養 ( 80 rpm ) した。培養後、毛状根および培地を回収し、液体窒素下で凍結させ  $-80^\circ\text{C}$  にて保存した。メチルジャスモン処理は回収する 2 日前に最終濃度  $20\mu\text{M}$  メチルジャスモン酸を加えた。

### タバコ導管液の回収と解析

1 ヶ月温室にて培養土で生育させたタバコ植物体を土壌から 3~4 cm のところで茎を切断し計 4 時間回収した。回収方法として、1.5 ml チューブにシリカウールを  $500 \mu\text{l}$  付近まで詰め込みチューブの底に小さな穴を開けた。そのチューブを切断面に置き切断面からの出液を回収した。切断から 2 時間たった後、切断面から 1 mm とところでカミソリで切り切断面を新しくし、さらに 2 時間回収を行った。4 時間後、チューブのフタを閉め、新しいチューブの上に重ねた。5000g 遠心することによりガラスウールに吸着した溶液を全て新しいチューブに回収した。回収した出液を 2 つに分割し、ニコチン含量の測定と遊離リン酸の測定を行った。遊離リン酸の測定には、Pi assay kit ( Phospha C-test, Wako ) を用いた。

### タバコ BY-2 プロトプラストを用いた液胞へのニコチン蓄積の解析

継代後 4 日間液体培養したタバコ BY-2 細胞を 2% Sumizyme C、0.2% Sumizyme AP2 (Shin-Nihonkagaku Industries Ltd., Anjo, Japan)、0.45M mannitol, pH5.5 で  $30^\circ\text{C}$  で 2 時間処理した。プロトプラストは 1 時間毎に顕微鏡下で観察し完全にプロトプラスト化しているものを用いた。酵素処理後、150g 3 分間  $20^\circ\text{C}$  遠心しプロトプラストを回収し 0.4M mannitol、HEPES-KOH, pH7.2、150g 3 分間  $20^\circ\text{C}$  で遠心し同様の作業を繰り返し 2 回洗浄した。洗浄後 0.4M mannitol、HEPES-KOH, pH7.2、10mM (-)-nicotine or 5mM ( $\pm$ )-nicotine を加えて  $27^\circ\text{C}$  で 1 時間穏やかに振とう培養した。培養後 0.4M mannitol、HEPES-KOH, pH7.2、 $4^\circ\text{C}$  で 2 回洗浄を行った。これらの作業は全て氷上または  $4^\circ\text{C}$  で行った。その後、( Shimaoka, 2002 ) を参考に液胞の単離を行った。単離した液胞は neutral re にて染色後顕微鏡下でカウントした。その後、前述のアルカロイド抽出方法と同様の方法を用いて抽出、Extrelut-1 column で精製を行いガスクロマトグラフィー用のサンプルを調整した。

## carboxy-SNARF-1を用いた細胞質pHの測定

タバコBY-2細胞の細胞質pHの測定には蛍光pHプローブである5-(and-6)-carboxy SNARFR-1 (Molecular Probes/Invitrogen)を用いた。継代後4日間液体培養したタバコBY-2細胞を5  $\mu$ Mの5-(and-6)-carboxy SNARFR-1, acetoxymethyl ester(AM) (Molecular Probes/Invitrogen) in DMSOを加えたMLS培地で3時間培養した。carboxy - SNARF - 1 - AMは膜透過性であり、細胞内に入ると非特異的エステラーゼによってAMエステル基が切断され膜透過性がなくなり蛍光観察が可能になる蛍光物質である。

蛍光観察にはLSM 510 META ( Zeiss ) でArgon laser、514nmで励起させた。酸性側の波長 ( 580 ~ 591 nm ) を緑色 ( channel 1 )、塩基性側の波長 ( 623 ~ 634 nm ) を赤色 ( channel 2 ) の2波長で蛍光をモニターし、channel 1 / channel 2の比を算出した。細胞内pHのキャリブレーションをするためにionophore nigericin、 $K^+$ -buffer( 100 mM KCl, 50 mM MES/HEPES, 10 $\mu$ M nigericin ) で処理することにより細胞外pHと細胞内pHが等しくさせた。あらかじめ5-(and-6)-carboxy SNARFR-1-AMを取り込ませたタバコBY-2細胞を様々なpHのnigericin &  $K^+$ -bufferで処理した。その後前述と同様に2波長の蛍光測定を行った。

これらの細胞内pHの測定とpHキャリブレーションは、すべて同じ細胞群を用いた。また、蛍光観察を行うArgon laserの条件、蛍光測定の条件、解像度の全ての同条件で、4回 ( 1秒間隔 ) で測定を行った。

## プロトン選択的ガラス微小電極による液胞内 pH の測定

タバコBY-2細胞の液胞内pHを測定するために(Yoshida et al., 2003))の方法に従い以下の手順で行った。

まずプロトン選択的ガラス微小電極を以下の手順で作成した。ガラスキャピラリー ( WPI, 1B100F-4 ) をアセトン中で超音波洗浄を行った後、超純水でリンスした。洗浄したガラスキャピラリーを垂直型プレーに2本セットし、15 Aで25秒間加熱した後10秒間かけて360°回転させる。自然冷却後、12 Aで引き伸ばした。片側を削り下り長管と短管に分けた。2極となった電極を200°C 1時間処理し、0.1% tetramethylsilane(TMS)-Cl、chloroformで長管に対してシラン化処理を行った。その後200°C 1時間処理した後、自然放冷させた。その後、2極の電極が外れないようにワックスで固定し、0.1% nitrocellulose in tetrahydrofuran ( THF )、 $H^+$ -ionophoreをシラン化した長管にキャピラリーシリンジで充填した。この電極を1晩デシケーター内でTHFを蒸発させた。実際に電極を使用する前に、nitrocelluloseを充填した長管に $H^+$ -ionophore

を0.2  $\mu$ lをキャピラリーシリンジで充填した。5分間脱気しガラス管の先端まで液が充填されているかどうかを確認した。その後未処理の短管に500mM KClをキャピラリーシリンジで全体に充填する。その後5分間脱気によって全体に液を充填させた。長管に500mM KCl、100mM MES、pH6.0 (TrisでpH調整を行った)をキャピラリーシリンジで充填させた。この際には先に充填させておいたH<sup>+</sup>-ionophoreの液面を崩さないように気をつけた。

完成したガラス微小電極を3M KClで満たした電極ホルダーに差込みプレアンプに接続し、短管側には別のプレアンプに接続された2% agarose、500mM KClを充填したチューブを差し込んだ。校正液を入れた容器に参照電極とガラス微小電極をいれpH校正を行った。用いた校正液の組成は、pH 4.0: 10mM DMG、10mM KCl ( Trisにて調整 )、pH 5.0: 10mM DMG、10mM KCl ( Trisにて調整 )、pH6.0: 10mM MES、10mM KCl ( Trisにて調整 )。

pHの測定には、WPI製エレクトロメーターで電位の測定をすることにより算出した。データはPowerLab/4spを通じChart for windows 5.0.1によって記録した。

タバコBY-2細胞の液胞内pHを測定するために、培養細胞をglass bottom dish( IWAKI ) poly-L-lysine (sigma)でコーティングしたもので固定させた。その後新しいMLS培地を加え、倒立顕微鏡下でpH測定を行った。液胞内pHを測定する際には、液胞にガラス微小電極を挿す前と後でpH 4.0、pH5.0、pH6.0の3段階校正を行い電極の精度を確認した。また、液胞内のpHを測定しているかどうかは、pHと同時に短管側の膜電位を計測することで確認した。

## 結果

### *Jasmonate Early Inducible 1 (JEI1)*

#### *JEI1* の配列解析

タバコの葉における *Nic* 遺伝子によって制御されているジャスモン酸応答性遺伝子が蛍光ディファレンシャルディスプレイ法によって単離された(高瀬、未発表)。その中に 1 時間のジャスモン酸処理した *nic1nic2* 変異体の葉において発現誘導性が低下した遺伝子として *JEI1* が単離された。その後単離された遺伝子断片をもとに 5'RACE 法により 1485bp の cDNA が同定され、この遺伝子は 463 のアミノ酸残基からなる推定 51kDa のタンパク質をコードしていた(図 4A)。DDBJ/EMBL/GenBank データベースを用いたドメイン解析の結果、N 末端側の 24 から 120 アミノ酸残基に BTB-POZ (Bric a brac, Tramtrack and Broad complex/POZ virus and Zing finfer)ドメイン、C 末端側 119 から 456 アミノ酸残基にかけて WD40 様ドメインを持つことが分かった(図 4A)。ホモロジー解析の結果、シロイヌナズナの At5g41330、At3g09030、At4g30940、At2g24240 タンパク質と高い相同性を示すことがわかった。At5g41330 タンパク質とは 79% といった非常に高い相同性を持っていた(図 4B)。これらのシロイヌナズナのタンパク質はアラビドプシスのゲノム内に 76 個存在するとされる BTB ドメインタンパク質の一種であるが、その機能は未だに分かっていない(Dieterle et al., 2005)。

#### *JEI1* 遺伝子の発現解析

蛍光ディファレンシャルディスプレイ法によってタバコの葉においてジャスモン酸の誘導性および *Nic* 遺伝子による発現制御が確認された *JEI1* 遺伝子に関して、ノーザンブロット解析および RT-PCR 解析によりタバコ栽培品種の Burley21 および NC95 の野生型、*nic1nic2* 変異体における発現解析を行った。それぞれの植物体を 1/2 B5 培地上で 2 ヶ月間生育後、メチルジャスモン酸処理を 1 時間行い、葉および根を回収し解析を行った。その結果、両栽培品種の野生型の葉において、メチルジャスモン酸処理 1 時間後に *JEI1* 遺伝子の誘導が確認された。それに対して *nic1nic2* 変異体の葉では、メチルジャスモン酸による発現誘導性が大きく低下していることが分かった(図 5A-C)。また、Burley21 の野生型および *nic1nic2* 変異体の根においてメチルジャスモン酸処理 1 時間と 24 時間の発現誘導性を観察したところ、野生型と *nic1nic2* 変異体においてジャスモン酸処理 1 時間後からの発現誘導性が確認された。しかしながら、*nic1nic2* 変異体の根における *JEI1* 遺伝子の発現誘導性は、野生型と比較して遺伝子の

発現誘導が弱いまたは遅れていることが示唆された(図5D)。それに対して、タバコの根において *Nic* 遺伝子によって制御されている *PMT* 遺伝子や後期の傷害応答性遺伝子である *Proteinase Inhibitor-II (PI-II)* 遺伝子は、メチルジャスモン酸処理後 24 時間で発現の増大が確認された。これらの結果より、*JEII* 遺伝子の発現は、葉・根において 1 時間といった短時間のメチルジャスモン酸誘導性と *Nic* 依存的な発現様式を持つことが分かった。その発現誘導性に対する *Nic* 遺伝子の制御度合いは葉と根では異なることが明らかになった。

タバコの葉でのメチルジャスモン酸による初期誘導性を解析するため、1/2 B5 倍地で 1 ヶ月間育てた Burley21 の葉に対してメチルジャスモン酸処理を行い 48 時間までの *JEII* 遺伝子の発現量の変動を RT-PCR により解析した。その結果、処理後 15 分で *JEI* の発現が増大し、その後徐々に減少していき、処理後 3 時間後には再び発現量が増大する、反復的な発現パターンを示した。さらに処理後 24 時間後には *JEII* 遺伝子は未処理葉での発現レベルまで低下していることが分かった(図6A)。これに対して、*Wound-Inducible Protein Kinase (WIPK)* 遺伝子や *PI-II* 遺伝子は、処理後 1 から 3 時間までの間に発現誘導性が見られた。このことから、*JEII* はメチルジャスモン酸に対してかなり早い初期応答性を示す遺伝子であることが示唆された。

物理的な傷害ストレスに対する発現応答性を観察するため、メチルジャスモン酸処理のときと同様に生育させたタバコ植物体の葉を回収し、滅菌水上で葉を切断し、時間ごとに葉を回収し RT-PCR による発現解析を行った。その結果、*JEII* 遺伝子は傷害処理後 15 分で発現の誘導性が観察され、メチルジャスモン酸処理による発現誘導性と同等な発現様式を示した(図6B)。傷害処理を施した場合の *WIPK* 遺伝子も同様の発現様式を示し、それに対して *PI-II* 遺伝子は障害処理後 3 時間後に発現の増大が観察された。

これらの発現解析の結果、*JEII* 遺伝子は、タバコの葉において *Nic* 遺伝子依存的にメチルジャスモン酸および傷害処理によって初期応答性を示し、既知の傷害初期応答性の *WIPK* 遺伝子とは異なる発現様式を持つ新規遺伝子であることが明らかになった。

## *Nicotiana tabacum* *Multidrug And Toxin compound Efflux transporter (NtMATE) 1/2*

### *NtMATE1/2* 遺伝子の配列解析

*NtMATE1* および *NtMATE2* 遺伝子はタバコ栽培品種の Burley21 の野生型と *nic1nic2*



変異体の根において *nic* 変異依存的に発現量の減少が観察される遺伝子として蛍光ディファレンシャルディスプレイ法によって単離された。(稲井、修士論文、2000)。

タバコの根の cDNA ライブラリーより単離された *NtMATE1/2* cDNA の ORF にはともに 500 アミノ酸残基のタンパク質がコードされていた。*NtMATE1/2* は 96.4% の非常に高いアミノ酸同一性を示すタンパク質であり、DDBJ/EMBL/GenBank データベースを用いた解析および TMHMM プログラム (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) による解析の結果、12 個の推定膜貫通領域を持ち、Multidrug And Toxin compound Extrusion transporter family と相同性を持つことが分かった(図 7)。*NtMATE1/2* のアミノ酸配列から推定される構造は、他の生物の MATE 型トランスポーターと同様な構造をしており、膜貫通領域間の親水性領域は非常に短く、比較的長い親水性領域は N 末端、C 末端側にしか存在しないことが分かった(図 7 B)。

*NtMATE1/2* とこれまでに報告されている代表的な MATE 型トランスポーターとの進化系統樹を作成した(図 8)。*NtMATE1/2* はシロイヌナズナの At1g61890、At3g21690 と非常に近縁であり、解析報告がある中では、TRANSPARENT TESTA 12 (TT12) と非常に近いことが分かった。TT12 は、その変異体の解析からシロイヌナズナ種子外皮におけるプロアントシアニン前駆体の液胞への隔離の少なくとも一部を担うトランスポーターとされている(Debeaujon et al., 2001)。他の生物種ではトマトの TT12 ホモログである MTP77 がある。シロイヌナズナの AtDTX1、ALF5、EDS5、FRD3、ヒトの hMATE1、*Vivrio parahaemolyticus* の NorM とは異なるクラスターに存在することが分かった。

## NtMATE1/2 のゲノムサザン解析

タバコ染色体上のコピー数およびその遺伝子の由来を解析するため、*N. tabacum* および祖先種として考えられる *N. sylvestris* と *N. tomentosiformis* においてゲノムサザン解析を行った。それぞれの植物体よりゲノム DNA を抽出し、*NtMATE1/2* の cDNA 上に切断部位が存在しない *Bam*HI、*Eco*RI、*Xba*I 制限酵素によって完全消化後、*NtMATE1* の ORF 領域の一部をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。その結果、*N. tabacum* において *NtMATE1/2* 意外に非常に類似した配列を持つ遺伝子の存在がないことが示唆された(図 9)。また、祖先種である *N. sylvestris* と *N. tomentosiformis* にもそれぞれ *NtMATE1/2* に近い DNA が存在し、*NtMATE1/2* 両遺伝子が栽培品種特異的な遺伝子ではなく祖先種から遺伝したものであることがわかった。

## NtMATE1/2 のタバコ植物体における発現解析

*NtMATE1/2* 遺伝子の *Nic* 依存的な発現様式に関して解析を行った。ノーザンブロット解析によって Burley21 品種の異なる *Nic* 遺伝子型における *NtMATE1/2* 遺伝子の発現解析を行った。その結果、*NtMATE1/2* 遺伝子の発現量は *Nic1Nic2* > *Nic1nic2* > *nic1Nic2* > *nic1nic2* の順に減少していた (図 10 A)。これより *NtMATE1/2* は、*Nic1*、*Nic2* ともに発現制御を正に受けているとともに、その効果は *Nic1* の方が大きいことが分かった。

次に、野生型および *nic1nic2* における組織特異的な発現様式に関して解析を行った。その結果、*NtMATE1/2* は根特異的に正の *Nic* 制御を受けていることが分かった (図 10 B)。これらの発現様式は、*PMT* や *A622* といったニコチン生合成酵素遺伝子と同様な *Nic* 制御を受けている遺伝子であることを示していた。

ニコチン生合成は、タバコ植物体が葉に障害を受けたときにジャスモン酸を介したシグナルが根に伝わり、ニコチン生合成関連遺伝子群の発現が増加し生合成が活性化する (Baldwin et al., 1994; Sinclair et al., 2004; Cane et al., 2005)。障害およびジャスモン酸処理をタバコ植物体に行ったとき、ニコチン生合成酵素遺伝子群の遺伝子発現は増大することが分かっていることから、*NtMATE1/2* も同様な処理による発現応答性を確認するため、Burley21 品種の野生型と *nic1nic2* 変異体の葉と根を用いたノーザンブロット解析を行った。障害処理は、ルレットを用いて処理することにより葉が病害虫に食われたときの障害を模倣できるという報告から同様な方法を用いた (Cane et al., 2005)。また、メチルジャスモン酸処理はコットンボールにメチルジャスモン酸をしみ込ませ、培養しているポットを密閉することで植物体全体にメチルジャスモン酸処理が行われるようにした (Shoji et al., 2000b)。その結果、野生型の根においてのみ *NtMATE1/2* 遺伝子の発現増大性が確認された。処理後 4 時間から遺伝子発現の増大が観察され、傷害処理では処理後 24 時間で遺伝子発現のピークに達し、処理後 48 時間に達すると減少していた (図 11)。また葉における *NtMATE1/2* の遺伝子発現は、それぞれの処理によっても確認されなかった。この発現様式は *PMT* 遺伝子に非常に類似したものであった。さらに *nic1nic2* における *NtMATE1/2* 遺伝子の発現応答性はほとんど確認されず、*PMT* 遺伝子が若干の発現応答性を示していることから、*NtMATE1/2* 遺伝子の傷害処理やメチルジャスモン酸処理による発現応答性は、*PMT* 遺伝子よりも *Nic* 依存的に厳しく制御されていることが示唆された。それに対してタバコの障害応答性遺伝子 *PI-II* 遺伝子は、それぞれの処理によって野生型と *nic1nic2* 変異体の葉と根ともに発現誘導性を示した。

タバコ BY-2 細胞は、メチルジャスモン酸処理によりニコチンおよびニコチン類縁体の生合成が誘導されることが知られている (Blechert et al., 1995; Imanishi et al., 1998)。そこで *NtMATE1/2* の遺伝子発現がタバコ BY-2 細胞でも同様に誘導性をもつかどうかノーザンブロット解析および RT-PCR によって確認した。その結果、既知のニコチン

生合成関連遺伝子と同様に発現誘導が確認された(図 12, 図 18A)。また、タバコ BY-2 細胞において *JEI1* 遺伝子がメチルジャスモン酸による初期応答性を示すことが示唆された。

### ***NtMATE1* プロモーターを用いた *GUS* レポーター遺伝子による発現解析**

タバコの根における *NtMATE1* の組織特異的な発現解析を行うため、*N. tabacum* cv. Burley 21 のゲノムより単離された *NtMATE1* プロモーター配列に *GUS* レポーター遺伝子による発現解析を行った。*NtMATE1pro::GUS* 遺伝子を形質転換した *N. tabacum* cv. SR-1 の T<sub>2</sub> 世代を用いた(佐藤、修論、2004)。その結果、根特異的な発現様式が観察されたことに加え、根の根端分裂領域には *GUS* の発現は観察されなかった(図 13 A, B)。さらに根の cross section や longitudinal section で染色様式を観察したところ、根端領域では endodermis や cortex で染色が確認され、分化領域では cortex の最外層においてもっとも強く染色が確認された(図 13 C-E)。*NtMATE1* プロモーターを用いた *GUS* レポーター遺伝子解析によって、根組織における組織特異的な発現様式もニコチン酵素遺伝子 *PMT*、*A622* のそれと類似することが分かった(Shoji et al., 2000a, 2002)。

### ***NtMATE1*-GFP 融合タンパク質による細胞内局在解析**

*NtMATE1* タンパク質の細胞内局在性を解析するために CaMV35S プロモーター制御下で *NtMATE1*-GFP(Green Fluorescent Protein)融合タンパク質を恒常的に発現する形質転換 BY-2 細胞を作製した。液体培養した形質転換 BY-2 細胞を FM4-64 で染色した。FM4-64 は脂肪親和性の蛍光プローブであり、エンドサイトーシスにより液胞膜に取り込まれる蛍光色素である。短時間では細胞膜を観察でき、添加後約 10 時間まではエンドサイトーシスの過程に生じる小胞が観察されるが、添加後 12 時間後あたりになるとほとんどの色素が液胞膜上に取り込まれ、液胞膜が観察できるようになる(Kutsuna et al., 1995)。*NtMATE1*-GFP 形質転換 BY-2 細胞を FM4-64 で 12 時間処理した後、FM4-64 と *NtMATE1*-GFP の蛍光を confocal microscopy によって観察した(図 14)。その結果、GFP 由来の蛍光は細胞内に膜状の分布を示した。GFP のみを発現した場合は、細胞質および核内にその蛍光が観察される(data not shown)が、*NtMATE1*-GFP 形質転換 BY-2 細胞では、細胞質、核ともに GFP 由来の蛍光は観察されなかった。また、その他の細胞膜および小胞上の細胞内器官への GFP 蛍光の局在は観察されなかった。細胞内の膜状の蛍光は FM4-64 由来の蛍光と重なりあうことから *NtMATE1*-GFP は液胞膜局在性を持つことが示された。

## 抗 NtMATE 抗体を用いたウェスタンブロット解析

抗 NtMATE 抗体を作成するため NtMATE1 タンパク質の N 末端側の推定親水性領域（図 7）に glutathione *S*-transferase (GST) タンパク質を融合したタンパク質を大腸菌より発現、精製し抗原とした。作製した抗体の評価を NtMATE1-GFP 形質転換 BY-2 細胞から調整した全膜タンパク質を用いて行った。その結果、NtMATE-GFP 形質転換 BY-2 細胞のみにおいてアミノ酸配列から推定される分子量と近い高分子量の位置にシグナルが検出されたことから、作製した抗体をタバコ植物体および BY-2 細胞における細胞内局在性の解析に用いた（図 15 A）。細胞内局在性解析には、*N. tabacum* cv. SR-1 の根と *CaMV35S* プロモーター制御下で NtMATE1 タンパク質を恒常的発現する *NtMATE1* 過剰発現 BY-2 細胞を作製し解析に用いた。抗 NtMATE 抗体を精製し、タバコの根および *NtMATE1* 過剰発現 BY-2 細胞より調整した全膜タンパク質をショ糖密度連続勾配法によって分画しウェスタンブロット法による細胞内局在解析を行った。その結果、抗 NtMATE1 抗体によるシグナルの分布は液胞膜のマーカである抗 V-ATPase 抗体のシグナル分布と非常に類似したものであった（図 15 B, C）。それに対し、細胞膜マーカである抗 P-ATPase 抗体や endoplasmic reticulum (ER) マーカーである抗 BiP 抗体のシグナル分布とは異なることから、NtMATE1 は、タバコの根およびタバコ BY-2 細胞においても液胞膜に局在することが示唆された。

## 免疫電子顕微鏡法による NtMATE の局在解析

精製した抗 NtMATE 抗体を用いて免疫電子顕微鏡法による NtMATE の局在解析を行った。その結果、メチルジャスモン酸処理を行い、ニコチン生合成を誘導したタバコ BY-2 細胞および *NtMATE1* 過剰発現 BY-2 細胞においてもそのシグナルのほとんどを液胞膜上に観察した（図 16）。また、そのシグナルの多くが細胞質側に存在し、抗 NtMATE 抗体は、NtMATE1 の N 末端領域を抗原とした抗体であることから NtMATE1 の N 末端および C 末端側の親水性領域が細胞質側に出るような形で液胞膜上に局在することが示唆された（表 1）。

## タバコ BY-2 細胞を用いたニコチン生合成の解析とニコチン輸送の観察

メチルジャスモン酸処理後 48 時間のタバコ BY-2 細胞の液体培地中および細胞内からニコチンアルカロイドを抽出しガスクロマトグラフィーによって測定した。タバコ植物体では、ニコチンが主要アルカロイドとして生合成されているのに対して、メチルジャスモン酸処理を施したタバコ BY-2 細胞においてはニコチン類縁体のアナタビ

ンが多く生合成されるようになる。また、タバコ植物体では非常に少なく蓄積されているアナバシン、アナタリンなどのニコチンアルカロイドの生合成量も増大する (Gossens et al., 2003)。メチルジャスモン酸処理 48 時間後の液体培地中のニコチンアルカロイドを測定した結果、ニコチン、アナバシン、アナタピンが細胞外へ排出されていることが分かった (図 17, 18)。

NtMATE1 のタバコ BY-2 細胞における機能を解析するため、野生型と *NtMATE1* 過剰発現 BY-2 細胞とのニコチンアルカロイドの細胞外へのニコチン排出量の変化を測定した。野生型と *NtMATE1* 過剰発現 BY-2 細胞 (NtMATE1-OX1、-OX5) の細胞にたいして、メチルジャスモン酸処理を 48 時間行い、細胞内および液体培地中のニコチンアルカロイドをガスクロマトグラフィーによって測定した。その結果、細胞内のニコチン、アナタピン、アナバシンが減少していた。それに対して、これらのニコチンアルカロイドの細胞外への排出量が増大していた (図 18 B)。細胞外へのニコチンアルカロイドの排出量の増大は、*NtMATE1* 過剰発現 BY-2 細胞における *NtMATE1* の発現量に対して正の相関があることが示唆された (図 18A)。

#### NtMATE1/2 発現抑制タバコにおけるニコチン輸送の変化

タバコ植物体における NtMATE1/2 の機能を解析するため、*NtMATE1/2* 遺伝子の部分 cDNA 配列を用いた RNAi 法によって恒常的に NtMATE1/2 遺伝子の発現が抑制されている *NtMATE1/2* 発現抑制タバコを作製した。ノーザンブロット解析によって *NtMATE1/2* 発現抑制タバコ (NtMATE-RNAi #18、#24) の根における発現抑制の効果を調べたところ、各ラインにおいて *NtMATE1/2* 遺伝子の発現抑制が起きていた (図 19 A)。また、NtMATE-RNAi #24 ラインの方が、#18 ラインと比較して発現抑制効率が高かった。

作製した *NtMATE1/2* 発現抑制タバコ (NtMATE-RNAi #18、#24) を用いて、葉と根のニコチン含量をガスクロマトグラフィーによって測定することで、生合成器官である根から蓄積器官である葉への輸送に対する *NtMATE1/2* 遺伝子の発現抑制の影響を調べた。これらの形質転換体およびコントロールとして pBI121 を導入した形質転換タバコを 1/2B5 培地で 1 ヶ月間生育させた後、それぞれの葉におけるニコチン含量を比較したところ、*NtMATE1/2* 発現抑制タバコの 2 ラインにおいてニコチン含量の低下が観察された。それに対して根のニコチン含量は増加していた (図 19 B,C)。このニコチン含量の変化度合いはそれぞれの *NtMATE1/2* 発現抑制タバコのラインにおける発現抑制度合いと正の相関関係にあることが示唆された。この結果から、*NtMATE1/2* 遺伝子を発現抑制させると葉へのニコチンの転流量が減少していることが示唆されたことから、導管液を回収し導管液中のニコチン含量を測定することで *NtMATE1/2*

発現抑制によるニコチン転流量の変化を調べた。それぞれの形質転換タバコを1ヶ月間、温室にて土を用いて生育させた後、第1葉より上部を茎から切断し、切断面から出る地下部から導管液をシリカウールにて回収しニコチン含量を測定し、導管液中の遊離リン酸含量当りのニコチン含量を比較することで転流量の変化を比較した。その結果、pBI121を導入し形質転換タバコと比較して、*NtMATE1/2* 発現抑制タバコの2ラインにおいてニコチン転流量の低下が観察された(図19C)。

### NtMATE1/2 発現抑制毛状根におけるニコチン輸送の変化

タバコ植物体に *A. rhizogenes* を感染させて得られるタバコ毛状根は、植物体の場合よりもニコチンアルカロイド生合成量が増大しかつ培地中に多くのニコチンアルカロイドが分泌・排出されている(Sevon et al., 2002)。作製した pBI121 形質転換タバコと *NtMATE1/2* 発現抑制タバコ (*NtMATE*-RNAi #24) に *A. rhizogenes* を感染させ形質転換毛状根をそれぞれ作出し、タバコ BY-2 細胞の場合と同様にニコチンの排出量の変化を調べた。

2週間液体培養したそれぞれの形質転換毛状根のニコチン含量と液体培地中のニコチン含量を測定した。その結果、メチルジャスモン酸処理をした場合、しない場合においても *NtMATE1/2* 発現抑制毛状根において培地中に分泌・排出されるニコチン含量が低下していた(図20)。しかしながら、毛状根内のニコチン含量にはほとんど変化は見られなかった。このことは、タバコ毛状根の場合、植物体よりもニコチン生合成が非常に活性化されている影響と考えられる。しかしながらニコチン生合成そのものが低下している可能性も否定できないが、エリシターに対する応答性が異なるなど毛状根は通常の植物体とは異なる性質をもつことも報告されている(Neill et al., 1994)。

### タバコ BY-2 プロトプラストを用いた液胞へのニコチン蓄積の解析

過剰発現 BY-2 細胞や発現抑制タバコの実験から、*NtMATE1/2* がニコチンの転流・排出に関与することが示唆されたことから、細胞内レベルにおける *NtMATE1* とニコチン輸送の関係に関し *NtMATE1* 過剰発現 BY-2 細胞を用いて解析を行った。タバコ BY-2 細胞はプロトプラスト化し、*S*-(-)-nicotine を含む pH7.2 付近の buffer 中で1時間インキュベートすることでニコチンを短時間で取り込むことが分かった(data not shown)。そこで、野生型および *NtMATE1* 過剰発現 BY-2 細胞 (*NtMATE1*-OX5) から調整したプロトプラストに(*S*)-(-)-nicotine を含む buffer で1時間インキュベートし、その後無傷の液胞を percoll 密度勾配遠心法によって単離し、液胞中のニコチン含量を測定した。その結果、*NtMATE1* 過剰発現 BY-2 細胞では液胞数当たりのニコチン含量が

低下していた(図 21)。

タバコ植物で生合成されているニコチンは、(S)-(-)-nicotine の形で存在する。それに対して光学異性体である (R)-(+)-nicotine はほとんど存在していない (Leete, 1983; Mesnard et al., 2001)。また、ベンジルイソキノリンアルカロイドの reticulín は液胞への蓄積にはイオントラップ機構ではなく (S)-reticulín のみが蓄積する光学異性体に対しての特異性をもつ (Deus-Neumann and Zenk, 1986)。そこで同様の方法で NtMATE1 が関与する輸送機構がニコチン光学異性体における特異性を示すかどうかを解析した。まず、ニコチン光学異性体をガスクロマトグラフィーによって分離する条件を検討し、キラルカラムによってニコチン光学異性体の分離測定方法を確立した(図 22 A)。野生型と NtMATE1 過剰発現 BY-2 細胞 (NtMATE1-OX5) から調整したプロトプラストを(±)-nicotine を含む buffer 中でインキュベート後、無傷の液胞を単離しキラルカラムによってニコチン光学異性体の蓄積量をそれぞれ測定した。その結果、ニコチン光学異性体に対しても特異性を示すことなく (±)-nicotine とともに蓄積量が低下していた(図 22 B)。

### NtMATE1 過剰発現による細胞内および液胞内 pH の変化

hMATE1 および NorM の研究から、MATE 型トランスポーターは organic cation /H<sup>+</sup> 交換輸送体であると考えられている (otsuka et al., 2005a, 2005b)。また、液胞は液胞型 ATPase や液胞型 PPase の働きにより細胞質に対して酸性に保たれていることから液胞膜に局在する NtMATE1 が H<sup>+</sup> 勾配に依存した交換輸送体である可能性を考えられた。そこで、NtMATE1 過剰発現 BY-2 細胞における細胞内 pH を蛍光 pH プロブである SNARF-1 を用いて測定を行った。SNARF-1 はアルゴンレーザー488nm または 514nm によって効果的に励起され、580nm 付近と 640nm 付近の蛍光強度の比を利用して pH の測定が可能な pH 感受性の蛍光色素である (Roos et al., 1998)。また、実験にはアセトキシメチル化された SNARF - 1 (SNARF-1 AM) を用いた。SNARF-1 AM は生細胞に対して膜透過性を示し、細胞内に取り込まれると細胞内のエステラーゼによって SNARF-1 に加水分解され生体膜に対する透過性が減少し細胞内に留まり細胞内の pH の測定が可能である (図 23 A)。

NtMATE1 過剰発現 BY-2 細胞 (NtMATE1-OX1、OX5) を SNARF-1 AM を取り込ませたのちに、共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光強度を測定し、細胞質の pH を算出した。その結果、野生型 BY-2 細胞では細胞質 pH がおよそ pH7.0 であったのに対し、NtMATE1-OX1 では pH6.6 に、より NtMATE1 が強く発現している NtMATE1-OX5 では、pH5.7 に減少していた (図 23 B)。SNARF-1 AM を用いたデータからそれぞれの液胞内の pH を測定しようと考えたが、SNARF-1 は中性付近に対して感受性の蛍光プ

ローブであるのに対して、液胞内の pH は通常 pH5.5 であるため測定が困難であると考え、ガラス微小電極法を用いた液胞内 pH の測定を行った。プロトン選択的ガラス微小電極を作製し顕微鏡下で野生型と NtMATE1-OX5 ラインの BY-2 細胞の液胞に刺し、直接的に液胞内 pH を測定した。その結果、野生型では液胞内の pH5.6 であるのに対して、NtMATE1-OX5 ラインでは、pH5.8 に上昇していた (図 23 C)。また、メチルジャスモン酸処理を 36 時間施したこれらの細胞における液胞内 pH を測定したところ、未処理の細胞と同様に液胞内 pH の上昇が観察された (data not shown)。



A

```

NtJE1      1 MPPFAGSNPLSYNFSRNSDSASNIITIDVGGQIFOTTKQTLKCSGSKLLSEITNFNDG
At5g41330 1 ----- MNFPTIPHESNVVSIIVGGRI FOTTKQTLGLAGTDSLLSOLATETI-
At3g09030 1 ----- MVVSDGGRVVKLVVGGELFEINASTIIGSSCPDSSLRALSTSTSH
Os03g0264700 1 ----- MEAAGAGGRRTYKQLVVGGKLPALAEASLP----- ILSLSP

NtJE1      61 VLP--FDRDPEFSLLSLLRYGNLPQKAKTFDIDDLFESQFTGVEHLINSCSNFS
47 --R--FYDRDPDLSVLTILRTGNLPARSRADVDRLDESRYVGLDPTDLSLNS
At5g41330 45 GSNPFFDRDPEFAMVLLNLRTRPANSSSGVSKKELDEAMYGVESLRLAAMPPP
At3g09030 39 SPNF FYDRDPALLSALLSATSAF---SAAPAPAGVLDFAHSYGLGDDLAASLPP
Os03g0264700

NtJE1      118 QFFPFDLKKSVIPLSRRNSPTAISTTDIGSVQVAHGCKITSPDWSLKRKSTIILQFAG
102 QFFPFDLRRSRIQLNQRDSSPSISPTVIQQQLVVAHGCKITSPDWSLRCKSTIILNFA
At5g41330 105 LLGFDARLVSTLVPAADGVPSALTATAGDASLVAHGCKIVYVDWLSLACTVRLNLD
At3g09030 95 LLGFDASRASTLSPPEPFPALAPRNDSGLCLAHGAGLITNYSPALQMLTIFRNLHR
Os03g0264700

NtJE1      177 IDSLISLSPGIVAAATDFSGQDI DVSCKFVKELTNWENITKSGSTVCAIQQSK-
162 VDSLELSPGIVAAATDFSGQDI DLDNCGVRTTLNWNITRSGSTVCAIQQSK-
At5g41330 164 ITRCRVWGEAATSGSASRHFYDLSRRVIGSTHATDPEPRTHKARVAAD-
At3g09030 154 ITRCRVWGEAATSGSASRHFYDLSRRVIGSTHATDPEPRTHKARVAAD-
Os03g0264700

NtJE1      232 -----DFLEISFESSRRNSNIMLYDLNDSFRPVAEI QHYEFGAELDSAI PAIKLW
At5g41330 218 -----DFLEISFESSRRNSNIMLYDLNDSFRPVAEI QHYEFGAELDSAI PAIKLW
At3g09030 220 ---SEGGVASTDQLHRENSVLOIDNSTLQVAAVGGSGNSAKTT---VPRKLRW
Os03g0264700 214 DAADKNSPLLAIFPQPHRENCILWFDPVTLKQIQLIGRTGSAAKSS...APGRVHL

NtJE1      286 SSHNLLMAASRHSGRSGVRCNRFWDI RSNVVMKEK-----VDCPSDCTVSD
At5g41330 271 GSCNLLVSSSHTSPSGVWGHRFWDRSRNIVVAEKEA-----QDCPSDCTVSD
At3g09030 271 PAKGLLVGSAYQKQVFCSSGYIRADPDRSNIVVAEKEA-----QDCPSDCTVSD
Os03g0264700 269 QELCLVFAAGVSGGAFVSGYIRADPDRSRNIVVAEKEA-----QDCPSDCTVSD

NtJE1      337 SAAILKYGVHSGGVFISDLRNIIGENSITCLGQDQKRVVTNGKKEPCKIKSHGQVFP
At5g41330 322 SAIVFYVGVTSQGVFVADLRSLGTKDPWVCLGEGKRNLNERRVQCKIISYGNHVP
At3g09030 330 DSIKFKVCSRSGLGMADRKSGSDPQVYMSDENFGAWKAGDSSYSVYHRYRQVLA
Os03g0264700 329 GQIKFKVCSRSGLGMADRKSGSDPQVYMSDENFGAWKAGDSSYSVYHRYRQVLA

NtJE1      395 KSGLEWASEVILSNSE-----KDRVFRKNSMGRAKILGKNTLHF
At5g41330 382 KESLEWASEVITLVENSS-----RDVLEERVFRKNSLGLADGKNTLGL
At3g09030 389 KSGLEWASEVILSNSE-----KDRVFRKNSMGRAKILGKNTLHF
Os03g0264700 384 RKDSLWASEVILSNSE-----KDRVFRKNSMGRAKILGKNTLHF

NtJE1      437 SFGGNKMFVTRKDDQFVFWQSSVRCF-----
At5g41330 430 AFGGNRMFVTRKDDQFVFWQSSVRCF-----
At3g09030 429 SFGGNKMFVTRKDDQFVFWQSSVRCF-----
Os03g0264700 444 SGGDRREFVTRKDDQFVFWQSSVRCF-----

```

B

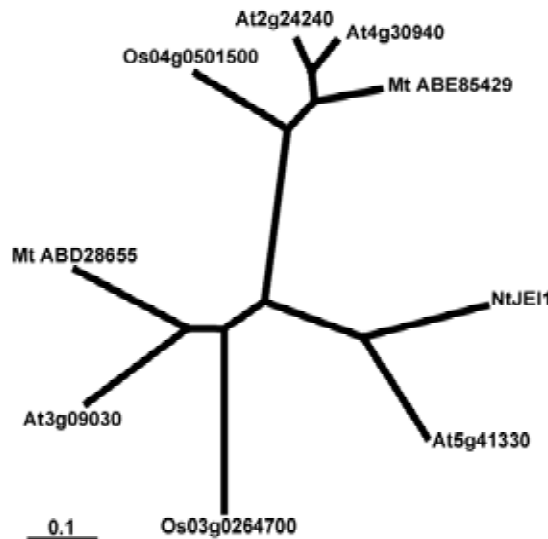


図4 JE11の配列解析

A JE11 遺伝子の推定アミノ酸配列と近縁タンパク質のアライメント。JE11 タンパク質の推定される BTB/POZ ドメインを黒線で WD40 様ドメインを点線で示している。

B JE11 タンパク質と近縁タンパク質との系統樹解析

*Arabidopsis thaliana* : At2g24240, At3g09030, At4g30940, At5g41330。 *Oriza sativa* : Os03g0264700, Os04g0501500。 *Medicago truncatula* : ABD28655, ABE85429。

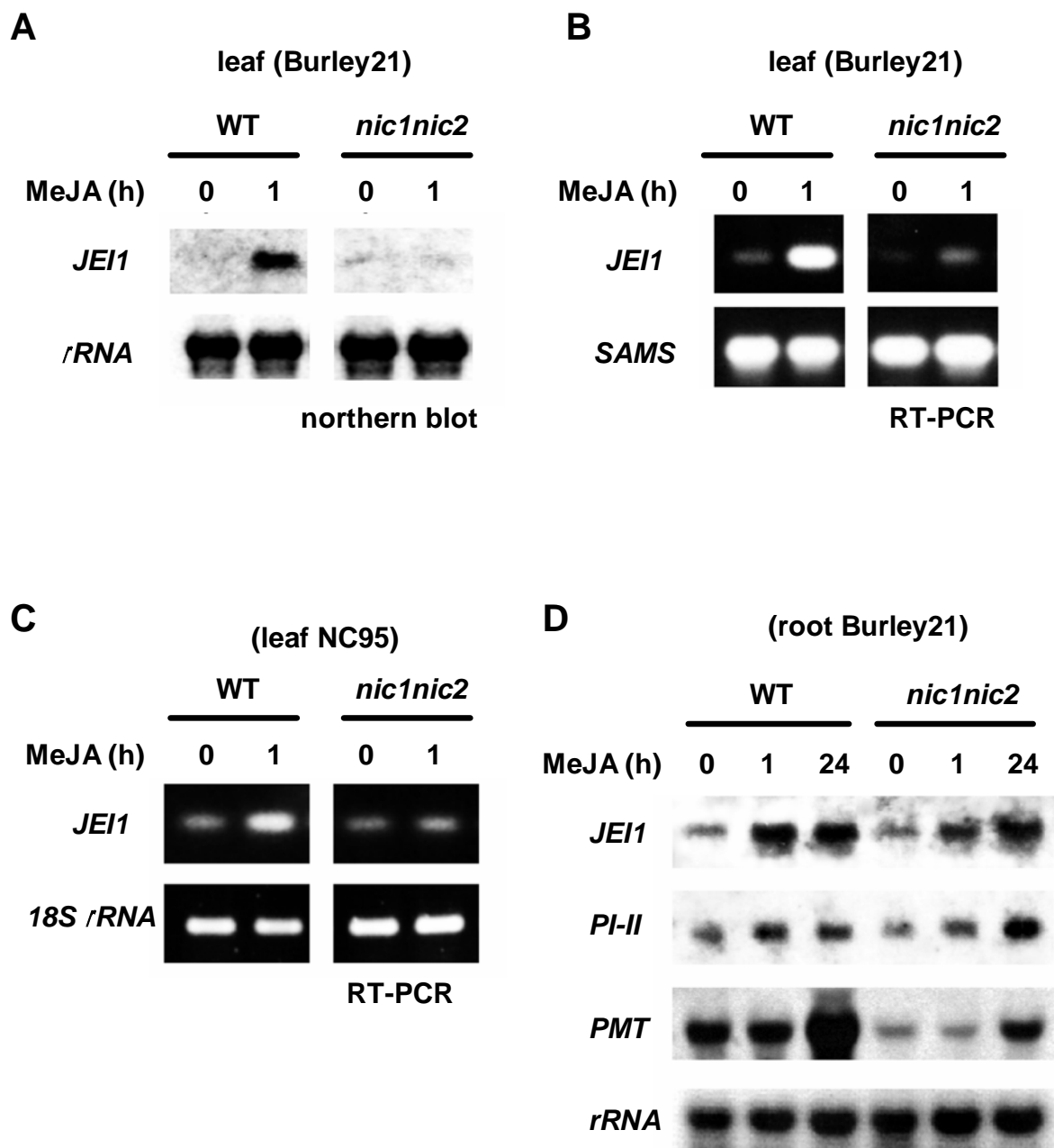


図5 *JEI1* 遺伝子の発現解析

A *N. tabacum* cv. Burley21 の野生型と *nic1nic2* 変異体の葉における *JEI1* 遺伝子のノーザンブロット解析

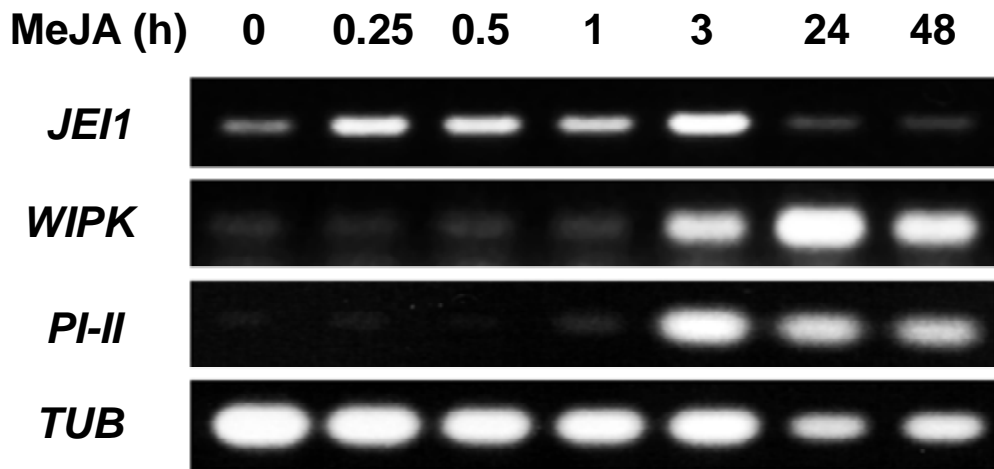
B *N. tabacum* cv. Burley21 の野生型と *nic1nic2* 変異体の葉における *JEI1* 遺伝子の RT-PCR 解析

C *N. tabacum* cv. NC95 の野生型と *nic1nic2* 変異体の葉における *JEI1* 遺伝子の RT-PCR 解析

D *N. tabacum* cv. Burley21 の野生型と *nic1nic2* 変異体の根における *JEI1* 遺伝子のノーザンブロット解析

*SAMS*: *S*-Adenosylmethinine Synthase *PI-II*: protease inhibitor-II

**A**



**B**

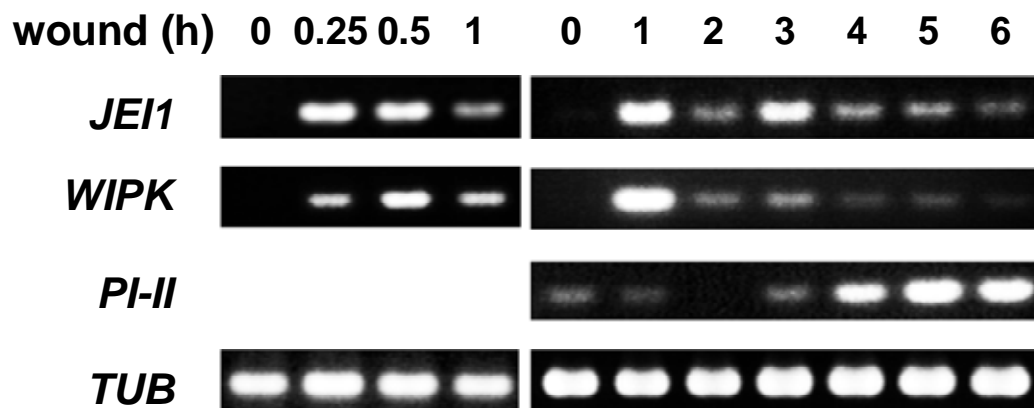


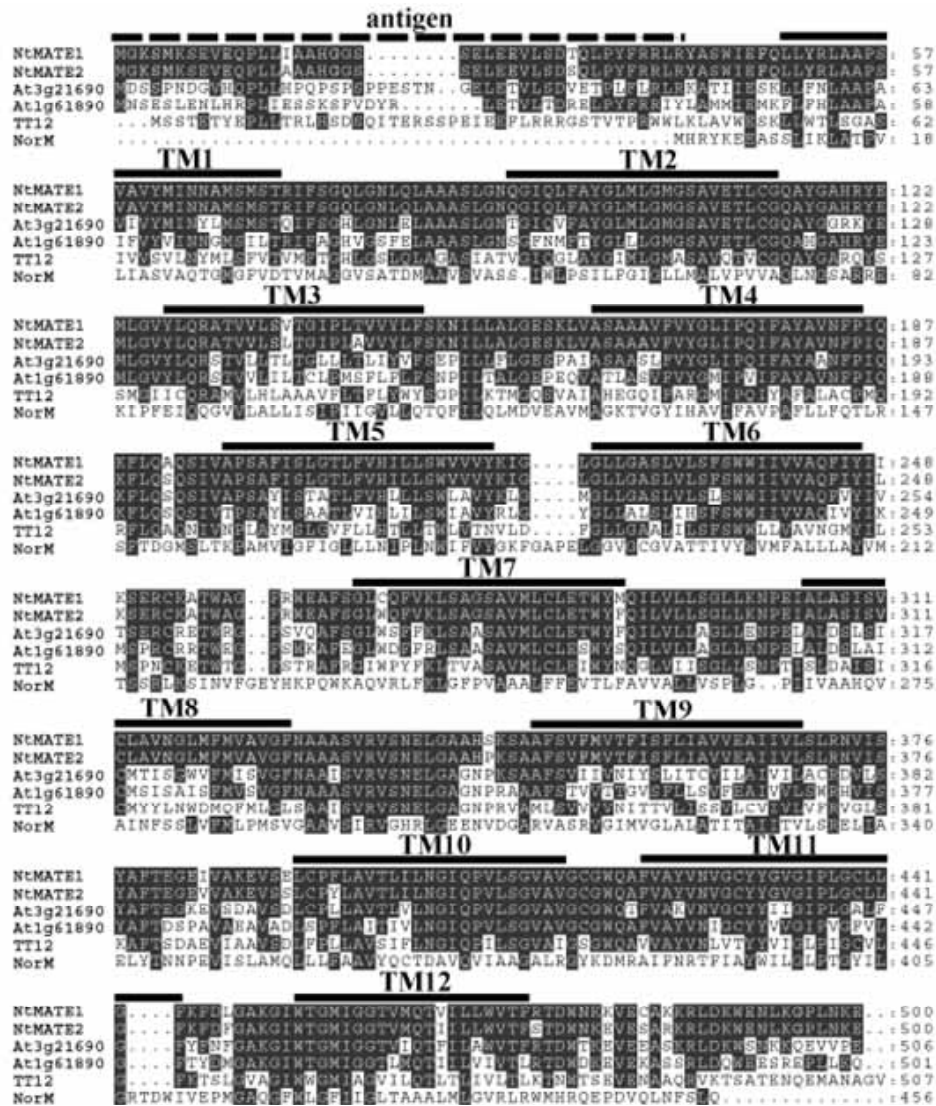
図6 *JEI1* 遺伝子の傷害およびメチルジャスモン処理による初期応答性発現解析

A *JEI1* 遺伝子のメチルジャスモン酸処理による初期応答性発現解析 (RT-PCR)

B *JEI1* 遺伝子の障害処理による初期応答性発現解析 (RT-PCR)

*WIPK* : wounding-inducible protein kinase    *TUB* : *N. tabacum*  $\alpha$ -tubulin

A



B

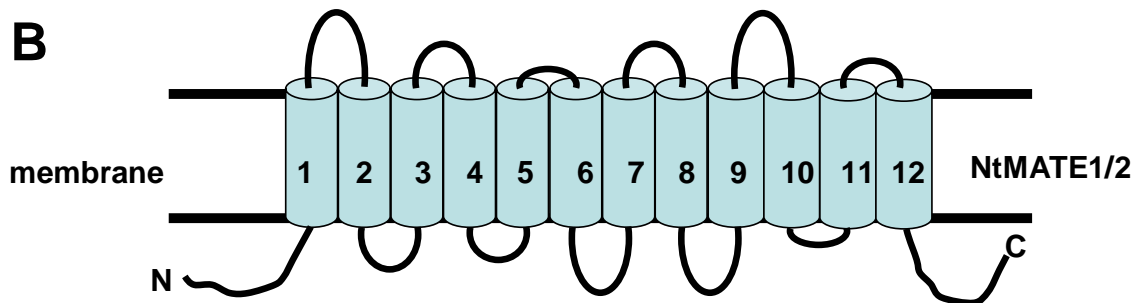


図7 NtMATE1/2 の配列解析

A NtMATE1/2 と近縁 MATE family とのアミノ酸配列アライメント。実線は TMHMM プログラムによって予測される推定膜貫通領域 (TM) を示す。

B NtMATE1/2 の予測タンパク質構造

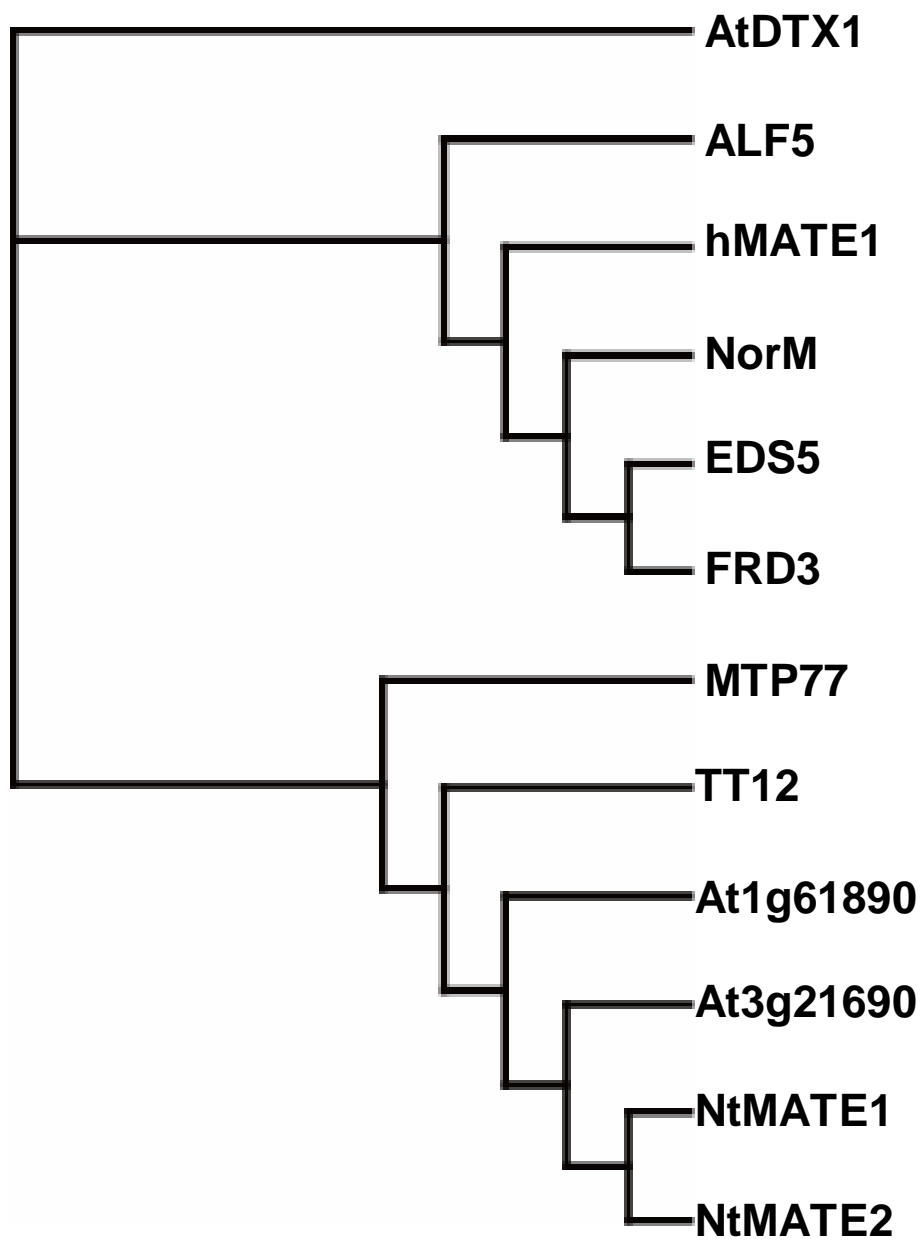


図8 NtMATE1/2 と近縁 MATE family との系統樹解析

NtMATE1/2 と他の生物種の近縁 MATE family との系統樹。

*A. thaliana* : Arabidopsis thaliana Detoxification 1 (AtDTX1), Aberrant lateral root formation (ALF5), Enhanced disease susceptibility5 (EDS5), Ferric reductase defective 3(FRD3), Transparent testa12 (TT12), At1g61890, At3g21690

human : hMATE1

*Vivrio parahaemolyticus* : NorM

*Lycopersicon esculentum* : MTP77

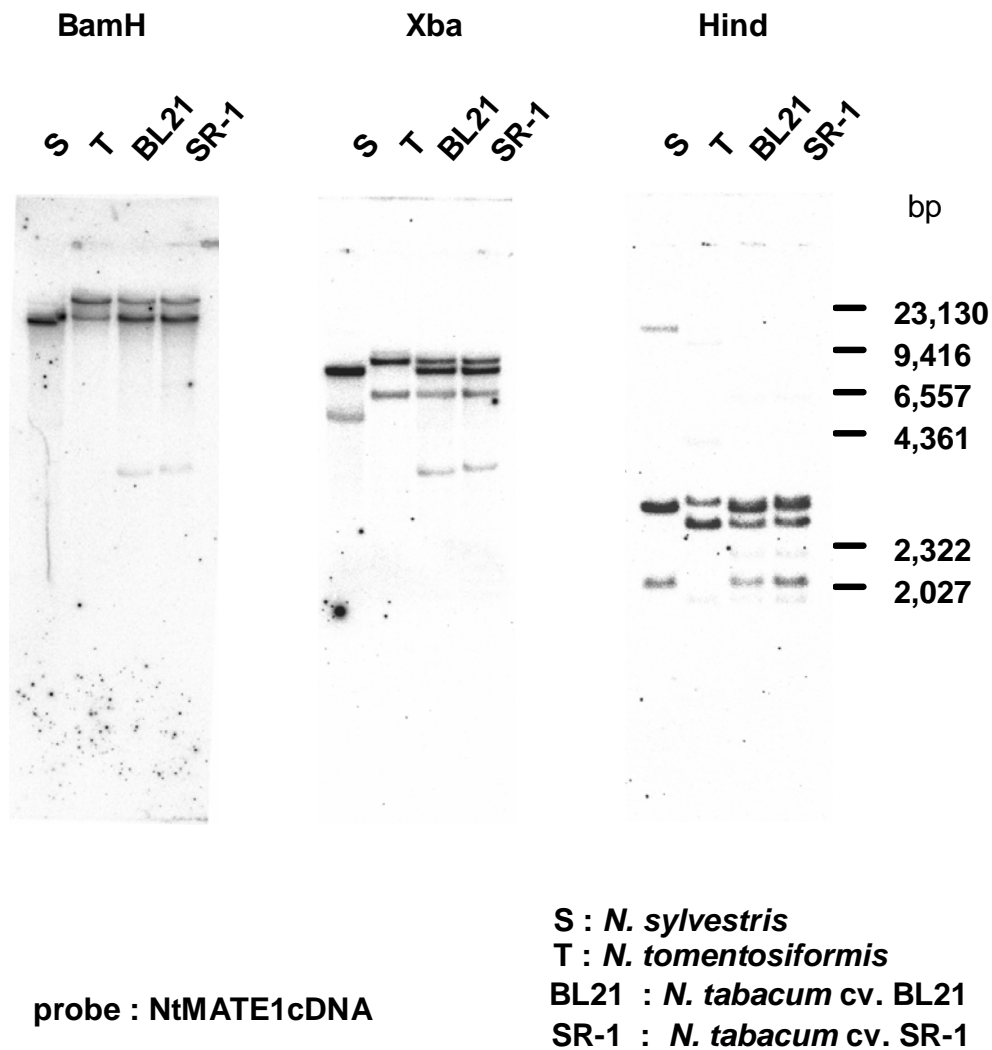


図9 *NtMATE1/2* のゲノムサザン解析

*NtMATE1/2* の *N. tabacum* cv. Burley21 および SR-1 と *N. tabacum* の祖先種として考えられる *N. sylvestris* と *N. tomentosiformis* におけるゲノムサザン解析。プローブとして *NtMATE1* の部分 cDNA 断片を用いた。

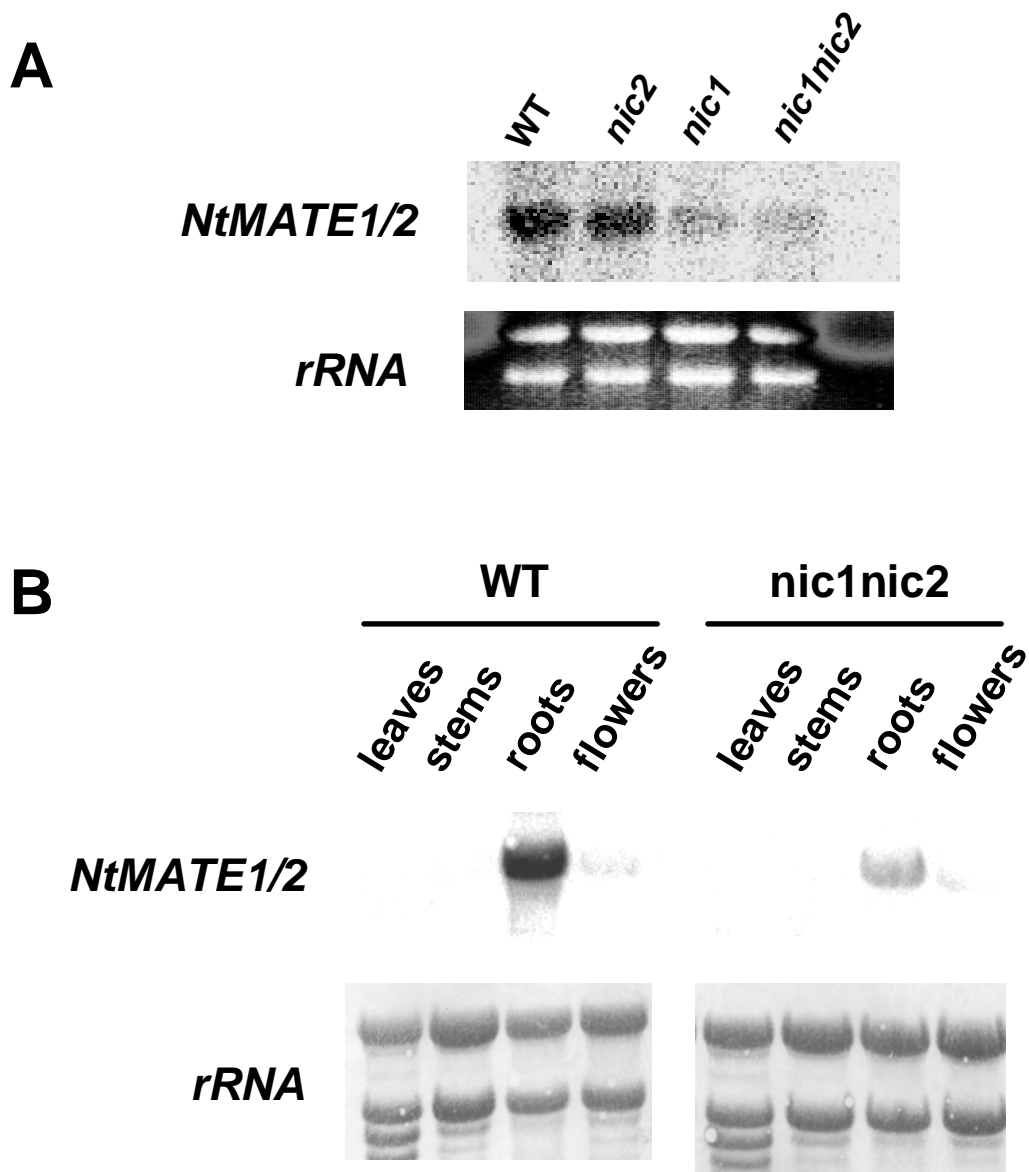


図 10 *N. tabacum* cv. Burley21 の野生型と *nic* 変異体における *NtMATE1/2* の発現解析  
 A *N. tabacum* cv. Burley21 における異なる *Nic* 遺伝子型における *NtMATE1/2* の発現解析  
 B *N. tabacum* cv. Burley21 の野生型と *nic1nic2* 変異体での *NtMATE1/2* の器官特異的発現解析

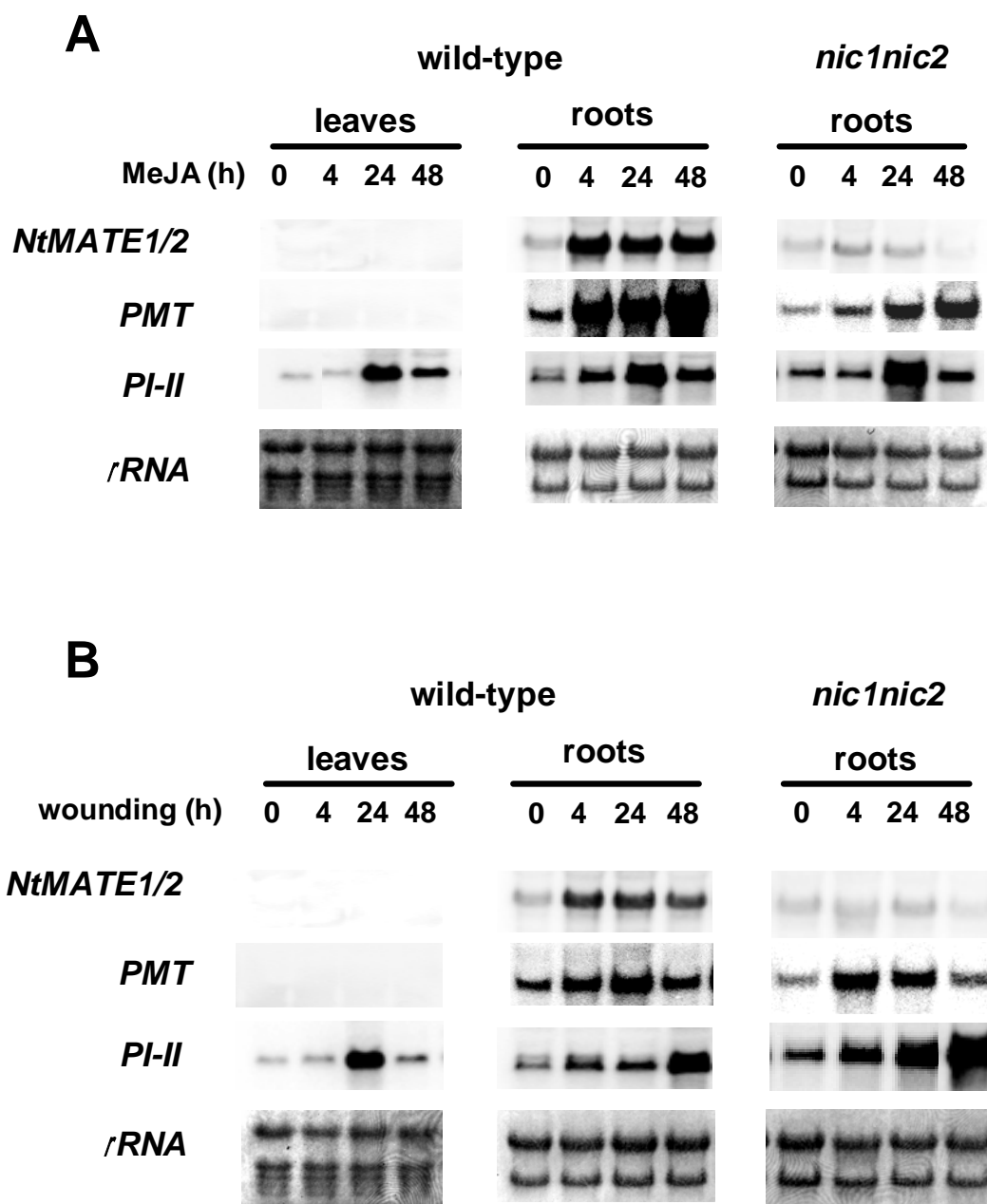


図 11 タバコ植物体における傷害およびメチルジャスモン酸処理による *NtMATE1/2* の発現応答性の解析

*N. tabacum* cv. Burley21 の野生型と *nic1nic2* 変異体の葉と根を用いて発現解析を行った。

A メチルジャスモン酸処理による *NtMATE1/2* 発現応答性のノーザンブロット解析

B 傷害処理による *NtMATE1/2* の発現応答性のノーザンブロット解析



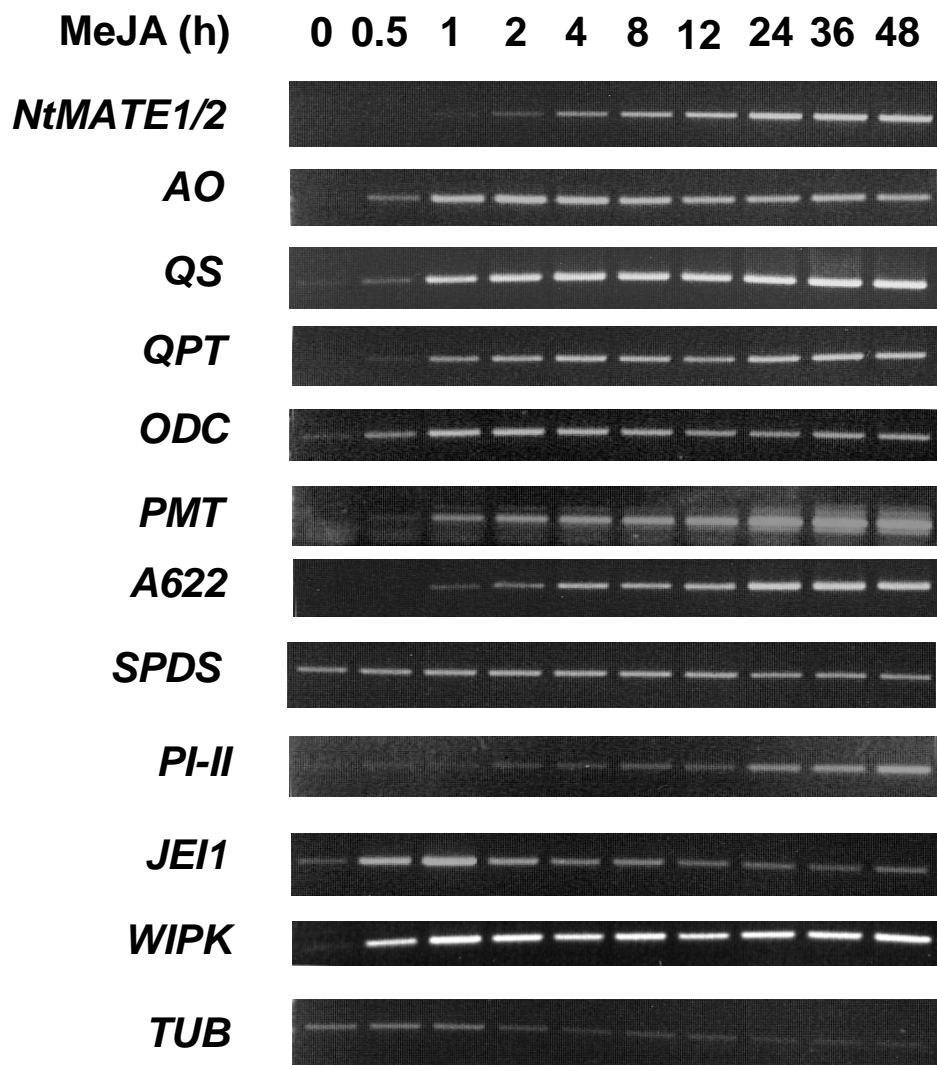


図 12 タバコ BY-2 細胞におけるニコチン生合成関連遺伝子の発現誘導性

タバコ BY-2 細胞におけるメチルジャスモン酸処理による *NtMATE1/2* およびニコチン生合成関連遺伝子群の発現誘導性を RT-PCR によって解析した。

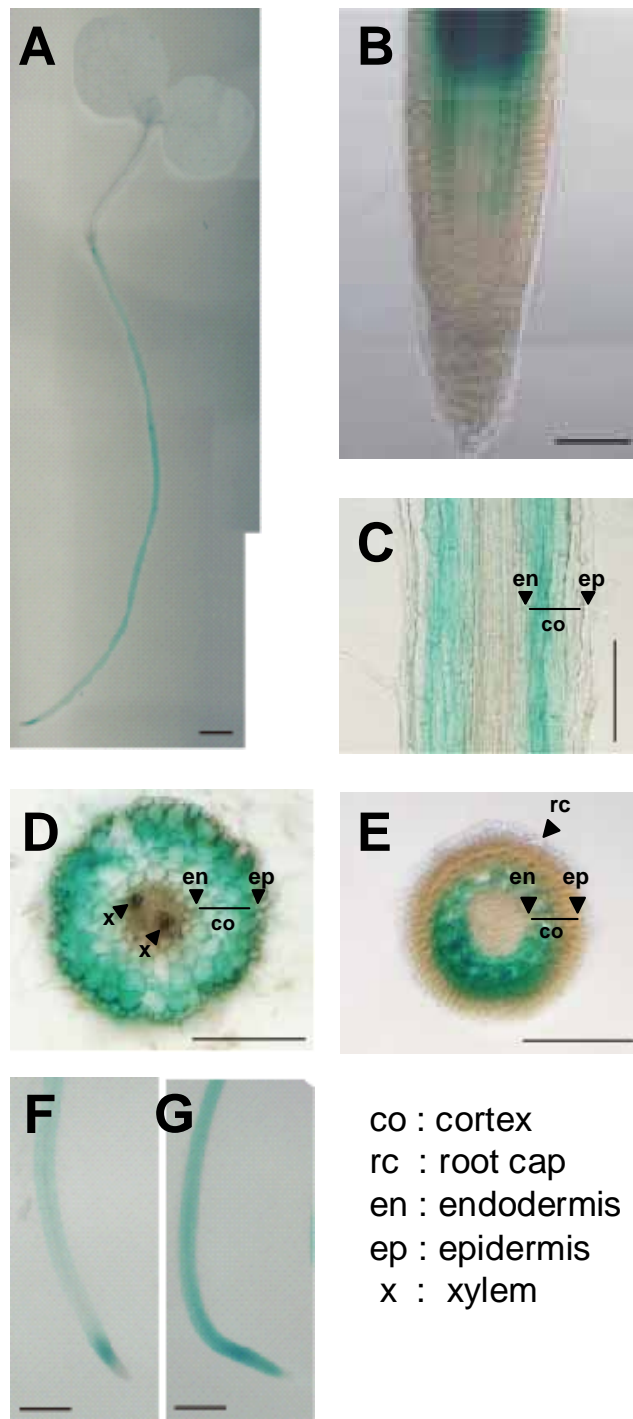


図 13 *NtMATE1promoter::GUS* を用いた *NtMATE1* の組織特異性発現解析

*NtMATE1promoter* 制御下で *GUS* を発現する形質転換タバコを用いて *NtMATE1* の組織特異性発現解析を行った。

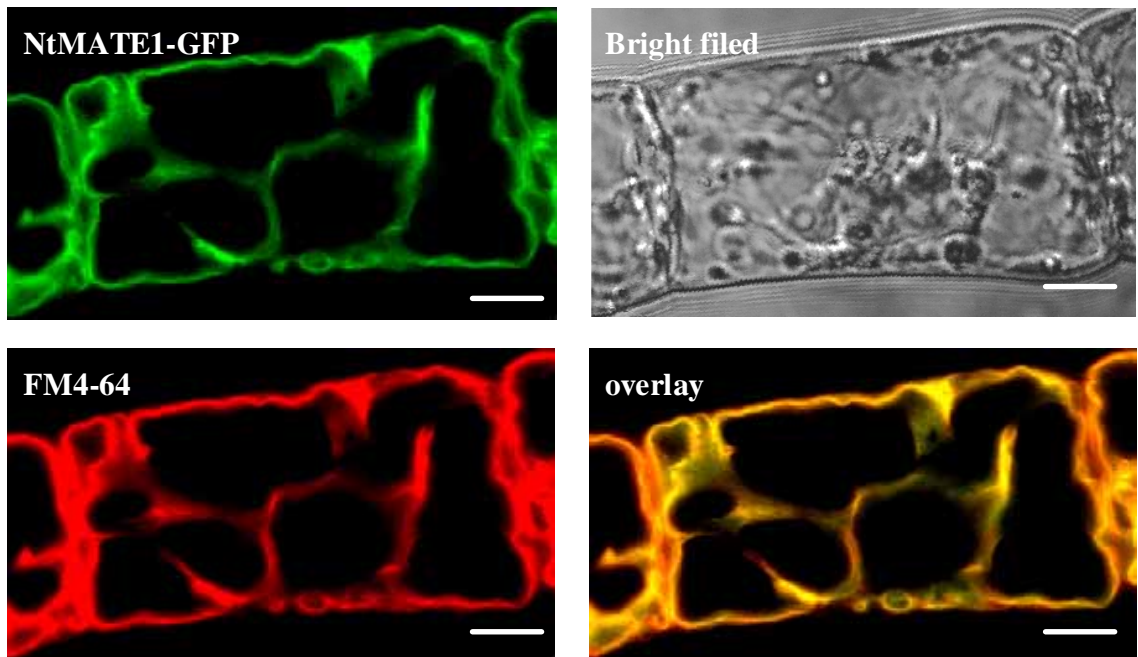
A-G 5日目の幼植物体 A: 植物体全体 (bar=5mm) B: 根端部 (bar=0.2mm)

C, D 根の分化領域 C: longitudinal section (bar=0.1mm)、D: cross section (bar=0.1mm)

E 根の根端領域の cross section (bar=0.1mm)

F メチルジャスモン酸未処理の根 (bar=1mm)

G 20 $\mu$ M のメチルジャスモン酸 24 時間処理した根 (bar=1mm)



bar=10mm

図 14 NtMATE1-GFP 融合タンパク質による細胞内局在解析

NtMATE1-GFP 融合タンパク質を恒常的に発現する形質転換 BY-2 細胞を作製し NtMATE1 の細胞内局在性を解析した。液胞膜は FM4-64 を用いて 12 時間培養し蛍光染色した。NtMATE1-GFP のシグナルは液胞膜上で観察された。

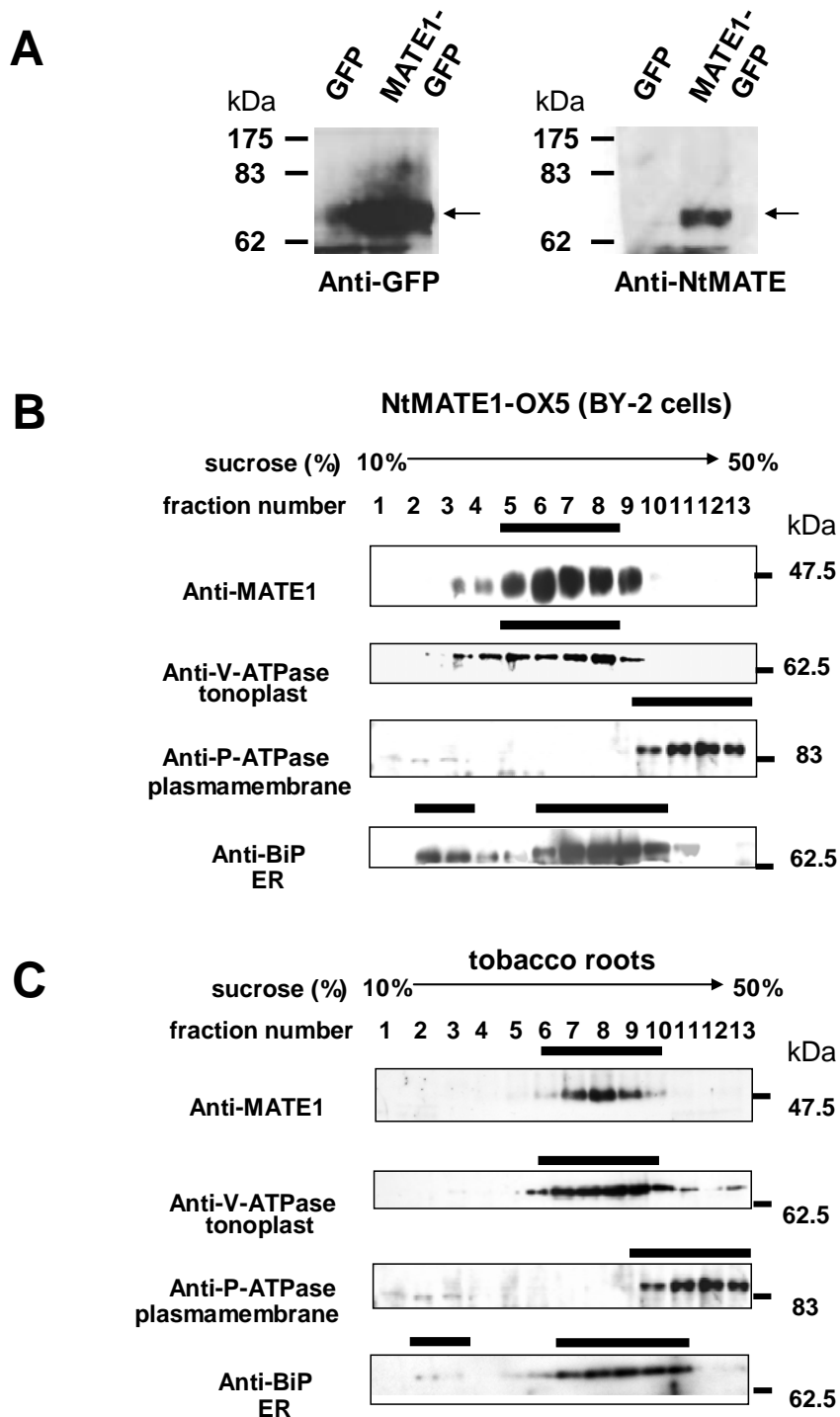


図 15 抗 NtMATE 抗体を用いた細胞内局在性解析

A GFP および NtMATE1-GFP 形質転換 BY-2 細胞 (GFP、NtMATE-GFP) から調整した全膜タンパク質に対して抗 GFP 抗体および抗 NtMATE 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。

B *NtMATE1* 過剰発現 BY-2 細胞 (NtMATE1 - OX5) におけるのシヨ糖密度勾配遠心法による細胞内局在性解析

C *N. tabacum* cv. SR-1 の根におけるシヨ糖密度勾配遠心法による細胞内局在性解析

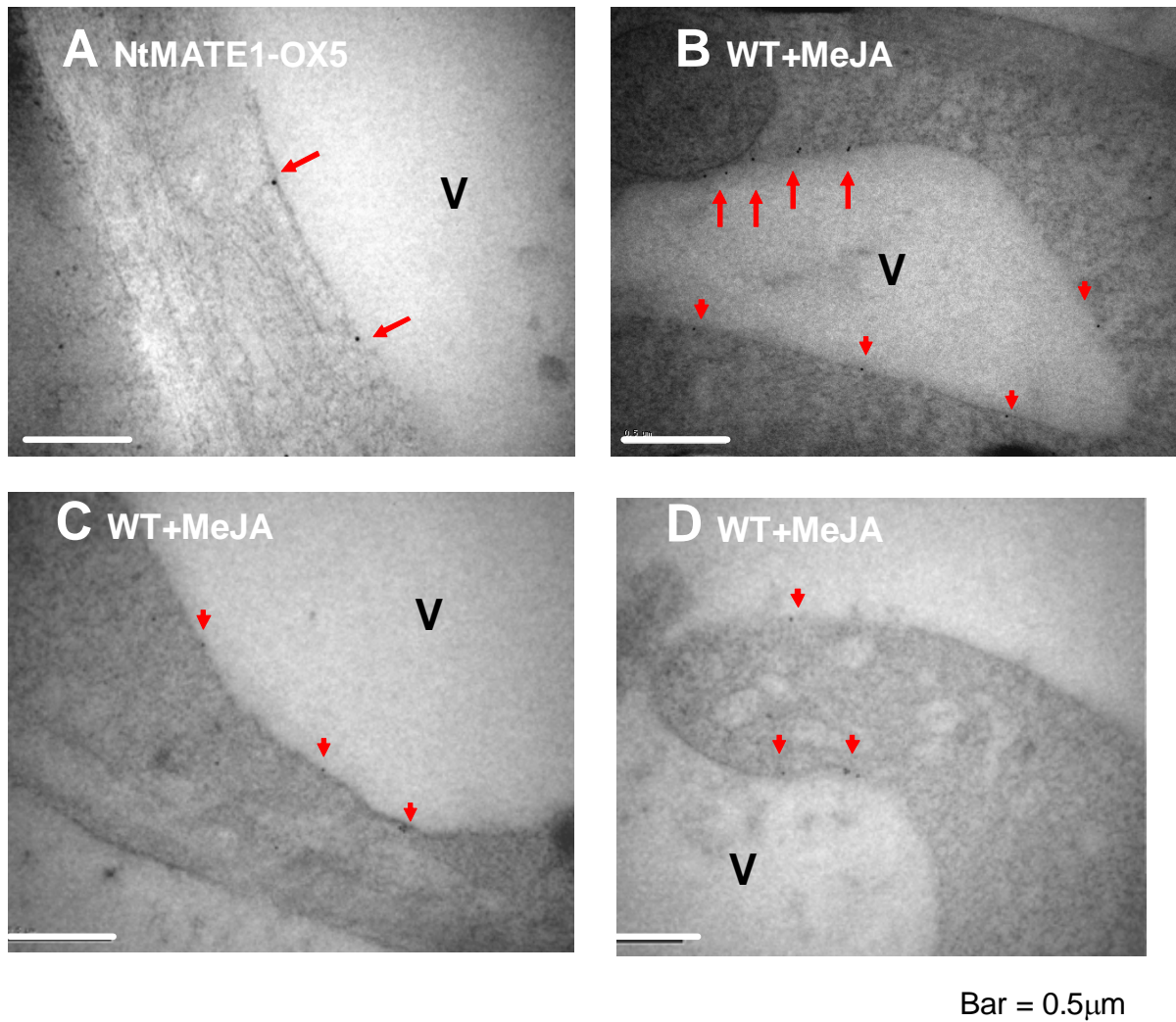


図 16 免疫電子顕微鏡法による NtMATE の細胞内局在解析

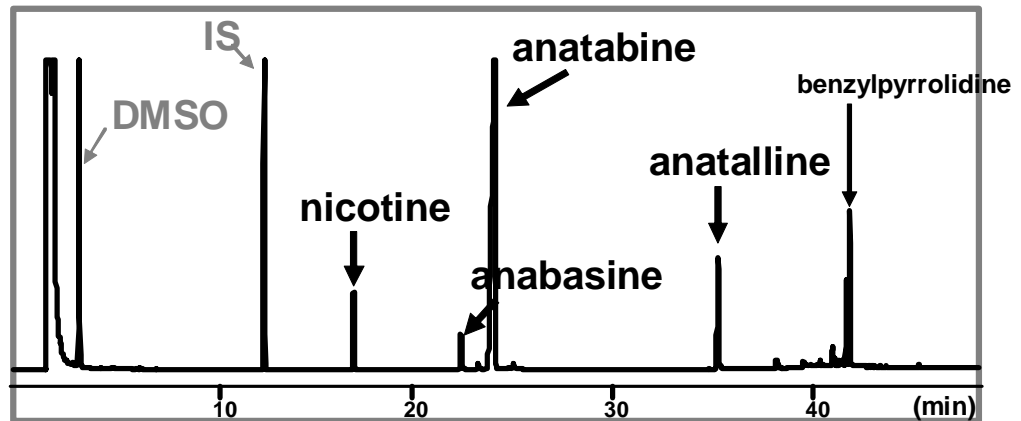
NtMATE1-OX5 およびメチルジャスモン酸処理を 48 時間した野生型 BY-2 細胞において抗 NtMATE 抗体を用いて免疫電子顕微鏡法による細胞内局在解析を行った。各細胞において、赤矢印で示すように抗 NtMATE 抗体のシグナルは液胞膜上に観察された。  
V: 液胞

	outside (%)	inside (%)	n
NtMATE1-OX5 (Anti-NtMATE)	82 ± 10	18 ± 10	82
WT+MeJA (Anti-NtMATE)	87 ± 10	13 ± 10	119

表 1 免疫電子顕微鏡法による液胞膜上に存在するシグナルの分布

抗 NtMATE 抗体を用いた免疫電子顕微鏡画像から液胞膜上のシグナルの液胞膜の外側 (outside) と内側 (inside) に存在する割合 (%) を測定した。

## A cells



## B culture medium

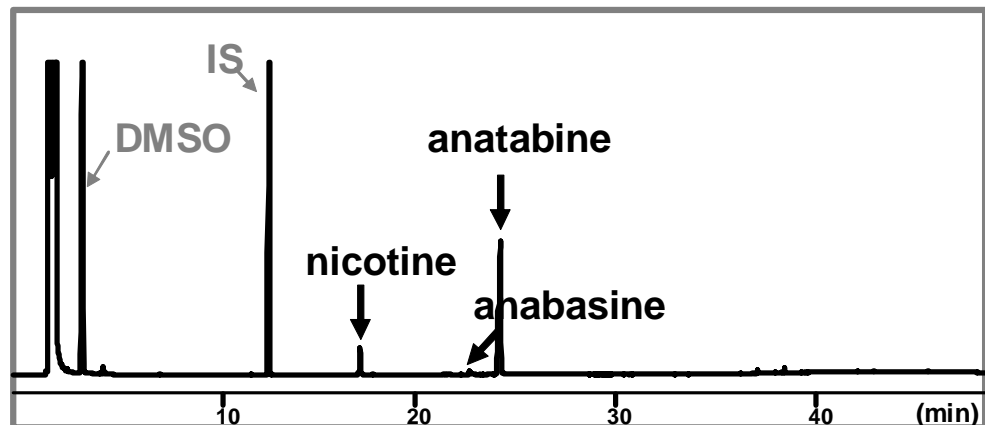


図 17 タバコ BY-2 細胞におけるニコチンアルカロイド生合成

メチルジャスモン酸処理 48 時間後のタバコ BY-2 細胞における細胞内および液体培地中のニコチンアルカロイドをガスクロマトグラフィーによって分離した。

A メチルジャスモン酸処理後の細胞内のニコチンアルカロイドのクロマトグラム

B メチルジャスモン酸処理後の液体培地中のニコチンアルカロイドのクロマトグラム

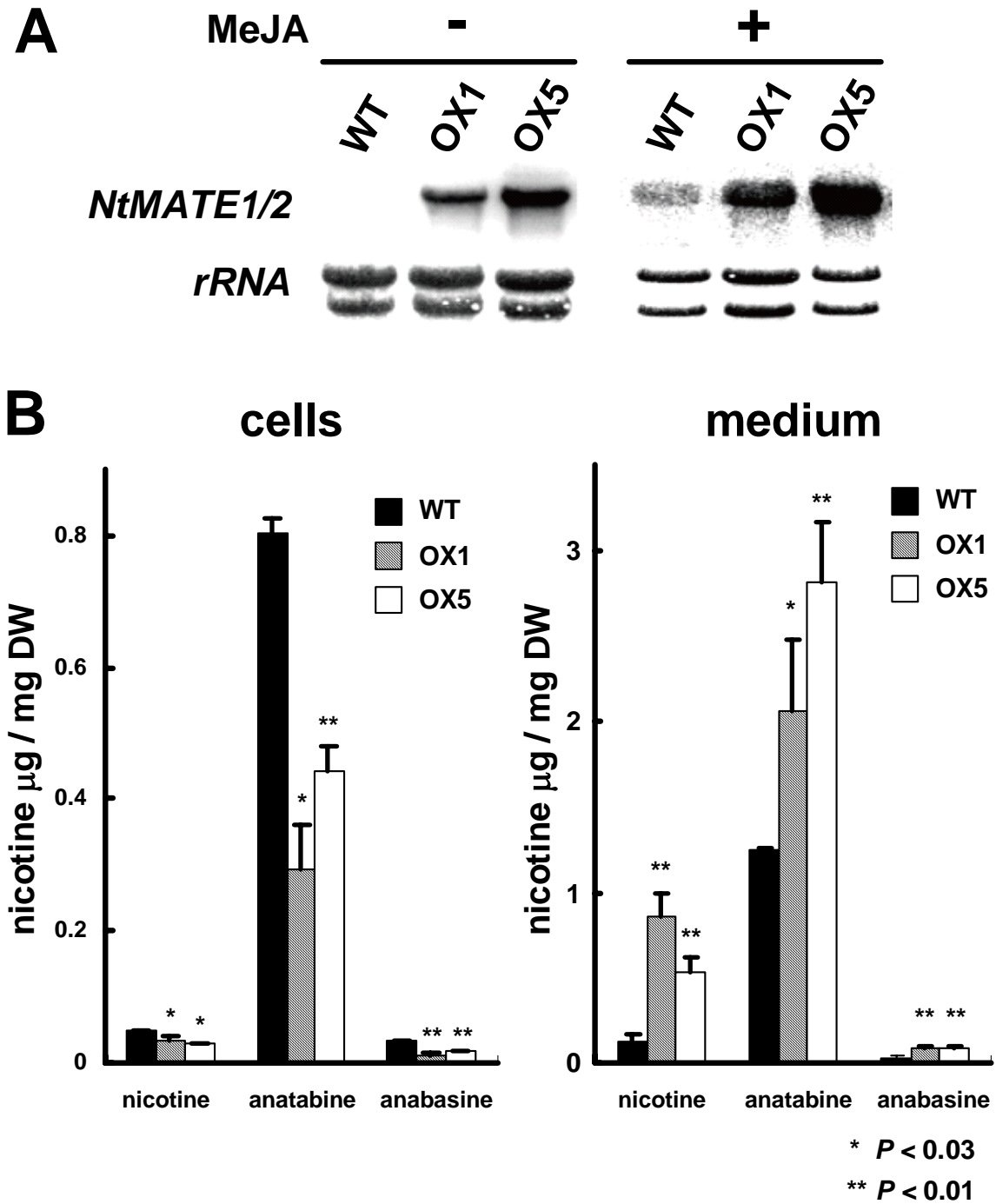


図 18 *NtMATE1* 過剰発現によるニコチンアルカロイド排出量の変化

メチルジャスモン酸処理後の野生型と *NtMATE1* 過剰発現 BY-2 細胞 (*NtMATE1*-OX1、-OX5) における細胞内および液体培地中のニコチンアルカロイド含量を測定した。

A *NtMATE1* 過剰発現 BY-2 細胞における *NtMATE1/2* のノーザンプロット解析

B 細胞内と液体培地中のニコチン、アナタピン、アナバシン含量



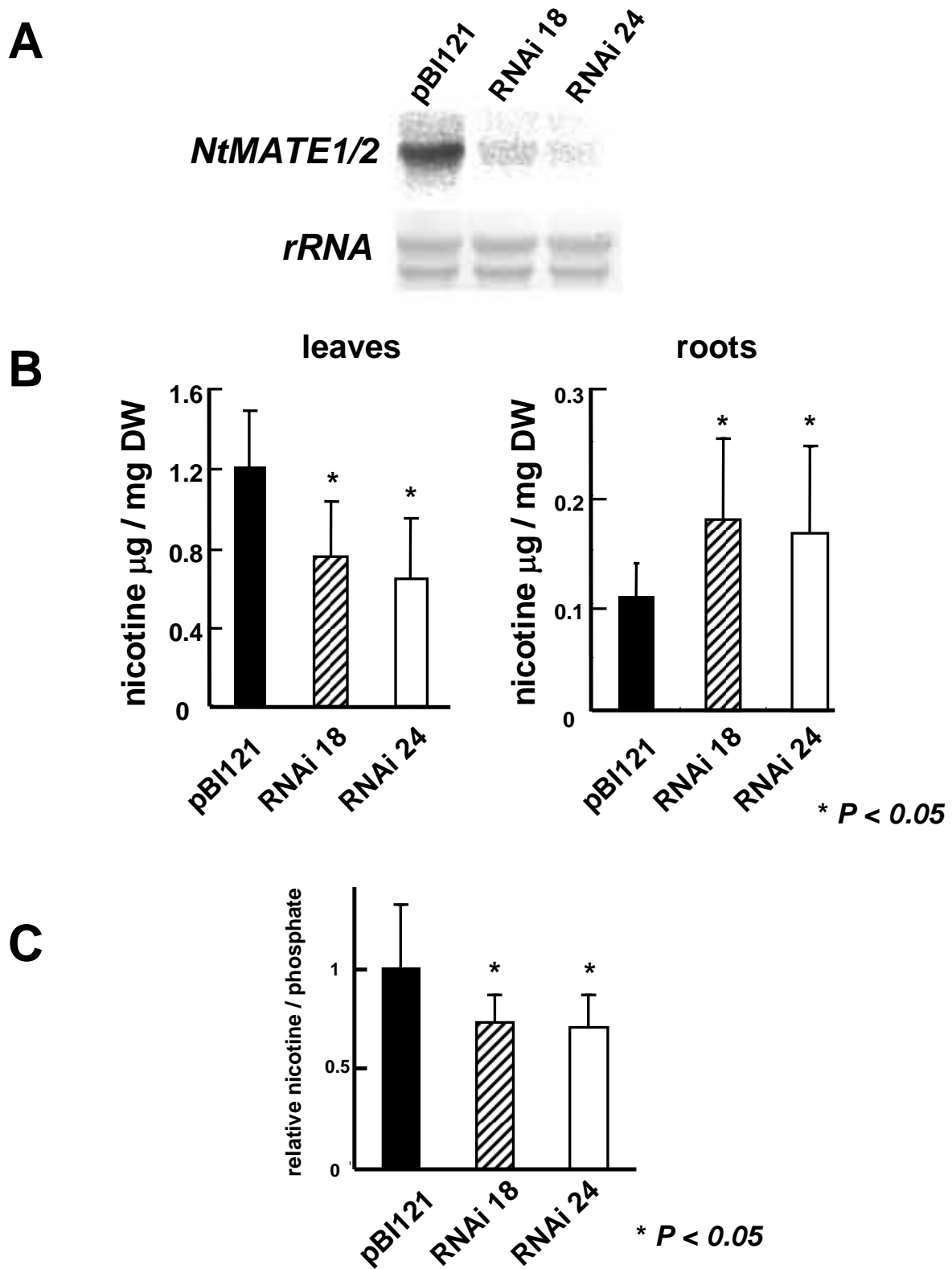


図 19 *NtMATE1/2* 発現抑制タバコにおけるニコチン転流の変化

A *NtMATE1/2* 発現抑制タバコ (*NtMATE*-RNAi #18、#24) における発現解析

B pBI121 形質転換タバコと *NtMATE1/2* 発現抑制タバコの葉と根のニコチン含量 (n=8)

C pBI121 形質転換タバコと *NtMATE1/2* 発現抑制タバコの遊離リン酸当りのニコチン含量の相対比 (pBI121 n=9; RNAi n=7)

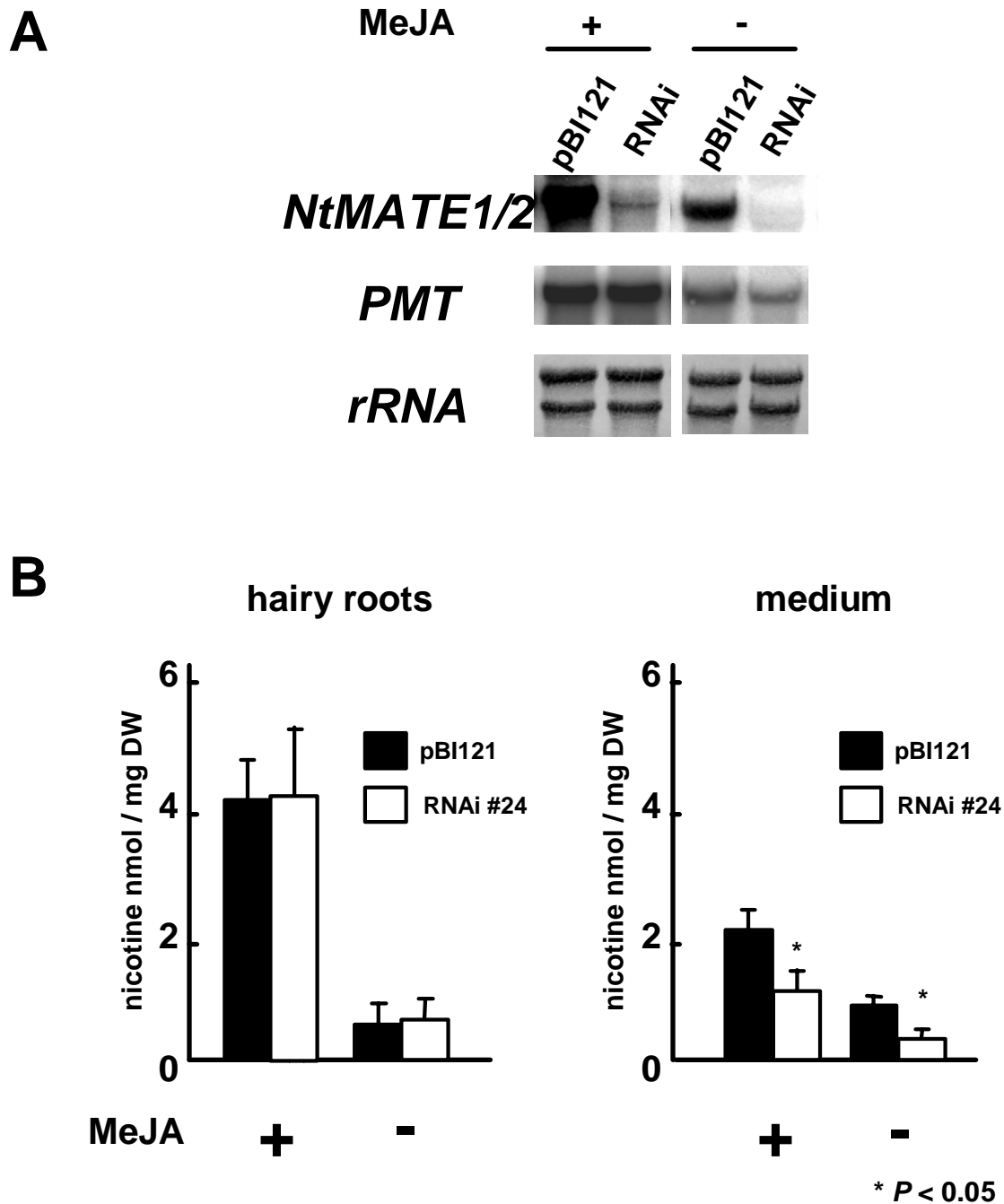


図 20 *NtMATE1/2* 発現抑制毛状根におけるニコチン排出量の変化

pBI121 形質転換タバコと *NtMATE1/2* 発現抑制タバコ (*NtMATE*-RNAi #24) より作製した毛状根を用いて解析した。それぞれ毛状根に対してメチルジャスモン酸処理を行った場合の発現解析およびニコチン含量についても測定した。

A pBI121 形質転換毛状根と *NtMATE1/2* 発現抑制毛状根における発現解析

B pBI121 形質転換毛状根と *NtMATE1/2* 発現抑制毛状根の毛状根中および培地中のニコチン含量。(n=3)

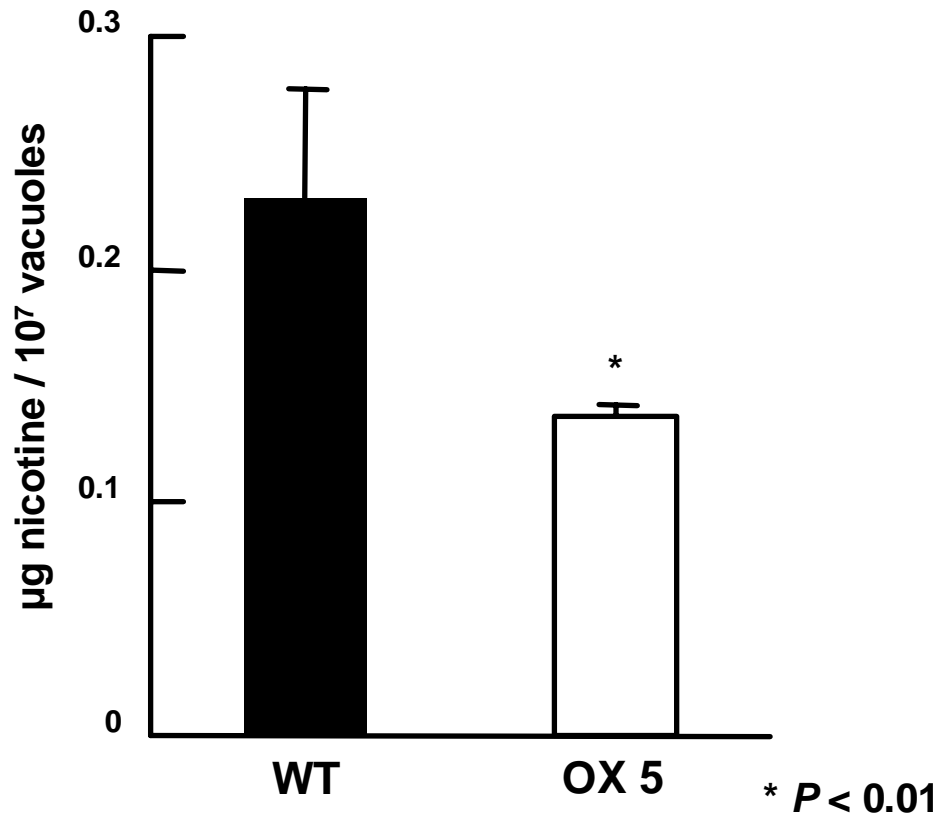


図 21 タバコ BY-2 プロトプラストを用いた液胞へのニコチン蓄積量の解析

野生型と *NtMATE1* 過剰発現 BY-2 細胞 (*NtMATE1-OX5*) から調整した BY-2 プロトプラストを 10µM S-(-)-ニコチンを取り込ませ、各細胞から無傷の液胞を単離し液胞中に蓄積するニコチン含量を測定した。野生型と比較して *NtMATE1-OX5* 細胞の液胞中に蓄積するニコチンは 59%に低下していた。(n=3)

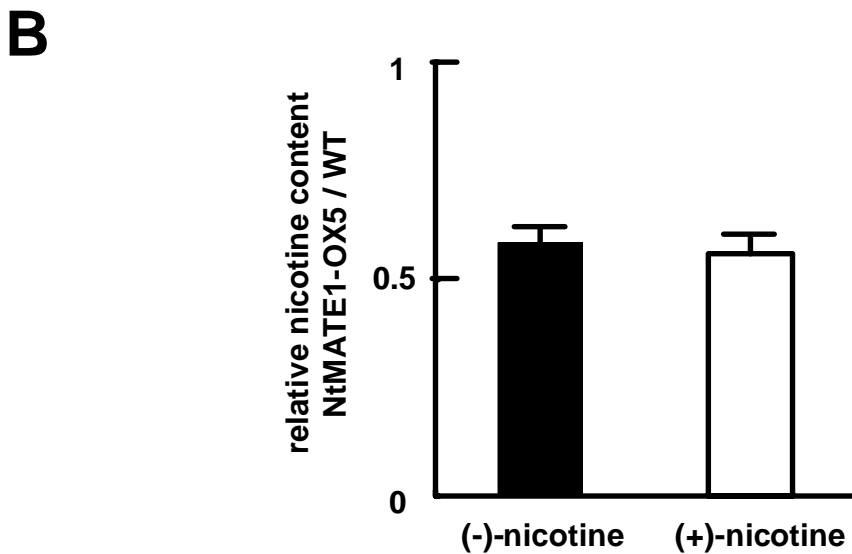
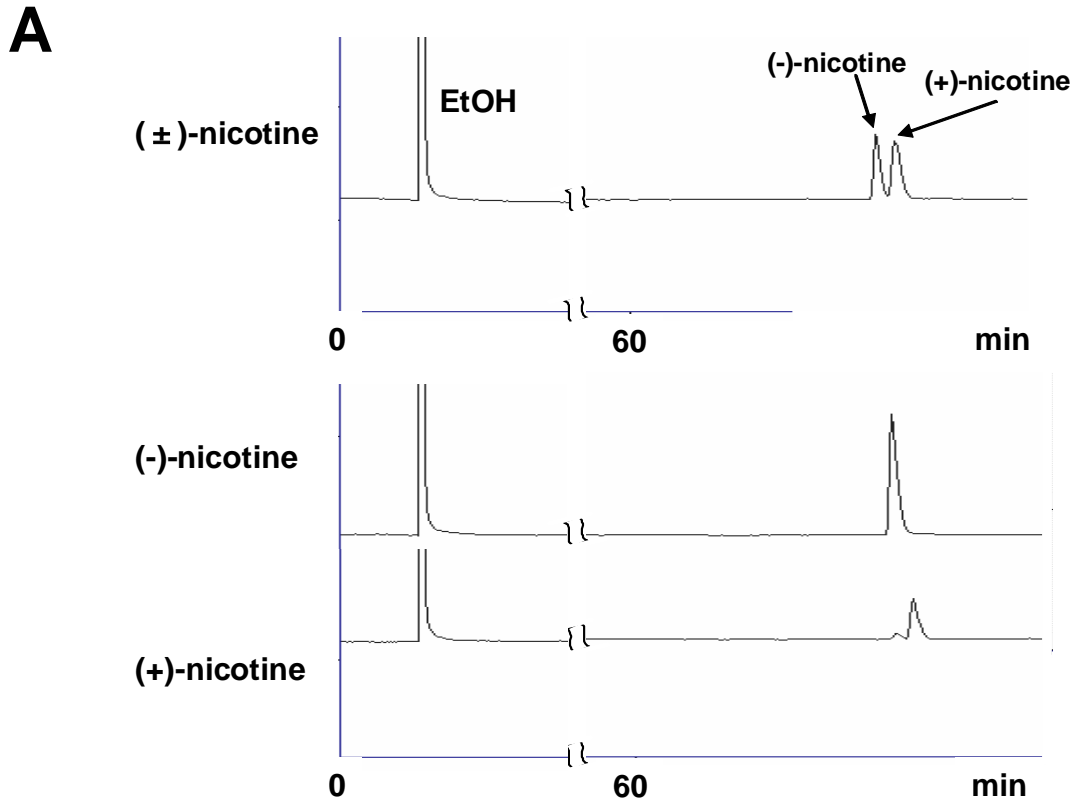


図 22 *NtMATE1* 過剰発現 BY-2 細胞を用いたニコチン光学異性体の解析

野生型と *NtMATE1* 過剰発現 BY-2 細胞を用いてニコチン光学異性体の液胞への蓄積効率の違いを解析した。

A キラルカラムを用いたガスクロマトグラフィーによるニコチン光学異性体の分離

B それぞれの細胞から調整したプロトプラストに 5 $\mu$ M (±)-nicotine を取り込ませ液胞単離後、液胞内の(±)-nicotine 含量を測定した。野生型と比較して *NtMATE1*-OX5 の液胞では光学異性体における特異性は示さず(-)-nicotine は 58 %、(+)-nicotine は 56 % に減少していた。(n=3)

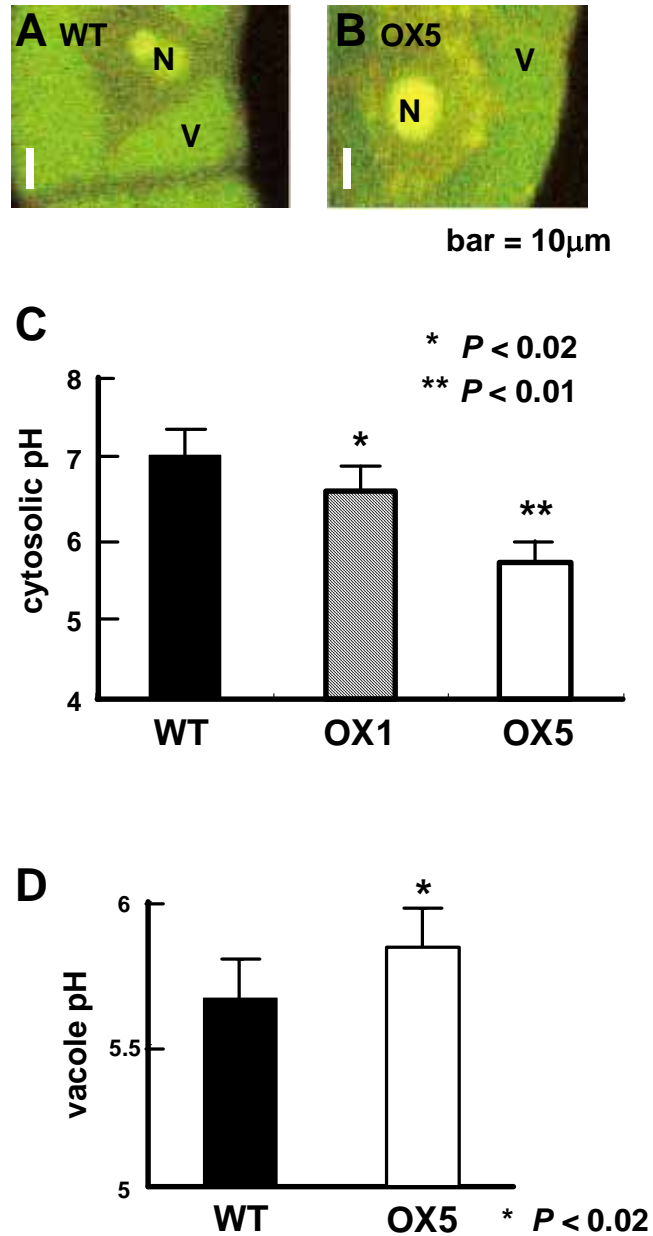


図 23 NtMATE1 過剰発現による細胞内 pH の変化

野生型と NtMATE1 過剰発現細胞 (NtMATE1-OX1、-OX5) における細胞質 pH と液胞内 pH を測定した。

A、B SNARF-1 を用いて 2 波長 (緑、赤) で得た各細胞画像を重ねたもの。A は野生型 BY-2 細胞、B は NtMATE1-OX5。

C SNARF-1 蛍光強度より算出した各細胞質 pH (WT n=7; OX1 n=10; OX5 n=8)

D ガラス微小電極法による各細胞の液胞内 pH (n=10)

## 考察

タバコ植物体のニコチンに関する研究に関してはニコチン酵素遺伝子が単離され、その遺伝子の発現様式や生化学的な機能が解析されることでニコチン生合成経路の研究が進んでいる。しかしながら、これら遺伝子群の発現制御の実態や生合成されたニコチンの輸送機構に関与する遺伝子は未だ分かっていない。本研究における *JE11* 遺伝子および *NtMATE1/2* 遺伝子の解析からこれらのニコチン生合成に関する未知なる領域に新たな知見が得られたと考えられる。

### *JE11*

*JE11* 遺伝子の発現解析の結果から、タバコの葉と根において *Nic* 依存的な発現誘導性を示すことから *JE11* 遺伝子は、ニコチン生合成に関与する遺伝子であることが示唆された (図 5)。また、*JE11* 遺伝子は、傷害やメチルジャスモン酸処理後 15 分という早い時間で誘導され、その後遺伝子発現量が減少するといった、多くの転写因子に代表されるような発現様式を取っていることが分かった (図 6)。*JE11* の推定アミノ酸配列から BTB/POZ ドメインと WD40 リピートを有するタンパク質をコードしている (図 4)。シロイヌナズナには少なくとも 76 の BTB ドメインをもつ遺伝子が存在する (Dieterle et al., 2005)。これらシロイヌナズナの BTB ドメインタンパク質は 11 のファミリーに分類され、*JE11* はその中の BTB ドメインを含む potassium channel tetramerization ドメインと WD40 様リピート配列を持つ遺伝子のサブファミリーである Class XIa に属する At5g41330 や At3g09030 と高い相同性を持っていた。このサブファミリーに属するタンパク質の機能は未だ解明されていない。しかしながら、酵母や動物の Cullin3 が様々な BTB ドメインタンパク質と結合することが報告されている (Pintard et al., 2004)。Cullin タンパク質はユビキチンリガーゼ複合体 (E3) の構成因子である。この複合体は 26S プロテアソームを介して調節因子を含む基質となるタンパク質を選択的に分解することで、様々な生命活動に重要な役割をしている (Ciechanover et al., 2000)。BTB タンパク質はユビキチンリガーゼ複合体から基質タンパク質へのユビキチンの結合を助ける機能を有しているとされている (Furukawa et al., 2003)。シロイヌナズナにおいてもユビキチン依存型プロテアソームはストレスや植物ホルモンに対する応答などに関与することが知られている (Lechner et al., 2006)。また、シロイヌナズナの BTB ドメインタンパク質も自身の CUL3A や CUL3B といったタンパク質と結合することが知られている (Weber et al., 2005)。他の BTB ドメインタンパク質が cullin と結合することから *JE11* もタバコの Cullin3 と結合し CUL3-BTB 型ユビキチンリガーゼとしてユビキチン依存型タンパク質分解系において機能する可能性がある。

*JEI1* 遺伝子の障害初期誘導性は、タバコにおいて同様に障害に対して初期誘導性を示す *WIPK* 遺伝子の発現パターンと非常に類似していた (図 6 B) (Seo et al., 1999; Kumar and Klessing 2000)。植物体が傷害を受けたときに一過的に *WIPK* が活性化されその後ジャスモン酸生合成量が増加する。しかしながら、ジャスモン酸に対する誘導性は *JEI1* 遺伝子が傷害処理と同様に一過的に発現が誘導されるのに対し、*WIPK* 遺伝子はジャスモン酸処理では処理後 3 時間から増大していくことが示された。*JEI1* 遺伝子はタバコ植物体における傷害応答シグナル経路に關与する可能性が示唆された。しかし *WIPK* との発現様式の違いが *WIPK* の活性化によるジャスモン酸増大を介するのかどうか今後の研究が必要である。

*Nic* 依存的に発現する *JEI1* 遺伝子がどのようにニコチン生合成に關与するかを推測した。*JEI1* 遺伝子と同様な初期誘導性の発現様式を示し、アルカロイド生合成に關与する遺伝子としてジャスモン酸誘導性の AP2/ERF ドメイン転写因子である Octadecanoid-Responsive Catharanthus AP2 3 (ORCA3) がある。ORCA3 は *Catharanthus roseus* におけるテルペノイドインドールアルカロイドの生合成の主要な制御因子であり、テルペノイドインドールアルカロイドの生合成酵素遺伝子である *Strictosidine synthase* (*Str*) の発現制御をしていることが分かっている (van der Fits and Memelink, 2001, Memelink et al., 2001)。ORCA3 は、*Str* プロモーター上に存在する jasmonate- and elicitor-responsive gene expression (JERE) エlementに直接的に結合し転写制御を行っている。それに対して *JEI1* は BTB/POX ドメインをもちタンパク質分解系を介した調節をする可能性が考えられたことから、ORCA3 のように直接的にニコチン生合成酵素遺伝子の発現を調節しているのではなく、ジャスモン酸シグナルを介してニコチン生合成酵素遺伝子の発現をネガティブに制御している因子を排除する、または、根でも誘導性と *Nic* 依存性が観察されたことから、タンパク質分解系を介してニコチン生合成酵素そのものの安定性や活性化を制御していることが推測される。今後は *JEI1* 遺伝子がタバコの葉と根における発現がジャスモン酸シグナルと拮抗するサルチル酸シグナル経路など他の植物ホルモンに対しての遺伝子発現の変動、*WIPK* によって活性化するジャスモン酸生合成経路との関連性、ニコチン生合成への関連機構などを明らかにしていかなければならない。

### *NtMATE1/2*

*NtMATE1/2* 遺伝子は MATE family トランスポーターをコードする (図 7)。MATE ファミリーは Multidrug transporter family のひとつである。Multidrug transporter は、Major facilitator superfamily (MFS)、small multidrug resistance (SMR)、resistance nodulation division (RND)、ATP-binding cassette (ABC)、multidrug and toxic compound extrusion (MATE) の 5 つのファミリーに分類される (Murakami and Yamaguchi, 2003)。これ

らのトランスポーターは、毒性物質や薬剤を排出するトランスポーターで、ABC ファミリーは ATP の加水分解によって毒性物質の輸送活性をもつものに対して、その他のファミリーは、 $H^+$ または  $Na^+$ と毒性物質の交換輸送体として機能する。MATE ファミリーは 12 の膜貫通領域をもつがその他ファミリーに見られるような特徴的な配列をもたない。いくつかの MATE ファミリーが解析され、その機能はカチオンと低分子量の毒性物質や薬剤などの交換輸送体である (Omote et al., 2006)

シロイヌナズナには少なくとも 54 の MATE ファミリーが存在している (Eckardt, 2001)。現在までに 4 つのシロイヌナズナ MATE ファミリーの変異体の表現型解析がなされている。これらの変異体の中でもっとも NtMATE1 に近縁なのは TT12 である。tt12 変異体は、シロイヌナズナ種子外皮におけるプロアントシアニジンの蓄積が低下していることから、その前駆体の液胞への隔離の少なくとも一部を担うトランスポーターとされている (Debeaujon et al., 2001)。eds5 変異体は、サルチル酸の低下した変異体であり PR タンパク質の発現が見られないことからサルチル酸シグナル経路の一端を担っているとされる (Nawrath et al., 2002)。frd3 変異体はイオン欠乏または鉄の分布に異常が見られることから FRD3 は植物の鉄恒常性に関与すると考えられている (Rogers et al., 2002)。alf5 変異体は、培地中の夾雑物によって側根形成が阻害される。ALF5 は、表皮細胞で発現していることや酵母において発現させると毒性カチオンの tetramethylammonium に対して耐性が付与されることが報告されている (Diener et al., 2001)。これらは変異体の解析などから機能が推測されているが、その輸送基質は分かっていない。変異体解析以外でその機能が推測されているのが AtDTX1 である。シロイヌナズナの MATE ファミリーを大腸菌の多剤排出輸送体変異体に導入し相補的スクリーニングの結果見つかった AtDTX1 は、変異大腸菌において正電荷の植物アルカロイドや抗生物質やカドミウムなどに対して輸送活性をもつ (Li et al., 2002)。

NtMATE1/2 は TT12 と相同性の高い At1g61890 や At3g21690 ともっとも近縁でありこれらはシロイヌナズナの単離液胞プロオーム解析の結果から液胞膜に局在する MATE ファミリーである (Shimaoka et al., 2004)。また、シロイヌナズナ以外でもっとも近縁なのは、トマトの MTP77 である。MTP77 はアントシアニン生合成の転写因子によって発現が制御されている遺伝子として単離され、液胞へのアントシアニンの蓄積に関与するトランスポーターであるとされている (Mathews et al., 2003)。これらのことから NtMATE1/2 を含む系統樹上のサブクラスターは、液胞膜局在性の MATE ファミリーであると考えられる (図 8)。

NtMATE1/2 の発現解析の結果、その Nic 依存性および傷害、メチルジャスモン酸処理に対する応答性、器官発現様式などから NtMATE1/2 はニコチン生合成酵素遺伝子と非常に類似した発現様式を示すことがわかった。この結果から NtMATE1/2 がニコチン生合成に関与するトランスポーターであると推測された。さらに、NtMATE1 プロ



モーターを用いた GUS 発現解析から、*NtMATE1/2* は *PMT* 遺伝子が強く発現している組織において発現が観察されたことから、ニコチン生合成細胞において機能していると推測された。また、タバコ BY-2 細胞におけるニコチン生合成関連遺伝子発現に関するジャスモン酸応答性を解析した結果、*NtMATE1/2* 遺伝子の応答性は処理後 1 時間から徐々に発現が増大した。この発現様式はニコチン生合成に特異的な *PMT* 遺伝子や *A622* 遺伝子と非常に類似している。それ以外のニコチン生合成だけでなくポリアミン生合成にも関与する *ODC* 遺伝子や NAD 生合成酵素遺伝子群は、初期の段階から発現量が多く、その発現誘導は短期間で起きているように見えた (図 12)。このことから *NtMATE1/2* はニコチン生合成と密接な関与を示唆していると考えられる。

タバコ BY-2 細胞を用いた細胞内のニコチンの挙動を解析したところ、生合成されたニコチンおよびその他のニコチンアルカロイドが細胞外に排出されていた (図 17)。さらに *NtMATE1* を過剰発現させると細胞外に排出されるニコチンアルカロイド量が著しく増大した (図 18)。細胞内局在性解析の結果から *NtMATE1* は液胞膜上に局在することから、液胞内に蓄積するニコチンアルカロイドを細胞質に排出することで細胞外へのニコチンアルカロイドの排出を促進していると考えられる。現在までにニコチン生合成の最終段階である縮合反応が細胞内のどこで起きているかはわかっていないが、細胞内で生合成されたニコチンはその毒性から生合成最終反応は、細胞内で隔離された細胞内小胞などで起こっているか、すみやかに液胞に隔離されるか、細胞外に排出されると推測できる。*NtMATE1* 過剰発現の結果と *NtMATE1* が液胞膜に局在していることを考慮すると細胞内で生合成されたニコチンアルカロイドの大半は、液胞内に蓄積していることを示唆しているように思われた。ニコチンアルカロイドが細胞外に排出されているが、現在までに細胞膜に局在するニコチン輸送体は明らかになっていない (Yazaki, 2006)。

*NtMATE1* 過剰発現 BY-2 細胞の結果から推測された機能をタバコ植物体における機能を当てはめてみると、*NtMATE1* はニコチンの根から葉への転流を促進していると考えられる。事実、*NtMATE1/2* 発現抑制タバコの解析から、*NtMATE1/2* を発現抑制すると導管液中のニコチン含量が低下し、葉のニコチン蓄積量が減少した (図 19)。さらに、*NtMATE1/2* 発現抑制毛状根では培地中へのニコチン排出量が低下する (図 20) ことから *NtMATE1* が根の生合成細胞からのニコチン排出を促進し、ニコチンの転流量を制御する機能の一端を担っていると言える。また、*nic1nic2* 変異体に傷害処理をした場合ニコチン生合成量は少ないながらも増大するが、葉におけるニコチン含量の増大は観察されず、根におけるニコチン含量が増大することから *nic1nic2* 変異体ではニコチンの転流が阻害されている報告もある (Cane et al., 2005)。これは *Nic* 依存的に発現している *NtMATE1/2* がニコチン転流に関与しているという考えと一致する部分がある。

ニコチンアルカロイドを生合成する *Nicotiana* 属の中でも全てが根から葉へニコチンアルカロイドを転流し蓄積しているわけではない (Saitoh et al., 1985; Sinclair et al., 2004)。例えば、*N. alata* や *N. longiflora* では全アルカロイドの 90%以上が根に蓄積している。これら *Nicotiana* 属では NtMATE が担う機能が欠損している可能性が考えられる。これらの *Nicotiana* 属を用いた NtMATE と転流機構の解析も今後のニコチン転流に関して非常に有益な研究であろう。

免疫電子顕微鏡法による解析から NtMATE1 の N 末端側は、細胞質側に位置する(表 1)。その生体膜に対するトポロジーは他の MATE ファミリーと同じである (Omote et al., 2006)。これまでの MATE ファミリーの研究から MATE ファミリーの代表的な機能として  $H^+$  または  $Na^+$  と低分子の有機カチオンの交換輸送体として細胞内から細胞外への物質の排出を担っている (Omote et al., 2006)。このことから考えると NtMATE は細胞質から液胞への  $H^+$  または  $Na^+$  勾配に依存して基質となる物質を輸送すると考えられる。遺伝子発現解析の解析から NtMATE1/2 がニコチン生合成に関与すると考えると、NtMATE1/2 は毒性の持つニコチンアルカロイドを液胞内に蓄積する機能を担うとも推測される。実際に、ヒトの MATE ファミリーである hMATE1 はニコチンに対して輸送活性をもつことが示唆されている (Otsuka et al., 2005)。しかしながら、前述のように形質転換体を用いた解析の結果から、NtMATE1/2 は液胞内から細胞質への排出を促進しているか、液胞へニコチンが蓄積することを妨げていると思われる。また、NtMATE1 過剰発現 BY-2 プロトプラストを用いた液胞へのニコチン蓄積の実験から、外部から投与したニコチンの液胞への蓄積量が低下したこと(図 21)や、その機構には光学異性体に対する特異性がないこと(図 22)も含めて、NtMATE1/2 はニコチンアルカロイドを特異的な基質としているのではなく別の機構を介して液胞内、細胞内にニコチンアルカロイドを蓄積しにくい環境を作り出していると推測できる。

タバコ BY-2 細胞において *NtMATE1* を過剰発現させると細胞質 pH の酸性化と液胞 pH のアルカリ化が起きていることがわかった(図 23)。この結果より、NtMATE1 は液胞と細胞質の  $H^+$  勾配に依存した物質の交換輸送をしていると推測できる。さらにメチルジャスモン酸処理を行っていないタバコ BY-2 細胞ではニコチンアルカロイドが存在しないことより、ニコチンアルカロイドの存在に関係なく  $H^+$  との交換輸送が起きていることを示している。つまり、NtMATE1 はタバコ細胞内に存在する有機カチオンと  $H^+$  交換輸送体であることを示唆している。

ニコチンは中性の pH では疎水性の性質をもつため脂質二重膜である液胞膜を単純拡散によって透過することが可能である。ブタ粘膜や皮膚を用いた実験からイオン化されていない状態のニコチンは、プロトン化されているニコチンよりも透過性が高い (Nair et al., 1997)。植物細胞内では、細胞質は pH7.0 付近であることを考えると細胞質に存在するニコチンは疎水性であり、そのため液胞膜を透過することができる。そ

の後、液胞内に入ったニコチンは酸性状態にある液胞内でプロトン化し親水性が増すために膜を透過できずに液胞内部に蓄積すると考えられる。*NtMATE1* 過剰発現による細胞質の酸性化は細胞質に存在するニコチンのプロトン化を促進しニコチンの液胞膜の透過性を減少させるため液胞内へのニコチンの蓄積が減少し、逆に液胞のアルカリ化はニコチンの脱プロトン化を進めるためニコチンの液胞膜への透過性が増し液胞中に留まりにくくなっていることが推測できる。この *NtMATE1/2* が関与するニコチンのプロトン化・脱プロトン化による細胞質と液胞と輸送仮説とニコチンが細胞外に分泌され、植物体レベルでは転流されていることを考慮するとニコチンを生合成する細胞の細胞膜にはプロトン化したニコチンを細胞外へ輸送するトランスポーターの存在が示唆された。

これまでの考察より、タバコ植物体における *NtMATE1/2* の関与するニコチンの細胞外への排出機構の仮説を示す (図 24)。ニコチンが生合成されている細胞では *NtMATE1/2* が発現、液胞膜上に局在する。*NtMATE1/2* は液胞内と細胞質との  $H^+$  勾配に依存して細胞質内に存在する有機カチオンとの交換輸送が起きる。その結果、細胞質の酸性化および液胞内のアルカリ化が引き起こされる。この状態でのニコチンの膜透過性は細胞質では低下し、液胞内では上昇する。それによってニコチンは液胞内に留まりにくくなり、細胞質多量に存在するようになるが、その毒性物質として働くニコチンを排除するため細胞膜に局在するニコチン輸送体によって速やかにアポプラストに排出される。その後導管を通り葉の液胞へ転流・蓄積すると考えられる。

*NtMATE1/2* の研究を介して、タバコの根から葉へのニコチン転流には生合成細胞内の pH の変化の関与が示唆された。しかしながら *NtMATE1/2* の生化学的な機能が明らかになったわけではない。今後、人工脂質二重膜を用いた *NtMATE1/2* を介した基質同定実験やニコチンと pH 変動との関連性を深めることで、ニコチン輸送機構の解明につながるであろう。また、ニコチンの転流には生合成細胞内の細胞膜に局在する輸送体、導管へのローディング機構、シンク器官である葉へのアンローディング、蓄積細胞内および液胞内への取り込みなど未知なる部分が多い。*NtMATE1/2* を足がかりに他のニコチン輸送に関与する輸送体や機構が見つかることでニコチンだけでなくアルカロイドの輸送機構の解明にもつながっていくと考える。

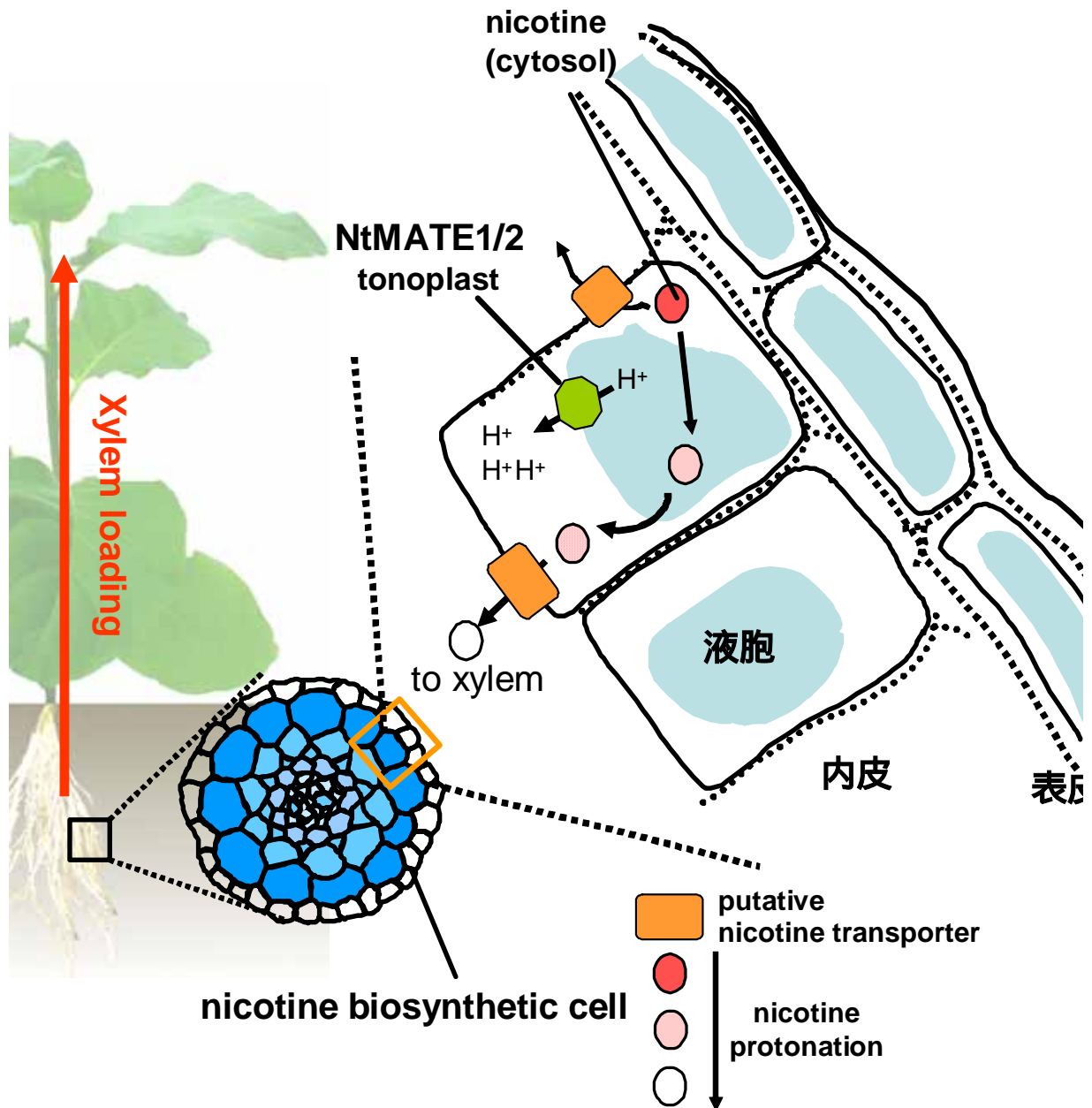


図 24 推定されるタバコ植物体におけるニコチン輸送機構

ニコチン生合成細胞では、NtMATE1/2 の機能により他の細胞よりも細胞質が酸性に液胞内がアルカリ化されている。細胞質のニコチンはイオン化が増し生体膜を透過しにくくなる。液胞内のニコチンはイオン化が減少し液胞膜と透過しやすくなる。細胞質に存在するニコチンは推定される細胞膜局在型のニコチントランスポーターによってアポプラストに排出されイオン化される。その後導管へ運ばれ地上部へ転流し葉に蓄積する。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり多大なるご助言・ご指導を頂いた奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科植物遺伝子機能学講座の橋本隆教授に心より感謝いたします。そして、修士課程1年から今まで研究だけでなく多くの面でご助力をくださいました京都学園大学バイオ環境学部バイオサイエンス学科植物バイオテクノロジー研究室の高瀬尚文准教授には深く感謝いたします。

本研究における免疫電子顕微鏡解析にご協力いただきました九州大学植物生産科学講座の松岡健教授、独立行政法人理化学研究所植物科学センターの豊岡公德博士、後藤友美さんに感謝いたします。また、ガラス微小電極による液胞内 pH の測定は名古屋大学生命情報論講座の吉田久美准教授のご指導のもと行いました。

細胞内局在性の解析のために抗体を分与していただいた大阪府立大学の小泉望准教授、名古屋大学の前島正義教授に深く感謝いたします

トランスポーターの研究の素人である私に対して非常に丁寧なディスカッションをしていただいた京都大学生存圏研究所の矢崎一史教授、土反伸和博士、名古屋大学生命農学研究科の小八重善裕博士には深く感謝いたします。神戸大学生体分子機構講座の三村徹朗教授、大西美輪さんには研究に関するディスカッション以外にも多くの面でお世話になりました、深く感謝いたします。

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科分化・形態形成学講座の横田明穂教授、明石欣也助教、蘆田弘樹助教、宗景ゆり助教には学位取得のために大変お世話になりました、心より感謝いたします。

本研究は奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科植物遺伝子機能学講座の中島敬二准教授、庄司翼助教、加藤壮英助教に心より感謝をいたします。

多くのことに関して助けくださった植物遺伝子機能学講座の皆様には感謝いたします。

最後になりましたが私が研究を続けてこられたのも両親のおかげです。心より感謝いたします。

稲井 康二

## 参考文献

- An, G.H. (1985). High-Efficiency Transformation of Cultured Tobacco Cells. *Plant Physiology* 79, 568-570.
- Balandin, T., Vanderdoes, C., Albert, J.M.B., Bol, J.F., and Linthorst, H.J.M. (1995). Structure and Induction-Pattern of a Novel Proteinase-Inhibitor Class-Ii Gene of Tobacco. *Plant molecular biology* 27, 1197-1204.
- Baldwin, I.T., and Ohnmeiss, T.E. (1994). Coordination of Photosynthetic and Alkaloidal Responses to Damage in Uninducible and Inducible *Nicotiana-Sylvestris*. *Ecology* 75, 1003-1014.
- Blechert, S., Brodschelm, W., Holder, S., Kammerer, L., Kutchan, T.M., Mueller, M.J., Xia Z.Q., and Zenk, M.H. (1995). The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4099-4105.
- Boswell, H.D., Drager, B., McLauchlan, W.R., Portsteffen, A., Robins, D.J., Robins, R.J., and Walton, N.J. (1999). Specificities of the enzymes of N-alkyltropane biosynthesis in *Brugmansia* and *Datura*. *Phytochemistry* 52, 871-878.
- Cane, K.A., Mayer, M., Lidgett, A.J., Michael, A.J., and Hamill, J.D. (2005). Molecular analysis of alkaloid metabolism in AABB v. aabb genotype *Nicotiana tabacum* in response to wounding of aerial tissues and methyl jasmonate treatment of cultured roots. *Functional Plant Biology* 32, 305-320.
- Ciechanover, A., Orian, A., and Schwartz, A.L. (2000). The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: Mode of action and clinical implications. *Journal of Cellular Biochemistry*, 40-51.
- Debeaujon, I., Peeters, A.J., Leon-Kloosterziel, K.M., and Koornneef, M. (2001). The TRANSPARENT TESTA12 gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. *Plant Cell* 13, 853-871.

Deus-Newmann, B., and Zenk, M. (1986). Accumulation of alkaloids in plant vacuoles does not involve an ion-trap mechanism. *planta* 167, 44-53.

Diener, A.C., Gaxiola, R.A., and Fink, G.R. (2001). Arabidopsis ALF5, a multidrug efflux transporter gene family member, confers resistance to toxins. *Plant Cell* 13, 1625-1638.

Dieterle, M., Thomann, A., Renou, J.P., Parmentier, Y., Cognat, V., Lemonnier, G., Muller, R., Shen, W.H., Kretsch, T., and Genschik, P. (2005). Molecular and functional characterization of Arabidopsis Cullin 3A. *Plant Journal* 41, 386-399.

Dixon, R.A., and Paiva, N.L. (1995). Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* 7, 1085-1097.

Eckardt, N.A. (2001). Move it on out with MATEs. *Plant Cell* 13, 1477-1480.

Follet-Gueye, M.L., Pagny, S., Faye, L., Gomord, V., and Driouich, A. (2003). An improved chemical fixation method suitable for immunogold localization of green fluorescent protein in the Golgi apparatus of tobacco Bright Yellow (BY-2) cells. *J Histochem Cytochem* 51, 931-940.

Frisch, D.A., Harris-Haller, L.W., Yokubaitis, N.T., Thomas, T.L., Hardin, S.H., and Hall, T.C. (1995). Complete sequence of the binary vector Bin 19. *Plant molecular biology* 27, 405-409.

Gamborg, O.L., Miller, R.A., and Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental cell research* 50, 151-158.

Goossens, A., Hakkinen, S.T., Laakso, I., Seppanen-Laakso, T., Biondi, S., De Sutter, V., Lammertyn, F., Nuutila, A.M., Soderlund, H., Zabeau, M., Inze, D., and Oksman-Caldentey, K.M. (2003). A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 8595-8600.

Gundlach, H., Muller, M.J., Kutchan, T.M., and Zenk, M.H. (1992). Jasmonic Acid Is a Signal Transducer in Elicitor-Induced Plant-Cell Cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 2389-2393.

Hakkinen, S., Rischer, H., Laakso, I., Maaheimo, H., Seppanen-Laakso, T., and Oksman-Caldentey, K.M. (2004). Anataline and other methyl jasmonate-inducible nicotine alkaloids from *Nicotiana tabacum* cv. BY-2 cell cultures. *Planta Medica* 70, 936-941.

Hashimoto, T., Yukimune, Y., and Yamada, Y. (1989). Putrescine and Putrescine N-Methyltransferase in the Biosynthesis of Tropane Alkaloids in Cultured Roots of *Hyoscyamus-Albus* .1. *Biochemical-Studies. Planta* 178, 123-130.

Hashimoto, T., Mitani, A., and Yamada, Y. (1990). Diamine Oxidase from Cultured Roots of *Hyoscyamus-Niger* - Its Function in Tropane Alkaloid Biosynthesis. *Plant Physiology* 93, 216-221.

Hashimoto, T., and Yamada, Y. (1994). Alkaloid Biogenesis - Molecular Aspects. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45, 257-285.

Haslam, S.C., and Young, T.W. (1992). Purification of N-Methylputrescine Oxidase from *Nicotiana-Rustica*. *Phytochemistry* 31, 4075-4079.

Heim, W.G., Sykes, K.A., Hildreth, S.B., Sun, J., Lu, R.H., and Jelesko, J.G. (2007). Cloning and characterization of a *Nicotiana tabacum* methylputrescine oxidase transcript. *Phytochemistry* 68, 454-463.

Hibi, N., Higashiguchi, S., Hashimoto, T., and Yamada, Y. (1994). Gene expression in tobacco low-nicotine mutants. *Plant Cell* 6, 723-735.

Horsch, R.B., Rogers, S.G., and Fraley, R.T. (1985). Transgenic Plants - Technology and Applications. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 190, 67-AGO.

Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G., and Fraley, R.T. (1985). A Simple and General-Method for Transferring Genes into Plants. *Science* 227, 1229-1231.

Imanishi, S., Hashizume, K., Nakakita, M., Kojima, H., Matsubayashi, Y., Hashimoto, T., Sakagami, Y., Yamada, Y., and Nakamura, K. (1998). Differential induction by methyl jasmonate of genes encoding ornithine decarboxylase and other enzymes involved in nicotine biosynthesis in tobacco cell cultures. *Plant molecular biology* 38, 1101-1111.



Katoh, A., Yamaguchi, Y., Sano, H., and Hashimoto, T. (2003). Analysis of expression sequence tags from *Nicotiana sylvestris*. *Proceedings of the Japan Academy Series B-Physical and Biological Sciences* 79, 151-154.

Katoh, A., Shoji, T., and Hashimoto, T. (2007). Molecular cloning of N-methylputrescine oxidase from tobacco. *Plant & cell physiology* 48, 550-554.

Kutchan, T.M. (1995). Alkaloid Biosynthesis - the Basis for Metabolic Engineering of Medicinal-Plants. *Plant Cell* 7, 1059-1070.

Kutsuna, N., and Hasezawa, S. (2002). Dynamic organization of vacuolar and microtubule structures during cell cycle progression in synchronized tobacco BY-2 cells. *Plant & cell physiology* 43, 965-973.

Lechner, E., Achard, P., Vansiri, A., Potuschak, T., and Genschik, P. (2006). F-box proteins everywhere. *Current Opinion in Plant Biology* 9, 631-638.

Leete, E. (1979). The alkaloids: alkaloids derived from ornithine, lysine and nicotinic acid.

Legg, P.D., Chaplin, J.F., and Collins, G.B. (1969). Inheritance of percent total alkaloids in *Nicotiana tabacum* L. *J. Am. Chem. Soc* 79, 4529-4531.

Legg, P.D., and Collins, G.B. (1971). Inheritance of percent total alkaloids in *Nicotiana tabacum* L. II genetic effects of two loci in Burley21XLA Burley 21 populations. *J. Herd.* 60, 213-217.

Li, L., He, Z., Pandey, G.K., Tsuchiya, T., and Luan, S. (2002). Functional cloning and characterization of a plant efflux carrier for multidrug and heavy metal detoxification. *The Journal of biological chemistry* 277, 5360-5368.

Maeshima, M. (2000). Vacuolar H(+)-pyrophosphatase. *Biochimica et biophysica acta* 1465, 37-51.

Mathews, H., Clendennen, S.K., Caldwell, C.G., Liu, X.L., Connors, K., Matheis, N., Schuster, D.K., Menasco, D.J., Wagoner, W., Lightner, J., and Wagner, D.R. (2003). Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. *Plant Cell* 15, 1689-1703.

Memelink, J., Verpoorte, R., and Kijne, J.W. (2001). ORCANization of jasmonate - responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends in Plant Science* 6, 212-219.

Murakami, S., and Yamaguchi, A. (2003). Multidrug-exporting secondary transporters. *Current Opinion in Structural Biology* 13, 443-452.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15, 473-497.

Nagata, T., Nemoto, Y., and Hasezawa, S. (1992). Tobacco BY-2 cells as the "HeLa" cells in the cell biology of higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 132, 1-30

Nair, M.K., Chetty, D.J., Ho, H., and Chien, Y.W. (1997). Biomembrane permeation of nicotine: Mechanistic studies with porcine mucosae and skin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 86, 257-262.

Nawrath, C., Heck, S., Parinthewong, N., and Metraux, J.P. (2002). EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in Arabidopsis, is a member of the MATE transporter family. *Plant Cell* 14, 275-286.

Neill, S.J., Lenton, J.R., and Wibberley, M.S. (1994). Differential effects of elicitors on secondary metabolism in hairy root cultures of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Biochemical Society transactions* 22, 383-388.

Nesi, N., Debeaujon, I., Jond, C., Pelletier, G., Caboche, M., and Lepiniec, L. (2000). The TT8 gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of DFR and BAN genes in Arabidopsis siliques. *Plant Cell* 12, 1863-1878.

Nesi, N., Jond, C., Debeaujon, I., Caboche, M., and Lepiniec, L. (2001). The Arabidopsis TT2 gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *Plant Cell* 13, 2099-2114.

Omote, H., Hiasa, M., Matsumoto, T., Otsuka, M., and Moriyama, Y. (2006). The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. *Trends in Pharmacological Sciences* 27, 587-593.

Otani, M., Shitan, N., Sakai, K., Martinoia, E., Sato, F., and Yazaki, K. (2005). Characterization of vacuolar transport of the endogenous alkaloid berberine in *Coptis japonica*. *Plant Physiology* 138, 1939-1946.

Otsuka, M., Matsumoto, T., Morimoto, R., Arioka, S., Omote, H., and Moriyama, Y. (2005). A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17923-17928.

Otsuka, M., Yasuda, M., Morita, Y., Otsuka, C., Tsuchiya, T., Omote, H., and Moriyama, Y. (2005). Identification of essential amino acid residues of the NorM Na<sup>+</sup>/multidrug antiporter in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of bacteriology* 187, 1552-1558.

Pintard, L., Willems, A., and Peter, M. (2004). Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *The EMBO journal* 23, 1681-1687.

Rogers, E.E., and Guerinot, M.L. (2002). FRD3, a member of the multidrug and toxin efflux family, controls iron deficiency responses in Arabidopsis. *Plant Cell* 14, 1787-1799.

Roos, W., Evers, S., Hieke, M., Tschöpe, M., and Schumann, B. (1998). Shifts of intracellular pH distribution as a part of the signal mechanism leading to the elicitation of benzophenanthridine alkaloids - Phytoalexin biosynthesis in cultured cells of *Eschscholtzia californica*. *Plant Physiology* 118, 349-364.

Saitoh, F., Noma, M., and Kawashima, N. (1985). The Alkaloid Contents of 60 *Nicotiana* Species. *Phytochemistry* 24, 477-480.

Saunders, J.W., and Bush, L.P. (1979). Nicotine Biosynthetic Enzyme-Activities in *Nicotiana-Tabacum-L* Genotypes with Different Alkaloid Levels. *Plant Physiology* 64, 236-240.

Schevelbein, H. (1982). Nicotine, resorption and fate. *Pharm. Ther.* 18, 233-248.

Sevon, N., and Oksman-Caldentey, K.M. (2002). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. *Planta Med* 68, 859-868.

Sharma, S.B., and Dixon, R.A. (2005). Metabolic engineering of proanthocyanidins by ectopic expression of transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 44, 62-75.

Shimaoka, T., Ohnishi, M., Sazuka, T., Mitsuhashi, N., Hara-Nishimura, I., Shimazaki, K.I., Maeshima, M., Yokota, A., Tomizawa, K.I., and Mimura, T. (2004). Isolation of intact vacuoles and proteomic analysis of tonoplast from suspension-cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 45, 672-683.

Shitan, N., Bazin, I., Dan, K., Obata, K., Kigawa, K., Ueda, K., Sato, F., Forestier, C., and Yazaki, K. (2003). Involvement of CjMDR1, a plant multidrug-resistance-type ATP-binding cassette protein, in alkaloid transport in *Coptis japonica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 751-756.

Shoji, T., Nakajima, K., and Hashimoto, T. (2000). Ethylene suppresses jasmonate-induced gene expression in nicotine biosynthesis. *Plant & cell physiology* 41, 1072-1076.

Shoji, T., Yamada, Y., and Hashimoto, T. (2000). Jasmonate induction of putrescine N-methyltransferase genes in the root of *Nicotiana sylvestris*. *Plant & cell physiology* 41, 831-839.

Shoji, T., Winz, R., Iwase, T., Nakajima, K., Yamada, Y., and Hashimoto, T. (2002). Expression patterns of two tobacco isoflavone reductase-like genes and their possible roles in secondary metabolism in tobacco. *Plant molecular biology* 50, 427-440.

Sinclair, S.J., Johnson, R., and Hamill, J.D. (2004). Analysis of wound-induced gene expression in *Nicotiana* species with contrasting alkaloid profiles. *Functional Plant Biology* 31, 721-729.

Stephuhn, A., Gase, K., Krock, B., Halitschke, R., and Baldwin, I.T. (2004). Nicotine's defensive function in nature. *PLoS biology* 2, E217.

van der Fits, L., and Memelink, J. (2001). The jasmonate-inducible AP2/ERF-domain transcription factor ORCA3 activates gene expression via interaction with a jasmonate-responsive promoter element. *Plant Journal* 25, 43-53.

Walker, A.R., Davison, P.A., Bolognesi-Winfield, A.C., James, C.M., Srinivasan, N., Blundell, T.L., Esch, J.J., Marks, M.D., and Gray, J.C. (1999). The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell* 11, 1337-1350.

Walton, N.J., Robins, R.J., and Peerless, A.C.J. (1990). Enzymes of N-Methylputrescine Biosynthesis in Relation to Hyoscyamine Formation in Transformed Root Cultures of *Datura-Stramonium* and *Atropa-Belladonna*. *Planta* 182, 136-141.

Weber, H., Bernhardt, A., Dieterle, M., Han, P., Hano, P., Mutlu, A., Estelle, M., Genschik, P., and Hellmann, H. (2005). *Arabidopsis* AtCUL3a and AtCUL3b form complexes with members of the BTB/POZ-MATH protein family. *Plant Physiology* 137, 83-93.

Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G., and

Waterhouse, P.M. (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* 27, 581-590.

Wink, M., and Roberts, M. (1998). in *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*, eds Roberts MF, Wink M (Plenum Press, New York), pp239-262.

Yazaki, K. (2006). ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *FEBS letters* 580, 1183-1191.

Yoshida, K., Toyama-Kato, Y., Kameda, K., and Kondo, T. (2003). Sepal color variation of *Hydrangea macrophylla* and vacuolar pH measured with a proton-selective microelectrode. *Plant and Cell Physiology* 44, 262-268.

稲井康二. (2002). FDD 法を用いたニコチン生合成調節遺伝子 Nic の制御下にある遺伝子の単離. 修論.

佐藤康隆. (2004). タバコ MATE 型トランスポーターのプロモーター解析. 修論.

## 論文目録

**Takase, H., Inai, K.** and Hashimoto, T. (2007). Jasmonate- and wounding-induced expression of a tobacco gene encoding a BTB domain protein. *Plant Biotechnology*. (in press)

Katoh, A., Oki, H., Inai, K. and Hashimoto, T. (2006) Molecular regulation of nicotine biosynthesis. *Plant Biotechnology* 22: 389-392.

Tkaizawa, M., Hori, K., Inai, K., Takase, H., Hashimoto, T. and Watanabe, Y. (2007) Virus-induced gene silencing approach for the suppression of nicotine content in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Biotechnology* 24: 295-300

Sato, F., Inai, K. and Hashimoto, T. (2007) Metabolic engineering in alkaloid biosynthesis: case studies in tyrosine- and putrescine-derived alkaloid. In: R Verpoorte et al. (eds.), *Application of Plant Metabolic Engineering*. Springer 139-166