

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05711

研究課題名(和文)狭波長LED照射に応答する植物メタボロームのデジタルケミカルマッピング

研究課題名(英文) Digital chemical mapping by treatment of narrow-band LED light in the plant metabolome

研究代表者

草野 都 (Kusano, Miyako)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：60415148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物は光の過剰エネルギーおよび光質の違いを感知し、多種多様な防御物質を含む二次代謝物を生産する。本研究では、様々な光環境下で量的・質的に変化する代謝物「作り分け」を決定する生合成経路上の鍵酵素反応ステップの推定方法開発に取り組んだ。その中で、実測データを得るのに困難なUV-B照射により蓄積する二次代謝物、特にシロイヌナズナが生産するアントシアニンに着目し、量子化学計算によるUV-visスペクトル予測を行った。その結果、各化合物における紫外可視吸収極大波長の実測値を十分予測可能であることが判明した。よって、本手法は植物二次代謝物の化合物情報が入手できれば簡便に物性予測が可能であると結論付けた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、様々な環境下で生育する植物の生存戦略のひとつである多様な二次代謝物の「作り分け」のしくみを、量子化学計算による構造安定性から迫る初の試みである。現状では、代謝研究において化合物の実測値を文献検索や実際に測定して得ることは困難な作業となる。本研究はこの問題を解決するため、ab initio計算によりUV照射時に蓄積する二次代謝物のUV-visスペクトルを実測値と遜色なく予測することができた。本結果は、代謝物の安定性等、その化合物が有する物性値について、実測値に頼らず得ることができる成果である。本法の応用により、多様な生合成経路の解明に繋がるのではと考えている。

研究成果の概要(英文)：Plant secondary metabolites have large chemical diversities. However, information of physicochemical properties of these compounds can be obtained by referring articles or measurement of target compounds. As it takes time due to curating published papers as well as quantifying target compounds, novel computational methods is required for predicting compounds' properties to shorten time with high accuracy. We developed the novel method for improving accuracy of spectroscopic data of secondary metabolites in Arabidopsis predicted by quantum chemical calculation. In this study, we focused on defense metabolites produced by Arabidopsis, in particular anthocyanins, accumulated by UV-B irradiation. By quantum chemical calculation of the 19 metabolites, we favorably predicted UV-vis spectra. Therefore, the high-resolution prediction method may contribute to shed light on complex biosynthetic pathways in plants.

研究分野：メタボロミクス

キーワード：量子化学計算 植物 シロイヌナズナ 二次代謝物

### 1. 研究開始当初の背景

植物は光の過剰エネルギーおよび光質の違いを感知し、多種多様な防御物質を含む二次代謝物を生産する。研究代表者らはこれまでに、モデル植物であるシロイヌナズナを中心に UV-B 照射や狭波長 LED パネルによる異なる光質処理等の非生物的ストレス処理に応答して変化する代謝物およびその生合成経路について研究を行ってきた (Kusano, et al, Plant J, 2011; Fukushima, et al, Front Plant Sci, 2018; Kitazaki, et al, Sci Rep, 2018)。本取組の中で、メタボロームをひとつの表現型と考え、光質の違いで引き起こされる代謝物の量的・質的变化を我々のメタボローム解析技術により解析した結果、光質変化による代謝物の「作り分け」の軌跡を見出すことに成功した。しかし、このような「作り分け」を決定する生合成経路上の鍵酵素反応ステップの推定方法開発には至っていないのが現状である。

### 2. 研究の目的

植物ホルモンやヒトの健康等に役立つ有用二次代謝物の生合成経路の解明には、主に化合物中間体の予測、その修飾様式から各生合成反応を触媒する酵素の推定、および本酵素をコードする遺伝子を同定する手法が適用される。そこで本研究では、生合成経路に属する代謝物を基質と生産物の連鎖として考え、代謝物の化合物構造の物理化学的性質(物性)の違いに着目することにより、各代謝物の物性情報に基づく生合成経路予測を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、シロイヌナズナに UV-B や青色光照射により顕著に変化することが明らかになっている二次代謝物 6 種類 (sinapic acid, kaempferol, cyanidin, quercetin, アントシアニン A3 およびアントシアニン A11) における量子化学計算を行い、計算値と実測値の精度評価を行った。次に、フェニルプロパノイド生合成経路に属する二次代謝物の中でも、特にシロイヌナズナが UV-B 照射時に量的変化を示すアントシアニン 11 種 (A1-A11) に着目した。これらの物性値を量子化学計算により求め、計算により求めた UV-vis スペクトルの吸光度と吸収波長を実測値と比較した。さらに、A1-A11 が示す溶媒効果についても検討した。なお、全ての計算には MOPAC プログラムを用いた。作成した初期構造について、PM3 法 (Parametric Method 3) を用いて最適化を行った。

また、アントシアニンと並び高い抗酸化活性を有するカロテノイドについてマイクロプレートリーダーを用い、トマト 157 品種の果実に含まれるリコペンおよび総カロテノイド量を定量した。その結果から 8 代表品種 (Ailsa Craig, Bear Creek, Chocolate Cherry, Dixie Golden Giant, Green Gage, Green Zebra, Lemon Drop および Poiré Jaune) を選抜し、LC-PDA によるカロテノイドの定量分析を行った。

### 4. 研究成果

#### 【量子化学計算による 6 種類の二次代謝物の物性値予測】

半経験的分子軌道計算手法により、sinapic acid, kaempferol, cyanidin-3-glucoside, quercetin, アントシアニン A3 およびアントシアニン A11 の化学構造の最適化を行った。その結果、sinapic acid, kaempferol, quercetin はフェノール基に対してほぼ平面構造となるのに対し、cyanidin-3-glucoside はナフチル基とカテコール基が約 30° 回転した構造を取ることが明らかとなった。また、A3 および A11 はこれらの置換基がアントシアニン骨格に覆いかぶさる構造となった (図 1)。

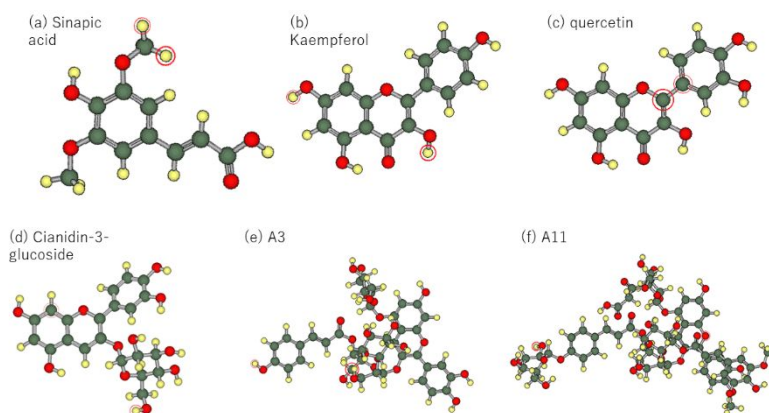


図 1. PM3 法により最適化した二次代謝物の分子構造

次に、この最適化構造を用いて物性予測値を得た。さらに、独自の補正を加えることによって求めた UV スペクトルの吸収極大値を文献の実測値と比較した。その結果、両者は高い相関を示したことから、本研究で開発した手法は多大な計算能力を必要とせず、各化合物における紫外可視吸収極大波長の実測値を十分予測可能であることが判明した (図 2)。よって、本手法は植物二次代謝物の化合物情報が入手できれば簡便に物性予測が可能であると結論付けた。本研究成果は J Comp Chem J に報告した (Kuwahata, et al, J Comp Chem J, 2019)。

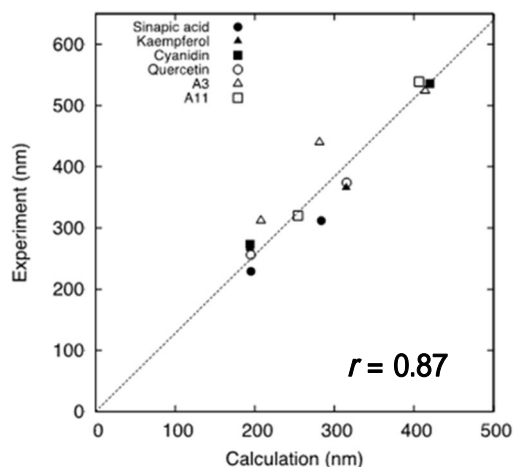


図 2. 量子化学計算で求めた物性予測値と実測値の相関解析 (Kuwahata, et al, J Comp Chem J, 2019) より抜粋

### 【量子化学計算による A1-A11 の物性値評価】

植物が生産するアントシアニンには抗酸化活性をもつものが多く、UV 照射等のストレス時に高蓄積することが知られている。しかし、ストレス条件下においてどの分子種が最も多く蓄積するか、またそれが UV-vis スペクトルにおいてどの程度の吸収波長および吸収強度を示すか、実際に測定もしくは文献による検索することは困難な作業である。シロイヌナズナは 11 種のアントシアニンを生合成する能力を持つが (図 3)、それらを常に検出することは不可能である。この問題を解決するため、*ab initio* 計算により A1 から A11 の UV-vis スペクトルを予測した。その結果、実測値と比較して 4 パターンの化学修飾による UV-vis スペクトル変化を十分予測可能であることを見いだした (未発表データ)。さらに、置換パターンによる溶媒効果を検証したところ、グルコシル化により溶媒和自由エネルギーが最も低くなる一方、シナポイル化により溶媒和自由エネルギーは高くなることが明らかとなった (未発表データ)。

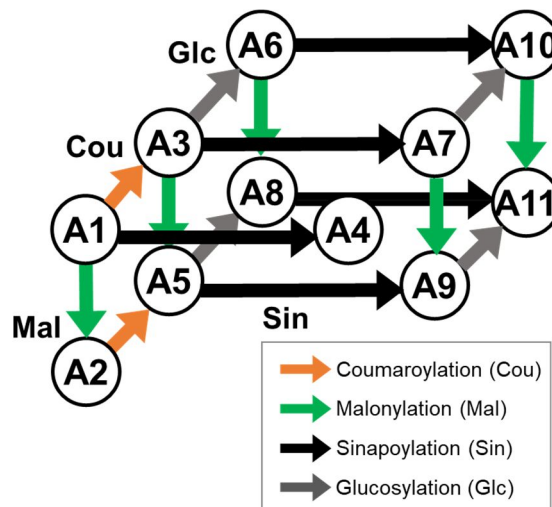


図 3. A1-A11 の生合成経路と化学修飾パターン

### 【簡便かつ高速スクリーニング法によるカロテノイド類の多様性検証】

カロテノイドはアントシアニンと並び高い抗酸化活性を示すことが知られている。また、カロテノイドの化学構造は共役系 2 重結合を含んでいるため、特徴的な UV-vis スペクトルを示す。また、脂溶性色素としてトマトをはじめとする果実等に多く含まれることが知られている。そこで、カロテノイドの構造多様性に着目し、マイクロプレートリーダーを用いたトマト 157 品種に含まれるカロテノイドの簡便かつ高速スクリーニング法を開発した。本法を用いてトマト特異的なカロテノイドであるリコペンおよび総カロテノイド量を定量した結果、トマト品種の違いによりリコペンおよび総カロテノイド量は多様性があることを明らかにした。さらに、代表品種について、LC-PDA による詳細解析を行った。その結果、黄色を呈する Dixie Golden Giant では polycopene を高蓄積する一方、同じく黄色を呈する Lemon Drop および Poire Jaune には検出されなかった (図 4)。このことから、果実の色だけでは判断できないカロテノイド生産の多様性を示すことができた。本研究成果は Metabolites に報告した (Aono, et al, Metabolites, 2021)。

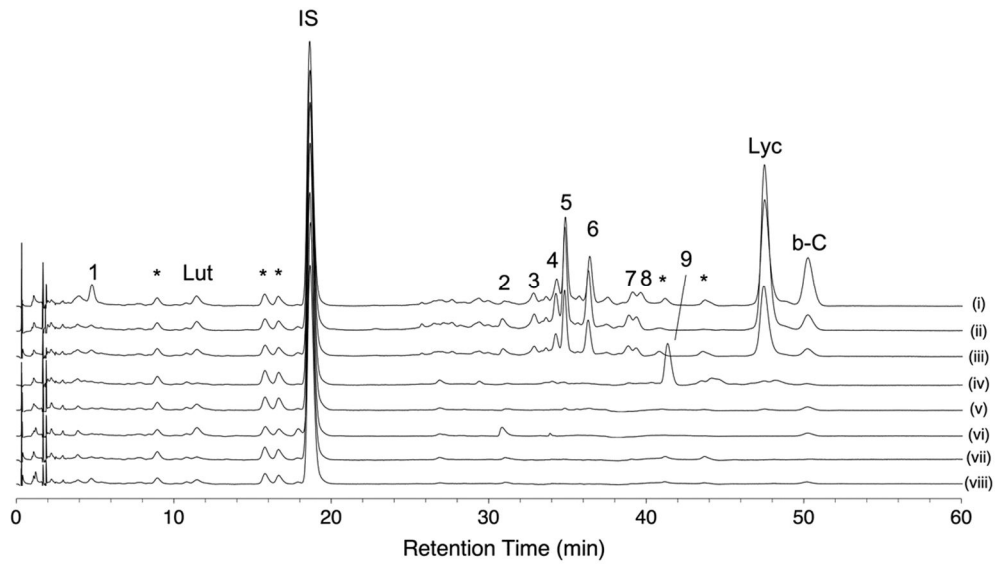


図 4. 8 種類の代表品種における LC-PDA スペクトル (Aono, et al, Metabolites; 2021) より抜粋  
 ‘Ailsa Craig’ (i), ‘Bear Creek’ (ii), ‘Chocolate Cherry’ (iii), ‘Dixie Golden Giant’ (iv), ‘Green Gage’  
 (v), ‘Green Zebra’ (vi), ‘Lemon Drop (vii) および ‘Poire Jaune’ (viii) の 450 nm におけるスペクトルを  
 示す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 KUWAHATA Kazuaki, SAKUMA Yui, KAWASHIMA Yukio, FUKUSHIMA Atsushi, NAGASHIMA Umpei, KUSANO Miyako, TACHIKAWA Masanori	4. 巻 18
2. 論文標題 Application of Quantum Chemical Calculation for Prediction of Ultraviolet-vis Spectrum of Plant Self-protective Metabolites Produced by UV-B Irradiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Computer Chemistry, Japan	6. 最初と最後の頁 108 ~ 114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2477/jccj.2019-0002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 神谷 健、草野 都、福島 敦史	4. 巻 37
2. 論文標題 メタボロームデータ解析および解釈に資する可視化手法	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本化学会情報化学部会誌	6. 最初と最後の頁 72 ~
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11546/cicsj.37.72	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aono Yusuke, Asikin Yonathan, Wang Ning, Tieman Denise, Klee Harry, Kusano Miyako	4. 巻 11
2. 論文標題 High-Throughput Chlorophyll and Carotenoid Profiling Reveals Positive Associations with Sugar and Apocarotenoid Volatile Content in Fruits of Tomato Varieties in Modern and Wild Accessions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 398 ~ 398
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/metabo11060398	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 桑畑 和明, 福島 敦史, 長嶋 雲兵, 草野 都, 立川 仁典
2. 発表標題 植物が生産するUV-B防御物質に対する光吸収スペクトルの理論計算
3. 学会等名 第13回メタボロームシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青野佑亮, Yonathan Asikin, 王寧, Denise Tieman, Harry Klee, 草野都
2. 発表標題 脂溶性色素迅速測定法によるトマト品種の大規模スクリーニング
3. 学会等名 第13回メタボロ ムシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青野佑亮, Yonathan Asikin, 王寧, Denise Tieman, Harry Klee, 草野都
2. 発表標題 カロテノイド由来香氣成分の制御機構解明を目指した統合メタボローム解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青野 佑亮, Yonathan Asikin, 王 寧, Denise Tieman, Harry Klee, 草野 都
2. 発表標題 栽培・野生トマト果実中の色素含量が糖およびアポカロテノイド香氣成分蓄積に与える影響
3. 学会等名 第38回日本植物バイオテクノロジー学会(つくば)大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青野 佑亮, Yonathan Asikin, 王 寧, Denise Tieman, Harry Klee, 草野 都
2. 発表標題 栽培種・野生種トマト果実中の色素および食味成分統合解析による品種評価
3. 学会等名 第15回メタボロ ムシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Aono Yusuke, Asikin Yonathan, Wang Ning, Klee Harry, Kusano Miyako
2. 発表標題 Large-scale screening of carotenoid and chlorophyll content in tomato cultivars by using the simple, rapid and quantitative method
3. 学会等名 The 15th International conference of the Metabolomics Society (Metabolomics 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	立川 仁典 (Tachikawa Masanori)  (00267410)	横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・教授  (22701)	
研究分担者	青木 裕一 (Aoki Yuichi)  (40747599)	東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・助教  (11301)	
研究分担者	福島 敦史 (Fukushima Atsushi)  (80415281)	京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授  (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------