

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580132

研究課題名(和文)シロイヌナズナのフェノール性異物配糖体の輸送機構の解析

研究課題名(英文)Studies on the metabolism of phenolic-xenobiotics and transport of their glucosides in Arabidopsis

研究代表者

田口 悟朗 (TAGUCHI, Goro)

信州大学・繊維学部・准教授

研究者番号：70252070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物は有害な化学物質にさらされると、糖を付けるなどの修飾反応を行ってから輸送/蓄積し、その毒性を回避します。本研究では、モデル植物であるシロイヌナズナがフェノール性の異物であるナフトールにさらされたときに働く糖転移(配糖化)酵素およびアシル化酵素を同定して、その役割を解析しました。また、植物ではほとんど知られていない、糖が結合した異物を細胞の外に排出する仕組みを解析し、関与する輸送体の候補を見つけるとともに、この異物代謝における配糖化酵素の役割分担を明らかにしました。

研究成果の概要(英文)：When plants are exposed to harmful chemicals, plants modified them by glucosylation and/or acylation, and then accumulate the compounds into vacuoles for detoxification. In this work, we identified and functionally analyzed a glucosyltransferase and two acyltransferases those would work on the detoxification of naphthols, phenolic-xenobiotics, in Arabidopsis. We analyzed the export system of naphthol glucoside that are rarely reported in plants, and found a candidate transporter for this export. We also found division of roles of glucosyltransferases on this metabolism.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：植物の異物代謝 配糖化酵素 マロニル化酵素 配糖体の放出 物質輸送 シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物は低分子の異物が環境からもたらされると、様々な修飾をした上で細胞に蓄積してその毒性を回避すると考えられている。ただ、その詳細な機構は、明らかになっていないことが多い。

(2) シロイヌナズナにフェノール性異物であるナフトールを投与すると、マロニル化された配糖体として細胞内に蓄積されるが、一部はマロニル化を受けず、培地中へ放出されることが明らかになった。

(3) 上記のマロニル化酵素遺伝子の破壊株では、フェノール性異物配糖体の培地中への放出が増大したことから、シロイヌナズナにおいて、マロニル化がフェノール性異物配糖体の細胞内蓄積に重要であること、かつ、フェノール性異物配糖体を細胞外に輸送する系が存在すること、が強く示唆されていた。

2. 研究の目的

(1) 植物のフェノール性異物に対する修飾反応がその輸送 / 蓄積に与える影響を明らかにするとともに、フェノール性異物配糖体の輸送機構、特に放出現象を解明することを目的とする。

(2) 異物代謝に関わることが推測される配糖化酵素およびマロニル化酵素遺伝子の破壊株 / 発現抑制株および過剰発現株における種々の異物の物質代謝、および生体内物質の修飾・蓄積状態を解析し、「異物代謝と生合成に関わる酵素の役割分担」を検証する。

(3) シロイヌナズナにおける異物フェノール類の輸送活性測定系の構築を行って、輸送の評価を行うとともに、シロイヌナズナの輸送体遺伝子の変異株を利用して、これら輸送に関与する輸送体を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 投与した際に、配糖体が根から放出されるフェノール性化合物を探索し、その代謝の違いを解析した。また、この排出系を利用した物質生産の可能性を検討した。

(2) 異物代謝に関わる可能性が高いマロニル化酵素遺伝子 (*AtPmaT1*、*AtPmaT2*) と配糖

化酵素遺伝子 (*UGT72B1*) を過剰発現 / 発現抑制したシロイヌナズナを作出し、種々のフェノール性異物を投与して、野生株との代謝の違いを観察した。

(3) 各種輸送阻害剤を投与した際の、フェノール性異物の代謝、特に配糖体の細胞内蓄積量と放出量の変化を解析し、輸送機構の推定を行った。また、根から膜ベシクルの作出を行い、物質輸送活性の検出系の構築を試みた。

(4) 根で発現する ABC トランスポーターおよび MATE トランスポーター遺伝子の破壊株を入手してフェノール性異物代謝の変化を解析し、配糖体の放出に関与する輸送体の探索を行った。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナ幼植物に投与すると、その配糖体が培地中に放出されるフェノール性化合物を探索した。これまでに配糖体放出現象を確認していた、1-ナフトールおよび 2-ナフトール以外に、*o*-クマル酸の配糖体が放出されることを確認した。また、2、4-ジクロロフェノールおよびビスフェノール A の投与でも微量の配糖体が放出された。一方、ケンフェロールやスコポレチン、*p*-クマル酸など、シロイヌナズナの内在性物質では、配糖体の放出は起こらなかった。このように、異物配糖体の放出は、その構造が類似した化合物でも大きく異なることが明らかとなった。

(2) 異物代謝に関わるマロニル化酵素 (*AtPmaT1*、*AtPmaT2*) の反応性を解析した。

AtPmaT2 酵素を大腸菌で発現させ、その基質特異性を比較したところ、*AtPmaT2* は *AtPmaT1* と比較して、ナフトール以外では、単環性のフェノール配糖体に対してより高い活性を示した。

AtPmaT1 のノックアウト株 (*pmat1*) では、ナフトール投与時に蓄積されるマロニル化された配糖体が消失することから、異物代謝に関与することが明らかになっている。そこで、*AtPmaT2* のノックアウト株およびノックダウン株の作出を試みたが、致死となりその作出を行うことは出来なかった。そのため、*pmat1* 株に *AtPmaT2* 遺伝子を高発現させたところ、ナフトール投与時にマロニル化された

配糖体が蓄積され、*AtPmaT2* が *AtPmaT1* の異物代謝機能を相補した。以上から、*AtPmaT2* は生存に必須な何らかの機能を持っているとともに、異物代謝にも関与しうることが示唆された。

異物代謝にマロニル化酵素が関与することはいくつか知られていたが、その酵素遺伝子を同定・機能解析したのは *AtPmaT1* が初めてであった。それ以外に、異物代謝に関与する可能性があるマロニル化酵素 *AtPmaT2* を機能解析したことは、植物の異物代謝を理解する上で重要な成果であるといえる。また、マロニル化酵素が生存に必須である例は報告されておらず、その本来の機能を解析することで、「マロニル化修飾」の生体における意義の解明につながることを期待される。

(3) クロロフェノール類などの異物の代謝に関与することが報告されている配糖化酵素 (*UGT72B1*) が、ナフトールの配糖化およびその配糖体の放出現象に関与するか、解析を行った。

まず、シロイヌナズナの *UGT72B1* 破壊株 (*ugt72b1*) にナフトールを投与したところ、野生株で認められる細胞外への配糖体の放出が全く起こらなかったことから、*UGT72B1* がナフトールの配糖化を担っていることが示された。その一方で、細胞内のマロニルグルコシドの蓄積は変化しなかったことから、マロニル化を受けた配糖体は、*UGT72B1* によって配糖化されたのでは無いことが明らかとなった。さらに、シロイヌナズナ野生株にナフトールを投与すると、*UGT72B1* 遺伝子の発現が誘導された。以上から、細胞内に吸収されたナフトールは、*UGT72B1* によって配糖化されると、そのまま細胞外に放出されることが示唆された。

次に、*ugt72b1* に *o*-クマル酸を投与したところ、ナフトールとは異なり、野生株と同様に細胞外へ配糖体が放出された。さらに、大腸菌発現させた *UGT72B1* はナフトールに対する活性を示したが、*o*-クマル酸には活性を示さなかった。以上から、同様の代謝を受ける異物であっても、その代謝に寄与する配糖化酵素は異なることが示された。

植物の異物代謝において、配糖化は重要な反応であることが知られているが、1つの植物種に配糖化酵素遺伝子は100以上存在す

ることから、どの酵素が異物代謝に関与しているか、不明な点が多い。本研究において、同じ生体外異物の代謝でも関与する配糖化酵素が複数存在し、どの酵素によって修飾反応を受けるかによって、代謝物の運命が異なっていることや、異物の種類によっても寄与する配糖化酵素が異なることが明らかとなった。これらの結果は、「異物代謝と生合成に関わる酵素の役割分担」を考える上で、重要な知見であるといえる。すなわち、シロイヌナズナでは、初めは生体内に既存の生合成酵素によりフェノール性異物の代謝を行い、その後、異物代謝に特化した酵素を動員して、より効率的な対応を行っていることが推測された。

(4) フェノール性異物としてナフトールを投与した際に、その配糖体が放出される現象における配糖体輸送活性の解析を進めた。

初めに、シロイヌナズナの根の膜ベシクルを作成し、輸送活性の検出を試みたが、ATP依存的な物質輸送を検出することは出来なかった。

シロイヌナズナに各種輸送阻害剤を処理し、投与したナフトールの代謝に与える影響を確認したところ、脱共役によりイオン勾配を失わせる働きをもつ DCC が、ナフトール配糖体の細胞外への放出を減少させた。さらに、pH を 5.7 から 8.0 に変更したところ、配糖体の放出が大きく減少したことから、プロトン勾配がこの輸送に関与している可能性が示唆された。

そこで、根で特異的に発現しているエネルギー依存的な輸送体の破壊株を入手し、そのナフトール配糖体放出活性を検討したところ、MATE ファミリーに属する輸送体 *RHS2* の破壊株で、野生株と比較して配糖体の放出が有意に減少した。そのため、この輸送体が、異物配糖体の放出に関与している可能性が示唆された。

今後、その相補試験による確認や、ナフトール配糖体を放出しないタバコ細胞でこの輸送体を強発現させ、その輸送活性を検討することで、これまでに報告例のない、配糖体の放出機構の解明が期待される。さらに、この排出系を用いることで、植物体内で産生された配糖体の細胞外への放出、による物質生産への応用の可能性が期待される。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

田口悟朗、植物の異物修飾機構を応用した配糖体生産への取り組み 生物工学会誌、査読無、Vol.89、2012、643-645

[学会発表](計 4 件)

渡邊 貴史、丸山佳紀、田口悟朗、シロイヌナズナにおけるフェノール性異物の配糖化およびその排出現象の解析、日本農芸化学会 2013 年度大会(川崎)、2014 年 03 月 29 日、川崎市(明治大学生田キャンパス)

丸山佳紀、渡邊貴史、田口悟朗、シロイヌナズナにおけるフェノール性低分子異物代謝に関するマロニル化酵素の研究、第 31 回日本植物細胞分子生物学会(札幌)大会・シンポジウム、2013 年 09 月 10 日、札幌市(北海道大学)

長友仁寿、古謝詠喜、伊藤崇充、田口悟朗、植物二次代謝の生合成に關与するグリコシルトランスフェラーゼ、日本農芸化学会 2013 年度大会(仙台)(招待講演)、2013 年 03 月 27 日、仙台(東北大学)

田中淳、渡邊貴史、長友仁寿、田口悟朗、シロイヌナズナのマロニル化酵素 AtPMT2 の解析、第 29 回日本植物細胞分子生物学会(福岡)大会・シンポジウム、2011 年 9 月 8 日、福岡(九州大学)

[その他]

ホームページ等

<http://www.fiber.shinshu-u.ac.jp/taguchi/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田口 悟朗 (TAGUCHI, Goro)

信州大学・繊維学部・准教授

研究者番号：7 0 2 5 2 0 7 0

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

矢崎 一史 (YAZAKI, Kazufumi)

京都大学・生存圏研究所・教授

研究者番号：0 0 1 9 1 0 9 9