

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 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570057

研究課題名（和文） トランスクリプトミクスに基づいたイネ・フラボンC-配糖体生合成経路の解明

研究課題名（英文） Elucidation of flavone C-glycosides biosynthesis pathway in rice based on transcriptome analysis

研究代表者

榊原 圭子 (SAKAKIBARA KEIKO)

独立行政法人理化学研究所・メタボローム機能研究グループ・上級研究員

研究者番号：20360555

研究成果の概要（和文）：

独自に作成したイネ共発現データベースを用いた遺伝子共発現解析により、フラボンC-配糖体生合成系酵素遺伝子が、カルコン合成酵素、カルコンイソメラーゼ遺伝子と共発現関係にあることを明らかにし、フラボンC-配糖体生合成系の候補遺伝子を得た。イネ各器官におけるフラボノイド分析により総計29種類のフラボン関連ピークを検出し、うち11種類の構造を推定した。配糖化酵素遺伝子を過剰発現させたイネFOXラインのフラボノイド分析を行い、新たな関連ピークをもつラインを見いだした。分子遺伝学的解析とあわせ、これら候補遺伝子の組換えタンパク質の活性測定、植物体への導入により、その機能を検討した。

研究成果の概要（英文）：

Transcriptome coexpression analysis based on correlation coefficients database developed independently showed that the expression patterns of genes in flavonoid C-glycoside biosynthetic pathway are correlated with genes encoding chalcone synthase and chalcone isomerase and suggests some genes as candidates involved in flavonoid C-glycoside biosynthesis. By flavonoid analyses using several rice organs, 29 flavonoid-related peaks were detected and the structures of 11 peaks were supposed. Additional flavonoid related peaks were detected in some rice FOX lines. The functions of candidate genes were assayed by measurement of enzymatic activity using recombinant proteins and overexpression in Arabidopsis in addition to molecular genetic analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：

C-配糖化、フラボノイド、トランスクリプトミクス、二次代謝、イネ、植物

1. 研究開始当初の背景

フラボノイドの炭素部分に糖が直接結合したフラボノイド *C*-配糖体は、シダ類から単子葉植物、双子葉植物にわたる一部の植物に蓄積される化合物である。一般的にフラボノイドには抗酸化活性があり、人類にとって有用な物質であるが、中でもフラボン *C*-配糖体は、アレルギー治療薬として他に比べ低用量で有効な化合物であることが報告されている。またイネ・オオムギにおいてはフラボン *C*-配糖体含量と病害虫の成育遅延に相関が見られ、植物が持つ自然耐性機構 (natural resistance) との関連が示唆されている。

フラボノイドは、最もよく研究されている二次代謝系の一つであり、フラボノイドの主要骨格 (フラボン、フラボノール、アントシアニン等) への生合成経路に加え、主要骨格への修飾反応 (*O*-配糖化、アシル化、メチル化) についても既に多くの酵素遺伝子が複数の植物種から単離・報告されている。しかしながら、フラボノイド *C*-配糖体の生合成については、明らかにされていない。

フラボン *C*-配糖体の生合成に関しては、ウキクサやソバを材料にした研究から、2-hydroxynaringenin から 2-hydroxynaringenin6-*C*-glucoside を経てフラボン *C*-配糖体が合成され、さらに *O*-配糖化等の修飾をうけると推定されている (*Phytochemistry*, 1969, 8, 93, *J. Plant Physiol.*, 1988, 132, 110-115)。

研究開始当初、植物では、フラボノイドに限らず、*C*-配糖化酵素 (GT) 遺伝子単離の報告はなかった。細菌 (放線菌、大腸菌等) では、抗生物質等を基質とする少なくとも 7 種類の *C*-GT 遺伝子単離の報告があり、植物由来フラボノイド *O*-GT と同じ GT1 ファミリーに属することが明らかになっている (*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 75, 1367-1375)。植物の *C*-GT も GT1 ファミリーに属すると予想されるが、植物の GT 遺伝子は多重遺伝子として存在しており、その一次構造から機能を推定することは非常に困難である。ゲノムサイズの小さいシロイヌナズナでさえ 100 以上、イネでは 200 以上の GT 遺伝子が存在している。フラボン *C*-配糖体の *O*-GT 遺伝子も同定されておらず、フラボン以外のフラボノイド *C*-配糖体の生合成については、全く報告がない。

研究代表者は、フラボノイドの修飾系酵素について GT を中心に長年研究を行ってきた。最近、「同じ二次代謝系に属する酵素遺伝子群は協調的に発現が制御されている、即ち共発現する遺伝子群は同じ代謝系に属することが多い」という前提に基づいた遺伝子共発現解析により、既知のフラボノイド代謝系酵素と共発現する遺伝子について解析し、複

数の新規フラボノイド GT 遺伝子の機能同定に成功している (*Plant Cell*, 2008, 20, 2160-2176, *J. Biol. Chem.*, 2007, 282, 14932-14941 他)。シロイヌナズナにはフラボノイド *C*-配糖体は存在しないが、イネでは主要なフラボノイドとしてフラボン *C*-配糖体が存在している。研究開始当初、イネ由来フラボノイド生合成系酵素 (カルコン合成酵素: CHS、カルコン異性化酵素: CHI、フラバノン 3 水酸化酵素: F3H 等) が機能同定された (*Planta*, 2008, DOI.10.1007/s00425-008-0806-1)。また、イネの遺伝子発現の相関係数データベース (*Oryza_Express*) が開発・公開されており、十分とは言いきれないが、イネにおいても、フラボノイド代謝系新規遺伝子の探索に遺伝子共発現解析が可能な状態であった。しかしながら、イネにおいて遺伝子共発現解析により遺伝子機能を推定し、代謝物解析、生化学実験とあわせて生理学的に機能証明しているグループはほとんど無かった。これは、共発現解析に必要な遺伝子発現の相関係数データベースの開発がシロイヌナズナに比べ遅れていること、イネの遺伝子の機能予測がシロイヌナズナに比べ精度が低いことに由来する。

このため、研究代表者は、独自にイネ遺伝子の発現相関係数データベースを構築した。研究代表者は 54,000 遺伝子を使用したマイクロアレイ 140 実験区に基づいてデータベースを構築しており、既に公開されているイネ共発現データベース (22,000 遺伝子のマイクロアレイ 40 実験区に基づく) と比較すると、高い精度が期待できる。研究代表者は、既に独自に構築したイネ・データベースを用いて、イネでも既知のフラボノイド代謝系酵素遺伝子の発現に相関が見られることを検証済みであった。

2. 研究の目的

本研究は、イネ・フラボン *C*-配糖体の生合成経路の解明を目標に、遺伝子共発現解析に基づいた関連酵素遺伝子の機能同定に重点をおいた。

具体的には、2-ヒドロキシフラバノン *C*-GT 遺伝子、フラボン *C*-配糖体 *O*-GT 遺伝子の同定をめざした。

3. 研究の方法

モデル植物シロイヌナズナでは、遺伝子共発現解析により精度良くフラボノイド代謝系の新規酵素遺伝子を見出すことに成功している。この手法をイネに応用し、遺伝子共発現解析を用いた *in silico* での遺伝子発現

ネットワークの解析により、既知のフラボノイド代謝系遺伝子と相関するフラボンC-配糖体生合成系遺伝子の探索を行った。

並行して、LC-TOF/MSを用いて、イネの各器官におけるフラボンC-配糖体を含むフラボノイド各分子種の量的質的な蓄積様式を明らかにし、詳細なイネ・フラボノイド代謝地図を作成する。得られたフラボノイドの構造より、フラボンC-配糖体生合成系に関わる酵素機能を推定する。また、イネFOXライン（イネcDNA過剰発現シロイヌナズナ）のフラボノイド分析により、フラボンC-配糖体の蓄積様式に変化がみられる変異体を探索する。

これらの結果得られた候補遺伝子について、組換えタンパクによる生化学実験や遺伝子破壊型あるいは過剰発現型の変異体のフラボノイド分析を行い、未解明のフラボンC-配糖体生合成に関与する酵素遺伝子の機能同定、フラボンC-配糖体生合成経路の解明を行う。フラボンC-配糖体生合成系を優先するが、イネ・フラボノイド代謝系全体についても視野に入れ、あわせて行う。

4. 研究成果

4-1. 遺伝子共発現解析による候補遺伝子の絞り込み

フラボンC-配糖体生合成系遺伝子の探索のため、既知のイネのフラボノイド代謝系酵素遺伝子群（CHS、CHI、F3H、F3'H、DFR、LDOX/ANS）を用いて、遺伝子共発現解析を行った。この結果、イネのフラボノイド代謝系遺伝子群は、少なくとも3つの遺伝子共発現ネットワークに分類できることが明らかとなった。

フラボンC-配糖体の生合成に関わる遺伝子は、その予想生合成経路から、この3つのうち、CHS、CHIと遺伝子共発現ネットワークを形成する確率が高いと予想され、CHS、CHIをqueryにイネの全遺伝子に対して、遺伝子共発現解析を行ったところ、Cytochrome P450 family 遺伝子、配糖化酵素遺伝子、4-coumarate-CoA ligase 遺伝子、脱水素酵素遺伝子と発現相関が見られた。

2009年7月に本研究のターゲットの一つであるイネ・C6グルコース転移酵素がイギリスの研究グループより単離された（JBC、284、17926-17934、2009）が、この遺伝子は、我々が共発現解析で候補としていた配糖化酵素遺伝子のうちの一つと一致した。また2010年には、中国の研究グループがC-配糖化フラボン生合成系のflavanone 2-hydroxylase（F2H）遺伝子を単離した（Plant Physiology、154、324-333、2010）が、この遺伝子もまた、我々が共発現解析で候補としていた

Cytochrome P450 family 遺伝子と一致していた。これらの結果は、CHS、CHI遺伝子とC-フラボン配糖体生合成系酵素遺伝子が同様の転写制御を受けており、遺伝子共発現解析によるフラボンC-配糖体生合成系の候補遺伝子の絞り込みが有効であることを支持するものである。

4-2. 比較ゲノム学に基づいたC-配糖化酵素の絞り込み

比較ゲノム学に基づいて、C-配糖化酵素候補を探索すべく、陸上植物6種類（*Physcomitrella patens*, *Selaginella moellendorffii*, *populus trichocarpa*, *oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata*）のゲノム配列から配糖化酵素の保存配列を持つ遺伝子を選抜し、系統樹解析を行った。これらの配糖化酵素遺伝子は24のorthologous groupに分類され、単離されたイネ・C6グルコース転移酵素は、他にイネ配糖化酵素2種類を含むorthologous groupを形成した。同じorthologous groupに属するこれら配糖化酵素遺伝子も候補遺伝子とした。また、既知のフラボノイド配糖化酵素と同じorthologous groupに属することから、イネ由来フラボノイド3位配糖化酵素の候補遺伝子を同定できた。

4-3. イネ各器官におけるフラボノイド分析

HPLCを用いて、イネの1週齢の葉と根、2週齢の第3葉身および葉鞘、第4葉のフラボノイド分析を行い、総計29種類のフラボン関連ピークを検出した。そのうち11種類については既知のフラボン由来ピークであると推定できた。また、今までのイネ・フラボノイド分子種の報告とあわせ、この推定構造より、イネには未同定のC-配糖化酵素、O-配糖化酵素が少なくとも3種類ずつ存在することが示唆された。

4-4. イネFOXラインのスクリーニング
イネC-配糖化酵素遺伝子のスクリーニングのため、C-配糖化酵素の基質と考えられる2-hydroxynaringeninを添加した培地で生育させたイネFOXライン（イネcDNA過剰発現シロイヌナズナ）のフラボノイド分析を行った。イネFOXラインのうち、配糖化酵素遺伝子を過剰発現させたものは、55ライン（配糖化酵素24遺伝子に相当）存在した。分析したうち、9ライン（配糖化酵素遺伝子3種類に相当）について、新たなフラボンもしくはフラボノール配糖体のピークが検出された。これらの配糖化酵素遺伝子は、フラボノイド7位配糖化酵素と同じUGT73もしくはUGT88サブファミリーに属して

いた。UGT73およびUGT88サブファミリーは既知のイネC配糖化酵素とは、別のorthologous groupに属している。また、UGT73およびUGT88の属するorthologous groupには、シロイヌナズナ由来のGT遺伝子も多数含まれていた。

4-5. 候補配糖化酵素の活性測定

4-1、2で得られたC-配糖化酵素候補遺伝子のうち、3種類について大腸菌で組換えタンパク質を発現、精製した。既知のイネ・C6グルコース転移酵素を用いて、活性測定条件を確立した後、候補遺伝子のC-配糖化活性を測定した。既知のイネ・C6グルコース転移酵素については、2-hydroxynaringeninとUDP-glucoseを基質として活性を確認できたが、候補酵素遺伝子3種類については、C-配糖化酵素活性は確認できなかった。基質として、Apigenin C-6-glucoside, UDP-arabinoseも検討したが、活性は検出されなかった。

4-6. 候補配糖化酵素導入植物体の作出と解析

既知のイネ・C6グルコース転移酵素とF2H遺伝子を共発現させるベクターを導入したシロイヌナズナを作出したところ、該当するフラボンC配糖体が検出できた。

そこで、候補酵素遺伝子2種類について、それぞれF2H遺伝子と共発現させるベクターを構築し、シロイヌナズナに導入した。得られた形質転換植物のフラボノイド分析を行ったが、新たなフラボノイド関連ピークは検出されなかった。

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1件)

K. Yonekura-Sakakibara, K. Hanada (2011) An evolutionary view of functional diversity in family 1 glycosyltransferases. *Plant J.*, 66, 182-193. (査読有り)

[学会発表] (計2件)

①榊原圭子 (2011) シロイヌナズナ・ファミリー1配糖化酵素の機能ゲノム学、P450, SULT, UGT 勉強会、2011年6月18-19日、大阪・吹田(招待講演)

②榊原圭子、花田耕介、斉藤和季、ファミリー1配糖化酵素の機能多様性における進化的考察、第52回日本植物生理学会、2011年3月20-22日、仙台(口頭発表)

[図書] (計1件)

榊原圭子、遺伝子発現様式に基づく遺伝子の単離と機能同定植物の分子育種学、鈴木正彦編集、(2011) pp33-42, 講談社サイエンティフィック

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榊原 圭子 (SAKAKIBARA KEIKO)
独立行政法人理化学研究所・メタボローム機能研究グループ・上級研究員
研究者番号：20360555

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし