

博士論文番号 : 0981007

タバコ植物におけるニコチン蓄積に関する
トランスポーターの機能解析

加藤 啓太

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 植物細胞機能

(橋本 隆 教授)

平成 26 年 6 月提出

目次

序論	1
第1章 ニコチン輸送体 NUP1 の輸送機能解析	
材料と方法	16
結果	23
考察	37
第2章 ニコチン輸送体 NUP1 のニコチン蓄積機能の解析	
材料と方法	40
結果	46
考察	70
第3章 オーキシシン輸送体 PILS を介したニコチン生合成におけるジャスモン酸 とオーキシシンのクロストーク	
材料と方法	74
結果	78
考察	107
総括	111
謝辞	112
参考文献	113
supplement data	125

序論

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。一方で生命維持活動に必ずしも必要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もって機能している。高等植物において、一次代謝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 50,000 種類を超える。二次代謝産物は生合成機構および構造からテルペノイド、アルカロイド、フラボノイド類に大別される。植物にとって二次代謝産物は病害虫や病原菌からの防御物質として機能するのはもちろんのこと、誘因物質または共生細菌との相互作用など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の窒素を含んだ塩基性化合物の総称である。窒素原子はアミノ酸に由来する(Hashimoto and Yamada, 1994, Kutchan, 1995)。ニコチンおよびトロパンアルカロイドのピロリジン骨格はオルニチンに由来し、ペペリジン、キノリチジンおよびインドリジンアルカロイドはリジンに由来し、そしてタバコアルカロイドのピリジン骨格はアスパラギン酸に由来する。アルカロイドにはおよそ 13,000 種の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 (Kutchan, 1995)。二次代謝産物はその多様な化学構造と高い生理活性をもつことから医薬品や嗜好品さらに毒物として利用されている。例えば、プリンアルカロイドの 1 つである *caffeine*、さらにその前駆体でありココアなどの主成分である *theophylline* は食品に利用される一方で筋弛緩作用を持つため医薬品として利用されている。

本研究ではタバコ (*Nicotiana tabacum*) 植物における主要ピリジンアルカロイドのニコチンに着目した。ニコチンの薬理活性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つ。またニコチンは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嗜好品としての利用だけでなく殺虫剤として農業的にも利用されてきた。

ニコチンは、1928 年に Jean Nicot によって単離され、そのニコチンの構造はピリジン環とピロリジン環が結合している(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ベ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ロリジン環はオルニチン由来のプトレシンを介して作られる。プトレシンは全ての生物でより高次のアミンであるスペルミンやスペルミジンなどのポリアミンへと代謝される。タバコ植物体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始まる (Hashimoto et al., 1989)。この反応の生成物である *N*-methylputrescine は、*N*-methylputrescine oxidase (MPO)が触媒する酸化的脱アミノ化を受け、4-methylaminobutanal に変換される(Heim et al., 2007; Katoh et al., 2007; Naconsie et al., 2013)。さらに 4-methylaminobutanal は、自発的環化反応により *N*-methyl- Δ^1 -pyrrolinium cation になる。また、タバコ植物体内で生合成されるピリジン環はアスパラギン酸に由来し、ピリジンヌクレオチドサイクルを介したニコチン酸からニコチン生合成へ供給される(Katoh and Hashimoto, 2004)。アスパラギン酸からピリジンヌクレオチドサイクルまでは高度に保存された 3 ステップの反応によって代謝される。アスパラギン酸は asparatate oxidase (AO) が触媒する酸化反応から始まり α -imino-succinate に代謝される(Dalton, 1980)。続いて quinolinate synthase (QS) によって α -imino-succinate は glyceraldehyde 3-phosphate と共に縮合および環化反応を受ける。その時脱リン酸および脱水反応によって quinolinate に代謝され、ピリジン環が生成する(Dalton, 1980; Katoh et al., 2006)。さらに quinolinate は hosphoriboxyl pyrophosphate とともに quinolinate phosphoribosyl transferase (QPT)によって nicotinic acid mononucleotide (NaMN) へと代謝される(Saunders and Bush, 1979; Wagner et al., 1986a; Wagner et al., 1986b; Bhatia and Calvo,1996)。その後、NaMN はピリジンヌクレオチドサイクルの代謝中間体のニコチン酸に代謝されニコチンの生合成に使用される。ニコチン酸と *N*-methyl- Δ^1 -pyrrolinium cation が酸化還元反応を介した縮合反応の後、ニコチンが生合成される。近年この縮合反応に必須である A622 reductase および Berberine bridged enzyme like(BBL)が単離された(Kajikawa et al., 2009; Kajikawa et al., 2011)。A622 reductase は NADPH 依存的還元酵素であり PMT の遺伝子発現パターンと類似している(Shoji et al., 2000b; Shoji et al., 2002; Cane et al., 2005; Kidd et al., 2006)。A622 を *RNAi* による発現抑制させた培養根では著しくニコチン蓄積量が減少するとともに、*N*-(β -D-glucopyranosyl) nicotinic acid (NaNG)の蓄積が見られた。しかし、NaNG は A622 の酵素反応基質ではなく、ニコチン酸に由来する二次的な代謝中間体として蓄積した(Kajikawa et al., 2009)。また BBL は FAD 依存

的酸化酵素であり、*RNAi*による発現抑制させた培養根では著しくニコチン蓄積量が減少するとともに、dihydrometanicotine (DMN)を過剰に蓄積した。しかし、DMNはBBLの直接の反応基質ではない(Kajikawa et al., 2011)。ニコチン酸と*N*-methyl- Δ^1 -pyrrolinium cationにおける酸化還元反応を介した縮合反応にはA622およびBBLが必須であるが、この縮合反応を解明するには不十分であり、さらに未知の酵素が縮合反応に必要である(図1)。

ニコチンはタバコの根組織において生合成されており、ニコチン生合成酵素遺伝子群は根特異的に強く発現している(Hibi et al., 1994; Shoji et al., 2000b; Shoji et al., 2002; Cane et al., 2005)。また、根組織におけるニコチン生合成酵素遺伝子群の発現および、それに伴う葉組織へのニコチン蓄積は葉への傷害刺激や虫害によって増大される(Baldwin et al., 1994; Sinclar et al., 2004; Cane et al., 2005)。タバコ植物が葉に傷害を受けることで、根における内在性のジャスモン酸産生を増大させる。タバコBY-2培養細胞およびタバコ培養根においてジャスモン酸処理によってニコチン生合成が活性化される。つまり、ニコチン生合成酵素遺伝子群はジャスモン酸シグナル経路を経て活性化される(図2; Gundlach et al., 1992; Shoji et al., 2002; Cane et al., 2005)。

ジャスモン酸シグナル経路の解析はモデル植物のシロイヌナズナを用いられて行われてきた。ジャスモン酸非感受性変異体の解析から*colonatine-insensitive 1*および*jasmonate-insensitive 1*が単離され、それぞれの原因遺伝子として*COI1*および*JIN1 / MYC2*が同定された(Feys et al., 1994; Xie et al., 1998; Berger et al., 1996; Lorenzo et al., 2004)。COI1はほとんど全てのジャスモン酸応答に必要な因子として知られ、SCF型(Skp1-Cullin-F-BOX)E3ユビキチンリガーゼ複合体を構成するF-boxタンパク質をコードしている(Xie et al., 1998)。JIN1 / MYC2はbHLH型転写因子をコードしており、傷害応答のみならず酸化ストレス応答、さらにフラボノイド生合成などの、広範囲な遺伝子発現を制御している(Berger et al., 1996; Lorenzo et al., 2004)。さらにjasmonate ZIM domain (JAZ)タンパクと呼ばれる一群の26Sプロテアソーム系で分解を受ける転写リプレッサータンパクの発見によってCOI1-JAZの相互作用(Chini et al., 2007)、JAZ-MYC2の相互作用(Thines et al., 2007; Yan et al., 2007)が示された。COI1が活性型のジャスモン酸であるジャスモン酸イソロイシン複合体を認識することでJAZ転写リプレッサータンパクが26Sプロテアソーム系によって分解され、さらにMYC2転写因子が活性化される。このCOI1-JAZ-MYC2カスケードがジャスモン酸応答の中心的な

役割を果たしている。シロイヌナズナでは、MYC2 応答性の下流因子には T/G box または G box と呼ばれる *cis* 配列が含まれ、そこへ MYC2 タンパクが結合することで、下流因子を活性化させる (Chini et al., 2007)。また MYC2 による広範囲な遺伝子制御は別の転写因子を介して二次的に制御されていることも知られており、ERF 型、MYB 型、WRKY 型、ORC 型転写因子が MYC2 による制御を受けている (図 2; Xu et al., 2006; Wang et al., 2008; Pre et al., 2008)。

ニコチン生合成経路の解明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を戻し交雑によって野生型の Burley21 品種に導入した品種である。LA Burley21 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高感受性を示す (Legg et al., 1969)。また LA Burley21 の低ニコチン含量という表現型は、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起因している (Legg et al., 1971)。この二つの独立した遺伝子座 (*NICOTINE 1* および *NICOTINE 2*、以下 *NIC1* および *NIC2* とする) では、*nic1* 変異の方が *nic2* 変異よりも低ニコチン形質を示し、*nic1nic2* の二重変異体ではさらに強い低ニコチンの形質を示す (Legg et al., 1971)。*nic* 変異体において全てのニコチン生合成遺伝子の発現が低下していることから、ニコチン生合成に特異的な調節遺伝子座であることが示唆され (Saunders, 1979; Hibi et al., 1994)、その後のニコチン生合成経路の解明に用いられてきた。

近年 ERF 型転写因子の欠失が低ニコチンを引き起こす *NIC2* 遺伝子座の原因遺伝子と同定され、*nic2* 変異体では少なくとも 7 つの ERF 型転写因子が欠失していた (Shoji et al., 2010)。これら *NIC2* 遺伝子座 ERF 型転写因子はニチニチソウにおけるジャスモン酸誘導型インドールアルカロイド生合成構造遺伝子群を正に制御する ORCA3 (van der Fits and Memelink, 2001) のホモログであり、AP2/ERF DNA 結合ドメインを持っていた。これら *NIC2* 遺伝子座 ERF 型転写因子は非常に強くジャスモン酸に誘導される。生化学的解析より *NIC2* 遺伝子座 ERF 型転写因子はニコチン生合成遺伝子 PMT を始めとするニコチン蓄積に関わる遺伝子のプロモーター上の *cis* 配列 GCC box に結合することがわかった。また GCC box はニコチン生合成および輸送体構造遺伝群のプロモーター上に複数存在し、*NIC2* 遺伝子座 ERF 型転写因子によるニコチン蓄積の包括的な制御が存在する (Shoji et al., 2010)。この *NIC2* 遺伝子座 ERF 型転写因子は MYC2 転写因子の下流でニコチン生合成全体を制御し、特に ERF189 はニコチン蓄積へのマスター転写

因子である。活性化した MYC2 転写因子がさらに NIC2 遺伝子座 ERF 型転写因子を発現誘導し、活性化した ERF 型転写因子がニコチン生合成遺伝子のプロモーター上に存在する GCC box に結合することでニコチン蓄積を促進している (Shoji et al., 2010)。つまりニコチン生合成遺伝子群は COI1-JAZ-MYC2 カスケードとその下流の NIC2 遺伝子座 ERF189 転写因子によって協調的に制御されている(図 2)。

ニコチン生合成全体がジャスモン酸によって協調的に正の制御を受け活性化される(Imanishi et al., 1998; Shoji et al., 2000a; Shoji et al., 2002; Goossens et al., 2003)。一方で他の植物ホルモンによって抑制される(Shoji et al., 2000a; Winz and Baldwin, 2001; Shoji et al., 2010)。エチレンは気体の植物ホルモンで一般的に生長阻害や果実の成熟に関与するが、ニコチン生合成を抑制することも知られている。タバコ *N. sylvestris* ではエチレンによって複数のニコチン生合成酵素遺伝子のジャスモン酸による発現誘導が抑制される(Shoji et al., 2000a)。またタバコ *N. attenuata* でも同様にエチレンによってニコチン生合成酵素遺伝子 PMT のジャスモン酸による発現誘導が抑制される(Winz and Baldwin, 2001)。また、エチレンの前駆体の 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid(ACC)によって NIC2 遺伝子座 ERF 型転写因子のジャスモン酸による強い発現誘導が打ち消される(Shoji et al., 2010)。つまり、ニコチン生合成はジャスモン酸によって誘導され、エチレンによって ERF189 転写因子の発現を介して抑制される(図 3)。しかし、エチレンがニコチン生合成に抑制的に機能する分子機構は未解明である。

また植物の発生、成長に必須である植物ホルモンのオーキシンはニコチン生合成を負に制御する機構も知られている (Baldwin, 1988)。タバコ植物の頂芽切除によって植物体内で茎頂からの根へのオーキシン輸送が阻害され、ニコチン蓄積を誘導することが経験的に知られている。さらにそこへ外生のオーキシンを添加すると根へのオーキシン輸送が促進され、ニコチン蓄積が抑制される(図 4; Shi et al., 2006)。またナス科 *Hyoscyamus* 属植物の培養根にオーキシンを処理することでトロパンアルカロイドの蓄積が抑制される(Hashimoto et al., 1986)。オーキシンによるジャスモン酸誘導性の二次代謝産物の蓄積の抑制は古くから知られているものの、詳細な分子機構は未解明である (図 5)。

ジャスモン酸とオーキシンの相互作用に関してはシロイヌナズナを用いた遺伝学的解析を用いた研究が多い(supplemnt 図 1)。オーキシン生合成遺伝子 *YUCCA9* の発現はジャスモン酸レセプター COI1 依存的(Hentrich et al., 2013)、さ

らに天然型オーキシシン IAA の前駆体であるトリプトファンを生合成する *tryptophan synthase α/β* (TSA/TSB) は MYC2 転写因子依存的である (supplement 図 1. A; Dombrecht et al., 2007)。さらにジャスモン酸シグナル経路の転写リプレッサー JAZ4/8 およびオーキシシンシグナル経路の転写リプレッサー IAA29 はシロイヌナズナ WRKY57 転写因子を介し、拮抗的に葉の老化を制御している (supplement 図 1. B; Jang et al., 2014)。オーキシシンシグナル経路に関わる転写因子である *arf6arf8* 変異体は花の成熟に異常をきたすだけでなく、ジャスモン酸を減少させる (supplement 図 1. C; Nagpal et al., 2005)。ジャスモン酸誘導性 JAZ1/TIFY10A 転写リプレッサーはオーキシシン誘導性を示す (supplement 図 1. D; Grunwald et al., 2009)。このようにジャスモン酸とオーキシシンの相互関係について数多く報告されているが、タバコ植物におけるジャスモン酸シグナル経路とオーキシシンシグナル経路の具体的な相互関係がニコチン生合成に及ぼす影響については未解明である。

タバコ植物のニコチン蓄積における制御因子、生合成経路および輸送様式の分子生物学的解明は、低ニコチン *nic1nic2* 変異体を用いた解析だけでなくタバコ BY-2 培養細胞や培養根を用いても行われている。タバコ BY-2 培養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)。タバコ植物由来の細胞としてニコチン蓄積の特性も有し、高増殖状態で添加されている人工オーキシシンの 2,4-D を除いた上で、ジャスモン酸処理によりニコチン生合成が誘導される (Blechert, 1995; Gossens et al., 2003)。

タバコ植物体においてニコチンは根で生合成され道管を通り地上部に運ばれ、特に葉の液胞内に蓄積する (Wink and Robert, 1998)。ニコチン生合成酵素の PMT や A622 は根端領域では、*epidermis* や *cortex* に局在し、分化領域では *cortex* の最外層、道管を取り囲む *parenchyma* 細胞に存在している (Shoji et al., 2000b; Shoji et al., 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、生合成されたニコチンが道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。

これまでに報告されたニコチン輸送体は Multidrug and toxic compound extrusion (MATE)型である Jasmonate-inducible alkaloid transporter 1(NtJAT1)および NtMATE1/2、Drug and metabolite transporter (DMT)型の Nicotine uptake permease 1

(NUP1)である。(Morita et al., 2009; Shoji et al., 2009; Hildreth et al., 2011)。NtJAT1 は葉、NtMATE1/2 は根の液胞膜に局在し、共に細胞質中のニコチンをは H^+ の対向輸送を駆動力として液胞内に輸送している(Morita et al., 2009; Shoji et al., 2009)。さらに NtMATE1 はニコチンの根から葉への長距離輸送には関与しておらず、根の細胞内輸送にのみ機能している(Shoji et al., 2009)。NUP1 は根の細胞膜上に局在しアポプラストからシンプラストにニコチンを輸送している。興味深いことに *NUP1* の発現とニコチン生合成遺伝子群の発現は正の相関がある(Hildreth et al., 2011)。さらに *NUP1* 発現抑制形質転換体では根の伸長が促進され、ジャスモン酸またはニコチン添加培地でもその表現型は維持される(Hildreth et al., 2011)。タバコ植物におけるニコチン輸送様式の一部は解明されつつあるが、例えば根で道管にニコチンをローディングする輸送体、さらに葉で道管からのアンローディングする輸送体など根から葉への長距離輸送の全体像は未解明である(図 6)。

タバコ NUP1 はホモログであるシロイヌナズナ Purine uptake permease transporter (PUP)と共に DMT スーパーファミリー 2.A.7.14 を形成している(図 7, 用いた配列は supplement 表 2 に示す)。シロイヌナズナ PUP1 はアデニン取り込み変異体酵母 MG887-1 への相補スクリーニングから得られた(Burkle et al., 2003)。PUP は細胞膜局在型輸送体で GUS レポーター解析から PUP 1 は葉の排水組織、PUP2 は師管、PUP3 は葯や雄蕊で高発現している(Burkle et al., 2003)。PUP1 を発現させた分裂酵母における基質取り込み実験から、PUP1 はプリン環を持つアデニンを輸送基質とし、さらにプリン環を持つサイトカニンも輸送基質としている(Burkle et al., 2003; Cedzich et al., 2008)。またビタミン B6 取り込み変異体酵母 MVY30 への相補スクリーニングから、PUP1 はビタミン B6 およびビタミン B6 類縁体の輸送体である(Szydlowski et al., 2013)。

上記のようにニコチン生合成および蓄積には様々な分子機構が存在し制御されている。本研究は *NUP1* 発現抑制形質転換植物体における根の伸長促進およびニコチン生合成遺伝子の発現抑制を介したニコチン蓄積量の減少に着目した。この現象は NUP1 のニコチン取り込み活性からは説明がつかない。具体的には以下の 2 点を明らかにする。

1. NUP/PUP ファミリーのタバコ NUP1 とシロイヌナズナ PUP1 の輸送機能について比較することで、NUP1 の詳細な輸送機能を明らかにする。
2. NUP1 の輸送活性を明らかにすることで、NUP1 がどのような分子機構で、ニ

コチン生合成と根の生育に影響を与えているのかを明らかにする。

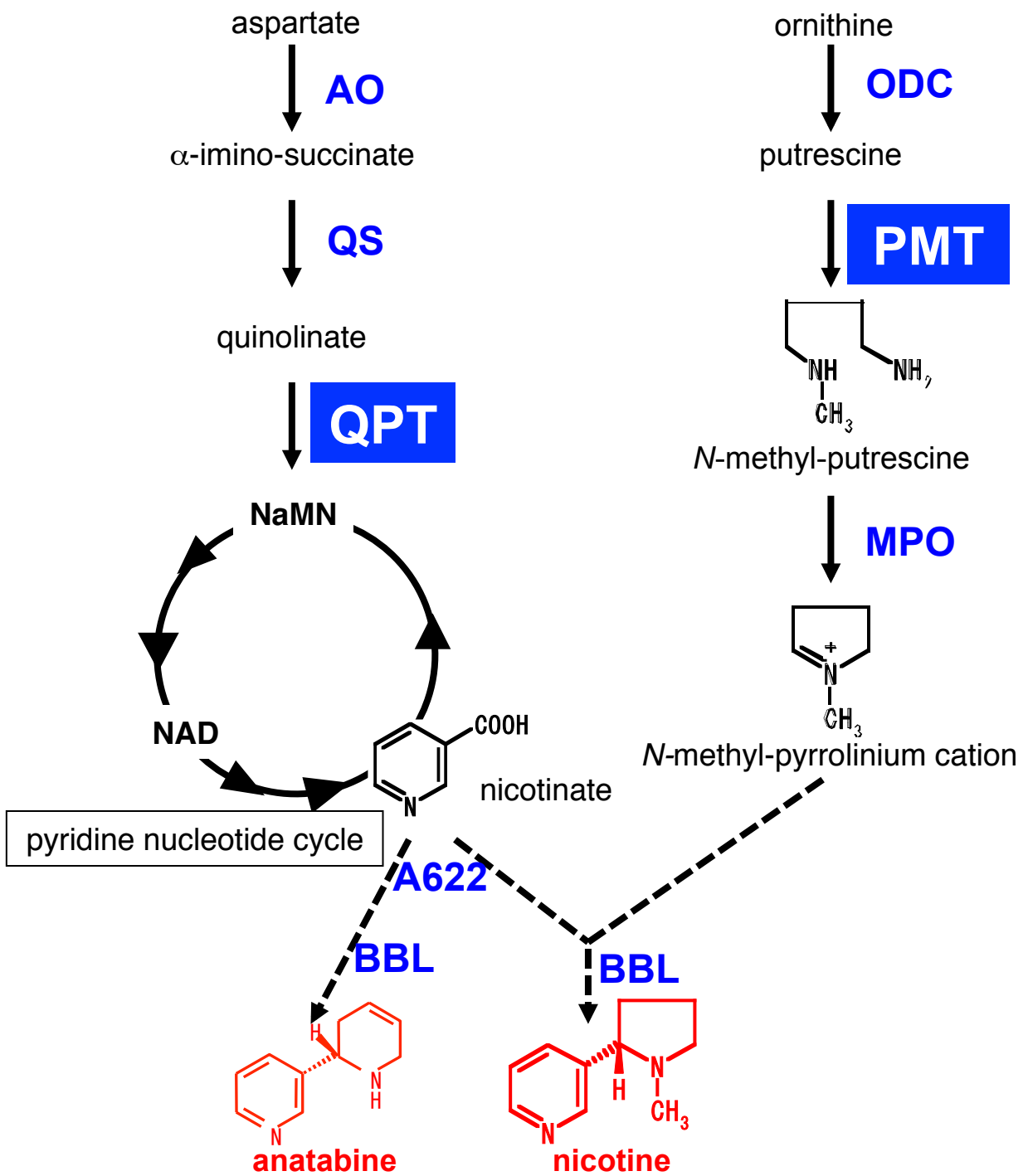


図1. ニコチン生合成経路のモデル図

タバコ植物体や培養根においてニコチンはピリジン環とピロリジン環から構成される。ピリジン環はアスパラギン酸がAO、QS、QPTによってNaMNに代謝された後、ピリジンヌクレオチドサイクルを介しニコチン酸に由来している。またピロリジン環はODC、PMT、MPOによって代謝され、N-methyl-pyrrolium cationに由来している。これら2つの環がA622 reductaseとBBLによって縮合反応され、ニコチンが生合成される。またタバコBY-2培養細胞ではMPO遺伝子が発現抑制されているため、ニコチン酸が2つ縮合したアナタビンが生合成される。

縮合反応にはA622およびBBLが必須であるが不十分であり、他の生合成酵素が必要であるが未解明である。

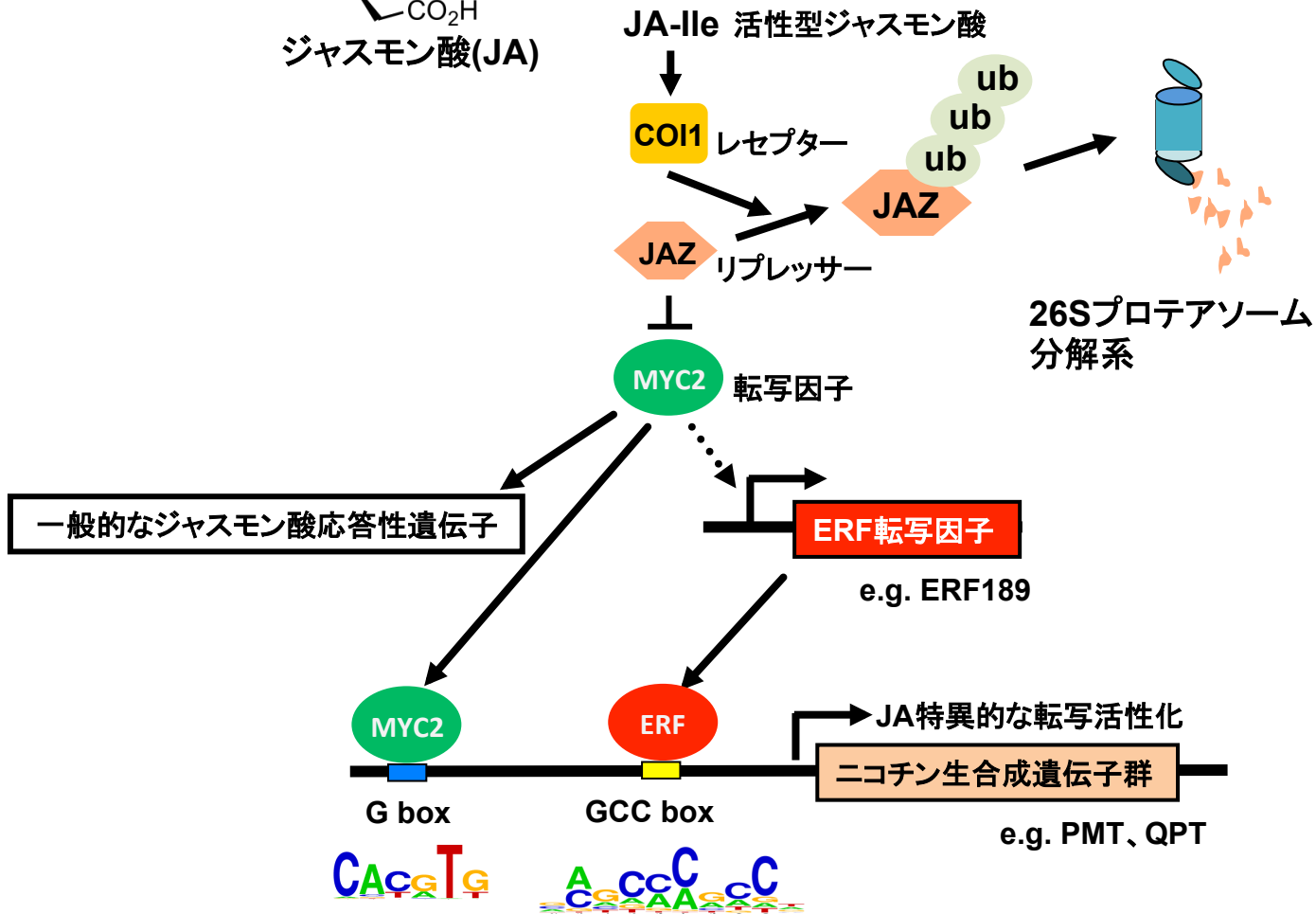
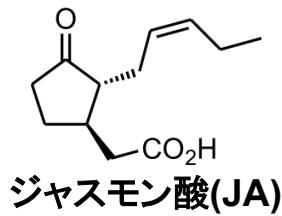


図2. COI1-JAZ-MYC2によるジャスモン酸シグナル経路のモデル図

活性型ジャスモン酸であるのジャスモン酸イソロイシンがジャスモン酸レセプターCOI1に認識されることで、JAZリプレッサータンパクが26Sプロテアソーム依存的に分解される。その結果MYC2転写因子が活性化される。活性化したMYC2がニコチン合成酵素遺伝子のプロモーター上のcis配列G boxに結合することがニコチン合成遺伝子の活性化に必要である。またMYC2がNIC2遺伝子座 ERF型転写因子ERF189遺伝子の発現を誘導する。NIC2遺伝子座 ERF型転写因子がニコチン合成酵素遺伝子のプロモーター上のcis配列GCC boxに結合し、MYC2と協調的に機能することでニコチン合成遺伝子が活性化される。

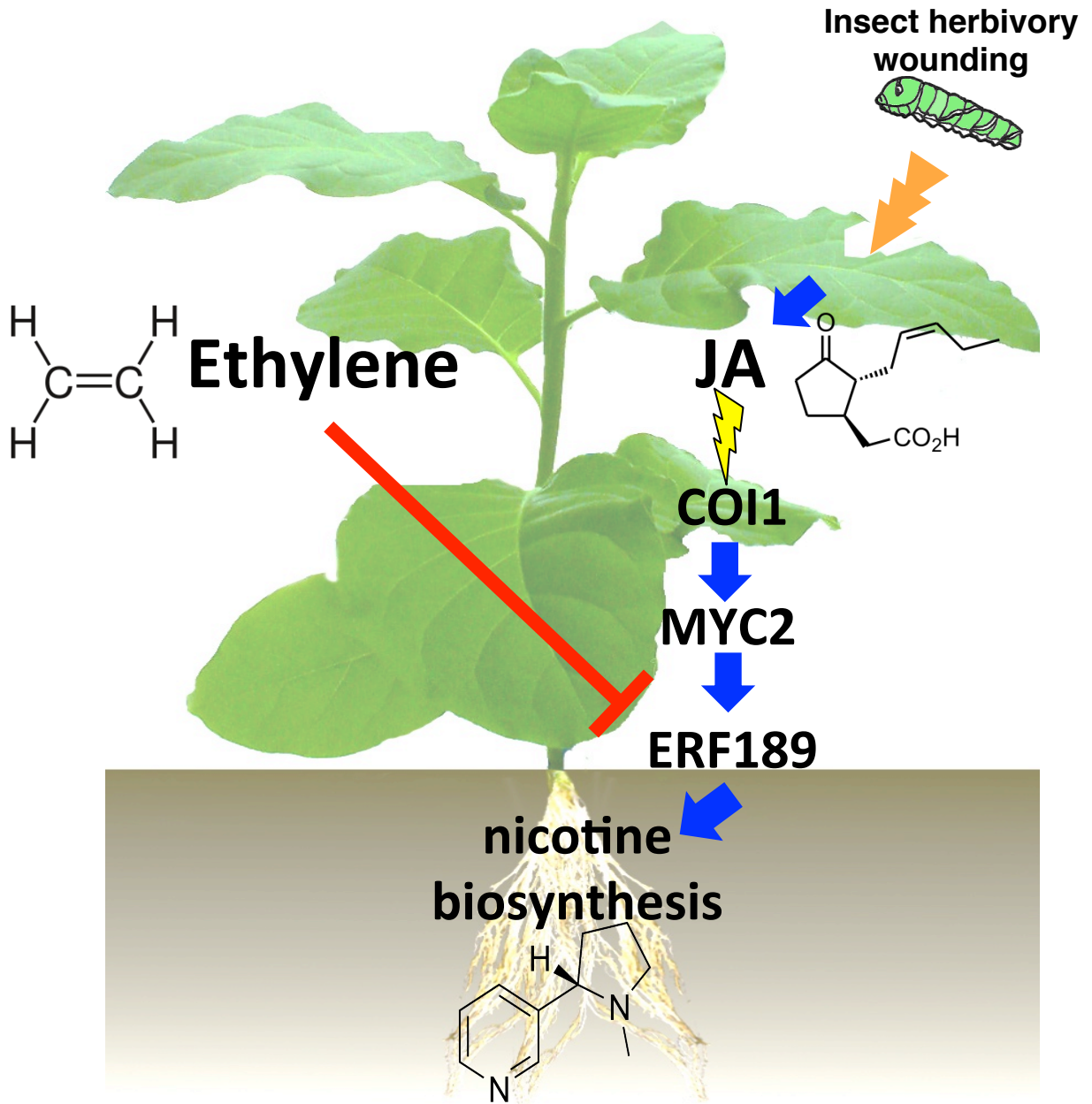
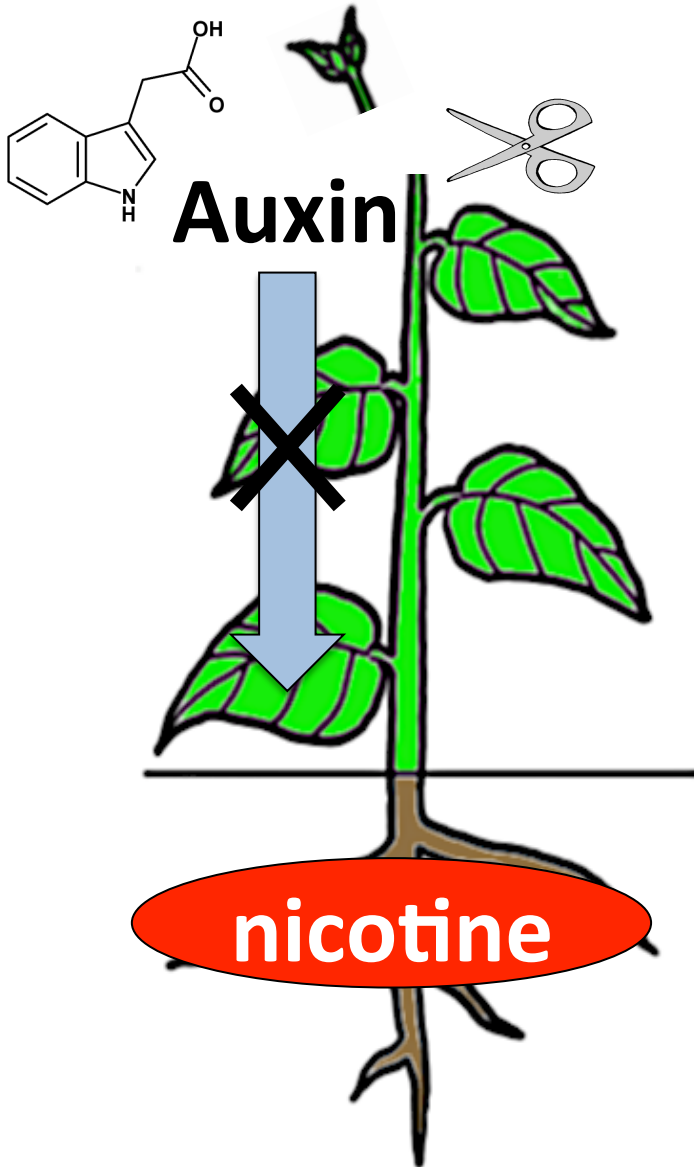


図3. ニコチン生合成へのジャスモン酸とエチレンの相互作用

葉への害虫による傷害によって、ジャスモン酸経路を介してニコチンの産生が促進される。一方で、エチレンはジャスモン酸によるERF189転写因子の強い発現誘導を抑制することで、下流因子であるニコチン生合成遺伝子群の発現を抑制する。しかし、エチレンがERF189以外のジャスモン酸シグナル経路の因子に影響を及ぼすのかどうかは未解明である。

頂芽切除



オーキシシン添加

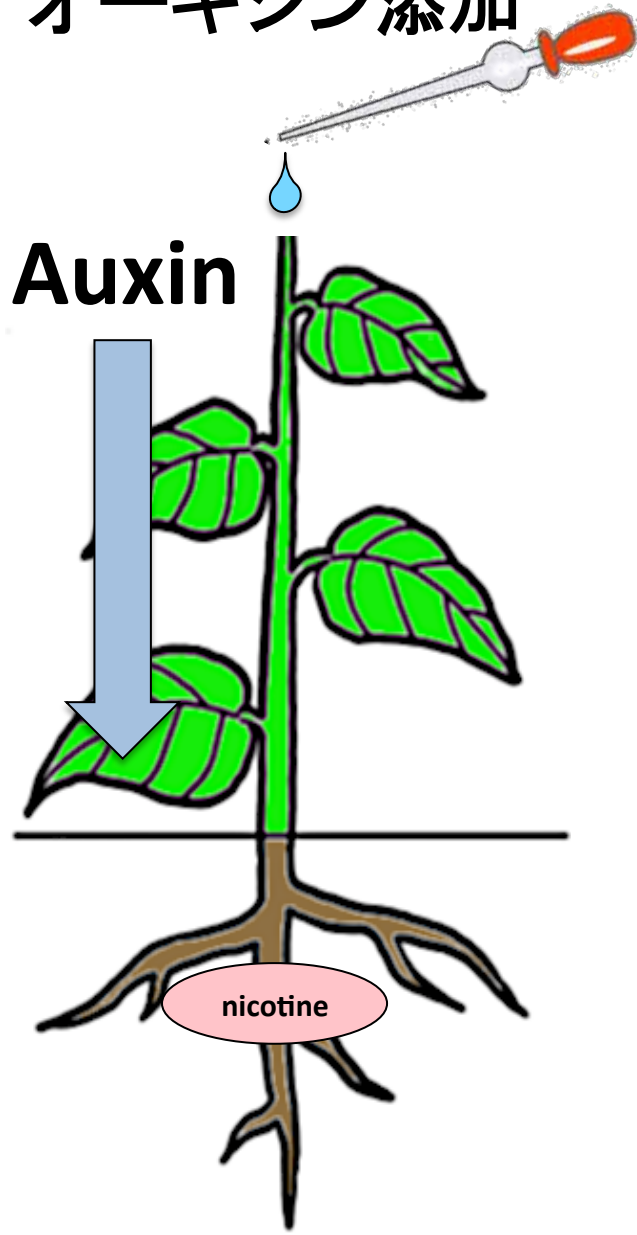


図4. ニコチン生合成へのオーキシシンの影響

タバコ植物で茎頂の切除を行うと根へのオーキシシン輸送が阻害され、ニコチンの蓄積量が増加することが経験的に知られている。また、茎頂を切除した植物体へ外生のオーキシシンを添加すると根へのオーキシシン輸送が増大し、ニコチンの蓄積量が減少することが実験的に示された(Shi et al., 2006)。

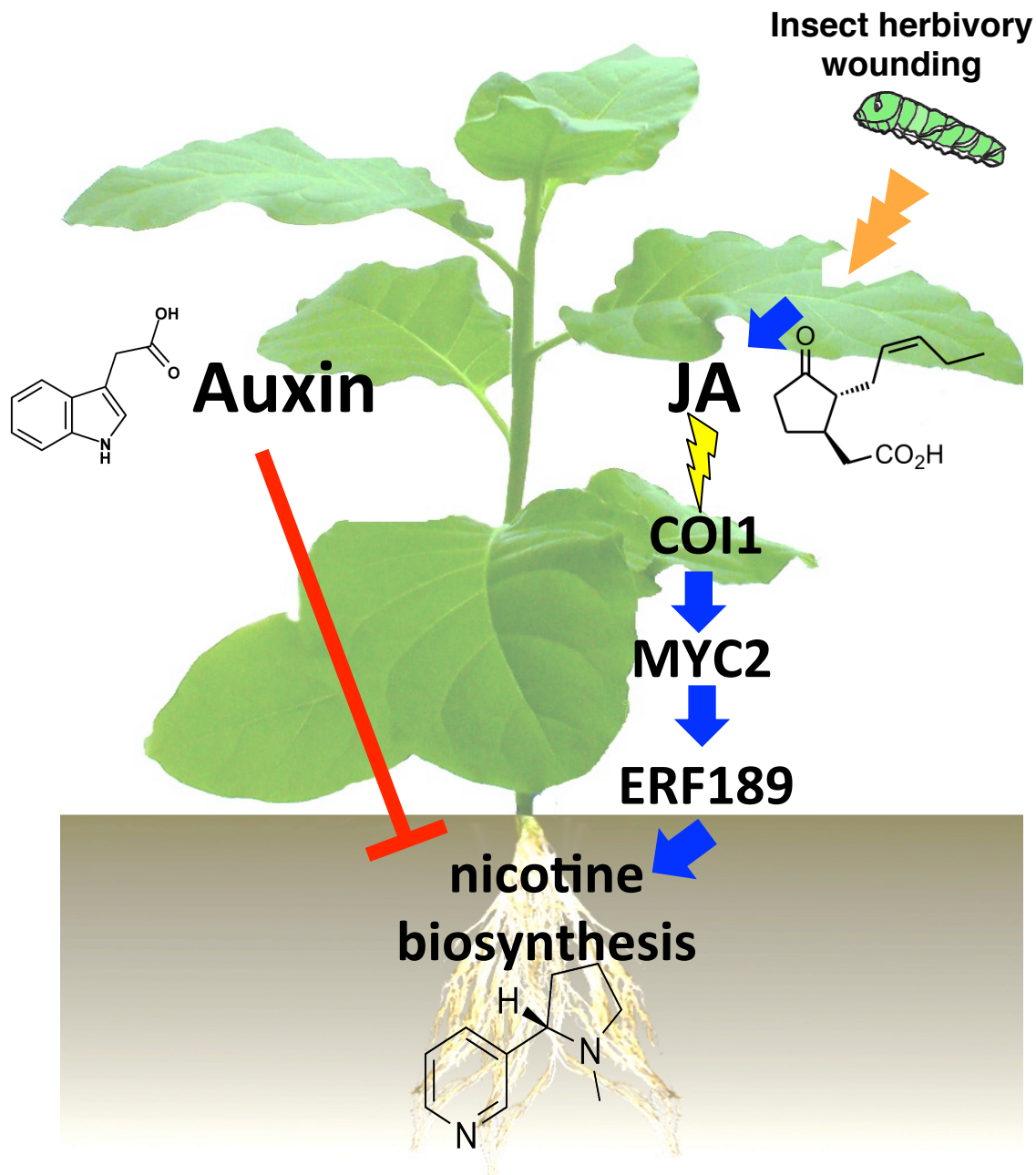


図5. ニコチン生合成へのジャスモン酸とオーキシンの相互作用

葉への害虫による傷害によって、ジャスモン酸シグナル経路を介してニコチン生合成が促進される。一方で、ジャスモン酸によるニコチン生合成にオーキシンは抑制的に機能する。しかし、詳細な分子機構は未解明である。

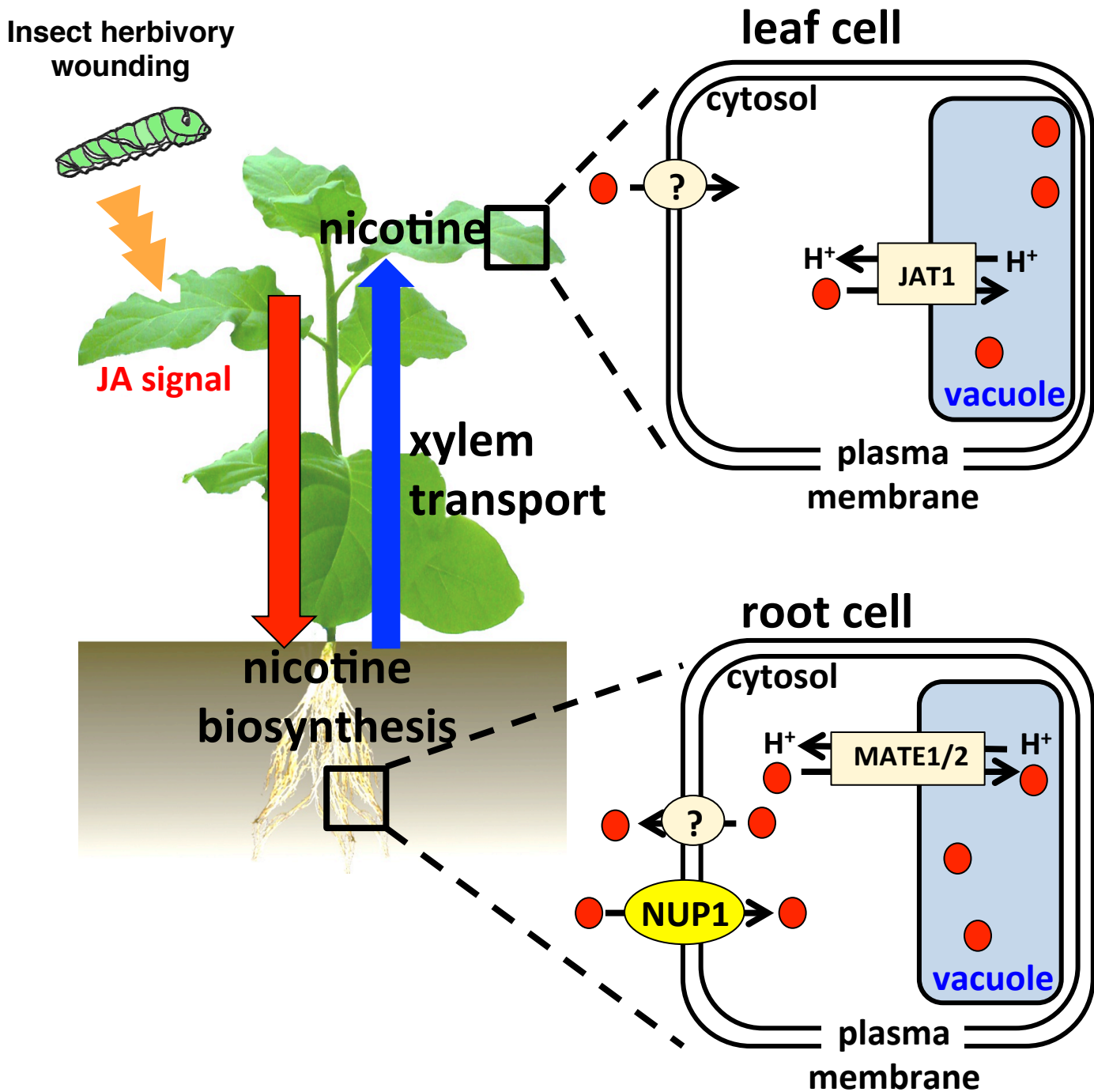


図6. ニコチン蓄積におけるニコチン輸送体のモデル

根で生合成されたニコチンは道管輸送を経て葉に蓄積される。MATE1/2とJAT1はそれぞれ根と葉の液胞膜に局在し、ニコチンを液胞内に輸送している。またNUP1は根の細胞膜上に局在し細胞質中にニコチンを輸送している。しかし根から葉へのニコチン輸送にはニコチンを根の生合成細胞から排出する輸送体、道管の取り込みを促進する輸送体および葉の細胞において細胞外からニコチンを取り込む輸送体が必要であるが未だ未解明である。

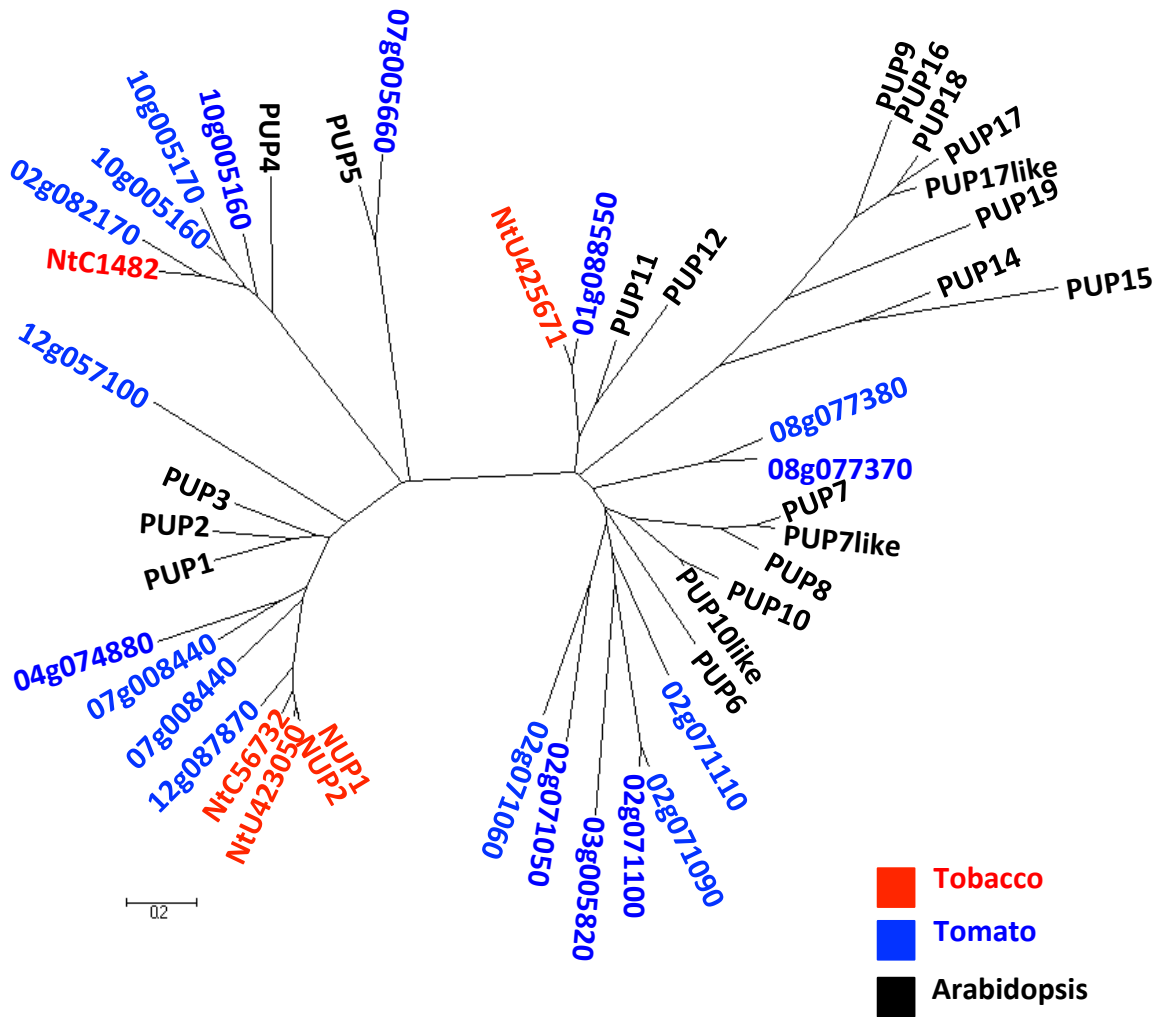


図7. タバコ、アラビドプシスおよびトマトのNUP/PUP型輸送体の系統樹

タバコおよびトマトのNUP/PUP型類縁輸送体はアラビドプシスPUPのアミノ酸配列をクエリーにして、Sol genomics network内で検索を行った。系統樹作成にはMultiple Sequence Alignment by CLUSTALW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) およびMEGA5.2.1 programを用いた。

第 1 章 ニコチン輸送体 NUP1 の輸送機能解析

材料と方法

植物材料

遺伝子クローニングには *N. tabacum* cv. Burley 21 およびシロイヌナズナ col-0、1 % 次亜塩素酸ナトリウムで 10 分滅菌後、滅菌水で 5 回以上洗浄したのち、種子を一晩吸水させ、0.8 % (W/V) agar、3 % (W/V) スクロースを含む B5 培地 (Gamborg et al., 1968) に播種した。

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、タバコ BY-2 培養細胞(以下 BY-2 細胞; Nagata et al., 1992) を用いた。BY-2 細胞は液体培養条件下では 27 °C 110 rpm 暗所での培養を行い、一週間ごとに 100 ml の改変 LS 培地(1x MS salt (Murashige and skoog, 1962)、0.5 g l⁻¹ MES、0.2 g l⁻¹ KH₂PO₄、0.1 g l⁻¹ myoinositol、1 mg l⁻¹ thiamine-HCl、0.2 mg l⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)、30 g l⁻¹ sucrose、pH 5.6-5.8; 以下 BY-2 培地と略す) に 1 ml 継代培養した。固体培地での培養条件は 0.8 % Agar を含む BY-2 培地にて 27 °C 暗所にて培養し、約 2 週間ごとに継代培養を行った。

形質転換

形質転換に用いた *Agrobacterium* へのプラスミド導入には Gene pulser (Biorad) を用いエレクトロポレーション法で形質転換を行った。50 µl *Agrobacterium* コンピテントセルに 1 µl プラスミド溶液を混和したものを、2 mm キュベットに移し 2.5 kV でエレクトロポレーションを行った。その後、キュベットに直接 1 ml YEB 培地(5 g l⁻¹ Meat extract、5 g l⁻¹ bactopectone、1 g l⁻¹ Yeast extract、0.5 g l⁻¹ MgSO₄ · 7H₂O、2.5 g l⁻¹ スクロース) を加え、全量を新しい 1.5 ml チューブに移し、28 °C、220 rpm、2 時間培養した後、13 g l⁻¹ agar を含む YEB 寒天培地にて 28 °C、48 時間培養した。

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 BY-2 細胞を新しい 100 ml BY-2 培地に 4 ml 継代し、4 日目の細胞を用いた。対象のプラスミドを *A. tumefaciens* strain EHA105 に形質転換した後、3 ml YEB 液体培地で液体培養し、培養 2 日後の菌液 30 µl を新たな 3 ml YEB 液体培地に継代し、継代後 24 時間の菌液を形質転換に用いた。

4 ml の BY-2 細胞に 500 μ l *Agrobacterium* 菌液を加え、2 日間暗所で共存培養した後、BY-2 液体培地で 5 回洗浄した後、セレクションマーカーに対応した抗生物質 (50 μ g ml⁻¹ kanamycin または 25 μ g ml⁻¹ hygromycin) および 250 μ g ml⁻¹ sefotaxim sodium を加えた BY-2 固形培地上で 28 °C 暗所で選抜培養を行った。約 3 週間後、生育してきた耐性 BY-2 細胞を新しい選抜培地で二次選抜を行った。その後選抜された独立したラインから total RNA を抽出し、qRT-PCR によって選抜した。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 BY-2 培地にて、継代培養を行った。

NUP1 基質取り込み活性の測定

NUP1 基質取り込み活性については NUP1 および NUP1 のオルソログであるシロイヌナズナ PUP1 を異所発現させた出芽酵母、および *NUP1* および *PUP1* 過剰発現 BY-2 細胞を用いた。

NUP1 および PUP1 発現酵母を得るために、Gateway technology (Invitrogen) を用いてタバコ NUP1 およびシロイヌナズナ PUP1 を pDONR/zeo にサブクローニングし、シーケンスを確認した。さらにこれらのタンパク質が酵母の細胞膜に局在することを確認するために C 末端に酵母 Green fluorescent protein (GFP) を融合した NUP1-GFP および PUP1-GFP を pDONR / zeo にサブクローニングし、シーケンスを確認した。この pDONR / Zeo / NUP1、pDONR / Zeo / PUP1、pDONR / Zeo / NUP1-GFP および pDONR / Zeo / PUP1-GFP を LR 反応によって pDR196GW (Barker et al., 2000) にクローニングし、シーケンスを確認し、酵母形質転換用 pDR196GW / NUP1、pDR196GW / PUP1、pDR196GW / NUP1-GFP、pDR196GW / PUP1-GFP を作成した。クローニングに使用したプライマーは supplement 表 3 に示す。

以降の実験は神戸薬科大 土反伸和准教授との共同研究として行い、上記の vector を出芽酵母に形質転換した。出芽酵母は strain AD12345678 (MAT α , PDR1-3, ura3, his1, Δ yor1::hisG, Δ snq2::hisG, Δ pdr5::hisG, Δ pdr10::hisG, Δ pdr11::hisG, Δ yef1::hisG, Δ pdr3::hisG; and Δ pdr15::hisG) (Decottignies et al., 1998) を用い lithium acetate 法を (Yazaki et al., 2002) 用いて形質転換し、uracil を除き (-uracil) 2 % agar を含む固形 SD 培地 (6.7g l⁻¹ yeast nitrogen base w/o amino acid, 20 g l⁻¹ glucose, 2 mg l⁻¹ adenine, 30 mg l⁻¹ L-isoleucine, 150 mg l⁻¹ L-valine, 20 mg l⁻¹

L-arginine-HCl、30 mg l⁻¹ L-lysine-HCl、20 mg l⁻¹ L-methionine、50 mg l⁻¹ L-phenylalanine、200 mg l⁻¹ L-threonine、30 mg l⁻¹ L-tyrosine、20 mg l⁻¹ L-tryptophan、20 mg l⁻¹ L-histidine-HCl、100 mg l⁻¹ L-leucine) にプレーティングし 30 °C で生育させた。これらのプラスミドを含んだ酵母を液体 SD 培地 (-uracil) に移し 200 rpm、30 °C で振盪培養し、OD 600 nm が 0.7 に達した時に一度酵母を回収し液体 SD 培地 (-uracil) に再懸濁した。最終濃度 0.25 μM のアルカロイドのニコチン、アナタビン、ヒヨシアミンおよびスコポラミン、フラボノイドのルチン、ビタミン B6 のピリジン、ピリドキサミンおよびピリドキサル、PUP1 の輸送基質として明らかになっているアデニンを酵母懸濁液に添加し、4 時間取り込みを行った。酵母懸濁液の回収は遠心分離で酵母と培養液を分け、氷冷下イオン交換水で 2 回洗浄し酵母の外側に付着している余分なサンプルを洗い流した。この酵母細胞からアルカロイドおよびルチンを抽出し、アルカロイドは gas-liquid chromatography、ルチンおよびビタミン B6 は HPLC で解析した。

BY-2 細胞を用いて、基質取り込み実験を行うために *NUPI* 過剰発現 BY-2 細胞および *PUP1* 過剰発現 BY-2 細胞を作成した。タバコ *NUPI* 過剰発現形質転換体を得るために、CaMV35S プロモーター制御下で *NUPI* タンパク質を過剰発現する vector を以下の手順で作成した。*NUPI* の ORF 配列に *Bam*HI および *Sac*I 制限酵素サイトを付加した cDNA 断片を増幅した後 pGEM-T に TA クローニングした。上記の制限酵素サイトで切り出し、pBI121 の GUS のサイトを上記の制限酵素サイトで切り出した vector に置き換え pBI121 / *NUPI*ox binary vector を作成した。さらにシロイヌナズナ *PUP1* 過剰発現 BY-2 細胞を作成した。シロイヌナズナ *PUP1* 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 *PUP1* タンパク質を過剰発現する vector を以下の手順で作成した。*PUP1* の ORF 配列に *Hind*III および *Sac*I 制限酵素サイトを付加した cDNA 断片を増幅した後 pGEM-T に TA クローニングし、シーケンスを行った。*PUP1* の ORF 配列を上記の制限酵素サイトで切り出し、さらに pBI121 の GUS のサイトを上記の制限酵素サイトで切り出した vector に置き換え pBI121 / *PUP1*ox binary vector を作成し、BY-2 細胞に前述の方法で形質転換を行った。クローニングに使用したプライマーは supplement 表 4 に示す。

液体培養 3 日目の *NUPI* および *PUP1* 過剰発現 BY-2 細胞 3 ml を新たな 30 ml BY-2 培地に添加した。さらに最終濃度 0.05 μM のアルカロイドのニコチン、アナタビン、ヒヨシアミン、スコポラミン、パパベリン、ベルベリン、フラボノ

イドのルチン、ビタミン B6 のピリジン、ピリドキサミンおよびピリドキサーールおよび PUP1 の輸送基質として明らかになっているアデニン添加し、4 時間取り込みを行った。BY-2 培養細胞の回収はブフナー漏斗で細胞と培養液を分け、脱イオン交換水で 5 回洗浄し細胞の外側に付着している余分な基質を洗い流した。前述と同様に BY-2 細胞からアルカロイド、ルチンおよびビタミン B6 を抽出し、ニコチン、アナタビン、ヒヨシアミンおよびスコポラミンは gas-liquid chromatography、パパベリン、ベルベリン、ルチンおよびビタミン B6 は HPLC で解析した。

qRT-PCR による遺伝子発現解析

BY-2 細胞からの totalRNA の抽出には Qiagen の RNA 抽出キットを用いた。抽出した 1 μ g total RNA を用いての cDNA を合成には Super script II (Invitrogen) 逆転写酵素を用いた。逆転写された cDNA 反応液は逆転写後 500 μ l 蒸留水を加え qRT-PCR 解析に用いた。qRT-PCR は SYBR Green (Takara)を用い、Light cycler 96 system (Roshe)で 95°C 600 秒 hold、94 °C 10 秒、55 °C 10 秒、72 °C 15 秒を 55 cycle、high resolution melting 60 °C から 95 °C まで 0.05 °C / 秒に統一して行った。使用したプライマーセットは supplement 表 5 に示す。

アルカロイドの抽出

基質取り込み実験における天然型(2'S)-ニコチン、アナタビン、ヒヨシアミンおよびスコポラミンの抽出は以下の手順で行った。回収および凍結粉碎した 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 25 mg に 0.1 N H₂SO₄を加え 60 分間超音波処理を行った。その後 15,000 g 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 % NH₄OH 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 Extrelut-1 column (Merck) に添加した後、6 ml の chloroform で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) を含むエタノールで溶出しガスクロマトグラフィー用のサンプルとした。

ニコチン、アナタビン、ヒヨシアミンおよびスコポラミンの取り込みを行った酵母においては 5 倍量の 0.1 N H₂SO₄ (V/W)およびガラスビーズを用いて vortex により細胞を破碎し、遠心分離によって上澄みを回収し Extrelut-1 column を用いた上記の抽出法と同様に行った。

パパベリンおよびベルベリンの抽出は以下の方法で行った。回収したタバコ BY-2 培養細胞に新鮮重の 5 倍量の 20 mM リン酸バッファー (pH. 2.5) (V/W) を添加し超音波処理 30 min、さらにインキュベート 65 °C、30 min を行った後、遠心分離にて上澄みを回収し分析サンプルとした。

ルチンの抽出方法

回収した酵母およびタバコ BY-2 細胞に新鮮重の 10 倍量の 50 % EtOH (V/W) を添加し、ガラスビーズを用いて vortex により細胞を破碎し、遠心分離によって上澄みを回収し分析サンプルとした。

ビタミン B6 の抽出方法

回収した酵母の新鮮重の 2 倍量 (V/W) の 25 mM 酢酸バッファー (pH 4.0) を加え、ガラスビーズクラッシャーで破碎した後、常温、10 分、15,000 rpm で遠心分離により上澄みを回収し、分析サンプルとした。

回収した BY-2 細胞の新鮮重の 5 倍量 (V/W) の 25 mM 酢酸バッファー (pH 4.0) を加え、65 °C、30 分間インキュベートした後、常温、10 分、15,000 rpm 遠心分離により上澄みを回収し、分析サンプルとした。

アデニンの抽出方法

回収した BY-2 細胞の新鮮重の 3 倍量 (V/W) の 20 mM 酢酸バッファー (pH 7.0) を加え、超音波処理 30 min および 65 °C、30 min インキュベートした後、常温、10 分、15,000 rpm 遠心分離により上澄みを回収し、分析サンプルとした。

Gus-liquid chromatography によるアルカロイドの測定

Gus-liquid chromatography 解析には GC-2010 (Shimadzu) を用いた。ニコチン、アナタピン、ヒヨシアミン、スコポラミンの測定には Rtx-5 Amine capillary column (Restek; I.D. 0.25 mm, 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 hold、150 °C まで 25 °C min^{-1} 、170 °C まで 1 °C min^{-1} 、300 °C まで 30 °C min^{-1} 、300 °C、10 min hold、injector 300 °C、FID detector 300 °C。

ニコチン光学異性体を分離、測定するために、GC-2010 に β -DEXTM120 fused silica column (SUPELCO, PA, US) を用いた。ガスクロマトグラフィーの条件は

以下の通りである。120 °C 60 min hold、injector 230 °C、FID detector 250 °C。

HPLCによるパパベリン、ベルベリン、ルチン、ビタミン B6 およびアデニンの測定には HPLC は LC-10 システム (Shimadzu) を用いた。ルチンの分析のみ 土反伸和准教授に依頼し MD-2018 システム(Jasco)を用いた。分析条件は以下の通りでおこなった。

HPLC によるパパベリン、ベルベリン、ルチン、ビタミン B6 およびアデニンの測定

HPLCによるパパベリン、ベルベリン、ルチン、ビタミン B6 およびアデニンの測定には HPLC は LC-10 システム (Shimadzu) を用いた。ルチンの分析のみ 土反伸和講師に依頼し MD-2018 システム(Jasco)を用いた。分析条件は以下の通りでおこなった。

パパベリンおよびベルベリンの測定

Column ; COSMOSIL Cholester (2.0 × 100 mm, 2.5 mm) (Nacalai Tesque)

Column Temp. ; 40 °C

Flow rate ; 0.5 ml / min

Mobile phase ; 20 mM phosphate buffer (pH 2.5) : MeOH = 4 : 6 (V / V)

Gradient time program ; isocratic analysis

Injection volume ; 5.0 ml

Detection ; UV 254 nm

ルチンの測定

Column ; COSMOSIL 5C18 MS-II (4.6 mm x 150 mm, 5 μm) (Nacalai Tesque)

Column Temp. ; 40 °C

Flow rate ; 1.0 ml / min

Mobile phase ;

A. water : formic acid = 9 : 1 (V/V)

B water : formic acid : MeOH : acetonitrile = 40 : 10 : 22.5 : 22.5 (V/V/V/V)

Gradient time program ; liner gradient

0 min ; A : B = 88 : 12 (V/V)

12 min ; A : B = 0 : 100 (V/V)

Injection volume ; 5.0 ml

Detection ; UV 358 nm

ビタミン B6 の測定

Column ; COSMOSIL Cholester (2.0 × 100 mm, 2.5 mm) (Nacalai Tesque)

Column Temp. ; 40 °C

Flow rate ; 1.0 ml / min

Mobile phase ; 25 mM phosphate buffer (pH 4.0)

Gradient time program ; isocratic analysis

Injection volume ; 5.0 ml

Detection ; Fluorescent, Emission 328 nm, Excitation 393 nm

アデニンの測定

Column ; COSMOSIL Cholester (2.0 × 100 mm, 2.5 mm) (Nacalai Tesque)

Column Temp. ; 40 °C

Flow rate ; 1.0 ml / min

Mobile phase ; 25 mM phosphate buffer (pH 7.0)

Gradient time program ; isocratic analysis

Injection volume ; 5.0 ml

Detection ; UV 254 nm

天然型(2'S)-ニコチンとピリドキサミンの競合阻害実験

NUPI および *PUPI* 過剰発現 BY-2 細胞における競合阻害実験を行った。液体培養 3 日目の *NUPI* および *PUPI* 過剰発現 BY-2 細胞 3 ml を新たな 30 ml BY-2 培地に添加した。天然型(2'S)-ニコチン取り込みにおけるピリドキサミンによる競合阻害については最終濃度 0.05 μM 天然型(2'S)-ニコチンおよび 0、0.05 および 0.5 μM ピリドキサミンの 3 処理区を設けた。さらにピリドキサミン取り込みにおける天然型(2'S)-ニコチンによる競合阻害については最終濃度 0.05 μM ピリドキサミンおよび 0、0.05 および 0.5 μM 天然型(2'S)-ニコチンの 3 処理区を行った。回収したサンプルからの天然型(2'S)-ニコチンおよびピリドキサミンの抽出、測定条件は前述の通りである。

結果

タバコ NUP1 およびシロイヌナズナ PUP1 の輸送基質特異性解析

NUP1 の輸送基質を解析するために、NUP1 を異所的に発現させた出芽酵母を用いて取り込み実験を行った。NUP1 は植物体内では細胞膜局在型で 10 の膜貫通領域を持ち、細胞内にニコチンを輸送する (Hildreth et al., 2011)。再度、局在解析を行い細胞膜に局在することを確認した(図 20)。しかし、NUP1 を酵母で発現させた際に必ずしも細胞膜で発現しているとは限らないので GFP を NUP1 の C 末端に付加した NUP1-GFP の局在解析を行った。NUP1-GFP の一部は酵母の内膜で発現しているものの、細胞膜での局在が観察されたので、細胞膜を介した輸送基質特異性解析が行えると判断した(図 8. A)。輸送基質の候補としてタバコが生産するピリジンアルカロイドである天然型(2'S)-ニコチンおよびアナタピン、さらにタバコが生産しないトロパンアルカロイドであるヒヨシアミンおよびスコポラミンの取込みを解析したところ、NUP1 を発現させた酵母で有意に取込み量が増加していた (図 8. C)。さらに非輸送基質であると期待されるフラボノイドのルチンの取込みを解析したが、NUP1 を発現させた酵母で取込みが増加することはなかったため、NUP1 の輸送基質はフラボノイドではなくアルカロイドであることが明らかになった。

さらにニコチンの光学異性体の取込み解析するために、天然型(2'S)-ニコチンおよび非天然型(2'R)-ニコチンを等量混合した基質の取込みを解析した(図 9)。天然型(2'S)-ニコチンおよび非天然型(2'R)-ニコチンを等量混合した基質はクロマトグラムでもほぼ 50%ずつのピークを示したが(図 9. A)、NUP1 を発現させた酵母では天然型(2'S)-ニコチンを有意に多く取り込むことが明らかになった(図 9. B)。しかしベクターコントロールでは非天然型(2'R)-ニコチンの取込みが LC の検出限界以下であったため、天然型(2'S)-ニコチンおよび非天然型(2'R)-ニコチンの取込みの比率をベクターコントロールと比較することは不可能であった。また、シロイヌナズナ PUP がビタミン B6 も輸送基質することが明らかになっているので(Szydlowski et al., 2013)、タバコ NUP1 がビタミン B6 に対しても輸送活性を持つかどうかを解析した(図 10)。ビタミン B6 は官能基の違いにより 3 種類存在しアルコール型ピリドキシン、アルデヒド型ピリドキサール、そしてアミン型ピリドキサミンに分けられる(図 10. A)。NUP1 を発現させた酵母で全てのビタミン B6 の取り込みが有意に増加した(図 10. B)。タバコ NUP1 もシロイヌナ

ズナ PUP と同様にビタミン B6 を輸送することが明らかになった。

同様の基質取込み解析 *NUPI* 過剰発現 BY-2 細胞を用いて行った。十分に *NUPI* が過剰発現している形質転換 BY-2 細胞を得るために *NUPI* の発現解析を行ったところ、有意に *NUPI* が過剰発現している独立な 2 系統を確立した(図 11. A)。輸送基質の候補としてタバコが生産するピリジンアルカロイドである天然型(2'S)-ニコチンおよびアナタビン、さらにタバコが生産しないトロパンアルカロイドであるヒヨシアミンおよびスコポラミン、さらにベンジルイソキノリンアルカロイドのベルベリンおよびパパベリン、ビタミン B6 であるピリドキシリン、ピリドキサールおよびピリドキサミンの取込みを解析したところ、*NUPI* 過剰発現 BY-2 細胞においてパパベリンを除くアルカロイドの取り込みが有意に増加した(図 11. C)。またビタミン B6 での取り込みは *NUPI* 過剰発現 BY-2 細胞において全てのビタミン B6 で取り込みが有意に増加した(図 12)。非輸送機質と推定されるフラボノイドのルチンの取込みを解析したが、*NUPI* 過剰発現 BY-2 細胞で取込みが増加することはなかった(図 11, C)。したがって、*NUPI* の輸送基質はアルカロイドおよびビタミン B6 であることが明らかになり、酵母での解析の結果と一致した。さらにニコチンの光学異性体の取込み解析するために、天然型(2'S)-ニコチンおよび非天然型(2'R)-ニコチンを等量混合した基質の取込みを解析した。天然型(2'S)-ニコチンおよび非天然型(2'R)-ニコチンを等量混合した基質のクロマトグラムはほぼ 50%ずつのピークを示した(図 13. A)。しかし *NUPI* の発現量には依存せず BY-2 細胞では天然型(2'S)-ニコチンを優先的に取り込んだため (図 13. B)、*NUPI* はニコチンの光学異性体の取込みには関与していないことが明らかになった。

さらに、タバコ *NUPI* とシロイヌナズナ *PUP1* の輸送機質の特異性を BY-2 細胞で比較するために、シロイヌナズナ *PUP1* 過剰発現 BY-2 細胞を作成したところ有意に *PUP1* が高発現している独立した 2 系統を得た(図 14. A)。BY-2 細胞での輸送解析の結果からタバコ *NUPI* のみで輸送する基質の候補として天然型(2'S)-ニコチン(図 11. C)、シロイヌナズナ *PUP1* のみで輸送する基質としてアデニン(Gillissen et al., 2000)、さらにタバコ *NUPI* およびシロイヌナズナ *PUP1* 共に輸送するビタミン B6 の中でも最も高い取り込みを示したピリドキサミン(図 10 および 12)を輸送基質候補として比較した。タバコ *NUPI* 過剰発現 BY-2 細胞では天然型(2'S)-ニコチンおよびビタミン B6 であるピリドキサミンを有意に取り込み(図 14. C および D)、シロイヌナズナ *PUP1* 過剰発現 BY-2 細胞ではビタミ

ン B6 であるピリドキサミンおよびアデニンを有意に取り込んだ。(図 14. D および E)。この結果よりビタミン B6 はタバコ NUP1 およびシロイヌナズナ PUP1 の両方の輸送基質となり、天然型(2'S)-ニコチンはタバコ NUP1、アデニンはシロイヌナズナ PUP1 特異的な輸送基質であることが明らかになった。

さらに、タバコ NUP1 およびシロイヌナズナ PUP1 の天然型(2'S)-ニコチンとビタミン B6 に対して、どちらの輸送基質に高いアフィニティーを示すのかを解析するために競合阻害解析を行った。一定濃度の天然型(2'S)-ニコチンに対してピリドキサミンの濃度を変えて天然型(2'S)-ニコチンの取り込み量を解析し、また天然型(2'S)-ニコチンとピリドキサミンを入れ替えた実験区を設けた。50 μ M 天然型(2'S)-ニコチンに対し、ピリドキサミンの濃度を変化させた際の天然型(2'S)-ニコチンの取り込みは、ピリドキサミンの濃度によらず一定であった(図 15. A)。一方、50 μ M ピリドキサミンに対し天然型(2'S)-ニコチンの濃度を変化させた際のピリドキサミンの取り込みは、NUP1 過剰発現 BY-2 細胞ではニコチンの濃度依存的に減少した(図 15. B)。また PUP1 過剰発現 BY-2 細胞では 50 μ M 天然型(2'S)-ニコチンを添加した時にピリドキサミンの取り込みが阻害されていた。しかし、500 μ M 天然型(2'S)-ニコチンを添加した時では 50 μ M 天然型(2'S)-ニコチン添加した時と変わらなかった。つまり、タバコ NUP1 はビタミン B6 のピリドキサミンよりも天然型(2'S)-ニコチンに高いアフィニティーを持つことが明らかになった。

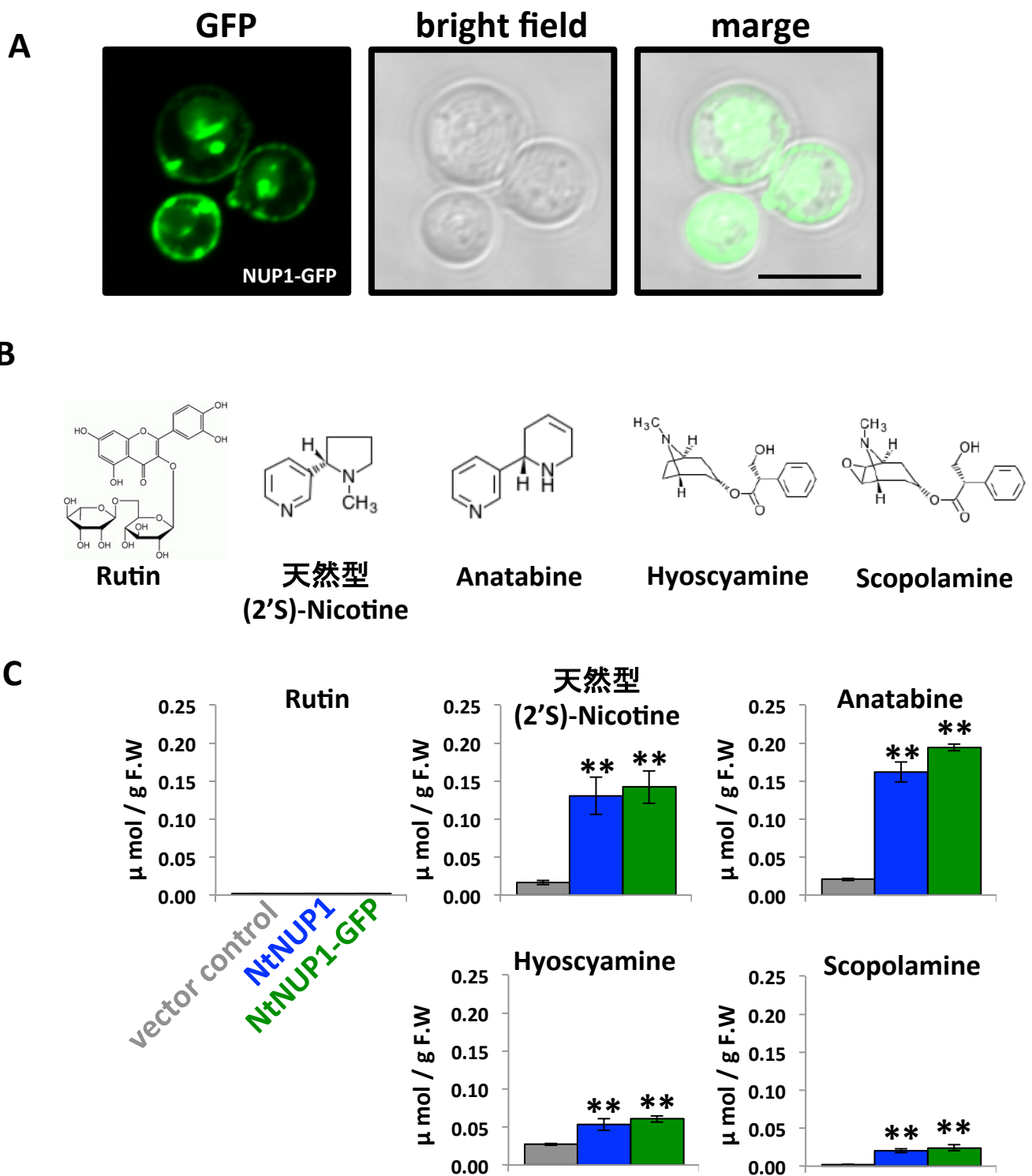
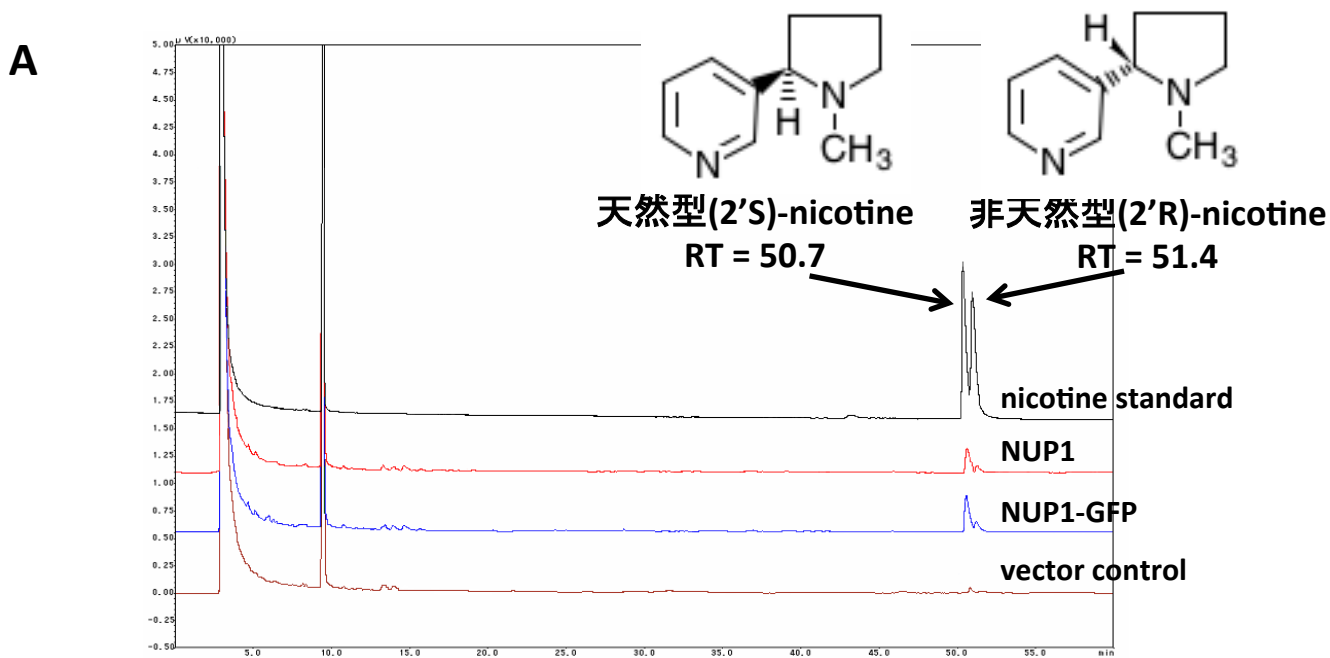


図8. NUP1およびNUP1-GFPを発現させた出芽酵母でのアルカロイドおよびフラボノイドの取り込み
 A. NUP1-GFPを発現させた出芽酵母での細胞内局在 スケールバーは100 μm とする。
 B. 取り込みに用いたフラボノイドのルチン、ピリジナルカロイドの天然型(2'S)-ニコチンおよびアナタビン、トロパンアルカロイドのヒヨシアミンおよびスコポラミンの構造式
 C. 酵母細胞内におけるアルカロイドおよびフラボノイドの蓄積量
 B.で示した化合物を用いて最終濃度250 μM を添加した。添加4時間後のサンプルをGLCまたはHPLCで解析した。各カラムは平均値 \pm 標準誤差を示し、統計処理はStudent's t testをvector control に対して行い、* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を示した。(N = 3)



Retention time (min)

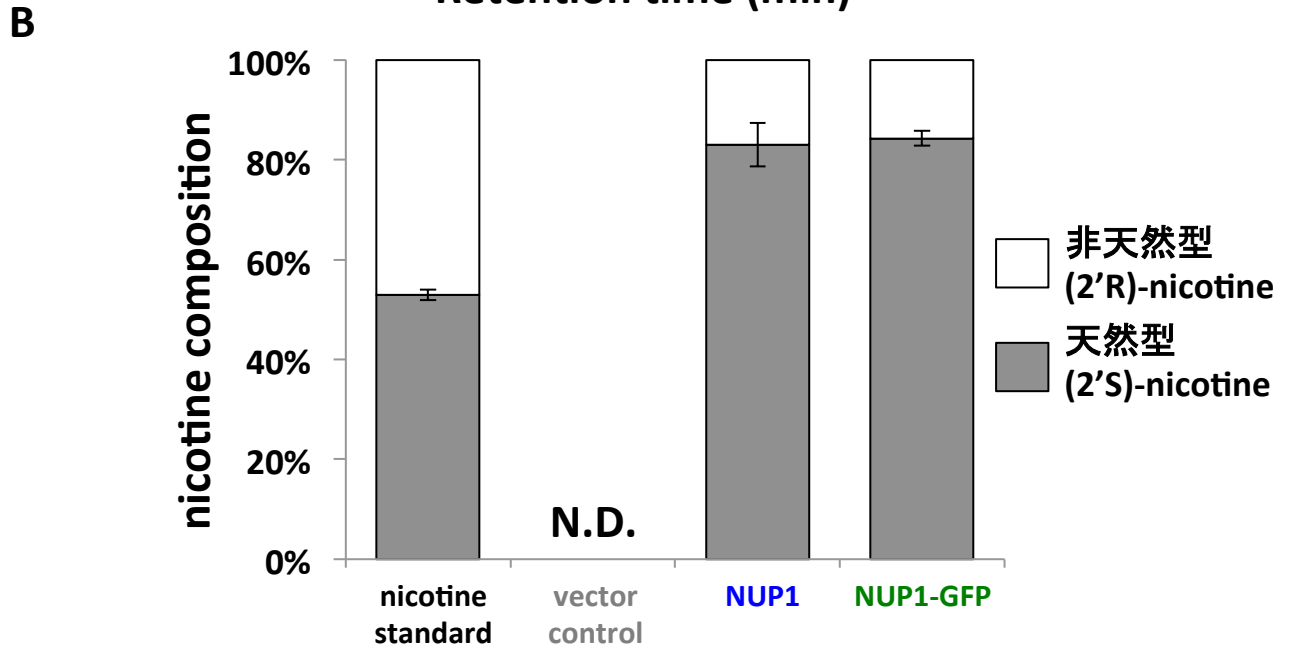


図9. NUP1およびNUP1-GFPを発現させた出芽酵母でのニコチン光学異性体の取り込み解析
 nicotine standardは天然型(2'S)-nicotineおよび非天然型(2'R)-nicotineそれぞれ125 μ M 混合した。
 添加4時間後のサンプルからニコチンを抽出し、キラルカラムを装着したGLCで解析した。

A. ニコチン光学異性体のクロマトグラム

B. 酵母細胞内に取り込んだニコチン光学異性体の存在比率

各カラムは取り込んだニコチンの総量を100%とし、それぞれの平均値 \pm 標準誤差を示した。

vector controlは取り込み量が低く、非天然型(2'R)-nicotineが検出限界のためN.D.とした。(N = 3)

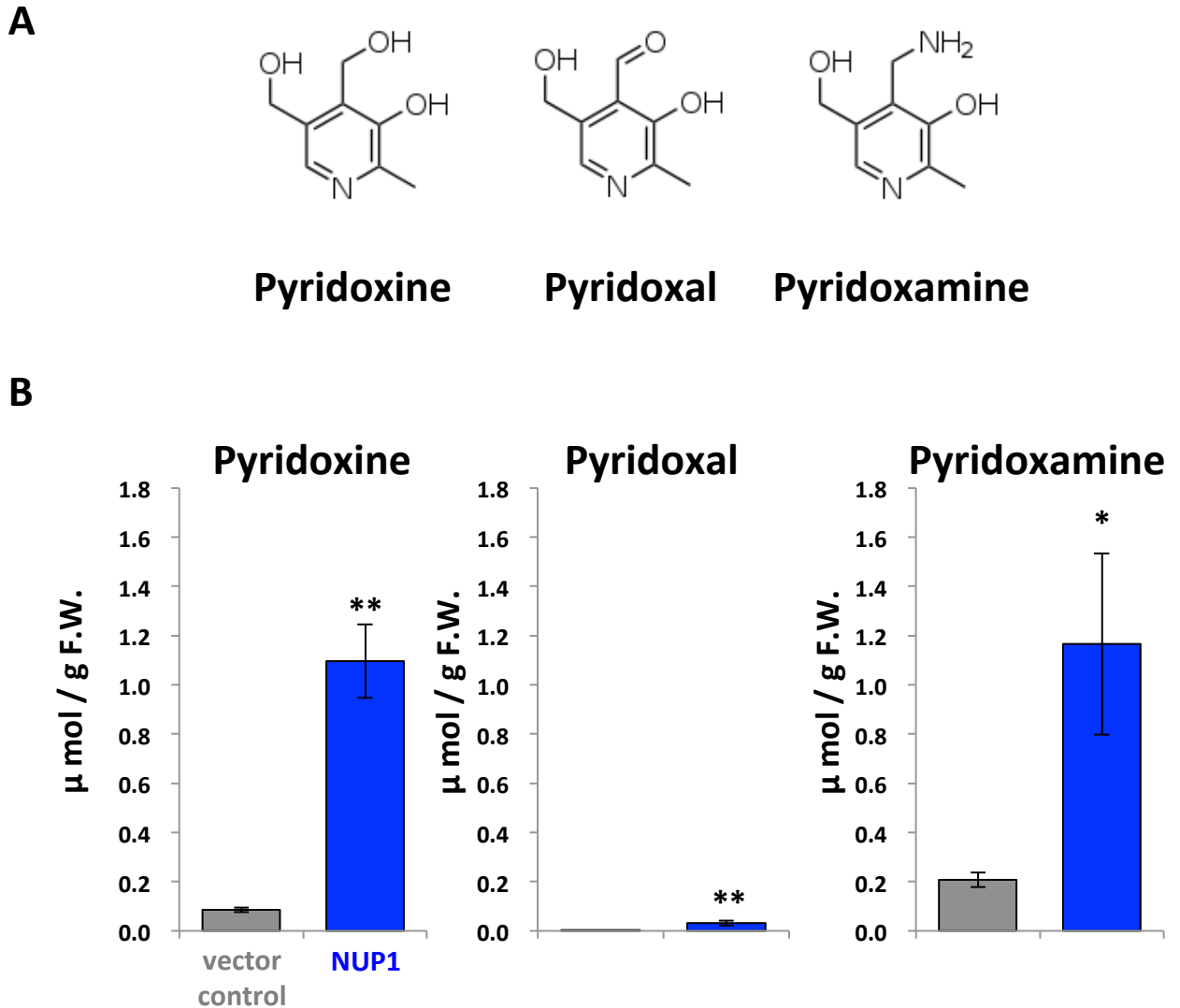


図10. NUP1を発現させた出芽酵母でのビタミンB6取り込み

A. ビタミンB6の構造式

B. 酵母細胞内のビタミンB6の蓄積量

添加したビタミンB6は最終濃度250 μM とし、添加4時間後のサンプルから抽出しHPLCで解析した。各カラムは平均値±標準誤差を示し、統計処理はStudent's t.testをvector controlに対して行い、*P<0.05、**p<0.01を示した。(N = 3)

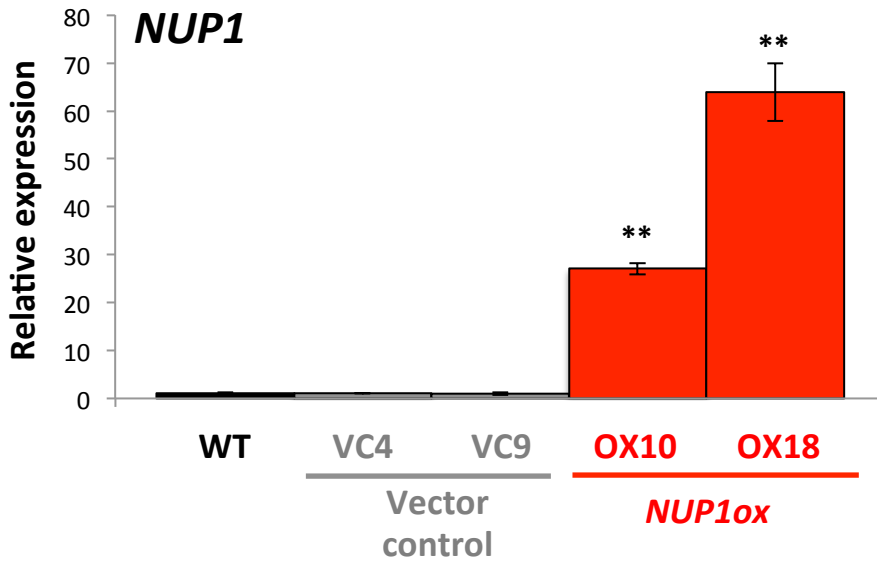
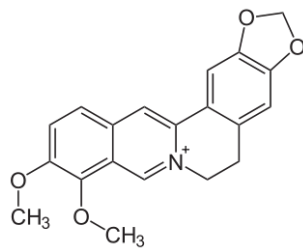
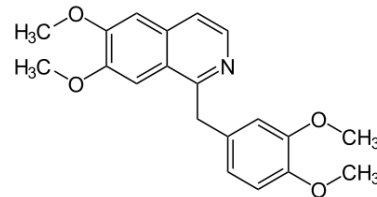
A**B****Berberine****Papaverine**

図11. *NUP1*を過剰発現BY-2細胞でのアルカロイドおよびフラボノイドの取り込み

A. *NUP1*の遺伝子発現

ジャスモン酸なしで2,4-Dを添加している状態での*NUP1*の遺伝子発現をqRT-PCRで解析した。形質転換系統はそれぞれのベクターに対して独立の2系統を用いた。各カラムは平均値±標準誤差を示した。統計処理はStudent's t.testをWTに対して行い、* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を示した。(N = 3)

B. イソキノリンアルカロイドのベルベリンおよびパパベリンの構造式

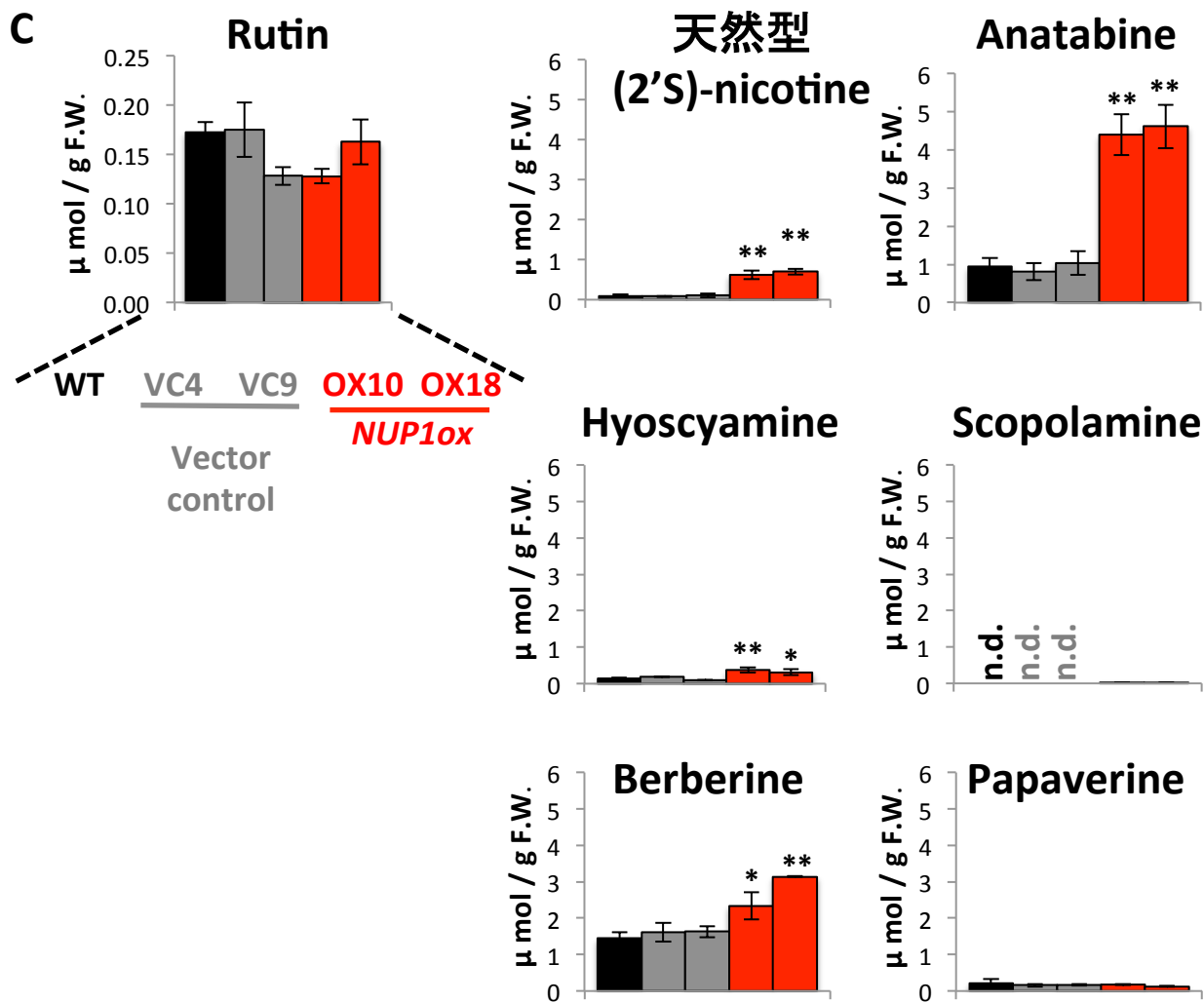


図11. *NUP1*を過剰発現BY-2細胞でのアルカロイドおよびフラボノイドの取り込み(続き)

C. BY-2培養細胞内におけるアルカロイドおよびフラボノイドの蓄積量

添加した基質はピリジンアルカロイドの天然型(2'S)-ニコチンおよびアナタビン、トロパンアルカロイドのヒヨシアミンおよびスコポラミン(構造式は図8. B参照)、ベンズルイソキノリンアルカロイドのベルベリンおよびパパベリン(図11. B参照)、さらにフラボノイドのルチンを用いて最終濃度50 μ Mを添加した。それぞれ 添加4時間後の細胞内の蓄積量をGLC(ニコチン、アナタビン、ヒヨシアミンおよびスコポラミン)またはHPLC(ルチン、ベルベリンおよびパパベリン)で解析した。各カラムは平均値 \pm 標準誤差を示し、スコポラミンの取り込みにおけるWTおよびvector controlは検出限界以下のためN.D.とした。形質転換システムはそれぞれのベクターに対して独立の2システムを用いた。統計処理はStudent's t.testをWTに対して行い、* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を示した。(N = 3)

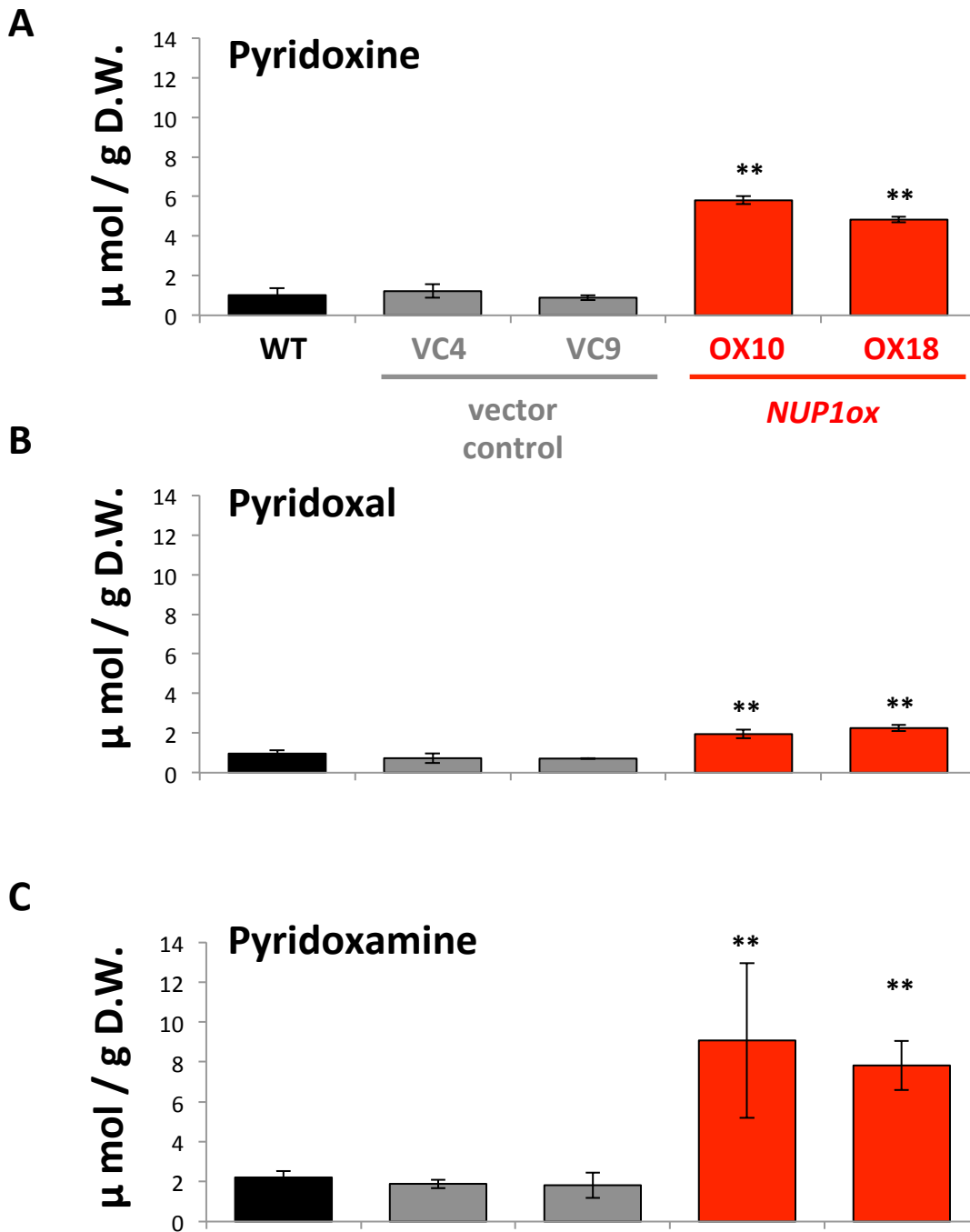


図12. *NUP1*過剰発現BY-2細胞でのでのビタミンB6取り込み

添加したビタミンB6(構造式は図10.A参照)は最終濃度50 μMとし、添加4時間後のサンプルから抽出しHPLCで解析した。形質転換システムはそれぞれのベクターに対して独立の2システムを用いた。各カラムは平均値±標準誤差を示し、統計処理はStudent's t.testをWTに対して行い、* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を示した。(N = 3)

- A. pyridoxine
- B. pyridoxal
- C. pyridoxamine

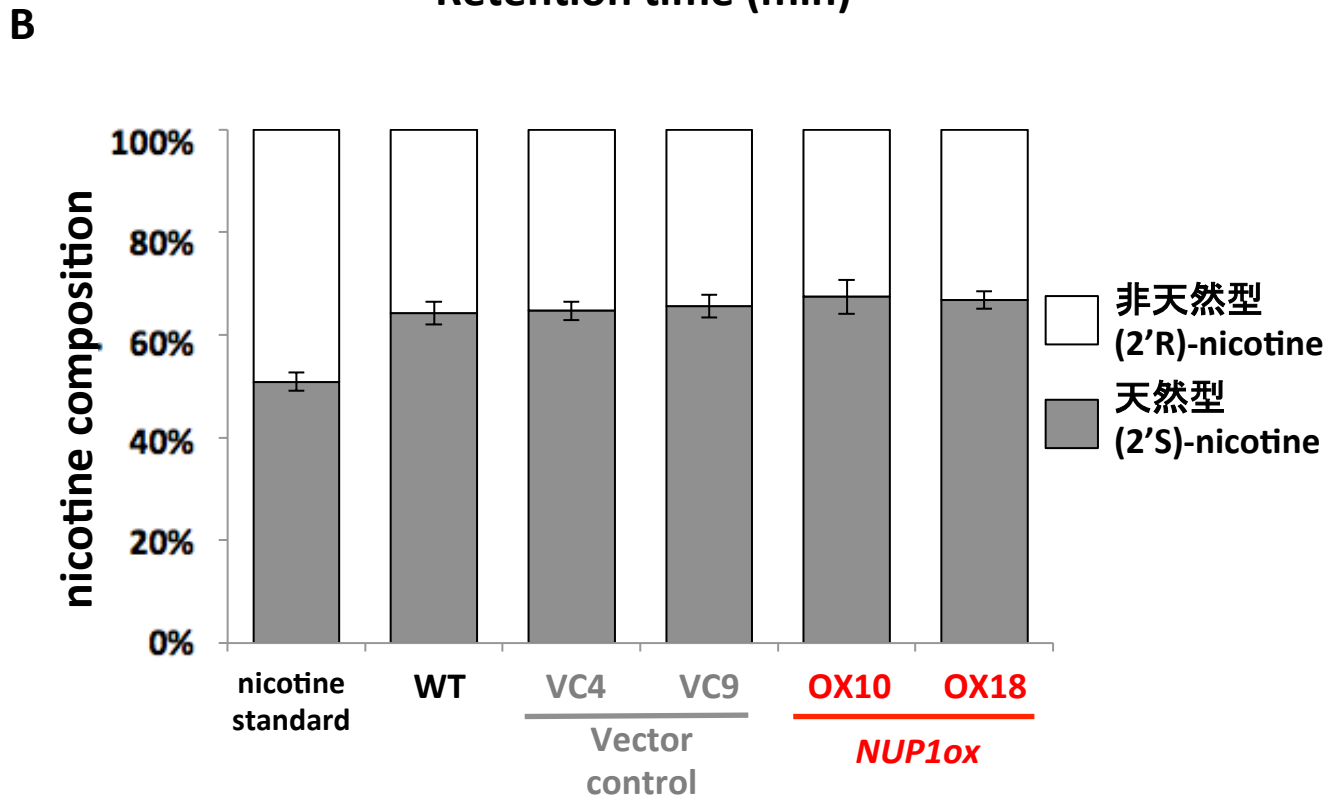
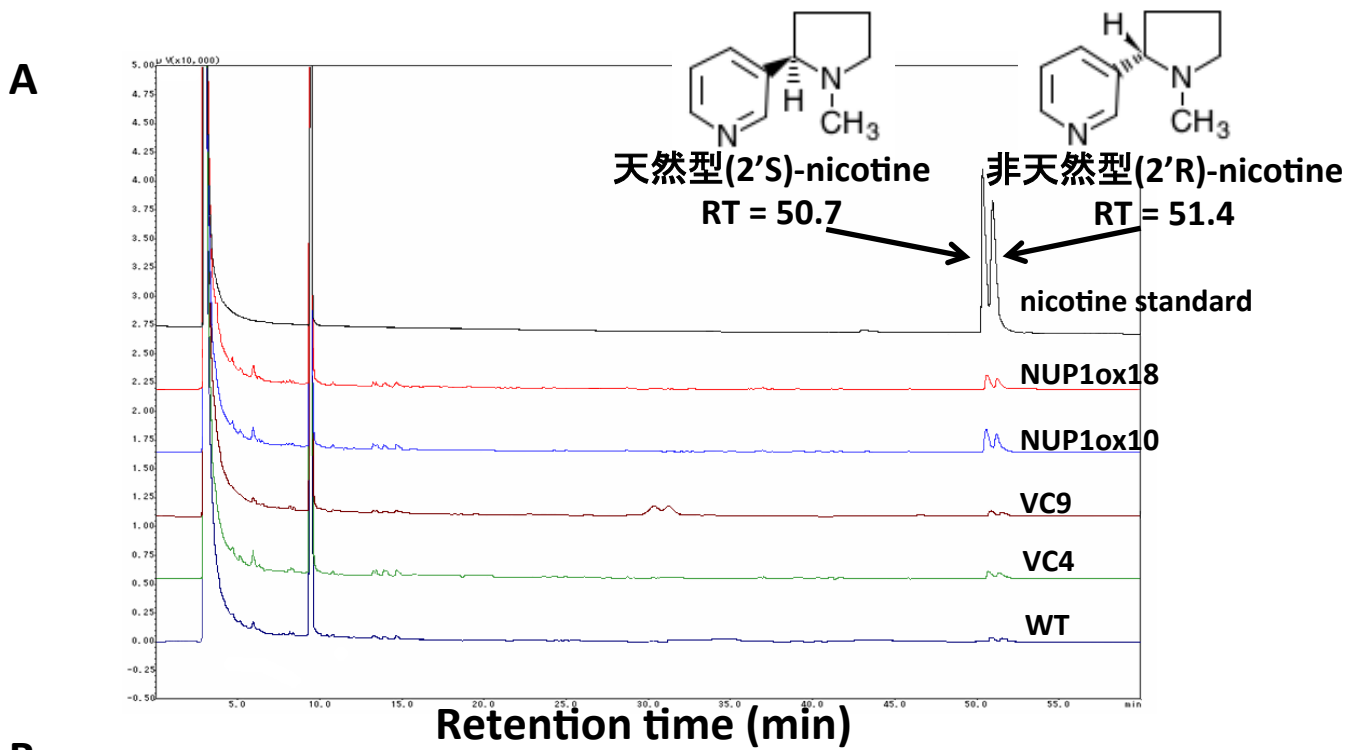


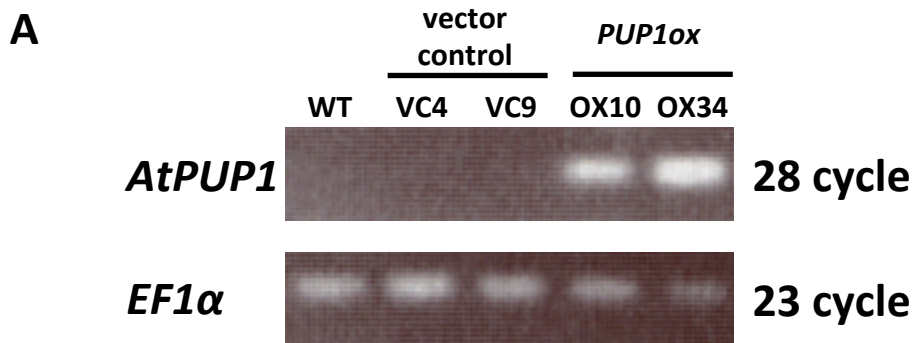
図13. *NUP1*過剰発現BY-2細胞でのニコチン光学異性体の取り込み解析

形質転換系統はそれぞれのベクターに対して独立の2系統を用いた。nicotine standardは天然型(2'S)-ニコチンおよび非天然型(2'R)-ニコチンそれぞれ25 μ M 混合した。添加4時間後のBY-2細胞内のニコチンを抽出しキラルカラムを装着したGLCで解析した。

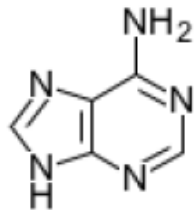
A. ニコチン光学異性体のクロマトグラム

B. 細胞内の取り込んだニコチン光学異性体の存在比率

各カラムは取り込んだニコチンの総量を100%とし、平均値 \pm 標準誤差を示した。



B



Adenine

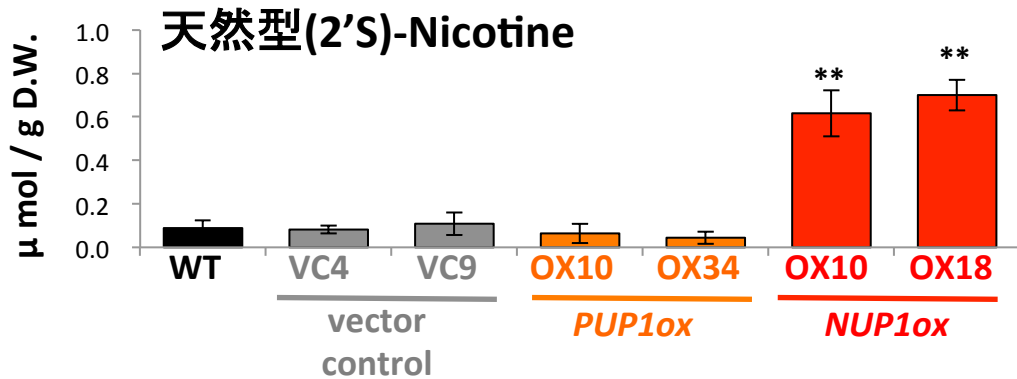
図14. *NUP1*および*PUP1*過剰発現BY-2細胞での*NUP1*および*AtPUP1*の発現
形質転換系統はそれぞれのベクターに対して独立の2系統を用いた。

A. *AtPUP1*過剰発現BY-2細胞における*PUP1*の発現

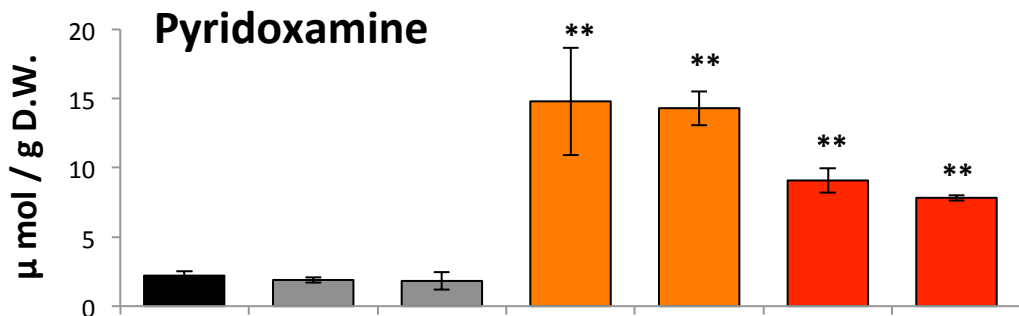
半定量RT-PCRによって解析し、電気泳動を行い、ゲル画像を撮影した。*AtPUP1*は28cycle、ハウスキーピング遺伝子*EF1α*は23cycleのPCR反応を行った。

B. アデニンの構造式

C



D



E

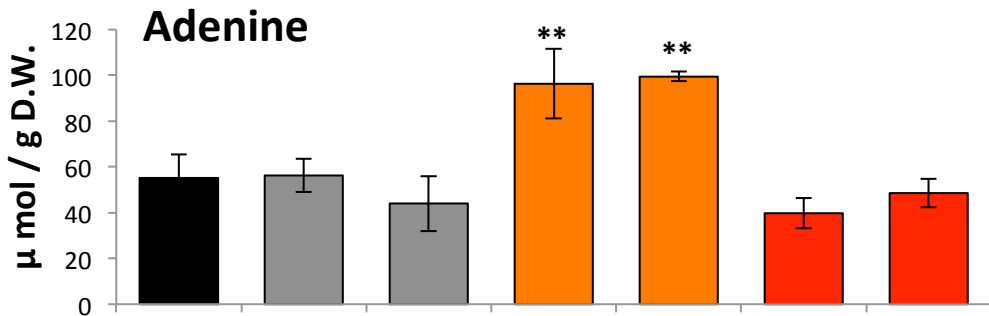


図14. *NUP1*および*PUP1*過剰発現BY-2細胞での基質取り込み解析(続き)

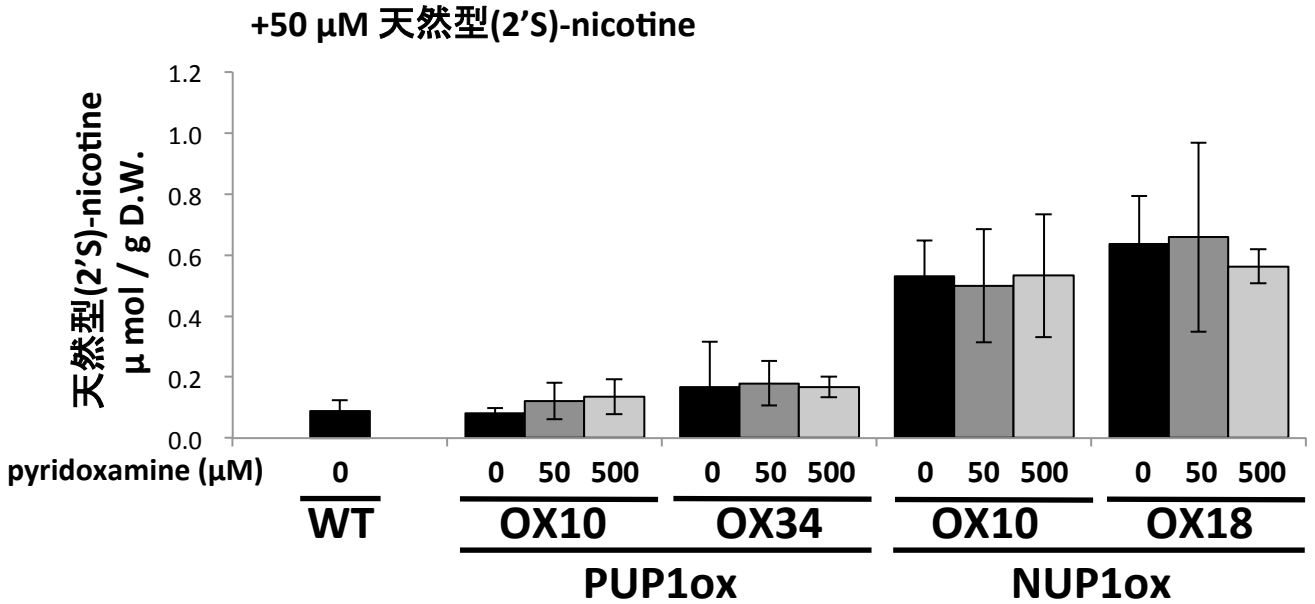
添加した基質(2'S)-ニコチン、ピリドキサミンおよびアデニンをそれぞれ50 μMした。添加4時間後のサンプルにおける細胞内の天然型(2'S)-ニコチンの蓄積量はGLCで解析し、アデニンおよびピリドキサミンの蓄積量はHPLCで解析した。形質転換システムはそれぞれのベクターに対して独立の2システムを用いた。各カラムは平均値±標準誤差を示し、統計処理はStudent's t.testをWTに対して行い、* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を示した。(N = 3)

C. 天然型(2'S)-ニコチンの蓄積量

D. ピリドキサミンの蓄積量

E. アデニンの蓄積量

A



B

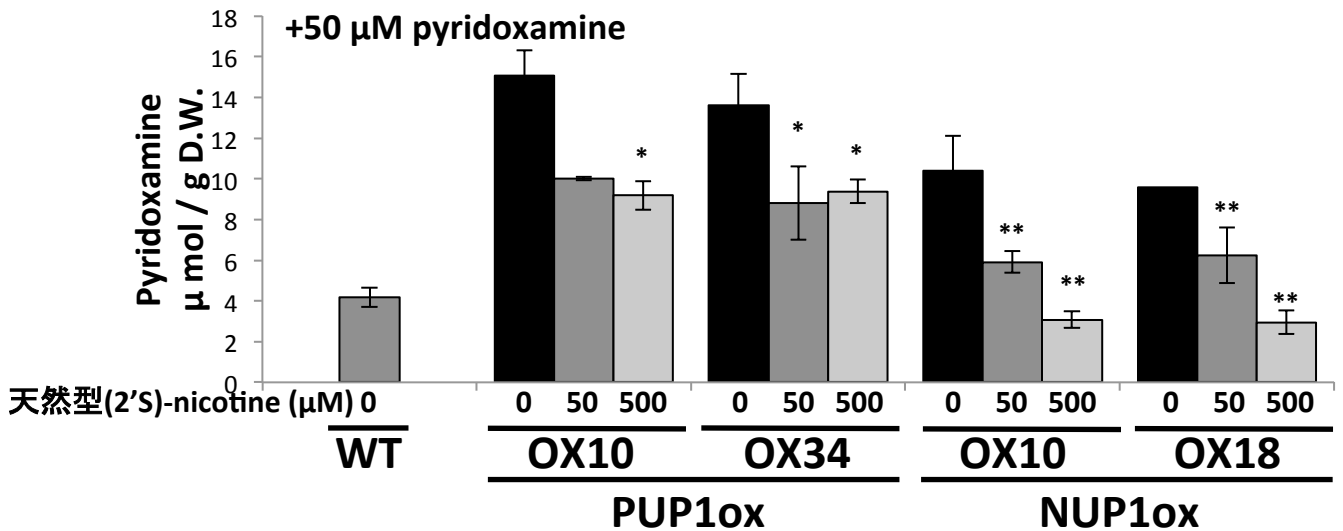


図15. *NUP1*および*PUP1*過剰発現BY-2細胞でのニコチンおよびピリドキシンの取り込み阻害実験
 取り込みを4時間行ったサンプルにおけるニコチンまたはピリドキサミンの細胞内蓄積量をGCまたはHPLCで解析した。形質転換システムはそれぞれのベクターに対して独立の2システムを用いた。各カラムは平均値 \pm 標準誤差を示し、統計処理はStudent's t.testをそれぞれの基質0 μM に対して行い、* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を示した。(N = 3)

A. 最終濃度 50 μM 天然型(2'S)-ニコチンに対し、最終濃度0、5、25、50および250 μM ピリドキサミンを添加したBY-2細胞でのニコチンの蓄積量

B. 最終濃度 50 μM ピリドキサミンに対し、最終濃度0、5、25、50および250 μM 天然型(2'S)-ニコチンを添加したBY-2細胞でのピリドキサミンの蓄積量

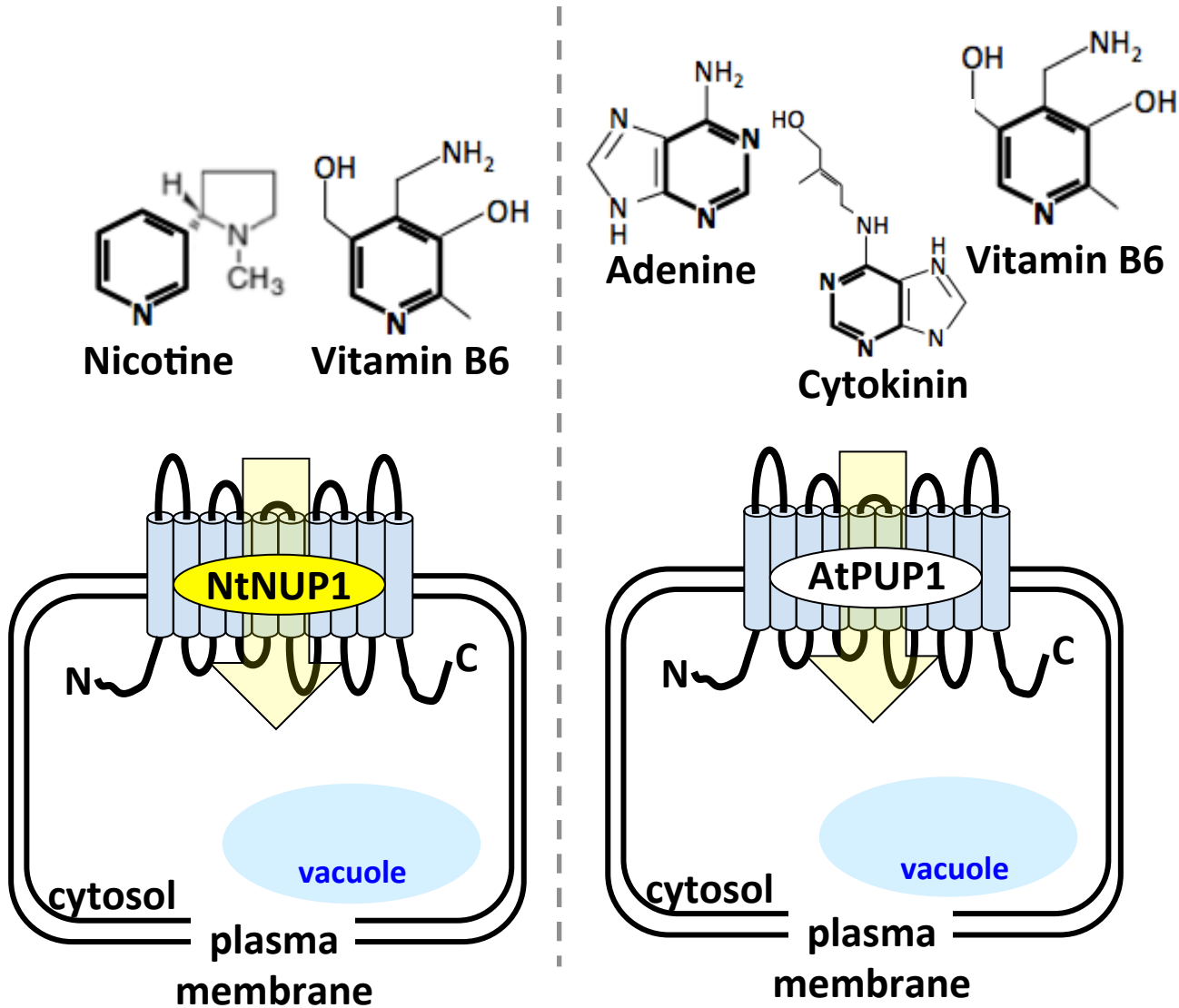


図16. タバコNUP1およびシロイヌナズナPUP1の輸送モデル

タバコNUP1およびシロイヌナズナPUP1は共に細胞膜局在型のNUP/PUP型輸送体である。輸送基質についてはビタミンB6はともに輸送するが、タバコNUP1ではニコチンを含むアルカロイド、シロイヌナズナPUP1はアデニンやサイトカイニンの特異的に輸送する。輸送駆動力として H^+ と共に上記の輸送基質を細胞内に輸送するシンポート型の輸送体と推察される。

考察

NUP1 はシロイヌナズナ PUP1 と高い相同性を持つ輸送体をコードしている。タバコ NUP およびシロイヌナズナ PUP は植物に特異的な Drug and Metabolite transporter (DMT) 2. A 7. 14 family に属している (Jelesko, 2012)。DMT 2. A 7. 14 family は Plant Organic Permease (POP) family と呼ばれ、 H^+ の駆動力を用いて、プリン誘導体 (アデニン、グアニンなど)、植物ホルモン (トランスゼアチン、カイネチンなど) さらにアルカロイド (カフェインなど) を輸送基質にすると考えられてきた (Jack et al., 2001)。

シロイヌナズナには 21 の PUP 遺伝子 (1 つは psuedogene) が存在している (Jelesko, 2012)。この PUP 遺伝子の中で、タバコ NUP1 および NUP2 と近縁なシロイヌナズナ PUP1、PUP2 および PUP3 が機能解析に用いられている (Gillissen et al., 2000; Burkle et al., 2003; Cedzich et al., 2008; Szydlowski et al, 2013)。酵母のアデニンの取り込み変異体 *fcy2* を用いた相補的スクリーニングから、PUP1 はアデニンの輸送体として発見された (Gillissen et al., 2000)。さらに PUP1 を発現させた分裂酵母ではアデニンに対し高い輸送アフィニティーを持ち、 H^+ 透過阻害剤によりアデニンの取り込みが抑えられたことから、 H^+ シンポート機構を持つ。アデニンと同様にプリン環を持つサイトカニンやカフェインをアデニンと同時に添加した競合阻害実験からアデニンの取り込みが阻害された。またニコチンも弱いながらもアデニンの取り込みを阻害した。細胞内局在が解析されたのは PUP1 のみで細胞膜局在型である (Cedzich, 2008)。発現組織解析では PUP1 は葉脈の末端の排水組織、PUP2 は師管、PUP3 は葯および花粉 (Burkle et al., 2003) であり、PUP ファミリーの他の遺伝子は機能解析されていない。タバコ NUP1 の機能解析は Hildreth et al. (2011) によって、細胞膜局在型であり根端で強く発現しているニコチン特異的な輸送体と報告された。さらに興味深いことに *NUP1* 発現抑制毛状根ではニコチン生合成遺伝子の発現が低下し、ニコチン蓄積が減少していた。さらに根の生育が早くなると報告されている (Hildreth et al., 2011)。また近年、酵母のビタミン B6 の取り込み変異体 MVY30 を用いた相補的スクリーニングによって、PUP1 はビタミン B6 の輸送体としても報告されている (Szydlowski et al, 2013)。しかし、ビタミン B6 の輸送活性は PUP1 および PUP2 のみで認められ、PUP3 ではほぼ見られない。これまでの先行研究よりタバコ NUP1 は細胞膜局在型のニコチン輸送体であるが、同じ NUP/PUP ファミリー内

のシロイヌナズナ PUP1 が有するアデニンやビタミン B6 の輸送活性については不明であった。

NUP1 を発現させた分裂酵母を用いた取込み基質の競合阻害実験から NUP1 のニコチンの取り込みはタバコアルカロイドのアナタビン、アナバシン、トロパンアルカロイドであるアトロピン(ヒヨシアミンのラセミ混合物)およびサイトカイニンであるカイネチンなどによって阻害される。しかしトロパンアルカロイドのスコポラミンはシロイヌナズナ PUP1 のニコチン取り込みに対して阻害を起こさない (Hildreth et al., 2011)。

本研究では 1 つの化合物に対しての取り込みを解析した。NUP1 を発現させた出芽酵母および *NUP1* 過剰発現 BY-2 細胞を用いて、基質輸送様式の機能解析を行った(図 8 - 図 14)。NUP1 を異所発現させた出芽酵母ではタバコ植物が本来産生するピリジンアルカロイドのニコチンおよびアナタビン、タバコ植物が産生しないトロパンアルカロイドのヒヨシアミンおよびスコポラミン、さらにビタミン B6 などのプリン環を含まない化合物への広範囲な輸送基質特異性が認められた。また *NUP1* 過剰発現させた BY-2 細胞では同様の結果となったことから、やはり NUP1 は広範囲な輸送基質特異性を有していると推察される。シロイヌナズナ PUP1 の輸送基質はアデニン、サイトカイニンおよびビタミン B6 である (Gillissen et al., 2000; Burkle et al., 2003; Cedzich, 2008; Szydłowski et al, 2013)。一方でタバコ NUP1 の輸送基質はアルカロイドおよびビタミン B6 であり、少なくともアデニンは輸送基質ではなかった(図 14)。NUP1 発現分裂酵母および *NUP1* 過剰発現 BY-2 細胞のビタミン B6 の取り込みの共通点として、ピリドキサール(ビタミン B6 のアルデヒド型)よりもピリドキシン(アルコール型)やピリドキサミン(アミン型)を多く取り込んでいた。NUP1 の輸送基質は共通構造としてピリジン環が考えられるが、さらにピリジン環周辺の官能基または立体構造によって輸送基質の選択性が生じている可能性がある。

栄養要求性の動物とは異なり植物ではビタミン B6 を生合成している。ピリドキサール-5-リン酸(PLP)が活性型ビタミン B6 であり、生体内の様々な水溶性酵素の補酵素として機能している(Roje, 2007)。PLP 生合成酵素のサブユニットの一つであるシロイヌナズナ *PDX2* の null 変異体は胚性致死を示す (Tambasco-Studart et al. 2005)。また *PDX1.1* および *PDX1.3* は浸透圧ストレスおよび酸化ストレス耐性に寄与している(Chen and Xiong, 2005)。これより PLP は発生、細胞内恒常性における重要な役割を果たしている。シロイヌナズナ PUP1

は葉脈の末端の排水組織で高発現しているため、PUP1の機能は排水組織から排水されたサイトカニンやビタミン B6 の再取り込みに関わるとされている (Bürkle et al. 2003; Szydlowski et al. 2013)。しかし、*PUP1* の null 変異体では顕著な表現型を示していないので、*PUP1* の生物的な役割は明らかではない (Szydlowski et al. 2013)。タバコ植物における *NUP1* 発現抑制株では細胞内 PLP が減少することで、PLP 依存性酵素を含む代謝が阻害される可能性がある。

本研究の結果から DMT 2. A 7. 14 family のタバコ *NUP1* およびシロイヌナズナ *PUP1* は、共通輸送基質であるビタミン B6 の輸送体として機能していたものが、進化の過程で新規にプリン環を持つ化合物またはアルカロイドなどを輸送機質として認識する機能を獲得した可能性がある。

第 2 章 ニコチン輸送体 NUP1 のニコチン蓄積機能の解析

材料と方法

植物材料

遺伝子クローニングには *N. tabacum* cv. Burley 21、発現解析には *N. tabacum* cv. NC95 および低ニコチン変異株である *N. tabacum* cv. NC95 の *nic1nic2* 遺伝型のタバコ植物体を用いた。1 % 次亜塩素酸ナトリウムで 10 分滅菌後、滅菌水で 5 回以上洗浄したのち、種子を一晩吸水させ、0.8 % (W/V) agar、3 % (W/V) スクロースを含む B5 培地(Gamborg et al., 1968)に播種した。発芽後、Sakata SuperMix : バーミキュライト : 赤玉土 = 1 : 1 : 1(V/V/V)の培養土に緩効性肥料マグアンプ K を少量加え、アグリポットに植物体を移し 25 °C の温室で育成した。形質転換タバコ植物体の作成に用いた *N. tabacum* cv. SR-1 は前述と同様に行った。

培養細胞に関しては第 1 章の材料と方法と同様に行った。

形質転換

形質転換植物体を得るためにリーフディスク法(Horsch et al., 1985)を参考に以下の手順で行った。対象のプラスミドを *A. tumefaciens* strain EHA105 に形質転換した後、6 ml YEB 液体培地で液体培養し、培養 24 時間菌液を MS 液体培地で 4 倍希釈したものを形質転換に用いた。リーフディスクに用いる植物は温室で育てた *N. tabacum* cv. SR-1 の若い葉を、1% 次亜塩素酸ナトリウム、少量の tween-20 を含む滅菌液で 10 分間浸漬滅菌した後、滅菌水で 5 回洗浄したものを形質転換材料とした。滅菌した葉を *Agrobacterium* 菌液内で 0.5-1 cm 角のリーフディスクを作成し、余分な菌液を拭き取った後 MS 固形培地に展開し 2 日間共存培養した後、MS 液体培地で 5 回洗浄し 2 mg l⁻¹ benzyl adenine (BA)、50 µg ml⁻¹ kanamycin および 250 µg ml⁻¹ sefotaxim sodium を加えた MS 固形培地 (Shooting 培地) に静置し、25 °C 明所で shoot を再分化させた。さらに shoot が約 5 cm に成長するまで、3 週間ごとに新しい shooting 培地に植え継いだ。約 5 cm に成長した shoot を shooting 培地から BA を除いた 1/2 x MS 塩の Rooting 培地に植え継ぎ、発根を促した。約 2 週間で発根したラインだけをタバコ培養土に移植し、T0 世代として前述の条件で育成し、自家受粉により T1 世代の種子を得た。その後選抜された独立した T1 世代から total RNA を抽出し、qRT-PCR によって選

抜き、解析に用いた。

形質転換毛状根を得るためにリーフディスク法(Horsch et al., 1985)を参考に以下の手順で行った。対象のプラスミドを *A. rhizogenes* strain 15834 に形質転換した後、6 ml YEB 液体培地で液体培養し、培養 24 時間菌液を MS 液体培地で 4 倍希釈したものを形質転換に用いた。リーフディスクへの感染方法は上記と同様に行った。2 日間共存培養した後、MS 液体培地で 5 回洗浄し、50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ kanamycin および 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ sefotaxim sodium を加えた MS 固形培地静置し、25 °C 暗所で毛状根を誘導した。さらに成長した毛状根を 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ kanamycin および 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Sefotaxim sodium を加えた B5 固形培地で選抜を 2 回行った後、抗生物質を含まない 100 ml B5 液体培地を用い 80 rpm、25 °C で震盪培養した。BY-2 細胞への形質転換は第 1 章の材料と方法と同様に行った。

メチルジャスモン酸処理

BY-2 細胞に対するメチルジャスモン酸処理として、培養 7 日目の細胞 4 ml を新しい 100 ml BY-2 培地に植え継ぎ、さらに 4 日培養した。培養 4 日目の BY-2 細胞を回収し 2,4-D を含まない BY-2 培地（以下 BY-2 free 培地と略す）で 5 回洗浄した後、BY-2 free 培地でタバコ BY-2 培養細胞 2 倍量 (V/V) に希釈した 5 ml を、新しい 95 ml BY-2 free 培地に植え継いだ。通常の液体培養条件下にて 12 時間培養を行い、その後 Dimethyl sulfoxide (DMSO) で希釈したメチルジャスモン酸を最終濃度 100 μM になるように添加した。メチルジャスモン酸を添加した細胞を処理 0 時間とした。液体培地の回収にはキムワイプで細胞を除きチューブに移し -20 °C で保存し、BY-2 細胞の回収には濾紙 (Advantech) を敷いたブフナー漏斗で吸引濾過し、蒸留水で 5 回細胞を洗浄した後、液体窒素下で凍結後 -80 °C にて保存した。

形質転換毛状根へメチルジャスモン酸処理として、液体培養 2 週間目の毛状根を 3 等分し、それぞれ 100 μM メチルジャスモン酸を添加した新しい 100 ml B5 液体培地に継代培養し、培養 24 時間後に回収し、-80 °C で保存した。

NUP1-tagRFP 融合タンパク質の細胞内局在解析

NUP1 タンパク質の細胞内局在性を解析するために、タマネギ表皮細胞にボンバードメント法を用いた一過的発現系で解析を行った。CaMV35S プロモーター制御下で NUP1-tagRFP 融合タンパク質を一過的に発現する vector を以下の手順で

作成した。*NUP1* の ORF 配列に Gateway BP cloning 組み替え配列付加した cDNA 断片を増幅した後、Gateway adapter プライマーによってさらに増幅した。増幅した DNA 断片は、pDONR / Zeo に BP 反応によってクローニング後、シーケンスを確認した。この pDONR / Zeo / NUP1 を LR 反応によって一過的過剰発現用ベクター pUGW2-tagRFP にクローニングし、pUGW2-tagRFP / NUP1 を作成した。同様の方法で細胞膜マーカーとして報告されているシロイヌナズナ PIP2a(Janget al., 2004; At3g53420)を上記と同様にクローニングし、pUGW6 / PIP2a とした。クローニングに用いたプライマーを supplement 表 6 に示す。

それぞれ 5 μ g の pUGW2-tagRFP / NUP1 および pUGW6 / PIP2a、10 μ l 2.5 M CaCl₂、4 μ l 0.1 M spermidine、とともに 1.6 μ m 金粒子にコートした後、70 % ethanol、100 % ethanol の順で脱水した後、PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System(Biorad)を用いてタマネギ表皮細胞に打ち込んだ後、25 °C、暗所で 12 時間インキュベートした。インキュベート後すぐに観察したものを無処理とし、さらに 0.8 M マンニトール水溶液で 1 時間処理したものを高浸透圧処理とした。観察には C2 共焦点顕微鏡 (Nicon) を用い、tagRFP および GFP はそれぞれ励起光 544 nm および 488 nm、バンドパスフィルターはそれぞれ 585/65 nm および 514/30 nm を用いた。

***β -glucuronidase (GUS)* レポーター遺伝子による発現解析**

NUP1 の組織、器官特異性発現解析をするために *NUP1* プロモーター制御下で GUS 遺伝子を発現する vector を以下の手順で作成した。*NUP1* プロモーターを Sol genomics network (<http://solgenomics.net>) を用い *NUP1* cDNA を query にして *N.tabacum* Methylation Filtered Genome TGI:V.1 Contigs に対して検索をかけ、processed-tobacco-genome seucece-C32375 を取得した。さらにタバコ genomic DNA を用いて 3 回シーケンスを行い配列の確認を行った(図 25)。得られたプロモーター領域 1.4 kb に *Hind*III および *Bam*HI 制限酵素サイトを付加して増幅した後 pGEM-T (promega)に TA クローニングした。さらに上記の制限酵素サイトで切り出し、pBI121(clonetech)の 35S プロモーターのサイトを上記の制限酵素サイトで切り出し、置き換え pBI121 / NUP1pro :: GUS を作成した。クローニングに用いたプライマーを supplement 表 6 に示す。

この NUP1pro :: GUS を用いた毛状根を作成し、GUS 染色を行った。継代培養後 7 日目の毛状根を染色液 (Shoji et al., 2000b) に浸し 20 分間脱気を 2 回行い、

37 °C にて 24 時間反応させた。反応後、反応液を蒸留水に置き換え 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、20 mM phosphate buffer(pH 7.0)でリンスし、30 分間浸した。サンプルを 5% Agar, 1 mM DTT, 20 mM phosphate buffer, pH 7.0 に抱埋し DTK-1500 microslicer (DohanEM, Kyoto) で 75-100 μ m の厚さでスライスした。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。

***COI1*, *MYC2* および *ERF189* 発現抑制毛状根および BY-2 細胞の作出**

発現抑制株を作成するための binary vector は RNAi による発現抑制 vector pBI121 / *COI1* RNAi (Shoji et al., 2008)、pBI121 / *MYC2* RNAi (Shoji and Hashimoto, 2011)および *ERF189* に EAR リプレッションモチーフを融合させて強制発現し、内在性の *ERF189* および同じ DNA 結合特性をもつ *ERF189* ホモログの機能をドミナント抑制する pBI121 / *ERF189*-EAR (Shoji et al., 2010)を用いた。形質転換方法は前述と同様の方法を用いた。

***NUPI* 過剰発現および発現抑制 BY-2 細胞および形質転換植物体の作出**

NUPI 発現抑制体を得るために、CaMV35S プロモーター制御下で恒常的に RNAi による発現抑制を起こすための vector を以下の手順で作成した。*NUPI* の ORF から 3'-UTR 領域を含む部分配列(+750- +1129)に異なる 4 種類の制限酵素サイトを付加した 2 種類の cDNA 断片を増幅し、pGEM-T (promega)に TA クローニングした。これら cDNA 断片を植物 RNAi 用 vector である pHANNIBAL(Wesley et al., 2001)を改良した改良 pHANNIBAL (小川, 修士論文, 2004) のそれぞれの制限酵素ペア領域にセンス鎖として *Bam*HI および *Cl*aI、アンチセンス鎖として *Kpn*I および *Sac*I で処理した cDNA 断片を挿入し RNAi カセットを改良 pHANNIBAL 上に作成した。作成した RNAi カセットからセンス鎖、pdk intron、アンチセンス鎖を含む領域を *Bam*HI と *Sac*I で切り出し、あらかじめ上記制限酵素サイトで処理し GUS 遺伝子を除去した pBI121 へ挿入し pBI121 / *NUPI*RNAi binary vector を作成した。

以上の pBI121 / *NUPI* RNAi を BY-2 細胞および形質転換植物体へ上記の方法を用いて形質転換した。

QPT 発現抑制 BY-2 細胞を得るために CaMV35S プロモーター制御下で恒常的に RNAi による発現抑制を起こすための vector を以下の手順で作成した。*QPT*

の ORF の部分配列(+1- +510)に異なる 4 種類の制限酵素サイトを付加した 2 種類の cDNA 断片を増幅し、pGEM-T (promega)に TA クローニングした。これら cDNA 断片を植物 RNAi 用 vector である pHANNIBAL(Wesley et al., 2001)を改良した改良 pHANNIBAL (小川, 修士論文, 2004) のそれぞれの制限酵素ペア領域にセンス鎖として *BamHI* および *ClaI*、アンチセンス鎖として *KpnI* および *SacI* で処理した cDNA 断片を挿入し RNAi カセットを改良 pHANNIBAL 上に作成した。作成した RNAi カセットからセンス鎖、pdk intron、アンチセンス鎖を含む領域を *BamHI* と *SacI* で切り出し、あらかじめ上記制限酵素サイトで処理し GUS 遺伝子を除去した pBI121 へ挿入し pBI121 / QPT RNAi binary vector を作成した。クローニングに用いたプライマー-h は supplement 表 6 に示す。

また *BBL* 発現抑制 BY-2 細胞の作成には Kajikawa ら(2011)が作成した pBI121 / *BBL* RNAi を用いた。

以上の pBI121 / NUP1 RNAi、pBI121 / QPT RNAi、pBI121 / *BBL* RNAi および第 1 章で用いた pBI121 / NUP1ox を BY-2 細胞および形質転換植物体へ上記の方法を用いて形質転換した。

qRT-PCR 法による発現解析

第 1 章の材料と方法と同様に行った。使用したプライマーセットは supplement 表 7 に示す。

植物体からのサンプル回収方法

植物体からのサンプルの回収には葉、道管液、根の順番で回収した。まず植物体から第 5 葉を回収し、太い葉脈を除いて -80 °C で保存した。道管液の回収については土壌から 5 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 エッペンチューブにシリカウールを 500 μ l 付近まで詰め込み、そのエッペンチューブを切断面に置き切断面からの滲出した道管液を回収した。回収開始から 2 時間後、切断面から約 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。道管液の回収にはエッペンチューブの底に小さな穴を開け、新しいエッペンチューブの上に重ね、パラフィルムで上下のエッペンチューブを連結し、5000 g、15 min 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エッペンチューブに回収し。最後に根の回収につ

いては、できる限り培養土を水道水で洗い流し、水分を除いてから -80°C で保存した。

アルカロイドの抽出および Gus-liquid chromatography アルカロイドの測定

タバコ植物体および BY-2 細胞からのアルカロイド抽出は以下の手順で行った。回収および凍結粉碎したタバコ組織（根および葉）および 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 25 mg に 0.1 N H_2SO_4 を加え 60 分間超音波処理を行った。その後 15,000 g 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_4OH 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 Extrelut-1 column (Merck) に添加した後、6 ml の chloroform で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) を含むエタノール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、BY-2 細胞培養液および道管液は 15,000 g、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。1 ml BY-2 細胞培養液または 100 μl 道管液 Extrelut-1 column に直接入れ同様の手順にてサンプル調整を行った。

Gus-liquid chromatography による測定条件は第 1 章の方法と同様に行った。

結果

***NUP1* の発現解析**

NUP1 のニコチン代謝との関連性を調べるために低ニコチン *nic1nic2* 変異体 (*N.tabacum* cv. NC95) を用いて、*NUP1* の発現パターンを解析した。*NUP1* の発現は野生型に比べて *nic1nic2* 変異体で有意に低下していた(図 17)。この結果は既知のニコチン輸送体 *MATE1/2* およびニコチン生合成遺伝子 *PMT* の発現パターンと一致していた。

NUP1 の植物組織間の発現パターンを調べるために、野生型タバコ (*N.tabacum* cv. NC95) の根、茎および第 5 葉を用いて発現パターンを解析した (図 18)。*MATE1/2* および *PMT* の発現パターンはニコチン生合成が行われる根で非常に強く発現し、葉および茎での発現は低くなっていた。*NUP1* の発現は *MATE1/2* および *PMT* と同様に根で非常に強く、葉および茎では有意に低くなっていた。

NUP1 のジャスモン酸への応答性を確認するために、BY-2 細胞を用いてジャスモン酸処理による遺伝子発現を解析した (図 19)。*MATE1/2* および *PMT* は強くジャスモン酸に誘導されることが知られている。*NUP1* の発現はジャスモン酸処理後 24、48 時間でそれぞれ約 4、5 倍と有意に誘導されることが明らかになった。また *MATE1/2* および *PMT* とジャスモン酸に誘導される強さは異なるものの、同様の発現パターンを示すことが明らかになった。

***NUP1* の細胞内局在解析**

NUP1 の細胞内局在を解析するために、タマネギの表皮細胞へのボンバードメント法を用いて解析を行った (図 20)。*NUP1* の C 末端および N 末端に tagRFP を連結したものと、細胞膜マーカーであるシロイヌナズナ PIP2a の N 末端に GFP を連結したものを同時に共発現させた。*NUP1* の N 末端に tagRFP を連結したプラスミドでは蛍光が観察できなかった。*NUP1* の C 末端に tagRFP を連結したものでは細胞膜マーカー PIP2a と完全に共局在した(図 20. A)。さらに 0.8 M マンニトールによる高浸透圧処理を 1 時間行っても、細胞膜マーカー PIP2a と完全に共局在したため(図 20. B)、*NUP1* は細胞膜に局在することが明らかになった。

GUS レポーターを用いた *NUP1* の組織局在

NUP1 は根のどの組織に局在しているかを解析するために *NUP1pro* :: *GUS* を

導入した毛状根を用いて、GUS 染色を行った。ジャスモン酸の誘導によって GUS 染色が促進されることを期待し、ジャスモン酸処理を行ったところ、ジャスモン酸処理 24 時間後の形質転換毛状根は強い GUS 染色を示した(図 21. A)。これは野生型 BY-2 細胞へのジャスモン酸処理(図 19)と同様に *NUPI* はジャスモン酸誘導性遺伝子であることを示している。さらにジャスモン酸による誘導 24 時間後の毛状根の横断切片を作成し、根の組織間での発現パターンを確認したところ、根毛を含む表皮組織で強く GUS 染色された(図 21. B)。また内皮付近でも弱く GUS 染色が観察された。*NUPI* は表皮で強く発現していることが明らかになった。

***COI1*、*MYC2*、*ERF189* 発現抑制毛状根およびタバコ BY-2 培養細胞における *NUPI* の発現解析**

低ニコチン変異体、組織別発現およびジャスモン酸処理における *NUPI* 発現パターンは既知のニコチン生合成酵素遺伝子 *PMT* およびニコチン輸送体 *MATE1/2* の発現パターンと一致した。さらに、タバコ植物でのニコチン産生に関わるジャスモン酸シグナル経路の構成因子との相互関係を解析するために *COI1* レセプターおよび *MYC2* 転写因子の RNAi による発現抑制毛状根および BY-2 細胞を作成した。さらに *NIC2* 遺伝子座 ERF 型転写因子の *ERF189* に EAR リプレッションドメインを融合させたタンパク質を強制発現させることで、内在性の *ERF189* および同じ DNA 結合能力をもつ ERF 型転写因子機能をドミナント抑制した毛状根および BY-2 細胞を作成した。これら変異体に *NUPI* の発現パターンを解析した。

COI1 発現抑制毛状根(図 22. A)および BY-2 細胞(図 22. B)、さらに *MYC2* 発現抑制毛状根(図 20)において、*NUPI* の発現は有意に抑制されていて、発現パターンは *PMT* および *MATE1/2* と同様であった。*MYC2* 発現抑制 BY-2 細胞の作成を試みたが、形質転換体は得られなかった。*ERF189* 機能抑制毛状根(図 24. A) および BY-2 細胞(図 24. B)においては、*PMT* および *MATE1/2* の発現は有意に低下していたが、*NUPI* の発現は変化していなかった。これより、*NUPI* はジャスモン酸誘導性で *MYC2* 転写因子依存的であるが、*NIC2* 遺伝子座 *ERF189* 転写因子の制御は受けていないことが明らかになった。

***NUPI* 発現抑制および過剰発現植物体におけるピリジナルカロイド蓄積**

の解析

NUP1 の *in vivo* での機能を解析するために、発現抑制および過剰発現植物体を作成した。またコントロールとしてジャスモン酸レセプター *COI1* の RNAi による発現抑制植物体を供試した。この *COI1* 発現抑制植物体ではジャスモン酸経路全体が抑制され、ニコチン蓄積が阻害されることが明らかになっている (Shoji et al., 2008)。 *NUP1* 発現抑制植物体では *NUP1* の発現が有意に低下している独立した 2 系統を確立した (図 26. A)。さらにニコチン生合成酵素遺伝子 *PMT*、*QPT* およびニコチン輸送体遺伝子 *MATE1/2*、さらに *NIC2* 遺伝子座 ERF 型転写因子 *ERF189* の発現が有意に低下していた (図 26. B)。一方で *MYC2* 転写因子の発現は変化していなかったため、*ERF189* の発現抑制を介してニコチン蓄積に関わる遺伝子が抑制されていることが明らかになった。さらにニコチン蓄積量を解析したところ、野生型およびベクターコントロールと比較して発現抑制植物体では葉および根で有意に低下していた (図 27)。つまり *NUP1* 発現抑制植物体では、*ERF189* 転写因子介したニコチン生合成酵素遺伝子の発現抑制によって、ニコチン蓄積量が低下していたことが明らかになった。

さらに *NUP1* 過剰発現植物体では *NUP1* の発現が有意に増加している独立した 2 系統を確立した (図 28. A)。さらにニコチン生合成酵素遺伝子 *PMT* および *QPT*、さらに輸送体遺伝子 *MATE1/2*、さらに *NIC2* 遺伝子座 ERF 型転写因子 *ERF189* の発現も有意に増加した (図 28. B)。この結果は *NUP1* 発現抑制形質転換植物体の結果とほぼ逆の結果であった。さらにニコチン蓄積量を解析したところ、ニコチンが生合成されている根での蓄積量は有意に増加したが (図 29. C)、ニコチンが蓄積する葉では有意に減少した (図 29. A)。ニコチンの根から葉への組織間輸送は道管輸送を介しているため、作られたニコチンが根で道管へローディングされにくくなっているのか、または道管輸送されたニコチンが葉で蓄積されにくくなっているのかを確認するために、道管液を採取しニコチン含有量を解析した。道管液のニコチン濃度は有意に低下していたため (図 29. B)、*NUP1* 過剰発現植物体の葉におけるニコチン蓄積の減少は、根におけるニコチンの道管へのローディングが阻害されていることに起因することが明らかになった。

ジャスモン酸誘導における *NUP1* 発現抑制および過剰発現 BY-2 細胞でのピリジナルカロイド蓄積の解析

さらに *NUP1* の *in vivo* での機能を解析するために、*NUP1* 発現抑制および過剰発現 *BY-2* 細胞を用いてニコチン蓄積への影響を解析した。*BY-2* 細胞は通常の増殖には人工オーキシシン 2,4-D が必要でニコチン蓄積が行われていない。そこへ人工オーキシシン 2,4-D を除きジャスモン酸を添加することで初めてニコチン蓄積が誘導される。ジャスモン酸誘導 24 時間後の *NUP1* の発現が発現抑制株では有意に低下し、過剰発現株では有意に増加しているそれぞれのベクターに対して独立した 2 系統を確立した (図 31. A)。さらにニコチン蓄積に関わる遺伝子発現を解析したところ、ニコチン生合成酵素遺伝子の *PMT* および *QPT*、ニコチン輸送体遺伝子の *MATE1/2*、さらに *NIC2* 遺伝子座 ERF 型転写因子 *ERF189* の発現が *NUP1* の発現と正の相関を示していた(図 31. B)。しかし、ジャスモン酸シグナルに関わる *MYC2* 転写因子、および *MYC2* 転写因子に制御される一般的な防御遺伝子 *PI-II* の発現は変化していなかった。この結果より、*NUP1* の発現は、特に *NIC2* 遺伝子座 *ERF189* を介して、その下流のニコチン生合成遺伝子の発現を制御していることが明らかになった。

BY-2 細胞で蓄積量が多いアナタピンおよびニコチンに注目しアルカロイド蓄積を解析した。蓄積したアルカロイドを細胞内/細胞外(培地中)に分けて解析したところ、蓄積総量は *NUP1* 発現抑制株で低下し、過剰発現株で上昇しており、*NUP1* の発現と正の相関があった(図 32. A)。蓄積したアルカロイドの細胞内/細胞外の存在比率を解析したところ、*NUP1* 発現抑制株ではアルカロイドは細胞外(培地中)に多く存在し、過剰発現株では細胞内に多く存在していた(図 32. B)。これは細胞膜局在型ニコチン輸送体 *NUP1* のニコチン輸送機能によって細胞内にニコチンを輸送している結果 (図 16) と一致した。

***QPT* および *BBL* 発現抑制 *BY-2* 発現抑制 *BY-2* 細胞の遺伝子発現およびピリジンアルカロイドの蓄積量の解析**

NUP1 の発現量と *ERF189* 転写因子の発現は正の相関あることが明らかになった。上記の変化は、生合成されたアルカロイド自体が *ERF189* 転写因子およびニコチン生合成遺伝子の発現に影響を及ぼすのかどうかを解析した。既知のニコチン生合成遺伝子 *QPT* および *BBL* の RNAi による発現抑制 *BY-2* 細胞を解析に用いることで、生合成されるアルカロイドを減少させることができる。この解析で *QPT* および *BBL* を選択した理由として、ニコチン生合成経路の中で *QPT*

はニコチン生合成前半のキノリン酸からキノリン酸モノヌクレオチドの反応を触媒し、一方 *BBL* はニコチン生合成後半のニコチン酸と *N*-メチルピロリニウムカチオンの縮合反応に関わる (Kajikawa et al., 2011) と報告されているからである。

ジャスモン酸誘導における *QPT* 発現抑制 *BY-2* 細胞では *QPT* の発現が有意に抑制されている独立した 2 系統を確立した(図 33. A)。この発現抑制株ではアルカロイド蓄積は抑制されていたが (図 33. C)、*NIC2* 遺伝子座 *ERF189* 転写因子とその下流のニコチン生合成酵素遺伝子 *PMT* および *BBL* さらにニコチン輸送体遺伝子 *MATE1/2* の発現は変化していなかった (図 33. B)。同様に *BBL* 発現抑制 *BY-2* 細胞でも、*BBL* の発現が有意に抑制されている独立した 2 系統を確立し(図 34. A)、アルカロイドの蓄積は抑制されていたが (図 34. C)、*NIC2* 遺伝子座 *ERF189* 転写因子とその下流のニコチン生合成酵素遺伝子 *PMT* および *QPT* さらにニコチン輸送体遺伝子 *MATE1/2* の発現は変化していなかった (図 34. B)。つまり *QPT* および *BBL* 発現抑制 *BY-2* 細胞におけるニコチン蓄積の減少は、*NIC2* 遺伝子座 *ERF189* 転写因子の発現とは関係ないことが明らかになった。

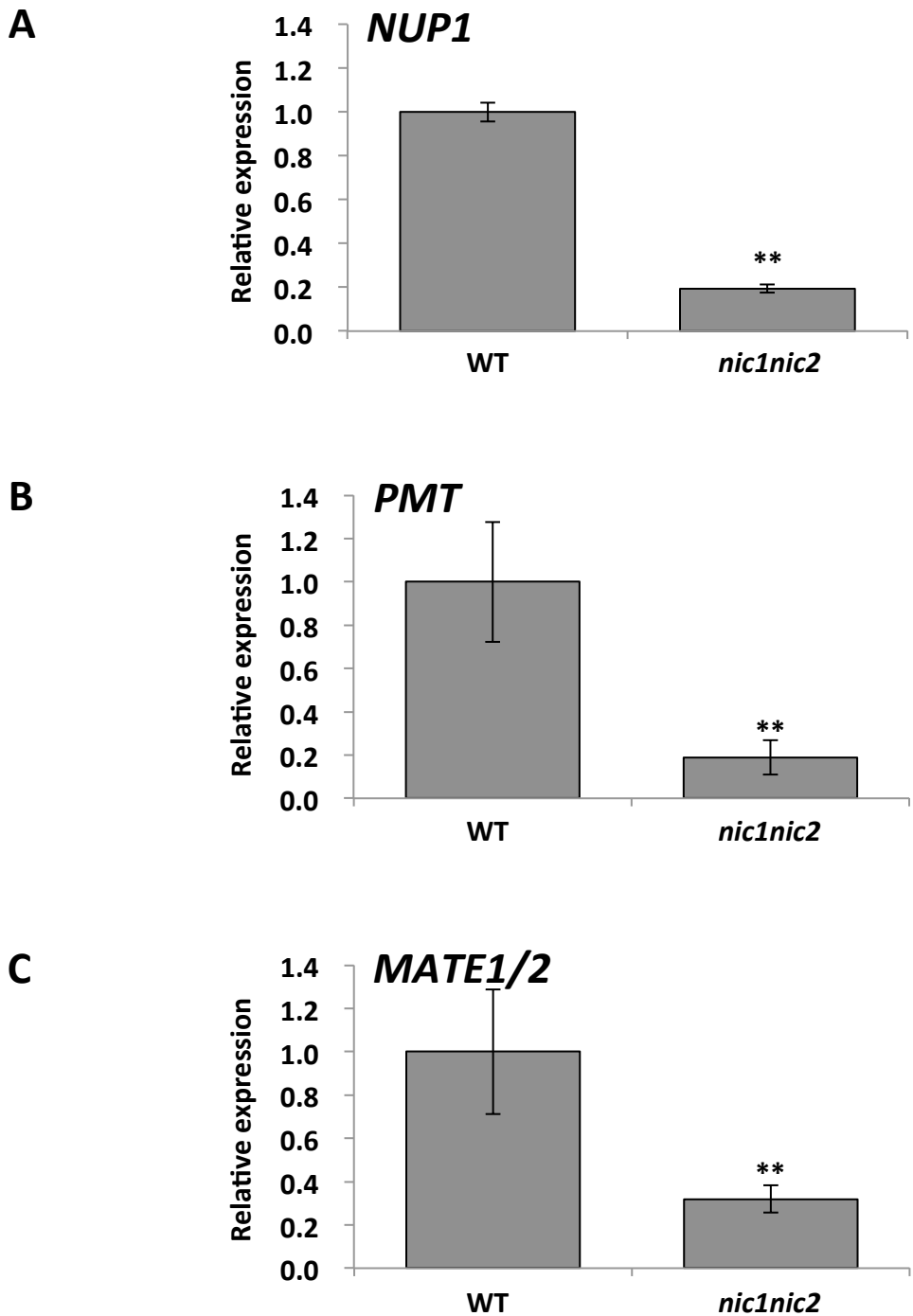


図17. *N. tabacum* cv. NC95の野生型(WT)とおよび低ニコチン変異体(*nic1nic2*)における遺伝子発現
 8週齢の各植物体の根を用いて、*NUP1*、ニコチン生合成酵素遺伝子*PMT*、ニコチン輸送体
*MATE1/2*の遺伝子発現をqRT-PCRで解析した。各カラムは平均値±標準誤差を示し、統計処理は
 Student's t.testをWTに対して行い、* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を示した。(N = 6)

A. *NUP1*の発現量

B. *PMT*の発現量

C. *MATE1/2*の発現量

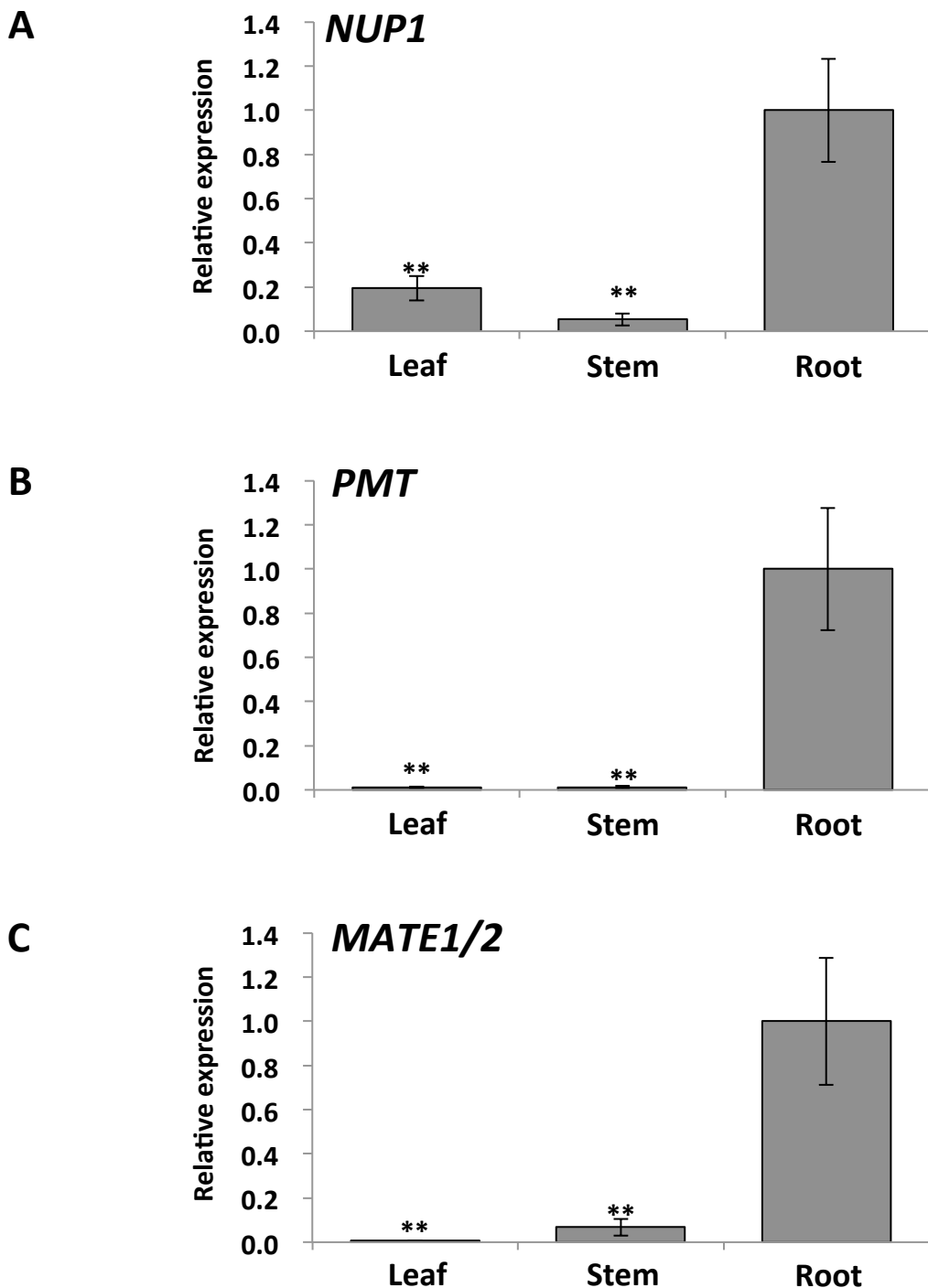


図18. *N. tabacum* cv. NC95の野生型における*NUP1*の組織別遺伝子発現

8週齢植物体の第3展開葉、培養土表面から3-7 cmの茎および根を用い*NUP1*、ニコチン生合成酵素遺伝子*PMT*およびニコチン輸送体遺伝子*MATE1/2*の発現をqRT-PCRで解析した。各カラムは平均値±標準誤差を示し、統計処理はStudent's t.testを根に対して行い、* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を示した。(N = 6)

A. *NUP1*の発現量

B. *PMT*の発現量

C. *MATE1/2*の発現量

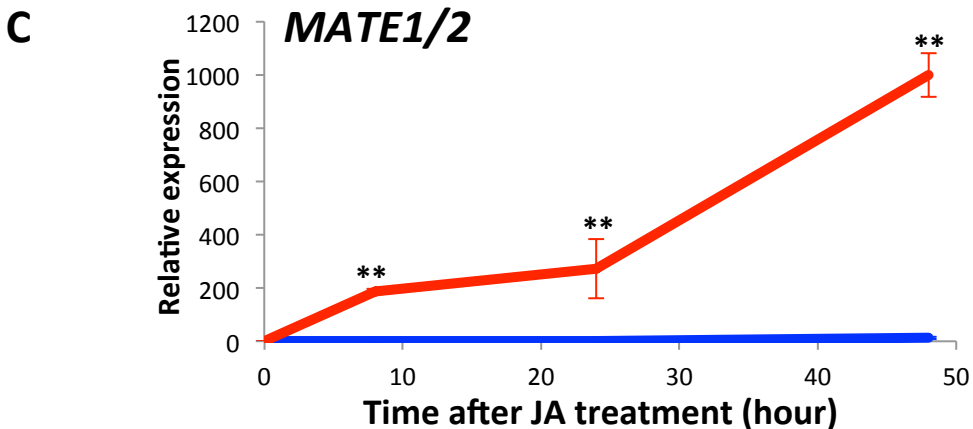
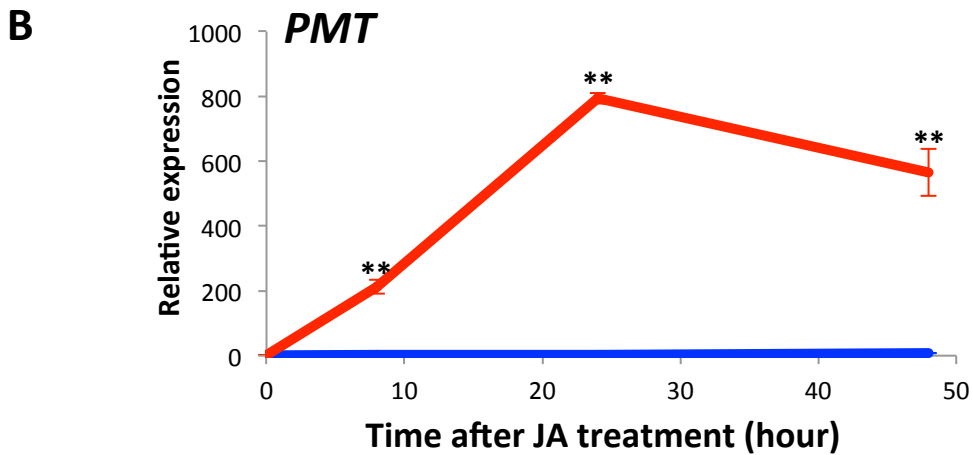
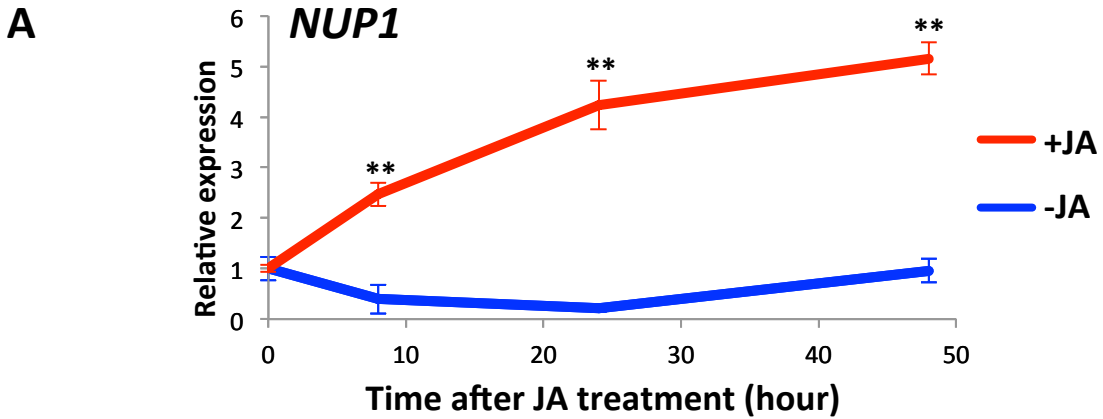


図19. 野生型BY-2細胞を用いたジャスモン酸処理における遺伝子発現

ジャスモン酸処理による*NUP1*、ニコチン生合成酵素遺伝子*PMT*およびニコチン輸送体遺伝子*MATE1/2*の発現をqRT-PCRで解析した。100 μ M ジャスモン酸(+JA)およびDMSO(-JA)を添加し、処理開始から0、8、24および48時間後の遺伝子発現を平均値 \pm 標準誤差を示し、統計処理はStudent's t.testを各時間の-JAに対して行い、* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を示した。(N = 3)

A. *NUP1*の発現量

B. *PMT*の発現量

C. *MATE1/2*の発現量

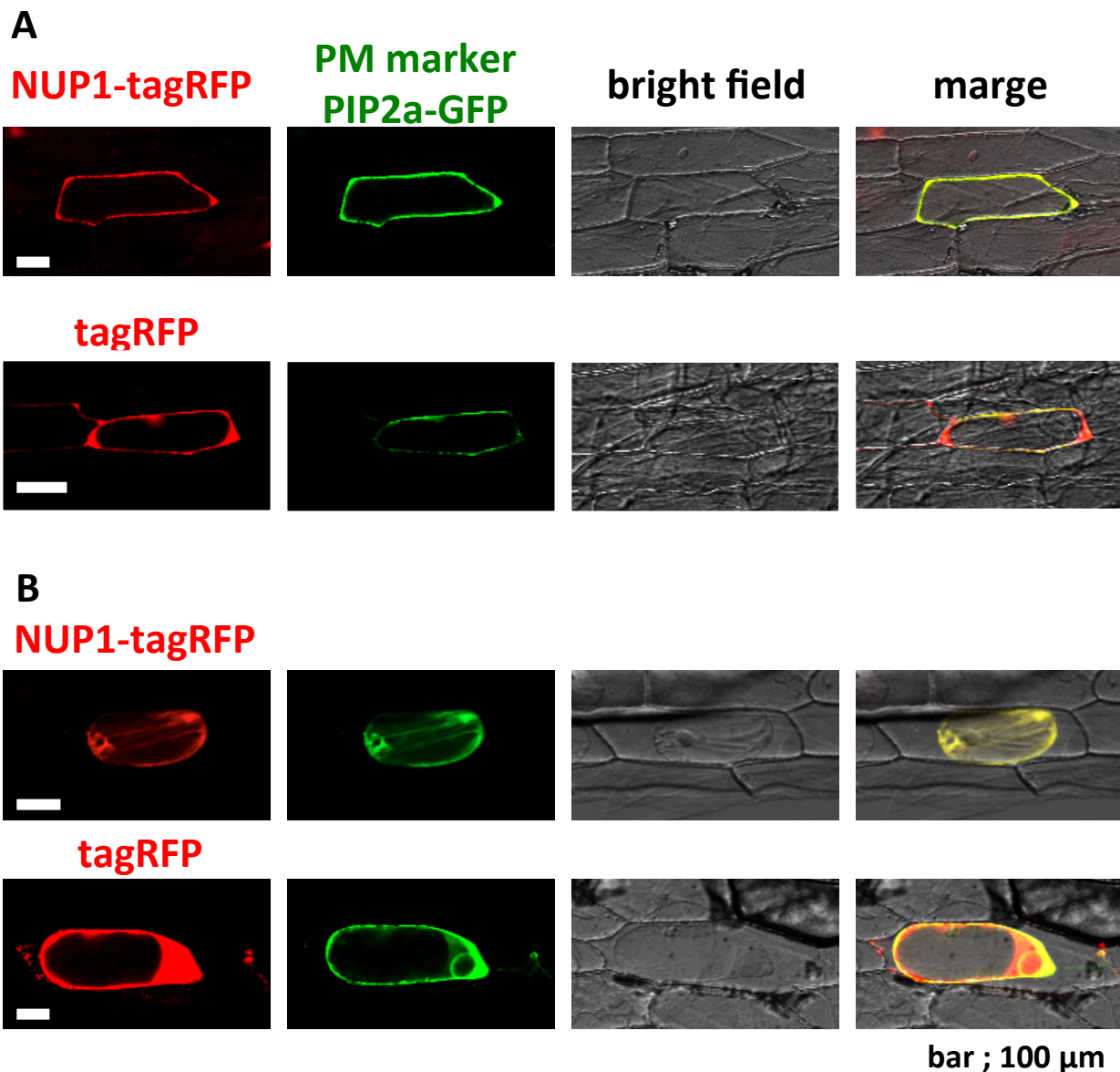


図20. NUP1の細胞内局在

NUP1-tagRFPおよび細胞膜マーカーであるPIP2a-GFPをタマネギの表皮細胞にco-bombardmentを用い一過的に発現させた。観察は打ち込み後12-16時間の細胞を用いた。さらに0.8 M マンニトールによる1時間の高浸透圧処理を行った。スケールバーは100 μ mとした。

A. 未処理

B. 0.8 M マンニトールによる高浸透圧処理

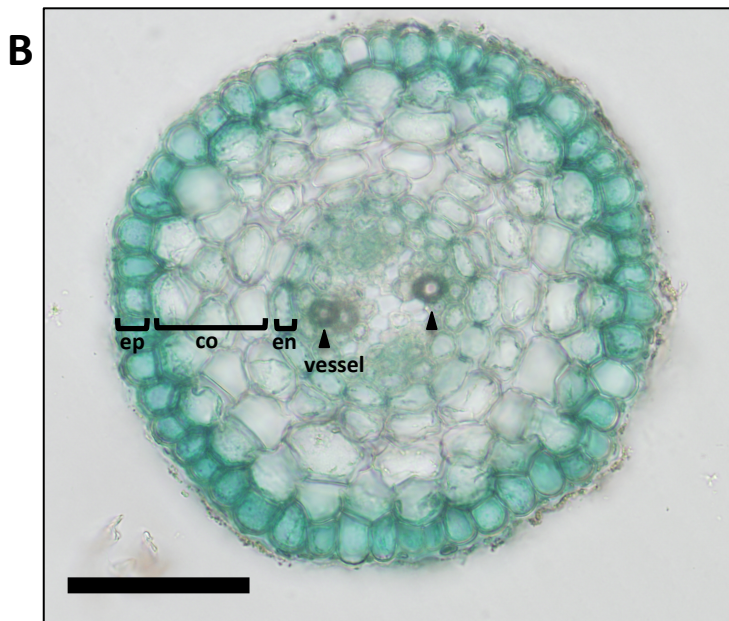
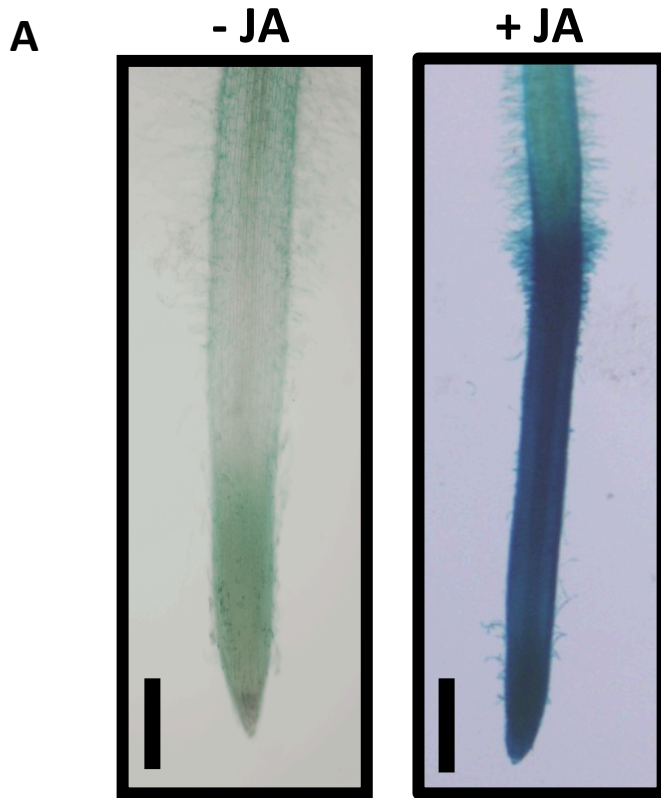


図21. NUP1の根組織での局在

NUP1pro :: GUSを形質転換した毛状根を作成しGUS染色を行った。GUSの染色時間は12時間行い、5%寒天に包埋し厚さ75 - 100 μm の切片を作成し観察を行った。

A. ジャスモン酸未処理(-JA)および 24 時間の100 μM ジャスモン酸処理(+JA)の毛状根 スケールバーは1 mm

B. 24 時間の100 μM ジャスモン酸処理(+JA)の毛状根の横断切片
根端から1 mm付近の領域を切片に用いた。スケールバーは100 μm
ep; 表皮、co; 皮層、en; 内皮、vessel; 道管

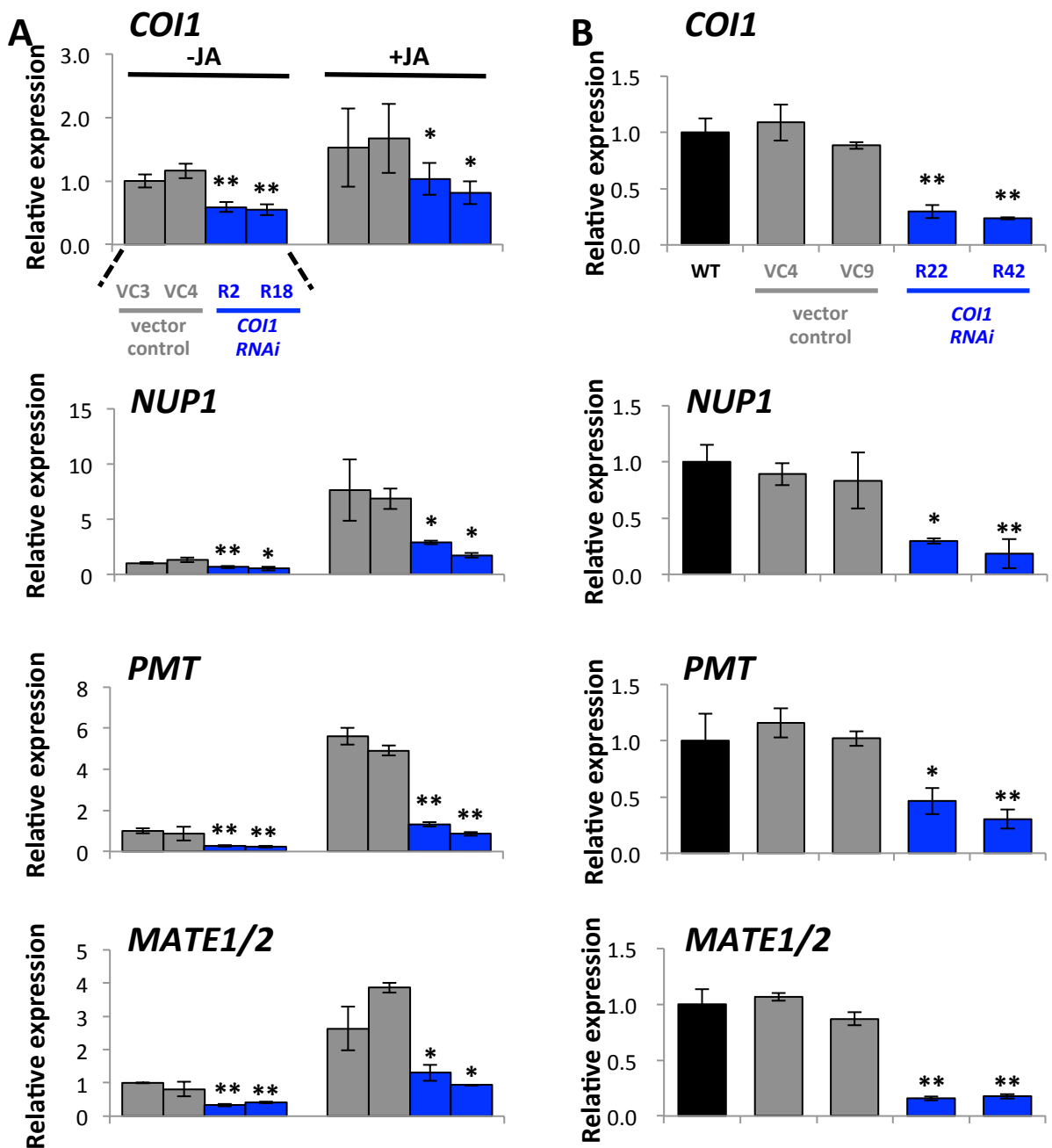


図22. *COI1*発現を抑制させたタバコ毛状根およびタバコBY-2細胞における遺伝子発現

*COI1*発現抑制毛状根へは100 μ M ジャスモン酸(+JA)またはDMSO(-JA)を添加した。*COI1*発現抑制BY-2細胞へは100 μ M ジャスモン酸を添加し、添加24時間後の遺伝子発現をqRT-PCRを用いて解析した。形質転換システムはそれぞれのベクターに対して独立した2システムを用いた。各カラムは平均値 \pm 標準誤差を示し、統計処理はStudent's t.testを各処理のVC3もしくはWTに対して行い、* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を示した。(N = 3)

A. *COI1*発現抑制毛状根における*COI1*、*NUP1*、*PMT*および*MATE1/2*の遺伝子発現

B. *COI1*発現抑制BY-2細胞における*COI1*、*NUP1*、*PMT*および*MATE1/2*の遺伝子発現

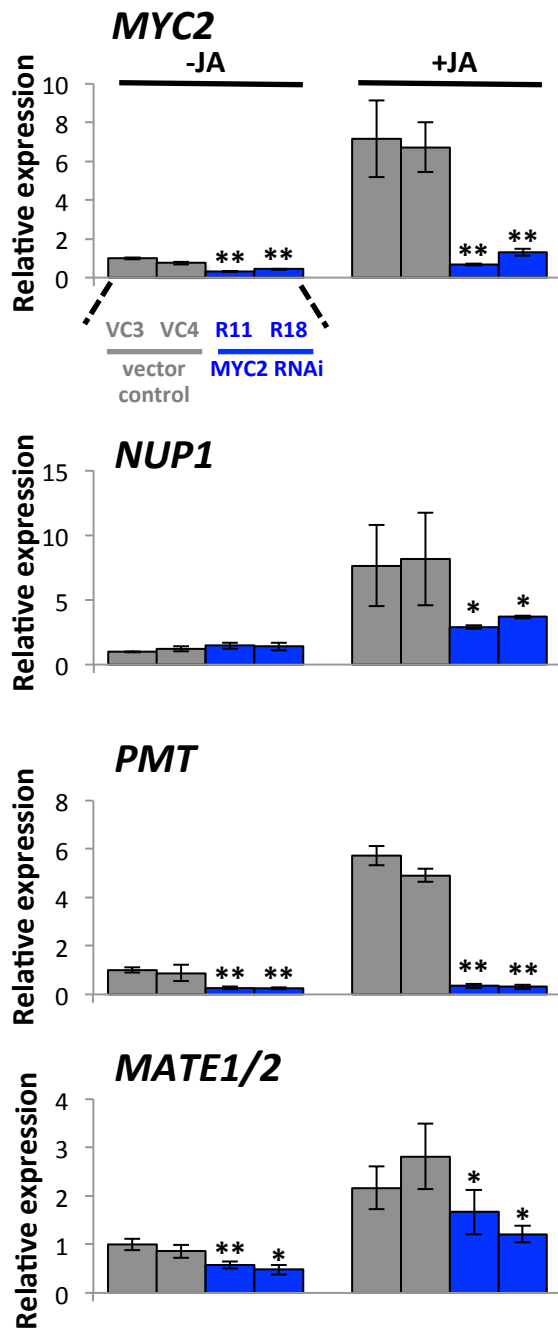


図23. MYC2発現を抑制させたタバコ毛状根における遺伝子発現

100 μM ジャスモン酸(+JA)またはDMSO(-JA)を添加し、添加24時間後の遺伝子発現をqRT-PCRを用いて解析した。形質転換系統はそれぞれのベクターに対して独立した2系統を用いた。各カラムは平均値±標準誤差を示し、統計処理はStudent's t.testを各処理のVC3に対して行い、*P<0.05、**p<0.01を示した。(N = 3)

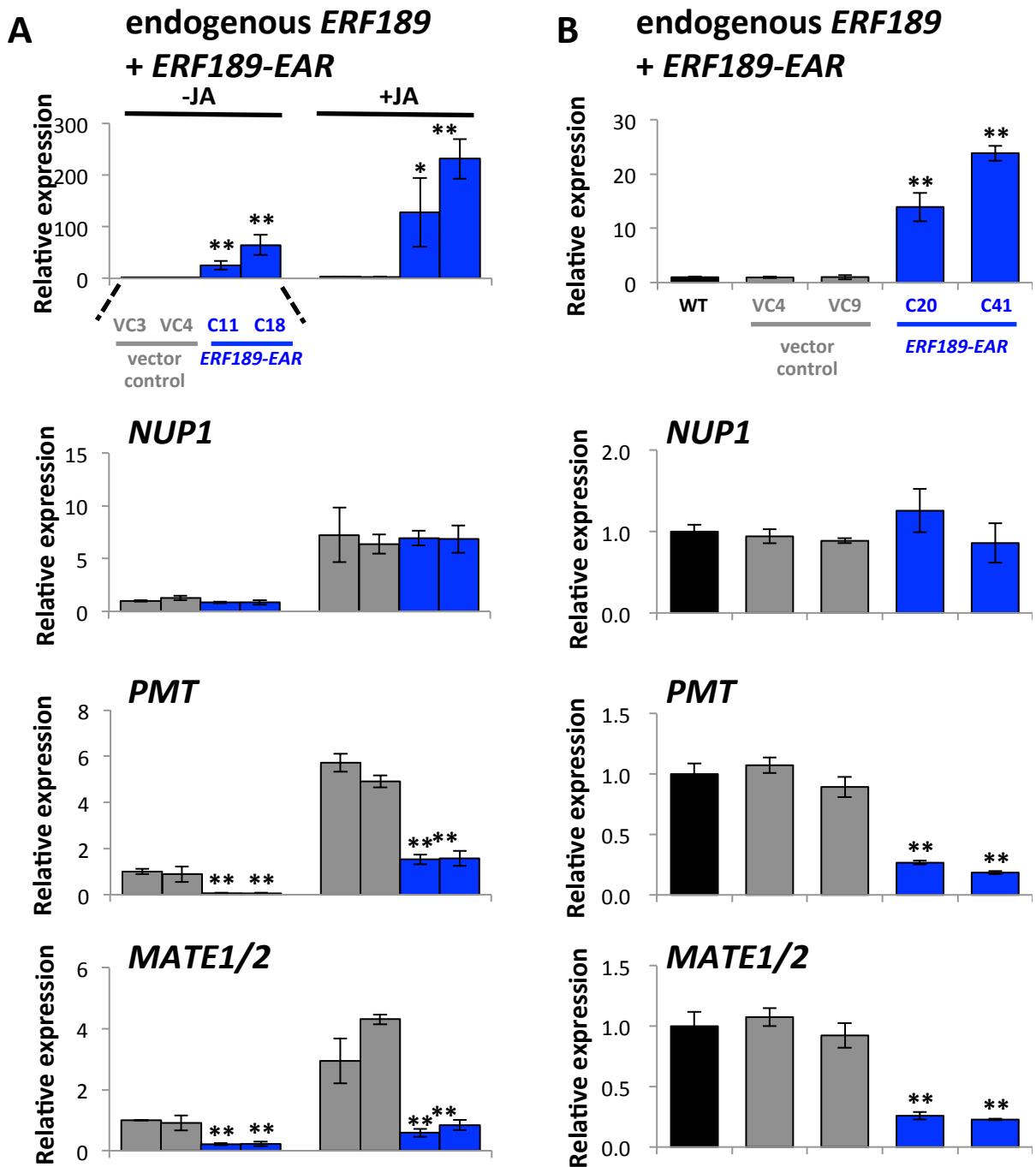


図24. *ERF189*を発現抑制させたタバコ毛状根およびタバコBY-2細胞における遺伝子発現

*ERF189*にEARリプレッションモチーフを融合させて強制発現し、内在性の*ERF189*および同じDNA結合特性をもつ*ERF189*ホモログの機能をドミナント抑制とした。毛状根へは100 μ M ジヤスモン酸(+JA)またはDMSO(-JA)を添加し、BY-2細胞へは100 μ M ジヤスモン酸を添加した。添加24時間後の遺伝子発現をqRT-PCRを用いて解析した。形質転換システムはそれぞれのベクターに対して独立した2システムを用いた。各カラムは平均値 \pm 標準誤差を示し、統計処理はStudent's t.testを各時間のVC3もしくはWTに対して行い、* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を示した。(N = 3)

A. *ERF189*ドミナント発現抑制毛状根における*ERF189*、*NUP1*、*PMT*および*MATE1/2*の遺伝子発現

B. *ERF189*ドミナント発現抑制BY-2細胞における*ERF189*、*NUP1*、*PMT*および*MATE1/2*の遺伝子発現

```

-1400 TTA A A T T T G T T C C T T C T T T T G G G A T T T T C A T C A A T A A A A T A C A G C C A C T C A T T G T T G G T T C T T G T T T T A A A A A A T A T T G T G G A G A C T C C A T G G A T A A A T A
* * * * *
-1300 C T C T A C A G A G A A G A C A C A C T A A T G A C G T A T A A A C A C G A A T A T C T C C A G A C A A T A T A G A A A G G A T T G C T T G A A A A A T T G T A C A A T G G G A C A G C T A T T G A T G
* * * * *
-1200 C T A A A T T T A A G C T G A C T C T A A G A A C G T T C A A G C A A C T A G C A G A T G C A A T T T T T A A G T C A A C T C C G A T A T T T A T G G A A A A A G A G T A A G A T C A T T G G T A C T C
* * * * *
-1100 A A A A G A A A A A A G A G A A T G C A T T A A A T T T T G A T C T G T C A A A A A G G T G A G G A G A T T T T T A T T T T A A A A T A A A A G A G A G A A G A A G C A G T G G A A A T A T
* * * * *
-1000 T T T G T A A A T A C A G A A A A T G G A T C G T T G T G C C T T C A A A A A G T C A T A G C T A T A A A A T A G A A A T A T A T C C A C G A G C T T C A C G T C A T T T T G T T A A T T A T A A A
* * * * *
-900 G A A A A G A A A G T C A A C T C C A A G T T A G G T G G A G G T G G G G A G T G G G A A T A A G A C A G A A A C C A A A G T T G T T A T T G T T C T C A T A A A T T A T T C A A T T G G C A T A A
* * * * *
-800 T A C A T G A A T A G G G C A A A T T C C A A A T T T G G G T G T G G A C A A G T A A C C A T C T C A A C T T C T A T A C T T T G T C G G T T A A C A C T T T A A C T T A T C A A A T G A T C T
* * * * *
-700 T C T A G A C A C C T T C A G A A T T T A T A T G T C A C G T T A G T G C C A T A T C A G C G T T A G T G T T A T A T A T T C A A C T T T A T A C A A G T T G A G A T G T C T A T T T G T G C A C T T
* * * * *
-600 C C A A A A T T G A A G G T A T A C T T G C C G G C T G A A G C C A A A T T T A T G G G C A T G T T A T A T A T T T G C C T G T T C A A T T C T G A C A A A G T T G G C A T A T G G C T G G C T A
* * * * *
-500 C T C A T A A T T A T T T A A G T C A A A C A A A G T T A A T T A A A C C C A C G T T T G T C C C A C A T C C T T T A A T T T A A A T C C A T A T C T T T C T C T C A G A A G T G G A A A T G C A A
* * * * *
-400 A A A T T T A C G T C A A C C A G T A G C G T G G T T A T G G C T A T T T A C G G G C A G A G G C C A T G G T T G G C A T A C T A G T T T T T C T T G A A A T T C A A C G C T T C A A T T T A A T A A
* * * * *
-300 C A A A A T T A C T C A C A A T C A T T G C T T C T T T A G C T T T G C T C T A A T A T A T T T T T A A T T T T A T A A A C T T C C C T T G T G A A A C A T A G A A A A T T A T T A A T A C T G
* * * * *
-200 C T G T A A T T A C T A T G T T G A T T C T T C A T T T A A G T T A A C T T A T T G T T T G T G T G G G G C C A C T T C T C A A T T A T A T A T A G C A G G C T A C A C T T C T C A C T T C T C A T C A
* * * * *
-100 C T G C A A C A G G T C C A A A A A T C C A A A C C T T C G G A G A A G A A A G C A T T T C A G C T T G A G T A A C A G A A T A C T C C A A T T T A A T A T C C A A A T C T C T A G A A A A C A A A T
* * * * *

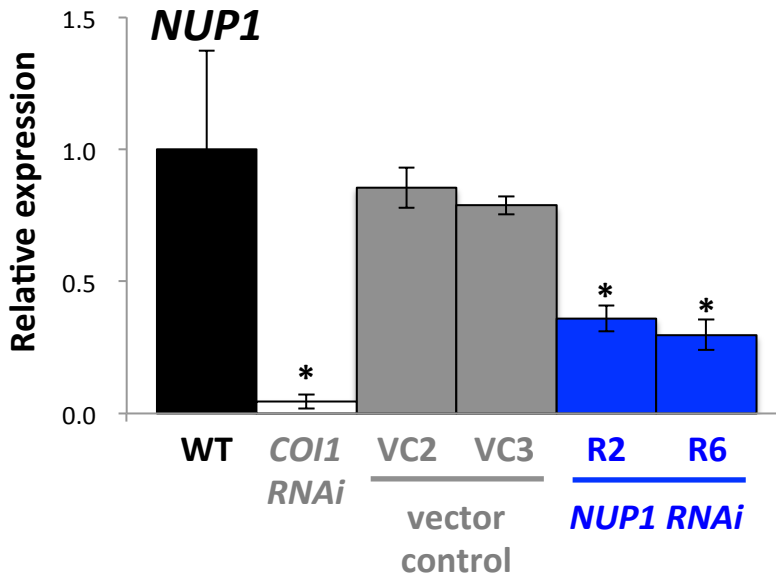
```

ATG

図25. NUP1プロモーター上のcis配列G boxおよびGCC boxの予測

MYC2転写因子結合cis配列G boxおよびERF189転写因子結合cis配列GCC boxの予測をRSATools (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>)を用いて行った。保存配列のマトリックスはShoji and Hashimoto(2011; G box)およびShoji et al. (2010; GCC box)を参考にした。青線はG box、赤線はGCC box、緑線はNUP1のCDSの翻訳開始のメチオニンを示す。

A



B

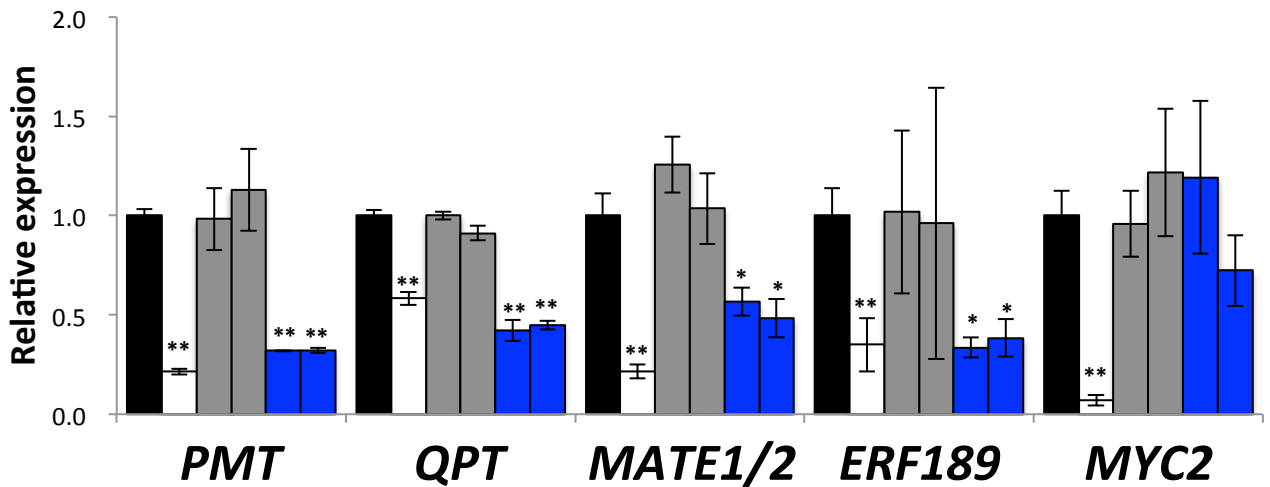


図26. *NUP1*発現抑制植物体での遺伝子発現解析

10週齢のT1世代の*NUP1*発現抑制植物体およびジャスモン酸レセプター*COI1*発現抑制植物体を用い遺伝子発現をqRT-PCRで解析を行った。形質転換系統はそれぞれのベクターに対して独立した2系統を用いた。*COI1*発現抑制系統は1系統だけを用いた。各カラムは平均値±標準誤差を示し、統計処理はStudent's t.testをWTに対して行い、* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を示した。(N = 3)

A. *NUP1*の遺伝子発現

B. ニコチン生合成遺伝子*PMT*および*QPT*、ニコチン輸送体*MATE1/2*、*NIC2*遺伝子座*ERF189*転写因子および*MYC2*転写因子の遺伝子発現

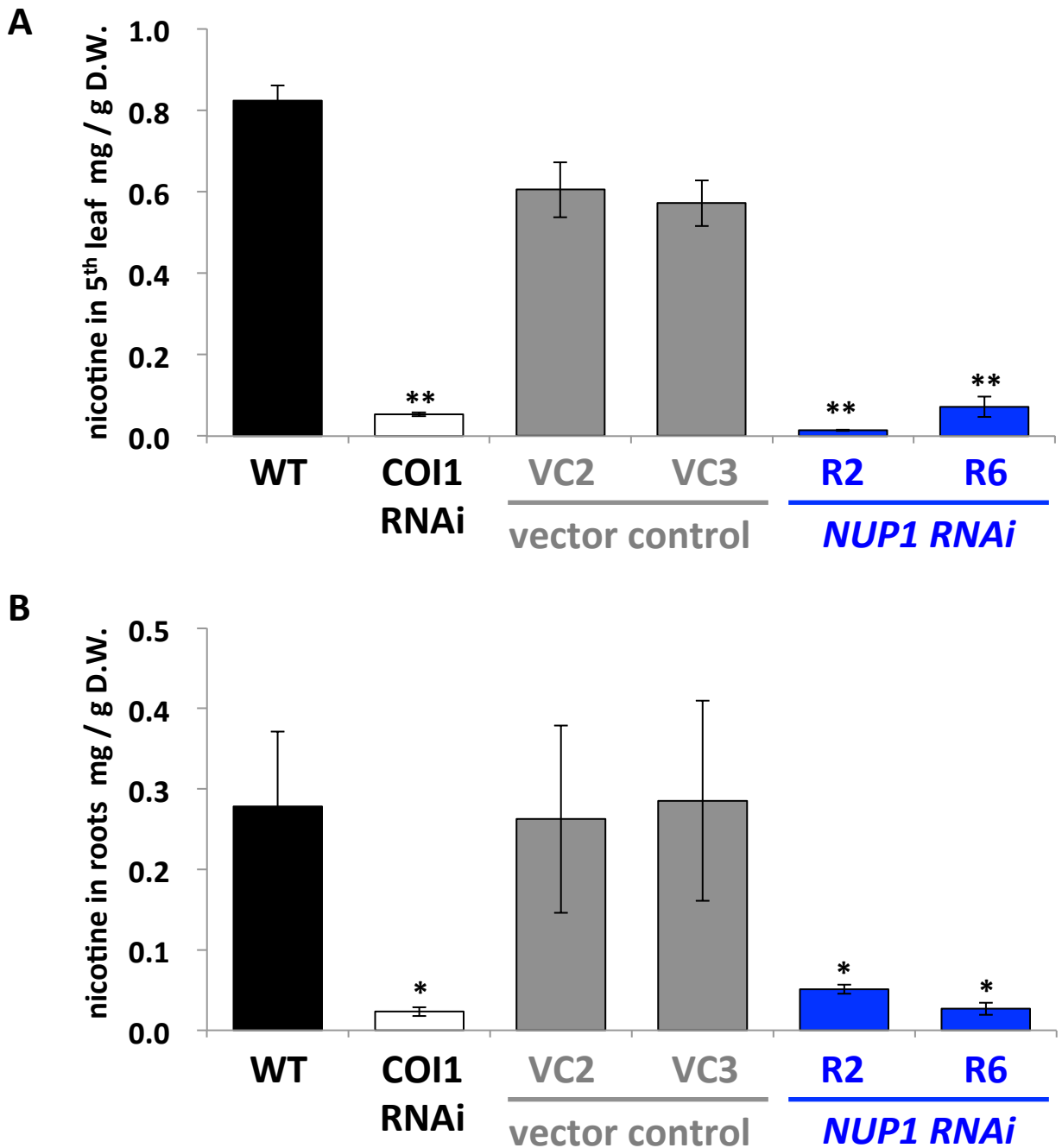
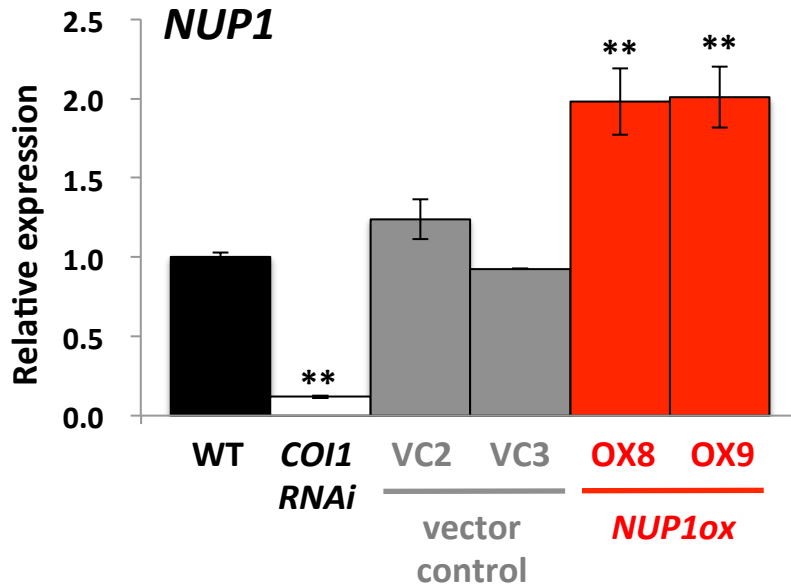


図27. *NUP1*発現抑制植物体でニコチン蓄積

10週齢のT1世代の*NUP1*発現抑制植物体およびジャスモン酸レセプター*COI1*発現抑制植物体を用い、第5展開葉および根でのニコチンの蓄積量をGLCで解析を行った。形質転換系統はそれぞれのベクターに対して独立した2系統を用いた。*COI1*発現抑制系統は1系統だけを用いた。各カラムは平均値±標準誤差を示し、統計処理はStudent's t.testをWTに対して行い、* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を示した。(N = 3)

- A. 第5展開葉でのニコチン蓄積量
- B. 根でのニコチン蓄積量

A



B

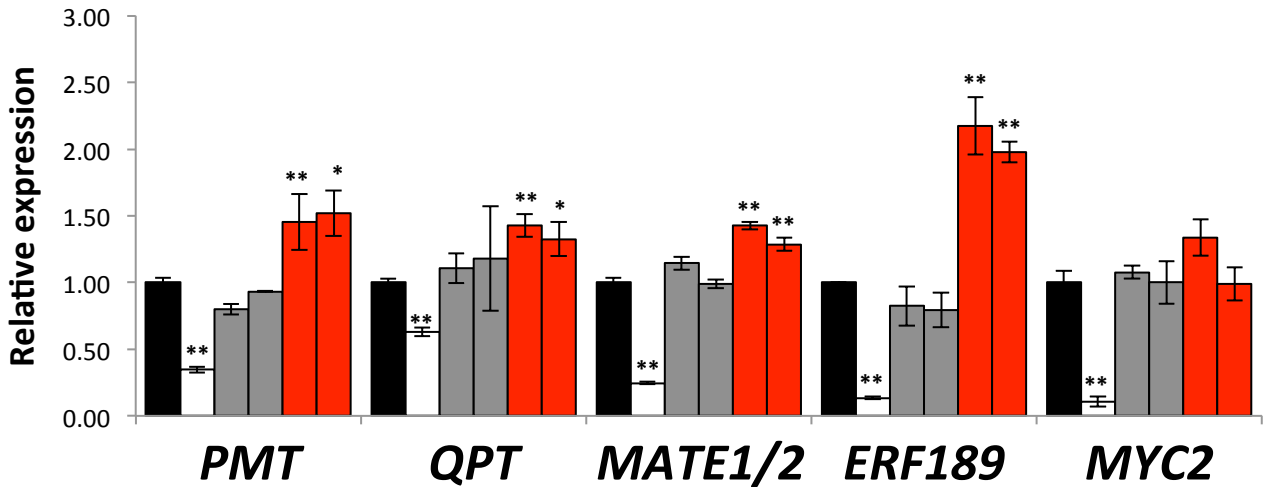


図28. *NUP1*過剰発現形質転換植物での遺伝子発現解析

8週齢のT1世代の*NUP1*過剰発現植物体およびジャスモン酸レセプター*COI1*発現抑制植物体を用い遺伝子発現をqRT-PCRで解析を行った。形質転換システムはそれぞれのベクターに対して独立した2システムを用いた。*COI1*発現抑制システムは1システムだけを用いた。各カラムは平均値±標準誤差を示し、統計処理はStudent's t.testをWTに対して行い、* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を示した。(N = 3)

A. *NUP1*の遺伝子発現

B. ニコチン合成遺伝子*PMT*および*QPT*、ニコチン輸送体*MATE1/2*および*NIC2*遺伝子座*ERF189*転写因子および*MYC2*転写因子の遺伝子発現

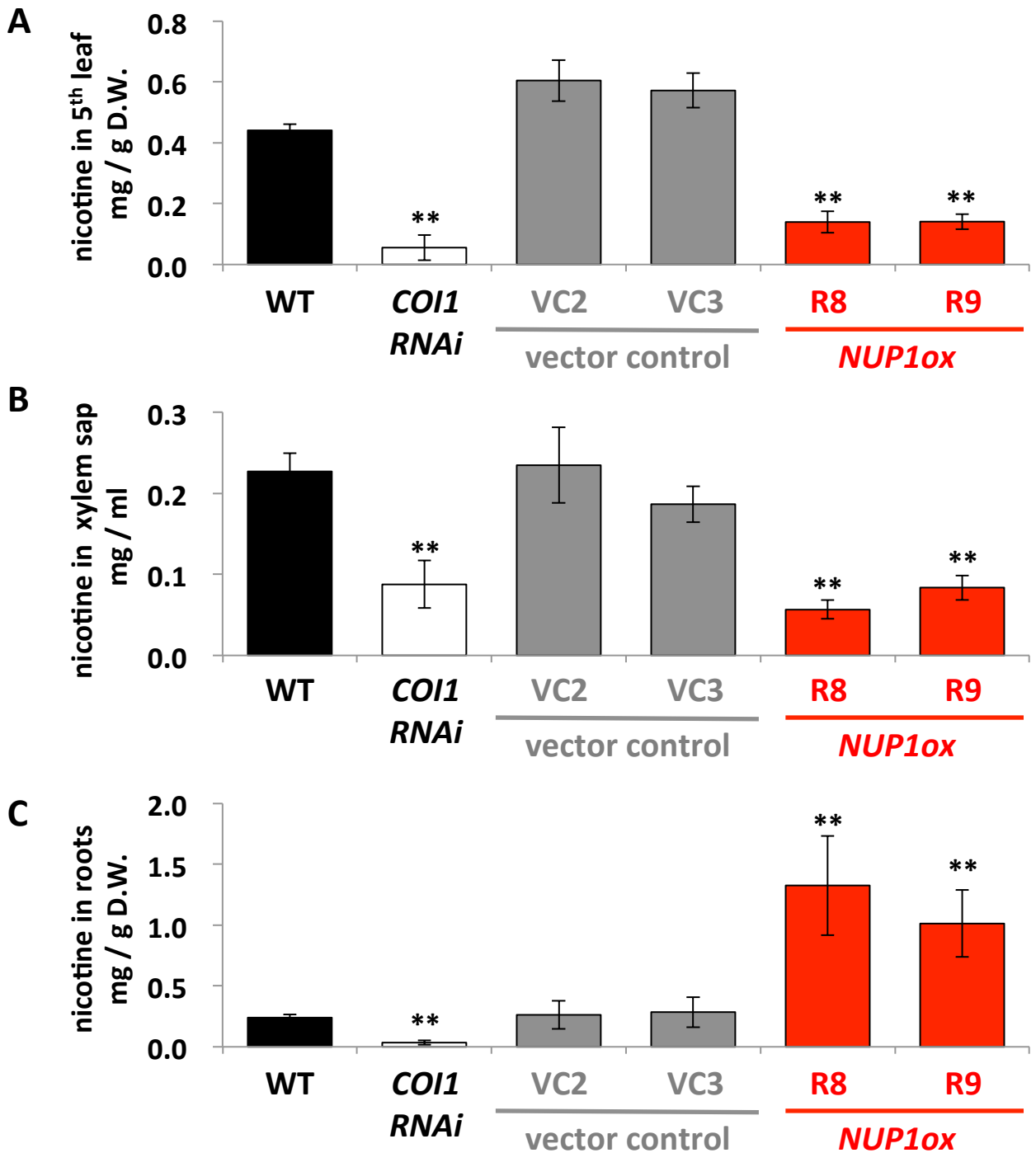


図29. *NUP1*過剰発現植物体でのニコチン蓄積

8週齢のT1世代の*NUP1*過剰発現植物体およびジャスモン酸レセプター*COI1*発現抑制植物体を用い、第5展開葉、導管液および根でのニコチンの蓄積量をGLCで解析を行った。形質転換システムはそれぞれのベクターに対して独立した2システムを用いた。*COI1*発現抑制システムは1システムだけを用いた。各カラムは平均値±標準誤差を示し、統計処理はStudent's t.testをWTに対して行い、* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を示した。(N = 3)

- A. 第5展開葉でのニコチン蓄積量
- B. 道管液でのニコチン濃度
- C. 根でのニコチン蓄積量

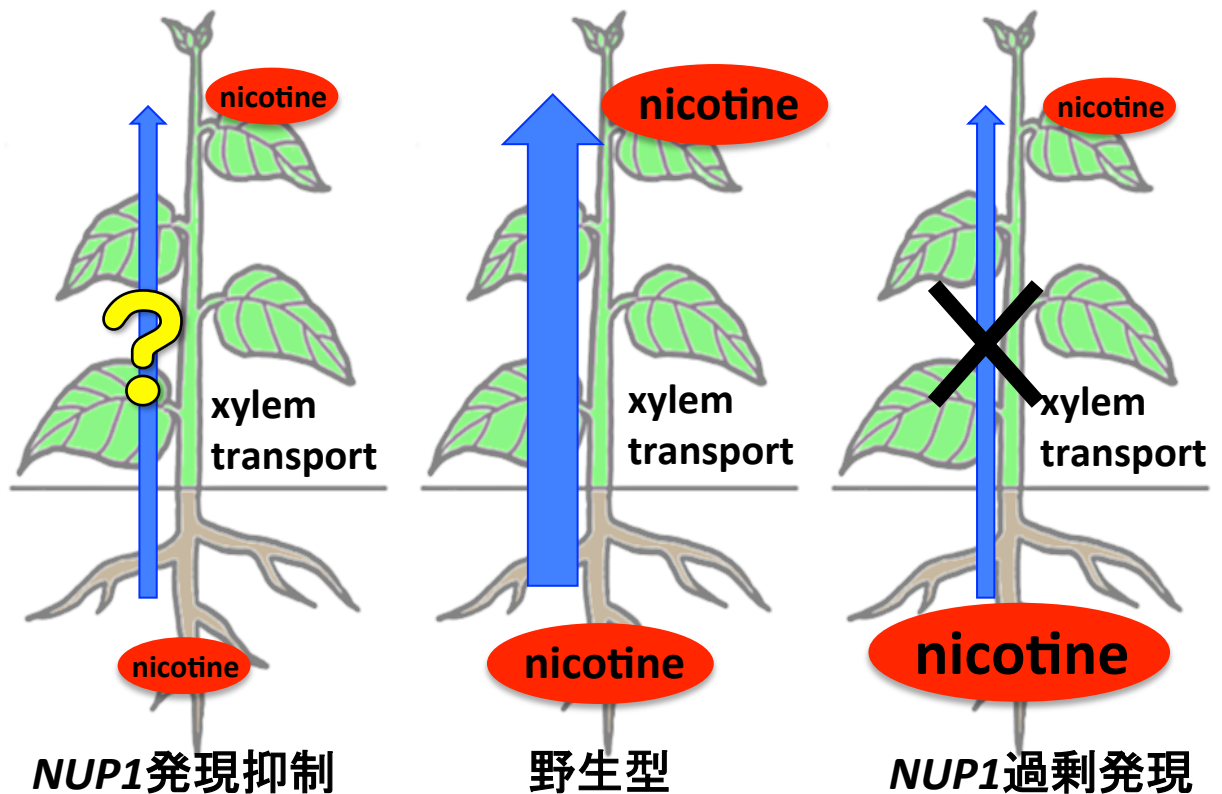


図30. *NUP1*発現抑制および過剰発現形質転換植物におけるニコチン輸送モデル

*NUP1*発現抑制形質転換植物体では、*NIC2*遺伝子座ERF型転写因子*ERF189*の発現低下を介して根におけるニコチン産生量が低下した結果、葉におけるニコチン蓄積が低下する。これに対し*NUP1*過剰発現形質転換体では、*NIC2*遺伝子座ERF型転写因子*ERF189*の発現上昇を介して根におけるニコチン産生量が増加する。しかし、根でのニコチンの導管へ取り込みが阻害されることで、根から葉への転流が阻害され、葉におけるニコチン蓄積が低下すると推察される。

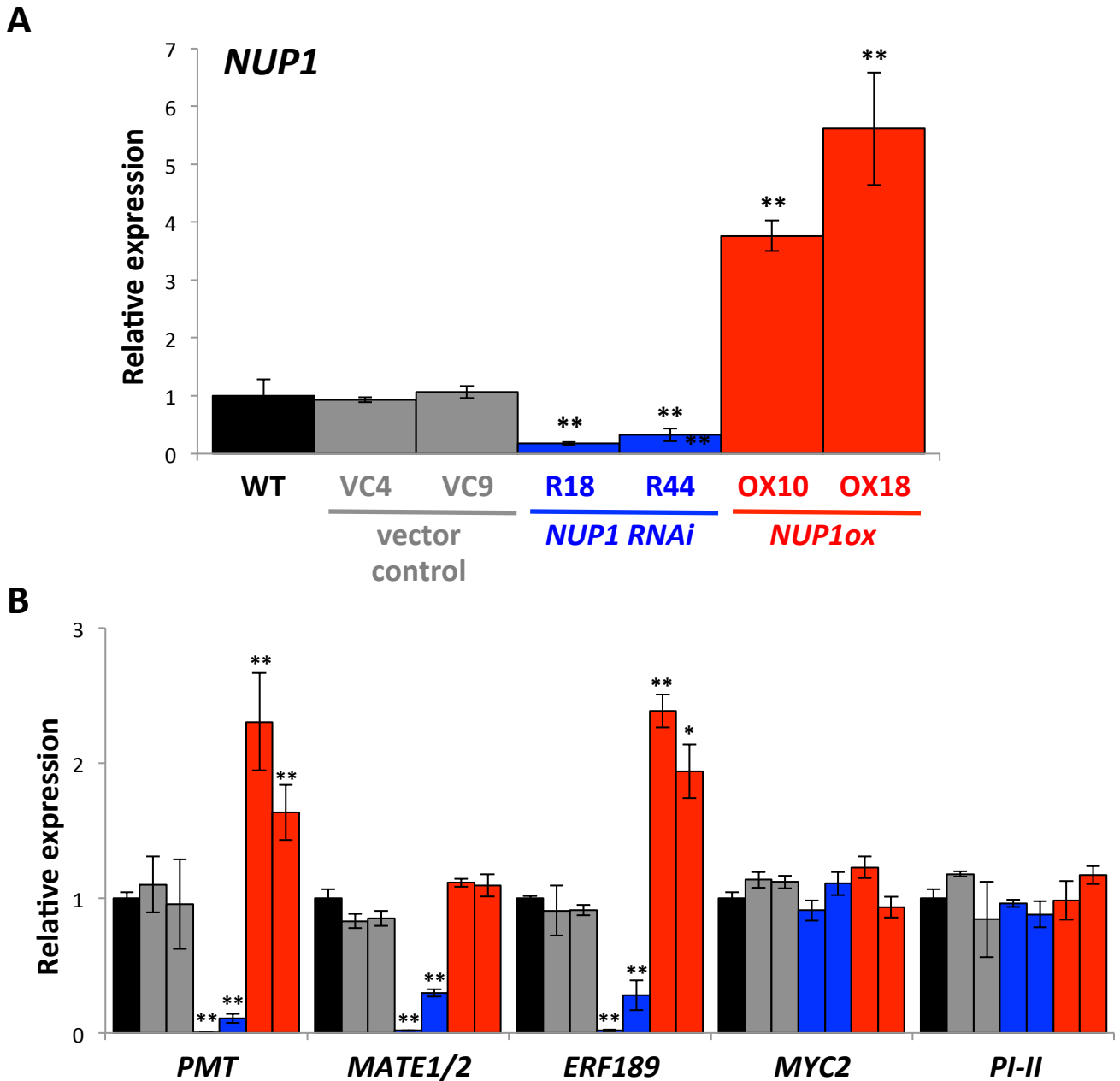


図31.ジャスモン酸処理における*NUP1*発現抑制および過剰発現BY-2細胞での遺伝子発現
 100 μ M ジャスモン酸処理後24時間の遺伝子発現をqRT-PCRで解析した。形質転換系統はそれぞれのベクターに対して独立した2系統を用いた。各カラムは平均値 \pm 標準誤差を示し、統計処理はStudent's t.testをWTに対して行い、* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を示した。(N = 3)
 A. *NUP1*の遺伝子発現
 B. ニコチン生合成遺伝子*PMT*、ニコチン輸送体*MATE1/2*、さらに*NIC2*遺伝子座*ERF189*転写因子、*MYC2*転写因子およびジャスモン酸応答性の一般的な防御遺伝子*PI-II*の発現

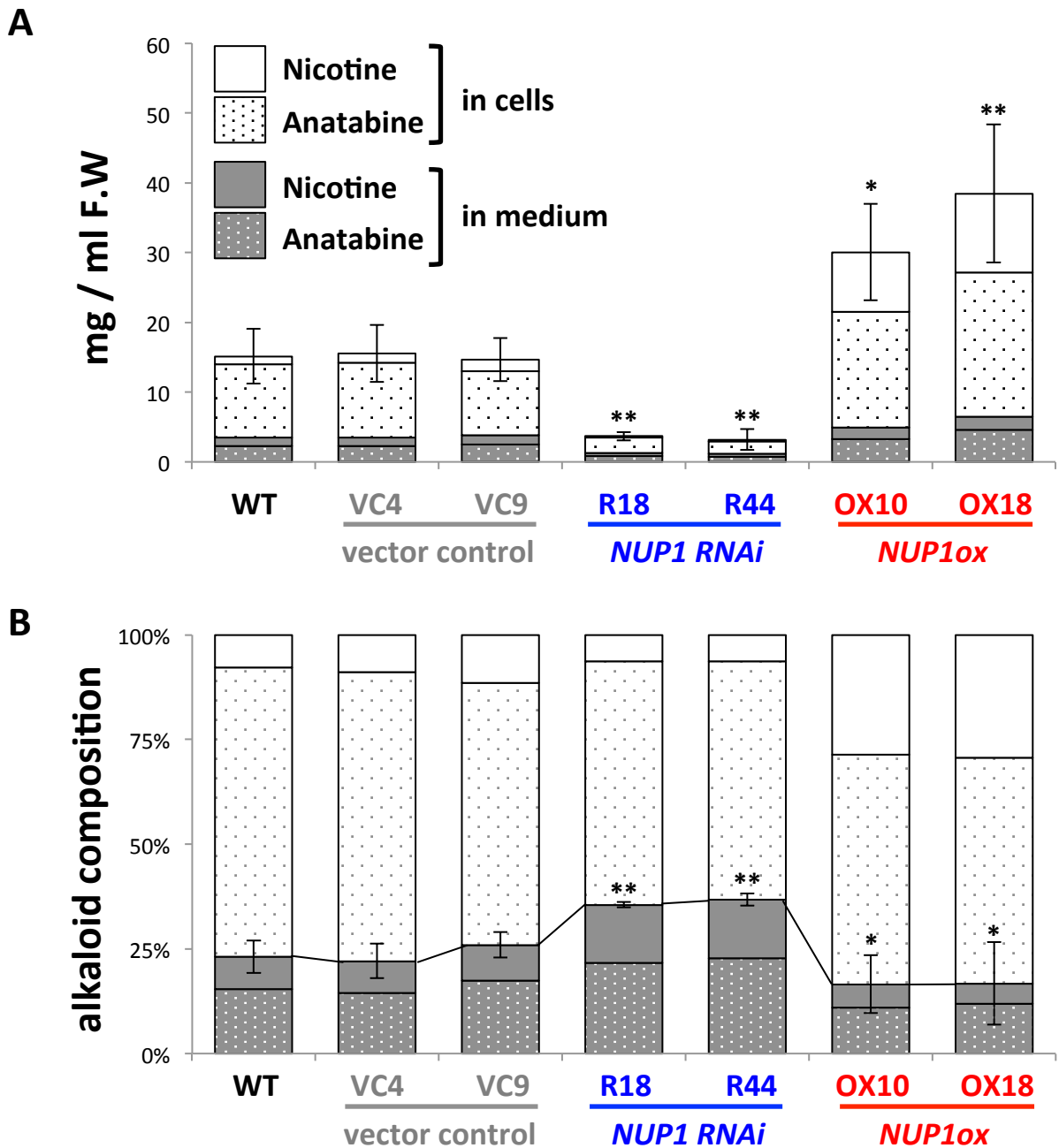


図32.ジャスモン酸処理における*NUP1*発現抑制および過剰発現BY-2細胞のアルカロイドの蓄積および細胞内外の分布

ジャスモン酸処理72時間行ったサンプルからニコチンおよびアナタビンの蓄積量を細胞および培地それぞれをGLCで解析した。形質転換システムはそれぞれのベクターに対して独立した2システムを用いた。各カラムは平均値±標準誤差を示し、統計処理はStudent's t.testをWTに対して行い、* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を示した。(N = 3)

A. ニコチンおよびアナタビンの蓄積量。

B. ニコチンおよびアナタビンの細胞内外の分布。各ラインの蓄積総量を100%としたときの比率を示した。

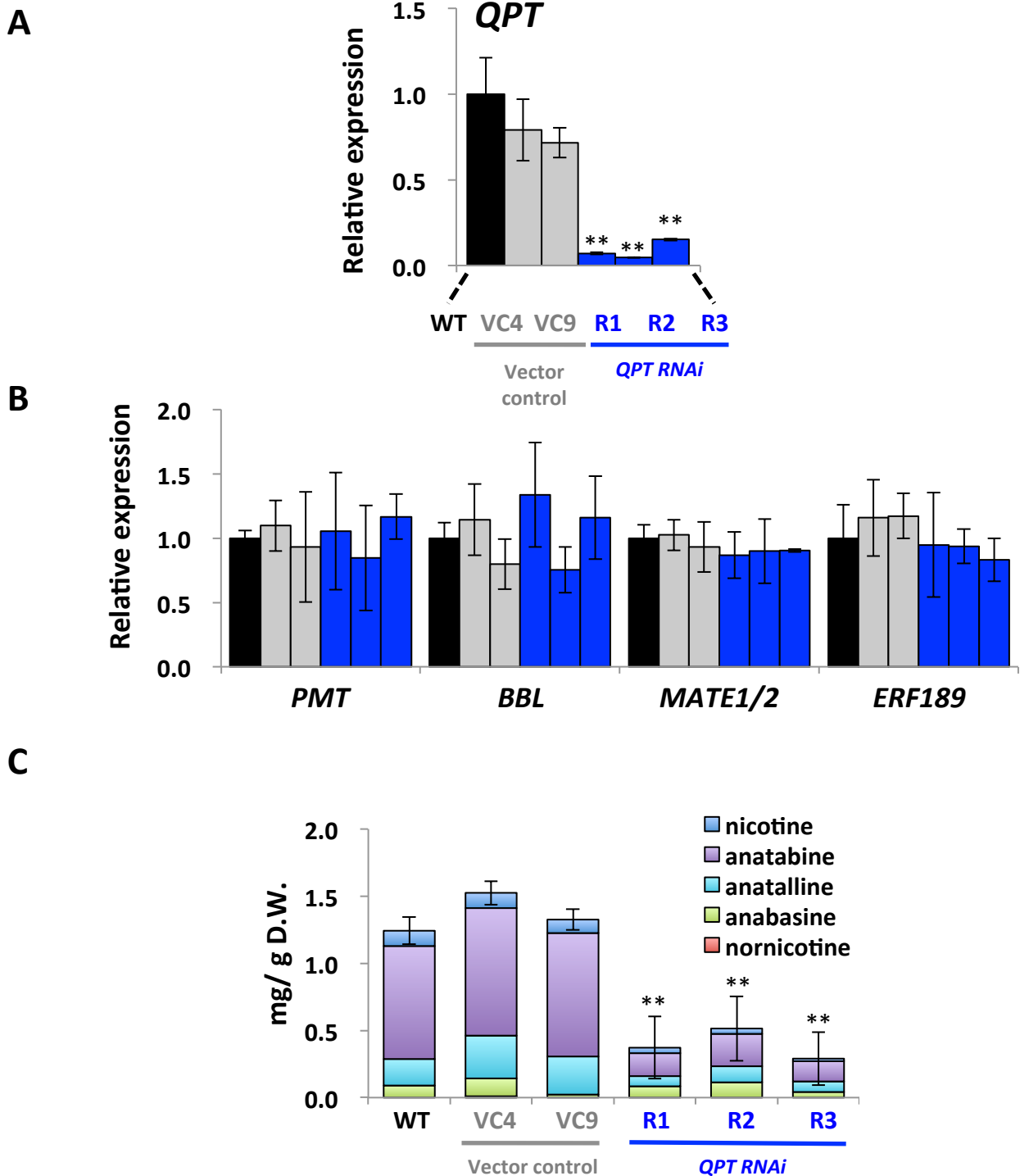


図33 QPT発現抑制BY-2細胞における遺伝子発現およびアルカロイド蓄積量

ジャスモン酸処理24時間後のニコチン合成酵素QPT, PMTおよびBBL, ニコチン輸送体MATE1/2, NIC2遺伝子座ERF189転写因子をqRT-PCRで解析し、各カラムは平均値±標準誤差で示した。さらにジャスモン酸処理72時間後のアルカロイド蓄積量をGLCで解析し、蓄積した総量の平均値±標準誤差を示した。統計処理はStudent's T.TESTをWTに対して行い、* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を示した。(N = 3)

A. QPTの遺伝子発現

B. PMT, BBL, MATE1/2およびERF189の遺伝子発現

C. アルカロイドの蓄積量

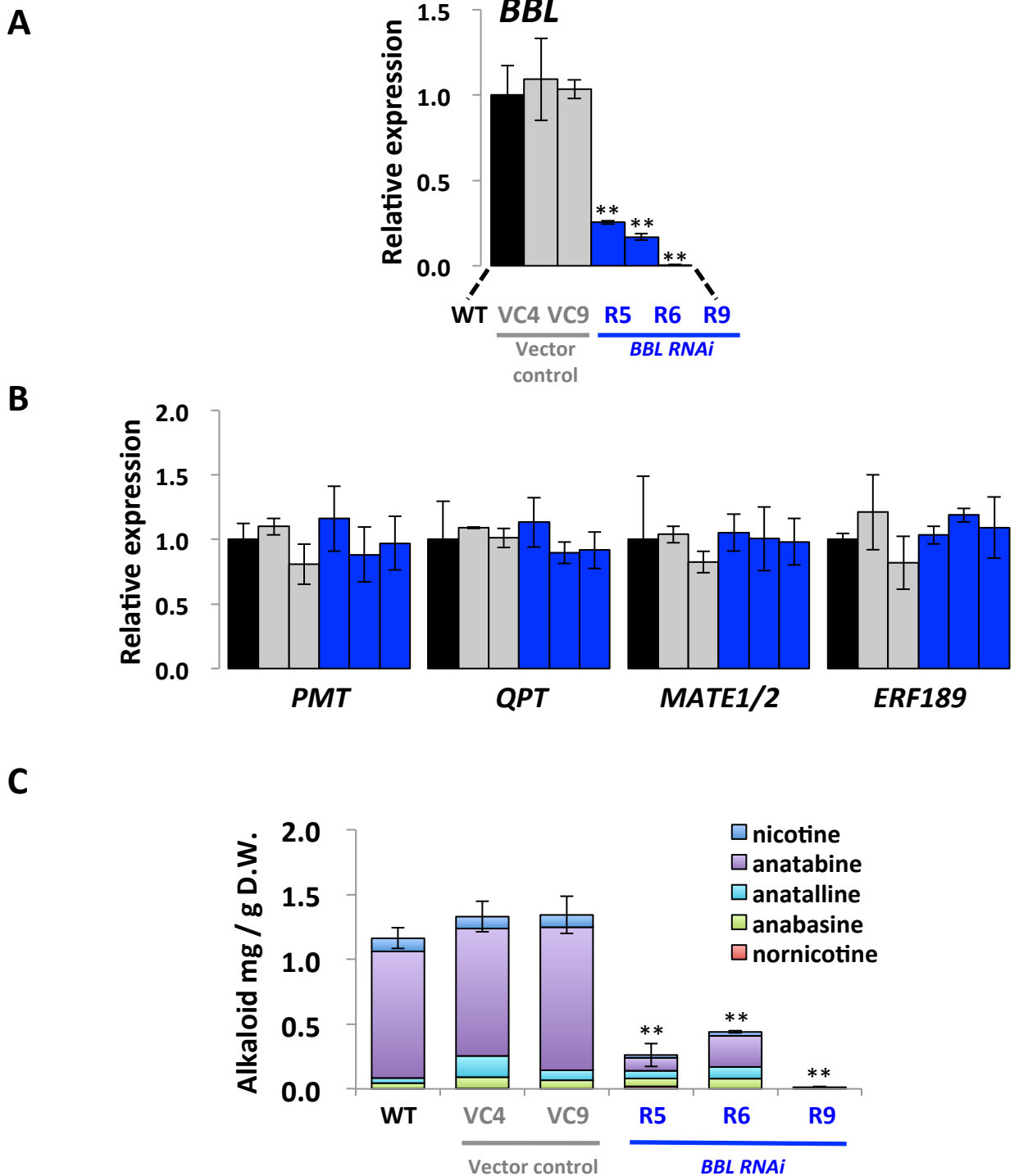


図34. *BBL*発現抑制BY-2細胞における遺伝子発現およびアルカロイド蓄積量

ジャスモン酸処理24時間後のニコチン合成酵素*BBL*, *PMT*および*QPT*, ニコチン輸送体*MATE1/2*, *NIC2*遺伝子座*ERF189*転写因子をqRT-PCRで解析し、平均値±標準誤差で示した。さらにジャスモン酸処理72時間後のアルカロイド蓄積量をGLCで解析し、蓄積した総量の平均値±標準誤差を示した。統計処理はStudent's T.TESTをWTに対して行い、* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を示した。(N = 3)

A. *BBL*の遺伝子発現

B. *PMT*, *QPT*, *MATE1/2*および*ERF189*の遺伝子発現

C. ピリジナルカロイドの蓄積量

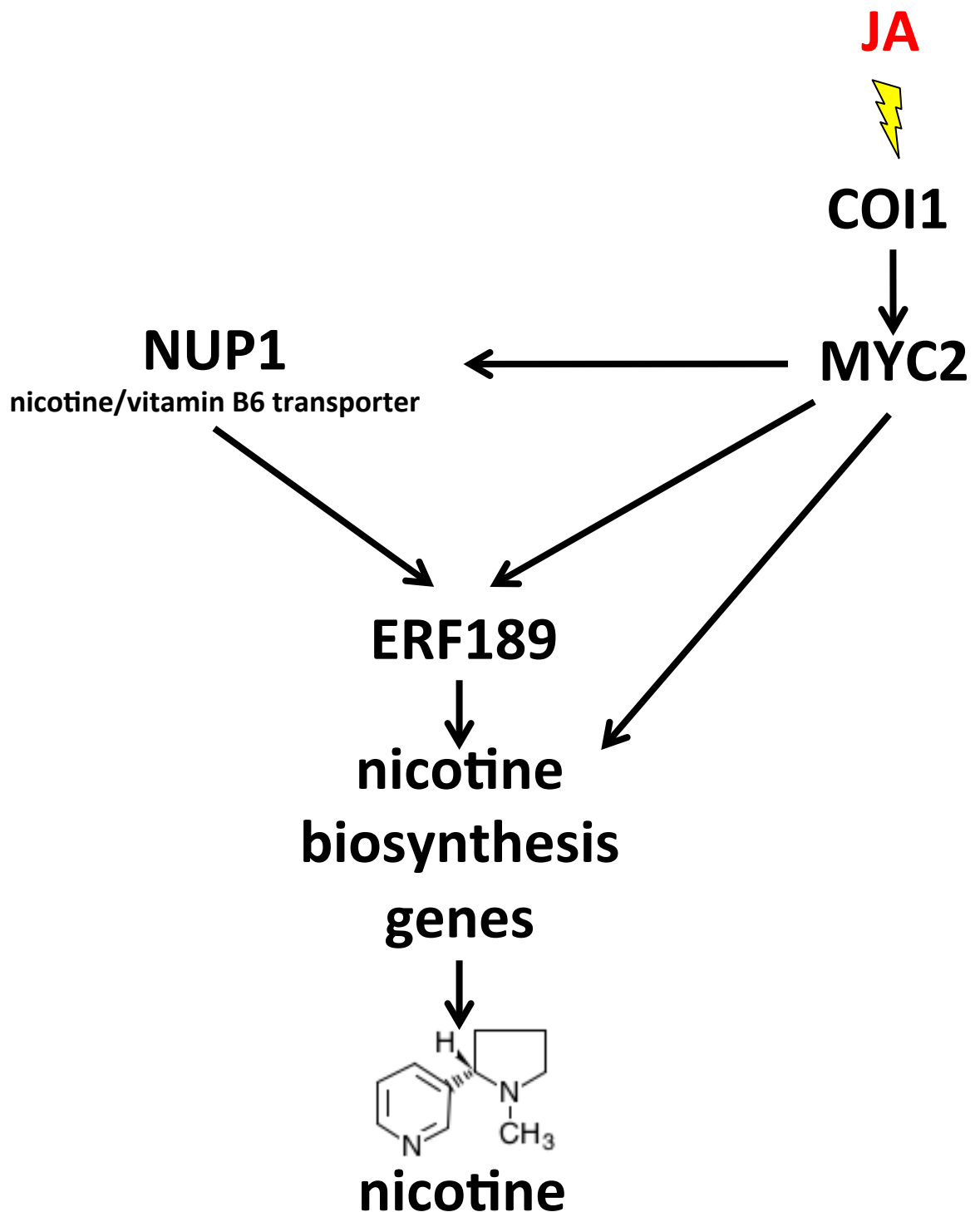


図35. *NUP1*発現抑制および過剰発現BY-2細胞におけるジャスモン酸シグナル経路

ジャスモン酸によってCOI1-JAZ-MYC2経路を介し、活性化したMYC2がニコチン生合成酵素遺伝子群を活性化させる。またMYC2が*NIC2*遺伝子座ERF型転写因子*ERF189*遺伝子の発現を誘導する。活性化した*NIC2*遺伝子座ERF189転写因子がMYC2と協調的に機能することでニコチン生合成遺伝子を活性化させ、ニコチン生合成を引き起こす。さらにMYC2が*NUP1*の発現を誘導することで*NIC2*遺伝子座ERF189転写因子の発現を誘導する。つまりMYC2→*NUP1*の経路によって*NIC2*遺伝子座ERF189転写因子の発現を制御していると示唆される。

考察

NUP1/PUP 型輸送体は植物に特異的な Drug and Metabolite transporter (DMT) 2. A 7. 14 family に属している (Jelesko, 2012)。シロイヌナズナ PUP で細胞内局在が解析されたのは PUP1 のみで細胞膜局在型である (Cedzich, 2008)。組織発現解析では PUP1 は葉脈の末端の排水組織、PUP2 は師管、PUP3 は葯および花粉で発現している (Burkle et al., 2003)。また *PUP1* の null 変異体では顕著な表現型を示していないので、*PUP1* の生物的な役割は明らかではない (Szydlowski et al. 2013)。

第 1 章の結果および細胞内局在解析(図 20)結果から、タバコ NUP1 は細胞膜局在型輸送体でニコチンを含むアルカロイドやビタミン B6 を輸送基質とすることが明らかになった。第 2 章では NUP1 の *in vivo* での機能に着目し解析を行った。タバコ NUP1 の機能解析は Hildreth et al. (2011) によって、細胞膜局在型であり根端で強く発現しているニコチン特異的なトランスポーターと報告された。さらに興味深いことに *NUP1* 発現抑制毛状根ではニコチン生合成遺伝子の発現が低下し、ニコチン蓄積が減少していた。さらに根の生育が早くなると報告されている。

NUP1 の発現パターンの解析の結果、*NUP1* の発現は *NIC* 遺伝子座依存性 (図 17)、根で高発現 (図 18) およびジャスモン酸誘導性 (図 19) であり、既知のニコチン生合成酵素遺伝子 *PMT* および輸送体遺伝子 *MATE1/2* と非常に類似した発現様式を示した。またニコチン生合成酵素遺伝子および輸送体遺伝子は *NIC2* 遺伝子座 ERF189 転写因子に正の制御を受けている (Shoji, et al., 2010)。そのため *NUP1* も *NIC2* 遺伝子座 ERF189 転写因子による制御を受けていると推測されたが、ERF189 機能抑制変異体における *NUP1* の発現解析から、*NUP1* の発現は *NIC2* 遺伝子座 ERF 型転写因子依存的ではないことが明らかになった (図 24)。そこで *NIC2* 遺伝子座 ERF 型転写因子の上流に位置するジャスモン酸レセプターの COI1 および MYC2 転写因子の発現抑制変異体において *NUP1* の発現は抑制されていた (図 22 および 23)。*NUP1* はジャスモン酸誘導性遺伝子であるため COI1-JAZ-MYC2 から構成される植物に共通するジャスモン酸シグナル経路に直接制御されていることが明らかになった。これまで COI1-JAZ-MYC2 ジャスモン酸シグナル経路に直接制御される遺伝子は、植物に一般的な傷害応答遺伝子の *PI-2* (Baladin et al., 1995) および *PR-1b* (Eyal et al., 1992) などが知られている。

NUP1 はニコチン/ビタミン B6 を輸送体として機能するとともに、ジャスモン酸シグナル経路 MYC2 転写因子依存的に制御され、さらに *ERF189* 転写因子を制御する機能を担っていることが示唆される。またタバコ植物ではニコチン生合成遺伝子のプロモーター上の *cis* 配列には MYC2 の結合サイト G BOX が存在し、ニコチン生合成遺伝子群は MYC2 に直接制御されている (Shoji and Hashimoto, 2011)。NUP1 プロモーター配列 1.4kb に対して、G box および *NIC2* 遺伝子座 *ERF189* 転写因子の結合サイト GCC box の予測検索 (RSA tools; <http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>)を行ったところ(図 25)、*NUP1* プロモーターの転写開始点より上流 400bp の範囲に G box および GCC box が存在したため、NUP1 は MYC2 転写因子依存的に制御されているのはもちろんのこと、*NIC2* 遺伝子座 *ERF189* 転写因子依存的に制御されている可能性が考えられるが、本研究からは *NIC2* 遺伝子座 *ERF189* 転写因子依存的ではないと結論づける。NUP1 はジャスモン酸シグナル経路の MYC2 転写因子依存的に制御されていることから、タバコ植物特異的に機能している輸送体とは考えにくく、タバコ以外の植物においても COI1-JAZ-MYC2 ジャスモン酸シグナル経路に制御される *NUP1* 相同遺伝子を介した何らかの制御があると考えられる。

NUP1 過剰発現植物体を用いた解析から、根ではニコチン蓄積量が上昇し(図 29. C)、葉ではニコチン含量が減少(図 29. A)、さら道管液のニコチン濃度が減少していた(図 29. B)ことから、*NUP1* は根の道管へのニコチン取り込みに寄与していることが推察される。タバコ *N.sylvestris* における PMT タンパクの根での組織発現は皮層の最外層であることからニコチン生合成は根の皮層で行われている (Shoji et al., 2000)。しかし *NUP1* は根の表皮で特に強く発現している (図 21)。*NUP1* のタバコアルカロイドを細胞内に輸送する活性から、*NUP1* 過剰発現植物体の根において皮層で生合成されたニコチンは根のアポプラストに排出されるが、再度表皮の細胞内に輸送されたために道管へのローディングが阻害され、結果的に葉にニコチンが蓄積されなくなると推察される。これまでにタバコ植物では根の液胞膜局在型 *MATE1/2* および葉の液胞膜局在型 *JAT1* が報告されている (Shoji et al., 2009, Morita et al., 2009)。いずれも *MATE* ファミリーに属し、 H^+ 対向輸送を駆動力としてニコチン輸送を行っている。*MATE1/2* 発現抑制形質転換植物では根から葉へのニコチンの組織間輸送には寄与しておらず、根の細胞質から液胞内の細胞内輸送のみを行っている (Shoji et al., 2009)。*JAT1* では根から葉への組織間輸送に関わる報告はない。*NUP1* 過剰発現植物体の結果から

NUP1 はニコチンの根から葉への組織間輸送に関わる輸送体であると強く示唆する(図 30)。NUP1 発現抑制植物体の解析では、ニコチン生合成全体が抑制されていたため、道管輸送に関する解析は行っていない。そのため組織間輸送に関しては不明である。NUP1 依存的に NIC2 遺伝子座 ERF189 転写因子の発現を介して生合成されるニコチンの総量が増加することから、NUP1 の発現が高すぎても、低すぎても葉に蓄積されるニコチンが減少する。これはジャスモン酸シグナルによってニコチン生合成が誘導され、葉に蓄積する機構と矛盾するが、現段階では説明することができない。

BY-2 細胞を用いてニコチンの蓄積を解析したところ、NUP1 を発現抑制または過剰発現させたタバコ培養細胞では、NUP1 はタバコアルカロイドを細胞内に輸送する活性(図 32. B)に加えて、アルカロイド生合成量を調節する働きがあることを明らかにした(図 32, A)。さらにニコチン生合成遺伝子群の発現解析により NUP1 依存的に NIC2 遺伝子座 ERF の発現を制御することで下流のニコチン生合成遺伝子群を転写レベルで制御していることを発見した(図 31. B)。このように輸送体が転写因子を制御する例はシロイヌナズナで報告されている。シロイヌナズナ triose phosphate/phosphate translocator (TPT)輸送体依存的に MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE6 (MPK6)が活性化し、ERF 型転写因子を発現誘導させる(Vogel et al., 2014)。NUP1 の機能として何らかの下流因子を介し間接的に NIC2 遺伝子座 ERF189 転写因子の発現を制御している可能性(第 3 章で述べる)、もしくは NUP1 の輸送している化合物が NIC2 遺伝子座 ERF189 転写因子の発現に影響を与えている可能性が示唆される。

NUP1 の発現量に相関してニコチン蓄積量が増加する。これは NIC2 遺伝子座 ERF189 転写因子の発現制御を介していることが明らかになった。また、ニコチン生合成酵素 QPT および BBL の発現抑制によるニコチン蓄積量の減少はニコチン代謝経路の一部の阻害によって引き起こされ、NIC2 遺伝子座 ERF189 転写因子の発現には影響していない。つまり生合成されたアルカロイドによる NIC2 遺伝子座 ERF189 転写因子の発現への制御はないと示唆される。NUP1、QPT や BBL の発現抑制ではアルカロイド蓄積量の減少という同一の表現型を示すが、原因が異なる。NUP1 の発現変化に起因する遺伝子発現および表現型の原因へは他の因子に関わる可能性が強く示唆されるため、第 3 章で解析を行う。

本研究から、NUP1 には 2 つの独立した機能があると示すことができた。1 つ目は細胞膜局在型輸送体でアポプラストから細胞内へとニコチンを含むアルカ

ロイドおよびビタミン B6 を輸送する広範囲な輸送基質特異性を持ち (図 16)、さらにそれらを根から葉への長距離輸送する(図 30)。2 つ目は *NUPI* の発現量に比例してニコチン生合成総量を調節する働きがあることを明らかにした。さらに、ジャスモン酸シグナル伝達系因子の発現解析により、*NUPI* は *MYC2* 転写因子依存的に発現制御される。またニコチン生合成特異的 *NIC2* 遺伝子座 *ERF189* 転写因子の発現制御を介してニコチン生合成量に影響を与える(図 35)。

第3章 オーキシシン輸送体 PILS を介したニコチン生合成における ジャスモン酸とオーキシシンのクロストーク

材料と方法

マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析には NASC The European Arabidopsis Stock Center (<http://arabidopsis.info>) の Affy Gene Chip Service の Tobacco Array (NASC ID: N782243) を利用した。用いた解析サンプルはタバコ BY-2 細胞の vector control (VC4 および VC9 の 2 ライン) および RNAi による *NUP1* 発現抑制株 (R18 および R44) を用いた。解析には以下のクライテリアを用い、*NUP1* 発現抑制株で発現低下および発現上昇している遺伝子をリストアップした。アウトラインは図 36 に示した。さらに遺伝子発現および有意差検定で有意に変化していた遺伝子の中から、アノテーションできたもの、または全長のアミノ酸配列が得られたものの中からニコチン生合成遺伝子を除く最も発現低下している 10 遺伝子、最も発現上昇している 5 遺伝子を選択した。

1. 遺伝子発現 = $((R18 / VC4) + (R44 / VC4) + (R18 / VC4) + (R44 / VC9)) / 4$
NUP1 発現抑制株で低下していた遺伝子 ; 遺伝子発現 < 0.7
NUP1 発現抑制株で上昇していた遺伝子 ; 遺伝子発現 > 1.4
2. 有意差検定 ; Student't 検定の p value < 0.05

qRT-PCR による遺伝子発現解析

第 1 章の材料と方法と同様である。使用したプライマーセット supplement 表 8 に示す。

系統樹解析

シロイヌナズナ PILS1-7 の配列をクエリーとして用い Sol Genomics Network (<http://solgenomics.net>) 内のタバコおよびトマトのデータベースを検索し、タバコおよびトマト PILS の配列を取得した。その中から全長 CDS 配列が得られたものだけを用いて系統樹を作成した。用いた遺伝子配列を supplement 表 9 に示す。

植物材料

遺伝子クローニングには *N. tabacum* cv. Burley 21 を用いた。タバコ植物の生育条件、培養細胞に関しては第 1 章の材料と方法と同様に行った。

形質転換

BY-2 細胞への形質転換は第 1 章の材料と方法と同様に行った。

植物ホルモン処理

BY-2 細胞に対する植物ホルモン処理は、ジャスモン酸処理としてメチルジャスモン酸を最終濃度 100 μ M、オーキシニン処理として 2,4-D を最終濃度 90 μ M 添加した。培養条件は第 1 章と同様に行った。

PILS1-GFP および PILS7-GFP 融合タンパク質の細胞内局在解析

PILS1 および PILS7 タンパク質の細胞内局在性を解析するために、タマネギ表皮細胞にボンバードメント法を用いた一過的発現系で解析を行った。CaMV35S プロモーター制御下で PILS1-tagRFP 融合タンパク質を一過的に発現する vector を以下の手順で作成した。PILS1 の ORF 配列に Gateway BP cloning 組み替え配列付加した cDNA 断片を増幅した後、Gateway adapter プライマーによってさらに増幅した。増幅した DNA 断片は、pDONR / Zeo に BP 反応によってクローニング後、シーケンスを確認した。この pDONR / Zeo / NUP1 を LR 反応によって一過的過剰発現用ベクター pUGW5 にクローニングし、pUGW5 / PILS1 を作成した。同様の方法で PILS7 をクローニングし、pUGW5 / PILS7 とした。さらに ER マーカーである TdTomato-ER とともにボンバードメントを行い細胞内局在を解析した。ボンバードメントの方法および顕微鏡の条件は第 1 章と同様に行った。クローニングに用いたプライマーは supplement 表 10 に示す。

PILS1、PILS5 および PILS7 発現抑制タバコ BY-2 の作出

PILS1 発現抑制株を得るために、CaMV35S プロモーター制御下で恒常的 RNAi による発現抑制を起こすための vector を以下の手順で作成した。PILS1 の ORF の部分配列(+1 - +600)に異なる 4 種類の制限酵素サイトを付加した 2 種類の cDNA 断片を増幅し、pGEM-T に TA クローニングした。これら cDNA 断片を植物 RNAi 用 vector である改良 pHANNIBAL にそれぞれの制限酵素ペア領域にセンス鎖として *Bam*HI および *Cl*aI、アンチセンス鎖として *Kpn*I および *Sac*I で処

理した cDNA 断片を挿入し *RNAi* カセットを改良 pHANNIBAL 上に作成した。pHANNIBAL に作成した *RNAi* カセットからセンス鎖、pdk intron、アンチセンス鎖を含む領域を *Bam*HI と *Sac*I で処理後、あらかじめ *Bam*HI と *Sac*I で処理し GUS 遺伝子を除去した pBI121 へ挿入し pBI121/PILS1 *RNAi* binary vector を作成した。

PILS5 および 7 発現抑制体を得るために、エストラジオール誘導プロモーター制御下で恒常的 *RNAi* を起こすための vector を以下の手順で作成した。PILS5 および 7 で類似している PILS7 の ORF の部分配列(+178 - +489)に異なる 4 種類の制限酵素サイトを付加した 2 種類の cDNA 断片を増幅し、pGEM-T に TA クローニングした。これら cDNA 断片を植物 *RNAi* 用 vector である改良 pHANNIBAL 改良したのそれぞれの制限酵素ペア領域にセンス鎖として *Xho*I および *Cla*I、アンチセンス鎖として *Kpn*I および *Spe*I で処理した cDNA 断片を挿入し *RNAi* カセットを改良 pHANNIBAL 上に作成した。作成した *RNAi* カセットからセンス鎖、pdk intron、アンチセンス鎖を含む領域を *Xho*I と *Spe*I で処理後、あらかじめ *Xho*I と *Xba*I で処理した pER8 へ挿入し pER8 / PILS5/7 *RNAi* binary vector を作成した。pBI121 / PILS1*RNAi* および pER8 / PILS5/7 *RNAi* binary vector をタバコ BY-2 培養細胞へそれぞれ形質転換した。形質転換方法は第 1 章の材料と方法と同様である。

さらに *PILS1*、5 および 7 多重発現抑制体を得るために pBI121 / *PILS1* *RNAi* binary vector を形質転換した *PILS1* 発現抑制株 BY-2 細胞 R8 系統に対し、さらに pER8/*PILS5/7* *RNAi* binary vector を用いて形質転換を行った。グローニングに用いたプライマーを supplement 表 10 に示す。

形質転換

形質転換へ用いた *Agrobacterium* へのプラスミド導入および BY-2 細胞への形質転換は前述の方法で行った。用いたバイナリーベクターおよび作成した形質転換体は supplement 表 11 示す。

形質転換 BY-2 細胞におけるジャスモン酸によるニコチン蓄積およびサンプリング

第 2 章の材料と方法と同様である。

アルカロイドの抽出および Gus-liquid chromatography アルカロイドの測定

第 1 章の材料と方法と同様である。

LC/MS による内在性オーキシシン定量解析

既存の *NUPI* 発現抑制、*NUPI* 過剰発現、*PILS1* 発現抑制、*PILS5/7* 発現抑制および *PILS1/5/7* 発現抑制形質転換タバコ BY-2 細胞の各 1 系統に対し、BY-2 培地に添加してある 2,4-D を除いた後最終濃度 100 μM ジャスモン酸処理を行い、処理後 36 時間の細胞をサンプリングし内在性活性型オーキシシンおよびアミノ酸結合型オーキシシンの定量解析をおこなった。

LC/MS 解析は理化学研究所 生産機能グループ 榊原均博士および小嶋美紀子氏との共同研究で行い、文部科学省最先端研究基盤事業「植物科学最先端研究拠点ネットワーク」植物ホルモン定量解析を利用し解析を依頼した。

DR5 ::GUS レポーターを用いた内在性オーキシシンの定量解析

既存の *NUPI* 発現抑制、*NUPI* 過剰発現、*PILS1* 発現抑制、*PILS5/7* 発現抑制および *PILS1/5/7* 発現抑制形質転換 BY-2 細胞の各 1 系統に対し、pBm43GW / DR5 :: GUS をさらに形質転換し、オーキシシンレポーターラインを作成した。トランスジーンである *DR5 :: GUS* のゲノムへの挿入位置による発現のばらつきを考慮して、それぞれ 14-20 の独立した系統をひとまとめにして培養しオーキシシンレポーターラインとした。これらの細胞に 100 μM ジャスモン酸処理または 90 μM 2,4-D 処理および 5 μM β -estradiol 処理を行った。ジャスモン酸処理は前述と同様の方法を用い、植物ホルモン処理後 24 時間の細胞を用いて遺伝子発現解析および GUS 染色を行った。遺伝子発現は第 1 章の材料と方法と同様に行った。さらに GUS 染色には植物ホルモン添加後 24 時間の 100 μl BY-2 細胞懸濁液を 900 ml GUS 染色液と混合し前述の方法と同様に行い、6 時間インキュベートした。

結果

マイクロアレイ解析および *NUPI* 発現抑制 BY-2 細胞における遺伝子発現解析

NUPI 発現抑制 BY-2 細胞においてジャスモン酸誘導時に、アルカロイドの蓄積全体量が減少した(図 32. A)。この原因は *NIC2* 遺伝子座 *ERF189* 転写因子を介して *PMT* の発現が抑制されていたことに起因していた。(図 31. B)。 *NUPI* から *ERF189* 転写因子の制御には他のどのような因子を介しているのかを明らかにするために、 *NUPI* 発現抑制 BY-2 細胞を用いてマイクロアレイ解析を行い、 *NUPI* の下流因子を探索した。用いたマイクロアレイにはおよそ 40,000 のプローブが載っていた。 *NUPI* 発現抑制 BY-2 細胞とベクターコントロールにおける遺伝子発現および有意差検定から *NUPI* 発現抑制 BY-2 細胞で発現が減少している遺伝子 (表 1) および上昇している遺伝子 (supplement 表 2) をリストアップした。 *NUPI* 発現抑制 BY-2 細胞では *NIC2* 遺伝子座 *ERF189* 転写因子を介してニコチン生合成酵素遺伝子が発現抑制されていたことから(図 31. B)、 *NUPI* 発現抑制 BY-2 細胞で発現が減少している遺伝子のリストに *ERF189* 転写因子およびニコチン生合成酵素遺伝子が含まれていることが期待できた。 *NUPI* 発現抑制 BY-2 細胞で有意に発現が抑制されているニコチン蓄積に関わる遺伝子は *AO* (#1 ; gene expression = 0.41)、 *MPO*(# 3 および #5 ; gene expression = 0.43 および 0.47)、 *PMT*(#8 および #63 ; gene expression = 0.53 および 0.66)が含まれていた。更に表 1 のリストには含まれていないが *QPT*(#84 および #85 ; gene expression = 0.72)、 *A622*(#177 ; gene expression = 0.80)、 *QS*(#288 gene expression = 0.84)、 *MATE2*(#333 ; gene expression = 0.85)および *ODC*(#458 ; gene expression = 0.87)が *NUPI* 発現抑制 BY-2 細胞で発現が減少している遺伝子の上位に位置していた。しかしこのマイクロアレイには *ERF189* に対応するプローブは載っていなかったが、ニコチン生合成酵素遺伝子の発現パターンからこのマイクロアレイ解析の結果は *NUPI* 発現抑制 BY-2 細胞の遺伝子発現を正確に反映していると判断した。

NUPI 発現抑制 BY-2 細胞で発現が減少している遺伝子のリストのニコチン生合成酵素遺伝子を除く上位 10 遺伝子および増加している遺伝子のリストの上位 5 遺伝子に対し特異的なプライマーを作成し、実際の遺伝子発現を qRT-PCR で解析した。マイクロアレイ解析において *NUPI* 発現抑制 BY-2 細胞で発現が減少

しているニコチン生合成酵素遺伝子を除き 10 遺伝子 (図 37. A) は、実際の qRT-PCR 解析の結果においても *NUPI* 発現抑制 BY-2 細胞で有意に遺伝子発現が減少しておりマイクロアレイの結果と一致したが、#12 *CYP716A2* だけは変化していなかった。マイクロアレイにおいて *NUPI* 発現抑制 BY-2 細胞で発現が増加している 5 遺伝子 (supplement 図 2) は、実際の qRT-PCR 解析の結果においても *NUPI* 発現抑制 BY-2 細胞で有意に遺伝子発現が増加しておりマイクロアレイの結果と一致した。

NUPI 発現抑制 BY-2 細胞で発現が減少している遺伝子の#2 および#4(gene expression = 0.44 および 0.48)は同一の遺伝子 *PIN-LIKES1* (以降 *PILS1* と略す) を認識するプローブであった。シロイヌナズナ *PILS* は ER 局在型のオーキシシン輸送体で、細胞質中の活性型オーキシシンを ER 膜内に輸送し、不活性型のアミノ酸結合型にすることで細胞内のオーキシシン量をコントロールしていると報告された(Barbez et al., 2012)。オーキシシンによってニコチン蓄積が抑制されることは古くから報告されている (Tabata et al., 1971, Takahashi and Yamada, 1973)。以上のことから私は *NUPI* 発現抑制 BY-2 細胞におけるジャスモン酸誘導時におけるニコチン蓄積の減少は、*PILS* を介した細胞内の活性型オーキシシン量の変化によって生じるのではないかと仮説を立て(図 38)、*PILS* の機能に注目し解析を行った。

ジャスモン酸およびオーキシシンの植物ホルモン処理による遺伝子発現解析

マイクロアレイの結果から *NUPI* 発現抑制 BY-2 細胞で発現が減少している 10 遺伝子(表 1 および図 37.A)および上昇している 5 遺伝子(supplement 表 1 および supplement 図 2)に対しジャスモン酸およびオーキシシンによってどのような遺伝子発現の変化が起きるかを確認するために、野生型 BY-2 細胞へジャスモン酸およびオーキシシンの処理を行った。*NUPI* 発現抑制 BY-2 細胞で発現が減少している 10 遺伝子の、#1 *PILS1*、#7 *HPR*、#9 *PER16*、#10 *PIP2;1*、#11 *APase*、および#17 *NPH3-like* はジャスモン酸処理で強く誘導され、オーキシシン処理では変化しないもしくは抑制され、ジャスモン酸およびオーキシシン同時処理でジャスモン酸による発現誘導が抑制された(図 37. B)。#14 *EHN* および#15 *HSP* についてはジャスモン酸処理もしくはオーキシシン処理で発現が誘導されたが、ジャスモン酸およびオーキシシン同時処理でその発現誘導が抑制された。また#6 *PAP* についてはジャスモン酸およびオーキシシンによる発現変化は生じなかった。*NUPI* 発

現抑制 BY-2 細胞で発現が増加している 5 遺伝子(supplement 図 2)の#1 *UGT74B1* および#6 *WRKY40* についてはジャスモン酸処理で誘導され、オーキシン処理では変化がないもしくは抑制され、ジャスモン酸およびオーキシン同時処理でジャスモン酸による発現誘導が抑制された。#3 *BSMT1*、#4 *PR4* および#8 *GPT2* についてはジャスモン酸処理によって強く誘導されるわけではないが、ジャスモン酸およびオーキシン同時処理でその誘導が抑制された。

さらにニコチン生合成に関わるジャスモン酸シグナル経路の *MYC2* 転写因子および *NIC2* 遺伝子座 ERF 型転写因子 *ERF189*、生合成酵素遺伝子 *PMT* および輸送体 *NUPI* のジャスモン酸およびオーキシンによる遺伝子発現パターンを解析した。これら遺伝子はジャスモン酸で強く誘導され、オーキシン処理では変化がないもしくは抑制され、ジャスモン酸およびオーキシン同時処理でジャスモン酸による発現誘導が強く抑制された(図 39)。この実験からニコチン産生に関する遺伝子はジャスモン酸で誘導され、オーキシンの同時処理でジャスモン酸のみの発現誘導を強く打ち消すことが明らかになった。つまりオーキシンはジャスモン酸シグナル経路上の遺伝子の転写レベルで抑制的に機能することが明らかになった。

ジャスモン酸処理における *NUPI* 発現抑制および過剰発現 BY-2 細胞での *PILS1* の発現解析

NUPI 発現抑制 BY-2 細胞において *PILS1* が非常に強く抑制されていた(図 37. A)ため、*NUPI* 過剰発現 BY-2 細胞で *PILS1* が高発現していることを期待してジャスモン酸誘導性 *PILS1* に及ぼす *NUPI* の影響を解析した。野生型およびベクターコントロールに対し *NUPI* 発現抑制株では常に *PILS1* の発現は抑制され、*NUPI* 過剰発現株では常に *PILS1* の発現は促進されていた(図 40)。 *PILS1* の発現は *NUPI* の発現と正の相関があり、ジャスモン酸に誘導されることが明らかになった。

PILS の系統樹解析

シロイヌナズナ *PILS* は 7 遺伝子存在することが報告されている (Barbez et al., 2012)。タバコでも複数の *PILS* が存在する可能性があるため、Sol Genomics Network でシロイヌナズナ *PILS* をクエリーにして検索し、系統樹を作成した(図 41)。タバコ *PILS* は 5 遺伝子 (*PILS1*, 2, 5, 6 および 7) が全長コーディング

配列を利用することができ、他にも複数の EST 配列が見つかった。タバコ PILS1 はシロイヌナズナ PILS1 およびトマト 02g037550 とそれぞれ相同性 48%、85% を示した。PILS1,3,4 および PILS5,7 はそれぞれサブクレードを形成していた。

タバコ *PILS* の遺伝子発現解析

NUPI 発現抑制 BY-2 細胞において *PILS1* の発現が強く抑制されていたため(図 37. A)、*NUPI* 発現抑制 BY-2 細胞における *PILS2*, 5, 6 および 7 の遺伝子発現についても解析を行った。*NUPI* 発現抑制 BY-2 細胞において *PILS1* はもちろんのこと *PILS5* および 7 が有意に抑制されており、*PILS2* および 6 は変化していなかった (図 42. A)。これは *NUPI* 依存的に *PILS1*, 5 および 7 が機能していることが明らかになった。

NUPI および *PILS1*、さらにニコチン生合成に関わる転写因子および生合成酵素遺伝子はジャスモン酸で発現誘導され、オーキシンで抑制されることが明らかになっていることから(図 37 および 39)、*PILS2*, 5, 6 および 7 についてもジャスモン酸およびオーキシン処理による遺伝子発現解析を行った。*PILS1*, 6 および 7 はジャスモン酸処理で誘導され、オーキシン処理で抑制され、そしてジャスモン酸とオーキシンの同時処理では、ジャスモン酸のみの発現誘導を強く打ち消すことが明らかになった。(図 43)。つまり *PILS1*, 6 および 7 についてもオーキシンはジャスモン酸に対し抑制的に機能することが明らかになった。一方 *PILS2* および 5 はジャスモン酸およびオーキシンによる発現の変化はなかった。これら結果から、ニコチン蓄積を制御する可能性のある *NUPI* 依存的かつジャスモン酸誘導性 *PILS1* および 7 に注目し、以降の解析を行った。

タバコ *PIN* およびオーキシン応答遺伝子の発現解析

NUPI 発現抑制 BY-2 細胞において細胞内オーキシン輸送体 *PILS1*, 5 および 7 の発現が低下していたことから、他のオーキシン輸送体 *PIN* の遺伝子発現を解析した。マイクロアレイ解析から *PIN2* および *PIN3* の発現は 0.93-1.05 で *NUPI* 発現抑制 BY-2 細胞で抑制されていなかった (表 1)。実際に qRT-PCR でタバコ *PIN1* および *PIN3* の実際の遺伝子発現を解析したところ、*NUPI* 発現抑制 BY-2 細胞で変化していなかったため (図 42. B)、*NUPI* は *PIN* の遺伝子発現と相関がなく、*NUPI* は *PILS1*, 5 および 7 特異的に正の相関があることが明らかになった(図 42. A)。

PILS はオーキシン輸送体であるため、*NUPI* 発現抑制 BY-2 細胞においても細胞内の活性型オーキシン量に変化しているかどうかを確認するためにタバコ内在性のオーキシン応答遺伝子 *IAA2;3* (Dargeviciute et al., 1998) および *GH3* (Roux and Rechenmann, 1997) の発現を解析した。*NUPI* 発現抑制 BY-2 細胞では *IAA2;3* および *GH3* の発現が上昇していたので (図 44)、活性型オーキシンが増加していると考えられる。これらの結果から *NUPI* は *PILS1*, 5 および 7 を介して細胞内活性型オーキシンの量を制御していると考えられる。

PILS1 および 7 発現抑制の細胞内局在解析

シロイヌナズナ PILS は ER 局在型オーキシン輸送体であるので (Barbez et al., 2012)、タバコ PILS も同様の機能をもつなら ER 局在を示すのではないかと考え、細胞内局在解析を行った。*PILS1-GFP* および *PILS7-GFP* は ER 局在マーカーである tdTomato-ER と共局在を示した (図 45)。これよりシロイヌナズナ PILS と同様にタバコ *PILS1* および 7 も ER 局在型のオーキシン輸送体であることが明らかになった。

PILS 発現抑制 BY-2 培養細胞の遺伝子発現およびニコチン蓄積の解析

PILS1 または 7 を発現抑制した際に、活性型オーキシン蓄積量の上昇を介して、蓄積するニコチン量が減少するかどうかを解析した。RNAi による *PILS1* の発現抑制 BY-2 細胞を作成し、BY-2 培地に添加してある 2,4-D を除いた後ジャスモン酸処理を行い、処理後 36 時間の遺伝子発現、72 時間後のアルカロイド蓄積を解析した。*PILS1* 発現抑制 BY-2 細胞では *PILS1* の発現が有意に低下している独立した 2 系統を確立した (supplement 図 3. A)。オーキシン応答遺伝子 *GH3* の発現が上昇し、*NIC2* 遺伝子座 *ERF189* 転写因子および *PMT* の発現が低下していた (supplement 図 4)。さらにアルカロイド蓄積量に関してニコチンを含むアルカロイド全体量が有意に減少していた (supplement 図 3. B)。

PILS5 および *PILS7* のアミノ酸配列は 94 % の相同性があるため、RNAi による *PILS7* のみを発現抑制するための binary vector の作成は困難であったため、*PILS5* および 7 を同時に発現抑制する binary vector (以下 *PILS5/7* 発現抑制とする) を用い、発現抑制 BY-2 細胞を作成した。恒常的過剰発現 35S プロモーターによって *PILS5/7 RNAi* 発現させると強い生育阻害が生じたため、エストラジオール誘導型 XVE プロモーターを用いた形質転換体を作成し解析を行った。*PILS1* 発

現抑制株と同様に BY-2 培地に添加してある 2,4-D を除いた後ジャスモン酸処理およびエストラジオール処理を同時に行い、処理後 36 時間の遺伝子発現を解析した。アルカロイド蓄積量の解析において、ジャスモン酸誘導 36 時間以降は生育阻害が生じたため、誘導 36 時間後における BY-2 細胞でアナタビンの量だけを測定した。エストラジオール誘導によって *PILS5* および 7 の発現が有意に低下した独立した 2 系統を確立した(supplement 図 5. A)。オーキシン応答遺伝子 *GH3* の発現が上昇し、*NIC2* 遺伝子座 *ERF189* および *PMT* の発現が低下していた (supplement 図 6)。さらにアナタビン蓄積量に関しては有意に減少していた (supplement 図 5. B)。

さらに *PILS1*、5 および 7 を同時に抑制するための形質転換 BY-2 細胞 (以下 *PILS1/5/7* 発現抑制とする) を作出し *PILS1* 発現抑制株および *PILS5/7* 発現抑制株と同様に BY-2 培地に添加してある 2,4-D を除いた後ジャスモン酸処理およびエストラジオール処理を同時に行い、処理後 36 時間の遺伝子発現およびアナタビン蓄積量を測定した。*PILS1*、5 および 7 の発現が有意に低下した独立した 2 系統を確立した(図 46. A)。オーキシン応答遺伝子 *GH3* の発現が上昇し、*NIC2* 遺伝子座 *ERF189* 転写因子および *PMT* の発現が低下していた (図 47)。さらにアナタビン蓄積量は有意に減少していた (図 46. B)。

これらの結果から *PILS* の発現抑制によって、細胞内活性型オーキシンの蓄積量が上昇し、*NIC2* 遺伝子座 *ERF189* 転写因子の発現が抑制されることを介し、下流のニコチン生合成遺伝子の発現が抑制され、最終的にニコチン蓄積が抑えられることが明らかになった。

***NUPI* 発現抑制および過剰発現 BY-2 細胞における遺伝子発現解析**

次に *NUPI* 発現抑制および過剰発現 BY-2 細胞においても、ジャスモン酸の誘導により *PILS* を介した細胞内活性型オーキシン蓄積量の変化が、*NIC2* 遺伝子座 *ERF189* 転写因子および *PMT* の発現に変化を及ぼすかを解析した。*NUPI* 発現抑制株においては *NUPI* が抑制されることで、*PILS1* が抑制され細胞内活性型オーキシン蓄積量が上昇することで *GH3* が上昇し、さらに *NIC2* 遺伝子座 *ERF189* 転写因子を介して *PMT* が抑制された (図 48)。*NUPI* 過剰発現株では *NUPI* 発現抑制株と逆の遺伝子発現を示した。さら *NUPI* 発現抑制および過剰発現に関わらず *MYC2* 転写因子の発現には影響を及ぼさなかった。この結果からジャスモン酸シグナルは *NUPI* および *PILS* を介したオーキシンシグナルとの

相互作用により *NIC2* 遺伝子座 *ERF189* 転写因子を介しておよび *PMT* の転写レベルで制御し、ニコチン蓄積を制御していることが明らかになった。

LC/MS による内在性オーキシシン定量解析

実際に *NUPI* 発現抑制、過剰発現および *PILS* 発現抑制 BY-2 細胞において、ニコチン蓄積には細胞内活性型オーキシシンと不活性型のアミノ酸結合型オーキシシンの比率の変化による影響があるのかを解析するために LC/MS 解析を行った。活性型/不活性型オーキシシンの比率の算出を試みたが、不活性型オーキシシン量が少なく LC / MS の検出限界以下であったため、再度解析するために条件検討中である。

オーキシシンレポーター *DR5::GUS* を用いた内在性オーキシシンの定量解析

LC/MS による内在性オーキシシンの定量ができなかったため、オーキシシンレポーター *DR5::GUS* を用いた *GUS* の遺伝子発現の定量を試みた。*NUPI* 発現抑制および過剰発現、*PILS* の発現抑制 BY-2 細胞へ、オーキシシンマーカーである *DR5::GUS* をさらに形質転換して、オーキシシンマーカーラインを作成した。形質転換した *DR5::GUS* のゲノムへの挿入位置による影響を排除するため、20 の独立した系統をひとまとめにして解析を行った。*PILS1/5/7* 発現抑制株のみ 14 の独立した系統をひとまとめにした。

作成したそれぞれのラインに対しオーキシシン処理を行ったところ、全てのラインで *GUS* および *GH3* の発現が上昇し(図 49. B)、*GUS* 染色でも強く染色されたため(図 50. B)、作成した全てのラインは以降の解析に使用できることが明らかになった。

作成したそれぞれのラインに対しジャスモン酸処理を行い、*GUS* 遺伝子の発現量からオーキシシンの定量を試みたところ、*PILS* 発現抑制株および *NUPI* 発現抑制株では *GUS* および *GH3* の発現が有意に上昇した (図 49. A) ことから活性型オーキシシンの過剰な蓄積が明らかになり、*GUS* 染色でも強く染色された (図 50. B)。また *NUPI* 過剰発現株では発現抑制株とは逆の結果となり、今までの結果と同様の結果を示した。本解析からも *NUPI* 発現抑制、過剰発現および *PILS* 発現抑制 BY-2 細胞では細胞内活性型オーキシシンが変化していることが明らかになった。

***NUPI* 発現抑制 BY-2 細胞における *PILS* 相補によるアルカロイド蓄積の解析**

NUPI 発現抑制 BY-2 細胞では2つの機能が明らかになった。*NUPI* の輸送体として機能として細胞外へのアルカロイドの高蓄積する (図 32. B)。*PILS* の発現を制御する機能として細胞内活性型オーキシンの増加を引き起こし、*ERF189* 転写因子を介したアルカロイド生合成を減少させる(図 46 および 47)。この結果から *NUPI* 発現抑制 BY-2 細胞に *PILS* 過剰発現させることで、*PILS* の機能を相補でき、アルカロイド生合成量が増加し細胞外へのアルカロイドの高分布だけが残ると期待し、*NUPI* 発現抑制 BY-2 細胞 R18 系統に対し *PILS1*、5 および 7 を過剰発現させた形質転換 BY-2 細胞を作成した。本解析は現在解析中である。

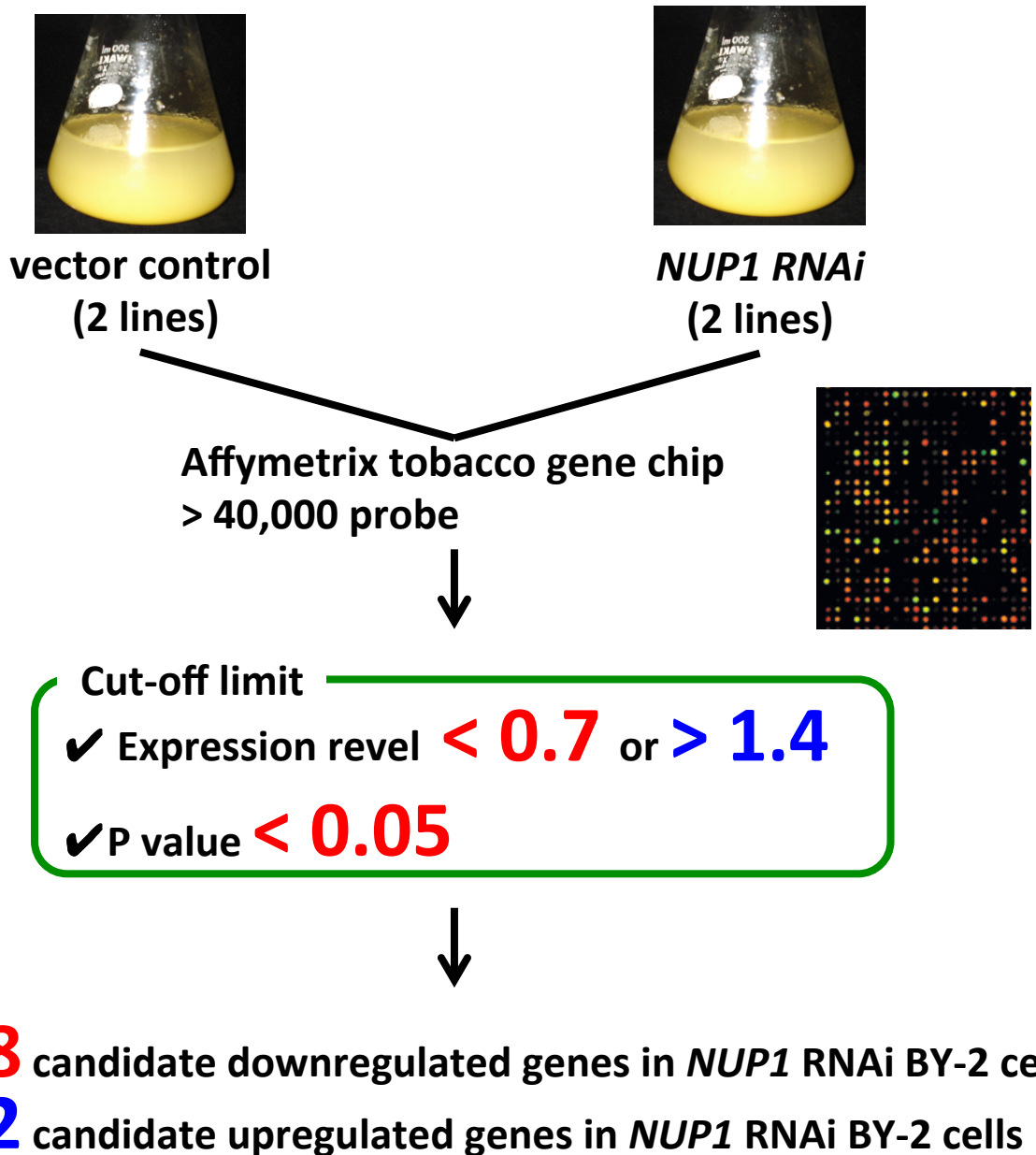


図36. マイクロアレイ解析の模式図

ベクターコントロール(VC4およびVC9)および*NUP1*発現抑制(R18およびR44)BY-2細胞の各2ラインを解析を用いた。解析にはNASC The European Arabidopsis Stock Center (<http://arabidopsis.info>)のAffy Gene Chip Service の Tobacco Array (NASC ID: N782243)を利用した。

#	Probe Set ID	gene expression	p value	EMBL	SGN	AGI	abbreviation	Description
1	C263_at	0.412	0.013	DV161862		AT5G14760		L-aspartate oxidase
2	C4972_s_at	0.439	0.011	EB435848	SGN-U428005	AT1G20925	PIN-like	PIN-Likes auxin transporter
3	C114_at	0.459	0.008	EB444182		AT2G42490		N-methyl putrescine oxidase
4	C4972_at	0.478	0.006	EB435848	SGN-U428005	AT1G20925	PIN-like	PIN-Likes auxin transporter
5	C1341_at	0.487	0.010	DW002039		AT2G42490		N-methyl putrescine oxidase
6	C2028_s_at	0.494	0.004	DW000709	SGN-U430734	AT3G26070	PAP	plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family protein
7	C2383_s_at	0.530	0.009	DV998880	SGN-U425019	AT1G68010	HPR	HPR (HYDROXYPYRUVATE REDUCTASE); glycerate dehydrogenase/ poly(U) binding
8	C2543_s_at	0.531	0.004	DV161770		AT1G23820		Putrescine N-methyltransferase 4
9	TT06_A21_at	0.544	0.005		SGN-U449911	At2G18980.1	PER16	peroxidase, putative
10	G2742_at	0.545	0.048	EB447206		AT4G35100	PIP2;1	Aquaporin PIP2;1
11	C116_s_at	0.545	0.036	EB683692	SGN-U436029	AT4G25150	APase	acid phosphatase, putative
12	EB443799_at	0.552	0.007	EB443799	SGN-E1049663	At5G36140	CYP716A2	CYP716A2 ; putative
13	TT06_B21_x_at	0.553	0.016			AT3G26070		plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family protein
14	C3678_at	0.555	0.018	DV999014	SGN-U437049	AT5G17170	ENH1	ENH1 (ENHANCER OF SOS3-1); metal ion binding ; electron transporter
15	C215_s_at	0.558	0.020	DW003219	SGN-U422165	AT5G22580	HSP	Stress responsive A/B Barrel
16	EB432711_s_at	0.562	0.029	EB432711		AT1G68010?		HPR HPR (Hydroxypyruvate reductase); NAD binding / cofactor binding / oxidoreductas&hellip
17	TT20_B18_s_at	0.570	0.003		SGN-U421307	At5G67385	NPH3-like	signal transducer
18	C9163_x_at	0.572	0.022	X66010		AT4G03280		PETC (PHOTOSYNTHETIC ELECTRON TRANSFER C)
19	C8716_at	0.576	0.024	CV018702	SGN-U436258	AT4G02370		similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G02816.1); similar to Os05g0362300
20	C215_at	0.576	0.020	EB683174	SGN-U422165	AT5G22580	HSP	Stress responsive A/B Barrel
21	EB439537_at	0.581	0.034	EB439537	SGN-U455011			unknown
22	C4305_x_at	0.584	0.001	EB444129		AT1G70850		wound-stimulated protein
23	C2524_at	0.585	0.013	DV162052	SGN-U427587	AT4G33110		cochlorine N-methyltransferase, putative
24	CV016587_x_at	0.590	0.032	CV016587	SGN-U445218	At5G38410		putative ribulose bisphosphate carboxylase small subunit protein precursor
25	TT05_C03_x_at	0.591	0.019		SGN-U446158	At2G02120		thionin like protein
26	CV017356_x_at	0.598	0.012	CV017356		AT5G38410		ribulose bisphosphate carboxylase small chain 3B / RuBisCO small subunit 3B (RBCS-3B)
27	CV021057_x_at	0.598	0.039	CV021057		AT5G38410		ribulose bisphosphate carboxylase small chain 3B / RuBisCO small subunit 3B (RBCS-3B)
28	C5754_s_at	0.598	0.002	EB434784		AT1G06680		PSBP-1 (OXYGEN-EVOLVING ENHANCER PROTEIN 2); poly(U) binding
29	C3678_s_at	0.599	0.026	DV999014		AT5G17170	ENH1	ENH1 (ENHANCER OF SOS3-1); metal ion binding ; electron transporter
30	L13440_at	0.601	0.012	L13440	SGN-U445688			cysteine-rich extensin-like protein-2

表1. マイクロアレイ解析にてNUP1発現抑制BY-2細胞において発現が抑制された遺伝子

NUP1発現抑制BY-2細胞を用いたマイクロアレイ解析より、NUP1発現抑制BY-2細胞で発現が抑制された上位遺伝子リストを示す。gene expression < 0.7 および p value < 0.05の条件でデータを並び替えた。黄色はニコチン合成遺伝子、青色はトランスポーター遺伝子、赤色は酵素遺伝子、緑は光合成関連遺伝子を示す。

#	Probe Set ID	gene expression	p value	EMBL	SGN	AGI	abbreviation Description
31	C3572_x_at	0.604	0.004	EB434969		AT2G06520	PSBX (photosystem II subunit X)
32	C4171_at	0.609	0.009	DW000100	SGN-U421829	AT3G63410	APG1 (ALBINO OR PALE GREEN MUTANT 1); methyltransferase
33	BP529666_at	0.610	0.013	BP529666	SGN-U423557	AtMG00810.1	Identical to Hypothetical mitochondrial protein AtMg00810 (ORF240b)
34	C8991_s_at	0.614	0.007	AB243209		AT4G34160	CYCD3/CYCD3;1/D3 (CYCLIN D3;1)
35	C6064_at	0.619	0.027	EB430247		AT5G02120	OHP (ONE HELIX PROTEIN)
36	C9567_s_at	0.624	0.027	FG638767		AT2G34700	pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein
37	C3915_at	0.629	0.017	CV018118		AT4G05180	PSBQ/PSBQ-2/PSII-Q (PHOTOSYSTEM II SUBUNIT Q-2); calcium ion binding
38	CV016264_x_at	0.637	0.036	CV016264		AT2G30570	PSBW (PHOTOSYSTEM II REACTION CENTER W)
39	C709_at	0.643	0.012	EB442492	SGN-U431900	AT1G32900	gbss1 ; granule-bound starch synthase 1
40	C10284_x_at	0.644	0.044	FG635998		AT5G24310	ABIL3 (ABL INTERACTOR-LIKE PROTEIN 3)
41	C2712_x_at	0.644	0.002	DV160894		AT3G50820	PSBO-2/PSBO2 (PHOTOSYSTEM II SUBUNIT O-2); oxygen evolving/ poly(U) binding
42	EB427893_at	0.646	0.016	EB427893		AT3G08860	alanine-glyoxylate aminotransferase, putative / beta-alanine-pyruvate aminotransferase,
43	CV019175_at	0.649	0.003	CV019175		AT4G35160	caffeic acid ortho-methyltransferase
44	C2712_at	0.650	0.014	DV999036		AT3G50820	PSBO-2/PSBO2 (PHOTOSYSTEM II SUBUNIT O-2); oxygen evolving/ poly(U) binding
45	C690_at	0.651	0.002	EB680357		AT1G06680	PSBP-1 (OXYGEN-EVOLVING ENHANCER PROTEIN 2); poly(U) binding
46	C5085_at	0.651	0.039	EB441089		AT3G51860	CAX3 (cation exchanger 3); cation:cation antiporter
47	C639_at	0.655	0.016	EB430897		AT3G16140	PSAH-1 (photosystem I subunit H-1)
48	TT05_C03_at	0.658	0.022		SGN-U446158	At2G02120	thionin like protein
49	C1784_at	0.661	0.021	EB444234	SGN-U440889	AT4G25660	putative thiol peptidase family protein
50	EB441658_at	0.661	0.013	EB441658		AT5G02120	OHP (ONE HELIX PROTEIN)
51	TT23_O24_at	0.664	0.039		SGN-U472295	At3G45780	phototropin-1
52	C4533_at	0.666	0.012	BP532193		AT1G23820	Putrescine N-methyltransferase
53	CV020595_s_at	0.668	0.019	CV020595		AT4G35090	CAT2 (CATALASE 2); catalase ;involvement in SA-mediated induction of systemic acquired resistance (SAR) in plants
54	EB440080_x_at	0.669	0.026	EB440080	SGN-U445218		rubpa? ; ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit
55	C6094_x_at	0.672	0.013	EB429799		AT3G63520	CCD1 (CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 1)
56	CV016224_s_at	0.673	0.031	CV016224		AT5G01530	chlorophyll A-B binding protein CP29 (LHCB4)
57	CV017292_s_at	0.674	0.000	CV017292	SGN-U438880	AT4G05180	chloroplast oxygen-evolving protein 16 kDa subunit
58	TT11_C21_at	0.680	0.001		SGN-U447011	At3G21510	AHP1 (HISTIDINE-CONTAINING PHOSPHOTRANSMITTER 3)
59	EB684085_at	0.683	0.001	EB684085		AT2G22960	serine carboxypeptidase S10 family protein
60	C4427_s_at	0.685	0.019	EB682081		AT4G21960	PRXR1 (peroxidase 42); peroxidase
61	C6308_s_at	0.689	0.007	EB428203		AT4G22756	SMO1-2 (STEROL C4-METHYL OXIDASE); catalytic
62	C2351_at	0.691	0.039	DV999022		AT3G08940	LHCB4.2 (LIGHT HARVESTING COMPLEX PSII); chlorophyll binding
63	C4533_x_at	0.693	0.018	BP532193		AT1G23820	Putrescine N-methyltransferase 4
64	EB444325_at	0.694	0.103	EB444325		AT1G10060	ATBCAT-1; branched-chain-amino-acid transaminase/ catalytic
65	C10109_s_at	0.695	0.039	BP129490	SGN-U444562	AT5G51720	similar to zinc finger, CDGSH-type domain 2
66	C6592_x_at	0.695	0.040	EB426702		AT5G64550	loricrin-related
67	C6759_at	0.699	0.002	DV158025	SGN-U433844	AT3G53010	similar to unknown protein
68	C2621_at	0.699	0.000	EB426255		AT2G18890	protein kinase family protein

表1. マイクロアレイ解析にてNUP1発現抑制BY-2細胞において発現が抑制された遺伝子(続き)

NUP1発現抑制BY-2細胞を用いたマイクロアレイ解析より、NUP1発現抑制BY-2細胞で発現が抑制された上位遺伝子リストを示す。gene expression < 0.7 および p value < 0.05の条件でデータを並び替えた。黄色はニコチン生合成遺伝子、青色はトランスポーター遺伝子、赤色は酵素遺伝子、緑は光合成関連遺伝子を示す。

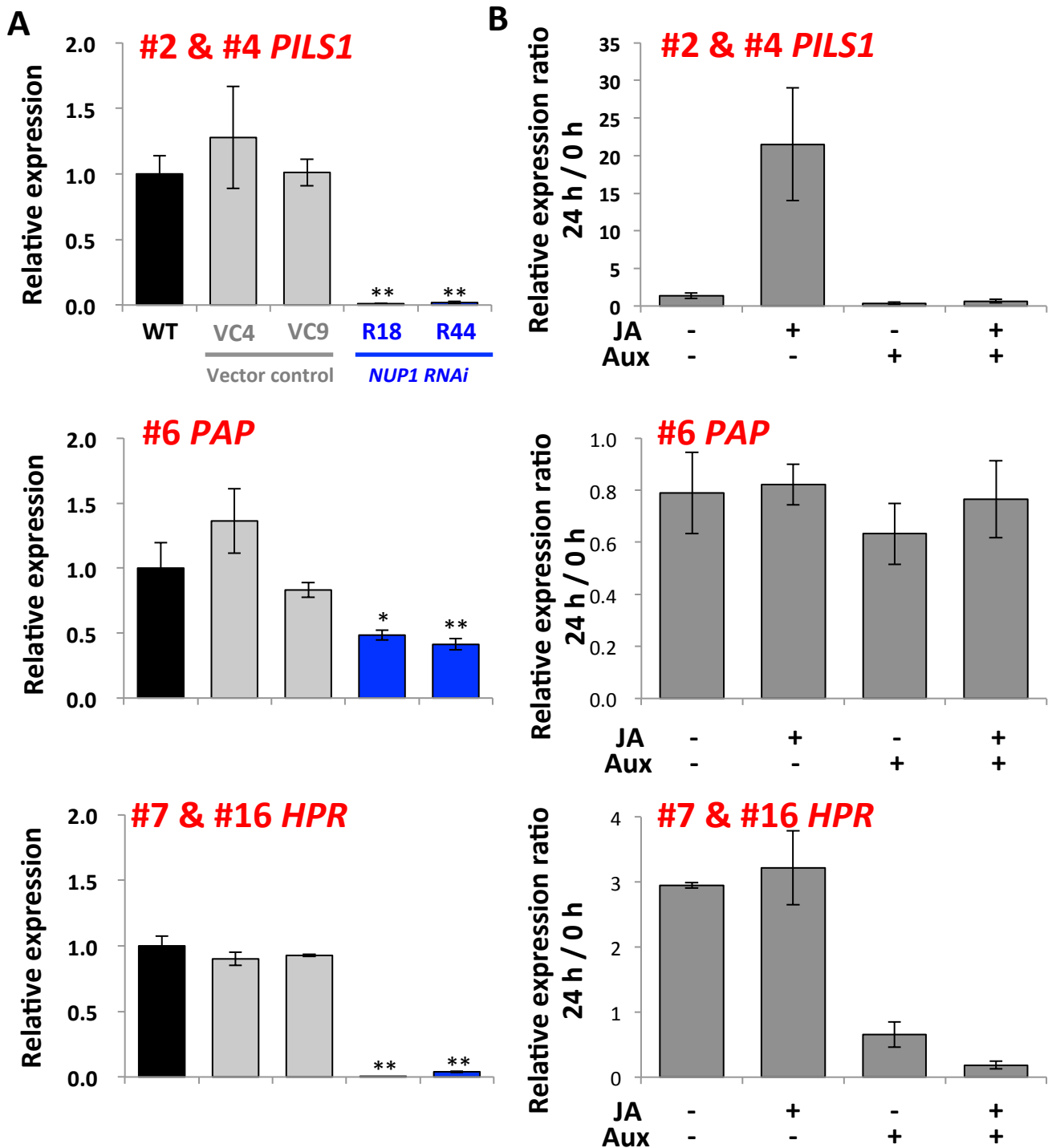


図37. *NUP1*発現抑制BY-2細胞における遺伝子発現

表3で示したマイクロアレイ解析で*NUP1*発現抑制BY-2細胞で発現が低下していたニコチン生合成遺伝子以外の上位10遺伝子の発現パターンをqRT-PCRを用いて確認した。

A. *NUP1*発現抑制BY-2細胞における遺伝子発現。形質転換システムはそれぞれのベクターに対して独立の2系統を用いた。各カラムは平均値±標準誤差を示した。統計処理はStudent's t.testをWTに対して行い、* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を示した。(N = 3)

B. ジャスモン酸およびオーキシンへの応答性。野生型BY-2細胞に対しDMSO (-JA, -AUX)、100 μ M MeJA (+JA)、90 μ M 2,4-D (+AUX) および100 μ M MeJAかつ90 μ M 2,4-D (+JA, +AUX) 処理を行い、遺伝子発現を解析した。各カラムは処理後24時間の遺伝子発現を処理後0時間の値で補正し、平均値±標準誤差を示した。(N = 3)

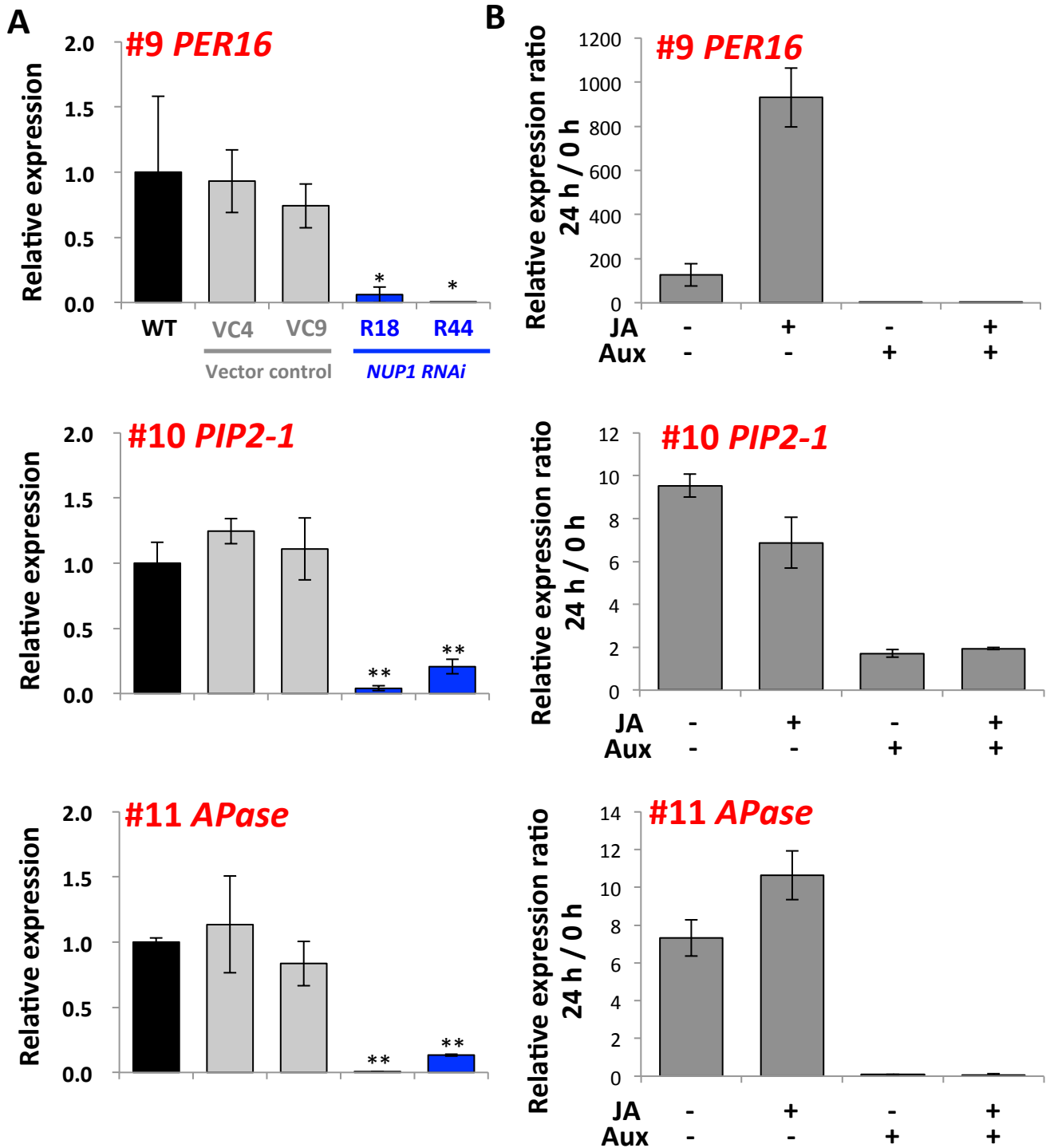


図37. *NUP1*発現抑制BY-2細胞における遺伝子発現

表3で示したマイクロアレイ解析で*NUP1*発現抑制BY-2細胞で発現が低下していたニコチン生合成遺伝子以外の上位10遺伝子の発現パターンをqRT-PCRを用いて確認した。

A. *NUP1*発現抑制BY-2細胞における遺伝子発現。形質転換システムはそれぞれのベクターに対して独立の2系統を用いた。各カラムは平均値±標準誤差を示した。統計処理はStudent's t.testをWTに対して行い、* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を示した。(N = 3)

B. ジャスモン酸およびオーキシンへの応答性。野生型BY-2細胞に対しDMSO (-JA, -AUX)、100 μ M MeJA (+JA)、90 μ M 2,4-D (+AUX) および100 μ M MeJAかつ90 μ M 2,4-D (+JA, +AUX) 処理を行い、遺伝子発現を解析した。各カラムは処理後24時間の遺伝子発現を処理後0時間の値で補正し、平均値±標準誤差を示した。(N = 3)

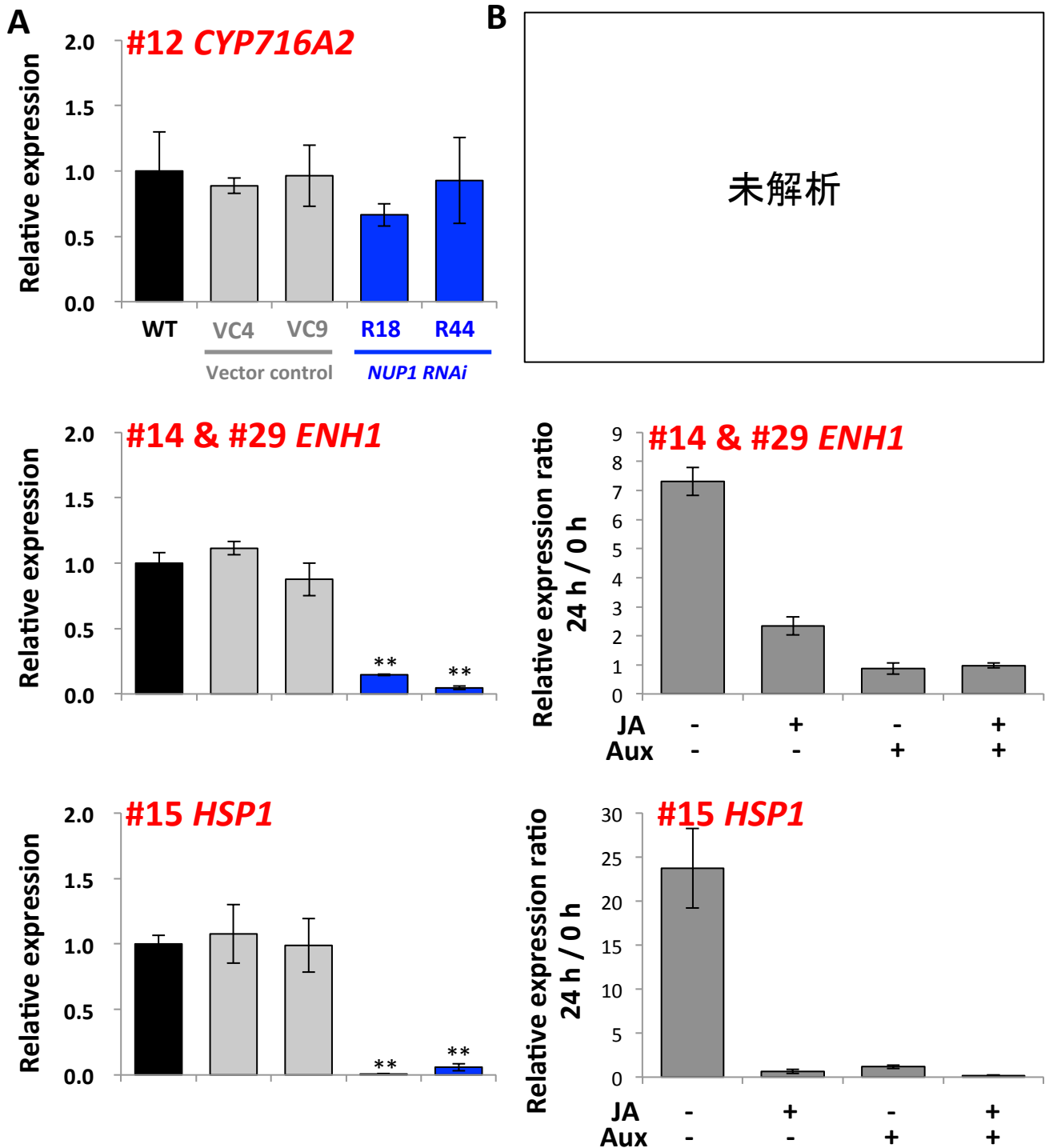


図37. *NUP1*発現抑制BY-2細胞における遺伝子発現

表3で示したマイクロアレイ解析で*NUP1*発現抑制BY-2細胞で発現が低下していたニコチン生合成遺伝子以外の上位10遺伝子の発現パターンをqRT-PCRを用いて確認した。

A. *NUP1*発現抑制BY-2細胞における遺伝子発現。形質転換システムはそれぞれのベクターに対して独立の2系統を用いた。各カラムは平均値±標準誤差を示した。統計処理はStudent's t.testをWTに対して行い、* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を示した。(N = 3)

B. ジャスモン酸およびオーキシンの応答性。野生型BY-2細胞に対しDMSO(-JA, -AUX)、100 μ M MeJA(+JA)、90 μ M 2,4-D(+AUX)および100 μ M MeJAかつ90 μ M 2,4-D(+JA, +AUX)処理を行い、遺伝子発現を解析した。各カラムは処理後24時間の遺伝子発現を処理後0時間の値で補正し、平均値±標準誤差を示した。(N = 3)

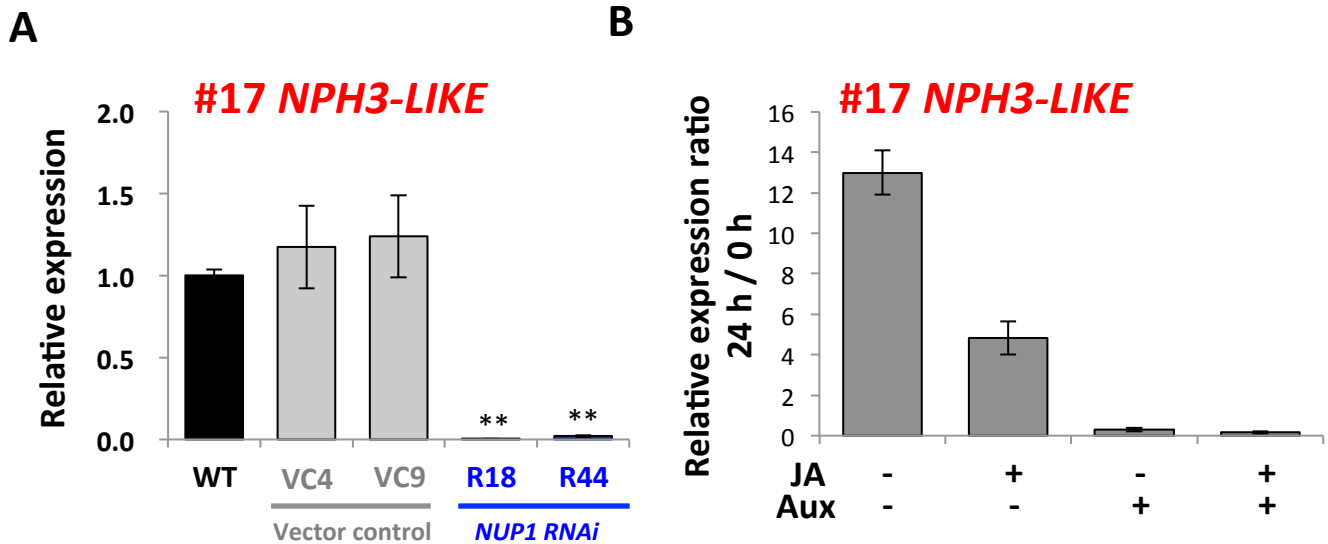
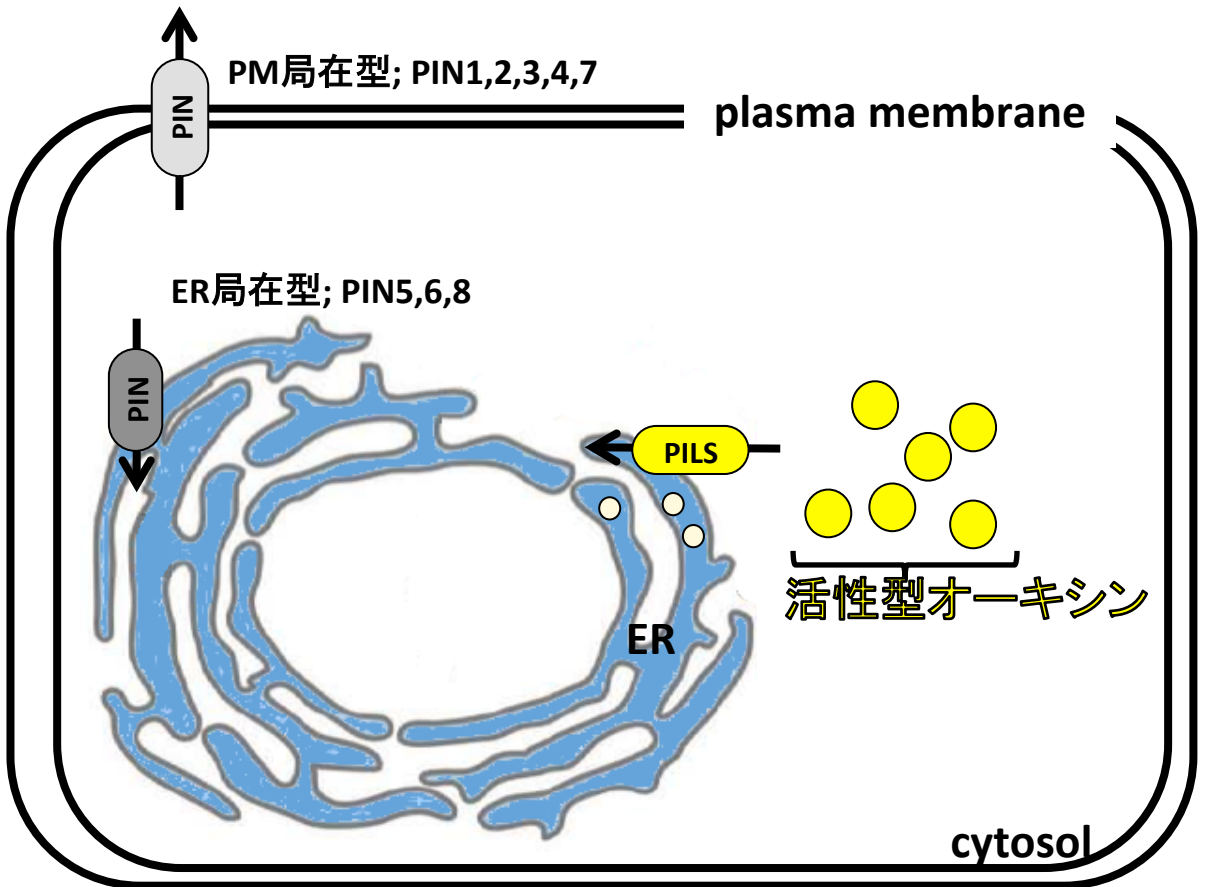


図37. *NUP1*発現抑制BY-2細胞における遺伝子発現

表3で示したマイクロアレイ解析で*NUP1*発現抑制BY-2細胞で発現が低下していたニコチン生合成遺伝子以外の上位10遺伝子の発現パターンをqRT-PCRを用いて確認した。

A. *NUP1*発現抑制BY-2細胞における遺伝子発現。形質転換系統はそれぞれのベクターに対して独立の2系統を用いた。各カラムは平均値±標準誤差を示した。統計処理はStudent's t.testをWTに対して行い、* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を示した。(N = 3)

B. ジャスモン酸およびオーキシンへの応答性。野生型BY-2細胞に対しDMSO (-JA, -AUX)、100 μ M MeJA (+JA)、90 μ M 2,4-D (+AUX) および100 μ M MeJAかつ90 μ M 2,4-D (+JA, +AUX) 処理を行い、遺伝子発現を解析した。各カラムは処理後24時間の遺伝子発現を処理後0時間の値で補正し、平均値±標準誤差を示した。(N = 3)



- 活性型オーキシン
- 不活性型オーキシン

図38. シロイヌナズナPILSの機能モデル

植物細胞には様々なオーキシン輸送体が存在する。PIN輸送体の場合細胞膜局在型とER局在型が存在するが、シロイヌナズナPILSは全てER局在型である。PILS輸送体は細胞質中の活性型フリーオーキシンをERルーメン内に輸送し、不活性型のアミノ酸結合型に変換することで、細胞質中で機能する活性型オーキシン量を制御している(Barbez et al., 2012)。

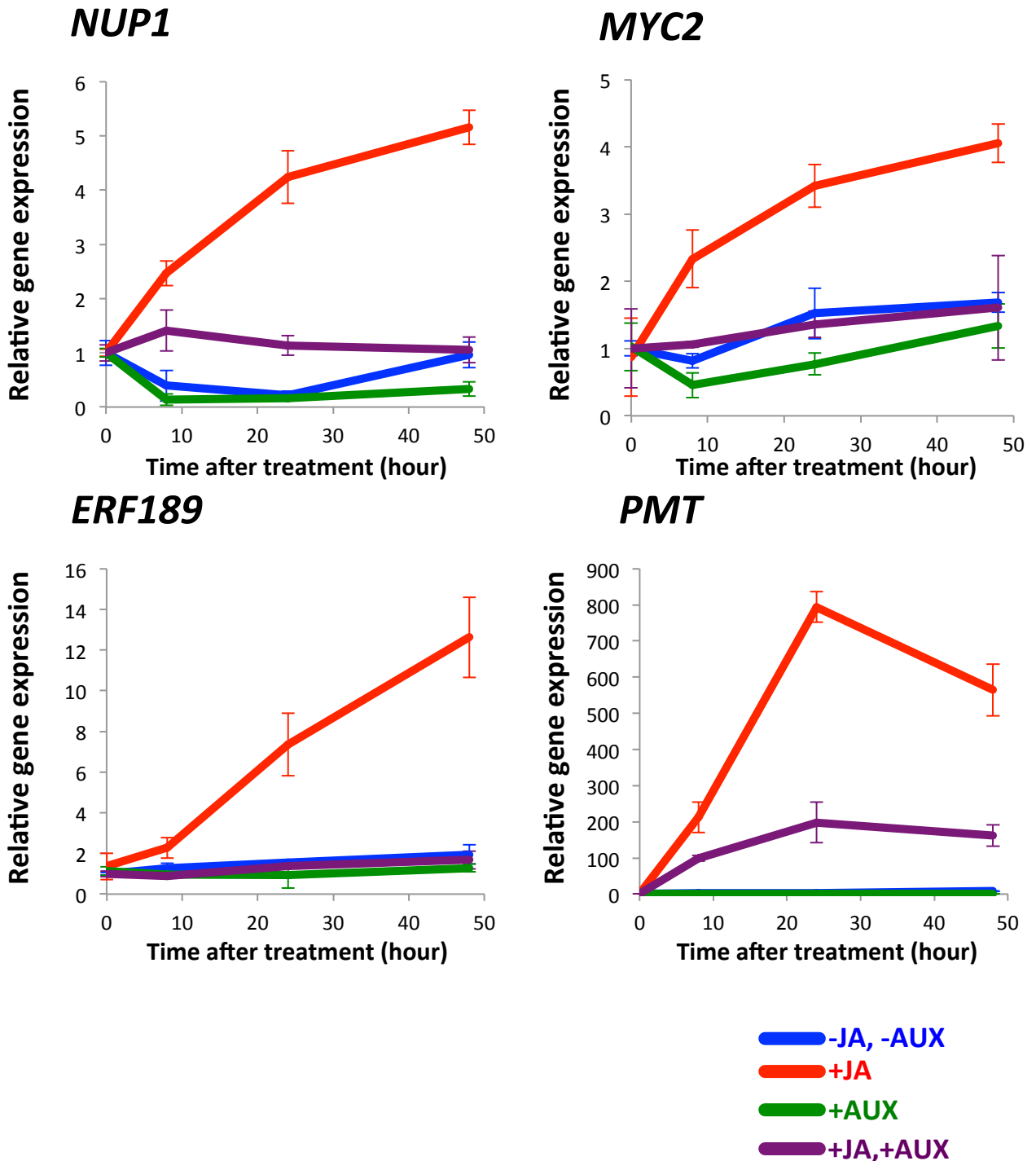


図39. 植物ホルモンを処理したWT BY-2細胞における遺伝子発現の経時変化

DMSO (-JA, -AUX)、100 μ M MeJA (+JA)、90 μ M 2,4-D (+AUX) および100 μ M MeJAかつ90 μ M 2,4-D (+JA, +AUX) 処理を行い、処理後0、8、24および48時間における遺伝子発現をqRT-PCRで解析した。ニコチン/ビタミンB6輸送体NUP1、MYC2転写因子、NIC2遺伝子座ERF189 転写因子およびニコチン合成遺伝子PMTを用い、平均値 \pm 標準誤差を示した。(N = 3)

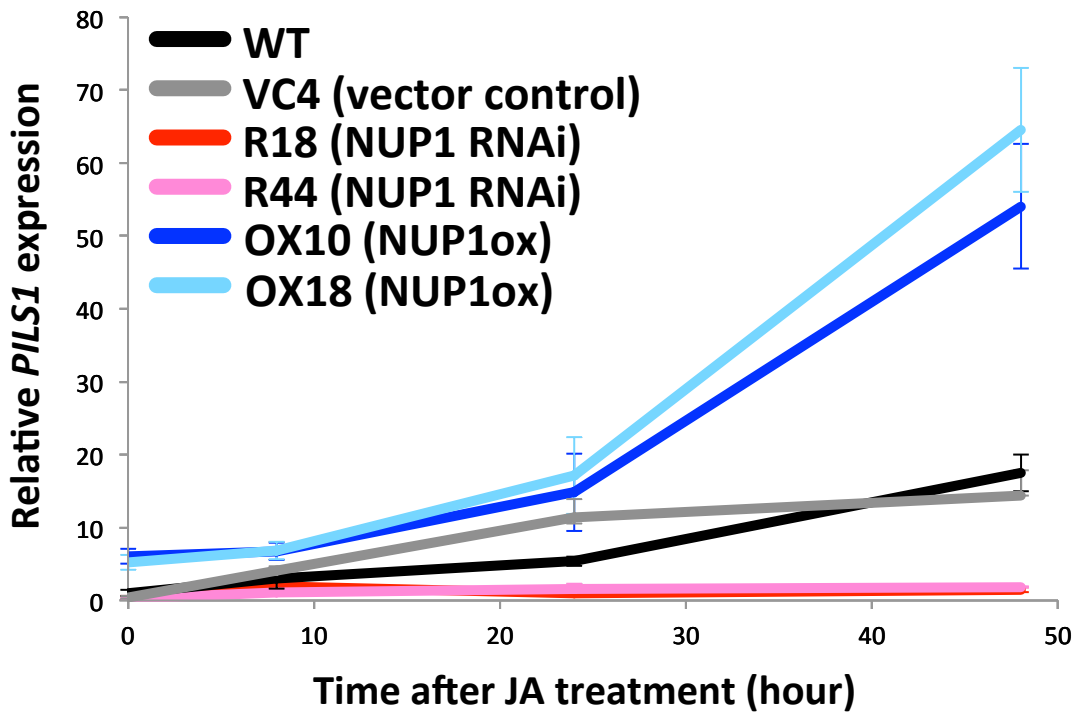


図40. PILSのジャスモン酸誘導性に及ぼすNUP1の影響

NUP1発現抑制および過剰発現BY-2細胞を用いて100 μ M MeJA処理を行い、処理後0、8、24および48時間のPILS1の遺伝子発現をqRT-PCRで解析した。NUP1発現抑制および過剰発現形質転換系統はそれぞれのベクターに対して独立の2系統、ベクターコントロール形質転換系統は1系統を用いた。各カラムは平均値 \pm 標準誤差を示し平均値 \pm 標準誤差を示した。(N = 3)

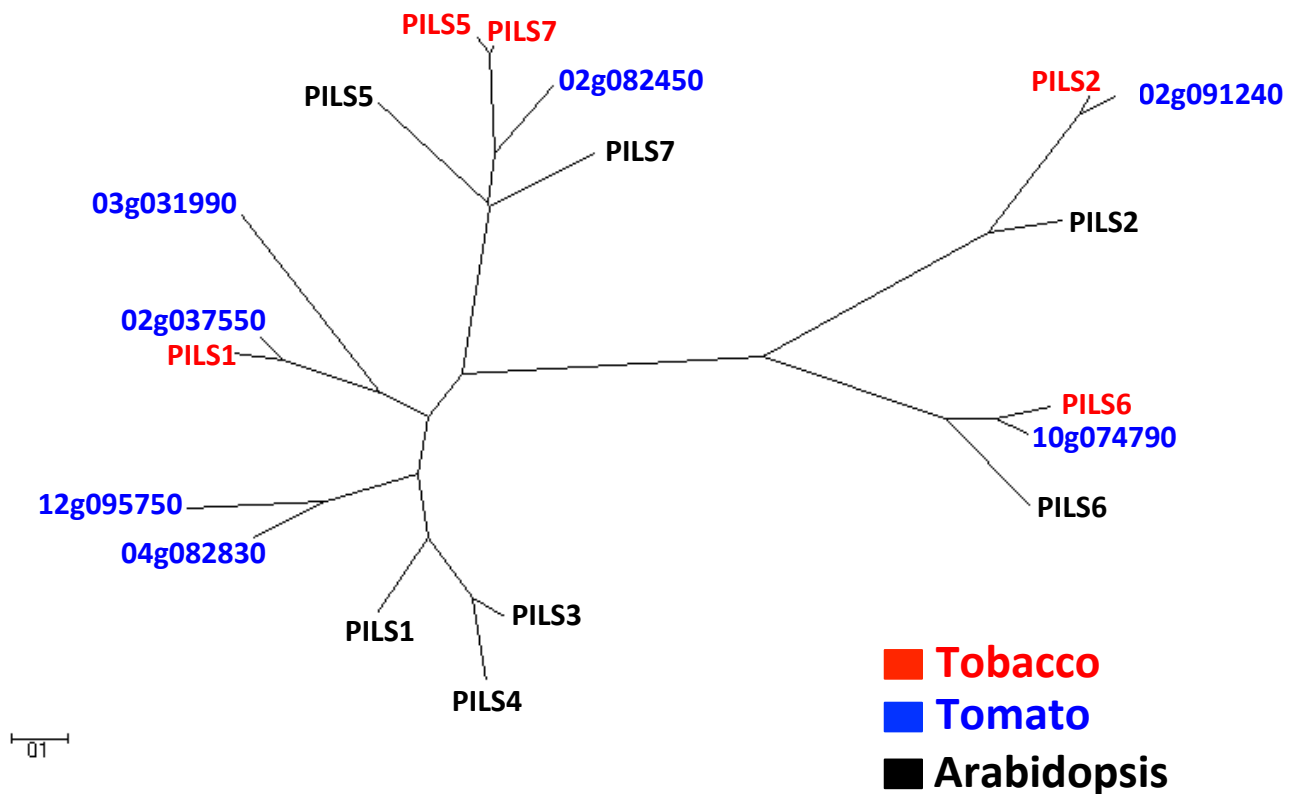


図41. タバコ、トマトおよびシロイヌナズナPILSの系統樹

シロイヌナズナPILSの配列をクエリーにして、Sol genomics network (<http://solgenomics.net>) 内で検索を行った。系統樹作成にはMultiple Sequence Alignment by CLUSTALW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) およびMEGA5.2.1 programを用いた。

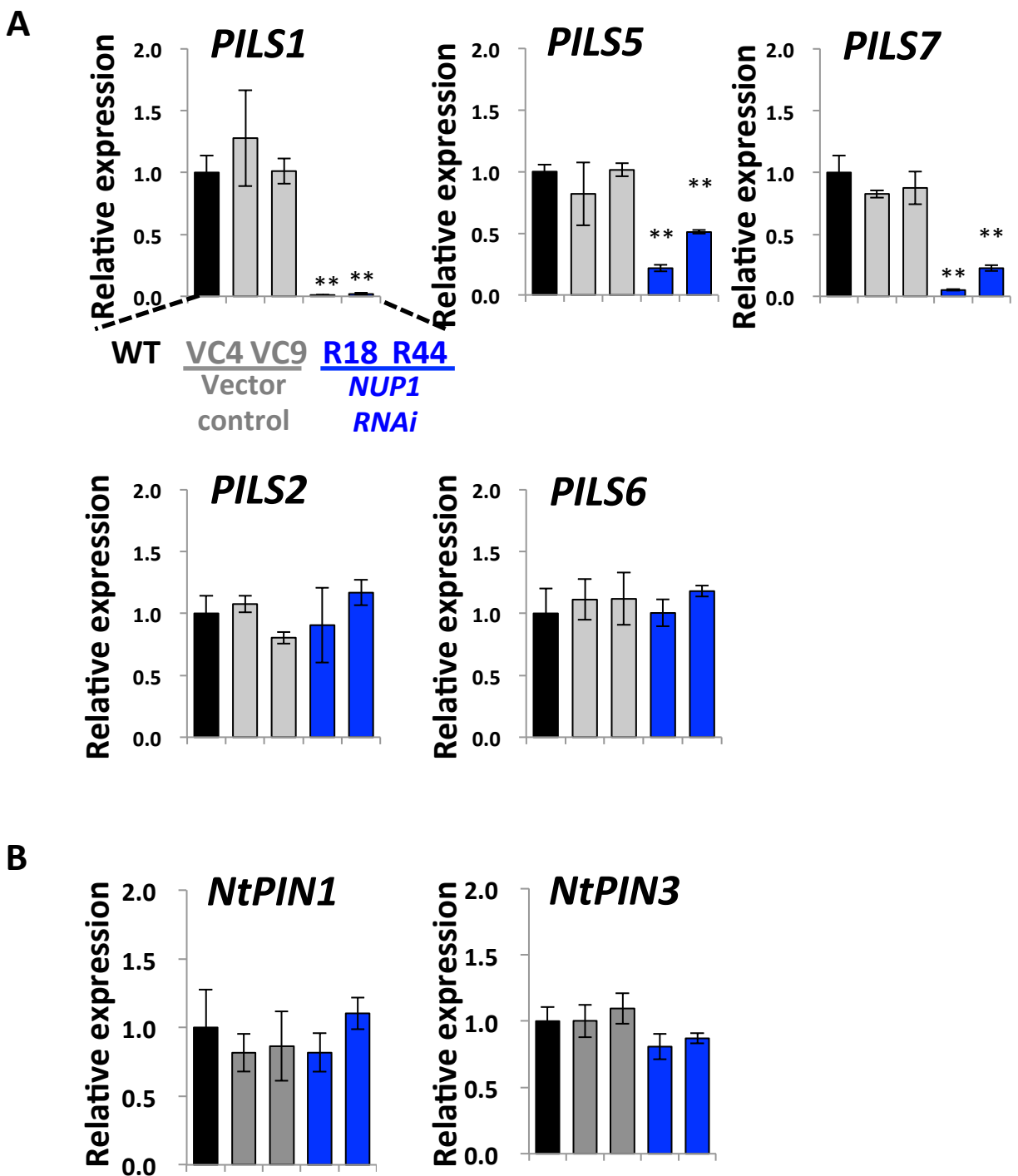


図42. ジャスモン酸誘導時のNUP1発現抑制BY-2細胞におけるPILSおよびPINの発現

ジャスモン酸24時間処理したNUP1発現抑制BY-2細胞におけるオーキシン輸送体であるPILSおよびPINの発現をqRT-PCRを用いて解析した。形質転換系統はそれぞれのベクターに対して独立の2系統を用いた。各カラムは平均値±標準誤差を示し各カラムは平均値±標準誤差を示した。統計処理はStudent's t.testをWTに対して行い、*P<0.05、**p<0.01を示した。(N = 3)

A. PILSの遺伝子発現

B. PINの遺伝子発現発現

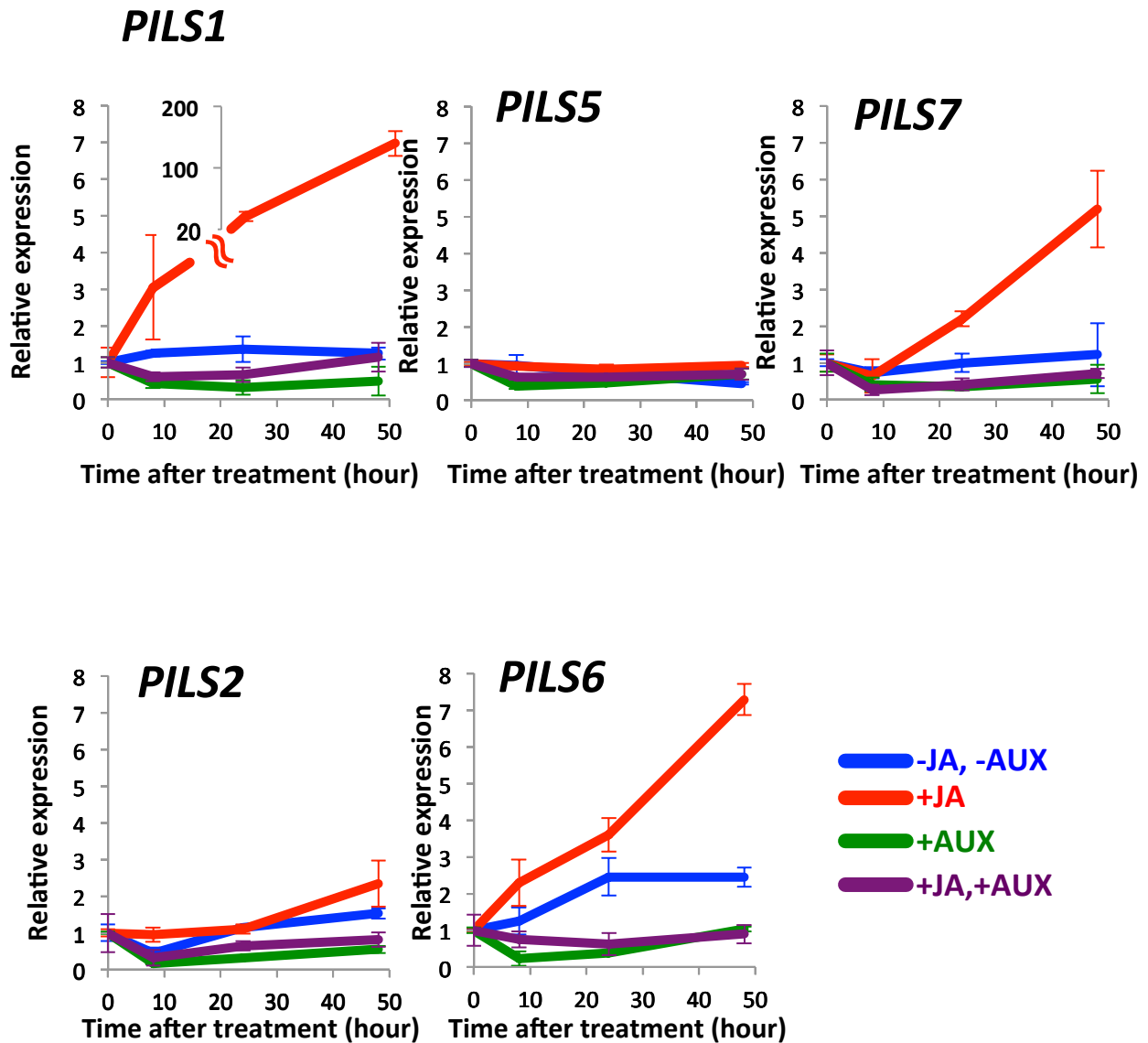


図43. 植物ホルモンを処理における野生型BY-2細胞のPILSの発現の経時変化

野生型BY-2細胞に対しDMSO(-JA, -AUX)、100 μ M MeJA(+JA)、90 μ M 2,4-D(+AUX)および100 μ M MeJAかつ90 μ M 2,4-D(+JA, +AUX)処理を行い、処理後0、8、24および48時間におけるPILSの発現をqRT-PCRを用いて解析した。各カラムは平均値 \pm 標準誤差を示した。(N = 3)

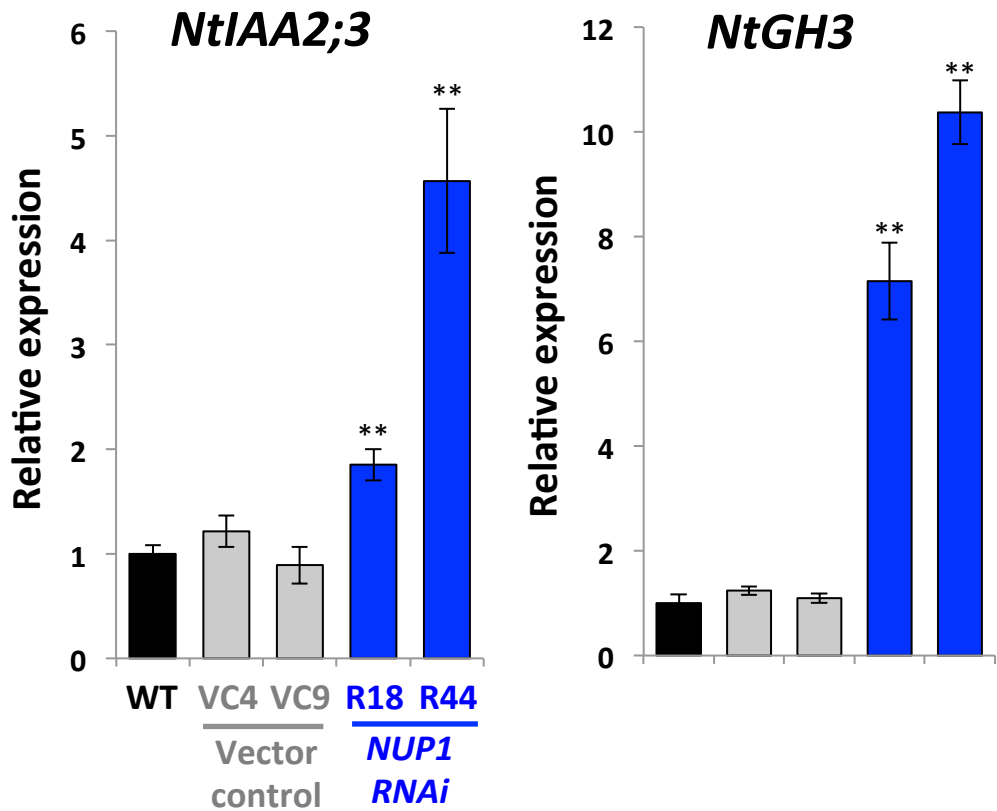


図44. ジャスモン酸誘導時の*NUP1*発現抑制BY-2細胞におけるオーキシン応答遺伝子の発現
 ジャスモン酸処理24時間処理した*NUP1*発現抑制BY-2細胞におけるオーキシン応答遺伝子の発現をqRT-PCRを用いて解析した。形質転換系統はそれぞれのベクターに対して独立の2系統を用いた。各カラムは平均値±標準誤差を示した。統計処理はStudent's t.testをWTに対して行い、* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を示した。(N = 3)

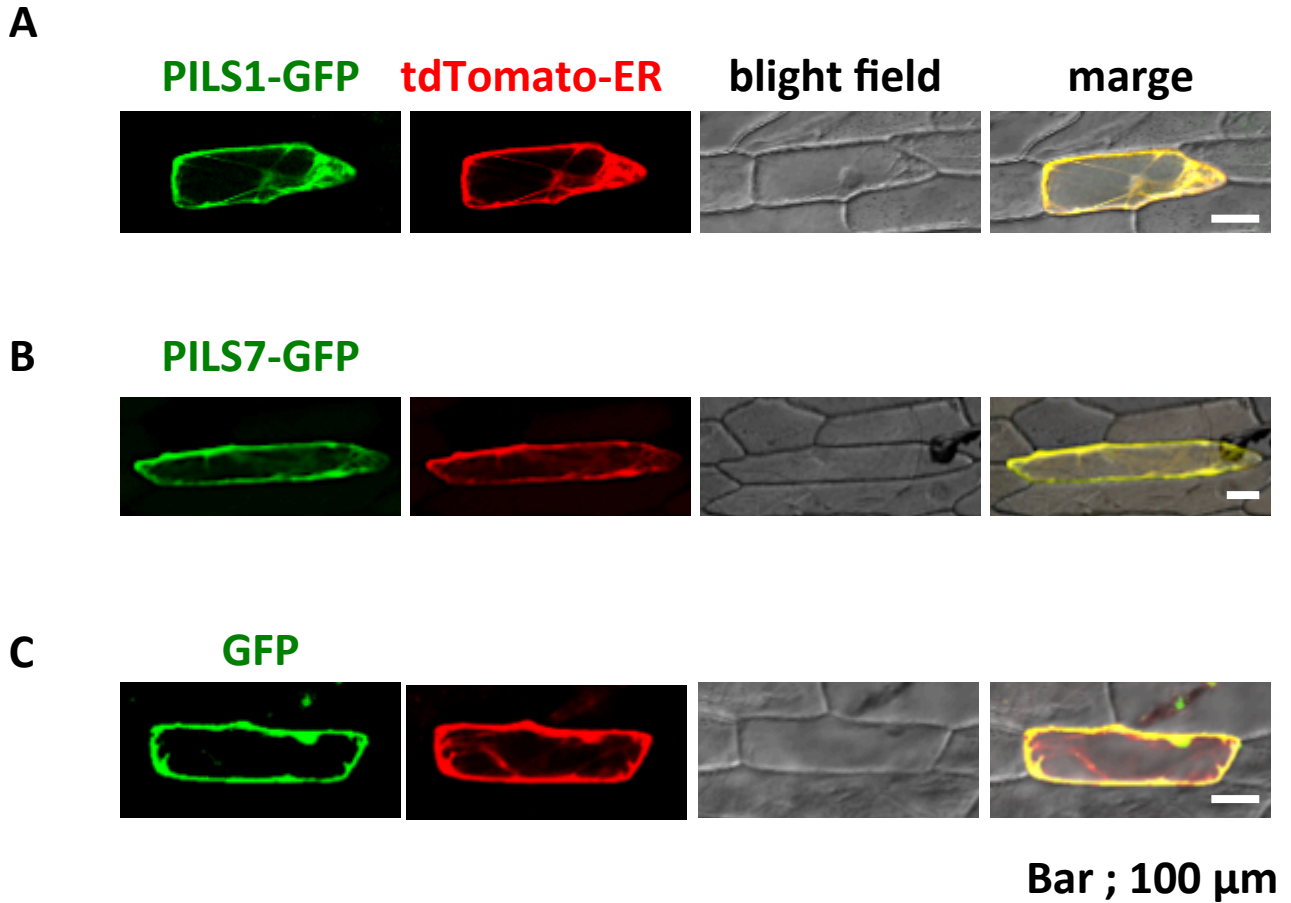


図45. PILS1および7の細胞内局在

PILS1-GFPまたはPILS7-GFPと細胞膜マーカーであるtdTomato-ERをタバコ表皮細胞にco-bombardmentを用い一過的な発現を観察した。観察は打ち込み後12-16時間の細胞を用いた。スケールバーは100 μ mとした。

A. PILS1-GFPおよびtdTomato-ERの局在

B. PILS7-GFPおよびtdTomato-ERの局在

C. GFPおよびtdTomato-ERの局在

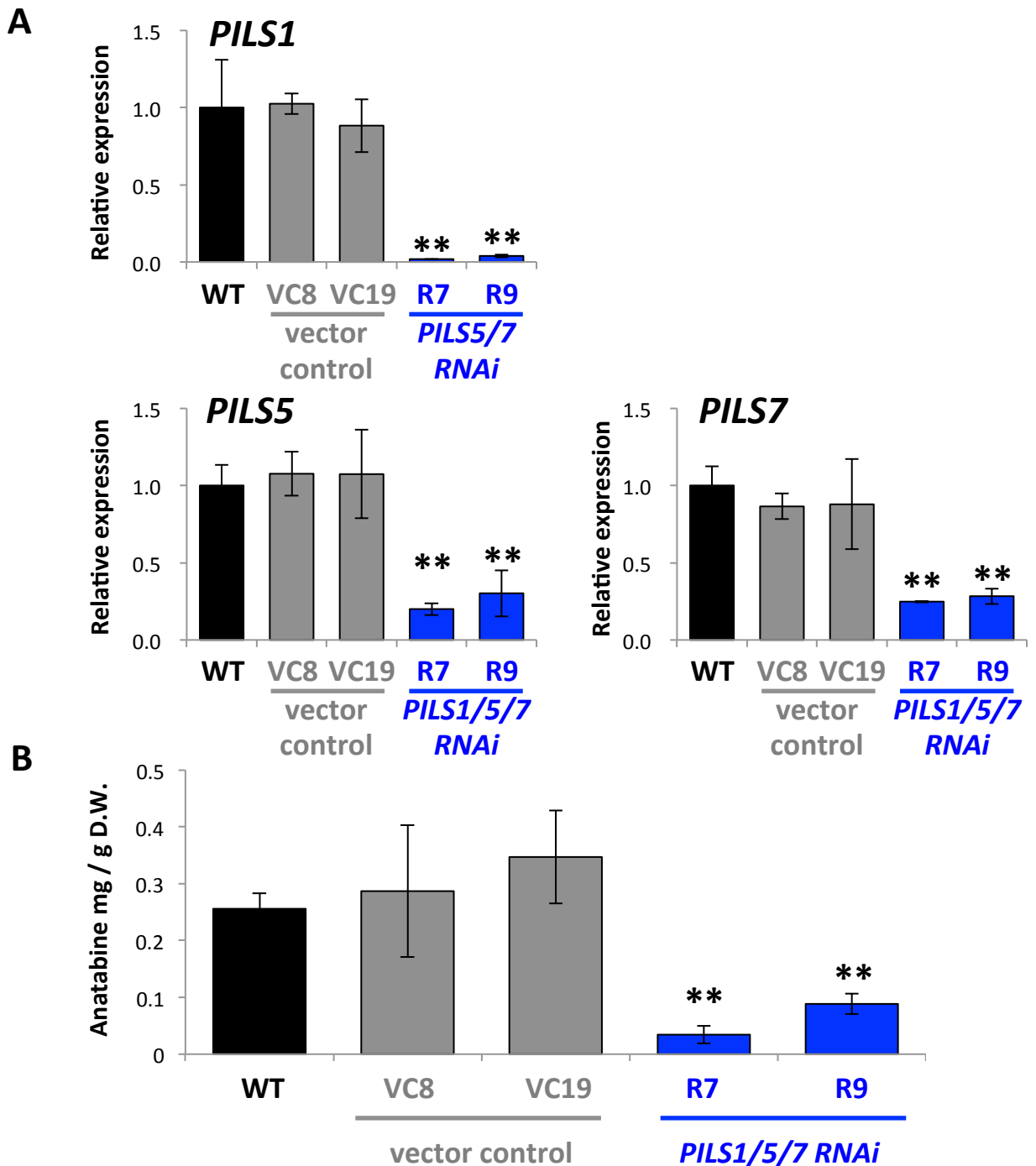


図46. ジャスモン酸誘導時の*PILS1/5/7*発現抑制BY-2細胞の*PILS*遺伝子の発現およびアナタピン蓄積量

100 μ M ジャスモン酸および5 μ M β -estradiolを36時間処理後の*PILS1/5/7*発現抑制BY-2細胞における*PILS*の発現についてqRT-PCRを用い、アナタピン蓄積量についてはGLCを用いて解析した。各カラムは平均値 \pm 標準誤差を示した。形質転換システムはそれぞれのベクターに対して独立の2システムを用いた。統計処理はStudent's t.testをWTに対して行い、* p <0.05、** p <0.01を示した。(N = 3)

A. *PILS1*、5および7の遺伝子発現

B. 蓄積したアナタピン量

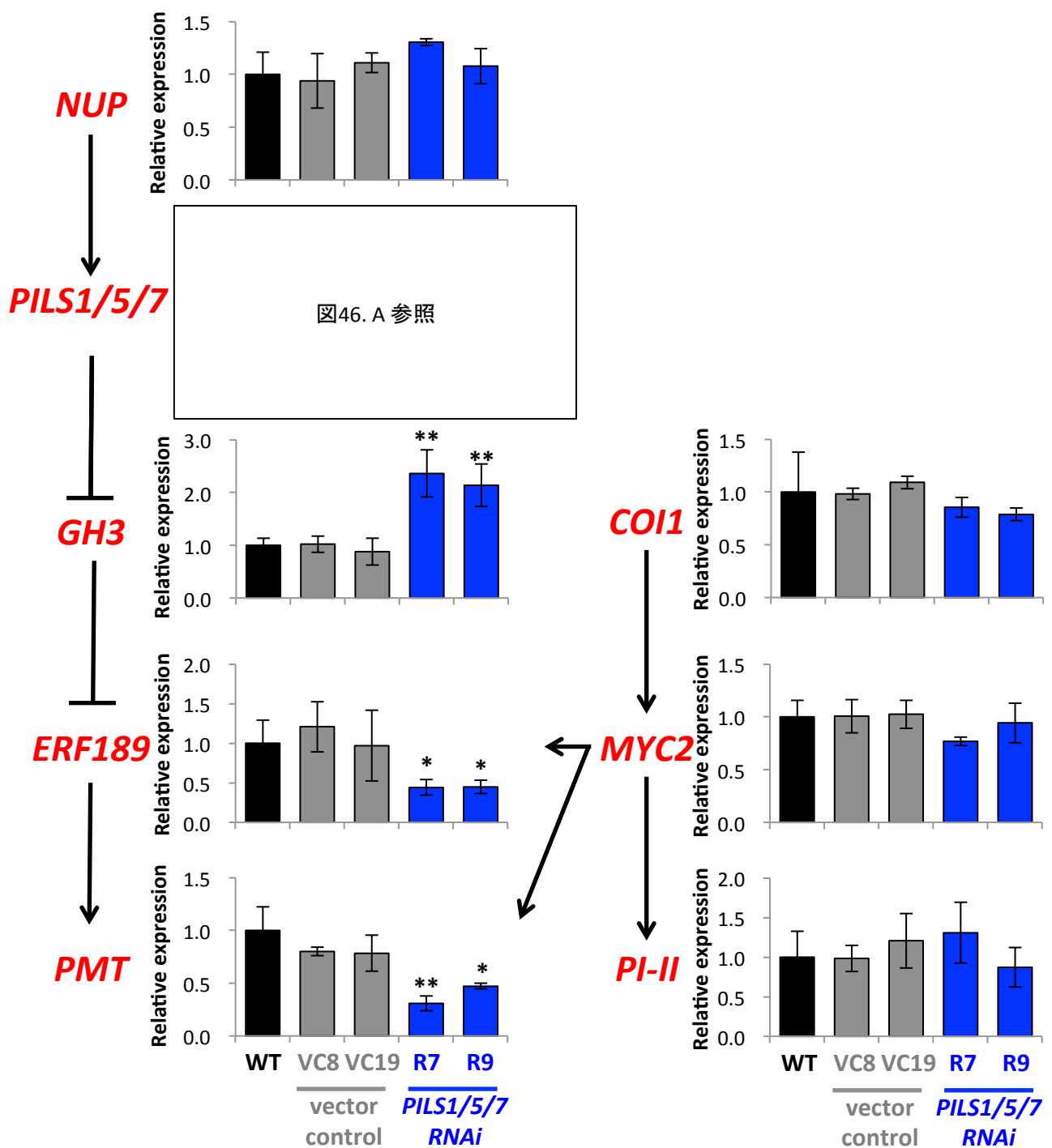


図47. ジャスモン酸誘導時の*PILS1/5/7*発現抑制BY-2細胞における遺伝子発現パターン

100 μ M ジャスモン酸および5 μ M β -estradiolを36時間処理後の*PILS1/5/7*発現抑制BY-2細胞におけるジャスモン酸受容体COI1、MYC2転写因子、防御遺伝子PI-II、ニコチン輸送体NUP1、オーキシン応答性遺伝子GH3、NIC2遺伝子座ERF189転写因子およびニコチン合成遺伝子PMTの遺伝子発現をqRT-PCRを用いて解析した。形質転換システムはそれぞれのベクターに対して独立の2システムを用いた。各カラムは平均値 \pm 標準誤差を示した。統計処理はStudent's t.testをWTに対して行い、*P<0.05、**p<0.01を示した。(N = 3)

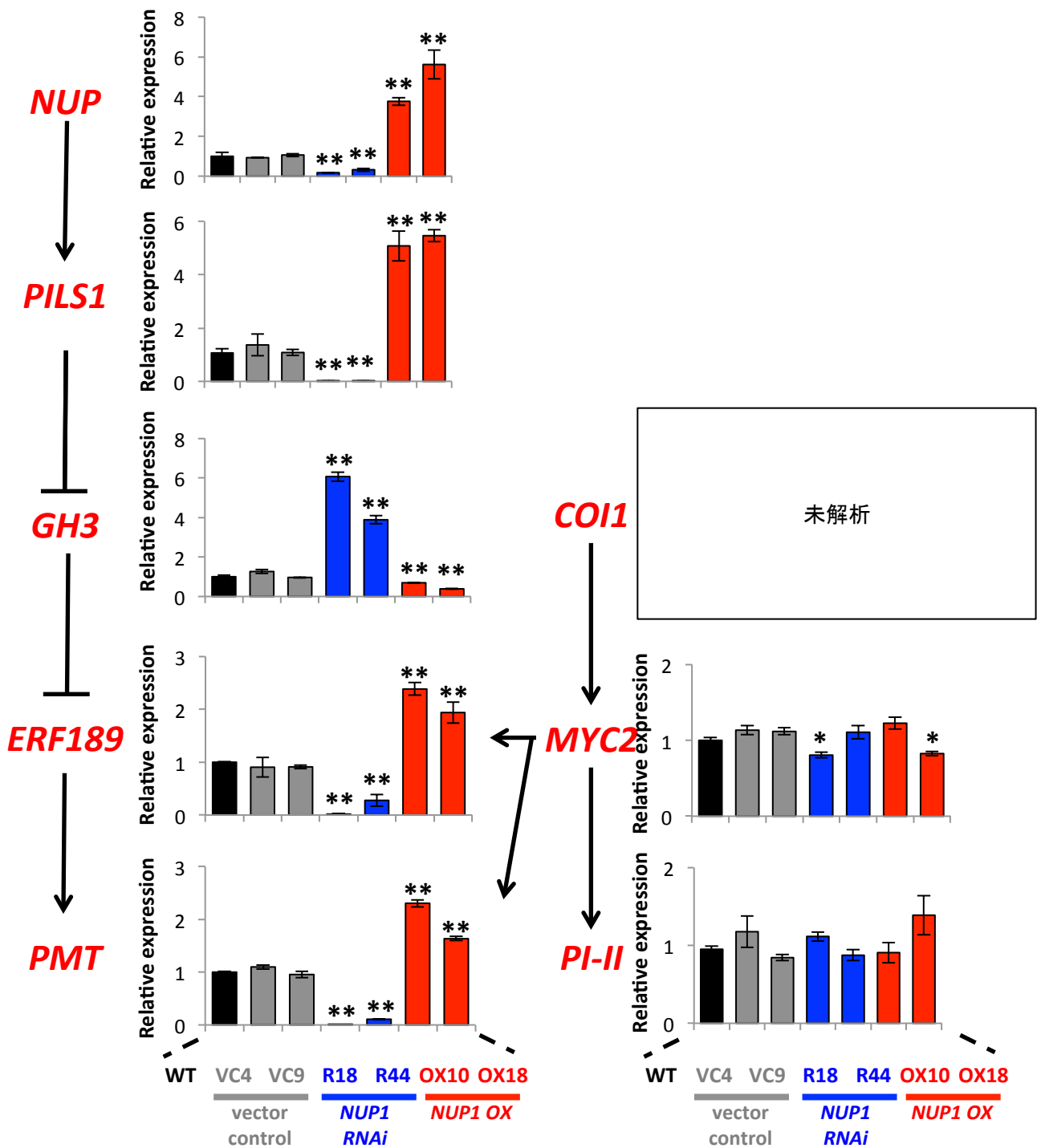


図48. ジャスモン酸誘導時のNUP1発現抑制および過剰発現BY-2細胞における遺伝子発現パターン

100 μ M ジャスモン酸処理24時間後のNUP1発現抑制および過剰発現BY-2細胞におけるジャスモン酸受容体COI1、MYC2転写因子、防御遺伝子PI-II、ニコチン輸送体NUP1、オーキシン応答性遺伝子GH3、NIC2遺伝子座ERF189転写因子およびニコチン合成遺伝子PMTの遺伝子発現をqRT-PCRを用いて解析した。形質転換系統はそれぞれのベクターに対して独立の2系統を用いた。各カラムは平均値 \pm 標準誤差を示した。統計処理はStudent's t.testをWTに対して行い、*P<0.05、**p<0.01を示した。(N = 3)

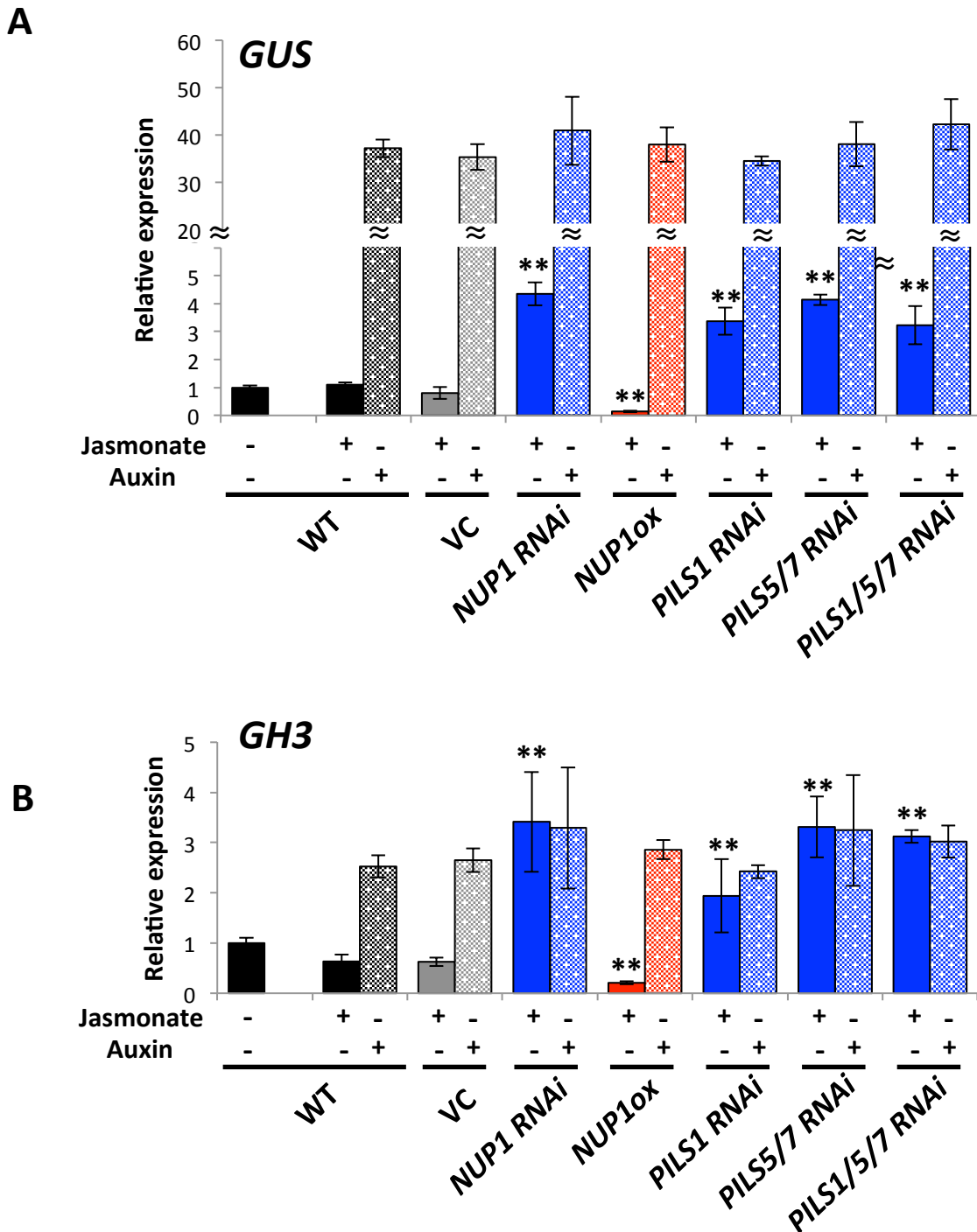


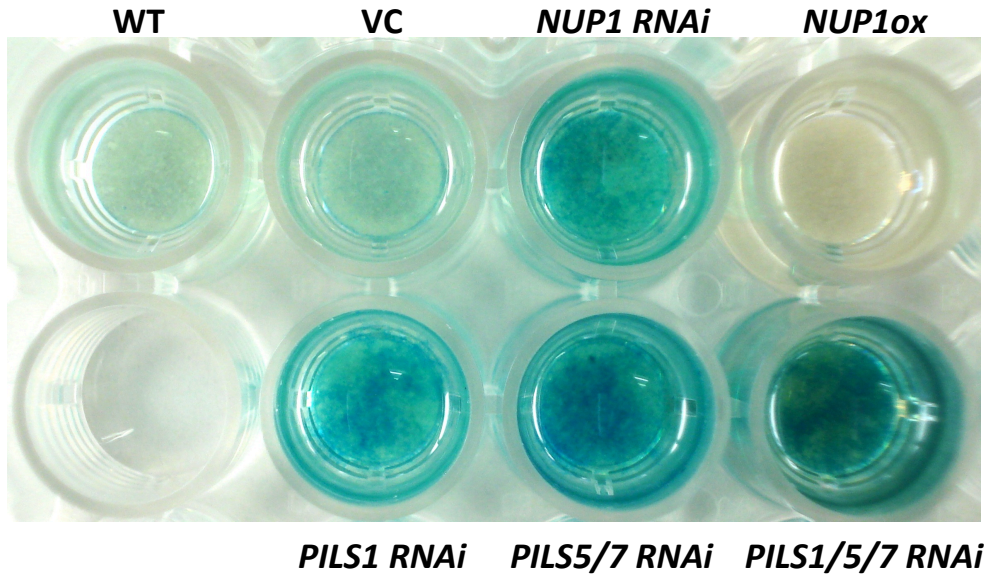
図49. ジャスモン酸およびオーキシン誘導時のオーキシンマーカ-DR5::GUSを導入したNUP1発現抑制および過剰発現、PILS発現抑制BY-2細胞におけるによる遺伝子発現

無処理(-JA、-Aux)、100 μ Mジャスモン酸(+JA)または90 μ M 2,4-D(+Aux)および5 μ M β -estradiolを24時間処理したDR5::GUSを導入したBY-2細胞における、内在性オーキシン応答性遺伝子GH3、外来遺伝子GUSの発現をqRT-PCRを用いて解析した。各形質転換系統は20の独立した系統(PILS1/5/7のみ14の独立した系統)をひとまとめにして解析に用いた。各カラムは平均値 \pm 標準誤差を示した。統計処理はStudent's T.TESTをジャスモン酸処理区だけ行い、WTに対して、*P<0.05、**p<0.01を示した。(N = 3)

A. 外来遺伝子GUSの発現

B. 内在性GH3の発現

A



B

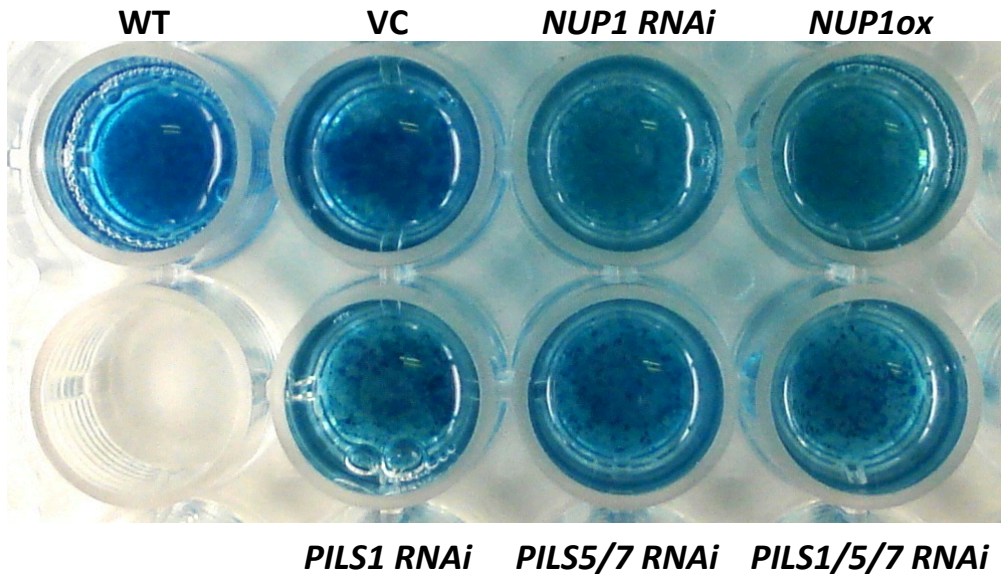


図50. ジャスモン酸およびオーキシシン誘導時のオーキシシンマーカー*DR5::GUS*を導入した*NUP1*発現抑制および過剰発現、*PILS*発現抑制BY-2細胞におけるGUS染色

100 μ M ジャスモン酸または90 μ M 2,4-Dおよび5 μ M β -estradiolを24時間処理した*DR5::GUS*を導入したBY-2細胞におけるGUS染色を示した。GUS染色開始から6時間の細胞の画像を示した。各形質転換系統は20の独立した系統(*PILS1/5/7*のみ14の独立した系統)をひとまとめにして解析に用いた。

A. 100 μ M ジャスモン酸処理後のGUS染色

B. 90 μ M 2,4-D処理後のGUS染色

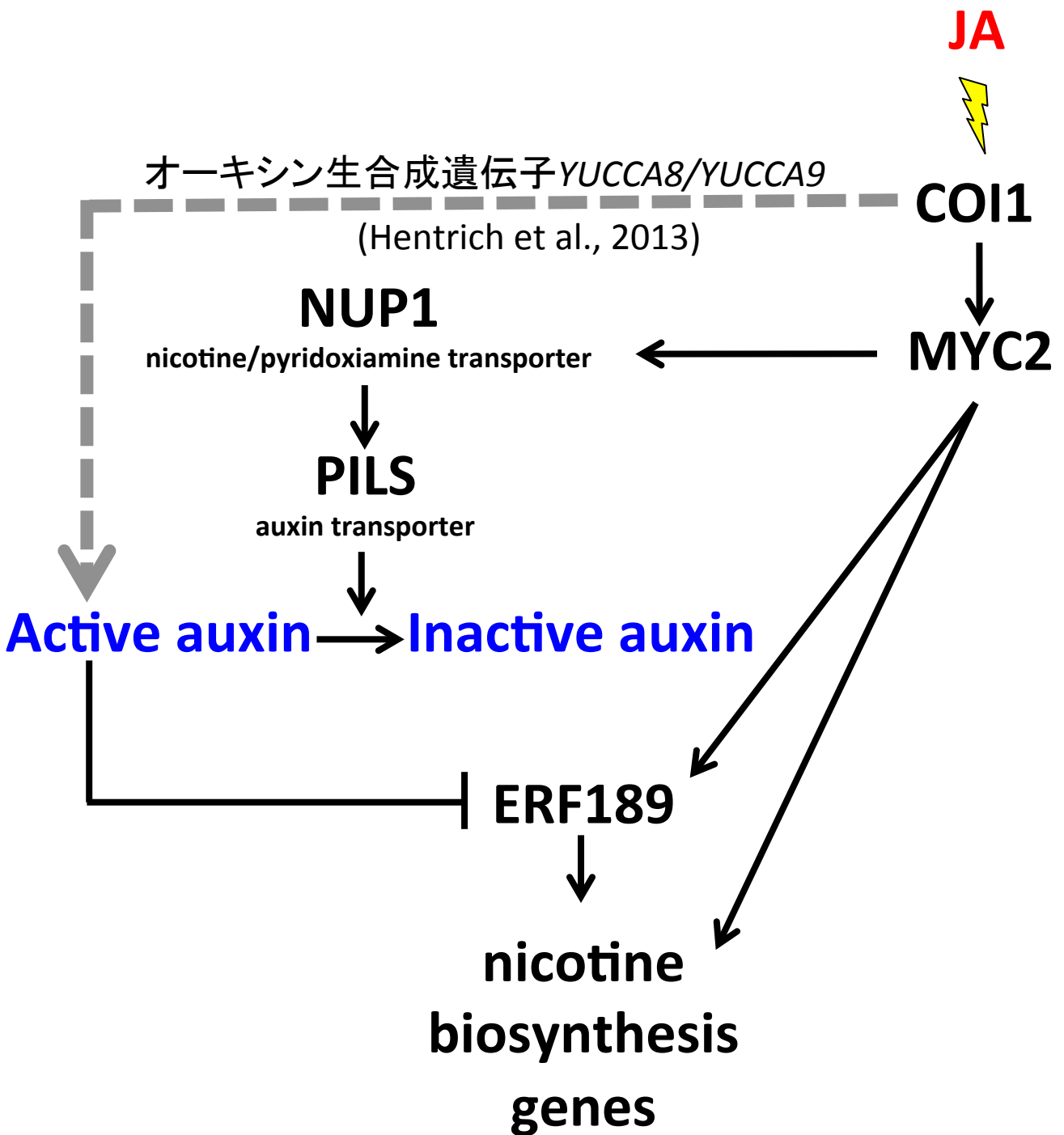


図51. NUP1およびPILS1を介したジャスモン酸とオーキシンのクロストークのモデル

ジャスモン酸シグナル経路を介してニコチン合成が誘導される。シロイヌナズナの研究からジャスモン酸シグナル経路に依存して、オーキシン合成遺伝子が活性化されることも報告されている (Hentrich et al., 2013)。本研究で明らかにしたことは、活性型オーキシンは *ERF189* の発現を抑制する。ジャスモン酸シグナル経路の *MYC2* 転写因子がニコチン・ビタミンB6輸送体の *NUP1* を活性化させ、さらに *NUP1* がオーキシントランスポーターの *PILS* を活性化させる。 *PILS* のオーキシン輸送機能によって活性型オーキシンがER内に輸送されることで、細胞質中の活性型オーキシンが減少する。活性型オーキシンの減少によってオーキシンによる *ERF189* 転写因子への抑制がなくなることで、 *ERF189* が活性化される。

考察

ジャスモン酸は病原菌および昆虫からの防御応答や物理的な傷害応答 (Kessler et al., 2004) に関わり、オーキシンは発生や生長などに関わる重要な植物ホルモンである。それぞれは単独で働くが、ジャスモン酸とオーキシンはお互いのシグナル系に影響を及ぼす (supplement 図 1 ; Kessler et al., 2004, Dombrecht et al., 2007, Grunwald et al., 2009, Hentrich et al., 2013, Jang et al., 2014)。さらにタバコ植物では防御物質であるニコチンの蓄積はジャスモン酸で誘導され、一方でオーキシンはニコチン生合成を抑制されることが知られている (Hashimoto et al., 1986, Baldwin, 1988)。しかし、オーキシンのジャスモン酸とのニコチン蓄積への相互作用の分子メカニズムは未解明である。

本研究では *NUPI* 発現抑制 *BY-2* 細胞を用いたマイクロアレイ解析から、*NUPI* 発現抑制株で有意に発現が低下している *PILS* (*PIN*-likes) を見いだした。シロイヌナズナ *PILS* は ER 局在を示し、細胞質中の活性型フリーオーキシンを ER ルーメン内に輸送する。さらにアミノ酸結合型オーキシンの変化させ ER 内に格納することで、細胞内で機能するオーキシンのレベルを制御している (Barbez et al., 2012)。タバコ *PILS* もシロイヌナズナ *PILS* と同様に、細胞内の活性型フリーオーキシンのレベルを調節しているのではないかと推察し、本研究を行った。

タバコにおけるジャスモン酸経路からニコチン生合成経路における代表的な因子である *MYC2* 転写因子、ニコチン合成のマスター転写因子 *NIC2* 遺伝子座 *ERF189* およびニコチン生合成酵素 *PMT* を用いて、ジャスモン酸およびオーキシンの応答性を解析したところ、これらの遺伝子発現はジャスモン酸で発現上昇し、オーキシンの抑制されることが明らかになった(図 39)。この解析からジャスモン酸シグナル経路の活性化をオーキシンの転写レベルで抑制すると示唆される。トロパンアルカロイドのヒヨシアミンやスコポラミンを産生するナス科 *Hyoscyamus* 種ではオーキシンの濃度依存的にこれらアルカロイドの蓄積量が減少する (Hashimoto et al., 1986)、またタバコ *N.sylvestris* では葉へのダメージによるジャスモン酸の蓄積がアルカロイド蓄積の引き金であり、オーキシン処理によってそのアルカロイド蓄積が阻害される (Baldwin, 1988)。傷害応答としてジャスモン酸シグナル経路を経る二次代謝産物の増加はオーキシンによって抑制されることが示唆される。

マイクロアレイ解析から *NUPI* 発現抑制株で *PILS1* が強く抑制され (表 1)、

qRT-PCR から *PILS1* はもちろんのこと、さらに *PILS5* および 7 も抑制されることが明らかになった(図 40)。オーキシン代謝に関わる因子として生合成酵素 SUR1(Boerjan et al., 1995) や YUCCA(Zhao et al., 2001)、輸送体 ABCB(Titapiwatanakun et al., 2009)、PIN(Galweiler et al., 1998) や AUX1/LUX(Swarup et al., 2001)、アミノ酸結合酵素 GH3(Staswick, 2005)、IAR(Lasswell et al. 2000; Magidin et al. 2003)や ILR(LeClere et al. 2004)など、さらにオーキシシングナるに関わる TIR1(Ruegger et al., 1997)など多数報告されている。本研究のマイクロアレイ解析において *NUP1* 発現抑制株で有意に上昇または減少しているオーキシン関連因子はなかったことから、*NUP1*→*PILS* のジャスモン酸誘導性の特異的な制御機構が存在することが示唆される。また *PILS1*、6 および 7 はジャスモン酸誘導性を示した(図 43)。シロイヌナズナにおいてジャスモン酸誘導性のオーキシン生合成遺伝子 *YUCCA8/9* (Hentrich et al., 2013)、tryptophan synthase α/β (TSA/TSB) (Dombrecht et al., 2007)が報告され(supplement 図 1)、ジャスモン酸シグナルを受けてオーキシン生合成経路が活性化される。ジャスモン酸誘導性の MYC2 転写因子→*NUP1*→*PILS* の経路もジャスモン酸とオーキシンの相互関係を説明する一例である。

タバコ *PILS* がシロイヌナズナ *PILS* と同様の機能を有するか解析したところ、*PILS1* および 7 は ER 局在を示し(図 45)、おそらく他のタバコ *PILS* も ER 局在を示すと推察される。さらに *PILS* 発現抑制 BY-2 細胞におけるジャスモン酸誘導によるニコチン蓄積へのオーキシンの影響を確認するために、内在性のオーキシン応答遺伝子 *GH3* の発現を解析したところ、これら発現抑制株で発現が上昇していた。これは *PILS* 発現抑制株で活性型フリーオーキシン量が増加し、さらに増加した活性型フリーオーキシンによって *NIC2* 遺伝子座 ERF189 転写因子の抑制を介し、下流の *PMT* を含むニコチン生合成全体が抑制された。この結果はジャスモン酸誘導時における *PILS*→*NIC2* 遺伝子座 ERF189 転写因子を介した細胞内活性型フリーオーキシンの抑制による制御機構が存在することを強く示唆する。

本研究では BY-2 細胞を用いて解析を行ったが、*NUP1* および *PILS* のさらなる表現型として、タバコ *NUP1* 発現抑制形質転換植物体では根の成長が促進し(Hildreth et al., 2011)、さらにシロイヌナズナ *pils2pils5* 変異体で根の成長が促進することが報告されている(Bardez et al., 2012)。本研究の *NUP1*→*PILS* のシグナル系から推察すると、タバコ *NUP1* 発現抑制形質転換植物体での根の成長促進

は *NUP1* の直接の表現型ではなく、*PILS* の発現抑制を介したオーキシシンによる表現型が間接的に現れているのではないかと推察する。本研究では根の生育に関する表現型は解析していないので、*NUP1* 発現抑制および過剰発現形質転換植物を用いた表現型解析を行う必要がある。

次に活性型フリーオーキシシンの定量を 2 種類の方法で行った。1 点目は活性型フリーオーキシシンおよび不活性型アミノ酸結合型オーキシシン量を LC/MS で定量する。2 点目はオーキシシンレポーターである *DR5 :: GUS* を用いた間接的な定量を試みた。1 点目の LC/MS による直接的な定量については、現段階では解析に失敗している。原因として BY-2 細胞では天然型オーキシシン IAA の全体量が非常に低く LC/MS の検出限界以下であった。具体的には IAA-Asp、IAA-Ala および IAA-Phe ではおよそ 1pg / 100 mg F.W.以下、IAA-Trp、IAA-Ile および IAA-Leu ではおよそ 5 pg / 100 mg F.W.以下であった。Bardez ら(2012)の報告では IAA-Asp はオーキシシン全体量の 0.1 %程度となっていることから、非常に微量な差異を検出しなければならないため、実験系を再構築する必要があると考えられる。2 点目の *DR5 :: GUS* を用いた間接的な定量においては *PILS* 発現抑制、*NUP1* 発現抑制および過剰発現 BY-2 を用いて多重変異体を作成し、解析を行った。ジャスモン酸処理によって *PILS* および *NUP1* 発現抑制株では *GUS* および *GH3* の発現が有意に上昇していたこと、また *NUP1* 過剰発現株において *NUP1* 発現抑制株と逆の結果となり、ニコチン/ビタミン B6 輸送体の *NUP1* からオーキシシン輸送体 *PILS* を介した細胞内活性型フリーオーキシシンへの制御が強く示唆される。

アミノ酸結合型オーキシシンはオーキシシン全体からすると非常に微量で(Bardez et al., 2012)、活性型オーキシシンの量には大きな変化を与えていないと考えられる。しかし *DR5 :: GUS* 導入した多重変異体の解析から、活性型オーキシシンレベルに非常に大きな差があった。これは *PILS* 以外のオーキシシン関連因子が変化していると考えるのが妥当である。シロイヌナズナではジャスモン酸誘導性のオーキシシン生合成遺伝子 *YUCCA8/9* (Hentrich et al.,2013)、tryptophan synthase α / β (TSA/TSB) (Dombrecht et al., 2007)が報告されている(supplement 図 1)。これはタバコ植物でもジャスモン酸誘導性のオーキシシン生合成遺伝子が増加している可能性がある。しかし本研究のマイクロアレイ解析からはオーキシシン生合成遺伝子の変化は認められなかった。本研究で用いたマイクロアレイにはジャスモン酸誘導性のオーキシシン生合成遺伝子のプローブが載っていなかった可能性があり、実際に qRT-PCR で確認していく必要がある。

本研究ではタバコ植物における NUP1→PILS→NIC2 遺伝子座 *ERF189* 転写因子に続く、ジャスモン酸誘導時の活性型オーキシシン抑制機構が機能している可能性が強く示唆される(図 51)。NUP/PUP 型輸送体は進化的にシダ植物以降の高等植物には広く存在し(Jelesko, 2012)、かつ複数個存在すると考えられる。また PILS についてもコケ植物以上には存在している(Feraru et al., 2012)ことが明らかになっている。本研究で明らかになったように MYC2 転写因子 → NUP → PILS シグナル系が広く存在し、オーキシシンシグナルによる調節を行っている可能性がある。これは他の植物において、ジャスモン酸シグナルとオーキシシンシグナルの相互作用の解明への有力なツールとなると期待できる。

本研究ではジャスモン酸シグナル経路から派生した MYC2 転写因子 → NUP 輸送体 → PILS 輸送体と続く経路によってオーキシシンシグナルを制御していることが明らかになった。つまりタバコ植物ではジャスモン酸によるニコチン蓄積を誘導するシグナルと同時に、ジャスモン酸シグナルを抑制するオーキシシンシグナルをよくせいすることで、より効率的にジャスモン酸が機能するように植物体内の環境を制御し、ニコチン蓄積を行っているかと推察される。

「

総括

本研究ではニコチン/ビタミン B6 取り込み輸送体 NUP1 の機能解析を行った。これより、NUP1 は3つの機能があることが明らかになった。

1. NUP1 はニコチンを含むアルカロイドおよびビタミン B6 を細胞内に輸送する。

NUP1 はタバコ植物の根の細胞膜に局在する 10 膜貫通型の輸送体であり、ニコチンを含むアルカロイドやビタミン B6 を輸送基質としていた。輸送特性としてアポプラストから細胞内への輸送を担っており、おそらくシロイヌナズナ PUP1 の輸送特性から推察すると H^+ を駆動力としていると考えられる(図 16)。

2. NUP1 は根から葉へニコチンを組織間輸送を制御する。

NUP1 は生合成されたニコチンを根から葉への組織間輸送を担っている。特に根でのニコチンの道管へのローディングに関与していると考えられる(図 30)。

3. NUP1 はジャスモン酸シグナルに誘導され、PILS 輸送体を介した、オーキシシンシグナルの抑制に関与している。

ジャスモン酸シグナル経路の MYC2 転写因子依存的に NUP1 の発現が誘導される。さらに NUP1 依存的に ER 局在型でジャスモン酸誘導性オーキシシン輸送体 PILS の発現が誘導され、活性化された PILS によって細胞質中の活性型フリーオーキシシンを ER ルーメン内に輸送し、不活性型のアミノ酸結合型オーキシシンにすることで、細胞内で機能する活性型フリーオーキシシンを減少させる。これによりジャスモン酸誘導性の *NIC2* 遺伝子座 *ERF189* 転写因子の活性化を介し、ニコチン生合成を促進する。つまりジャスモン酸によるニコチン蓄積を誘導するシグナルと同時に、ジャスモン酸シグナルを抑制するオーキシシンシグナルを抑えることで、より効率的にジャスモン酸が機能するように植物体内の環境を制御し、ニコチン蓄積を行っていると考えられる(図 51)。

謝辞

本研究を進めるにあたり多大なるご助言・ご指導をいただ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細胞機能の橋本隆教授に心より感謝いたします。また副査をつとめていただ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出村教授、高山教授には深く感謝いたします。

本研究における酵母での解析にご協力頂きました神戸薬科大学生薬化学研究室反伸和准教授、植物ホルモン解析 LC/MS 解析は理化学研究所生産機能グループ榊原均博士および小嶋美紀子氏には深く感謝いたします。

pUGWB2-tagRFP を分与して頂いた奈良先端科学技術大学院大学植物グローバル稲田のりこ博士、pDR196 を分与頂いたカーネギー研究所 Wolf Frommer 博士、pDR196GW を分与して頂いた矢崎一史教授、tdTomato-ER を分与して頂いた奈良先端科学技術大学院大学中島敬二教授、酵母 AD12345678 を分与して頂いたルーバンカトリック大学 Andre Goffeau 博士、pBm43GW / DR5 :: GUS を分与していただいたヘルシンキ大学 Antti-Pekka Tuovinen 博士には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植物細胞機能（旧植物遺伝子機能学）研究室ニコチングループ庄司翼助教、梶川昌孝博士(現京都大学)には先行研究で作成したベクターを分与していただき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植物細胞機能（旧植物遺伝子機能学）研究室スタッフをはじめといたします講座の皆様にも心より感謝いたします。

最後になりましたが私が研究を続けられ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。

加藤 啓太

参考文献

An, G. (1985). High Efficiency Transformation of Cultured Tobacco Cells. *Plant Physiol.* 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 Mol. Biol.* 27, 1197-1204.

Baldwin, I.T. (1988). Damage-induced alkaloids in tobacco - pot-bound plants are not inducible. *J. Chem. Ecol.* 14(4), 1113-1120.

Barbez, E., Kubeš, M., Rolčík, J., Béziat, C., Pěňčík, A., Wang, B., Rosquete, M.R., Zhu, J., Dobrev, P.I., Lee, Y., Zažímalová, E., Petrášek, J., Geisler, M., Friml, J. and Kleine-Vehn, J. (2012). A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants. *Nature* 485, 119–122.

Berger, S., Bell, E., and Mullet, J.E. (1996). Two Methyl Jasmonate-Insensitive Mutants Show Altered Expression of AtVsp in Response to Methyl Jasmonate and Wounding. *Plant Physiol.* 111, 525–531.

Bhatia, R. and Calvo, K.C. (1996). The Sequencing, expression, purification and steady-state kinetic analysis of quinolinate phosphoribosyltransferase from *Escherichia coli*. *Arch Biochem. Biophys.* 325, 270-278

Blechert, S., Brodschelm, W., Hölder, 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.* 92, 4099–4105.

Boerjan, W., Cervera, M.T., Delarue, M., Beeckman, T., Dewitte, W., Bellini, C., Caboche, M., Onckelen, H.V., Montagu, M.V., and Inzé, D. (1995). Superroot, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *Plant Cell* 7, 1405–1419.

Bürkle, L., Cedzich, A., Döpke, C., Stransky, H., Okumoto, S., Gillissen, B., Kühn, C., and Frommer, W.B. (2003). Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *Plant J.* 34, 13–26.

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. *Funct. Plant Biol.* 32, 305–320.

Cedzich, A., Stransky, H., Schulz, B., and Frommer, W.B. (2008). Characterization of Cytokinin and Adenine Transport in *Arabidopsis* Cell Cultures. *Plant Physiol.* 148, 1857–1867.

Chen, H. and Xiong, L. (2005). Pyridoxine is required for post-embryonic root development and tolerance to osmotic and oxidative stresses: Pyridoxine and root growth and stress tolerance. *Plant J.* 44, 396–408.

Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., García-Casado, G., López-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Micol, J.L. and Solano, R. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448, 666–671.

Dalton, D.R., (1980). Biosynthesis of nicotinic acid. In: Gassman, P. (Ed.), *Studies in Organic Chemistry*. Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong, pp. 147–149.

Dargeviciute, A., Roux, C., Decreux, A., Sitbon, F. and Perrot-Rechenmann, C. (1998). Molecular Cloning and Expression of The Early Auxin-Responsive Aux/IAA Gene Family in *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Physiol.* 39, 993–1002.

Decottignies, A., Grant, A.M., Nichols, J.W., Wet, H. de, McIntosh, D.B., and Goffeau, A. (1998). ATPase and Multidrug Transport Activities of the Overexpressed Yeast

ABC Protein Yor1p. *J. Biol. Chem.* 273, 12612–12622.

Dombrecht, B., Xue, G.P., Sprague, S.J., Kirkegaard, J.A., Ross, J.J., Reid, J.B., Fitt, G.P., Sewelam, N., Schenk, P.M., Manners, J.M. and Kazan K. (2007). MYC2 Differentially Modulates Diverse Jasmonate-Dependent Functions in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 2225–2245.

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

Eyal, Y., Sagee, O. and Fluhr, R. (1992). Dark-induced accumulation of a basic pathogenesis-related (PR-1) transcript and a light requirement for its induction by ethylene. *Plant Mol. Biol.* 19, 589–599.

Elena Feraru, E., Vosolsobe, S., Feraru, M.I., Jan Petrášek, J., and Kleine-Vehn, J. (2012). Evolution and structural diversification of PILS putative auxin carriers in plants. *Front. Plant Sci.* 3:227

Feys, B., Benedetti, C.E., Penfold, C.N. and Turner, J.G. (1994). Arabidopsis Mutants Selected for Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate, and Resistant to a Bacterial Pathogen. *Plant Cell* 6, 751–759.

Galweiler L, Guan C, Muller A, Wisman E, Mendgen K, Yephremov A. and Palme K. (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue. *Science* 282, 2226–2230.

Gillissen, B., Bürkle, L., André, B., Kühn, C., Rentsch, D., Brandl, B. and Frommer, W.B. (2000). A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in Arabidopsis. *Plant Cell* 12, 291–300.

Goossens, A., Häkkinen, S.T., Laakso, I., Seppänen-Laakso, T., Biondi, S., Sutter, V.D., Lammertyn, F., Nuutila, A.M., Söderlund, H., Zabeau, M., Inzé, D. and Oksman-Caldentey K.M. (2003). A functional genomics approach toward the

understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 8595–8600.

Grunewald, W., Vanholme, B., Pauwels, L., Plovie, E., Inzé, D., Gheysen, G. and Goossens, A. (2009). Expression of the Arabidopsis jasmonate signalling repressor JAZ1/TIFY10A is stimulated by auxin. *EMBO Rep.* 10, 923–928.

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.

Gundlach, H., Müller, M.J., Kutchan, T.M. and Zenk, M.H. (1992). Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 2389–2393.

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*. *Planta* 178, 123–130.

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*. *Planta* 178, 123–130.

Hashimoto, T., and Yamada, Y. (1994). Alkaloid biogenesis: molecular aspects. *Annual Review of Plant Biol.* 45, 257–285.

Hashimoto, T., Yukimune, Y. and Yamada, Y. (1986). Tropane Alkaloid Production in *Hyoscyamus* Root Cultures. *J. Plant Physiol.* 124, 61–75.

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

Hentrich, M., Böttcher, C., Düchting, P., Cheng, Y., Zhao, Y., Berkowitz, O., Masle, J., Medina, J., and Pollmann, S. (2013). The jasmonic acid signaling pathway is linked to

auxin homeostasis through the modulation of YUCCA8 and YUCCA9 gene expression. *Plant J.* 74, 626–637.

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

Hildreth, S.B., Gehman, E.A., Yang, H., Lu, R.-H., C, R.K., Harich, K.C., Yu, S., Lin, J., Sandoe, J.L., Okumoto, S., Murphy, A.S., and Jelesko J. G. (2011). Tobacco nicotine uptake permease (NUP1) affects alkaloid metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 18179–18184.

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 Mol. Biol.* 38, 1101-1111.

Jack, D.L., Yang, N.M., and H Saier, M. (2001). The drug/metabolite transporter superfamily. *Euro. J. Biochem.* 268, 3620–3639.

Jang, J.Y., Kim, D.G., Kim, Y.O., Kim, J.S., and Kang, H. (2004). An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 54, 713–725.

Jelesko, J.G. (2012). An expanding role for purine uptake permease-like transporters in plant secondary metabolism. *Front. Plant. Sci.* 3, 78

Kajikawa, M., Hirai, N., and Hashimoto, T. (2009). A PIP-family protein is required for biosynthesis of tobacco alkaloids. *Plant Mol. Biol.* 69, 287–298.

Kajikawa, M., Shoji, T., Kato, A., and Hashimoto, T. (2011). Vacuole-Localized Berberine Bridge Enzyme-Like Proteins Are Required for a Late Step of Nicotine Biosynthesis in Tobacco. *Plant Physiol.* 155, 2010–2022.

Katoh, A., and Hashimoto, T. (2004). Molecular biology of pyridine nucleotide and nicotine biosynthesis. *Front Biosci* 9, 1577–1586.

Katoh, A., Uenohara, K., Akita, M., and Hashimoto, T. (2006). Early Steps in the Biosynthesis of NAD in Arabidopsis Start with Aspartate and Occur in the Plastid. *Plant Physiol.* 141, 851–857.

Katoh A, Shoji T, Hashimoto T, (2007), Molecular cloning of N-methylputrescine oxidase from tobacco. *Plant Cell Physiol.* 48: 550–554

Kessler, A. (2004). Silencing the Jasmonate Cascade: Induced Plant Defenses and Insect Populations. *Science* 305, 665–668.

Kidd, S.K., Melillo, A.A., Lu, R.H., Reed, D.G., Kuno, N., Uchida, K., Furuya, M., Jelesko, J.G., (2006). The A and B loci in tobacco regulate a network of stress response genes, few of which are associated with nicotine biosynthesis. *Plant Mol. Biol.* 60, 699–716.

Kutchan, T.M. (1995). Alkaloid Biosynthesis [mdash] The Basis for Metabolic Engineering of Medicinal Plants. *Plant Cell* 7, 1059.

Lasswell J, Rogg LE, Nelson DC, Rongey C, and Bartel B. (2000). Cloning and characterization of IAR1, a gene required for auxin conjugate sensitivity in Arabidopsis. *Plant Cell* 12. 2395–2408.

LeClere S, Rampey RA, Bartel B. (2004). IAR4, a gene required for auxin conjugate

sensitivity in *Arabidopsis*, encodes a pyruvate dehydrogenase E1a homolog. *Plant Physiol.* 135. 989–999.

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 Burley21 X LA Burley 21 populations. *J. Herd.* 60, 213-217.

Lorenzo, O., Chico, J.M., Sánchez-Serrano, J.J., and Solano, R. (2004). JASMONATE-INSENSITIVE1 Encodes a MYC Transcription Factor Essential to Discriminate between Different Jasmonate-Regulated Defense Responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 1938–1950.

Magidin M, Pittman JK, Hirschi KD, Bartel B. (2003). ILR2, a novel gene regulating IAA conjugate sensitivity and metal transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 35. 523–534.

Morita, M., Shitan, N., Sawada, K., Montagu, M.C.E.V., Inzé, D., Rischer, H., Goossens, A., Oksman-Caldentey, K.-M., Moriyama, Y., and Yazaki, K. (2009). Vacuolar transport of nicotine is mediated by a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter in *Nicotiana tabacum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 2447–2452.

Naconsie, M., Kato, K., Shoji, T., and Hashimoto, T. (2014). Molecular Evolution of N-Methylputrescine Oxidase in Tobacco. *Plant Cell Physiol.* 55, 436–444.

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

Nagpal, P., Ellis, C.M., Weber, H., Ploense, S.E., Barkawi, L.S., Guilfoyle, T.J., Hagen, G., Alonso, J.M., Cohen, J.D., Farmer, E.E., et al. (2005). Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* 132,

4107–4118.

Pré, M., Atallah, M., Champion, A., Vos, M.D., Pieterse, C.M.J., and Memelink, J. (2008). The AP2/ERF Domain Transcription Factor ORA59 Integrates Jasmonic Acid and Ethylene Signals in Plant Defense. *Plant Physiol.* 147, 1347–1357.

Roje, S. (2007). Vitamin B biosynthesis in plants. *Phytochemistry* 68, 1904–1921.

Roux, C., and Perrot-Rechenmann, C. (1997). Isolation by differential display and characterization of a tobacco auxin-responsive cDNA *Nt-gh3*, related to *GH3*. *FEBS Letters* 419, 131–136.

Ruegger M., Dewey E., Hobbie L., Brown D., Bernasconi P., Turner J., Muday G., Estelle M. (1997). Reduced naphthylphthalamic acid binding in the *tir3* mutant of *Arabidopsis* is associated with a reduction in polar auxin transport and diverse morphological defects. *Plant Cell* 9. 745–757.

Saunders, J.W., Bush, L.P., (1979). Nicotine biosynthetic enzyme activities in *Nicotiana tabacum* L. genotypes with different alkaloid levels. *Plant Physiol.* 64, 236–240.

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

Shi, Q., Li, C., and Zhang, F. (2006). Nicotine synthesis in *Nicotiana tabacum* L. induced by mechanical wounding is regulated by auxin. *J. Exp. Bot.* 57, 2899–2907.

Shoji, T., and Hashimoto, T. (2011). Tobacco MYC2 Regulates Jasmonate-Inducible Nicotine Biosynthesis Genes Directly and By Way of the NIC2-Locus ERF Genes. *Plant Cell Physiol.* 52, 1117–1130.

Shoji, T., Inai, K., Yazaki, Y., Sato, Y., Takase, H., Shitan, N., Yazaki, K., Goto, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., et al. (2009). MultiS and Toxic Compound Extrusion-Type Transporters Implicated in Vacuolar Sequestration of Nicotine in Tobacco Roots. *Plant Physiol.* 149, 708–718.

Shoji, T., Nakajima, K., and Hashimoto, T. (2000a). Ethylene suppresses jasmonate-induced gene expression in nicotine biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 41, 1072–1076.

Shoji, T., Ogawa, T., and Hashimoto, T. (2008). Jasmonate-Induced Nicotine Formation in Tobacco is Mediated by Tobacco COI1 and JAZ Genes. *Plant Cell Physiol.* 49, 1003–1012.

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 Mol. Biol.* 50, 427-440.

Shoji, T., Yamada, Y., and Hashimoto, T. (2000b). Jasmonate Induction of Putrescine N-Methyltransferase Genes in the Root of *Nicotiana sylvestris*. *Plant Cell Physiol.* 41, 831–839.

Shoji, T., Kajikawa, M., and Hashimoto, T. (2010). Clustered Transcription Factor Genes Regulate Nicotine Biosynthesis in Tobacco. *Plant Cell* 22, 3390–3409.

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 Biol.* 31, 721-729.

Staswick, P.E. (2009). The Tryptophan Conjugates of Jasmonic and Indole-3-Acetic Acids Are Endogenous Auxin Inhibitors. *Plant Physiol.* 150, 1310–1321.

Steppuhn, A., Gase, K., Krock, B., Halitschke, R., and Baldwin, I.T. (2004). Nicotine's Defensive Function in Nature. *PLoS Biol.* 2, e217.

Swarup R, Friml J, Marchant A, Ljung K, Sandberg G, Palme K and Bennett M. (2001). Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex. *Genes and Development* 15,

2648–2653.

Szydlowski, N., Bürkle, L., Pourcel, L., Moulin, M., Stolz, J., and Fitzpatrick, T.B. (2013). Recycling of pyridoxine (vitamin B6) by PUP1 in Arabidopsis. *Plant J.* 75, 40–52.

Tabata M., Yamamoto H., Hiraoka N., Marumoto Y. and Konoshima M., (1971). Regulation of nicotine production in tobacco tissue culture by plant growth regulators., *Phytochemistry*, 10, 723-729.

Tambasco-Studart, M., Titiz, O., Raschle, T., Forster, G., Amrhein, N., and Fitzpatrick, T.B. (2005). Vitamin B6 biosynthesis in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 13687–13692.

Takahashi M. and Yamada Y., (1973). Regulation of nicotine production by auxins in tobacco cultured cells in vitro. *Agri. Biol. Chem.* 1755-1757.

Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A., and Browse, J. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCFCO11 complex during jasmonate signalling. *Nature* 448, 661–665.

Titapiwatanakun, B., and Murphy, A.S. (2009). Post-transcriptional regulation of auxin transport proteins: cellular trafficking, protein phosphorylation, protein maturation, ubiquitination, and membrane composition. *J. Exp. Bot.* 60, 1093–1107.

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 J.* 25, 43-53.

Vogel, M.O., Moore, M., König, K., Pecher, P., Alsharafa, K., Lee, J., and Dietz, K.-J. (2014). Fast Retrograde Signaling in Response to High Light Involves Metabolite Export, MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE6, and AP2/ERF Transcription Factors in Arabidopsis. *Plant Cell* 26, 1151–1165.

Wagner, R., Feth, F., Wagner, K.G., (1986a). The pyridine nucleotide cycle in tobacco. Enzyme activities for the recycling of NAD. *Planta* 167, 226–232.

Wagner, R., Feth, F., Wagner, K.G., (1986b). Regulation in tobacco callus of enzyme activities of the nicotine pathway: II. The pyridine-nucleotide cycle. *Planta* 168, 408–413.

Wang, Z., Cao, G., Wang, X., Miao, J., Liu, X., Chen, Z., Qu, L.-J., and Gu, H. (2007). Identification and characterization of COI1-dependent transcription factor genes involved in JA-mediated response to wounding in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell Reports* 27, 125–135.

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.

Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., and Stoutjesdijk, P.A. (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.

Winz, R.A., Baldwin, I.T., (2001). Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidase) and its natural host *Nicotiana attenuata*: IV. Insect-induced ethylene reduces jasmonate-induced nicotine accumulation by regulating putrescine N-methyltransferase transcripts. *Plant Physiol.* 125, 2189–2202.

Xie, D. (1998). COI1: An *Arabidopsis* Gene Required for Jasmonate-Regulated Defense and Fertility. *Science* 280, 1091–1094.

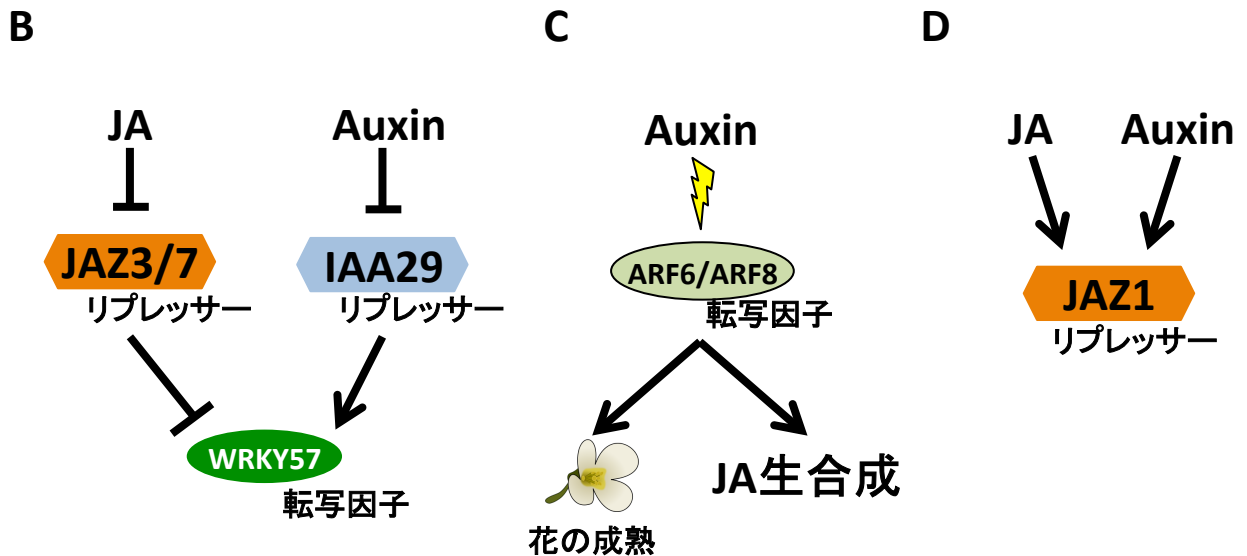
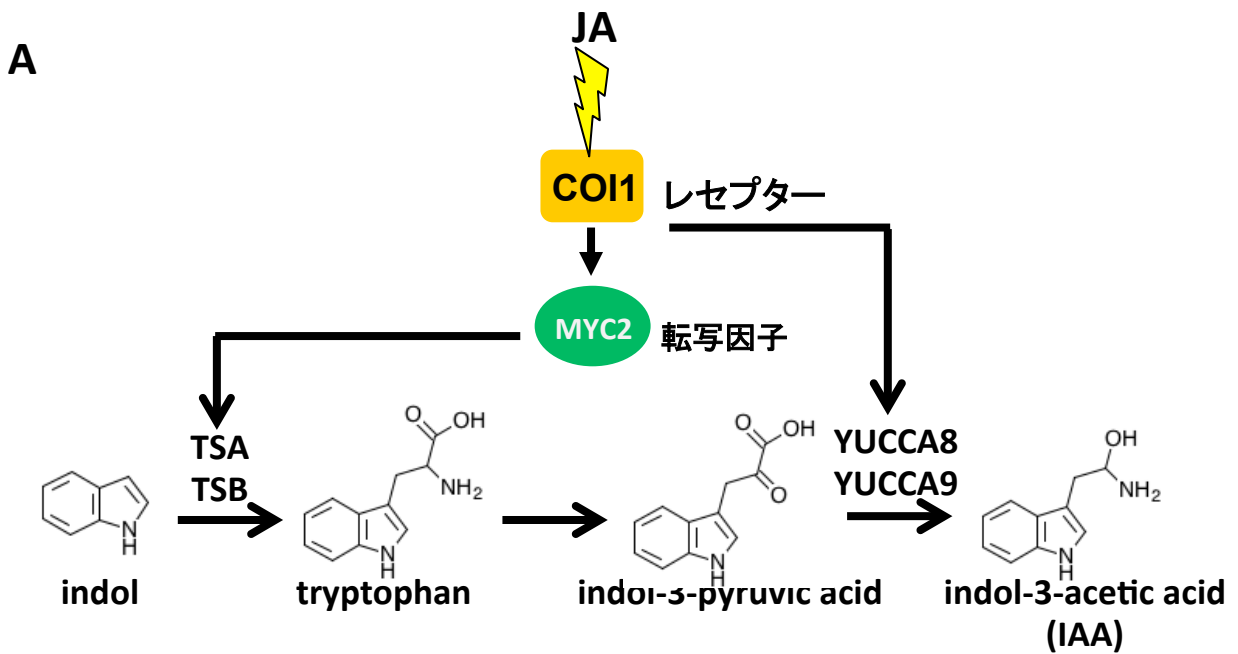
Xu, X., Chen, C., Fan, B., and Chen, Z. (2006). Physical and Functional Interactions between Pathogen-Induced Arabidopsis WRKY18, WRKY40, and WRKY60 Transcription Factors. *Plant Cell* 18, 1310–1326.

Yan, Y., Stolz, S., Chetelat, A., Reymond, P., Pagni, M., Dubugnon, L., and Farmer, E.E. (2007). A Downstream Mediator in the Growth Repression Limb of the Jasmonate Pathway. *Plant Cell* 19, 2470–2483.

Yazaki, K., Kuniyama, M., Fujisaki, T., and Sato, F. (2002). Geranyl Diphosphate:4-Hydroxybenzoate Geranyltransferase from *Lithospermum erythrorhizon*: cloning and characterization of a key enzyme in shikonin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 277, 6240–6246.

Zhao, Y. (2001). A Role for Flavin Monooxygenase-Like Enzymes in Auxin Biosynthesis. *Science* 291, 306–309.

小川孝之. (2004). RNAi 法を用いたニコチン生合成関連遺伝子の機能解析. 修論



supplement 図1. シロイヌナズナにおけるジャスモン酸とオーキシンの相互関係の報告例

- A. オーキシシン合成遺伝子YUCCA8/9およびトリプトファン合成遺伝子TSA/TSBはそれぞれCOI1レセプター依存的 (Hentrich et al., 2013)および MYC2転写因子依存的である (Dombreche et al., 2007)
- B. ジャスモン酸シグナル経路のJAZ4/8リプレッサーとオーキシシンシグナル経路のIAA29転写リプレッサーはWRKY57転写因子を制御している(Jiang et al., 2014)
- C. オーキシシンシグナル経路のARF6/ARF8転写因子は花の成熟を制御するだけでなく、ジャスモン酸合成量を制御している(Nagpal et al., 2005)
- D. ジャスモン酸シグナル経路のJAZ1リプレッサーはジャスモン酸に誘導されるだけでなく、オーキシシンにも誘導される(Grunwald et al., 2009)

#	Probe Set ID	gene expression	p value	EMBL	SGN	AGI	abbreviation	Description
1	EB424950_at	2.227	0.018	EB424950		AT1G24100	UGT74B1	UGT74B1 (UDP-glucosyl transferase 74B1)
2	BP531936_at	2.152	0.003	BP531936	SGN-U486139			unknown
3	C2033_at	2.093	0.022	DW000692	SGN-U438000	AT3G11480	BSMT1	BSMT1; S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase
4	EB428338_at	1.951	0.011	EB428338	SGN-U437469			unknown
5	X58547_at	1.683	0.009	X58547	SGN-U422245	AT3G04720	PR4	PR4 (PATHOGENESIS-RELATED 4)
6	AB024510_at	1.675	0.008	AB024510	SGN-U437295	AT1G80840	WRKY40	WRKY40 (WRKY DNA-binding protein 40); transcription factor
7	BP533512_at	1.652	0.048	BP533512	SGN-U453273			tumor-related protein [Nicotiana glauca x Nicotiana langsdorffii]
8	C4833_at	1.636	0.041	DW004499		AT1G61800	GPT2	GPT2 (glucose-6-phosphate/phosphate translocator 2)
9	C8113_s_at	1.621	0.017	BP534678		AT1G17860		trypsin and protease inhibitor family protein / Kunitz family protein
10	CN498883_at	1.615	0.018	CN498883	SGN-U454990			unknown
11	C8030_at	1.601	0.037	AJ538806	SGN-U465177			leucine-rich repeat protein
12	C10154_at	1.592	0.002	FG644041		AT2G46150		unknown
13	BP529388_at	1.591	0.005	BP529388		AT1G34210		SERK2 (SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE 2); kinase
14	C3666_at	1.564	0.012	EB451599		AT5G47560		ATSDAT/ATTD (TONOPLAST DICARBOXYLATE TRANSPORTER)
15	EB447376_at	1.557	0.009	EB447376	SGN-U431827			unknown
16	C9446_at	1.541	0.020	U66263		AT1G17860		trypsin and protease inhibitor family protein / Kunitz family protein
17	AF211615_at	1.527	0.043	AF211615	SGN-U487397			unknown
18	C10310_at	1.487	0.018	BP533230		AT3G22400		LOX5; lipoxygenase
19	BP535451_at	1.485	0.008	BP535451	SGN-U476578			unknown
20	C479_at	1.484	0.022	EB681468		AT3G56400		WRKY70 (WRKY DNA-binding protein 70); transcription factor
21	AF211532_at	1.465	0.002	AF211532		AT1G53820		zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein / Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 132
22	C9149_at	1.450	0.011	Z46349		AT1G05010		EFE (ETHYLENE FORMING ENZYME)
23	C6412_s_at	1.449	0.026	EB427774		AT1G05010		EFE (ETHYLENE FORMING ENZYME)
24	TT09_L07_at	1.446	0.009		SGN-U482278			unknown
25	DV157587_at	1.434	0.041	DV157587		AT2G38300		predict myb-like transcription factor / DNA binding
26	C6197_at	1.426	0.044	EB427446		AT5G17330		GAD (Glutamate decarboxylase 1); calmodulin binding
27	TT48_C16_at	1.415	0.044		SGN-U454887	At5G62150		peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein
28	C3666_x_at	1.402	0.014	EB450957		AT5G47560		ATSDAT/ATTD (TONOPLAST DICARBOXYLATE TRANSPORTER)
29	C479_s_at	1.399	0.030	EB681468		AT3G56400		WRKY70 (WRKY DNA-binding protein 70); transcription factor
30	C5428_at	1.397	0.005	EB444376	SGN-U428211			hypothetical protein

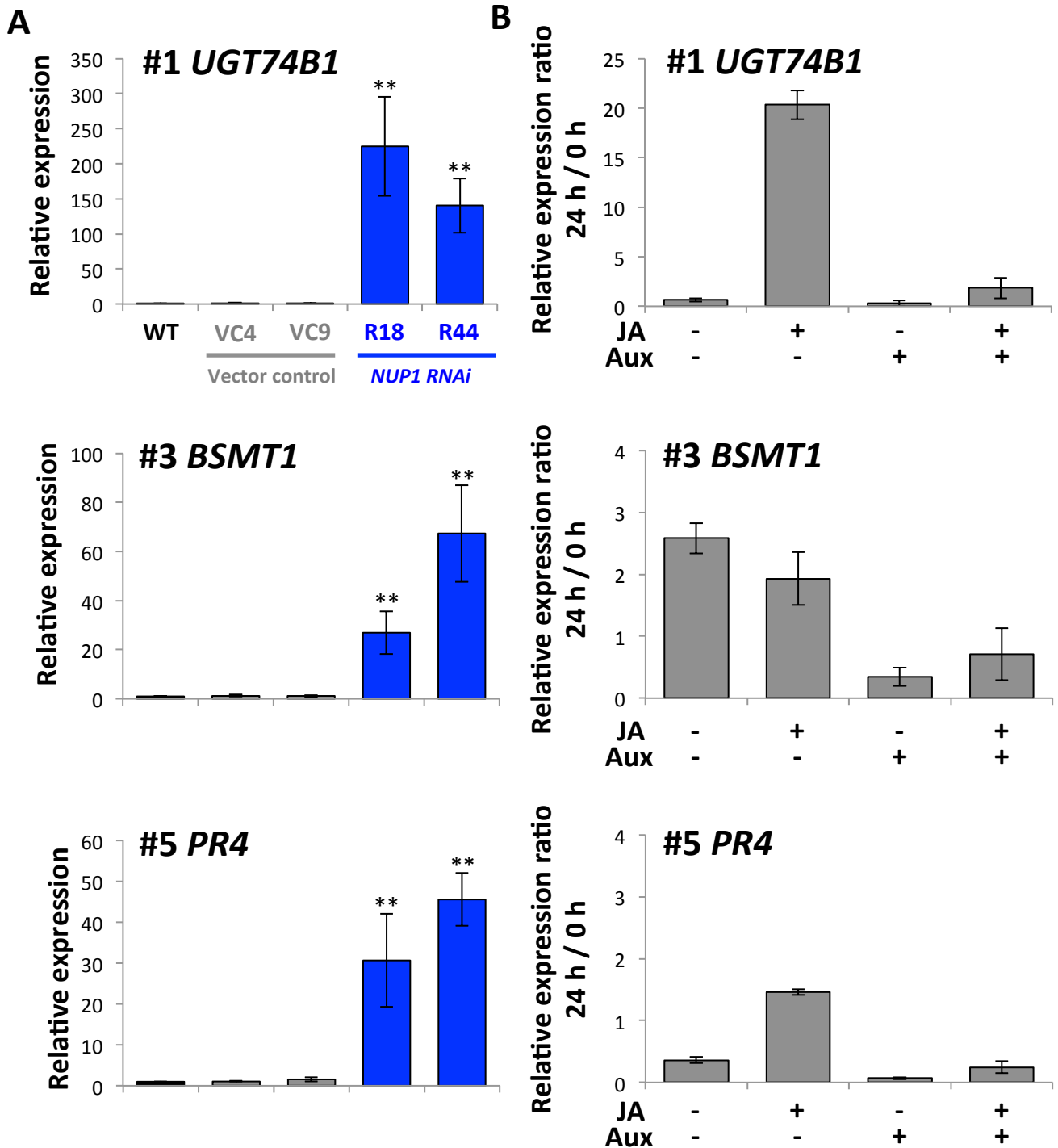
supplement 表1. マイクロアレイ解析にて*NUP1*発現抑制BY-2細胞において発現が上昇した遺伝子
*NUP1*発現抑制BY-2細胞を用いたマイクロアレイ解析より、*NUP1*発現抑制BY-2細胞で発現が上昇した上位遺伝子リストを示す。gene expression < 0.7 および p value < 0.05の条件でデータを並び替えた。青色はトランスポーター遺伝子、ピンク色は転写因子を示す。

127

# Probe Set ID	gene expression	p value	EMBL	SGN	AGI	abbreviation	Description
31 C10155_at	1.390	0.042	EB436332		AT4G35770		SEN1 (DARK INDUCIBLE 1)
32 TT19_I20_at	1.386	0.044		SGN-U434692			unknown
33 BP135923_at	1.378	0.005	BP135923	SGN-U438343			unknown
34 C6197_X_at	1.371	0.036	EB428757		AT5G17330		GAD (Glutamate decarboxylase 1); calmodulin binding
35 EB425943_at	1.367	0.039	EB425943		AT2G02010		GAD4 (GLUTAMATE DECARBOXYLASE 4); calmodulin binding
36 C8982_X_at	1.366	0.031	AF211627		AT2G46620		AAA-type ATPase family protein
37 AF193771_s_at	1.360	0.023	AF193771		AT3G56400		WRKY70 (WRKY DNA-binding protein 70); transcription factor
38 C9897_at	1.354	0.031	FG640207		AT1G52340		ABA2 (ABA DEFICIENT 2); oxidoreductase
39 C3134_at	1.338	0.039	DV158814		AT5G03860		MLS (MALATE SYNTHASE); malate synthase
40 EB432644_s_at	1.331	0.019	EB432644	SGN-U451102			WRKY transcription factor 6
41 CV019292_at	1.328	0.016	CV019292	SGN-U435737			peroxidase
42 C3596_at	1.328	0.032	EB428604	SGN-U439840			unknown
43 BP534291_s_at	1.327	0.001	BP534291	SGN-U469257			unknown
44 TT16_G12_at	1.320	0.019		SGN-U449517			unknown
45 C10120_at	1.313	0.006	AY220485		AT5G37490		U-box domain-containing protein
46 C6828_at	1.312	0.004	CN498810		AT3G54040		photoassimilate-responsive protein-related
47 C2835_s_at	1.309	0.012	DV160330		AT4G37470		hydrolase, alpha/beta fold family protein
48 EB684050_at	1.307	0.002	EB684050	SGN-U478306			gi 19310070 dbj BAB85863.1 ORF285 [Silene latifolia]
49 AF193771_at	1.306	0.043	AF193771		AT3G56400		WRKY70 (WRKY DNA-binding protein 70); transcription factor
50 C8874_at	1.305	0.006	CV016080		AT3G56400		WRKY70 (WRKY DNA-binding protein 70); transcription factor
51 C104_at	1.305	0.025	EB683764		AT1G55290		oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein
52 BP534404_at	1.303	0.010	BP534404	SGN-U451102	At3G56400		WRKY transcription factor 6

supplement 表1. マイクロアレイ解析にて*NUP1*発現抑制BY-2細胞において発現が上昇した遺伝子(続き)

*NUP1*発現抑制BY-2細胞を用いたマイクロアレイ解析より、*NUP1*発現抑制BY-2細胞で発現が上昇した上位遺伝子リストを示す。gene expression < 0.7 および p value < 0.05の条件でデータを並び替えた。青色はトランスポーター遺伝子、ピンク色は転写因子を示す。

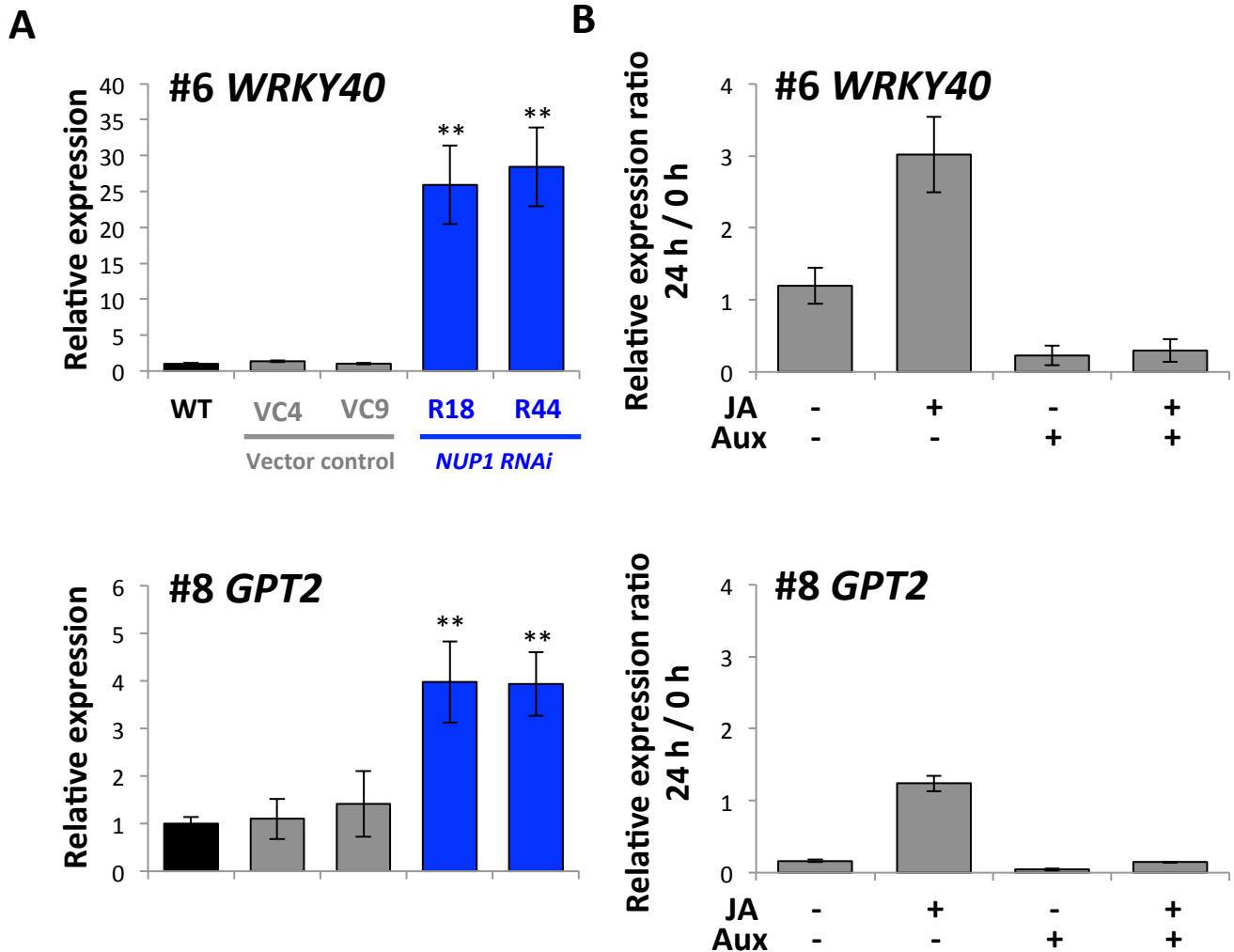


supplement 図2. *NUP1*発現抑制BY-2細胞において発現上昇した遺伝子の発現パターン

表Xで示したマイクロアレイ解析で*NUP1*発現抑制BY-2細胞で発現が上昇していた上位5遺伝子の発現パターンをqRT-PCRを用いて確認した。

A. *NUP1*発現抑制BY-2細胞における遺伝子発現。形質転換システムはそれぞれのベクターに対して独立の2システムを用いた。各カラムは平均値±標準誤差を示した。統計処理はStudent's t.testをWTに対して行い、* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を示した。(N = 3)

B. ジャスモン酸およびオーキシンへの応答性。野生型BY-2細胞に対しDMSO (-JA, -AUX)、100 μ M MeJA (+JA)、90 μ M 2,4-D (+AUX) および100 μ M MeJAかつ90 μ M 2,4-D (+JA, +AUX) 処理を行い、遺伝子発現を解析した。各カラムは処理後24時間の遺伝子発現を処理後0時間の値で補正し、平均値±標準誤差を示した。(N = 3)

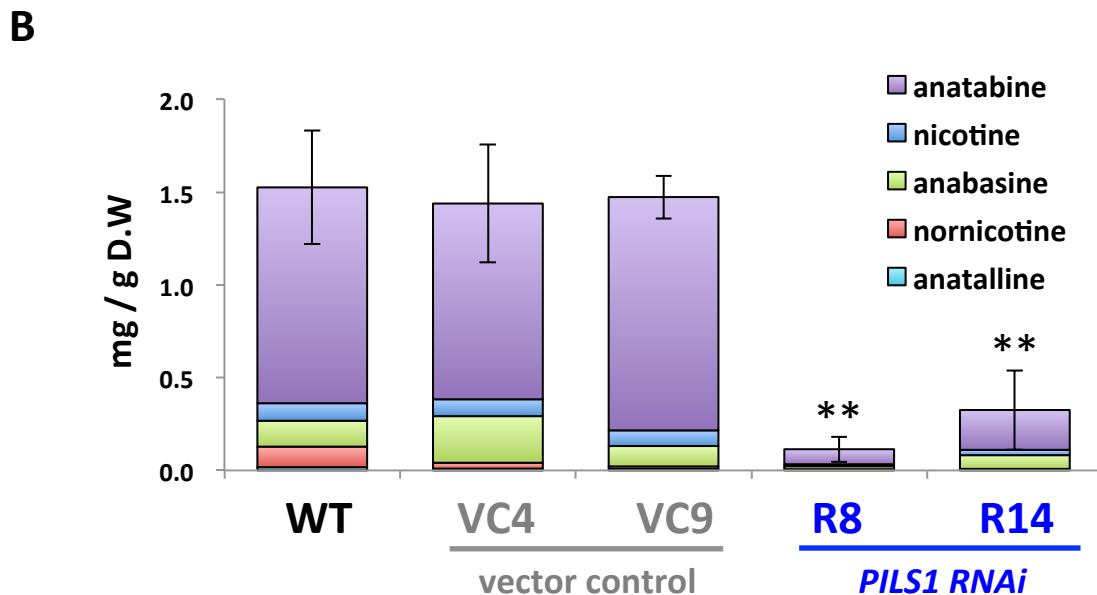
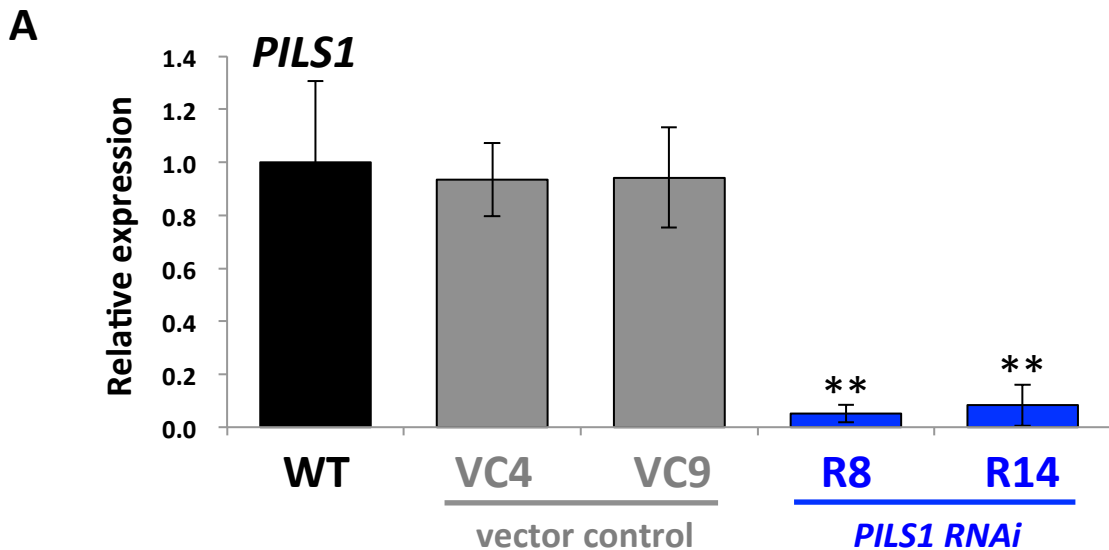


supplement 図2. *NUP1*発現抑制BY-2細胞において発現上昇した遺伝子の発現パターン

表Xで示したマイクロアレイ解析で*NUP1*発現抑制BY-2細胞で発現が上昇していた上位5遺伝子の発現パターンをqRT-PCRを用いて確認した。

A. *NUP1*発現抑制BY-2細胞における遺伝子発現。形質転換システムはそれぞれのベクターに対して独立の2システムを用いた。各カラムは平均値±標準誤差を示した。統計処理はStudent's t.testをWTに対して行い、* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を示した。(N = 3)

B. ジャスモン酸およびオーキシンの応答性。野生型BY-2細胞に対しDMSO (-JA, -AUX)、100 μ M MeJA (+JA)、90 μ M 2,4-D (+AUX) および100 μ M MeJAかつ90 μ M 2,4-D (+JA, +AUX) 処理を行い、遺伝子発現を解析した。各カラムは処理後24時間の遺伝子発現を処理後0時間の値で補正し、平均値±標準誤差を示した。(N = 3)

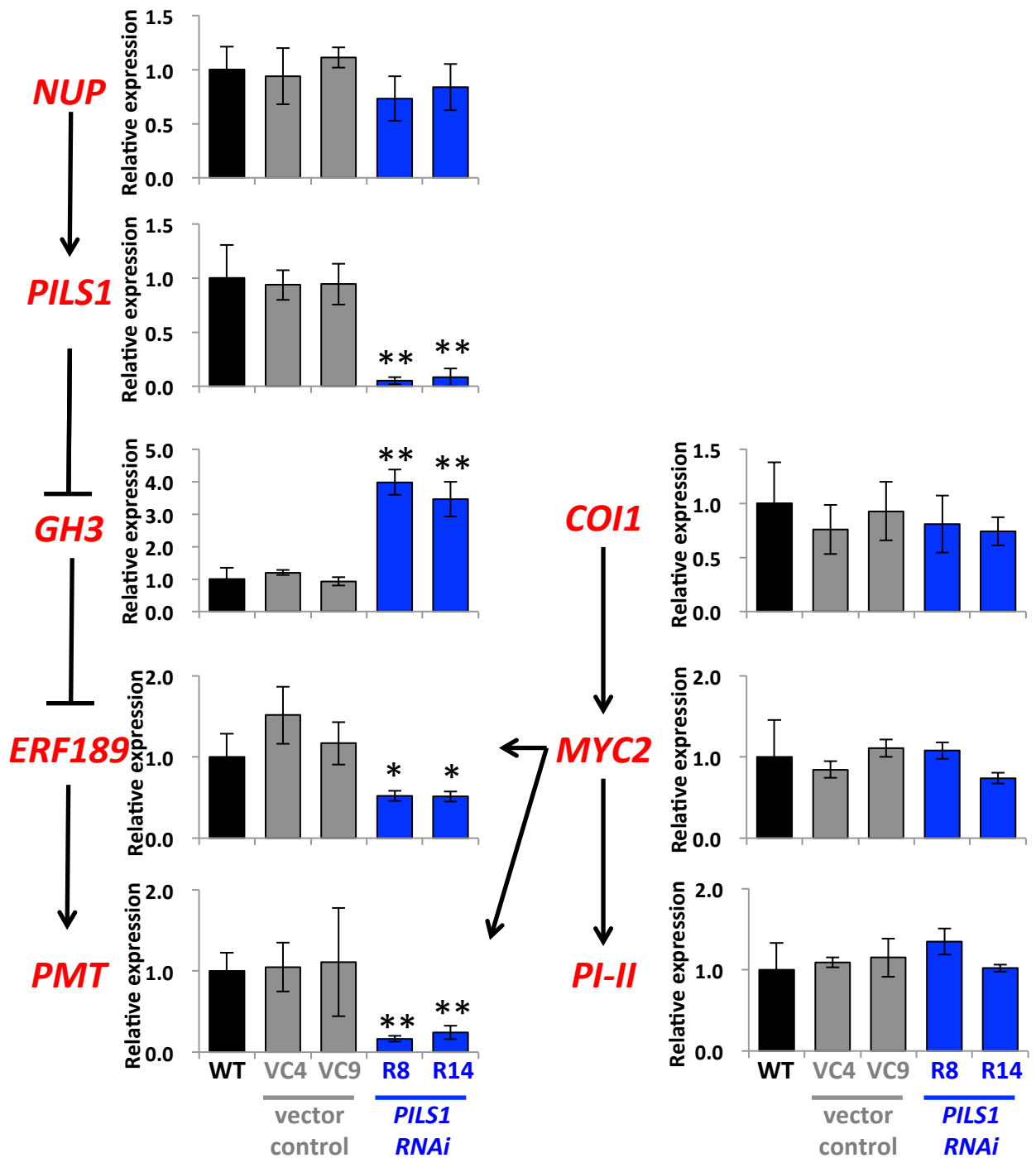


supplement 図3. ジャスモン酸誘導時の*PILS1*発現抑制BY-2細胞における*PILS1*の発現およびアルカロイド蓄積量

100 μ M ジャスモン酸36時間処理後の*PILS1*発現抑制BY-2細胞の遺伝子発現についてqRT-PCRを用いて解析を行った。ジャスモン酸72時間処理後のアルカロイド蓄積についてGLCを用いて解析した。形質転換系統はそれぞれのベクターに対して独立の2系統を用いた。各カラムは平均値 \pm 標準誤差を示した。統計処理はStudent's t-testをWTに対して行い、* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を示した。(N = 3)

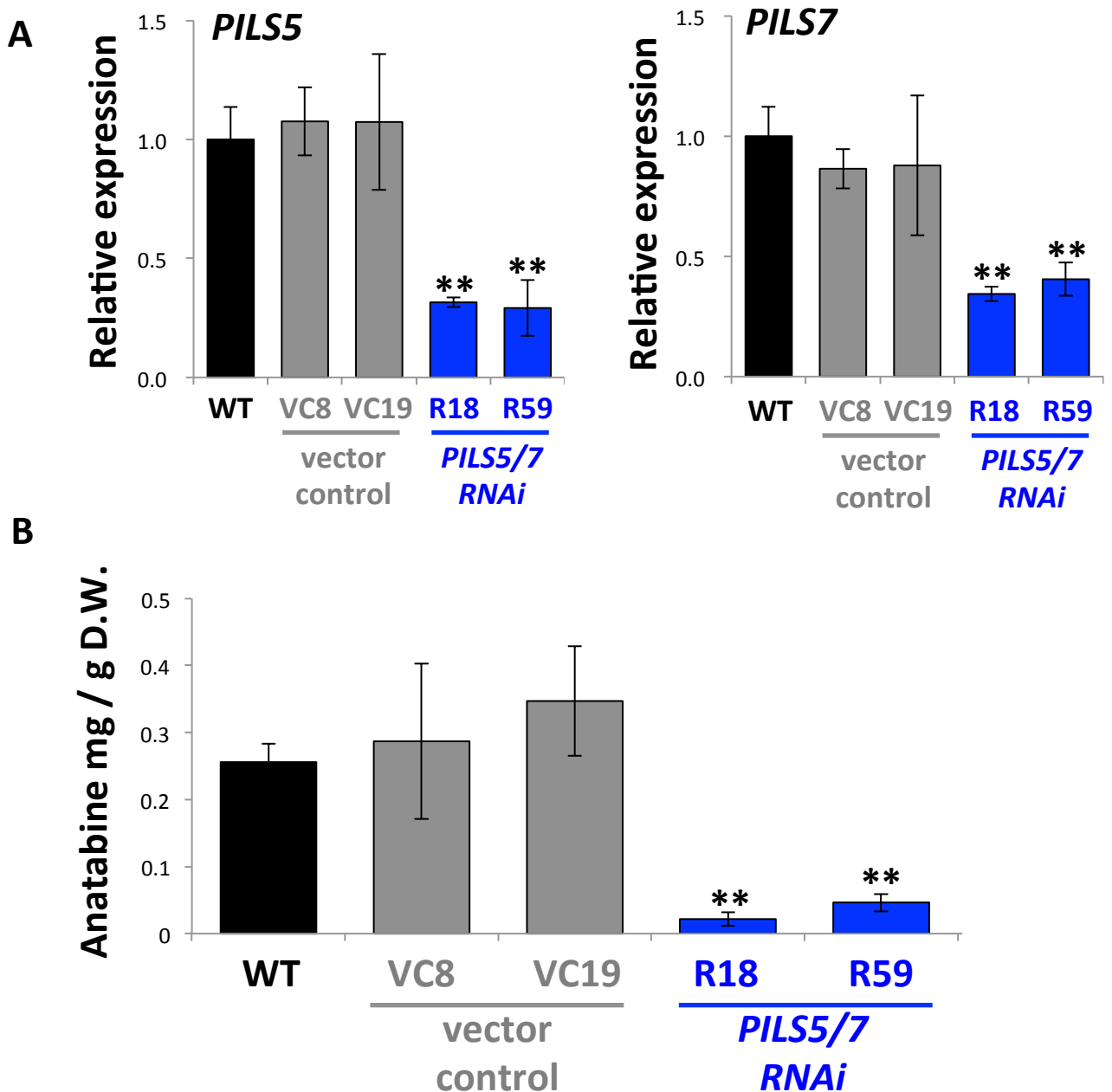
A. *PILS1*の遺伝子発現

B. 蓄積したアルカロイド総量



supplement 図4. ジャスモン酸誘導時のPILS1発現抑制BY-2細胞の遺伝子発現パターン

100 μ M ジャスモン酸36時間処理後のPILS1発現抑制BY-2細胞の遺伝子発現についてジャスモン酸受容体COI1、MYC2転写因子、防御遺伝子PI-II、ニコチン輸送体NUP1、オーキシン応答性遺伝子GH3、NIC2遺伝子座ERF189およびニコチン生合成遺伝子PMTの遺伝子発現をqRT-PCRを用いて解析した。形質転換系統はそれぞれのベクターに対して独立の2系統を用いた。各カラムは平均値 \pm 標準誤差を示した。統計処理はStudent's t.testをWTに対して行い、* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を示した。(N = 3)

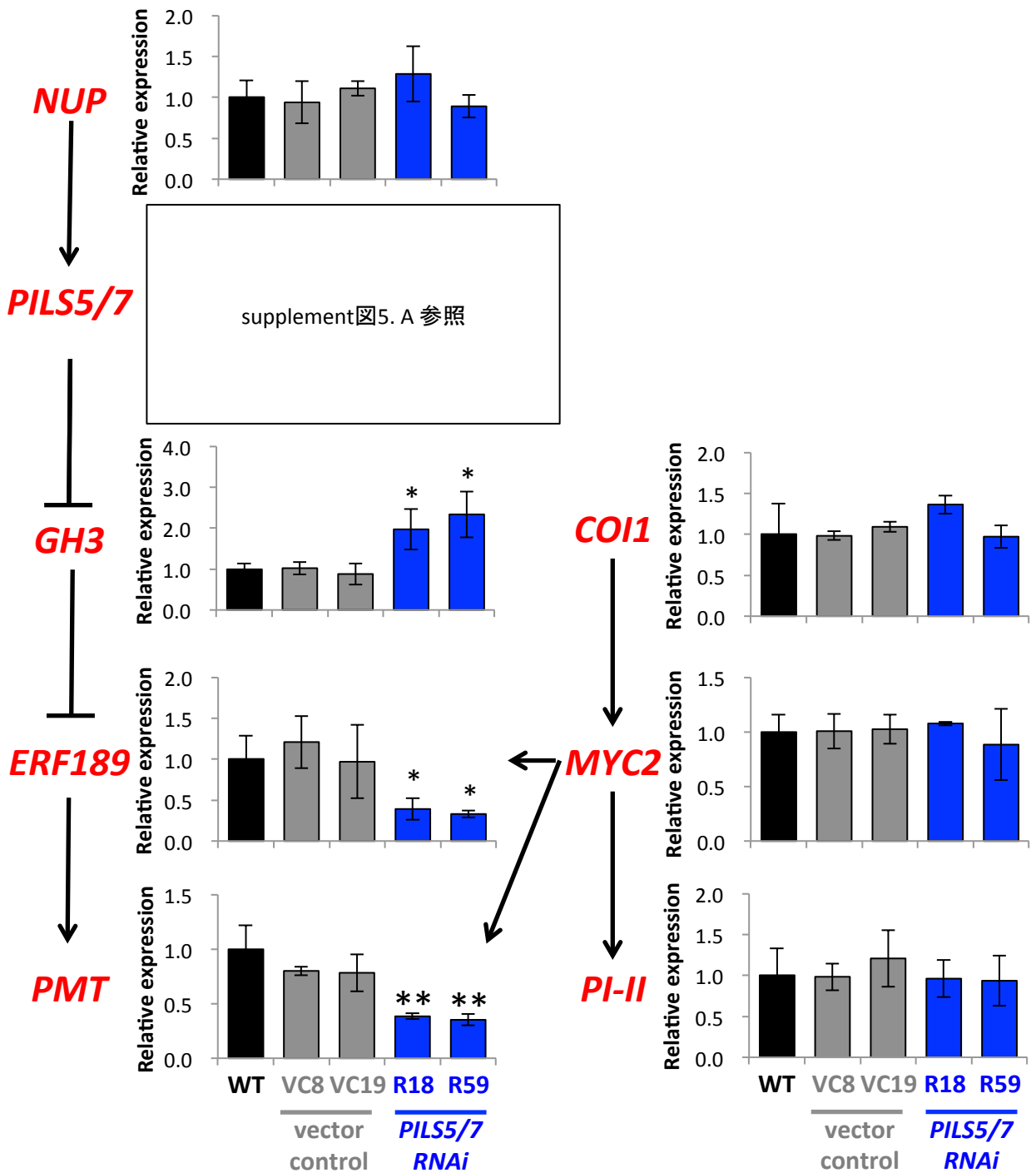


supplement 図5. ジャスモン酸誘導時の*PILS5/7*発現抑制BY-2細胞の*PILS*遺伝子の発現およびアナタビン蓄積量

100 μ M ジャスモン酸および5 μ M β -estradiolを36時間処理後の*PILS5/7*発現抑制BY-2細胞の*PILS5*および*PILS7*の発現についてqRT-PCRを用いて解析した、100 μ M ジャスモン酸および5 μ M β -estradiolを36時間処理後のアナタビン蓄積量についてはGLCを用いて解析した。形質転換系統はそれぞれのベクターに対して独立の2系統を用いた。各カラムは平均値 \pm 標準誤差を示した。統計処理はStudent's t-testをWTに対して行い、* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ を示した。(N = 3)

A. *PILS5*および7の遺伝子発現

B. 蓄積したアナタビン量



supplement 図6. ジャスモン酸処理における*PILS5/7*発現抑制BY-2細胞の遺伝子発現パターン

100 μ M ジャスモン酸および5 μ M β -estradiolを36時間処理後の*PILS5/7*発現抑制BY-2細胞におけるジャスモン酸受容体COI1、MYC2転写因子、防御遺伝子PI-II、ニコチン輸送体NUP1、オーキシン応答性遺伝子GH3、*NIC2*遺伝子座ERF189転写因子およびニコチン合成遺伝子PMTの遺伝子発現をqRT-PCRを用いて解析した。形質転換システムはそれぞれのベクターに対して独立の2システムを用いた。各カラムは平均値 \pm 標準誤差を示した。統計処理はStudent's t.testをWTに対して行い、* P <0.05、** p <0.01を示した。(N = 3)

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1  CACGAGGAAAATCCAAACCTTCGGAGAGAAAAGCATTTACGCTTGAGTAACAGAATACTCCAATTTAATATCCAATCTCTAGAAAACAATATGGAAC
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
      M E H

      110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
101 ATCCAGGATTAAGCACCAATATGAGGAGAACTCCTCCTGCTGATTAGCTGCTTAATACTCGCTGTTGGCATATGTGGTGGTCTTAATGATGCGTCTATA
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
      P G L S T N M R R I L L L I S C L I L A V G I C G G P L M M R L Y

      210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
201 FTATGTTGAGGGAGGTTCAAGAATATGGCTTAGTAGTTGGTTACAAACTGGTGGATGGCCACTCACCCCTTATACCTCTTGGCATCCTATACATATATCGT
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
      Y V E G G S R I W L S S W L Q T G G W P L T L I P L A I L Y Y Y R

      310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
301 CGAAAACCGAAGGCTCAAAACGCCAAGTTTACATGGTGGACCCGCAATTTATTGCATCATTGTTATGGCGTGGCCACTGGCTTGGATGATTTTC
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
      R K T E G S N A K F Y L M T P R I F I A S F V I G V A T G L D D F L

      410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
401 TCTATTCTGGGGGGGGTCAAAACTCCCCGATCAACCTCTTCACTTCTTCTGCTGCTCAACTTGCCTTACGGCAGTAGGTGCTTCTTCACTAGTAA
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
      Y S W G G S K L P V S T S S L L L A A Q L A F T A V G A F F I V K

      510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
501 GTTGAAGTTATCACCCCTCTCTATCAATGCAGTGGTTTTACTAACAGTTGGTGGCTTTTTATGGGTATTGATCTAATGGTGTCCACCAGAGGGCGTG
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
      L K L S P F S I N A V V L L T V G A V L L G I R S N G D R P E G V

      610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
601 ACAAGTAAGAATATATTGCTTTTATGATGACACTTCTAGCAGCAGCTTTGTACGGCAGTCAATTTTCCTTGTATGAGTTGATTTACATGAAGGCAA
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
      T S K E Y I I G F M M T L L A A A L Y G V I L P C I E L I Y M K A K

      710      720      730      740      750      760      770      780      790      800
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
701 AACAAAGCTATTACTTCTACGTTAGTATTGGAGATTGAGATGATCATGAGTTTGTCTGCTACTGCCTTTGCACTGTAGGAATGATCCGCAATAAAGACTT
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
      Q A I T S T L V L E I Q M I M S F A A T A F C T V G M I A N K D F

      810      820      830      840      850      860      870      880      890      900
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
801 TCAGGCAATCTCAAGGGAGGCAAAAACAATTTAACGTCGGAGAAAGCTAGATATTATACAGTTATAGTATGCACTGCCGCTATTGGCAGTCTTCTCTCGTG
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
      Q A M S R E A K Q F N V G E A R Y Y T V I V C T A A I W Q C F F V

      910      920      930      940      950      960      970      980      990      1000
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
901 GGTATTATTGGAGTTATCTACTGCTTCTTCTTGGATGCTGGGGTTATGATTGCAGTTTTGCTCCCGTACTGAGGTATTAGCTGTAATTTCTTTA
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
      G I I G V I Y C S S S L M S G V M I A V L L P V T E V L A V I F F K

      1010      1020      1030      1040      1050      1060      1070      1080      1090      1100
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1001 AGGAAAATTTTCAGGTGAAAAGGCTCTGCTCTTTCTCTTTGGGGTTTCGCTCATACTTCTATGGAGATTGAGCAAAAAGAAAGCAGAA
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
      E N F S G E K G L A L F L S L W G F V S Y F Y G E F R Q T K K Q K

      1110      1120      1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190      1200
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1101 GAATACAAGTCCAGAGCTGAGATGACAATTACGACACATACTGAAATCTGTTGATTTACTATTATGCTTATAAGGATACTAGTTTTTATTTTGTGA
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
      N T S P E A E M T I T T H T E S V *

      1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270      1280      1290      1300
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1201 CAAAATAATGTACGTCGTTTCTTCTTCAATTGCTACTTTCATTATGTTTGTGAAAAGGGTCTCTCTTCTTGAATTTCTGATGTTGCTCTTAAATCCGTAA
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

      1310      1320      1330      1340      1350
      *      *      *      *      *
1301 TACAACACTTGAAATATTTGCAGTTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1357

```

supplement 図7. タバコNUP1のcDNA配列
 緑色はCDS、赤線はRNAiに用いた部分配列を示す。


```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1 TTACGGCCGGGGTCCAATTGGAGAGTTGTAGACTAGTGCCTAAACTGTGGACTGTCAATCTCTGATTC AATTCACACAAATTAAGCAGTTTCGACAT
      110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
101 TTA AAAAATGAAAGTATAAAATGAAGAAACTCCTTGAAGGTGTTCCATTATATTAAGATGGGATTGTGGACTTGTTCGTCGGCCATTAAGTCCCTGTCT
      M G F V D L F V V A L V P V L
      210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
201 GAAAACCTCATAAATTAAGTGTGGCTTGTTCCTTGCTTTGGAACTGTCAATCTCCTTGGCTCTGCTGCAAGGCACATTTGAACAATCTTGTGTCT
      K T L I I T A V G L F L A L E R V N L L G S A A R H Y L N N L V F
      310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
301 FATATTTTCACTCCTGCGCTGGTAGCTAGCAGCTTGGCTGAAAACAGTAACATCGAGCAACATGTTTCATTATGGTTCATGCCCGTGAATATCCTTCTCA
      Y I F T P A L V A S S L A E T V T S S N I V S L W F M P V N I L L T
      410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
401 CATTATATCGGTTCCAGCATTTGGATGGTACTTGTGAAAATCACAAACTCCTATACAACCTCCATGGTCTTGTATTAGTTGCTGTGTCAGGGAA
      F I I G S A L G W V L V K I T T T P I Q L H G L V I S C C A A G N
      510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
501 FCTGGGAACCTTGTCTCATTATAAATTCCTGCAGTTTGTGTGGACAAAAATAGTCCCTTTGGAGATTCAATTACATGTTCCACCAATGGAAGGCCTAT
      L G N L L L I I I P A V C V E K N S P F G D S I T C S T N G K A Y
      610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
601 GCATCATTCAATGGCGATAGGAGCAGTCTATATATGGACTTATATCTATAACATAATTCGAGCATATGGAGTCCAACATAATACCTCAACTGCCAAC
      A S L S M A I G A V Y I W T Y I Y N I I R A Y G V Q H N T S T A N I
      710      720      730      740      750      760      770      780      790      800
701 TAGAGGATCTGGTGAAGTACCAGAGTTATTTGTCCTCAATAGCTGCACAAAAATGTTATCTTCACAGGATAGCCTACAATCTGATATGGACCATGAAGCTCA
      E D S G E V P E L L S N S C T K L L S S Q D S L Q S D M D H E A Q
      810      820      830      840      850      860      870      880      890      900
801 ACTTGCAGTACCTCTCATTGGATATGA AACCCACACATGAGGGACATTTTGTAGGAAGATCAAAACACATCAAAAATGGACGGAAAGGATCAATCTC
      L A V P L I G Y E T T H E G H F V R K I K Q H I K I W T E R I N L
      910      920      930      940      950      960      970      980      990      1000
901 AAAATGTTGTTTGCACCCCTCAACAATGGCAGGATGTTGGAAATCATCATTTGGTGTAACTGCCCTGTTAAGAAAGCTGATGATTGGAAATGAGGCTCCAT
      K M L F A P S T I A T I V G I I I G V T S L L R K L M I G N E A P L
      1010      1020      1030      1040      1050      1060      1070      1080      1090      1100
1001 TGCATCTGATTTGATAGCTCTGCATCTATGCTAGGACAGGCTGCAATACAGCCATCACATTTGATAGTTGGAGCAAACTCTCTTAGAGGGCTGAAAAAGTC
      H V I D S S A S M L G E A A I P A M T L I V G A N L L R G L K K S
      1110      1120      1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190      1200
1101 CGCAGTAGGGATGTGGCTTGTGATAGGCATACAGGTAGTACGTTATGTTGGCAATGCCATTATCAGGGATTGTTGTTGCAAAAGCTGCACGCCATTTGGG
      A V G M W V V I G I Q V V R Y V A M P L S G I C V V K A A R H F G
      1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270      1280      1290      1300
1201 TGGTTGGATCAGATTCTTATATCAGTTGTTACTTCTCCCTGCAATATGCACTTCTCTGCAATGACTATCGGTACAATACACAGTTGTTGAAGTTG
      L V G S D S L Y Q F V L L L O Y A L P S A M T I G T I T Q L F E V G
      1310      1320      1330      1340      1350      1360      1370      1380      1390      1400
1301 TGAAGTGAATGTTCAAGTGAATATGCTATGGAATTATGCACTGGCATTGTTGCTCTTACTCTATGGACCCTTATACATGTTGGATTTTATCTGATC
      E S E C S V I M L W N Y A L A S V A L T L W T T Y Y M W I L S *
      1410      1420      1430      1440      1450      1460      1470
1401 AGTCTCTACCAATAATCATGCTTTTGTTCCTTACAATACACAGTTGTTTGTCTTTTGGTTTAAATGGTTAA 1479

```

supplement図8. タバコ*PILS1*のcDNA配列
 緑色はCDS、赤線はRNAiに用いた部分配列を示す。

```

PILS5 1 ATGGGGTTTTGGACATTATTTGAAGTGGCATCTATGCCAATATTGCAAGTACTCCTCATAAGTATTTAGTGTCTTAATGGCCACTGATATATCTCAAGC 100
PILS7 1 ATGGGGTTTTGGACATTATTTGAGGTGGCATCCATGCCAATATTGCAAGTACTCCTCATAAGTATTTAGTGTCTTAATGGCCACTGATATATCTCAAGC 100

101 TTCTTCACCTCTGATGCCCGAAGATCTCTCAATAAAATCGTGTTCGTGGTATTTACGCCTTCTTAAATGTTTGC AAGTTTGGCAAAAACCTGTCACCTTGA 200
101 TTCTTCACCTCTGATGCCCGAAGATCTCTTAAATAAAATAGTGTTCGTGATATTTACGCCTTCTTAAATGTTTGC AAGTTTGGCAAAAACCTGTCACCTTGA 200

201 CGACATAATCTCATGGTGGTTTATGCCCATTAATATAGGGCTAACTTTCTAGTTGGAGGAATCTTGGATGGTTAGTTGTGAAAATACTGAAGCCAGAT 300
201 CGACATAATCTCATGGTGGTTTATGCCCATTAATATAGGGCTAACTTTCTAGTTGGAGGAATCTTGGATGGTTAGTTGTGAAAATACTGAAGCCAGAT 300

301 CTACATTTAGAAGGACTCATTATGTCTACATGCTCAGCAGGTAATTTGGGGAACTCTTTTGTATAGTAAATCCAGCAATTTGCAAGGAGAAAACGTAGCC 400
301 CTACATTTAGAAGGACTCATTATGTCTACATGCTCAGCAGGTAATTTGGGGAACTCTTTTGTATAGTAAATCCAGCAATTTGCAAGGAGAAAACGTAGCC 400

401 CATTGGTGATCATGGAATTTGTGCTTCTGTGGTCTGTCATATGCCTCTTCTCCATGGCAGTTGGTGGTTTCTACATATGGACCCACACATACCATT 500
401 CATTGGTGATCATGGAATTTGTGCTTCTGTGGTCTGTCATATGCCTCTTCTCCATGGCAGTTGGTGGTTTCTACATATGGACCCACACATACCATT 500

501 AATAAGAAGCTCATCTGTGAAATTTAAAGCACTAAAAGCAGCTGAGGAAGATGCTTTGAGAAACCAAAATATGATTTGATGCAAAATGAAAATCTCAC 600
501 AATAAGAAGCTCATCTGTGAAATTTAAAGCACTAAAAGCAGCTGAGGAAGATGCTTTGAGAAACCAAAATATGATTTGATGCAAAATGAAAATCTCAC 600

601 CTTCTTGAAGAAGTTGACCAAAAATGATCTTGTCTTAGCATTGCACCAAAAATCAACTGCATATGACCCGTGAAAATCAAACCTAAAGCATGTGAAAAA 700
601 CTTCTTGAAGAAGTTGACCAAAAATGATCTTGTCTTAGCATTGCACCAAAAATCAACTGCATATGACCCGTGAAAATCAAACCTAAAGCATGTGAAAAA 700

691 CTTCTTGAAGAAGTTGACCAAAAATGATCTTGTCTTAGCATTGCACCAAAAATCAACTGCATATGACCCGTGAAAATCAAACCTAAAGCATGTGAAAAA 691
-----ATATGACCCGTGAAAATCAAACCTAAAGCATGTGAAAAA

701 CAGACATGGAACCAAGAG-AGGGGAAGTATCATCATGGAGTAAATTTTGCACAAAATTTGGGAGGAAGTACTGGCACCCTCAAACAGTTGCAGCAATTA 799
692 CAGACATGGAACCAAGAG-AGAAAGGGGAAGTATTCATGGAGTAAATTTTGCACAAAATTTGGGAGGAAGTACTGGCACCCTCAAACAGTTGCAGCAATTA 799

800 TAGGACTTATATTTGGTTCAGTAACATGGTTGAAAAACCTGATATTTGGTAGTGTCTGCCCTCAGAGTTATCCAAGACTCAATCAAATTAAGTTGGGA 899
791 TTGGACTTATATTTGGTTCAGTAACATGGTTGAAAAACCTGATATTTGGTAGTGTCTGCCCTCAGAGTTATCCAAGACTCAATCAAATTAAGTTGGGA 899

900 TGGGACCATTCCTGTATCACTCTTATACTAGGAGAAAACCTCACCAAGGATTAAGGAAGGCAAAAAGTAAAACCAATGATCATAATATCAGTGGTATGT 999
891 TGGGACCATTCCTGTATCACTCTTATACTAGGAGAAAACCTCACCAAGGATTAAGGAAGGCAAAAAGTAAAACCAATGATCATAATATCAGTGGTATGT 999

1000 GTGCGGTATATATTCAGTCCCTAGTAGGAATTTCTAGTTCTTAAAGTAGCAGACAAACTAGGATTCCTTGCAGCAGATCCCCTTTACAAAATTTGTGA-TA 1098
991 GTGCGGTATATATTCAGTCCCTAGTAGGAATTTCTAGTTCTTAAAGTAGCAGACAAACTAGGATTCCTTGCAGCAGATCCCCTTTACAAAATTTGTGA-TA 1089

1099 ATGATTCAATACACATTGCCACCCGCCATGAATATCGGAACAATGACACAATTTTGGATGTAGCACAAGAGAGTGTTCAGTCCCTTTCTGTGGACTT 1198
1090 ATGATTCAATACACATTGCCACCCGCCATGAATATCGGAACAATGACACAATTTTGGATGTAGCACAAGAGAGTGTTCAGTCCCTTTCTGTGGACTT 1189

1199 ATTTGGTTGCAGCATTTGCACCTACTATTTGGTCCACTGTATTCATGTGGCTTTGCTCCTGA 1260
1190 ATTTGGTTGCAGCATTTGCACCTACTATTTGGTCCACCGTATTCATGTGGCTTTGCTCCTAA 1251

```

supplement 図9. タバコ*PILS5*および*PILS7*のCDS配列のアライメント
 上段は*PILS5*、下段は*PILS7*のCDS配列を示し、赤線はRNAiに用いた*PILS7*の部分配列を示す。

gene name	AGI code	gene name	ACC. #
<i>AtPUP1</i>	AT1G28230	<i>NUP1</i>	GU174267
<i>AtPUP2</i>	AT2G33750	<i>NUP2</i>	GU174268
<i>AtPUP3</i>	AT1G28220		
<i>AtPUP4</i>	AT1G30840		
<i>AtPUP5</i>	AT2G24220		
<i>AtPUP6</i>	AT4G18190		
<i>AtPUP7</i>	AT4G18197		
<i>AtPUP7-like</i>	AT4G18205		
<i>AtPUP8</i>	AT4G18195		
<i>AtPUP9</i>	AT1G09860		
<i>AtPUP10</i>	AT4G18210		
<i>AtPUP10-like</i>	AT4G18220		
<i>AtPUP11</i>	AT1G44750		
<i>AtPUP12</i>	AT5G41160		
<i>AtPUP13</i>	AT4G08700		
<i>AtPUP14</i>	AT1G19770		
<i>AtPUP15</i>	AT1G75470		
<i>AtPUP16</i>	AT1G09860		
<i>AtPUP17</i>	AT1G57943		
<i>AtPUP17-like</i>	AT1G57980		
<i>AtPUP18</i>	AT1G57990		
<i>AtPUP19</i>	AT1G47603		

supplement 表2. 図7に用いた配列のAGI codeまたはaccession number

vector name (backbone / target gene)	cloning method	cloning template	subcloning	using subcloning primer sequence from 5' to 3' Forward (F) and Reverse (R)
pDR196GW / NUP1	Gateway	tobacco BL21 cDNA (NUP1 full length CDS)	pDONR / zeo	F : <u>AAAAAGCAGGCTATATGGAACATCCAGGATTAAG</u> R : <u>AGAAAGCTGGGTATCAAACAGATTCAGTATGTG</u>
pDR196GW / NUP1-GFP	Gateway	tobacco BL21 cDNA (NUP1 full length CDS)	pDONR / zeo	NUP1 F : <u>AAAAAGCAGGCTATATGGAACATCCAGGATTAAG</u> R : <u>TCCTTGCTAGCCATAACAGATTCAGTATGTGTCG</u> GFP F : CATACTGAATCTGTTATGGCTAGCAAAGGAGAAGA R : <u>AGAAAGCTGGGTATCAGTTGTACAGTTCATCCA</u>
pDR196GW / AtPUP1	Gateway	arabidopsis Col. cDNA (PUP1 full length CDS)	pDONR / zeo	F : <u>AAAAAGCAGGCTTCATGAAGAATGGTTTGATAAT</u> R : <u>AGAAAGCTGGGTTTTAAGCAACATAATCACTAA</u>
pDR196GW / PUP1-GFP	Gateway	arabidopsis Col. cDNA (PUP1 full length CDS)	pDONR / zeo	PUP1 F : <u>AAAAAGCAGGCTTCATGAAGAATGGTTTGATAAT</u> R : <u>TCTTCTCCTTTGCTAGCCATAGCAACATAATCACTAACAG</u> GFP F : CTGTTAGTGATTATGTTGCTATGGCTAGCAAAGGAGAAGA R : <u>AGAAAGCTGGGTATCAGTTGTACAGTTCATCCA</u>

supplement 表4. 第1章 酵母用発現ベクター作成に用いたプライマーおよび作成方法

 はGateway AttBサイトを示す。さらにGatewayによるpDONR / zeoへのサブクローニングではF : 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3'およびR : 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'を用いてPCRを行った。

vector name (backbone / target gene)	cloning method	cloning template	subcloning	using subcloning primer sequence from 5' to 3' Forward (F) and Reverse (R)
pBI121 / NUP1ox	restriction enzyme	tobacco BL21 cDNA (NUP1 full length CDS)	pGEM-T	F : <u>GGATCC</u> ATGGAACATCCAGGATTAAG R : <u>GAGCTC</u> TCAAACAGATTCAGTATGTG
pBI121 / AtPUP1ox	restriction enzyme	arabidopsis Col. cDNA (PUP1 full length CDS)	pGEM-T	F : <u>CCCGGG</u> ATGAAGAATGGTTTGATAATC R : <u>GAGCTC</u> TTAAGCAACATAATCACTAACAGG

supplement 表5. 第1章 植物用バイナリーベクター作成に用いたプライマー配列および作成方法
_は制限酵素サイトを示す。

gene name	foward (F) or reverse (R)	sequence from 5' to 3'
<i>NUP1</i>	F	TTGGTTACAAACGGGTGGAT
	R	AAAAATTCGGGGTGTCAATCA
<i>AtPUP1</i>	F	TATCGGGATCCTTGCGTTAC
	R	AAGAGCTGCAACCACAGTCA
<i>EF1a</i>	F	AAGCCCATGGTTGTTGAGAC
	R	GTCAACGTTCTTGATAACAC

supplement 表3. 第1章 RT-PCRまたはqRT-PCRに用いたプライマー配列

vector name (backbone / target gene)	cloning method	cloning template	subcloning	using subcloning primer sequence from 5' to 3' Forward (F) and Reverse (R)
pBI121 / NUP1 RNAi	restriction enzyme	tobacco BL21 cDNA (+750 - +1129 ; partial NUP1 cDNA)	modified pHANNIBAL	sense F : <u>CTCGAGAGCTAGATATTATACAGTTA</u> R : <u>GAATTCGAAAACGACGTACATTATTT</u> antisense F : <u>TCTAGAAGCTAGATATTATACAGTTA</u> R : <u>ATCGATGAAAACGACGTACATTATTT</u>
pBI121 / NUP1pro :: GUS	TA cloning restriction enzyme	tobacco BL21 genome (-1436 - -1 ; NUP1 promoter)	pGEM-T	F : <u>AAGCTTTGCTTTTGTGAGGGTTTGGC</u> R : <u>GGATCCATTTGTTTCTAGAGATTTG</u>
pUGW6 / PIP2a	Gateway	arabidopsis Col. cDNA (PIP2a full length CDS)	pDONR / zeo	F : <u>AAAAAGCAGGCTATATGGCAAAGGATGTGGAAGC</u> R : <u>AGAAAGCTGGGTAGACGTTGGCAGCACTTCTGA</u>
pUGW2m-tagRFP(C) / NUP1	Gateway	tobacco BL21 cDNA (NUP1 full length CDS)	pDONR / zeo	F : <u>AAAAAGCAGGCTATATGGAACATCCAGGATTAAG</u> R : <u>AGAAAGCTGGGTAAACAGATTCAGTATGTGTCG</u>
pBI121 / AtPUP1ox	restriction enzyme	arabidopsis Col. cDNA (PUP1 full length CDS)	pGEM-T	F : <u>CCCGGGATGAAGAATGGTTTGATAATC</u> R : <u>GAGCTCTTAAGCAACATAATCACTAACAGG</u>
pBI121 / QPT RNAi	restriction enzyme	tobacco BL21 cDNA (+1 - +510 ; partial QPT CDS)	modified pHANNIBAL	sense F : <u>CTCGAGATGTTTAGAGCTATTCCTTT</u> R : <u>GAATTCGATGTAAGCAGGGTGTGCAG</u> antisense F : <u>TCTAGAATGTTTAGAGCTATTCCTTT</u> R : <u>ATCGATGATGTAAGCAGGGTGTGCAG</u>

supplement表6. 第2章 植物用バイナリーベクター作成に用いたプライマー配列および作成方法

␣は制限酵素、␣はGateway AttBサイトを示す。さらにgatewayを用いてのpDONR / zeoへのサブクローニングではF : 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3'およびR : 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'を用いて2段階のPCRを行った。

gene name	foward (F) or reverse (R)	sequence from 5' to 3'
<i>NUPI</i>	F	TTGGTTACAAACGGGTGGAT
	R	AAAAATTCGGGGTGTCAATCAA
<i>COII</i>	F	CCAATTGGGCTTGACGTACT
	R	CACCTTTGCAGCAAGAAACA
<i>MYC2</i>	F	GATGGGATGCKATGATTTCGTATAC
	R	CTGAAACACTRGCATGGTGCACATC
<i>ERF189</i>	F	GCAGCTTCGACTGCAGCTTCCTC
	R	CTCCTCGGACTCGGAGCACTTC
<i>PMT</i>	F	ATTGGACCAAGATCGAGTC
	R	ATTACTGCAGAATTCTCCTAC
<i>QPT</i>	F	GACGCATTCCGTGAAAGCAC
	R	AAGTAATGGCGCTCATGCTC
<i>BBL</i>	F	GATGGACGGTTATTAGACCG
	R	ATTTTCCAGGCATAAACAATG
<i>MATE1/2</i>	F	CAAGGAATGAAGGTGGTGGC
	R	GACTTCTTTCCCCTTGCATA
<i>PI-2</i>	F	AGATGTAGCTGTAGGATACG
	R	ATCGTAAGTTCCTGCAGCAA
<i>EF1a</i>	F	AAGCCCATGGTTGTTGAGAC
	R	GTCAACGTTCTTGATAACAC

supplement 表7. 第2章 qRT-PCRに用いたプライマー配列

gene name	foward (F) or reverse (R)	sequence from 5' to 3'	gene name	foward (F) or reverse (R)	sequence from 5' to 3'
<i>NUP1</i>	F	TTGGTTACAAACGGGTGGAT	<i>PAP</i>	F	TATTGACGGCGAGGGTATTC
	R	AAAAATTCGGGGTGTCACTAA		R	TCGATTGCCAGTTTAAAGG
<i>CO11</i>	F	CCAATTGGGCTTGACGTACT	<i>HPR</i>	F	TGAAATGATCAACATATGCCAGA
	R	CACCTTGCAGCAAGAAACA		R	GCCTTGCTATCAGCTCCTTTT
<i>MYC2</i>	F	GATGGGATGCKATGATTCGTATAC	<i>PER16</i>	F	AGCACACACAACGTTGATCC
	R	CTGAAACACTRGCATGGTGCACATC		R	CCTTCAAAGCTTCTGTTGATGC
<i>ERF189</i>	F	GCAGCTTCGACTGCAGCTTCCTC	<i>PIP2-1</i>	F	AATTGCATTCATCTGTCCAAA
	R	CTCCTCGGACTCGAGCACTTC		R	ACACATCCAAGGCTCCTCTT
<i>PMT</i>	F	ATTGGACCAAGATCGAGTC	<i>Apase</i>	F	AAAATGCCGAATCCCATGTA
	R	ATTACTGCAGAATTCTCCTAC		R	CGATCATACGCCCAAATCTT
<i>PI-II</i>	F	AGATGTAGCTGTAGGATACG	<i>CYP716A2</i>	F	TCCCGGGACTCCAATACATA
	R	ATCGTAAGTTCCTGCAGCAA		R	GCGGTTACGAAGGAAGAAAA
<i>PILS1</i>	F	TGGAATTATGCACTGGCATC	<i>ENH1</i>	F	TTGGTGGTGTGGAGCATT
	R	AAAGGCCAAAAAAAAGACATGA		R	TGTTGAAGTCTGTTGGAATGTG
<i>PILS2</i>	F	TTTCAGCTGATTTGGGGTTT	<i>HSP1</i>	F	CCACATGATCAATGTCACAAAA
	R	TCAACAGCGGTAGAACAGCA		R	CCACAATTTGGGAAGCAAAG
<i>PILS5</i>	F	TGTGTGGGACCATTCTATTTG	<i>NPH3-like</i>	F	AGTCGTGCGAGTTGTATGGT
	R	CACCTTATGAAGGGGGTCAT		R	GAAGTCGTCCACGTCCATCT
<i>PILS6</i>	F	GGCATTGGCAGACAAAAGAT	<i>UGT74B1</i>	F	ATCAAGCCATTGGTTGCTTC
	R	TGGGCGGAGGAAGTAGTAGA		R	GTCAGACCATTGTGGCATTG
<i>PILS7</i>	F	CAGCATCAAACCCATGCTTA	<i>BSMT1</i>	F	TCTGGATTCTGCCCTACCTG
	R	AACTCCTTTTTGCACAATTTGA		R	TTAGCAGCTCGACCACACAC
<i>PIN1</i>	F	TAAAGACCCTTTTGCCATCG	<i>PR4</i>	F	CAGCAAGGCCACCTTATTGT
	R	CTGTGCCCAACAATGAACC		R	ACAGCGCAGGTCTGAAAAAT
<i>PIN3</i>	F	TCTTGGCACGATCTTTATGTTG	<i>WRKY40</i>	F	CGTCTTCTTGACCGAGAAC
	R	GGAGAGAAGATTTTCCACCA		R	GCAAAGTTACAGTTACTCAGACGG
<i>LAA2;3</i>	F	ATCAGAAGCAAGAGGCTTGG	<i>GPT2</i>	F	ATGGGCAGCAATGGACTAAC
	R	GACAACCCAAGCTGGAAAAA		R	TCATTCATGATCATTGCCCTCT
<i>GUS</i>	F	AAAGCAAGCTGACCGACACT	<i>EF1a</i>	F	AAGCCCATGGTTGTTGAGAC
	R	CGCTGATCCTTCAGATAGGC		R	GTCAACGTTCTTGATAACAC
<i>GH3</i>	F	TGACATGGGAGAGTCAATGAAG			
	R	GCCGAACGTCCATGTCTAGT			

supplement 表8. 第3章 qRT-PCRに用いたプライマー配列

<i>gene name</i>	AGI code	<i>gene name</i>	SGN code
<i>AtPILS1</i>	AT1G20925	<i>NtPILS1</i>	SGN-U428005
<i>AtPILS2</i>	AT1G71090	<i>NtPILS2</i>	SGN-U438580
<i>AtPILS3</i>	AT1G76520	<i>NtPILS5</i>	SGN-U431337
<i>AtPILS4</i>	AT1G76530	<i>NtPILS6</i>	SGN-U426251
<i>AtPILS5</i>	AT2G17500	<i>NtPILS7</i>	SGN-U431341
<i>AtPILS6</i>	AT5G01990		
<i>AtPILS7</i>	AT5G65980		

supplement 表9. 図41で用いた配列のAGI codeまたはSGN code

vector name (backbone / target gene)	cloning method	cloning template	subcloning	using primer sequence from 5' to 3' Forward (F) and Reverse (R)
pBI121 / PILS1 RNAi	restriction enzyme	tobacco BL21 cDNA (+1 - +600 ; partial PILS1 CDS)	modified pHANNIBAL	sense F : <u>CTCGAGATGGGATTTGTGGACTTGTT</u> R : <u>GAATTCTAACAATTTTGTGCAGCTAT</u> antisense F : <u>TCTAGAATGGGATTTGTGGACTTGTT</u> R : <u>ATCGATTAACAATTTTGTGCAGCTAT</u>
pER8 / PILS5/7 RNAi	restriction enzyme	tobacco BL21 cDNA (+178 - +489 ; partial PILS7 CDS)	modified pHANNIBAL	sense F : <u>CTCGAGTTGGCAAAGACTGTCACCTT</u> R : <u>GAATTCGTAAGTCCATATGTAGAAAC</u> antisense F : <u>TCTAGATTGGCAAAGACTGTCACCTT</u> R : <u>ATCGATGTAAGTCCATATGTAGAAAC</u>
pUWB5 / PILS1	Gateway	tobacco BL21 cDNA (PILS1 full length CDS)	pDONR / zeo	F : <u>AAAAAGCAGGCTTCATGGGATTTGTGGACTTGTT</u> R : <u>AGAAAGCTGGGTTAGATAAAATCCACATGTAAT</u>
pUWB5 / PILS7	Gateway	tobacco BL21 cDNA (PILS7 full length CDS)	pDONR / zeo	F : <u>AAAAAGCAGGCTTCATGGGGTTTTGGACATTATT</u> R : <u>AGAAAGCTGGGTTGGACAAGAGCCACATGAATA</u>

supplement 表10. 第3章 ベクター作成に用いたプライマーの配列および作成方法

␣は制限酵素、␣はGateway AttBサイトを示す。さらにgatewayを用いてのpDONR / zeoへのサブクローニングではF : 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3'およびR : 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'を用いて2段階のPCRを行った。