

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07490

研究課題名(和文) ユーカリのアルミニウム無害化タンニンの合成に関わる糖転移酵素の探索と機能解明

研究課題名(英文) Identification and characterization of glycosyltransferases involved in biosynthesis of aluminum-detoxifying tannins in *Eucalyptus camaldulensis*

研究代表者

田原 恒 (Tahara, Ko)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号：70445740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、アルミニウム無毒化という加水分解性タンニンの新機能を提唱している。本研究の目的は、加水分解性タンニン生合成の第1段階の反応である α -グルコガリン合成を触媒するUDP-糖転移酵素(UGT)をアルミニウム耐性樹木ユーカリで同定することである。根から単離した4種類の候補UGT(UGT84A25a、25b、26a、26b)の組換えタンパク質は、 α -グルコガリン合成活性を示した。また、これらの候補UGTの遺伝子は、葉、茎、根のいずれでも発現しており、加水分解性タンニンの分布と一致していた。以上の結果から、4種類のUGTがユーカリで α -グルコガリン合成を担っていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have recently found a novel role for hydrolyzable tannins as aluminum-detoxifying compounds in roots of *Eucalyptus camaldulensis*. The objective of this study was to identify the gene of UDP glycosyltransferase [UGT] in *E. camaldulensis*, which catalyzes the formation of α -glucogallin, the first step of hydrolyzable tannin biosynthesis. In vitro assays showed that the recombinant proteins of the four candidate UGTs (UGT84A25a, 25b, 26a, 26b) synthesized α -glucogallin from UDP-glucose and gallic acid. Genes of the four candidate UGTs were expressed in leaves, stems, and roots of *E. camaldulensis*. This gene expression pattern was consistent with the distribution of hydrolyzable tannins in these organs. These results suggest that the four UGT enzymes catalyze the synthesis of α -glucogallin in *E. camaldulensis*.

研究分野：樹木生理学

キーワード：加水分解性タンニン α -グルコガリン 生合成経路 糖転移酵素 グリコシルトランスフェラーゼ *Eucalyptus camaldulensis* フトモモ科 アルミニウム耐性

1. 研究開始当初の背景

Eucalyptus camaldulensis (ユーカリ) は、酸性土壌で問題となるアルミニウム過剰害に非常に強い耐性を持つフトモモ科樹木である。研究代表者らは、ユーカリの根から新規アルミニウム無毒化物質を単離し、加水分解性タンニンのエノテイン B と同定した。(引用文献)。そして、加水分解性タンニンが根でアルミニウムを無毒化するという新しいアルミニウム耐性機構を提唱している。加水分解性タンニンによるアルミニウム無毒化の分子機構を理解するためには、加水分解性タンニンの生合成経路を遺伝子レベルで解明する必要がある。

2. 研究の目的

加水分解性タンニンの生合成は、シキミ酸経路から分岐して合成された没食子酸がグルコースとエステル結合し、β-グルコガリンが合成される反応から始まる(図1)。β-グルコガリンは、エノテイン B などのより複雑な加水分解性タンニンが合成される際の前駆体となり、加水分解性タンニン生合成の起点となる化合物である。本研究は、β-グルコガリン合成を触媒する UDP-糖転移酵素(UDP-glycosyltransferase, UGT)の遺伝子をユーカリで同定することを目的とした。

3. 研究の方法

ヨーロッパナラで既知の UGT(引用文献)との相同性を基に、ユーカリの根から候補 UGT の cDNA を単離した。候補 UGT を N 末端ヒスチジン融合組換えタンパク質として大腸菌で異種発現させた。抽出した組換えタンパク質をアフィニティークロマトグラフィーによって精製し、酵素活性の解析に用いた。また、候補 UGT の遺伝子発現を定量

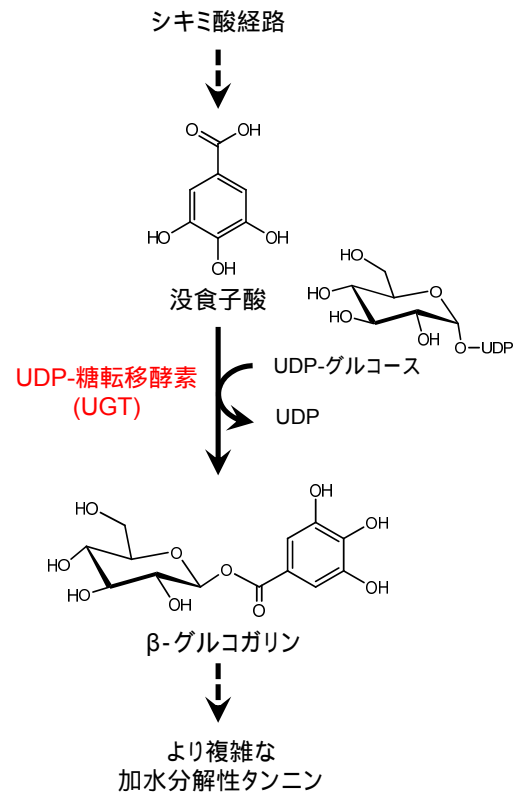


図1 β-グルコガリンの生合成

RT-PCR 法によって分析した。

4. 研究成果

(1) ユーカリからの候補 UGT の単離
ユーカリから単離した 7 種類の候補 UGT のうち、4 種類は UGT84A サブファミリータンパク質に分類され(UGT84A25a、A25b、A26a、A26b)、3 種は UGT84J サブファミリータンパク質に分類された(UGT84J3、J4、J5)(図2)。

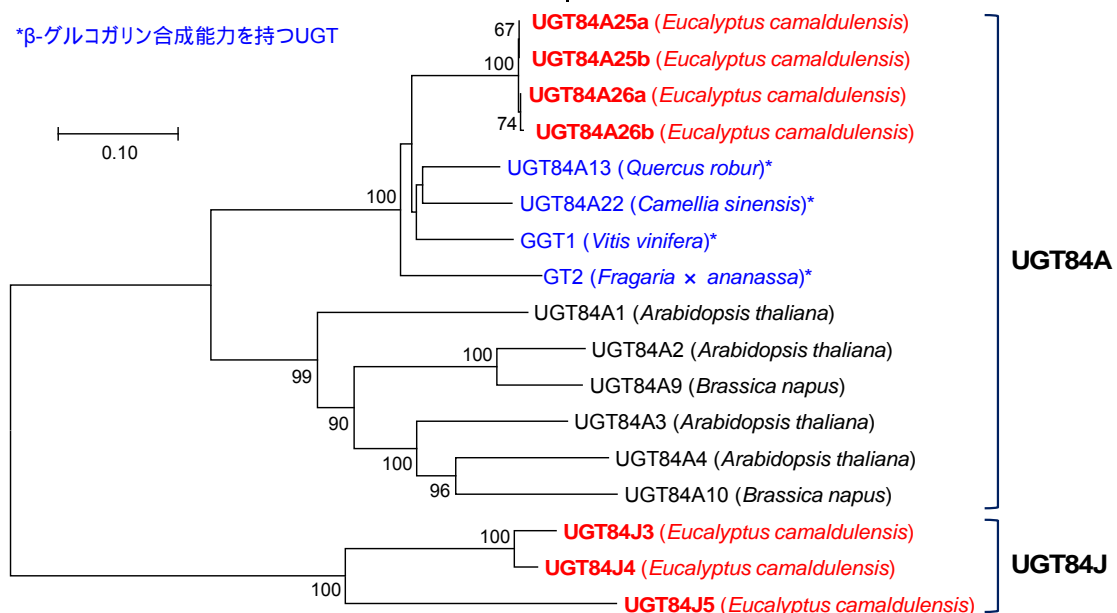


図2 ユーカリの UGT と他植物種で特性が明らかになっている UGT の系統発生解析

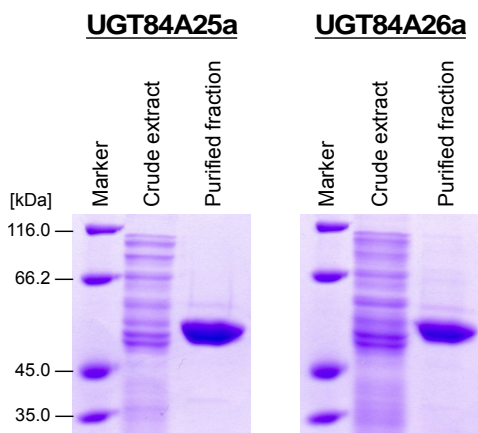


図3 精製したユーカリ UGT の組換えタンパク質

(2) 候補 UGT の酵素特性

組換えタンパク質 (図 3) を用いた解析で、4 種類の UGT84A サブファミリータンパク質は、UDP-グルコースと没食子酸 (gallic acid) を基質として β -グルコガリンを合成する活性を示した (図 4)。一方、3 種類の UGT84J サブファミリータンパク質では、活性を検出できなかった。UGT84A25a と A26a の基質特異性を調べたところ、ともにヒドロキシケイ皮酸類 (カフェー酸、フェルラ酸、シナピン酸) より、ヒドロキシ安息香酸類 (没食子酸、プロトカテキ酸、バニリン酸) を基質としたほうが高い酵素活性を示した。没食子酸を基質とした β -グルコガリン合成の反応速度論パラメータは、UGT84A25a で K_m 168 \pm 14 μ M、 V_{max} 237 \pm 5 nkat mg⁻¹、UGT84A26a で K_m 190 \pm 16 μ M、 V_{max} 186 \pm 4 nkat mg⁻¹ であった。

(3) 候補 UGT の遺伝子発現

UGT84A25a/b と A26a/b は、葉、茎、根のいずれでも発現しており、加水分解性タンニンの分布と一致していた。一方、UGT84J3、J4、J5 は、主に葉や茎で発現しており、加水分解性タンニンの分布と異なっていた。また、UGT84A25a/b と A26a/b の発現は、アルミニウムストレスの影響を受けなかった。

(4) 結論

以上の結果から、ユーカリでは UGT84A サブファミリーに属する 4 種類の糖転移酵素 (UGT84A25a、A25b、A26a、A26b) が β -グルコガリン合成を担い、加水分解性タンニン生合成に恒常的に前駆体を供給していると考えられた。

今後、 β -グルコガリン合成に関わる 4 種類の遺伝子 (UGT84A25a、A25b、A26a、A26b) の発現を抑えた遺伝子組換えユーカリを作製する予定である。加水分解性タンニン生合成の起点となる β -グルコガリンの合成を抑制することで、加水分解性タンニンの含有量が低くなるのが期待される。加水分解性タンニンの含有量が異なるユーカリを比較する

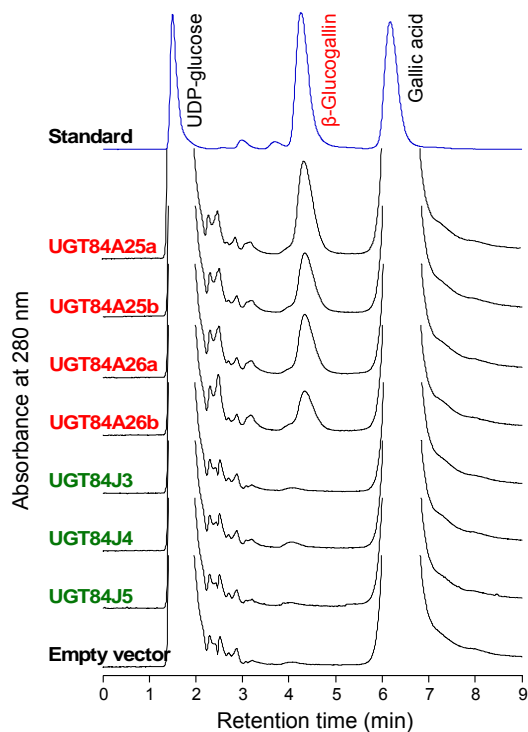


図4 ユーカリ UGT による β -グルコガリンの合成

ことにより、アルミニウム無毒化などの加水分解性タンニンの生理的機能を解明できると考えている。

本報告書中の図は、Elsevier からの許可を得て、Phytochemistry, 152, Tahara K, Nishiguchi M, Frolov A, Mittasch J and Milkowski C, Identification of UDP glucosyltransferases from the aluminum-resistant tree *Eucalyptus camaldulensis* forming β -glucogallin, the precursor of hydrolyzable tannins, 154–161, Copyright (2018)から転載したものです。

<引用文献>

Tahara K, Hashida K, Otsuka Y, Ohara S, Kojima K, Shinohara K (2014) Identification of a hydrolyzable tannin, oenothien B, as an aluminum-detoxifying ligand in a highly aluminum-resistant tree, *Eucalyptus camaldulensis*. Plant Physiology 164: 683–693.

Mittasch J, Böttcher C, Frolova N, Bönn M, Milkowski C (2014) Identification of UGT84A13 as a candidate enzyme for the first committed step of gallotannin biosynthesis in pedunculate oak (*Quercus robur*). Phytochemistry 99: 44–51.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Tahara K, Nishiguchi M, Frolov A, Mittasch J, Milkowski C (2018) Identification of UDP

glucosyltransferases from the aluminum-resistant tree *Eucalyptus camaldulensis* forming β -glucogallin, the precursor of hydrolyzable tannins. *Phytochemistry* 152: 154–161. 査読有
DOI: 10.1016/j.phytochem.2018.05.005

Tahara K, Hiradate S, Hashida K, Shinohara K (2017) An aluminum-resistance mechanism in *Eucalyptus camaldulensis*: complexation between aluminum and oenothetin B in presence of organic acids *in vitro*. *Journal of Forest Research* 22: 261–264. 査読有
DOI: 10.1080/13416979.2017.1326656

〔学会発表〕(計6件)

Tahara K, Mittasch J, Nishiguchi M, Kuhfahl S, Frolov A, Milkowski C (2018) Identification of glycosyltransferases involved in hydrolyzable tannin biosynthesis in *Eucalyptus camaldulensis*. 第59回日本植物生理学会年会

田原恒 (2018) タンニンによるユーカリのアルミニウム無毒化機構. 第129回日本森林学会大会

田原恒, Mittasch J, 西口満, Kuhfahl S, Frolov A, Milkowski C (2017) アルミニウム耐性ユーカリの加水分解性タンニン合成に関わる糖転移酵素の同定. 第63回日本土壌肥料学会仙台大会

Tahara K, Mittasch J, Nishiguchi M, Kuhfahl S, Frolov A, Milkowski C (2017) Identification of glycosyltransferases involved in biosynthesis of hydrolyzable tannins in an aluminum-resistant *Eucalyptus* tree. XVIII International Plant Nutrition Colloquium

田原恒, Mittasch J, 西口満, Kuhfahl S, Frolov A, Milkowski C (2017) *Eucalyptus camaldulensis* の加水分解性タンニン合成に関わる糖転移酵素の同定. 第128回日本森林学会大会

Tahara K, Mittasch J, Nishiguchi M, Kuhfahl S, Milkowski C (2016) Identification of UDP-glycosyltransferases involved in the biosynthesis of hydrolysable tannins in *Eucalyptus camaldulensis*. XXVIIIth International Conference on Polyphenols

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

森林総合研究所 研究成果
<http://www.ffpri.affrc.go.jp/research/saizensen/2018/20180531-02.html>

季刊 森林総研 No.29
<http://www.ffpri.affrc.go.jp/pubs/kikan/kikan-29.html>

森林総合研究所 110周年記念誌 「森林総合研究所百十年のあゆみ」
<http://www.ffpri.affrc.go.jp/pubs/ayumi/110ayumi/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田原 恒 (TAHARA, Ko)
国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等
研究者番号: 70445740

(2) 研究分担者

西口 満 (NISHIGUCHI Mitsuru)
国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等
研究者番号: 80353796

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

Carsten Milkowski (MILKOWSKI Carsten)
マルティン・ルター大学ハレ・ヴィッテンベルク