

## 植物二次代謝を制御する ERF 転写因子

富山大学和漢医薬学総合研究所 研究開発部門 資源科学領域  
庄司 翼

### はじめに

植物は生物活性を有するアルカロイドやテルペノイドなどの化学構造的にも多様な二次代謝産物を生産・蓄積します。厳しい自然環境において植物がよりよく生育・繁殖するために天然化合物は重要な役割を果たします。人類は古来より医薬、色素、香料、工業原料などとして植物由来成分を利用してきました。植物独自の APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR (AP2/ERF) ファミリー (Nakano et al. 2006) に属する転写因子が、複数の植物系統で、ニコチン (Shoji et al. 2010) やステロイドグリコアルカロイド (SGA) (Cardenas et al. 2016; Thagun et al. 2016) などの毒性天然物や、アルテミシニン (Lu et al. 2013)、ビンブラスチン、ビンクリスチン (van der Fits and Memelink 2000) などの医薬などの多くの代謝産物の生合成を制御します (図 1)。これらの ERF 遺伝子は、相同遺伝子とともにゲノムにおいて遺伝子クラスターを構成し、植物の防御シグナルであるジャスモン酸 (JA) によって誘導されます。本稿では、ERF 転写因子の機能、遺伝子構成、分子進化、代謝工学への応用などに関する最近の進展を解説します。関連する総説 (Shoji 2019; Shoji and Yuan 2021) もご参照ください。

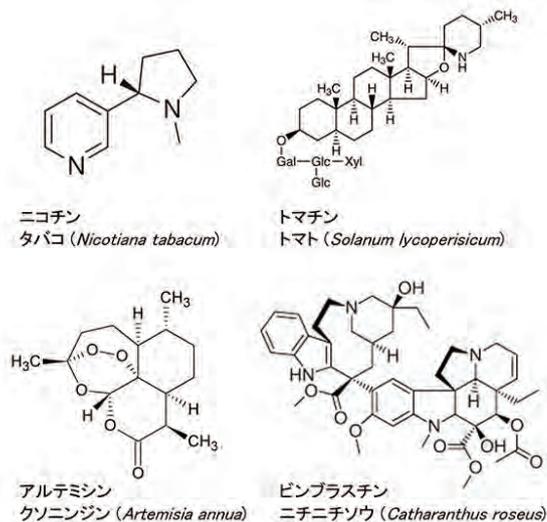


図1 ERF転写因子により制御される天然化合物

### 二次代謝の転写制御

植物やそれらのエキスは有史以前から薬用に供されてきました。人類の長年にわたる経験知に基づく伝統医薬は、生活に根付いた貴重な創薬基盤です。抗マラリア薬のセスキテルペンラクトンであるアルテミシン、抗がん性のジテルペンであるパクリタキセル (タキソール)、同じく抗がん性のモノテルペノイドアルカロイド (MIA) であるビンクリスチンとビンブラスチンなど数多くの天然化合物は、植物由来の医薬として用いられています。天然化合物は複数の光学中心を含む複雑な化学構造をもち、化学合成で効率的には生産できないことから、野生もしくは栽培された薬用植物から抽出・精製などの工程を経て供給されています。近年、植物における生理活性成分の生合成過程については、分子クローニングやゲノム科学の進展により急速に明らかにされつつあります。

多くの生理活性天然成分は植物の特定組織のみに微量で含有されます。また、同じ植物種でも遺伝的に異なる系統間で含量が異なったり、生育・栽培条件などにより含量が変動したりします。有用成分 (有効性) を安定的に得るためには、成分生合成の制御様式やそのメカニズムを理解する必要があります。二次代謝生合成遺伝子の発現は外的環境や内的な発生プログラムなどに応答してダイナミックに変動

します。こうした発現変動は主に転写レベルでの制御に依存しています。合成経路を構成する多数の遺伝子（生合成酵素やトランスポーターをコードする遺伝子）は、転写因子によって協調的に転写制御されます。例えば、アントシアニン色素や関連フラボノイドの合成経路は、MYB ファミリーや bHLH ファミリーに属する転写因子によって制御されます。最近では色素ばかりでなく変異が発見しづらい無色の代謝産物に関しても理解が進み、転写因子が成分変異の多くの原因であることもわかってきました (Shoji et al. 2021)。

脂肪酸由来の一群の化合物である JA 類は、植物において食害や感染に対する防除応答を惹起する代表的な植物ホルモンです。防御物質として二次代謝産物は JA シグナルによって蓄積が誘導されることがよく知られており、組織培養系において有用成分を誘導するエリシターとしてもしばしば利用されます。JA シグナル伝達経路に関しては受容から転写誘導に至るメカニズムが明らかにされており、プロテアソーム依存性の JAZ リプレッサーの分解とそれに伴う bHLH ファミリーに属する MYC2 などの転写因子の活性化が中心的な役割を果たしています (Shoji et al. 2008)。この JA シグナル伝達カスケードは AP2/ERF 転写因子などを介してさらに下流の防御応答・代謝経路につながります (Shoji and Hashimoto 2011a)。

## 二次代謝を制御する ERF 転写因子

AP2/ERF ファミリーは植物独自の転写因子スーパーファミリーで、一般的に各植物種で 100 以上のメンバー遺伝子が存在します (Nakano et al. 2006)。このスーパーファミリーは 4 つのファミリー (AP2, ERF, RAV, Soloist) に区別され、発生・生育やストレス応答など広範な過程に関与しています。AP2/ERF 転写因子は 3 つのβ鎖からなるシートと 1 つのαヘリックスから構成される特徴的な DNA 結合ドメインを有し、GCC 配列 (5' -AGCCGCC-3') などのシス制御要素を特異的に認識します (Allen et al. 1998)。

キョウチクトウ科の園芸・薬用植物ニチニチソウ (*Catharanthus roseus*) において JA 応答性の ERF ファミリー転写因子である Octadecanoid-derived Responsive *Catharanthus* AP2-domain 3 (ORCA3) が MIA 生合成を制御することを、ベルギーの研究グループが 2000 年に報告しました (van der Fits and Memelink 2000)。この報告以降、ORCA3 の相同因子で ERF ファミリー/グループ IXa/クレード II (Nakano et al. 2006; Shoji et al. 2013) に属する JA 応答性転写因子が、いくつもの植物系統において多様な二次代謝経路を制御することが次々に分かってきました。これらの転写因子には、ナス科嗜好品作物タバコ (*Nicotiana tabacum*) においてニコチンを制御する ERF189 (Shoji et al. 2010) と ERF199 (Shoji et al. 2022)、ナス科食用作物トマト (*Solanum lycopersicum*) においてトマチンなどの SGA を制御する JA-Responsive ERF 4 (JRE4) (Cardenas et al. 2016; Thagun et al. 2016)、キク科薬用植物クソニンジン (*Artemisia annua*) においてアルテミシンを制御する AaORC (Lu et al. 2013) などがあります。これらの ERF 転写因子は、GCC 配列やその類似配列である GC リッチ配列をそれぞれ特異的に認識することが知られています (Shoji and Hashimoto 2011b; Shoji et al. 2013)。シス配列の認識特異性は種間で若干異なるものの概ねは共通しており、例えば、ERF189 に制御されるニコチン生合成遺伝子プロモーターはトマトでは JRE4 によってコントロールされること (Shoji and Hashimoto 2019) や、タバコとニチニチソウの種間で互いの転写因子を機能的に交換可能であること (Paul et al. 2017) が報告されています。



り, *NIC2*は *N. tomentosiformis* 由来の第 19 染色体上の *ERF189*であることが分かりました(Kajikawa et al. 2017; Shoji et al. 2022) [2014 年のゲノム配列決定(Sierro et al. 2014)により詳細判明] (図 3)。それぞれのゲノム領域には 5 個と 10 個の *ERF* 遺伝子が縦列で並びクラスターを形成しています。発現や機能に関するいくつかの証拠(Kajikawa et al. 2017; Shoji and Hashimoto 2015)から, 多数の相同遺伝子のうち *ERF199*と *ERF189*の 1 対の遺伝子のみがニコチン制御に関与するものと考えられます。機能的に重複する *ERF199*と *ERF189*がともに機能欠損することで, 明瞭な低ニコチン表現型が現れます。*nic2-1*変異では *ERF189*と他 7 個の *ERF*を含む 746 kb の領域が欠損しています(図 3)。一方, *nic1-1*変異では *ERF199*周辺には変異箇所はなく, *ERF199*の下流 48 kb の部分に 2,908 bp の欠失があり, おそらく遠位制御配列として機能するその領域の欠失のため, *ERF199*の発現減弱が引き起こされています(図 3)(Shoji et al. 2022)。*ERF199*と *ERF189*は構造的にも非常に良く似ているばかりでなく, 転写活性化能や転写産物レベルの発現量の点でもほぼ同等であるにもかかわらず, *ERF189*が完全欠損している *nic2-1*変異よりも *ERF199*の発現が減弱している *nic1-1*変異の方がより表現型が強いのかという問題は未解決です(Shoji et al. 2022)。

### トマト JRE4 によるステロイドグリコアルカロイド生合成制御

トマトやジャガイモなどのナス属植物の主に非食部分には *SGA* が毒性成分として蓄積されています。ジャガイモの芽や未成熟塊茎にはソラニンやチャコニンなどの *SGA* が高濃度で含まれ, しばしば食中毒の原因になります。ジャガイモの品質管理上, *SGA* を削減することは大切です。最近では *SGA* 生合成酵素遺伝子をゲノム編集技術で破壊することで *SGA* をほとんど含まないジャガイモが実用化されつつあります。

筆者らはタバコ *ERF* の研究を進めている過程で, トマトゲノム[2012 年配列決定(Tomato Genome 2012)]に相同 *ERF* 遺伝子が存在し, 5 つの遺伝子からなるクラスターを形成することに気がつきました。発現やその他の性状から *JRE4* に着目し, *JRE4* の機能改変システムを形質転換によって作出したり, 変異集団から *TILLING* 法で *jre4-1* 変異 (DNA 結合ドメインの高度に保存された残基のアミノ酸置換変異) を得たりしました(Nakayasu et al. 2018; Thagun et al. 2016)。*JRE4* の機能改変に応じて上流のメバロン酸経路を含むアセチル-CoA から最終産物に至る *SGA* 生合成経路の大部分の遺伝子の発現が変動していました。また, *jre4-1* ホモ変異体ではトマチンなどの *SGA* 含量が野生型の 2%程度にまで減少し, 耐虫性が低下していました(Nakayasu et al. 2018)。タバコの *ERF199* や *ERF189* と同様に, クラスター内で *JRE4* のみが *SGA* を制御すると考えられます。トマト以外のナス属植物ジャガイモ(Cardenas et al. 2016)やナス(Shoji and Saito 2022)に関してもトマト *JRE4* のオルソログが *SGA* を制御しています。

### 代謝進化のリクルート説

タバコとトマトというナス科の 2 つの系統で, 進化的によく保存された *ERF* 転写因子が, それぞれニコチンと *SGA* という化学構造や生合成経路 (生合成遺伝子群) が異なる二次代謝産物を制御しています。プロモーター領域内に転写因子により認識されるシス配列が出現することで, 生合成遺伝子は転写因子に制御されるようになります。こうした「リクルート」が代謝経路を構成する多数の生合成遺伝

子で繰り返されることで、転写因子が多数の下流生合成遺伝子を制御するレギュロンが段階的に確立していきます。代謝レギュロンの確立がタバコとトマトの系統が分離したのちにそれぞれ独立に起こったと考えられます。比較的短いシス配列の高頻度での出現は、頻繁なリクルートを可能とし、複数の生合成酵素の組み合わせが探索的に試されていくと考えられます。生合成遺伝子のリクルートとともに新たな代謝の流れや新規代謝物が出現します。そうした新規代謝産物が例えばニコチンや SGA のように防御化合物のように植物生存に有利であるような場合、より選択されやすくなると考えられます。少しでも有利な代謝の流れが生じた場合、その流れを強化するようなリクルートやリクルートされた酵素の触媒特性の変異がより選択されやすくなるでしょう。概念的仮説で数理的な裏付けなどは現時点では希薄ですが、遺伝子発現を考慮した新しい代謝進化仮説として筆者は「代謝進化のリクルート説」(Shoji 2019)を提唱しました。

## 代謝工学への応用

トマト *jre4-1* 変異による SGA 含量の減少(Nakayasu et al. 2018)に比べると、タバコ二重変異 *nic1-1nic2-1* によるニコチン含量の減少は限られています。これは *nic1-1* 変異では *ERF199* の機能が部分的にしか失われていないためです。ゲノム編集により得た *ERF199* の機能完全欠損アレル *nic1-2* や *ERF199* が欠失した天然変異アレル *nic1-3* (図 3) は、単独変異でも二重変異 *nic1-1nic2-1* に匹敵する低ニコチン形質を生じます(Shoji et al. 2022)。 *nic1* 変異アレルを *nic2-1* や新たに編集で作出した変異アレル *nic2-2* と組み合わせることで、超低ニコチン形質(野生型の 2%程度)を生じることが分かってきました(Hayashi et al. 2020; Shoji et al. 2022)。ニコチン含量に影響を与えるさまざまな変異アレルが分子レベルで解明されたことで低ニコチンや超低ニコチンタバコを迅速に育種することが可能となりました。これらの変異は植物の生育には目立った影響を与えない点でも優れています(Hayashi et al. 2020)。

タバコ *ERF189* の過剰発現によりニコチン蓄積が誘導されます。ベンサムアナタバコ *N. benthamiana* の葉で一過的に *ERF189* を過剰発現した場合、蓄積が数百倍ほどになりました(Hayashi et al. 2020)。一方、*ERF189* を過剰発現させたタバコ形質転換体でも蓄積は増加しましたが、数倍ほどの増加に止まり、生育の阻害も生じました(Hayashi et al. 2020)。植物にとってもアルカロイドなどの天然化合物を構成的に過剰蓄積することは生育などに負荷が大きいと考えられます。生育阻害の問題を回避するためにも一過的発現系を天然化合物の生産に利用する必要がありそうです。

遺伝子組換えが容易なタバコやトマトを用いた筆者らの研究で、転写因子を標的とすることで効率的に代謝改変できることが明らかとなりました。今後、さまざまな薬用資源植物で同様の方法論により代謝改変が可能になると考えられます。

## 今後の展望

ゲノム配列情報が存在し形質転換が容易なナス科植物タバコやトマトを対象として筆者らは二次代謝を制御する ERF 転写因子について遺伝子構成、発現、転写活性化能などを解明し、代謝工学に応用しました。進化的に保存された転写因子は広範な植物種で防御性二次代謝産物を制御しています。同様の例は ERF ファミリー以外の転写因子でも知られるようになってきました(Shoji 2019)。二次代謝産物は

特定の種や属のみに特異的に存在することから、化合物や生合成酵素のレベルの研究は代謝経路ごとの「各論」になりがちですが、転写因子などの上流制御メカニズムは代謝系を超えて共通しており「総論」を語ることができそうです。低ニコチン変異のような天然変異・バリエーションについて分子的・ゲノム科学的アプローチで遺伝的基盤を解明し、効果的に成分制御することが重要です。多種多様な薬用資源植物のゲノム配列情報が今後の研究展開を加速することが期待されます。

## 文献

- Allen MD, Yamasaki K, Ohme-Takagi M, Tateno M, Suzuki M (1998) A novel mode of DNA recognition by a beta-sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. *EMBO J* 17: 5484-5496
- Cardenas PD, Sonawane PD, Pollier J, Vanden Bossche R, Dewangan V, Weithorn E, Tal L, Meir S, Rogachev I, Malitsky S, et al. (2016) GAME9 regulates the biosynthesis of steroidal alkaloids and upstream isoprenoids in the plant mevalonate pathway. *Nat Commun* 7: 10654
- Hayashi S, Watanabe M, Kobayashi M, Tohge T, Hashimoto T, Shoji T (2020) Genetic Manipulation of Transcriptional Regulators Alters Nicotine Biosynthesis in Tobacco. *Plant Cell Physiol* 61: 1041-1053
- Kajikawa M, Sierro N, Kawaguchi H, Bakaher N, Ivanov NV, Hashimoto T, Shoji T (2017) Genomic Insights into the Evolution of the Nicotine Biosynthesis Pathway in Tobacco. *Plant Physiol* 174: 999-1011
- Legg PD, Collins GB (1971) Inheritance of percent total alkaloids in *Nicotiana tabacum* L. II. genetic effects of two loci in Burley21 x LA Burley21 populations. *Can J Genet Cytol* 13: 287-291
- Lu X, Zhang L, Zhang F, Jiang W, Shen Q, Zhang L, Lv Z, Wang G, Tang K (2013) AaORA, a trichome-specific AP2/ERF transcription factor of *Artemisia annua*, is a positive regulator in the artemisinin biosynthetic pathway and in disease resistance to *Botrytis cinerea*. *New Phytol* 198: 1191-1202
- Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H (2006) Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol* 140: 411-432
- Nakayasu M, Shioya N, Shikata M, Thagun C, Abdelkareem A, Okabe Y, Ariizumi T, Arimura GI, Mizutani M, Ezura H, et al. (2018) JRE4 is a master transcriptional regulator of defense-related steroidal glycoalkaloids in tomato. *Plant J* 94: 975-990
- Paul P, Singh SK, Patra B, Sui X, Pattanaik S, Yuan L (2017) A differentially regulated AP2/ERF transcription factor gene cluster acts downstream of a MAP kinase cascade to modulate terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *New Phytol* 213: 1107-1123
- Shoji T (2019) The Recruitment Model of Metabolic Evolution: Jasmonate-Responsive Transcription Factors and a Conceptual Model for the Evolution of Metabolic Pathways. *Front Plant Sci* 10: 560
- Shoji T, Hashimoto T (2011a) 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, Hashimoto T (2011b) Recruitment of a duplicated primary metabolism gene into the nicotine biosynthesis regulon in tobacco. *Plant J* 67: 949-959
- Shoji T, Hashimoto T (2015) Stress-induced expression of NICOTINE2-locus genes and their homologs encoding

- Ethylene Response Factor transcription factors in tobacco. *Phytochemistry* 113: 41-49
- Shoji T, Hashimoto T (2019) Expression of a tobacco nicotine biosynthesis gene depends on the JRE4 transcription factor in heterogenous tomato. *J Plant Res* 132: 173-180
- Shoji T, Kajikawa M, Hashimoto T (2010) Clustered transcription factor genes regulate nicotine biosynthesis in tobacco. *Plant Cell* 22: 3390-3409
- Shoji T, Mishima M, Hashimoto T (2013) Divergent DNA-binding specificities of a group of ETHYLENE RESPONSE FACTOR transcription factors involved in plant defense. *Plant Physiol* 162: 977-990
- Shoji T, Moriyama K, Sierro N, Ouadi S, Ivanov NV, Hashimoto T, Saito K (2022) Natural and induced variations in transcriptional regulator genes result in low-nicotine phenotypes in tobacco. *Plant J*
- Shoji T, Ogawa T, 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, Saito K (2022) A Jasmonate-Responsive ERF Transcription Factor Regulates Steroidal Glycoalkaloid Biosynthesis Genes in Eggplant. *Plants (Basel)* 11
- Shoji T, Umemoto N, Saito K (2021) Genetic divergence in transcriptional regulators of defense metabolism: insight into plant domestication and improvement. *Plant Mol Biol* 109:401-411
- Shoji T, Yuan L (2021) ERF Gene Clusters: Working Together to Regulate Metabolism. *Trends Plant Sci* 26: 23-32
- Sierro N, Battey JN, Ouadi S, Bakaher N, Bovet L, Willig A, Goepfert S, Peitsch MC, Ivanov NV (2014) The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. *Nat Commun* 5: 3833
- Thagun C, Imanishi S, Kudo T, Nakabayashi R, Ohyama K, Mori T, Kawamoto K, Nakamura Y, Katayama M, Nonaka S, et al. (2016) Jasmonate-Responsive ERF Transcription Factors Regulate Steroidal Glycoalkaloid Biosynthesis in Tomato. *Plant Cell Physiol* 57: 961-975
- Tomato Genome C (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485: 635-641
- van der Fits L, Memelink J (2000) ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science* 289: 295-297