

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770033

研究課題名（和文） トランスポゾン・タギング法を用いたドーパ合成酵素遺伝子の探索

研究課題名（英文） Identification of the gene coding tyrosine hydroxylase using the transposon-tagging methods.

研究代表者

佐々木 伸大（SASAKI NOBUHIRO）

東京農工大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号：80422088

研究成果の概要（和文）：オシロイバナにおいてベタレイン色素合成に関わる DOPA dioxygenase（DOD）遺伝子についてプロモーター領域を含むゲノム構造を単離した。オシロイバナの DOD 遺伝子は2つのイントロンと3つのエキソンから構成されていると考えられた。易変花色をもつオシロイバナ系統のゲノム領域について DOD 遺伝子近傍配列を確認したが、トランスポゾン様の配列は確認されなかった。そこで、オシロイバナ花弁から抽出した mRNA を用いた cDNA サブトラクション法によってドーパ合成に関わると思われる候補遺伝子を3種類単離した。

研究成果の概要（英文）：The genomic region including promoter of the DOPA dioxygenase (DOD) gene was isolated from *Mirabilis jalapa*. DNA sequence analysis revealed that the DOD gene was consisted of 3 exons and 2 introns. We, however, could not find any transposable element-like sequences in the genomic region. Three candidate cDNAs encoding tyrosine hydroxylase were isolated from petals of *Mirabilis jalapa* using cDNA subtraction method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：代謝生理・植物色素・ベタレイン

1. 研究開始当初の背景

DOPA (dihydroxyphenylalanine) は動物においては神経伝達物質やメラニンの前駆体として重要な物質であるが、植物においても合成されており、多種多様な二次代謝産物の前駆体となっている。植物の二次代謝成分のなかでもアルカロイドと呼ばれる含窒素化合物群は生理活性が強く、生合成経路に関わる酵素遺伝子の探索とそれらの組換え酵素を用いたアルカロイド合成につい

ての研究がなされている。しかし、その最初の段階であるチロシンから DOPA を合成する酵素については未解明のままである。植物の二次代謝物質の合成に関わる酵素、遺伝子についての研究は、植物色素の一種であるアントシアニンの研究でかなりの部分が解明されてきた。それは、花色をマーカーとした育種遺伝学と分子生物学的手法とを組み合わせることによる成果である。異なる色を持つ同一植物種の組織における

サブトラクション法や、トランスポゾン・タギング法などが合成経路の解明に大きな貢献をしてきた (McLaughlin and Walbot, 1987, Marrs et al. 1995)。しかし、アルカロイド等の生薬成分は一般には色を持たないため、色をマーカーとした育種遺伝学を適応するのが困難であるため、これまで研究が遅れてきたと考えられる。

植物が持つもう一つの色素グループであるベタレイン色素はナデシコ目植物でよく見られる色素であるが、その生合成経路は図 1 に示すように、チロシンから始まり DOPA を経て合成されると推定されている (Strack 2003, Phytochemistry)。ベタレイン色素は赤色を呈するベタシアニンと黄色を呈するベタキサンチンとからなり、その経路はチロシンから DOPA が合成され、その後 DOPA dioxygenase (DOD) によってベタラミン酸が合成される。その後、ベタラミン酸が生体内のアミノ酸等と縮合して鮮やかな黄色を呈するベタキサンチンが合成される。ベタラミン酸が DOPA が酸化されて合成される *cyclo*-DOPA と縮合して赤色を呈するベタシアニンが合成される。申請者らはこれまでにオシロイバナを用いてベタレイン色素生合成系に関わる酵素・遺伝子についての研究を行ってきた。その過程においてベタシアニンの配糖化はこの *cyclo*-DOPA の段階で起ることを明らかとし、*cyclo*-DOPA 配糖化酵素をコードする遺伝子を単離した。また、ベタレイン色素の発色団であるベタラミン酸を合成する酵素である DOD 遺伝子 DOD 遺伝子をオシロイバナから単離し、酵母を用いて組換え DOD を生産し、酵素活性測定条件を検討することによって、ベタラミン酸が DOPA から DOD によって合成されることを試験管内で示すことに成功した。それらの研究を遂行する上で、オシロイバナの各色変異株、ならびに易変花色すなわち斑入りの花を持つ株について元法政大学教授の笠原基知治博士より分与を受けている本申請ではこれらのオシロイバナの遺伝学的資源を利用して植物二次代謝において最も重要である酵素の一つである DOPA 合成酵素をコードする遺伝子を探索する試みである。

2. 研究の目的

DOPA (dihydroxyphenylalanine) は植物の重要な二次代謝物質であるアルカロイド等の前駆体の一種であるが、植物の DOPA 合成酵素遺伝子については未だに明らかとなっていない。本研究では、DOPA 合成酵素遺伝子を探索するために、DOPA を前駆体として合成される植物色素であるベタレイン色素を持つ植物であるオシロイバナのトランスポゾンによって生じていると考えられ

る斑入りの花を材料として、トランスポゾン・タギング等の手法を用いて DOPA 合成酵素遺伝子を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 各種ベタレイン色素分子の半酵素学的合成法の確立

オシロイバナ由来 DOPA dioxygenase cDNA を Invitrogen 社の GATEWAY SYSTEM を用いて pDEST17 ベクターに導入したプラスミドを用いて、大腸菌株 BL21-AI 株を形質転換した。形質転換した大腸菌を 1.5 ml の 50 mg/ml のアンピシリンを含む LB (LBA) 培地に植菌し、30°C で一晚培養した。400 μ l の前培養した大腸菌を 200 ml の LBA 培地に植菌した。30 度で 16 時間培養した後に、終濃度で 1 mM になる様に IPTG を加えて 16°C で 3 時間培養した。培養した菌体液を遠心分離によって集菌を行い、上清を除去してから -20°C で保存した。保存してあった菌体に破碎バッファー (100 mM リン酸カリウム、pH 7.2) を加えて超音波破碎機を用いて細胞を破碎した。破碎した菌体液を遠心分離を行い、不溶性画分を除去し、これを粗酵素液とした。DOD 反応液は終濃度で 1 mM DOPA, 10 mM アスコルビン酸、50 μ M FeSO₄ と先の粗酵素液を含み、200 ml となるように調整した。30°C で 2 時間静置した後に終濃度が 1% となる様に 20% リン酸水溶液を加えて反応を停止した。反応液は 20,000xg で 20 分間遠心分離を行い不溶物を除去した。合成したベタラミン酸を試験管に分注し、そこに各種アミノ酸を添加し室 4°C で一晚静置することで各種ベタラミン酸を合成した。合成したベタキサンチンは HPLC で分析した。カラムには WakoPak Handy ODS (i.d. 4.6 x 250 mm) を用いて、溶離液 A に 1.5% リン酸水溶液、溶離液 B にメタノールを用いて流速 1ml/min で 8%-13%、5 分間、13%-21%、5 分間、21%-30%、5 分間、30%-38%、5 分間、38%-43%、5 分間となるリニアグラジェントで分離を行った。モニタリングは吸収波長 470 nm で行った。

2) DOPA dioxygenase (DOD) ゲノム構造解析

斑入りのオシロイバナは実験室内で土壌栽培した。植物体からのゲノム DNA の単離は CTAB 法あるいは、DNeasy Plant Mini Kit (キアゲン社) を用いて行った。DOD 遺伝子のゲノム領域を単離するために、DOD cDNA の first ATG と stop コドンの領域に設計したプライマー (DODatg: 5'-ATGAAAGGAACATACTA TATAAATCATGGT-3'; DODstp: 5'-TTAATCAGTTTTTGTAGTGGTGGGAGTGA-3')、並びにその内部に設計したプライマー (DODf4: GATACAATATCGAGCA

CCGGGAGCACC; DODR6: GGACTCG ATCATGCAGCATGGTTTCCACTA) を用いて、オシロイバナゲノムを鋳型とした PCR を行った。増幅された DNA 断片は pMD20 vector (Takara Bio) を用いてクローニングを行い、DNA 塩基配列を解析した。

DOD 遺伝子のプロモーター領域の単離は TaKaRa LA PCR in vitro cloning kit を用いて行った。方法はキットのマニュアルに従った。DOD 特異的プライマーとして、MjDODS1 (5'-TATATGTTTTTTAAGTACATT AGTGGATCACCAT-3') と MjDODS2 (5'-TATA TGTTTTTTAAGTACATTAGTGGATCACCAT-3') を用いた。制限酵素として *Sa*II, *Eco*RI を用いた。

サザンハイブリダイゼーション解析は DIG-ハイプライム DNA ラベリング&デテクションスターキット I (Roche) を用いて行った。

3) cDNA サブトラクション法による DOPA 合成酵素候補遺伝子の獲得

RNA 抽出は RNeasy Plant Mini Kit (キアゲン社) を用いて行った。cDNA サブトラクションは PCR-select cDNA subtraction kit (Clontech) を用いて行った。方法はキットのマニュアルに従った。植物材料としてはオシロイバナの安定に赤色あるいは、黄色の花をつける 2 つの系統の花弁を用いた。花弁をその発達段階で 5 つのステージに区切り、そのうち花弁が完全に開いたステージ 5 をテスターとして、いまだ呈色していないつぼみの段階であるステージ 1 をドライバーとしたサブトラクションを行った。赤色花弁、黄色花弁それぞれの cDNA サブトラクション後に得られた 1,344 クローンずつについて DNA 塩基配列を解析し、データベース上の DNA 塩基配列との相同性検索を行った。全長 cDNA の獲得は SMARTer™ PCR cDNA Synthesis Kit (Takara Bio) を用いて行った。方法はキットのマニュアルに従った。

4. 研究成果

1) 各種ベタレイン色素分子の半酵素学的合成による標品の獲得

ベタレイン色素のうち黄色を呈するものはベタキサンチンと総称され、これらはベタレイン色素の発色団であるベタラミン酸と生体内のアミノ酸やアミンが自発的に縮合することによって合成される。オシロイバナの赤色花弁はベタシアニンの 1 種であるベタニンによって発色していることが判明している。一方、オシロイバナの黄色系統はその花色に数段階の濃淡が認められるが、これがベタキサンチンの分子種の違いによるものか、蓄積量によるものかについ

て明らかではなかった。そこで、大腸菌を用いて組換え DOPA dioxygenase (DOD) を生産し、DOPA からベタラミン酸を合成し、その後アミノ酸やアミンと縮合させることによってベタキサンチン分子種の標品を獲得することで、オシロイバナの黄色系統においてどのようなベタキサンチン分子種を蓄積しているかについて解析を行った。組換え DOD 酵素を用いてベタラミン酸を合成し、20 種類のアミノ酸と 4 種類のアミンを縮合させることにより、24 種類のベタキサンチン分子種を合成した。合成した 24 種類を HPLC を用いて 30 分間で 23 種類のベタキサンチンを分離するメソッドを確立した (図 1)。このメソッドを用いて、オシロイバナの黄色系統の花弁抽出液を分析した結果、主色素として dopamine-betaxanthin をもち、マイナー成分として tyramine-betaxanthin を持つことが推定された。

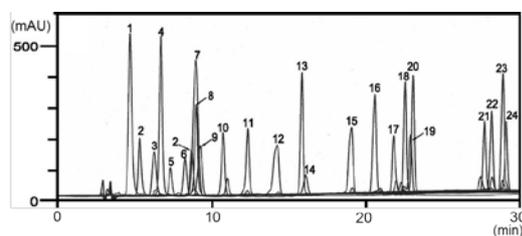


図 1 半合成したベタキサンチンの HPLC による分離

2) DOPA dioxygenase (DOD) ゲノム構造解析

DOD cDNA の open reading frame (ORF) を増幅するように設計したプライマーを用いて、赤色の花をつけるオシロイバナから抽出したゲノム DNA を鋳型として PCR を行ったところ、増幅産物が得られなかったため、ORF 内部にプライマーを設計し直し、再度ゲノム PCR を行った。その結果、cDNA の first ATG の下流 300 bp 付近に設計した antisense プライマー (DODR6) と DODatg プライマーを用いた場合に約 4 kbp の増幅産物が、また、first ATG の下流 220 bp 付近に設計した sense primer (DODF4) とでは 1.4 kbp 程度の増幅産物が確認された。これらの増幅産物をクローニングベクターに連結し、それらの DNA 塩基配列を確認したところ、DOD ゲノムは first ATG の下流 220 bp と 221 bp の間に 3,974 bp のイントロンと思われる配列が、また、602 bp と 603 bp の間に 674 bp のイントロンと思われる配列が確認された。このことから、DOD ゲノムは 3 つのエキソンが 2 つのイントロンで分断された構造であることが推定された (図 2)。

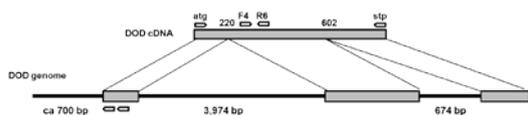


図2 *DOD* 遺伝子のゲノム構造

DOD 遺伝子のプロモーター領域を獲得するために、オシロイバナゲノム DNA を用いた cassette PCR を行った。その結果、制限酵素 *EcoRI* と *SaI* を用いた場合にいくつかの増幅された DNA 断片が獲得された。それらについて DNA 塩基配列を解析したところ、*DOD* の first ATG の上流約 700 bp の領域が単離されていることが判明した。獲得されたプロモーター領域には first ATG から 107 bp 上流に TATA box と思われる配列が、さらにその上流 68 bp のところに CAAT box と思われる配列が確認された。これら獲得された領域を増幅するように設計した数種類のプライマーの組み合わせを用いて、オシロイバナの易変花色株の花弁から抽出したゲノム DNA を鋳型として PCR を行ったが、期待された長さの増幅断片しか得られず、トランスポゾン様配列の挿入は確認されなかった。そこで、これらの易変花色株から抽出したゲノム DNA を用いて、*DOD* cDNA 全長をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、いずれのオシロイバナ系統において同じ長さの 2 本のバンドが観測された (図 3)。これは、トランスポゾンが抜けた細胞数が少なかったために、トランスポゾンが抜けたことによって生じるバンドが検出限界以下であったことや、今回用いた系統においては *DOD* 遺伝子がトランスポゾン等の挿入によって欠損したことが原因ではないことが考えられた。

3) cDNA サブトラクション法による DOPA 合成酵素候補遺伝子の獲得

易変花色オシロイバナ株において *DOD* 遺伝子内や近傍にトランスポゾン様配列を見出すことができなかったため、cDNA サブトラクション法によって DOPA 合成酵素候補遺伝子の単離を試みた。サブトラクションの候補としては、赤色や黄色の花弁から白色花弁をサブトラクションする方法も考えられたが、遺伝学的バックグラウンドが均一である材料を確保することが困難であったため、赤色花と黄色花を持つそれぞれ同一個体の花弁を用いて花弁の発達時期の後期、すなわちベタレイン合成が盛んに行われている時期の花弁とベタレイン合成が殆どされていない初期の花弁とのあいだでサブトラクションを行うこととした。それぞれの花弁の発達段階を 5 つのステージに分けステージ 1 と 5 から抽出した mRNA から

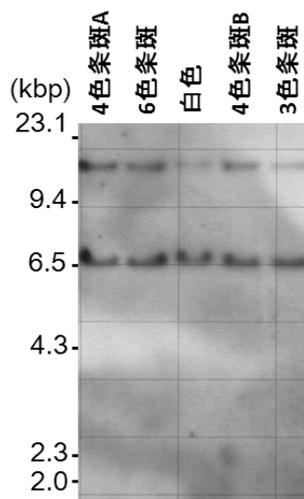


図 3 易変花色オシロイバナから抽出したゲノム DNA を用いて *DOD* cDNA をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析

調整した cDNA を用いて、ステージ由来をテスター、ステージ 1 由来のものをドライバーとしてサブトラクションを行った。サブトラクションして獲得された cDNA 断片をクローニングし、赤色花片由来と、黄色花片由来のものそれぞれにつき、1,344 クローンずつの DNA 塩基配列を解析し、それらについて既存のデータベースを用いて相同性検索を行った。その結果、hydroxylase のファミリーの一つである cytochrome P450 monooxygenase と相同性のあるクローンが数多く獲得されていることが判明した。そこで、この cytochrom P450 相同 cDNA と、その他に獲得された 2-oxoglutarate 依存 monooxygenase 相同 cDNA, polyphenol oxidase (PPO) 相同 cDNA について RACE PCR 法により全長 cDNA を単離した。その結果、P450 相同 cDNA は 1 種類 (P450)、2-oxoglutarate 依存 monooxygenase 相同 cDNA は 2 種類 (2-oxo-1, -2)、PPO は 1 種類を獲得した。これら 4 種類の cDNA についてオシロイバナの各組織と花弁の発達段階における転写量を RT-PCR 法によって確認した。その結果、P450, 2-oxo-1, PPO はいずれも葉や茎では転写が認められず、花のステージの後期においてのみ転写されていることが判明した (図 4)。これまでの研究において、ベタレイン色素合成に関わる遺伝子である *DOD* の転写がステージ 4-5 において細大になっていることから、今回獲得された cDNA がベタレイン合成に関わっていることが示唆された。

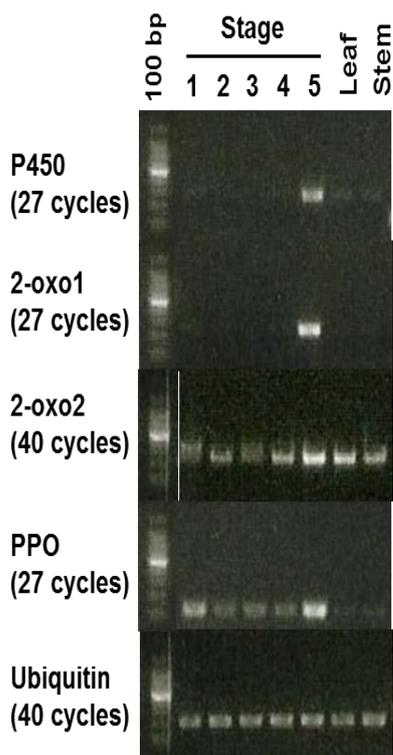


図 4 RT-PCR 法による DOPA 合成候補遺伝子の
 花卉のステージと各組織における転写量の
 解析

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 2 件)

- ① Sekiguchi H, Ozeki Y, Sasaki N. In vitro synthesis of betaxanthins using recombinant DOPA 4,5-dioxygenase and evaluation of their radical-scavenging activities. *J. Agric. Food Chem.* 58: 12504-12509 (2010), 査読有
- ② 佐々木伸大, 植物色素の排他性—アントシアニン色素とベタレイン色素—
 生物科学, 62: 30-38 (2010), 査読無

[学会発表] (計 1 件)

- ① 関口拓史、佐々木伸大、小関良宏、植物色素ベタキサントニンの酵素学的半合成, 第 28 回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム (2010.9.3 仙台)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: L-DOPA を蓄積する植物細胞及びその利用

発明者: 中塚 貴司, 高橋 秀行, 山田 恵理, 坂本 裕一, 関口 拓史, 佐々木 伸大, 小関 良宏, 西原 昌宏

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許出願 2010-200088

出願年月日: 平成 22 年 9 月 7 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 伸大 (SASAKI NOBUHIRO)

東京農工大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号: 80422088

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし