

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 17 日現在

機関番号：81202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850021

研究課題名(和文) リンドウ属植物におけるキサントン生合成経路の解明

研究課題名(英文) Elucidation of xanthone biosynthesis in *Gentiana*.

研究代表者

佐々木 伸大 (Sasaki, Nobuhiro)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・園芸資源研究部・主任研究員

研究者番号：80422088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ササリンドウ(*Gentiana scabra*)の葉から抽出したRNAを用いてRNA-seq解析を行った。キサントンを持っている種であるササリンドウから23種類のUDP-glucose依存型糖転移酵素(UGT)相同cDNAを単離し、組換え酵素活性を検討したところ、8種類においてnorathyriolに対する配糖化酵素活性が検出された。これらの酵素は類似的な芳香族化合物であるフラボノイドにも活性を示し、また、複数の反応生成物が得られた。また、エゾリンドウ(*G. triflora*)から単離したUGTの一種が、フラボンのC配糖化を直接触媒することを示した。

研究成果の概要(英文)：The RNA-seq analysis using the RNAs extracted from the leaves of *Gentiana scabra*. We use this and EST database of *G. triflora* constructed before to pick up the genes involved in xanthone and flavonoid biosynthesis. Twenty three (*G. scabra*) and 6 (*G. triflora*) of UDP-glucose dependent glucosyltransferase (UGT) homologous contigs including the putative first ATG sequence was found by BLAST search. The full lengths of their coding region were isolated and the recombinant proteins were produced using the *E. coli* expression system. One of them isolated from *G. triflora* showed UGT activity toward flavones. NMR and MS analysis showed that the compound produced by the reaction was the flavone linked to glucose by C-C bond. Eight recombinant protein produced by the cDNAs isolated from *G. scabra* showed UGT activities toward norathyriol, an aglycone of xanthones. They also showed the activities toward other flavonoids and produced multiple reaction products.

研究分野：植物細胞分子生物学

キーワード：キサントン リンドウ 配糖化酵素

1. 研究開始当初の背景

キサントン類は C6-C1-C6 の dibenzo- γ -pyrone 構造を有する化合物の総称で、植物界ではそのオキシ誘導体やヒドロキシ誘導体としてリンドウ科やオトギリソウ科、クワ科、ヒメハギ科などに存在している。植物が合成するキサントン類は非常に高い抗酸化力や抗菌活性、抗腫瘍作用、抗炎症作用などが報告されており、サプリメントとしても利用され始めている。しかし、植物におけるキサントンの生理学的意義については殆ど分かっておらず、また、その生合成がどのように行われているかについても殆ど情報が無いのが現状である。

リンドウは、岩手県や長野県などが主要な産地である。日本で栽培、販売されているリンドウの品種はエゾリンドウ (*Gentiana triflora*) とササリンドウ (*G. scabra*) の 2 種と、それらの交配種が用いられている。*G. triflora* は開花期が比較的早く、花色の発色も良いことから、切り花として多用されている。*G. scabra* は耐病性に優れること、また、花が開きやすいことから観賞価値も高いが、開花期が遅く、お盆や彼岸の時期の供給が困難である。そのため、これらを交配することによってそれぞれの良い形質を併せ持つ品種を作出する試みがなされている。

これまでに *G. triflora*、*G. scabra* が持つ代謝産物の解析を行ったところ、*G. scabra* が特異的にキサントンの一種である mangiferin をその葉や花などの器官に高濃度で蓄積していることが判明した。キサントン類はその強い抗酸化力や抗菌活性などが報告されていることから、この mangiferin が *G. scabra* の耐病性に関わっていることが考えられた。

キサントン類の中でも mangiferin は上述の科以外にも、幅広い植物種が蓄積していることが知られており、最も普遍的なキサントンの 1 種である (図 1)。しかし、その生理学的意義や生合成経路についての研究は殆どなされていない。この mangiferin は基本骨格である norathyriol とグルコースが C-C 結合で結合した C-glycosylxanthone であるが、リンドウには類似の化合物であるフラボンが同様に C 配糖化された C-glycosylflavone も蓄積している (図 1)。このことからこれらの化合物の生合成経路の関連性についても興味もたれる。キサントンの配糖化に関しては C 配糖化のみならず O 配糖化についても殆ど報告がなく、基本骨格の生合成とともにこれらの糖転移反応がどのようにして行われているかについても解明する必要がある。

2. 研究の目的

強力な抗酸化力や抗菌活性を有するキサントン類はリンドウ科や、オトギリソウ科などの植物が有するに植物ポリフェノールの 1 種であるが、その生合成系は殆ど不明のまま

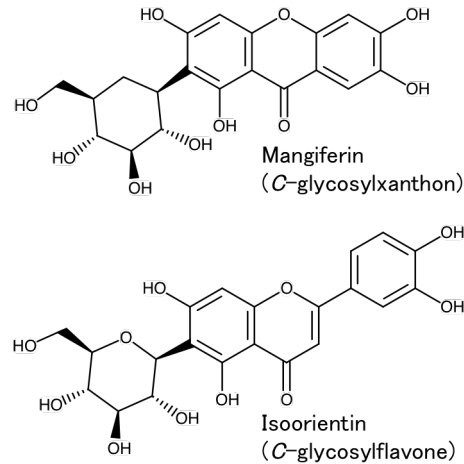


図 1 リンドウに含まれる C 配糖化キサントンと C 配糖化フラボン

である。本研究では、その葉や花に大量にキサントンを含むササリンドウ (*G. scabra*) を材料として、RNA-seq 解析を行い、キサントン生合成に関わる可能性のある遺伝子の探索を行う。また、その後ササリンドウとその近縁種でキサントンを有していないエゾリンドウ (*G. triflora*) の葉における EST ライブラリーを比較することによって、キサントン生合成に関わる酵素をコードする遺伝子を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) RNA-seq 解析

ササリンドウ (*G. scabra*) 葉から抽出した total RNA を用いて RNA-seq 解析を行なった。解析は BGI-Japan 株式会社のトランスクリプトーム解析受託サービスを用いた。

(2) RACE 法による cDNA の単離

ササリンドウ RNA-seq 解析または、これまでに当センターにて構築されていたエゾリンドウの EST データベースの BLASTX 相同性検索の結果から「Benzophenone synthase (BPS), 4-coumaroyl CoA ligase (4CL), UDP-glucose, glucosyltransferase (UGT)」等のキーワードで検索を行い、獲得された cDNA 配列に first ATG と推定される配列があるかについて確認した。推定の first ATG が見出されたものについて ATG を含むようにプライマーを設計した。3'-RACE 用の鋳型 cDNA は TAKARA BIO 社の 3'-Full RACE Core Set を用いて合成した。先に設計した ATG を含むプライマーとキットに付属の 3-site 3'プライマーを用いて PCR を行い、増幅された断片を pMD20 ベクターに連結した。クローニングした cDNA 配列は両鎖についてシーケンスを行なって DNA 塩基配列を決定した。

(3) 大腸菌を用いた組換え酵素の生産

全長が獲得された cDNA について first ATG を含むように設計したプライマーとストップコドン直上で、ストップコドンを含まない

ように設計したプライマーを用いて PCR 増幅を行い、大腸菌発現用ベクター pTrcHis2 に TOPO クローニングによって導入した。DNA を塩基配列を確認した後に、タンパク質誘導用の大腸菌株 BL21、あるいは Nico21 (New England Biolabs) を形質転換した。それらのコロニーを 30 °C で一晩液体培養した後に、1 mM となるように IPTG を加えて 16 °C で 2 時間培養し、菌体を回収した。

(4) 酵素活性測定

回収した大腸菌を破砕用バッファー (100 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM DTT) に懸濁し、超音波破砕機で菌体を破砕した。遠心分離によって不溶性画分を除去した上清を酵素活性測定に用いた。タンパク質を生成する場合には、HisTrap GraviFlow (GE Healthcare) あるいは HisTALON Superflow Cartridges (TakaraBio) を用いて行い、酵素溶液の濃縮には AMICONE Ultra (30 MWCO, Millipore) を用いて行なった。UGT 酵素活性は 20 µl の反応溶液 (130 mM リン酸バッファー, pH 7.5) に 2 µl ずつの 10 mM UDP-glucose、2 mM の基質と酵素溶液を加えて、30 °C で 10 分間の反応を行い、2 µl の 20% リン酸を加えて反応を停止した。反応生成物は HPLC-photodiode array detector (PDA) を用いて解析を行った。

(5) 配糖化酵素反応生成物の同定

配糖化酵素反応によって得られた反応生成物は HPLC-PDA を用いて標品が手に入るものについてはそれらとのリテンションタイムとスペクトルとを比較することで行なった。糖の結合位を決定する必要があるものについては、¹H NMR, ¹³C NMR, NOESY, HMQC, HMBC 解析を行った。

4. 研究成果

(1) キサントンを蓄積している種であるササリンドウの RNA-seq データベースを用いた相同性検索によってキサントン合成の初発の酵素であるベンゾフェノン合成酵素相同遺伝子 2 種類、その前駆体の合成に関わる 4 CL 相同遺伝子 14 種類を獲得した。また、芳香族化合物へ糖を転移する酵素である UGT 相同遺伝子を 23 種単離した。またキサントンは蓄積せずフラボノイドだけを蓄積している種であるエゾリンドウの in house の EST データベースを用いた相同性検索によって、6 種類の UGT 相同遺伝子を獲得した。

(2) キサントンとフラボノイドに対する配糖化酵素活性の測定

ササリンドウから単離された 2-3 種類の UGT 相同遺伝子が大腸菌を用いて組換え酵素を生産し、それらのキサントンやフラボノイドに対する配糖化酵素活性について検討した。その結果、8 種類において manngiferin のアグリコンである norathyriol への糖転移酵素活性が確認された (一例を図 2 に示し

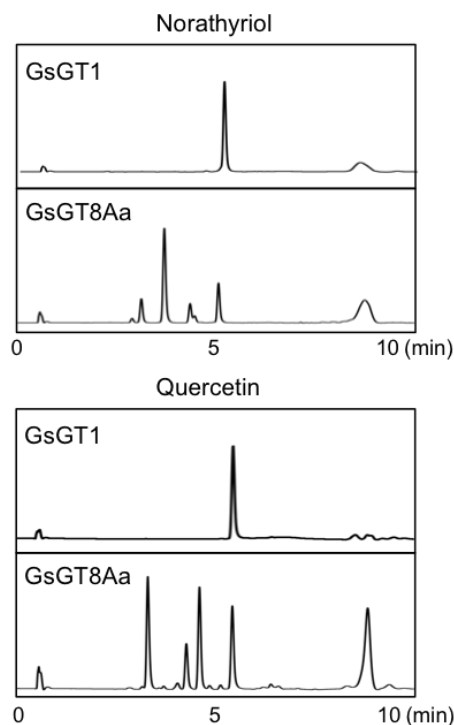


図 2 ササリンドウから単離した UGT 相同遺伝子の組換え酵素を用いた配糖化酵素活性の検出

GsGT8Aa は norathyriol と quercetin の両方を基質として認識する。対照として GsGT1 の結果を並べて示した。

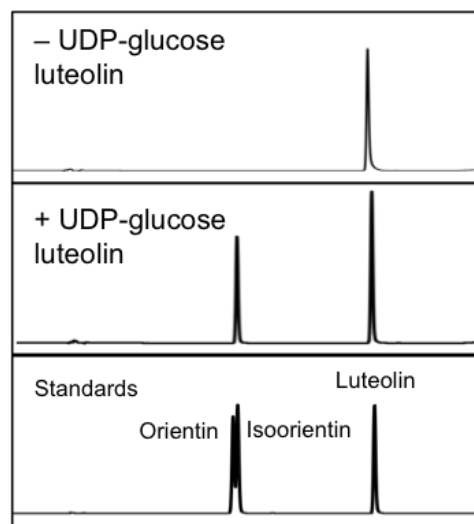


図 3 エゾリンドウから単離したフラボンに配糖化酵素活性を示す UGT 相同遺伝子の組換え酵素を用いた配糖化酵素活性の検出

フラボンの一種である luteolin を基質として組換え酵素を用いて酵素反応を行なった産物を HPLC で分析した。糖供与体である UDP-glucose が反応系に加えていない場合と比較して、加えた場合に特異的に新たなピークが検出された。そのピークは、C-glycosylflavone の一種である isoorientin と一致した。

た)。これらの反応生成物はいずれも複数種確認され、また、フラボノイドの一種であるケルセチンに対しても酵素活性を持つことが判明した。これらの酵素が生体内でキサントンやフラボノイドの生合成に関わっているかについては更なる研究が必要である。

(3) エゾリンドウからのフラボン C-配糖化酵素 cDNA の単離

エゾリンドウから単離された 8 つの UGT 相同遺伝子について組換え酵素を生産し、フラボンに対する糖転移酵素活性を検討した。その結果、1 種類について酵素活性が認められ、HPLC 分析の結果から、反応生成物が C-glycosylflavone であることが示唆された (図 3)。そこで、この反応生成物を NMR や MS を用いて解析したところ、フラボンの 6 位に C-C 結合でグルコースが結合したものであることが判明した。これまでに、植物においてフラボンの骨格に直接 C 配糖化する酵素についての報告例はなく、初めての報告である。

(4) エゾリンドウから単離したフラボン C 配糖化酵素の基質特異性

エゾリンドウから単離したフラボン C 配糖化酵素の組換え酵素を用いてフラボノイドやキサントンを基質として糖転移酵素反応について検討した。その結果、この酵素はフラボンに対して強い活性を示し、キサントンのアグリコンの一つである norathyriol には弱い活性を示すことが示された (表 1)。

表 1 エゾリンドウから単離されたフラボン C 配糖化組換え酵素の基質特異性

基質	UGT 活性 (pkatal/mg protein)
3,4,2',4',6'-pentahydroxychalcone	n.d.
2-Hydroxynaringenin	n.d.
Naringenin	trace*
Eriodictiol	trace*
Apigenin	97.9 ± 3.17
Luteolin	118.6 ± 3.35
Luteolin-8CG	n.d.
Kaempferol	n.d.
Quercetin	n.d.
Pelargonidin	n.d.
Cyanidin	n.d.
maclurin	n.d.
Norathyriol	trace**

n.d., 特に産物と認められるものは検出されなかった。* trace, 2 種類の僅かなピークが検出された。** trace, 3 種類の僅かなピークが検出された。

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)

Sasaki, N., Nishizaki, Y., Yamada, E., Tatsuzawa, F., Nakatsuka, T. Takahashi, H., Nishihara, M. Identification of the glucosyltransferase that mediates direct flavone C-glycosylation in *Gentiana triflora*. FEBS Letters 589: 182-187

〔学会発表〕(計 3 件)

佐々木 伸大, 山田 恵理, 西崎 雄三, 中塚 貴司, 立澤 文見, 樋口 敦美, 藤田 晃平, 高橋 秀行, 西原 昌宏, エゾリンドウからのフラボン配糖化酵素遺伝子群の単離 日本植物生理学会第 56 回年会

佐々木伸大, 山田恵理, 西崎雄三, 中塚貴司, 立澤文見, 樋口敦美, 藤田晃平, 高橋秀行, 西原昌宏, 日本のリンドウ園芸品種に含まれるポリフェノール類の解析 日本植物学会 第 78 回大会

佐々木伸大, 山田恵理, 西崎雄三, 中塚貴司, 立澤文見, 樋口敦美, 藤田晃平, 高橋秀行, 西原昌宏, リンドウからのフラボン C-配糖化酵素の単離 日本植物細胞分子生物学会第 32 回大会・シンポジウム

〔その他〕

ホームページ等

<http://gentian.ibrc.or.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 伸大 (SASAKI Nobuhiro)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・園芸資源研究部・主任研究員

研究者番号：80422088