

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440148

研究課題名(和文) 結晶構造に基づいた植物有用物質高次配糖化酵素の構造機能相関の解明とその応用

研究課題名(英文) glycosyltransferases for plant specialized compounds based on the 3D structures

研究代表者

榭原 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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：配糖化は、植物代謝産物の多様性の原因となる重要な反応であるが、高次配糖化(配糖体の糖部分にさらに糖を付加する反応)に関わる知見は限られている。フラボノイド高次配糖化酵素UGT79B1の4種類の結晶を得、構造解析を行った。解析にあたっては、高次配糖化酵素の知見が少なかったことから、シロイヌナズナなどから新規のフラボノイド高次配糖化酵素遺伝子を単離、機能同定し、得られた知見に基づいて、基質認識・基質阻害に重要なアミノ酸残基の同定とその生化学的解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Glycosylation plays an important role in the huge chemical diversity of plant metabolites. However, the knowledge about high-order glycosylation is limited. Four crystal structures of a flavonoid high-order glycosyltransferase UGT79B1 were dissolved. Genes encoding novel flavonoid high-order glycosyltransferases from Arabidopsis and soybean were also identified. Based on these data, amino acid residues which play crucial roles in the binding of substrates and substrate inhibition were found and biochemical analyses using mutated UGT79B1 proteins were conducted.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：配糖化酵素 フラボノイド シロイヌナズナ 結晶構造

1. 研究開始当初の背景

配糖化は、20万種ともいわれる植物特異的代謝産物(二次代謝産物)の多様性の原因であると共に、代謝産物の安定化や水溶性の増大に寄与し、細胞内輸送特性、生物活性、果実類の食味にも影響を与える重要な反応である。フラボノイド(フラボノール、フラボン、アントシアニン等)は、最もよく研究されている二次代謝産物の一つであり、比較的少数の基本骨格が、配糖化、アシル化、メチル化等の多様な修飾をうけ、天然には700種類以上の構造が存在する。フラボノイド配糖体の中でも、高次配糖化(基本骨格に結合した糖部分へのさらなる配糖化)されたフラボノイドは、その高次配糖化様式によって、果実の食味(苦味あるいは無味)や虫害抵抗性の有無に影響をあたえることが知られている(Plant J.,2004, 40,88-100; Phytochem., 2001, 56, 717-721)。また、オーキシン輸送体の変異により根の重力屈性に異常を示すシロイヌナズナ pin2 変異体では、根の高次配糖化フラボノールが減少する(J. Biol. Chem., 2008, 283, 31218-31226)。

研究開始当初、遺伝子が単離された植物二次代謝産物の高次配糖化酵素は、数えるほどしかなく、高次配糖化酵素の結晶構造の報告も無かった。植物の配糖化酵素反応は、糖供与体(UDP糖)と糖受容体(フラボノイド、テルペノイド等)の二基質反応であり、配糖化酵素は、ファミリー1配糖化酵素(UGT)に分類される。これまでに決定された植物のUGT5種類の結晶構造に基づいて、フラボノイドやトリテルペノイドの高次配糖化酵素のモデリングが行われ、糖供与体(UDP糖)認識に関わるアミノ酸残基が決定されている。しかしながら、糖受容体との共結晶が得られたのは、フラボノイドのアグリコンを認識する2種類のみであり(FEBS Lett., 2009, 583, 3303-3309)、他の糖受容体(フラボノイド配糖体、テルペノイドやアルカロイド等)の認識に関する知見はない。UGTはGT-B foldと呼ばれる保存された三次構造をとり、特に糖供与体(UDP糖)との結合に関する領域は、高く保存されているが、全体の配列同一性が20-30%で、特に糖受容体との結合に関係するN末端部分の保存性が低く、モデリングによる予測が困難である。さらに、UGTは、多重遺伝子族(シロイヌナズナでは100以上、イネでは200種類以上)として存在するため、系統樹解析により、高次配糖化酵素は特有のクラスターを形成するものの、その一次構造からのみで機能を推定することも難しい。また、酵素反応速度論的には、植物の配糖化酵素反応は、逐次反応である事が示唆されている(Plant Sci., 2000, 157, 105-112)が、その詳細な反応機構(定序機構 or ランダム機構)も不明のままであった。

2. 研究の目的

本研究は、結晶構造に基づいたフラボノイド高次配糖化酵素の基質認識機構及び基質阻害機構の解明とその応用を最終目的とし、

アントシアニン高次配糖化酵素 UGT79B1の結晶構造解析

新規フラボノール高次配糖化酵素の機能同定

結晶構造に基づいた高次配糖化酵素の基質認識機構および基質阻害機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

我々は、アントシアニン高次配糖化酵素(anthocyanidin 3-O-glucoside:2''-O-xylosyltransferase)であるUGT79B1の酵素のみおよび複数の糖受容体・糖供与体との共結晶を用いて、結晶構造の解析を行い、糖受容体・糖供与体認識に関わるアミノ酸残基の解析を行った。

また、研究開始当初、フラボノイド高次配糖化酵素遺伝子の単離の報告が少なく、また、一般的に、配糖化酵素は、植物種特異的にその基質認識機構を獲得してきていると考えられていることから、並行して、結晶構造が得られたUGT79B1と同じシロイヌナズナからのフラボノイド高次配糖化酵素遺伝子UGT79B6の機能同定を行った。UGT79B6は、UGT79B1と高い配列同一性を持っており、さらにUGT79B6とUGT79B1は、in vitroでは、糖供与体は異なるが、同一の糖受容体を利用することが予想されたため、基質認識機構の解明に有用であると期待した。シロイヌナズナ以外にも、複数の高次配糖化フラボノイドを蓄積しているダイズ(大豆)のフラボノイド高次配糖化酵素の機能同定を行い参考とした。

UGT79B1の結晶構造および新規に機能同定したフラボノイド高次配糖化酵素の知見に基づき、組換えUGT79B1タンパク質に種々のアミノ酸置換の導入、キメラタンパク質の生成をし、生化学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) アントシアニン高次配糖化酵素UGT79B1の結晶構造の解析

シロイヌナズナのアントシアニン3-O-glucoside:2''-O-xylosyltransferase, UGT79B1の4種類の結晶構造(酵素のみ、UDPとの共結晶、UDP/kaempferol 3-O-glucosideとの共結晶、UDP/cyanidin 3-O-glucosideとの共結晶)が得られた。

4種類の結晶は、他のUGTと同様に2つのロスマン様ドメインからなるGT-B foldを取っていた。UDP/kaempferol 3-O-glucosideあるいはUDP/cyanidin 3-O-glucosideとの共結晶については、2.0 Åの分解能でデータが得られた。UGT79B1のUDP/kaempferol 3-O-glucosideとの共結晶、UDP/cyanidin 3-O-glucosideとの共結晶の構造は、既知のアグリコンを配糖化するUGT(フラボノイド

3-*O*-glucosyltransferase, VvGT1) の結晶構造と比較して、より広い基質結合ポケットを保持しており、配糖体が、アグリコンに比べより広い空間を占めることとよく一致した。また、両結晶に置いて、糖受容体である kaempferol 3-*O*-glucoside と cyanidin 3-*O*-glucoside の UGT79B1 との結合位置は大きく異なった。kaempferol 3-*O*-glucoside の位置は、UDP 糖との糖部分の受け渡しが可能な距離にあったが、cyanidin 3-*O*-glucoside は、糖部分の受け渡しが不可能な位置に存在した。このため、基質認識に関わるアミノ酸残基の推定には、UDP/kaempferol 3-*O*-glucoside との共結晶を用いた。また、UDP/cyanidin 3-*O*-glucoside との共結晶については、基質阻害との関連が考えられた。

(2) 新規のフラボノール高次配糖化酵素の機能同定

これまでに遺伝子が単離された植物二次代謝産物の高次配糖化酵素は数えるほどしかない。より包括的な知見を得るために、UGT79B1 と同じシロイヌナズナからフラボノール高次配糖化酵素の単離と機能同定を試みた。我々のグループでは、シロイヌナズナを材料として、網羅的にフラボノイド配糖化酵素遺伝子の機能同定を行っており、既に機能の異なる7種類のフラボノイド配糖化酵素遺伝子を機能同定している。1種類の植物種から7種類のフラボノイド配糖化酵素が単離された例はなく、フラボノイド配糖化酵素の基質認識機構解明の分子進化的アプローチにシロイヌナズナは最適な材料である。

シロイヌナズナの花粉には、フラボノール高次配糖体であるフラボノール 3-*O*-hexosylglucoside が蓄積することが知られていたが、その正確な構造は不明であった。

我々の研究室では、シロイヌナズナの花粉およびタペート組織の正常な発達に必要な転写因子 *Male sterility 1 (MS1)* 遺伝子変異体と野生型の花粉の分析により、フラボノール (kaempferol/quercetin) 3-*O*-glucosyl(1 2)glucoside が、*ms1* 変異体には蓄積せず、野生型の花粉特異的に蓄積していることを見出していた。*ms1* 変異体および野生型のマイクロアレイデータ解析より *ms1* 変異体で発現が抑制されている UGT 遺伝子群を見出した。その中で花粉特異的な発現様式を示す UGT79B6 に着目した。

既知の高次配糖化酵素遺伝子は、UGT79, UGT91, UGT94 サブファミリー等からなるオルソログスグループ OG8 に属するが、UGT79B6 もこのグループに属した。点突然変異により、ugt79b6 遺伝子機能が破壊された変異体を単離し、フラボノイド分析をしたところ、フラボノール 3-*O*-glucosyl(1 2)glucoside が欠損していた。UGT79B6 ゲノムクローニングの導入により、この欠損は相補されたことから、UGT79B6 が花粉特異的なフラボノール 3-*O*-

-glucosyl(1 2)glucoside の必須であることを明らかとした。

大腸菌を用いて UGT79B6 組換えタンパク質を発現させ、酵素活性測定を行ったところ、UGT79B6 は、フラボノール 3-*O*-glucoside からフラボノール 3-*O*-glucosyl(1 2)glucoside への反応を触媒した。糖受容体としては、C3 位にグルコースもしくはガラクトースの付加したフラボノイドを広く基質として認識したが、フラボノールアグリコンやフラボノイド 3,5-diglucoside, 3,7-diglucoside は基質としなかった。糖供与体としては、UDP-グルコース、UDP-ガラクトース以外の UDP 糖では配糖化活性を示さず、また、UDP-グルコースをより好んだ。これらの結果より、UGT79B6 が、フラボノイド 3-*O*-glucoside:2” - 0

-glucosyltransferase をコードすることを明らかにした。

UGT79B6 の局在性についても調べるべく、UGT79B6 のプロモーター領域 2kb に GUS 遺伝子を結合したコンストラクトを導入した形質転換シロイヌナズナを作成した。GUS 染色の結果より、UGT79B6 は、発達中の葯のタペート組織およびマイクロスポアに局在していることが明らかとなった。以上の結果を論文として発表した。

また、シロイヌナズナ以外の植物として、ダイズにも配糖化様式の異なる複数のフラボノール高次配糖体が存在することが知られている。組換え蛋白質を用いて、フラボノール 3-*O*-glucoside/galactoside (1 2)glucosyltransferase、フラボノール 3-*O*-glucoside (1 6)rhamnosyltransferase、他1種類の UGT の機能同定を行い、論文として発表した。

(3) 結晶構造に基づいた高次配糖化酵素の基質認識機構および基質阻害機構の解明

UGT79B1 結晶構造、UGT79B6 および他のシロイヌナズナ由来フラボノイド配糖化酵素、ダイズの高次配糖化酵素の情報を基に、組換え UGT79B1 タンパク質に種々のアミノ酸置換を導入し、生化学的解析を行った。

その結果、フラボノイドの脱プロトン化に関わるアミノ酸残基は、アグリコンを基質とする配糖化酵素と同一であり、配糖化酵素間で保存されていることが明らかとなった。また、酵素活性に必要なアミノ酸残基が新たに明らかとなったが、分子間距離から糖供与体、糖受容体のどちらと結合しているかは判別できなかった。

糖供与体の認識に関係する部位の同定のため、糖供与体の異なるシロイヌナズナの配糖化酵素との融合タンパク質の作成を試みたが、可溶性蛋白質として得ることができず、生化学的解析には至らなかった。

UGT79B1 の UDP/cyanidin 3-*O*-glucoside との共結晶の構造から、基質阻害との関連が考えられたため、組換え UGT79B1 タンパク質を

用いて、広範囲の濃度のフラボノイド 3-*O*-glucoside およびアントシアニン 3-*O*-glucoside を用いて酵素活性測定を行ったところ、両基質に置いて基質阻害が見られ、また阻害様式に差が見られた。基質阻害に関わると考えられるアミノ酸残基を置換した変異 UGT79B1 タンパク質を作出し、解析したところ、予備的結果ではあるが、基質により、酵素活性に差が見られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

S. Di, F. Yan, F. R. Rodas, T. O Rodriguez, Y. Murai, T. Iwashina, S. Sugawara, T. Mori, R. Nakabayashi, K. Yonekura-Sakakibara, K. Saito, R. Takahashi, Linkage mapping, molecular cloning and functional analysis of soybean gene Fg3 encoding flavonol 3-*O*-glucoside/galactoside (1 2) glucosyltransferase, BMC Plant Biology, 査読有, vol.15, 2015, 126, DOI: 10.1186/s12870-015-0504-7

K. Yonekura-Sakakibara, R. Nakabayashi, S. Sugawara, T. Tohge, T. Ito, Misuzu Koyanagi, M. Kitajima, H. Takayama, K. Saito, A flavonoid 3-*O*-glucoside:2 -*O*-glucosyltransferase responsible for terminal modification of pollen-specific flavonols in *Arabidopsis thaliana*, The Plant Journal, 査読有, 79(5), 2014, 769-782, doi: 10.1111/tbj.12580

F. R. Rodas, T. O Rodriguez, Y. Murai, T. Iwashina, S. Sugawara, M. Suzuki, R. Nakabayashi, K. Yonekura-Sakakibara, K. Saito, J. Kitajima, K. Toda, R. Takahashi, Linkage mapping, molecular cloning and functional analysis of soybean gene Fg2 encoding flavonol 3-*O*-glucoside (1 6) rhamnosyltransferase, Plant Molecular Biology, 査読有, 84(3), 2014, 287-300, doi: 10.1007/s11103-013-0133-1

K. Saito, K. Yonekura-Sakakibara, R. Nakabayashi, Y. Higashi, M. Yamazaki, T. Tohge, A. R. Fernie, Plant Physiology and Biochemistry, 査読有, 72, 2013, 21-34, doi:10.1016/j.plaphy.2013.02.001

〔学会発表〕(計 13 件)

E. Knoch, S. Sugawara, K. Saito, K. Yonekura-Sakakibara, Flavonol 3-*O*-2"-*O*-glucosyltransferase from petunia pollen, 第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 19 日、岩手大学(岩手県岩手市)

K. Yonekura-Sakakibara, Structure, function and diversity of plant glycosyltransferases, 第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18 日、岩手大学(岩手県岩手市), 招待講演

K. Yonekura-Sakakibara, K. Saito, Genetic and structural variety of glycosyltransferases bring chemical diversity of flavonoids, The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem), 2015 年 12 月 15 日、Honolulu, USA, 招待講演

K. Yonekura-Sakakibara, K. Saito, Integrated 'Omics' analyses in a model plant, *Arabidopsis thaliana*, 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会合同大会, 2015 年 12 月 3 日、ポートアイランド(兵庫県神戸市), 招待講演

榎原圭子、トランスクリプトミクス・メタボロミクスを基盤としたフラボノイド代謝研究、地球環境・食糧・資源のための植物バイオ第 160 委員会 第 11 回研究会「植物天然物合成研究の新しい展開」, 2015 年 10 月 23 日、サントリーワールドリサーチセンター(京都府相楽郡精華町), 招待講演

榎原圭子、菅原聡子、斉藤和季、シロイヌナズナ花粉特異的フラボノールの高次配糖化酵素 UGT79B6 の局在とその生理的役割、第 56 回日本植物生理学会年会、2015 年 3 月 18 日、東京農業大学(東京都世田谷区)

榎原圭子、シロイヌナズナにおけるフラボノイド多様性の包括的解析、第 270 回生存圏シンポジウム・第 3 回植物二次代謝フロンティア研究会、2014 年 11 月 23 日、小田原お堀端コンベンションホール(神奈川県小田原市), 招待講演

K. Yonekura-Sakakibara, A flavonoid glycosyltransferase, UGT79B6, determines the pollen-specific flavonol structures in *Arabidopsis thaliana*, XII France-Japan Workshop on Plant Science 2014, 2014 年 10 月 29 日、東京大学(東京都文京区), 招待講演

K. Yonekura-Sakakibara, R. Nakabayashi, S. Sugawara, T. Tohge, T. Ito, M. Koyanagi, M. Kitajima, H. Takayama, K. Saito, Functional identification of a glycosyltransferase involved in pollen-specific flavonol biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*, XXVII International Conference on Polyphenols & Tannin

conference, 2014年9月2日 - 6日、名古屋大学(愛知県名古屋市)

K. Yonekura-Sakakibara, R. Nakabayashi, S. Sugawara, T. Tohge, T. Ito, M. Koyanagi, M. Kitajima, H. Takayama, K. Saito, Pollen-specific flavonol biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: identifications of the key enzyme UGT79B6 and the tailored flavonol structures, 25th International Conference on Arabidopsis Research, 2014年7月28日 - 2014年8月1日、Vancouver, Canada

榎原圭子、中林亮、菅原聡子、峠隆之、伊藤卓也、小柳美寿々、北島満里子、高山廣光、斉藤和季、シロイヌナズナ花粉特異的フラボノールの高次配糖化酵素遺伝子の機能同定とその局在性、第55回日本植物生理学会年会、2014年3月18日、富山大学(富山県富山市)

K. Yonekura-Sakakibara, R. Nakabayashi, S. Sugawara, T. Tohge, T. Ito, M. Koyanagi, M. Kitajima, H. Takayama, K. Saito, Functional identification of a key glycosyltransferase, UGT33, determining the pollen-specific flavonol structures in Arabidopsis, Plant Gene Discovery & 'Omics' echnologies, 2014年2月17日 - 18日、Vienna, Austria

榎原圭子、菅原聡子、中林亮、小柳美寿々、峠隆之、鈴木実、伊藤卓也、北島満里子、高山廣光、斉藤和季、花粉特異的なシロイヌナズナ・フラボノール高次配糖化酵素の機能同定、第31回日本植物細胞分子生物学会大会シンポジウム、2013年9月10日、北海道大学(北海道札幌市)

〔図書〕(計 1件)

K. Yonekura-Sakakibara, K. Saito, Wiley-Blackwell, Resent Advances in Polyphenol Research, 2014, 464 (61-82)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎原 圭子 (Yonekura-Sakakibara Keiko)
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

(2) 研究分担者
無し

(3) 連携研究者
無し