

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05466

研究課題名(和文) 二次代謝産物合成において細胞質型と液胞型酵素はどのように使い分けられるのか？

研究課題名(英文) Involvement of cytosolic and vacuolar enzymes in plant secondary metabolism

研究代表者

佐々木 伸大 (Sasaki, Nobuhiro)

東洋大学・食環境科学部・教授

研究者番号：80422088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：キンジソウや紫キャベツが持つアントシアニンは複数の糖と有機酸で高次に修飾されている。これらの修飾反応がどのような酵素によって触媒されるかについて検討を行った。その結果、キンジソウでは、最初の2段階の反応が細胞質局在型の酵素によって、それより後の反応が液胞局在型の酵素によって触媒されることが示唆された。紫キャベツでは、最初の3つの糖修飾が細胞質型の酵素によって、その後の2段階のアシル化が液胞型の酵素によって触媒されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物が生産する二次代謝産物は複雑な構造をした化合物も多い。これらの生合成は一般的に細胞質内で行われ、その後液胞に運ばれて蓄積されると考えられている。しかし、一部の修飾反応は液胞で行われることが報告されているが、その例は少なく、植物種や化合物種によってどちらの反応系が用いられるかについては情報が少ない。本研究では、これまでに報告のなかったキンジソウや紫キャベツにおけるアントシアニンの糖や有機酸による修飾反応の後半が液胞移行型の酵素によって触媒されることを示唆した。これらのことは植物がどのようにして二次代謝経路を進化させてきたかについての考察の一助となると期待される。

研究成果の概要(英文)：The acyl-CoA dependent malonyltransferase activity toward anthocyanin 3-glucoside using crude protein prepared from the leaves of *Gynura bicolor* was detected. The next step glucosylation activity was detected acyl-glucose dependently in the same crude protein mixture. These results suggested that cytosolic enzymes involved in the first two steps of polyacylated anthocyanin biosynthesis while the third or later steps are mediated by vacuolar type enzymes in *G. bicolor*.

We identified three UDP-glucosyltransferase mediate the first three steps of polyacylated anthocyanin from red cabbage. The acylglucose dependent sinapoyltransferase activities were detected using the crude protein prepared from the leaves of red cabbage. These results implied that the first three glucosylation of anthocyanin are mediated by cytosolic enzyme and last two acylations are catalyzed by vacuolar enzyme.

研究分野：植物細胞分子生物学

キーワード：ポリアシルアントシアニン 糖転移酵素 アシルトランスフェラーゼ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物が生産する二次代謝物質の多くは糖や有機酸で修飾されている。特に植物の主要色素の一種であるアントシアニンのなかには、複数種の糖と有機酸とで高次に修飾されているものが存在する。一般に糖や有機酸による修飾反応は細胞質基質で起こると考えられてきたが、近年、これらの反応の一部が液胞移行型の酵素によって触媒されていることが報告されている。このように同じ修飾反応でも、細胞質型と液胞型といった酵素の重複性が二次代謝の多様性を生み出すことに寄与していると考えられる。しかし、これらの修飾反応のうち、どの反応が細胞質型で、どの反応が液胞型の酵素によって触媒されているのか、それらの使い分けの機構は明確にされていない。アントシアニンの高次修飾にどのような酵素が関わっているかが判明すれば、それらの修飾反応がどのような酵素遺伝子が重複・進化をすることによって獲得されてきたかについて考察する一助となる。このことは、植物が持つ複雑な二次代謝(特化代謝)がどのようにして獲得されてきたかについての推定も与えるものと期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では高次に修飾されたポリアシルアントシアニン合成する植物であるキンジソウ (*Gynura bicolor*) や紫キャベツ (*Brassica oleracea*) を用いて、そのアントシアニンの糖と有機酸による修飾反応がどのような酵素、すなわち、細胞質型か液胞型のいずれのタイプの酵素によって触媒されるかについて検討するとともに、RNA-seq 解析を行うことによって、それらの酵素をコードする遺伝子を探索することを主な目的として実験を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 材料

材料として用いたキンジソウ (*Gynura bicolor*) はインターネットを通じて購入した苗を水耕栽培によって維持したものを使用した。紫キャベツと緑色のキャベツ (*Brassica oleracea*)、トレビス (*Cicorium intibus*) は近くのスーパーマーケットで購入したものを用了。

#### (2) 基質の準備

糖供与体やアシル基供与体として用いた sinapoyl-glucose は酵素学的方法を用いて既報の方法によって合成されたものを用了。Caffeoyl-glucose はキンジソウ葉から、Daiiaion HP20(三菱化学) オープンカラムクロマトグラフィーと ODS を用いたフラッシュクロマトグラフィーによって精製したものを用了。糖受容体として用いた cyanidin 3-malonylglucoside はトレビス葉から、cyanidin 3-galucosylglucoside-5-glucoside (CytriG) は紫キャベツ葉から Daiiaion HP20(三菱化学) オープンカラムクロマトグラフィーと ODS を用いたフラッシュクロマトグラフィーによって精製したものを用了。精製した化合物は LC-MS 分析によって既報のデータに一致することを確認した。

#### (3) 植物からの粗酵素液の調整

0.5 g のサンプルを氷上で乳鉢・乳棒で磨砕し、5 mL extraction buffer (0.1 M リン酸カリウム buffer pH 7.5, 1 mM DTT) に懸濁した。15,000 rpm, 2 分の遠心で上清を回収し、7.5 mL 飽和硫酸アンモニウム (硫酸) を加え氷上に 5 分静置した。その後 15,000 rpm, 5 分の遠心で得られた沈殿物を 50  $\mu$ L の extraction buffer に溶解後、G-25 spin column でゲルろ過したものを粗酵素液とした。

#### (4) 糖転移酵素活性測定

UDP-glucose 依存型の糖転移酵素反応については、標準的には 8  $\mu$ L 粗酵素液、2  $\mu$ L の 2 mM 糖受容体基質、2  $\mu$ L の 10 mM UDP-glucose、2  $\mu$ L の 10 mM DTT、10  $\mu$ L の 0.1M リン酸 buffer (pH 7.0) を入れ、30、20 分間で行った。アシルグルコース依存型の糖転移酵素反応については、典型的には 8  $\mu$ L 粗酵素液、2  $\mu$ L の 2 mM 糖受容体基質、2  $\mu$ L の 10 mM アシルグルコース、2  $\mu$ L の 10 mM DTT、10  $\mu$ L の 0.1 M クエン酸 buffer (pH 5.0) を入れ、30、2 時間で行った。

#### (5) アシル基転移酵素活性測定

アシル-CoA 依存型のアシル基転移酵素反応については、典型的には 8  $\mu$ L 粗酵素液、2  $\mu$ L の 2 mM 糖受容体基質、2  $\mu$ L の 10 mM アシル-CoA、2  $\mu$ L の 10 mM DTT、10  $\mu$ L の 0.1M リン酸 buffer (pH 7.0) を入れ、30、20 分間で行った。アシルグルコース依存型のアシル基転移酵素反応については、典型的には 8  $\mu$ L 粗酵素液、2  $\mu$ L の 2 mM 糖受容体基質、2  $\mu$ L の 10 mM アシルグルコース、2  $\mu$ L の 10 mM DTT、10  $\mu$ L の 0.1 M クエン酸 buffer (pH 5.0) を入れ、30、2 時間で行った。

#### (6) RNA-seq 解析

各組織からの RNA 抽出は RNeasy Plant Mini Kit(キアゲン社)を用いて行った。ショートリードシーケンスは Novogene 社の mRNA-seq 受託サービスを用いて行い、150 bp のペアエンドを獲得した。de novo アッセンブリーは Trinity 2.5.0 を用いて行い、各 contig の発現量は Salmon v0.12.0 を用いて算出した TPM (transcripts per million) で評価した。

(7) 組換え酵素を用いたアントシアニン糖転移酵素の生産

獲得した cDNA を pTrcHis TOPO TA Expression kit (Invitrogen 社) を使用して大腸菌発現系ベクターを構築した。これらを用いて大腸菌 BL21 株を形質転換し、常法に従って組換えタンパク質を生産した。

(8) UPLC-MS 測定条件

減圧濃縮した 3GGT 産物を 100%メタノールで薄め、UPLC/MS 解析を行った。UPLC/MS は ACQUITY UPLC SYNPT G2 (Waters, USA)、カラムは ACQUITY UPLC BEH C18 2.1×100 mm (Waters, USA) を使用した。分離条件は、A 液: 0.1%ギ酸、B 液: 0.1%ギ酸を含むアセトニトリルを用い、10 分間で B% が 7~35%になるリニアグラジエント、流速は 0.4 mL/min で行った。

(9) HPLC-PDA 測定条件

カラムは 4.6×50 mm の Cosmosil-C18-MSII (ナカライテスク社) を使用した。検出器にはフォトダイオードアレイを使用し、200~600nm で検出を行った。分離条件は A 液: 1%リン酸水溶液、B 液: アセトニトリルを用い、5 分間で B% が 7~40%になるリニアグラジエント、流速は 1.2 mL/min で行った。

4. 研究成果

(1) キンジソウ葉におけるアントシアニン修飾反応の順序の推定

キンジソウの葉から調整した粗酵素液を用いて、cyanidin 3-glucoside (Cy3G) を基質として、マロニル CoA をアシル基供与体として酵素反応を行ったところ、Cy3G にマロニル基が結合した産物が確認された。この結果から、キンジソウにおいて Cy3G のアシル化は細胞質型の酵素によって触媒されることが示唆された。Cy 3-malonylglucoside (Cy3MG) の次の反応を探るために、Cy3MG を基質として、UDP-glucose やアシルグルコースを基質として酵素反応を行った。その結果、UDP-glucose を用いた場合には、酵素反応生成物を確認できなかったが、アシルグルコースとして、カフェオイルグルコースを用いた場合に、LC-MS 分析によって  $m/z = 697$  を示す産物が微量観測された。この化合物は Cy3MG (分子量 535) にグルコース(分子量 180)が脱水縮合した化合物であると予想された(図 1)。このことから、キンジソウにおいては Cy3MG 以降の反応である、3' 位あるいは 7 位の配糖化はアシルグルコース依存型、すなわち液胞移行型の酵素によって触媒される可能性が示唆された(図 2)。キンジソウにおいてアントシアニン生合成に関わる遺伝子を探索するために、アントシアニンを蓄積しているキンジソウ葉と蓄積していない根を用いて RNA-seq 解析を行った。その結果、細胞質型のアントシアニンマロン酸転移酵素候補遺伝子が 3 種類、液胞型の糖転移酵素相同遺伝子を 6 種類、液胞型のアシル基転移酵素相同遺伝子を 4 種類獲得した。また、液胞型の糖転移酵素では 4 種類が推定の液胞移行シグナルペプチドを有しており、アシル基転移酵素では 3 種類が推定の液胞移行シグナルペプチドを有していた。

(2) 紫キャベツ葉におけるアントシアニン修飾反応の順序の推定

紫キャベツ葉から調整した粗酵素液を用いて、ポリアシル化アントシアニンの前駆体となる cyanidin (Cy)、Cy3G、Cy 3,5-diglucoside (Cy3,5diG) を基質として、UDP-glucose を糖供与体とする酵素反応を行ったところ、Cy Cy3G Cy 3-glucosylglucoside (Cy3GG) Cy3GG 5-glucoside (CytriG) の順番で生合成が進むことが示唆された。この際、

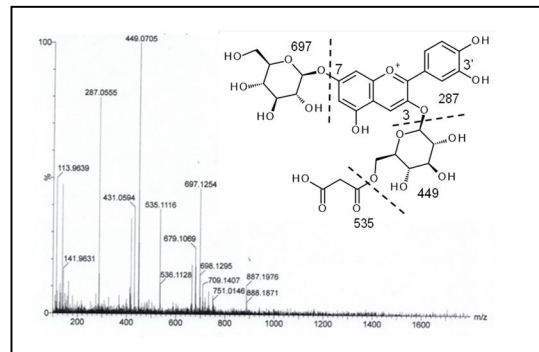


図 1 キンジソウにおける Cy3MG 配糖化酵素活性

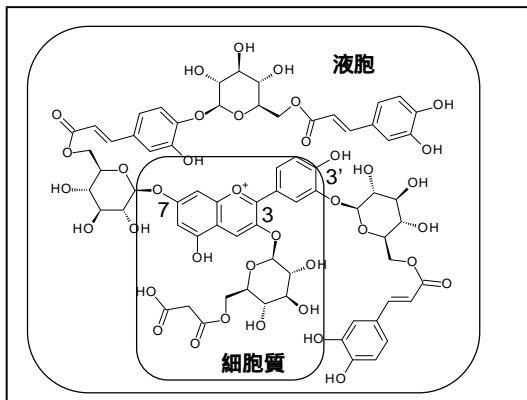


図 2 キンジソウにおいて推定されるアントシアニンの修飾反応の場

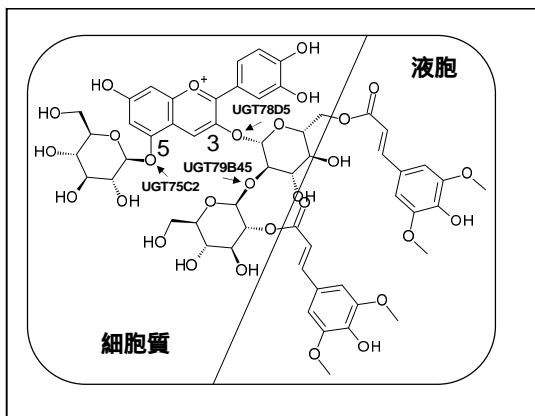


図 3 紫キャベツにおいて推定されるアントシアニンの修飾反応の場

Cy3,5diG の生成は確認されなかったことから、この生合成経路はグリッド状に進むのではなく、一つの経路で進むことが示唆された。また、いずれの反応も糖ヌクレオチド依存的に触媒されたことから、細胞質内で反応が進むことも示唆された。その後のアシル化反応について、アシルグルコースの 1 種であるシナポイルグルコースをアシル基供与体として CytriG を受容体として反応を行ったところ、HPLC クロマトグラム上にアシル基が 1 分子と 2 分子結合したと思われるピークが観測された。この結果から、紫キャベツにおいてアントシアニンのアシル化は液胞型の酵素によって触媒されることが示唆された。RNA-seq 解析を行ったところ、UDP-glucose 依存型のアントシアニン配糖化酵素の候補遺伝子が 4 種単離された。発現解析と組換え酵素の基質特異性の解析結果から、それらのうちの 3 種類がアントシアニンの 3 位 (UGT78D5)、3 位のグルコース (UGT79B45)、5 位 (UGT75C2) の配糖化を触媒することが示された (図 3)。アシルグルコース依存型のアシル基転移酵素の相同遺伝子として、19 種類が見いだされ、そのうち、3 種類については、液胞移行型のシグナルペプチド配列を有していることが推定されたため、これらが紫キャベツのアントシアニンアシル化酵素をコードしているものと推定された。これらのことから、紫キャベツでは、アントシアニンの 3 位と 5 位の配糖化は細胞質型の酵素によって触媒され、その後のアシル化は液胞型の酵素によって触媒される可能性が示唆された (図 3)。

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 0件）

1. 著者名 Horiuchi Riko, Nishizaki Yuzo, Okawa Natsumi, Ogino Ayaka, Sasaki Nobuhiro	4. 巻 68
2. 論文標題 Identification of the Biosynthetic Pathway for Anthocyanin Triglycoside, the Precursor of Polyacylated Anthocyanin, in Red Cabbage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 9750 ~ 9758
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jafc.0c03480	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nobuhiro Sasaki, Ayaka Ogino, Natsumi Okawa
2. 発表標題 Order of glucosylation reactions in the biosynthesis of anthocyanins in red cabbage.
3. 学会等名 10th International Workshop on Anthocyanins and Betalains. (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------