

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 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21310135

研究課題名（和文） 代謝酵素複合体形成を介する花色発現・制御の解析

研究課題名（英文） Analysis of flower coloration and control mediated by multi-enzyme complexes

研究代表者

中山 亨（NAKAYAMA TORU）

東北大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：80268523

研究成果の概要（和文）：キンギョソウの花色発現に関わるフラボノイド（アントシアニン・フラボン・オーロン）生合成関連酵素間の相互作用を酵母ツーハイブリッド法や Bimolecular fluorescence complementation 法などの各種の方法で解析した。その結果、キンギョソウ花弁細胞内でフラボンとアントシアニンの生合成酵素群が代謝酵素複合体を形成し、オーロン生合成関連酵素と空間的かつ機能的に仕分けられていることが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：I have clarified that, in snapdragon petal cell, enzymes that are related to biosynthesis of flavones and anthocyanins form multi-enzyme complexes, which are spatially and functionally separated from enzymes related to aurone biosynthesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2010 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2011 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：分子生物学

キーワード：メタボロン，フラボノイド，酵素間相互作用，キンギョソウ，フラボン，アントシアニン，オーロン

1. 研究開始当初の背景

モデル植物シロイヌナズナが白い花しかつけないのとは対照的に、キンギョソウはクリーム、マゼンタ、ピンク、オレンジ、黄色、アイボリー、白、あるいはそれらの複合といった多彩な花色を示す。キンギョソウのこうした多彩な花色はフラボノイドに起因

し、このうち赤系統の色はアントシアニンに、白系統の色はフラボンやフラボノールに、また黄色はオーロンやカルコンに起因する。すなわち、キンギョソウ花弁は多種多様なフラボノイドを生成するポテンシャルをもち、それが遺伝的に制御されることによって、上述の多彩な花色を発現するといえる。こうしたことからキンギョソウのフラボノイド生合

成経路は、古くから、遺伝学者、花卉園芸学者、植物生化学者の注目を集め、その遺伝生化学的な研究の成果は、植物フラボノイド生合成全体の研究の中でも特に重要な位置を占めてきた。

植物フラボノイド生合成経路のなかで、フラボン・フラボノール・アントシアニン生合成に関わる酵素遺伝子群は、キンギョソウの遺伝子を中心に 1990 年代の終わり頃までに取得され、フラボノイド生合成経路の植物界における共通性も明らかになった。さらに 1999 年になると、シロイヌナズナのフラボノイドの生合成酵素群が細胞内の小胞体上で代謝複合体（メタボロン）を形成していることが示された。それ以来、植物フラボノイド生合成では一般にメタボロンの形成によって代謝の円滑化が図られていると信じられるようになった。この仮説は非常に興味深いものであるが、代謝複合体形成の普遍性やその意義についてはほとんど検証されていない。

一方、黄色フラボノイド オーロンは、キンギョソウを含むごく限られた植物種にしか含まれないため、その生成機構は長い間謎のままであった。われわれは世界で初めて黄色キンギョソウのオーロン合成酵素（AS）を同定し（*Science* **290**, 1163-1166 (2000)）、オーロン生合成における前駆体（カルコン）のグルコシル化酵素（C4' GT）の重要性も示すことにより、オーロン生合成経路を確立した（*PNAS* **103**, 11075-11080 (2006)；*Plant J.* **45**, 133-143 (2006)）。

キンギョソウの花弁のフラボノイド代謝には、niv 劣性白色花を除き、品種を問わず共通した特徴が認められる。すなわち、花弁細胞中では、例外なく、ごく小さなつぼみの段階からフラボン生成系遺伝子群が強く発現し、フラボン配糖体が高蓄積しており、また完全に開花した花にはオーロンも必ず含まれる。黄色い品種（イエローバタフライ）において、オーロンを効率よく蓄積させて花を黄色にするためには、フラボン生合成の代謝の太い流れに逆らって、前駆体カルコンを横取りしてオーロン生成系に仕向けなければならないように見える。赤色系の花弁でもこのことは同様であり、デフォルトのフラボン生合成系から代謝経路をアントシアニン生合成に横流しするような仕組みが存在することが強く示唆される。しかしながら、こうした花色発現のメカニズムを、フラボノイド生合成における代謝酵素のダイナミクスの観点から、タンパク質レベルで合理的に説明しようとする試みはなかった。

2. 研究の目的

本研究では、上述のような示唆に富んだ

数々の観察結果を足がかりにして、キンギョソウのフラボノイド生合成酵素間の相互作用の詳細な解析を通じて、花色の発現・制御機構としての代謝複合体形成の重要性を立証することを目的とする。これまで花色発現の戦略は、もっぱら生合成酵素や転写制御因子の遺伝子発現の変化により議論されてきたが、「代謝複合体形成」というポストトランスレーショナルな仕組みも花色発現に重要な役割を果たしていることを実証する。

3. 研究の方法

(1) オーロン前駆体提供経路の検討

オーロンの生合成の前駆体として作用するペンタヒドロキシカルコン（PHC）について、PHCがカフェオイルCoAとマロニルCoAからde novoに合成される可能性が考えられた。オーロン生合成にメタボロンの形成が関わる可能性を考慮する場合には、カフェオイルCoA生合成系の酵素がその構成要素となる可能性も考える必要がある。この点を最初に検証しておくことは、今後の本研究課題全体の基盤を構築する上でも重要であると考えられた。

そこでカフェオイルCoAの生合成に必須であると考えられるヒドロキシシンナモイルトランスフェラーゼ（HCT）とシンナメート3-ヒドロキシラーゼ（C3H）のcDNAをキンギョソウ花弁から単離した。HCTについては、キンギョソウ花弁のESTデータベースからタバコのHCTと配列類似性の高いESTを検索した。このEST配列をプローブにして黄色キンギョソウ花弁のcDNAライブラリーからブランクハイブリダイゼーションにより候補遺伝子を取得した。一方、C3HについてはゴマのCYP98A20 cDNAをプローブにして黄色キンギョソウ花弁のcDNAライブラリーからブランクハイブリダイゼーションにより候補遺伝子を取得した。

HCT 遺伝子を大腸菌の菌体内に異種発現させ、形質転換体の細胞抽出液を調製して酵素活性を高速液体クロマトグラフィーによって評価した。一方、C3H 遺伝子についてはメタノール酵母のゲノムに組み込んでメタノール添加により誘導発現させた。酵母組換え体のマイクロソーム画分を調製して酵素活性を調べた。

活性が確認できた HCT と C3H 遺伝子について、キンギョソウにおける組織別発現を逆転写リアルタイム定量 PCR により調べた。

(2) 生合成酵素の小胞体局在性

これまでの知見によれば、メタボロンは、膜タンパク質であるシトクロム P450 を核にしてこれに可溶性酵素や膜酵素が会合することにより、小胞体の細胞質側表面に形成されることが多いと考えられる。そこで、可溶性の酵素であるカルコン合成酵素（CHS）、カ

ルコンイソメラーゼ (CHI), カルコン 4' グルコシルトランスフェラーゼ (C4' GT) およびオーロン合成酵素 (AS) の小胞体局在性を調べた。それぞれのタンパク質を用いてウサギを免疫し、それぞれに特異的なポリクローナル抗体を含む抗血清を調製した。抗血清から IgG 画分を調製した。

キンギョソウ花卉の細胞破碎液から超遠心によって可溶性画分とミクロソーム画分を調製した。各画分について、各酵素に対する IgG 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、各酵素の存在を検出した。

(3) 酵母ツーハイブリッドシステム

CHS と C4' GT, CHS と CHI, および C4' GT と CHI との間の相互作用について、市販のキット (Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System) をもちいて検索した。

(4) スプリットユビキチンシステムを用いたタンパク質間相互作用解析

前述のように、メタボロンは、膜タンパク質であるシトクロム P450 を核にしてこれに可溶性酵素や膜酵素が会合することにより、小胞体の細胞質側表面に形成されることが多い。そこで、フラボノイド合成経路におけるシトクロム P450 としてフラボン合成酵素 (FNS) およびフラボノイド 3'-水酸化酵素 (F3' H) を取り上げ、これらと他のフラボノイド合成酵素および関連タンパク質 (CHS, CHI, C4' GT, F3H, DFR, C3H, HCT) との相互作用を、スプリットユビキチンシステムを用いて検索した。この検索は市販のキット (DUALmembrane システム) 用いて行った。興味ある可溶性タンパク質どうしの相互作用についても同キットを用いて検索した。

(5) Bimolecular fluorescence complementation (BiFC)

上述のタンパク質間相互作用解析において相互作用が示唆された酵素タンパク質のペアについて、さらに植物細胞内環境での相互作用の存在を確認するため、BiFC 法による相互作用解析を行った。この方法の実施に必要な発現コンストラクトは、島根大学の中川強博士のご厚意により分与いただいた。宿主としてはタマネギの表皮細胞およびタバコの葉の細胞を用いた。

4. 研究成果

(1) オーロン前駆体提供経路の検討

カフェオイルCoAの生合成に必須であると考えられるヒドロキシシナモイルトランスフェラーゼ (HCT) とシナメート3-ヒドロキシラーゼ (C3H) のcDNAをキンギョソウ花卉から単離した。これらの酵素は、キンギョソウ

におけるオーロンの主要な前駆体ペンタヒドロキシカルコンの前駆体の一つカフェオイルCoAを供給する重要酵素である可能性があり、AmC4' GTとともにオーロン生合成に特化した代謝複合体を形成する可能性が考えられる。

HCTについて、キンギョソウ花卉のESTデータベースからタバコのHCTと配列類似性の高いESTを検索した。このEST配列をプローブにして黄色キンギョソウ花卉のcDNAライブラリーからブランクハイブリダイゼーションにより2種類の候補遺伝子を取得した。一方、C3HについてはゴマのCYP98A20 cDNAをプローブにして黄色キンギョソウ花卉のcDNAライブラリーからブランクハイブリダイゼーションにより8種類の候補遺伝子を取得した。

HCT遺伝子を大腸菌の菌体内に異種発現させ、形質転換体の細胞抽出液を調製して酵素活性を高速液体クロマトグラフィーによって評価した。活性評価の結果、HCTはp-クマロイルCoAをアシル基供与体、シキミ酸をアシル基受容体としてp-クマロイル基の転移を触媒し、p-クマロイルシキメートを生成した。キナ酸もアシル基受容体として作用したが、シキミ酸の方がより良好な受容体であった。同酵素はまたp-クマロイルシキメートをアシル基供与体、CoAをアシル基受容体とし、p-クマロイルCoAを生成する能力も持っていた。AmHCT1について速度論パラメータを求めた。p-クマロイルCoAアシル基供与体としたときの両方向の反応の速度論量を比較したところ、この酵素はシキミ酸をより良好なアシル基受容体として利用することがわかった。

一方、C3H遺伝子についてはメタノール酵母のゲノムに組み込んでメタノール添加により誘導発現させた。酵母組換え体のミクロソーム画分を調製して酵素活性を調べたところ、ひとつに酵素活性が認められ、p-クマロイルシキミ酸を基質とした場合にNADPH依存的に反応生成物を与え、この分子量はカフェオイルシキミ酸のものと同じであった。

以上の結果から、キンギョソウにおけるカフェオイルCoAの供給系が次のように推定された。p-クマロイルCoAをアシル基供与体、シキミ酸をアシル基受容体としてHCTの作用によりp-クマロイルシキメートが生成し、これにC3Hが作用してカフェオイルシキメートを生成する。次いでカフェオイルシキメートをアシル基供与体、CoAをアシル基受容体としてHCTの作用によりカフェオイルCoAが生成する。当初のわれわれの仮説によれば、カフェオイルCoAはマロニルCoAとともにカルコン合成酵素 (CHS) の基質となってペンタヒドロキシカルコンを生成する。ペンタヒドロキシカルコンはAmC4' GTの作用により配糖体となり液胞に運ばれ、そこでオーロン配糖体に変換される。

活性が確認できたHCTとC3H遺伝子について

，キンギョソウの組織別発現を調べた。その結果，両遺伝子は花卉の分化の初期から発現し，分化とともに漸減するが，完全に開花した花で最大となった。また根・茎・葉にも発現が認められた。一般にこれらの遺伝子は，これまで多くの植物においてリグニン生合成との関連で発現解析がなされ，茎や根での発現が高く，花卉での発現はほとんど検出されない場合がほとんどである。キンギョソウではこれらの遺伝子が花卉でも有意に発現しており，リグニン生合成とPHC合成の両方に寄与している可能性も示唆されたが，花色発現への寄与に関し，今後さらに別の証拠を探索する必要がある。

(2) 生合成酵素の小胞体局在性

キンギョソウ花卉細胞中でのフラボノイド生合成酵素間の相互作用をさまざまな角度から詳細に解析するための第1歩として，フラボノイド生合成における基幹的役割を果たすカルコン合成酵素 (CHS)，カルコンイソメラーゼ (CHI)，カルコン4' グルコシルトランスフェラーゼ (C4' GT) およびオーロン合成酵素 (AS) について，その小胞体局在性を解析した。キンギョソウ花卉の細胞破碎液からミクロソーム画分と可溶性画分を調製し，ウエスタンブロッティングにて各画分における酵素の存在を解析した。その結果，CHS，CHI，C4' GTは両画分に存在するが，ASは可溶性 (液胞) にのみ存在することがわかった。

(3) 酵母ツーハイブリッドシステム

オーロンが効率よく生成するためにはオーロン生成系の初発酵素である C4' GT が CHS と相互作用する必要があると考えられたため，CHS との相互作用を酵母ツーハイブリッドシステムにより検索した。CHS と CHI，および C4' GT と CHI との間の相互作用についても同様に調べた。その結果，CHS は C4' GT と相互作用できないことがわかった。CHS と CHI，および C4' GT と CHI との間にも相互作用は認められなかった。

(4) スプリットユビキチンシステムを用いたタンパク質間相互作用解析

スプリットユビキチンシステムを用いて，FNS および F3' H に対して，他のフラボノイド生合成酵素および関連タンパク質が会合するか否かを検索したところ，FNS には CHS，CHI，DFR が，また F3' H には CHI が相互作用することがわかった。また，CHI と DFR の間にも相互作用があることがわかった (図1)。また，フラボノイド代謝をオーロン生合成へと仕向ける C4' GT は，今回調べたいかなる酵素タンパク質とも相互作用しなかった。

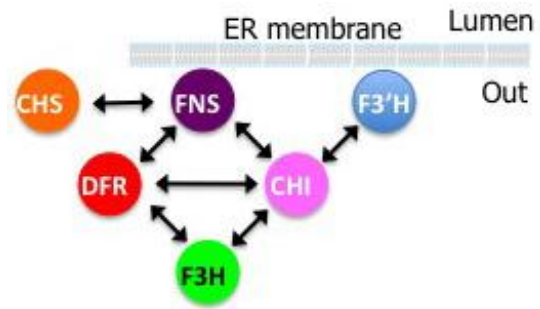


図1：スプリットユビキチン法の結果から強く示唆された酵素間相互作用

(5) BiFC 法による相互作用解析

植物細胞内環境での相互作用の存在を確認するため BiFC 法による相互作用解析を実施した。その結果，FNS と CHI，FNS と DFR，CHI と DFR の間に，明らかな相互作用が確認された。

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9件)

- ① Yoo, D.C., Hara, T., Fujita, N., Waki, T., Noguchi, A., Takahashi, S., Nakayama, T.: Transcription analyses of GmICHG, a gene coding for a β -glucosidase that catalyzes the specific hydrolysis of isoflavone conjugates in *Glycine max* (L.) Merr. **Plant Sci.** 208 (2013) 10–19.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.03.006> 査読あり
- ② Nair, A., Kuwahara, A. Nagase, A. Yamaguchi, H. Yamazaki, T., Hosoya, M., Omura, A., Kiyomoto, K., Yamaguchi, M., Shimoyama, T., Takahashi, S., and Nakayama, T.: Purification, gene cloning, and biochemical characterization of a β -glucosidase capable of hydrolyzing sesaminol triglucoside from *Paenibacillus* sp. KB0549. **PLOS ONE** 8 (2013) e60538.
doi:10.1371/journal.pone.0060538 査読あり
- ③ Mizohata, E., Okuda, T., Hatanaka, S., Nakayama, T., Horikawa, M., Nakayama, T., Ono, E., and Inoue, T.: Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of UDP-glucuronic acid : flavonol-3-O-glucuronosyltransferase (VvGT5) from the grapevine *Vitis vinifera*. **Acta Cryst.** F69 (2013) 65–68.
doi:10.1107/S1744309112045095 査読あり
- ④ 中山 亨*・兪 東燦・高橋 征司：メタボロン…植物二次代謝工学におけるインパクト。生物工学 90 (2012) 576-581.
doiコードなし 査読なし

- ⑤ Iwakiri, T., Imai, H., Hamada H., Nakayama, T. and Ozaki, S.: Synthesis of 3,5,3',4'-tetrahydroxy- *trans*-stilbene-4'-O- β -D-glucopyranoside by glucosyltransferases from *Phytolacca Americana* **Nat. Prod. Commun.**, **8** (2012) 119-120. doiコードなし 査読あり
- ⑥ Liu, J., Asano, Y., Ikoma, K., Yamashita, S., Hirose, Y., Shimoyama, T., Takahashi, S., Nakayama, T. and Nishino, T.: Purification, characterization, and primary structure of a novel *N*-acyl-D-amino acid amidohydrolase from *Microbacterium natoriense* TNJL143-2. **J. Biosci. Bioengin.** **114** (2012) 391-397. doi:10.1016/j.jbiosc.2012.05.015 査読あり
- ⑦ Ono, E., Homma, Y., Horikawa, M., Kunikane-Doi, S., Imai, H., Takahashi, S., Kawai, Y., Ishiguro, M., Fukui, Y., Nakayama, T.: Functional Differentiation of the Glycosyltransferases That Contribute to the Chemical Diversity of Bioactive Flavonol Glycosides in Grapevines. **Plant Cell** **22** (2010) 2856-2871. www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.110.074625 査読あり
- ⑧ Unno, H., Yamashita, S., Ikeda, Y., Sekiguchi, S., Yoshida, N., Yoshimura, T., Kusunoki, M., Nakayama, T., Nishino, T., Hemmi, H.: New role of flavin as a general acid-base catalyst with no dedox function in type 2 isopentenyl-diphosphate isomerase. **J. Biol. Chem.** **284** (2009) 9160-9167. doi: 10.1074/jbc.M808438200 査読あり
- ⑨ Noguchi, A., Horikawa, M., Fukui, Y., Fukuchi-Mizutani, M., Iuchi-Okada, A., Ishiguro, M., Kiso, Y., Nakayama, T., Ono, E.: Local differentiation of sugar donor specificity of flavonoid glycosyltransferase in Lamiales. **Plant Cell** **21** (2009) 1556-1572. www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.108.063826 査読あり
- ⑩ Ido配糖体の生合成に関わる糖転移酵素 (GT)の機能進化. 第426回ビタミンB研究協議会 2011年11月5日 大津 (ピアザ淡海)
- ④ 中山 亨 キンギョソウにおける花色発現の代謝戦略. 日本生化学会シンポジウム「植物の高次機能を司る機能性低分子化合物」2011年9月23日 京都国際会館
- ⑤ 中山 亨 ダイズイソフラボン生合成酵素群にみられるユニークな代謝と酵素 日本農芸化学会シンポジウム「多様な生物に見られるユニークな代謝と酵素: 機能・進化解析と応用への展望」2011年3月25日 京都女子大学 (京都市)
- ⑥ 中山 亨 植物グリコシルトランスフェラーゼの機能進化. 日本農芸化学会シンポジウム「酵素・タンパク質のユニークな活性調節機構と機能発現の新展開」2010年3月30日 東京大学 (東京)
- ⑦ 中山 亨 黄色い花もいかが? ~酵素ハンティングと花色変化~ 日本化学会東北支部地区講演会「バイオで開く21世紀の科学」2009年11月26日 山形大学 (山形市)
- ⑧ Nakayama, T. Comparative biochemistry of plant glucuronosyltransferases. Italy-Japan Symposium: New Trends in Enzyme Science and Technology. 2009年10月26日-2009年10月29日 イタリア ナポリ
- ⑨ 中山 亨 植物におけるグルクロノシル化反応の比較生化学 第2回博多シンポジウム「内外環境と生物応答」2009年10月9日-2009年10月10日 博多
- ⑩ Nakayama, T. Comparative studies on biochemistry and phylogenetics of three glucuronosyltransferases involved in anthocyanins and related flavonoids. 5th International Workshop on Anthocyanins, 2009 in Japan. 2009年9月15日-2009年9月18日 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 亨 (NAKAYAMA TORU)
 東北大学・大学院工学研究科・教授
 研究者番号: 80268523

[学会発表] (計 10 件)

- ① Nakayama, T. Purification, gene cloning, and biochemical characterization of a β -Glucosidase capable of hydrolyzing sesaminol triglucoside from *Paenibacillus* sp. Strain KB0549. 6th Japan-Finland Biotechnology Symposium 2012. 2012年6月4日-2012年6月8日 東北学院大学土樋キャンパス (仙台市)
- ② 中山 亨 ブドウのフラボノール3位グリコシルトランスフェラーゼにおける糖供与体特異性の進化. 日本応用酵素協会第37回研究発表会 2011年11月14日 大阪
- ③ 中山 亨 ブドウの生理活性フラボノ