

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26712013

研究課題名(和文)フラボノイド輸送系の包括的解明と有用物質生産への応用

研究課題名(英文) Characterization of flavonoid transport system and its application for the production of useful compounds

研究代表者

杉山 暁史 (Sugiyama, Akifumi)

京都大学・生存圏研究所・准教授

研究者番号：20598601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物は20万種以上にも上る多様な二次代謝産物を生産するが、その中でもフラボノイドは7,000種以上の大きなグループであり、医薬品原料や機能性食品等として私たちの生活に重要な化合物も多く含まれる。しかし、これらの植物由来の有用物質は、含有量が少ない、希少植物由来である、精製が困難である等の理由により、安定供給には大きな障害がある。本研究では植物におけるフラボノイドの細胞外やプラスチドへの輸送体を明らかにすることにより、形質転換体を用いた有用フラボノイド安定生産系の構築を目指した。

研究成果の概要(英文)：Plants produce more than 200,000 secondary metabolites, among which flavonoids are a group of over 7,000 compounds. These compounds are important for our lives as pharmaceutical raw materials and functional foods. However, useful secondary metabolites derived from these plants have a large limitation to stable supply because of low contents in plants, origin from rare plant, difficulty in purification. In this study, we aimed to construct stable flavonoid production system using transformants by clarifying transporters of flavonoids.

研究分野：応用生物化学

キーワード：フラボノイド 輸送体 有用物質生産 プラスチド

1. 研究開始当初の背景

植物は 20 万種以上にも上る多様な二次代謝産物を生産するが、その中でもフラボノイドは 7,000 種以上の大きなグループであり、医薬品原料や機能性食品等としてヒトの健康維持に役立つ有用な化合物も多く含まれる。しかし、植物由来の有用物質は、含有量が少ない、希少植物由来である、精製が困難である等の理由により、安定供給には大きな障害がある。そのため、代謝工学により形質転換生物を用いた安定生産が試みられてきたが、実用化された例はほとんどない。大豆イソフラボンは健康維持に重要な物質であるが、ダイズ植物において、抗菌性イソフラボンのグリセオリンは病原菌の感染を防御するファイトアレキシンとして機能し、ゲニステインやダイゼインは根から分泌され根粒菌へのシグナルとして機能する。フラボノイドの生合成や生理機能の発現には、細胞内・細胞外の適切な場所への輸送が重要であるが、植物におけるフラボノイド輸送は液胞への蓄積に関与する輸送体以外明らかになっていない。

2. 研究の目的

これまでの研究で、根粒形成への最初のステップであるフラボノイド分泌に着目して研究を行い、マメ科植物のゲノム解析やダイズ細胞膜ベシクルを用いた生化学的輸送解析により、フラボノイドの細胞外分泌に ABC 型タンパク質が関与することを明らかになった。さらに、フラボノイドの分泌にはアポプラストの β -グルコシダーゼが関与することが報告されている。本研究では、トランスクリプトーム解析と生化学的解析により、プラスチドへの生合成中間体輸送体、及び、細胞外へのフラボノイド輸送体を明らかにすることを目的とする。さらに、これらの輸送体や有用物質を生合成する酵素を用いて有用物質生産のプラットフォームを構築する。

3. 研究の方法

(1) ダイズ ABCG 輸送体の解析

生化学的輸送解析によりダイズの根からのイソフラボン分泌には ABCG 型の輸送体が関与すると示唆されている。そこで、ダイズのゲノム情報から ABCG 輸送体の遺伝子を探索し、イソフラボン分泌が促進される条件で発現上昇を示す遺伝子を絞り込むこととした。

(2) ミヤコグサを用いたフラボノイド輸送体の探索

マメ科のモデル植物であり、形質転換が可能なミヤコグサ (*Lotus japonicus*) を用いて ABCG ファミリータンパク質の解析を行った。

ダイズの ABCG 遺伝子と同様に、MeJA 処理や病原菌の感染により発現が誘導される遺伝子を探索し、LjABCG1 を見出した。LjABCG1

の機能を明らかにするため、RNAi 体の作出や、Promoter:GUS 形質転換体の作成、細胞内局在性の解析、シロイヌナズナ過剰発現体を用いた解析を行った。

(3) ダイズイソフラボン分泌の解析

ダイズを水耕栽培、及び、圃場栽培し、各生育段階毎に根、葉に含まれるイソフラボンを HPLC で定量するとともに、水耕液中に分泌されたイソフラボン、根圏に分泌されたイソフラボンを定量した。また、イソフラボン生合成、及び、アポプラストでのイソフラボン配糖体の加水分解酵素の遺伝子発現を real time RT PCR 法により解析した。

(4) 形質転換体を用いた有用物質生産

有用物質としてプレニル化フラボノイドに着目し、プレニル化フラボノイドの蓄積量を増加させるため、基質となるフラボノイド含量を増加させることを試みた。トマトではナリンゲニンカルコンが蓄積することから、これを基質となるナリンゲニンに変換するために、カルコンイソメラーゼを過剰発現することとした。

(5) プラスチドへの取り込み輸送の解析

無傷葉緑体を単離し、生化学的輸送解析を行うため、ダイズと同じマメ科植物であるエンドウ、及び、モデル植物のシロイヌナズナと同じアブラナ科植物のダイコン (カイワレ) を用いた。葉それぞれ約 40 g をポリトロンで破碎し、濾過した後、従来のパーコール不連続密度勾配遠心法によって、30% / 80% の界面に無傷葉緑体画分が得られた。カイワレ大根由来の無傷葉緑体画分については Pulse Amplitude Modulation によって無傷度が約 50% と求められた。

輸送活性測定法の確立のため RI 標識したアデニンをを用いてカイワレダイコン無傷葉緑体への取り込み実験を行った。

葉緑体懸濁液を ^3H -アデニンとインキュベーションし、次いで非ラベル体アデニン含有のバッファーで 2 度洗浄した後、残存した ^3H シグナルを取り込み活性として液体シンチレーションカウンターで定量した。RI 化合物として入手可能であったホモゲンチジン酸 (HGA) を用いた測定も行った。

4. 研究成果

(1) ダイズ ABCG 輸送体の解析

ダイズゲノムからフルサイズの ABCG 遺伝子を探索したところ、40 遺伝子が見いだされた。系統樹を作成した (図 1)。

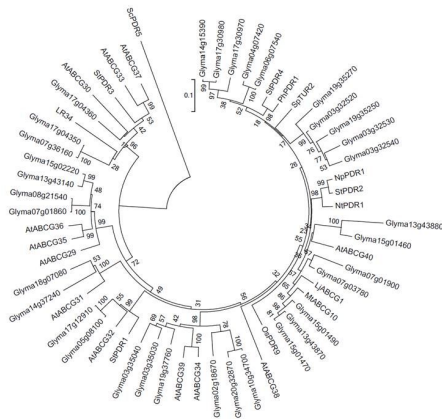


図1. ダイズフルサイズ ABCG タンパク質

ダイズゲノム中に見いだされた 40 分子種について、病原菌 (*Phytophthora sojae*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*) 感染条件、根粒菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) 感染、ホルモン処理、窒素欠乏条件において、RT-PCR 及びリアルタイム PCR により詳細な発現解析を行った。

その結果、ダイズファイトアレキシンであるグリセオリン誘導と同調的に発現する遺伝子やイソフラボン分泌の上昇する窒素欠乏条件で誘導される遺伝子が見出された。これらの遺伝子について全長 cDNA のクローニングと発現ベクター構築を行った。

発現ベクターが構築できた遺伝子について順次、異種発現系を用いた輸送解析を行っている。現在のところ、イソフラボン輸送活性の認められる遺伝子は得られていない。

(2) ミヤコグサを用いたフラボノイド輸送体の探索

二週齢のミヤコグサ無菌実生を用いて、植物ホルモンを中心とした処理を行い、*LjABCG1* の発現応答を解析した結果、*LjABCG1* の発現はメチルジャスモン酸で顕著に誘導された。MeJA に対する応答を詳細に解析するため、MeJA による *LjABCG1* の発現誘導の経時変化を real-time PCR で解析したところ、*LjABCG1* の発現上昇は、処理後 3 時間から認められ、48 時間まで高いレベルに保たれていた。さらに、*LjABCG1* 誘導に対する MeJA の濃度依存性を検討すると、*LjABCG1* の発現誘導は 1 μ M の低濃度 MeJA でも認められ濃度依存性を示した。シュートを MeJA で処理すると根粒形成が強く阻害される。地上部を MeJA で処理すると *LjABCG1* の発現は地上部で 10 ~ 20 倍程度上昇したが、根は最大 800 倍程度まで上昇し、顕著な発現誘導が起こった。

LjABCG1 の発現について詳細な空間的解析を行うため、*LjABCG1* の ORF の上流 2.0 kb をプロモーター領域として単離した。これにレ

ポーター遺伝子として GUS (-glucuronidase) を結合したコンストラクトを作成した。形質転換体に根粒菌 (*M. loti*) を感染させ、X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucuronic acid) による組織染色を行った。GUS 染色は根端と根の先端に近い領域 (若い組織) の中心柱で特異的に認められた。側根原基や側根においても GUS 染色が根端と中心柱で観察された。根粒における GUS 活性を調べると、染色は根粒原基や成熟過程の根粒において認められた。

LjABCG1 の細胞内局在性を明らかにするために、シヨ糖密度勾配遠心法によるミクロソームの分画を行った。*LjABCG1* は、細胞膜 H⁺-ATPase (W1C) の画分と一致し、液胞膜 H⁺-pyrophosphatase (AVP1) や ER 膜 BiP の分画パターンとは一致しなかった。さらに確かめるために、水性二層分配法を用いた細胞膜の分離精製を行った。ミクロソーム画分を 6.2% (w/w) Dextran T500-PEG 3350 により二層分離したところ、*LjABCG1* は細胞膜のマーカと同様に上層で検出された。

LjABCG1 に対するヘアピン RNA を CaMV35S プロモーターの下流で発現するミヤコグサを作出した。しかし、根粒形成や生育に影響は認められなかった。

LjABCG1 が *P. infestans* の侵入に対する抵抗性が欠損したシロイヌナズナの *atabcg36* 変異体を補完できるかを検定した。*LjABCG1* を変異体バックグラウンドで発現させ、*LjABCG1* を発現する T2 植物は感染アッセイに用いた。*P. infestans* を葉に接種し、トリパンブルー染色し、葉の細胞死および感染を観察した。*P. infestans* の感染菌糸は *LjABCG1/atabcg36* 形質転換体で観察されたが、頻度は有意に低下した。*ABCG36* はファイトアレキシンの輸送が示唆されていることから、*LjABCG1* がシロイヌナズナにおいてファイトアレキシンの輸送活性を部分的に相補した可能性が考えられる。

(3) ダイズイソフラボン分泌の解析

水耕条件においてエンレイ品種のダイズを水耕栽培し、各生育ステージ (VE, V3, V7, R4, R6) のダイズについて、24 時間中で水耕培地中に分泌されたイソフラボンを Sep-pak (C18) カラムに吸着させ、HPLC 解析を行った。分泌されるイソフラボンは、含量、組成ともに生育過程を通して大きく変動することが示された。ダイゼインが主要な分泌イソフラボノイドであり、特に栄養生長期で多く分泌した。また、生殖生長期にはマロニルダイジン及びダイジンの分泌量が増加した。

黒ダイズ及びエンレイを圃場で栽培し、黒ダイズを V1, V8, V11, R2, R6, R7 期に、エンレイを V1, V8, R3, R6, R7 期に葉及び根をサンプリングした。水耕栽培条件と同様に両品種とも、生育過程を通して含量、組成に

大きな変動はみられなかった。イソフラボン蓄積の形態は、エンレイにおいては全生育ステージを通してダイゼイン誘導体が主であった。

根においては黒ダイズ、エンレイともに、栄養生長期から生殖生長期への転換直後にアグリコンの含量が最大となった。イソフラボン蓄積形態は、全生育ステージを平均してみると、ダイゼイン誘導体がゲニステイン誘導体より黒ダイズでは約5倍、エンレイでは約4倍であった。

遺伝子発現を解析したところ *ICHG* について、黒ダイズでは栄養生長期で高く発現し、その後低下することが明らかとなったことから、圃場条件においても水耕栽培と同様に栄養成長期におけるイソフラボン分泌には *ICHG* を介した経路が重要な役割を担うことが示唆された。

(4) 形質転換体を用いた有用物質生産

カルコンイソメラーゼ(*CHI*)と *Naringenin* 8-Prenyltransferase (*N8DT*) をともに果実で発現するトマトを作出した。形質転換体の果実を用いて 8-dimethylallylnaringenin の含量を測定したところ、*CHI* と *N8DT* の両方を発現する形質転換体では、*N8DT* 単独で発現する形質転換体よりも 8-dimethylallylnaringenin の蓄積量は低下した。逆に *CHI* と *N8DT* の両方を発現する形質転換体では *Rutin* が 20 倍以上蓄積した。このことから中間体のプラスチックへの輸送が重要だと示唆された。

(5) プラスチックへの取り込み輸送の解析

アデニンがプロトンとの共輸送によってプラスチックに取り込まれることから、プロトン勾配消失剤 carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (*CCCP*) の効果を調べた。その結果、*CCCP* の添加により有意にアデニン取り込み量が減少した(図2)。この結果から、本項で立ち上げた輸送アッセイ系によって、従来報告されていたプロトンとの共輸送を検出できることが示された。

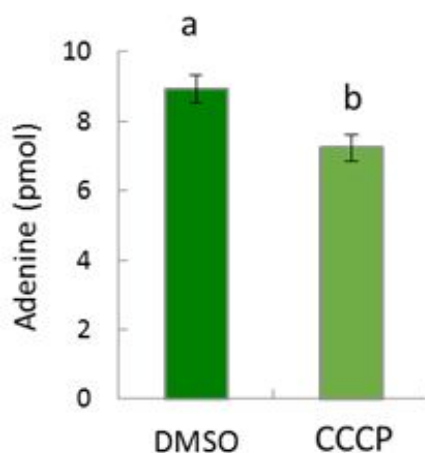


図2. プラスチックへのアデニン取り込み実験

さらに、アデニン取り込みのタイムコースを調べた結果、インキュベーション時間 10 分までで、アデニン取り込み量が増加する傾向が見られた。一方で、20 分のインキュベーション時間では、取り込み量が大きく減少した。これは長時間のインキュベーションにより葉緑体が破壊された可能性があると考え、今後のインキュベーション時間を 5 分とした。

なお、本項で構築した輸送アッセイ系は、従来の手法であるシリコンオイル濾過法と比較すると、洗浄までに時間がかかるため、バックグラウンドが高いという欠点があるものの、分散が小さいという利点があった。

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6件)

1. Takashi Kawasaki, Takao Koeduka, Akifumi Sugiyama, Kanako Sasaki, Philip J Linley, Nobukazu Shitan, Takuto Kumano, Hideaki Yamamoto, Hiroshi Ezura, Tomohisa Kuzuyama, Kazufumi Yazaki Metabolic engineering of flavonoids with prenyltransferase and chalcone isomerase genes in tomato fruits *Plant biotechnology* 31(5) 567-571 (2014) 査読有
<http://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.14.0918a>

2. Akifumi Sugiyama, Kazufumi Yazaki Flavonoids in plant rhizospheres: secretion, fate and their effects on biological communication *Plant biotechnology* 31(5) 431-443 (2014) 査読有
<http://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.14.0917a>

3 . Akifumi Sugiyama, Shoju Fukuda, Kojiro Takanashi, Miki Yoshioka, Hirofumi Yoshioka, Yoshihiro Narusaka, Mari Narusaka, Mikiko Kojima, Hitoshi Sakakibara, Nobukazu Shitan, Shusei Sato, Satoshi Tabata, Masayoshi Kawaguchi, Kazufumi Yazaki Molecular characterization of LjABCG1, an ATP-binding cassette protein in *Lotus japonicus* *PLoS One* 10(9) e0139127 (2015) 査読有
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139127>

4 . Akifumi Sugiyama, Yumi Yamazaki, Kazuaki Yamashita, Seiji Takahashi, Toru Nakayama, Kazufumi Yazaki Developmental and nutritional regulation of isoflavone secretion from soybean roots *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 80(1) 89-94 (2016) 査読有
<http://dx.doi.org/10.1080/09168451.2015.1062714>

5 . Papa Saliou Sarr, Akifumi Sugiyama, Aime Didier Boyogueno Begoude, Kazufumi Yazaki, Shigeru Araki, Eiji Nawata Molecular assessment of the bacterial community associated with Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivation in Cameroon *Microbiological Research* 197:22-28 (2017) 査読有
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.12.011>

6 . Akifumi Sugiyama, Yuka Saida, Mayuko Yoshimizu, Kojiro Takanashi, Davide Sosso, Wolf B Frommer, Kazufumi Yazaki Molecular Characterization of LjSWEET3, a Sugar Transporter in Nodules of *Lotus japonicus* *Plant and Cell Physiology* 58(2) 298-306 (2017) 査読有
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcw190>

〔学会発表〕(計8件)

杉山暁史、上田義勝、小野愛、吉川正巳、高瀬尚文、矢崎一史「ダイズの生育過程における根のフラボノイド及び根圏微生物叢の変動」第24回植物微生物研究会、2014年9月19日、佐賀市

杉山暁史「ダイズ圃場での根圏微生物と植物フラボノイドの解析」第8回ダイズ研究会、2015年3月7日、盛岡市

山崎由実、杉山暁史、高瀬尚文、矢崎一史「圃場栽培ダイズにおける生育過程を通じたフラボノイドの分泌及び動態の解析」第25回植物微生物研究交流会、2015年9月

15日、つくば市

山崎由実、杉山暁史、高瀬尚文、矢崎一史「圃場環境下のダイズにおける生育過程を通じたフラボノイドの含量、分泌及び動態の解析」第57回日本植物生理学会年会、2016年3月20日、盛岡市

Ryosuke Munakata, Tomoya Takemura, Sakihito Kitajima, Toki Taira, Akifumi Sugiyama, Kazufumi Yazaki "Molecular evolution and function of plant-derived prenyltransferases for polyphenols" 11th national meeting of the SFBV, July 7, 2016, Angers, France

棟方涼介、杉山暁史、矢崎一史「プラスチック・トコフェロール生合成におけるフェノール性中間体のプラスチック内向き輸送体の生化学的解析」第34回日本植物細胞分子生物学会大会、2016年9月2日、上田市

杉山暁史、山崎由実、濱本昌一郎、高瀬尚文、矢崎一史「ダイズ根からのイソフラボン分泌と根圏での動態」植物微生物研究会第26回交流会、2016年9月7日、仙台市

棟方涼介、杉山暁史、矢崎一史「プラスチック・トコフェロール生合成におけるフェノール性中間体のプラスチック取り込み輸送体の探索」日本農芸化学会2017年度大会、2017年3月19日、京都市

〔図書〕

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rish.kyoto-u.ac.jp/lpge/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

杉山暁史 (SUGIYAMA, Akifumi)
京都大学・生存圏研究所・准教授
研究者番号：20598601