

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450120

研究課題名(和文)植物のフラボノイドC配糖化酵素の反応機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the reaction mechanism of plant flavonoid C-glycosyltransferases

研究代表者

田口 悟朗 (TAGUCHI, Goro)

信州大学・学術研究院繊維学系・准教授

研究者番号：70252070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、その生理活性が注目されている「フラボノイドC-配糖体」の生合成に関わる「C-配糖化酵素」をソバやカンキツ類、マメ科植物などの植物から同定した。これらの酵素について詳細な酵素反応解析とタンパク質の結晶構造解析を行い、C-配糖化酵素がベンゼン環と糖の間の特殊な炭素-炭素結合を形成する反応の機構を推定した。また、これらの酵素遺伝子を保持する大腸菌を利用し、フラボノイドをそのC-配糖体に高効率で生物変換する系を構築した。

研究成果の概要(英文)：In this project, we identified C-glycosyltransferases those are responsible for the biosynthesis of valuable flavonoid C-glycosides from several plant species, such as buckwheat, citrus and leguminous plants. We characterized the enzymatic reaction of them precisely, and also analyzed the crystal structure of the protein to elucidate the reaction mechanisms of the C-glycosyltransferases producing carbon-carbon bonds between the sugar moiety and the aromatic carbon of flavonoids. We also achieved the production of C-glycosides of flavonoid by bioconversion using *Escherichia coli* expressing C-glycosyltransferases.

研究分野：植物生化学

キーワード：C-配糖化酵素 フラボノイドC-配糖体 酵素反応解析 X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

(1) C-配糖体 (図1) は、フラボンやカルコンなどの化合物に対し、糖が炭素-炭素結合した化合物群である。この特殊な結合のため、他の配糖体と比較して糖の結合が化学的に安定で、グリコシダーゼや酸による加水分解を受けないという特徴を持つ。これらは、抗菌・抗酸化物質、昆虫の摂食阻害物質や花の助色素などとしての作用のほか、血圧降下、抗炎症、抗肥満など種々の生理活性を示すことが報告されている有用化合物である。その生合成に関わる C-配糖化酵素の理解は、これら化合物の有効利用の観点からも重要である。しかし、O-配糖化酵素は数多く報告されて解析が進んで結晶構造や反応機構の詳細が明らかになってきたのに対し、C-配糖化酵素遺伝子は、単子葉植物のイネ科植物から2例が報告されていたのみで、ほとんど研究が進んでいない状況であった。本研究開始時点において、我々は、ソバから双子葉で初めて C-配糖化酵素遺伝子を単離して解析を進めていたほか、マメ科植物の C-配糖化酵素遺伝子を見いだしており、さらなる研究の進展が期待される状況であった。

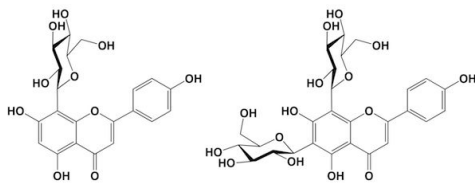


図1：フラボノイド-C-配糖体

2. 研究の目的

(1) 植物由来のフラボノイド C-配糖化酵素の結晶構造解析を行い、C-配糖化酵素の反応機構を分子レベルで明らかにする。さらに、活性中心アミノ酸の置換による反応性の変化の解析を通じて、C-配糖化酵素の基質認識機構を解析し、O-配糖化酵素との違いを明らかにする。

(2) これまでに解析された C-配糖化酵素がまだわずかであることから、C-配糖体を蓄積する種々の植物から候補遺伝子を単離して解析し、C-配糖化酵素の遺伝子の同定を行うとともに、それぞれの酵素の反応性を解析する。それらと(1)の結果と併せて比較検討し、種々の C-配糖化酵素の反応特性を明らかにする。特に、di-C-配糖体 (図1・右) の2番目の C-配糖化反応に関わる酵素を同定し、その反応機構を明らかにする。

(3) フラボノイド C-配糖体の簡便な合成法の確立のため、大腸菌などの異種宿主発現系を用いた、フラボノイドアグリコンをその C-配糖体に変換する生物的な C-配糖体生産系を構築する。

3. 研究の方法

(1) C-配糖化酵素の結晶化条件の検討およ

びX線結晶構造解析

ソバおよびマメ科植物から獲得した6種の酵素タンパク質について、結晶化解析を目的とした大量発現の検討を行い、選択したソバの C-配糖化酵素を大腸菌で大量発現させて精製した。蒸気拡散法による結晶化の条件検討を行い、さらに結晶化条件の最適化を行った。

得られた結晶について、高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設でX線回折実験を行った。得られた回折像について、分子置換法で位相決定を行い、原子モデルを構築した。

C-配糖化酵素と基質である UDP-グルコース、およびフラボノイド基質を結晶溶液に加えて共結晶を作出し、立体構造解析を行ってその基質認識機構の解析を行った。

の情報を元にして FeCGTa 酵素の活性中心付近のアミノ酸残基にそれぞれ点突然変異を導入し、得られた酵素の反応性を解析した。

(2) 新規 C-配糖化酵素の同定と機能解析

フラボノイド C-配糖体の蓄積が報告されており、公開データベースの存在するキュウリ、およびカンキツ類について、FeCGT と同性を示す候補遺伝子を選定し、その全長を RT-PCR により獲得した。

公開データベースが存在しないワサビについて、次世代シーケンサーによる RNA-Seq 解析を行い、EST ライブラリを構築した。さらに植物体から酵素精製を行い、LC-MS/MS 解析により部分アミノ酸配列情報を取得し、この情報を元に候補遺伝子を探索した。

これらの候補遺伝子、およびこれまでに得ていたマメ科植物由来の酵素遺伝子について大腸菌で異種宿主発現させた酵素を種々の基質と反応させて C-配糖化酵素遺伝子を同定し、それぞれの酵素反応性を解析した。

(3) 異種宿主発現系を利用した、効率的な C-配糖体生産条件の検討

C-配糖化酵素遺伝子を発現させた大腸菌を用い、フラボノイド関連基質を投与して、C-配糖体への生物変換を検討した。また、生成した化合物を精製して LC-MS および NMR 解析を行い、それらの構造決定を行った。

4. 研究成果

(1) C-配糖化酵素の立体構造の解明

ソバおよびマメ科植物から獲得した6種の酵素タンパク質のうち、大量発現が可能であったソバの C-配糖化酵素について結晶化条件の検討および最適化を行い、その単結晶を得ることに成功した。この結晶についてX線構造解析を行ったところ良好な回折像が得られたことから、その位相決定を試みた。重原子置換法などを含め、種々の検討を行った結果、最終的に分子置換法により立体構造を

解明することに成功した。解明したソバの C-配糖化酵素の立体構造は、これまでに立体構造が報告された植物由来の O-配糖化酵素とよく類似した構造を持つことが明らかとなった。

基質との共結晶解析により、糖供与基質である UDP-グルコースと酵素の活性中心のアミノ酸残基との相互作用を明らかにした。また、活性中心付近のアミノ酸残基への点突然変異の導入を行い、C-配糖化反応に必須ないくつかのアミノ酸残基を決定した。これらの結果を基に、C-配糖化酵素の反応機構を推定した。

立体構造情報や既知の O-配糖化酵素との比較からソバの C-配糖化酵素に 10 残基前後のアミノ酸置換を加えることで、弱いながら O-配糖化酵素を示す酵素に変換することに成功した。

(2) 新規 C-配糖化酵素の同定と機能解析

データベース情報をもとに獲得したマメ科植物、キュウリ、およびカンキツ類の C-配糖化酵素遺伝子を大腸菌発現させ、種々の基質と反応させて、その反応性を解析した。その結果、カンキツ類の C-配糖化酵素はフラボノイド分子に 2 分子の糖を転移することが可能な「di-C-配糖化酵素」であることを明らかにするとともに、それらがフラボノイド di-C-配糖体の生合成を担っていることを明らかにした。また、キュウリの酵素は、ソバの酵素と同様に主に 1 つの糖を転移する mono-C-配糖化酵素であった。一方、マメ科由来の酵素には上記 mono-C-および di-C-配糖化酵素の双方が存在した。

ワサビ植物の各部位の RNA-Seq 解析で構築した EST ライブラリを利用し、遺伝子配列の相同性からフラボノイド C-配糖化酵素遺伝子の探索を行ったが、その候補を見いだすことはできなかった。そこで、植物体から C-配糖化活性を指標として酵素タンパク質を部分精製し、得られた部分アミノ酸情報を元に候補遺伝子の単離を行い、3 つの候補遺伝子を得た。それら大腸菌でタンパク質発現させ、得られた酵素の反応性を解析し、C-配糖化酵素を同定した。その結果、ワサビにおける C-配糖化酵素は、これまでに我々が解析してきたソバやカンキツ、マメ科植物などの C-配糖化酵素とは異なり、フラボン骨格に直接配糖化する酵素であることを明らかにした。

(3) 大腸菌発現系を利用した、効率的な C-配糖体生産系の確立

C-配糖化酵素を発現誘導した大腸菌を用い、基質の投与による C-配糖体への生物変換を検討した。その結果、タンパク質発現誘導後 2 % グルコースを加えた合成培地に移した大腸菌に酵素基質を投与する系において、投与した基質の 80-95% を C-配糖体として培地中に放出させることに成功した。これ

ら化合物の構造決定を行い、目的の C-配糖体であることを確認した。

上記の変換系において、発現させる酵素にカンキツ類の C-配糖化酵素を利用することで、50% を越える収率で di-C-配糖体を生成させることが可能であった。

今回確立した方法で生産した mono-C-配糖体を反応基質として利用し、di-C-配糖化酵素の反応解析を行った。

(4) 本研究は、これまで解析例が極めて少なかった植物のフラボノイド C-配糖化酵素を複数単離同定し、その詳細な反応解析を行った先駆的な研究である。特に、その X 線結晶構造解析を行い、世界で初めて植物の C-配糖化酵素の立体構造を明らかにしたことは特筆に値する。C-配糖化酵素の反応機構が解明されることで、より有用な C-配糖体の創成へ発展することが期待される。また、フラボノイドに糖を 2 分子添加することが可能なカンキツ類の di-C-配糖化酵素や、反応機構が異なることが予想されるワサビの C-配糖化酵素を同定したことも注目される成果であるといえ、今後、これら種々の C-配糖化酵素の比較を通じ、植物が C-配糖化活性をどのように獲得したのか、という進化的な興味も期待される。さらに、大腸菌発現系を利用した高効率なフラボノイド C-配糖体生産系の構築にも成功しており、その生理活性が注目されているフラボノイド C-配糖体の安価な生産につながる成果であるといえる。

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 3 件)

Ito T., Fujimoto S., Suito F., Shimosaka M., Taguchi G. C-Glycosyltransferases catalyzing the formation of di-C-glucosyl flavonoids in citrus plants. *Plant Journal*, 2017, *in press*, 査読有 DOI : 10.1111/tpj.13555.

Ito, T., Fujimoto, S., Shimosaka, M., Taguchi, G. Production of C-glucosides of flavonoids and related compounds by *Escherichia coli* expressing buckwheat C-glucosyltransferase. *Plant Biotechnology*, 31, 519-524, 2014, 査読有 DOI : 10.5511/plantbiotechnology.14.1016a
Nagatomo, Y., Usui, S., Ito, T., Kato, A., Shimosaka, M., Taguchi, G. Purification, molecular cloning and functional characterization of flavonoid C-glucosyltransferases from *Fagopyrum esculentum* M. (buckwheat) cotyledon. *Plant Journal*, 80, 437-448,

2014, 査読有 DOI: 10.1111/tpj.12645.

〔学会発表〕(計 10 件)

眞島京子, 鈴木秀幸, 田口悟朗: ワサビ (*Wasabia japonica*) のイソサポナリン生合成に關与する C-配糖化酵素の同定; 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017.3.19, 京都女子大学 (京都市東山区)

小柳祐輔, 水藤史明, 新井亮一, 田口悟朗: ソバ由来フラボノイド C-配糖化酵素の反応メカニズムの調査; 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017.3.19, 京都女子大学 (京都市東山区)

眞島京子, 鈴木秀幸, 田口悟朗: ワサビのイソサポナリン生合成に關わる C-配糖化酵素の探索; 第 34 回日本植物細胞分子生物学会(上田)大会 2016.9.2, 信州大学繊維学部 (長野県上田市)

小柳祐輔, 水藤史明, 新井亮一, 田口悟朗: ソバ由来フラボノイド C-配糖化酵素の X 線結晶構造解析; 第 34 回日本植物細胞分子生物学会(上田)大会 2016.9.2, 信州大学繊維学部 (長野県上田市)

小柳祐輔, 伊藤崇充, 山本菜摘, 田口悟朗: タルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*)由来フラボノイド C-配糖化酵素の機能解析; 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016.3.28, 札幌コンベンションセンター (札幌市白石区)

小柳祐輔, 山本菜摘, 内田 開, 明石智義, 田口悟朗: ダイズ (*Glycine max*) のフラボノイド C-配糖化酵素の機能解析; 第 33 回日本植物細胞分子生物学会 (東京) 大会・シンポジウム, 2015.8.10, 東京大学農学部 (東京都文京区)

田口 悟朗: 植物の配糖体と配糖化酵素; 平成 27 年度日本応用糖質科学会東日本支部シンポジウム 『広がる糖質科学の世界』-配糖体・多糖類・関連酵素-, 2015.7.24, 東京大学農学部 (東京都文京区) (招待講演)

藤本 俊介, 伊藤 崇充, 下坂 誠, 田口 悟朗: キュウリ (*Cucumis sativus*) におけるフラボノイド C-配糖化酵素遺伝子の探索と解析; 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015.3.28, 岡山大学 (岡山県岡山市)

伊藤崇充, 藤本俊介, 小柳祐輔, 下坂 誠, 田口悟朗: 植物由来の配糖化酵素遺伝子を発現させた大腸菌による配糖体の生産; 第 32 回日本植物細胞分子生物学会 (盛岡) 大会・シンポジウム, 2014.8.21, アイーナ (岩手県盛岡市)

伊藤崇充, 藤本俊介, 小柳祐輔, 下坂 誠, 田口悟朗: ミカン科植物のフラボノイド C-配糖化酵素の解析; 第 32 回日本植物細胞分子生物学会 (盛岡) 大会・シンポジウム 2014.8.21, アイーナ (岩手県盛岡市)

〔図書〕(計 1 件)

Zhou M., Kreft I., Woo SH., Chrungoo N., Wieslander G. 編, Ohnishi O., Taguchi G. 他 計 83 名で分担執筆, Academic Press (Elsevier), Molecular Breeding and Nutritional Aspects of Buckwheat. 担当部分: Chapter 30, Taguchi G.: Flavonoid Biosynthesis in Buckwheat, pp.377-386, 2016.

〔その他〕

ホームページ等

信州大学繊維学部田口研究室

<http://fiber.shinshu-u.ac.jp/taguchi/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田口 悟朗 (TAGUCHI, Goro)

信州大学・学術研究院繊維学系・准教授
研究者番号: 70252070

(2) 研究分担者

新井 亮一 (ARAI, Ryoichi)

信州大学・学術研究院繊維学系・准教授
研究者番号: 50344023

鈴木 秀幸 (SUZUKI, Hideyuki)

公益財団法人かずさ DNA 研究所・
バイオ研究開発部・グループ長
研究者番号: 80276162