

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07460

研究課題名(和文)花粉特異的フラボノイドの空間的・時間的代謝経路とその作用機構の解明

研究課題名(英文) Spatial and temporal studies of pollen-specific flavonoid metabolism and its working mechanism

研究代表者

榎原 圭子 (Yonekura-Sakakibara, Keiko)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・上級研究員

研究者番号：20360555

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)：主要な植物二次代謝産物の一つであるフラボノイドは、ペチュニアやトウモロコシでは花粉の稔性に関与し、欠損すると不稔(種子ができないこと)となる。我々は、ペチュニア花粉特異的フラボノイド合成の最終ステップに関わる配糖化酵素UGT79B31遺伝子を単離し、UGT79B31が、フラボノイド3位配糖体の2'位にグルコースを転移する酵素であることを明らかにした。UGT79B31は細胞内で細胞質に局在した。ペチュニアの各器官(葯、花弁、葉)に存在するフラボノイドの構造を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

花粉特異的フラボノイドの代謝系酵素遺伝子の同定は、種子形成能に及ぼすフラボノイドの作用メカニズムの解明の手掛かりとなり、将来的には園芸学的な応用展開が期待される。現在、約9000種類のフラボノイドが報告されているが、これまで修飾様式を含めたフラボノイドの詳細構造とその機能の関連性が明らかにされているものはほとんどなく、その多様性の意義は不明であった。陸上植物に普遍的に存在するフラボノイドの詳細な構造とその代謝経路について、基礎的知見を積み上げることは、生態学的、形態学的に多様な植物の二次代謝産物合成能力の獲得メカニズムの理解につながる。

研究成果の概要(英文)：Flavonoids are one of the major plant secondary metabolites and known to be involved in pollen fertility in petunia and maize. We have identified UGT79B31, a UDP-glycosyltransferase responsible for the terminal modification of petunia pollen-specific flavonoids. UGT79B31 encodes a flavonoid 3-O-glycoside: 2'-O-glucosyltransferase. UGT79B31 protein was localized in the cytosol. The flavonoid profiles in various organs petunia were revealed.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：二次代謝 フラボノイド 配糖化酵素 稔性 花粉

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

主要な植物二次代謝産物の一つであるフラボノイドは、約9000種類ともいわれる多様な構造が報告されている。この構造多様性は、限られた基本骨格への多様な修飾（配糖化、アシル化等）に起因する。フラボノイドの生理的役割としては、UV防御や花粉媒介者の誘引、植物ホルモン・オーキシンの輸送制御、稔性への関与等様々な役割が報告されているが、フラボノイドの修飾様式を含めた構造とその機能との関係性が明らかにされたものはわずかであり、多様な修飾様式の意義は不明であった。

多様な構造を持つフラボノイドであるが、花粉では、フラボノールの3位に(1→2)結合したジグリコシドが主要フラボノイドとして蓄積していることが多い(Phytochem., 1972, 11, 1809-1813, Phytochem. anal., 2005, 16, 45-48)。ペチュニアでは、花粉特異的にフラボノイド kaempferol/queracetin 3-O-glucosyl(1→2)-galactoside (K3Gal2^{''}Glc)が蓄積しており、フラボノイド欠損により花粉の発芽や花粉管の伸長が阻害され不稔となることが知られている(Plant Physiol., 1999, 120, 615-622)。この不稔性は、フラボノイドを外的に与えることで相補される。しかしながら、kaempferol/queracetin から kaempferol/queracetin 3-O-galactoside、K3Gal2^{''}Glc に至る修飾経路上のどのフラボノイド構造が稔性に関与するのかわからない(図1)。また、フラボノイドは葯のタペート組織(形成中の小孢子・花粉粒に接しており、花粉成熟期には退化・崩壊して花粉表面への栄養・原料供給に重要な働きを果たす)で合成されるが、配糖化反応の起こる場所は不明である。

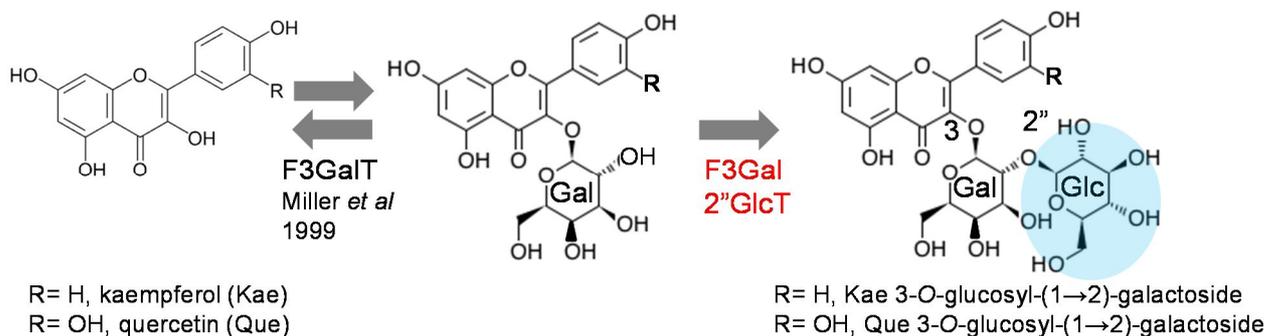


図1、ペチュニア花粉におけるフラボノイド代謝経路

興味深いことに、トウモロコシもペチュニア同様にフラボノイド欠損により、不稔性を示すことが報告されているが、シロイヌナズナでは、フラボノイドが全く蓄積しないtt4変異体も稔性があり、野生型と同様に種子形成が可能である(Plant Cell, 1996, 8, 1013-1025)。

2. 研究の目的

フラボノイドの修飾様式の多様性の意義の解明を最終目標として、(1)ペチュニア花粉特異的フラボノイド高次配糖化酵素遺伝子の機能同定、(2)ペチュニアおよびシロイヌナズナの花各器官における時間的・空間的なフラボノイド構造の同定とその分布様式の解明、(3)フラボノイド配糖化酵素遺伝子機能欠損ペチュニアの作出と生理学的解析により、花粉特異的フラボノイドの空間的・時間的代謝経路とその作用機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) ペチュニア花粉特異的フラボノイド高次配糖化酵素遺伝子の機能同定

ペチュニア花粉特異的フラボノイドはアグリコン形成ののち、2ステップの配糖化を受ける(図1)。最初の配糖化酵素 flavonoid 3-O-galactosyltransferase (F3GalT)は既に単離、報告されており(J Biol. Chem. 1999, 274(48), 34011-9)、未同定の最終ステップを触媒する配糖化酵素

flavonoid 3-*O*-galactoside: 2''-*O*-glucosyltransferase (F3Gal2" GlcT) の同定を行う。既に同定したシロイヌナズナ由来の類似の反応を行う配糖化酵素の知見を基に、発現パターンや分子進化学的解析によりペチュニアの該当配糖化酵素を単離、機能同定する。シロイヌナズナの変異体を利用して、植物体での機能も証明する。

(2) ペチュニアおよびシロイヌナズナにおける時間的・空間的なフラボノイド構造の同定とその分布様式の解明

ペチュニアでは、花粉管の発芽、伸長は、花粉もしくは雌しべ柱頭のどちらかにフラボノイドが存在すれば、稔性は保持される。ペチュニアおよびシロイヌナズナの花各器官における時間的・空間的なフラボノイド構造の同定とその分布様式の解明を行う。

(3) フラボノイド配糖化酵素遺伝子機能欠損ペチュニアの作出

植物体での機能を調べるため、ゲノム編集技術を用いて、ペチュニア花粉フラボノイドの修飾に関わる2種類の配糖化酵素(F3GalT, F3Gal2" GlcT)の遺伝子欠損変異体を作成する。

4. 研究成果

(1) ペチュニア花粉特異的フラボノイド高次配糖化酵素遺伝子の機能同定

ペチュニアの花粉特異的フラボノイド高次配糖化酵素遺伝子の機能同定を行った。既知のフラボノイド高次配糖化酵素遺伝子をクエリとし、ペチュニアのトランスクリプトームデータベースのin silico searchを行い、候補遺伝子4種類を得た。そのうち、UGT79B31は、2)で明らかにしたペチュニアの各器官/組織におけるフラボノール分布と矛盾のない発現パターンを示した。組換えUGT79B31タンパク質を用いた生化学実験、シロイヌナズナ変異体を用いたin vivoでの機能相補実験より、UGT79B31が、flavonoid 3-*O*-glycoside: 2''-*O*-glucosyltransferaseをコードすることを明らかにした。基質特異性の解析により、UGT79B31は、糖供与体としてUDP-glucoseをほぼ排他的に利用し、糖受容体としてflavonol 3-*O*-glucoside/galactosideを好むことを明らかにした。最初の配糖化反応を触媒するF3GalTとUGT79B31の発現様式、UGT79B31の基質特異性の解析により、花粉特異的フラボノイドの構造は、ペチュニアでは、最初の配糖化反応を触媒する配糖化酵素、シロイヌナズナでは、最後の配糖化反応を触媒する配糖化酵素の花 pollen 特異的発現様式によって決定されていることが判明した。

また、UGT79B31が、細胞質に局在することを明らかにした。また、UGT79B31の薬での発現部位の解析を行い、フラボノイドが花粉稔性に影響を及ぼさないシロイヌナズナの配糖化酵素遺伝子と発現部位に違いがあることが示唆された。

(2) ペチュニアおよびシロイヌナズナにおける時間的・空間的なフラボノイド構造の同定とその分布様式の解明

ペチュニアの各器官(薬、花弁、葉)におけるフラボノイド分析を行った。薬と花弁では異なるフラボノイド分子種が存在し、葉においては、微量ではあるが、薬と花弁に存在するフラボノイド分子種の両方が存在することを明らかにした。

(3) フラボノイド配糖化酵素遺伝子機能欠損ペチュニアの作出

植物体での機能を調べるため、ゲノム編集技術を用いて、ペチュニア花粉フラボノイドの修飾に関わる配糖化酵素(F3Gal2" GlcT)のヘテロな遺伝子欠損変異体を作成した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Eva Knoch, Satoko Sugawara, Tetsuya Mori, Ryo Nakabayashi, Kazuki Saito, Keiko Yonekura-Sakakibara | 4. 巻 247 |
| 2. 論文標題 UGT79B31 is responsible for the final modification step of pollen-specific flavonoid biosynthesis in <i>Petunia hybrida</i> | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Planta | 6. 最初と最後の頁 779-790 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1007/s00425-017-2822-5 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Keiko Yonekura-Sakakibara |
| 2. 発表標題 UGT79B31 is responsible for the terminal modification step of pollen-specific flavonoid biosynthesis in <i>Petunia hybrida</i> |
| 3. 学会等名 IPMB (International Plant Molecular Biology) 2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Keiko Yonekura-Sakakibara |
| 2. 発表標題 Flavonoid Biosynthesis in Pollen: Functional Identification of Glycosyltransferases Responsible for Pollen-specific Flavonols |
| 3. 学会等名 XIX International Botanical Congress (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | エヴァ クノッホ (Eva Knoch) | 理化学研究所 | |