

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26292015

研究課題名(和文)カンキツ特有のフラボノイドであるノビレチンの生合成機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism of biosynthesis of flavonoid, nobiletin in citrus fruit

研究代表者

加藤 雅也 (Kato, Masaya)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：10432197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、カンキツ特有のフラボノイドのノビレチンの生合成経路を明らかにすることを目的とした。ウンシュウミカン、バレンシアオレンジ、太田ポンカンのフラベドにおけるフラボノイド含量の季節変化を調査したところ、ノビレチン含量は太田ポンカンで高く推移した。フラボノイドヒドロキシラーゼおよびフラボノイドO-メチルトランスフェラーゼ(OMT)遺伝子の発現は、太田ポンカンで高いレベルを示した。さらに、OMTのリコンビナントタンパク質を用いた機能解析から、OMTはフラボノイドの水酸基をメトキシル化する可能性が示唆された。以上より、OMTはカンキツのノビレチン生合成において重要な役割を担うことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The objective of the present study is to elucidate the biosynthetic pathway of nobiletin in citrus fruit. During fruit maturation, nobiletin content in ponkan mandarin was much higher than those in Satsuma mandarin and Valencia orange. High levels of the gene expression of flavonoid hydroxylase and flavonoid o-methyl-transferase (OMT) were observed in ponkan mandarin. Functional analysis of the recombinant protein of OMT showed that OMT catalyzed the reaction from hydroxyl group to methoxyl group of flavonoid. Thus, these results indicated that OMT plays an important role in nobiletin biosynthesis of citrus fruit.

研究分野：収穫後生理学

キーワード：ノビレチン フラボノイド カンキツ フラボノイドO-メチルトランスフェラーゼ

1. 研究開始当初の背景

カンキツ果実には、多様なフラボノイドが含まれる。一般的に、野菜や果実には、フラボノイドとして、ルチンやケルセチンなどが多く含まれている。一方、カンキツ果実には、特有のフラボノイドとして、ヘスペリジン、ナリンギン、ナリルチンといったフラバノン、ロイフォリンやジオスミンといったフラボン、ノビレチン、タンゲレチン、シネンセチンといったポリメトキシフラボンが含まれている。

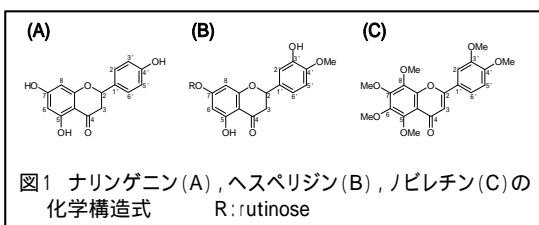
これまでカンキツ果実に特有なフラボノイドは、機能的成分として多くの研究が行われている。ヘスペリジンやナリンギンは、ガン細胞に対するアポトーシス誘導作用、脂質代謝改善作用、抗炎症作用などが報告されている。またナリルチンは、抗アレルギー作用が報告されている。ポリメトキシフラボンのタンゲレチンやノビレチンは、ガン細胞の浸潤、転移抑制作用、血しょう VLDL 濃度の低下作用、関節リウマチや関節破壊症に与えるマトリックスメタロプロテアーゼの産生を阻害することなどが明らかにされている。近年、シークワーサーやポンカンの果皮に多く含まれるノビレチンの機能性について多くの研究が行われており、アルツハイマー病の予防にも効果があることが報告されている。

植物におけるフラボノイド生合成は、1分子の p-クマリル CoA と 3 分子のマロニル CoA が縮合し、カルコンシンターゼによりテトラヒドロキシカルコンが生合成されることから始まる。その後、カルコンイソメラーゼによりフラバノン類のナリンゲニンが生成される。カンキツ特有のフラバノン類のヘスペリジン、ナリンギン、ナリルチンは、ナリンゲニンから生合成されると考えられる。フラバノン類は、フラボンシンターゼによりフラボン類のアピゲニンが生成される。その後、複数のフラボノイドヒドロキシラーゼおよびフラボノイド O-メチルトランスフェラーゼが作用することにより、ポリメトキシフラボノイドのタンゲレチンやノビレチンが生合成されると考えられる。

しかし、これまでのところカンキツ果実におけるフラボノイド生合成、特に、機能的成分として近年注目されているノビレチンの生合成に与える酵素遺伝子およびその経路は不明である。

2. 研究の目的

図 1 にフラバノン類のナリンゲニンおよびヘスペリジンとポリメトキシフラボン類



のノビレチンの化学構造式を示す。ナリンゲニンからヘスペリジンへの生合成では、ナリンゲニンの 7 位の水酸基にルチノース (rutinose) が転移して配糖体となり、4' 位の炭素にメトキシ基が導入され、5' 位に水酸基が導入される。また、ヘスペリジンからノビレチンへの生合成では、ヘスペリジンの 2 位と 3 位の炭素の間に二重結合が導入された後、6 位および 8 位の炭素に水酸基が導入され、5 位、6 位、7 位、8 位および 5' 位の炭素にメトキシ基が導入される。このように、カンキツ特有のフラボノイドの生合成には多くの酵素が関わっており、その経路は複雑である。

本研究では、カンキツ果実におけるフラボノイド生合成、特に、ノビレチンの生合成に与える酵素遺伝子の単離、発現解析、機能解析を行うことにより、カンキツ果実におけるノビレチンの生合成経路を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

フラボノイド含量・組成の異なるウンシュウミカン、バレンシアオレンジおよび太田ポンカンの 3 種を用いて、カンキツ果実におけるフラボノイド生合成、特に、ノビレチンの生合成メカニズムを明らかにするために、次の実験を行った。

(1)カンキツ 3 種のフラボノイド含量・組成の季節変化の調査

カンキツ 3 種のフラベド (果皮部分) におけるフラボノイド含量および組成を、HPLC を用いて測定した。測定したフラボノイドは、フラバノン類のナリルチン、ヘスペリジン、ポンシリン、フラボン類のロイフォリン、イソロイフォリン、ジオスミン、ポリメトキシフラボン類のシネンセチン、タンゲレチン、ノビレチン、ヘプタメトキシフラボンの計 10 種類とした。

(2)フラボノイドヒドロキシラーゼおよび O-メチルトランスフェラーゼの酵素遺伝子の単離

カンキツのゲノムデータベースから、フラボノイドヒドロキシラーゼおよびフラボノイド O-メチルトランスフェラーゼのそれぞれの遺伝子についてプライマーを設計し、ウンシュウミカン、太田ポンカンおよびバレンシアオレンジの cDNA を鋳型にして PCR による増幅を行い、クローニングし、塩基配列を決定した。

(3)カンキツ 3 種のフラボノイドヒドロキシラーゼおよびフラボノイド O-メチルトランスフェラーゼの遺伝子発現の季節変化の調査

フラボノイドヒドロキシラーゼ遺伝子およびフラボノイド O-メチルトランスフェラーゼ遺伝子について、発現解析を行うために、

ウンシュウミカン、バレンシアオレンジおよび太田ポンカンから単離した遺伝子の共通する塩基配列から、リアルタイム PCR を行うための TaqMan プローブを設計した。また、経時的にサンプリングしたウンシュウミカン、太田ポンカンおよびバレンシアオレンジのフラベドから RNA を抽出し、カラムによる精製後、ランダムヘキサマーを用いて cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型に、TaqMan プローブとプライマーを用いたリアルタイム PCR により、フラボノイドヒドロキシラーゼ遺伝子および 0-メチルトランスフェラーゼ遺伝子の発現の季節変化を調査した。

(4)フラボノイド 0-メチルトランスフェラーゼの酵素学的な機能解析

単離したフラボノイド 0-メチルトランスフェラーゼ遺伝子の翻訳領域を発現ベクターにライゲートし、大腸菌を用いてリコンビナントタンパク質を発現させ、精製した。得られたリコンビナントタンパク質を用いて、フラボノイド 0-メチルトランスフェラーゼの酵素学的な機能解析を行った。

4. 研究成果

(1)カンキツ 3 種のフラボノイド含量・組成の季節変化

ウンシュウミカン、バレンシアオレンジ、太田ポンカンのフラベドにおけるフラボノイド含量の変動を調査した。

フラベドにおけるフラボノイドの季節変化を 6 月から翌年の 1 月まで調査した。実験期間中、フラベドにおける総フラボノイド含量は 6 月が最も高く、翌年 1 月まで成熟に伴い急速に減少する傾向を示した (図 2)。カ

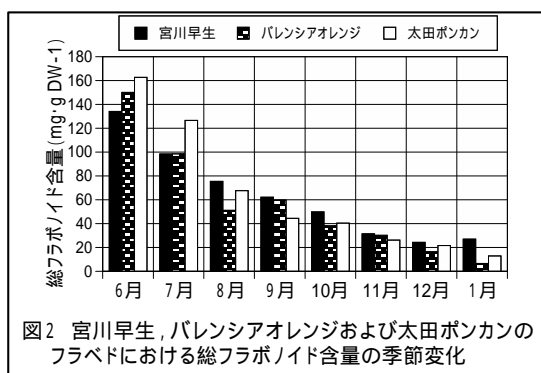


図2 宮川早生、バレンシアオレンジおよび太田ポンカンのフラベドにおける総フラボノイド含量の季節変化

ンキツ 3 品種いずれも 6 月ではヘスペリジンが最も高く検出され、70%以上を占めた。6 月のウンシュウミカンでは、ヘスペリジンに次いでナリルチン (6.7%) とロイフォリン (4.3%) が主なフラボノイドとして検出された。6 月のバレンシアオレンジにおいてはロイフォリン (6.3%) とポンシリン (1.8%) が検出された。ポンカンにおいてはノビレチン (7.3%) とロイフォリン (7.3%) が検出された。特にノビレチン含量は、季節を通じて太田ポンカンが他の 2 種よりも高い値を示した (図 3)。

以上の結果から、カンキツ 3 品種ではフラ

ボノイド含量および組成において品種間差があることが明らかとなった。

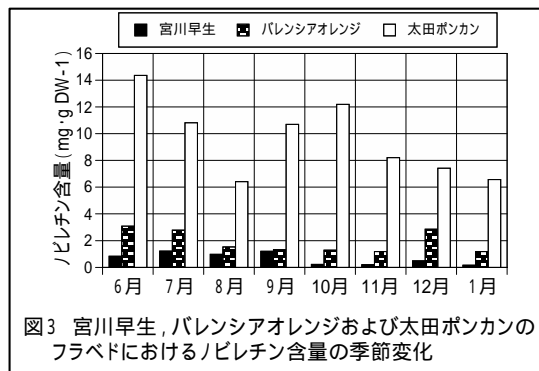


図3 宮川早生、バレンシアオレンジおよび太田ポンカンのフラベドにおけるノビレチン含量の季節変化

(2)フラボノイドヒドロキシラーゼおよびフラボノイド 0-メチルトランスフェラーゼの酵素遺伝子の単離

ポリメトキシフラボノイド生合成に関わるフラボノイドヒドロキシラーゼとして、*CitF6H1*、*CitF6H2*、*CitF6H3* および *CitF3 'H* の cDNA を、カンキツ 3 種から RT-PCR により増幅し、塩基配列を決定した。また、フラボノイド 0-メチルトランスフェラーゼとして、*Cit3 'OMT*、*Cit4 'OMT* および *Cit8OMT* を単離した。いずれの酵素遺伝子についても、カンキツ 3 種間において 97%以上の高い相同性を示した。

(3)カンキツ 3 種におけるフラボノイドヒドロキシラーゼおよびフラボノイド 0-メチルトランスフェラーゼの遺伝子発現の季節変化

単離した遺伝子の発現をリアルタイム PCR により調査したところ、*CitF6H1* および *CitF3 'H* の遺伝子発現は、果実成熟後期においてポンカンで高いレベルを示した。

また、*Cit3 'OMT* の遺伝子発現は、10 月以降、ウンシュウミカンより太田ポンカンの方が高く推移した。*Cit4 'OMT* の遺伝子発現は、果実成熟期間中、太田ポンカンにおいて非常に高いレベルであった (図 4)。*Cit8OMT* の遺

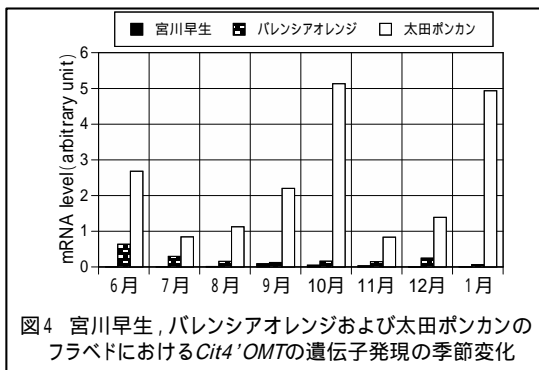


図4 宮川早生、バレンシアオレンジおよび太田ポンカンのフラベドにおける *Cit4 'OMT* の遺伝子発現の季節変化

伝子発現は、9 月以降、ウンシュウミカンより太田ポンカンの方が高く推移した。

したがって、太田ポンカンのフラベドでは、ポリメトキシフラボノイド生合成に関わる OMT 遺伝子の高い発現量がノビレチンの蓄積

に関わっていることが示唆された。特に、ノビレチン生合成には *Cit4' OMT* の遺伝子発現が深く関わっていることが示唆された。

(4)フラボノイド 0-メチルトランスフェラーゼの酵素学的な機能解析

フラボノイド 0-メチルトランスフェラーゼの機能解析を行うために *Cit4' OMT*、*Cit3' OMT* および *Cit8OMT* からリコンビナントタンパク質を大腸菌を用いて発現させ、抽出、精製した。精製タンパク質を SDS-PAGE で確認したところ、*Cit4' OMT*、*Cit3' OMT* および *Cit8OMT* はいずれも単一のバンドとして検出された。*Cit4' OMT* の機能解析を行うため、様々なフラボノイドを基質として反応させ、生成物を HPLC により分析した。その結果、7,8-ジヒドロキシフラボンを基質とした場合に新たなピークが検出され、*Cit4' OMT* は 7 位、8 位、あるいはその両方の水酸基をメトキシル化した可能性が示唆された。また、*Cit3' OMT* の機能解析を行ったところ、3',4'-ジヒドロキシフラボンを基質とした場合に新たなピークが検出され、一方、4'-ヒドロキシフラボンを基質とした場合に新たなピークが検出されなかったことから、*Cit3' OMT* は 3' 位の水酸基をメトキシル化した可能性が示唆された。

以上の結果より、フラボノイド 0-メチルトランスフェラーゼはポンカンにおけるノビレチン生合成において重要な役割を担う酵素遺伝子であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計3件)

- ① 池戸 勇太、神谷 志織、馬 剛、張 嵐翠、八幡 昌紀、山脇 和樹、松本 光、生駒 吉識、小川 一紀、加藤 雅也
カンキツ果実の成熟過程におけるフラボノイド集積、園芸学会平成 26 年度秋季大会、2014 年
及川 みちる、池戸 勇太、馬 剛、張 嵐翠、八幡 昌紀、山脇 和樹、吉岡 照高、太田 智、加藤 雅也
カンキツ果実の成熟過程におけるノビレチン集積および関連遺伝子の発現変動、園芸学会平成 27 年度秋季大会、2015 年
及川 みちる、池戸 勇太、馬 剛、張 嵐翠、八幡 昌紀、山脇 和樹、吉岡 照高、太田 智、加藤 雅也
カンキツ果実の成熟過程におけるフラボノイドヒドロキシラーゼ遺伝子の発現変動、園芸学会平成 28 年度秋季大会、2016 年

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 雅也 (KATO, Masaya)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：10432197

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

馬 剛 (MA, Gang)

張 嵐翠 (ZHANG, Lancui)