

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 4 月 25 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650092

研究課題名(和文) 青色色素トリコトミンの生合成経路の解明

研究課題名(英文) Elucidation of biosynthetic pathway of blue pigment trichotomine

## 研究代表者

小関 良宏(Ozeki, Yoshihiro)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50185592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：トリコトミンはトリプトファンを由来とするインドールアルカロイドであるが、その生合成経路は未知であり、本研究ではその生合成経路を明らかにすることを目的とした。クサギの果肉から total RNA を抽出し、次世代シーケンサーにより網羅的な RNA-seq 解析を行った。その結果、トリプトファン代謝に関わる酵素遺伝子を 17 遺伝子抽出した。またトリコトミンへの配糖化に関与する配糖化酵素遺伝子について 6 遺伝子単離した。また、トリコトミン合成カルスの変異体としてトリコトミン非合成カルスの獲得および培養に至った。今後、トリコトミン非合成カルスを使用して発現比較などからその合成経路の解析を進める。

研究成果の概要(英文)：Trichotomine produced as a deep blue pigment in *Clerodendron trichotomum*. The structure was known as a bis(indole) alkaloid and biosynthesized from tryptophan, however the biosynthetic pathway of trichotomine has not been confirmed. This study intended to be clarified the biosynthetic pathway and identified their enzymatic genes. The transcriptional gene sequencing data of next generation sequence was constructed from total RNA that extracted from *C. trichotomum* fruit. Seventeen genes of the enzymes in tryptophan metabolic pathway were extracted and also extracted six candidate genes of the N-glucosyltransferase that might be involved in glucosylation of trichotomine. The defect of trichotomine biosynthetic mutant calli was isolated from the trichotomine spontaneous biosynthesis calli. In future, the expression analysis of the extracted genes in this study is going to compare from normal trichotomine calli and mutant calli reveal the reason of the mutant is occurred.

研究分野：植物分子・生理科学

キーワード：クサギ トリコトミン インドールアルカロイド N-グルコシルトランスフェラーゼ

### 1. 研究開始当初の背景

クサギは鮮やかな青色の染色材の 1 つとして歴史の中で用いられてきたが、その中心青色色素成分であるトリコトミンの構造と化学合成法は 1978 年に Iwadare らにより報告された。また 1992 年に Koda らによりクサギのカルス誘導法が報告された。しかしその後、研究は途絶え、トリコトミンの生合成経路やそれに関わる酵素、さらにはその遺伝子については未解明のままである。現在、市場ニーズの高い青い花を遺伝子組換えによって作出する方法は、青みを帯びるアントシアニンであるデルフィニジン合成酵素遺伝子を導入することが唯一の方法である。しかし、デルフィニジンだけでは紫色止まりであり、さらなる有機酸や糖による修飾、液胞内 pH 調節やコピグメンテーション化合物の合成が必要とされている。一方、トリコトミンは安定かつ鮮やかな青色を呈していることから、トリコトミンの生合成酵素遺伝子を単離し、花色開発に利用できるようになればブレークスルーとなることが期待される。

### 2. 研究の目的

クサギはシソ目クマツヅラ科に含まれる木本植物であり、秋になると濃青色の実をつける。この主要色素はトリコトミンと呼ばれるインドールアルカロイドの一種であり、トリプトファンを出発物質とする植物色素である。インドール系青色色素の代表はアイなどが合成するインディゴであるが、その化学合成法は古くから確立されたのに対し、トリコトミンを含め植物における生合成系は未解明のままである。本研究ではこの鮮やかな青色を呈するトリコトミンの生合成酵素遺伝子を解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験材料と試薬

本実験で用いたクサギ植物体は東京農工大学農学部（東京都府中市）で採集したものをを用いた。また恒常的トリコトミン合成カルスは三栄源エフ・エフ・アイ株式会社より分与されたものを申請者の研究室において継代培養されていたものを使用した。カルスの培養条件は明条件下において 1/2 MS 液体培地により巡回培養し、14 日おきに新鮮培地に移植、または 1/2 MS 固形培地により 1 か月ごとに新鮮培地に移植した。一部カルスにおいてトリコトミンを合成しない、白色個体が現れたため、隔離し同条件で培養を行った。採集後は液体窒素で凍結させ、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

#### (2) 次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析

クサギ果実の果肉 0.1 g をサンプリングし、液体窒素で凍結後、使用するまで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)

を用いて total RNA を抽出した。この RNA をユーロフィンジェノミクス株式会社に送付し、illumina 社 HiSeq2000, HiSeq Control Software 2.2.38 を用いて RNA-seq 解析を行なった。

得られた RNA-seq 配列の RAW データを DNA Data Bank of Japan の提供するスパコン利用 web サービス Read Annotation Pipeline を利用してアッセムプリングを行った。アッセムプリングには de novo assembly プログラム Trinity 2.1.1 を使用した。次に情報解析の web platform である Galaxy を利用して、アッセムプリングにより得られたコンティグ配列を対象配列とし、RAW データのマッピングを Bowtie2 を使用して行った。最後にマッピング情報をもと Cufflinks により FPKM 値を算出した。また、アッセムプリングによるコンティグ配列情報は Blast command line application である blast+ によりデータベースファイルを作製し、塩基配列解析ソフトウェア GENETYX-MAC ver.16 により Local blast を使用して相同性検索をできるように準備した。トリプトファン代謝経路における酵素として、Tryptophan decarboxylase (TDC)、Tryptophan aminotransferase (TA)、Amine Oxidase (AO)、Indolepyruvate decarboxylase (PDC)、Indole acetaldehyde dehydrogenase (IAD)、Flavin-containing monooxygenase (FMO) および窒素結合配糖化酵素 N-glucosyltransferase (NGT) について相同性検索を行ない、次世代シーケンサーデータから各遺伝子の配列情報の抽出および Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments (FPKM) 値による発現量の比較を行った。

#### (3) cDNA 合成および real time RT-PCR による発現解析

候補酵素遺伝子を単離するため、上記方法でクサギ植物体の葉、萼、果実およびトリコトミン合成カルスより得た total RNA 1  $\mu\text{g}$  をテンプレートに、oligo-dT primer、Prime Script Reverse Transcriptase (Takara) を使用し、cDNA を合成し、3' RACE による cDNA の獲得を行なった。また、各コンティグの 5' 末端配列獲得のため、total RNA 1  $\mu\text{g}$  をテンプレートに SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Takara) を用いて 5' RACE 用 cDNA を合成した。

さらに各候補遺伝子の発現部位を明らかにするために、合成した cDNA をテンプレートとし、各々の候補遺伝子特異的塩基配列領域に対してプライマーを設計し、DNA Engine Opticon 2 System (Bio-Rad)、Thunderbird SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いて、95 20 秒の初期変性のうち、95 $^{\circ}\text{C}$  10 秒、55 15 秒、72 30 秒を 40 サイクルで定量的 real time RT-PCR 反応を行った。なお発現の内部標準としては 18s rRNA 遺伝子を用いた。

(4) トリコトミン合成カルスからの各種トリコトミン分子種および低分子化合物の抽出と単離精製

継代培養により新鮮培地に植え替えてから 10 日目のカルスを生重量 300 g を 80% メタノール溶液に浸漬し、4℃ に一晚静置し、カルス内の蓄積物の抽出を行った。抽出溶液はダイヤイオン HP-20 担体を充填したオープンカラムにより、粗精製をおこなった後に中圧分取クロマトグラフィーと高性能液体クロマトグラフィーにより単離精製を行い、得られた生成物は TOF-MS により質量分析を行い、質量電荷比  $m/z$  値を文献値と照合することで分子種の同定を行った。

(5) カルスからのタンパク質抽出および粗酵素活性の反応条件

カルス 生重量 10 g を乳鉢・乳棒により液体窒素中で磨砕し、破砕物を 5 mL の 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.5 に懸濁した。この溶液を 75% 硫酸沈殿によりタンパク質を沈殿させ、再度同上バッファ 200  $\mu$ L に再懸濁した。次に脱塩カラムにより脱塩した溶液を粗酵素溶液とした。粗酵素溶液のタンパク質濃度は Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit (Thermo Scientific) により定量した。

N-結合配糖化酵素活性の検討では、粗酵素タンパク質 20  $\mu$ g に対し、トリコトミン非配糖体分子種を終濃度 0.2 mM、UDP-glucose を終濃度 1 mM となるように混合し、反応量 30  $\mu$ L として、30℃ 30 分で反応させた。20% リン酸溶液を 1.5  $\mu$ L 加えて反応を停止させ、遠心後の上清を反応産物として HPLC により分析した。HPLC は Handy ODS カラム (250 mm x 4.6 mm, Wako)、A 溶媒: 1.5% リン酸、B 溶媒: アセトニトリル、流速 1.0 mL、B 溶媒を 40% から 50% を 10 分、55% から 60% を 10 分の勾配により反応産物の分離を行った。

#### 4. 研究成果

(1) トリコトミン非合成カルスの隔離

トリコトミン合成カルスの継代培養を行っている過程で、培養室の空調が故障し、40℃ 程度まで室温が上昇したことがあった。これにより、多くのカルスが変色し死滅してしましたが、一部生存したカルスの中にトリコトミンを合成しない白色の個体が現れたため、青色カルスから隔離した(図 1)。

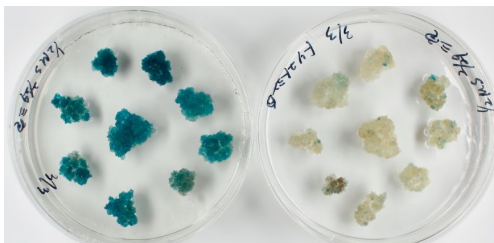


図 1 トリコトミン合成カルスと非合成カルス

昨年度までにサンプルとして使えるほどに白色カルスを増殖させることができたため、今後は白色カルスにおける変異の原因を調査することでトリコトミン合成経路の解明を進める。

(2) 次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析

トリコトミン合成系に關与する酵素遺伝子群を同定するため、クサギ細胞において発現している遺伝子について次世代シーケンサーを用いて網羅的な解析を行なった。まず予備実験としてトリコトミン合成カルスから RNA を抽出して cDNA を合成し、いくつかの種類のハウスキーピング遺伝子を単離し、その塩基配列を決定した。その結果、同じ遺伝子の単離において 1 塩基から数塩基の異なりをもつ遺伝子多型が多く獲得されたことから、培養変異などにより数塩基多型の配列が転写されている可能性が考えられた。このため、カルスの RNA をシーケンスしてしまうと、シーケンス情報から正しい配列情報を獲得することが困難になり、発現量の数値化も正常に行うことができないと判断したため、次世代シーケンスに供する total RNA は植物体のトリコトミンが蓄積している果実の果肉から獲得することにした。次世代シーケンスは網羅的塩基配列決定を委託した。その結果、総リード数 19,017,580 の配列が得られた。また、総コンティグ数 92,725、平均コンティグ長 1,412 bp が得られた。

(3) トリプトファン代謝経路の関連酵素遺伝子の配列抽出および発現比較

トリコトミンはインドールアルカロイドに属する構造であり、他のインドールアルカロイドに属する物質ではリゼルグ酸、ストリクトシジンなどが知られている。リゼルグ酸はトリプトファンとジメチルアリルピロリン酸から、ストリクトシジンはトリプタミンとセコログニンから生合成されると考えられており、インドールアルカロイド化合物はトリプトファン代謝経路から分岐して生合成されることが示唆される。このため、まず次世代シーケンスデータからトリプトファン代謝経路における酵素遺伝子の抽出を行った。トリプトファンからインドール 3-ピルビン酸を合成する TA はクサギカルスでは contig 37408 の 1 遺伝子のみ発現が確認された。トリプトファンからトリプタミンを合成する TDC は contig 31872 と contig 32465 の 2 遺伝子が発現しており、そのうちの contig 31782 は数塩基のみの違いがある 3 つの異なる遺伝子配列が確認された。トリプタミンからインドール 3-アルデヒドを合成する A0 は、3 遺伝子が発現しており contig 33413 が特に強く発現していることが示された。インドール 3-ピルビン酸から

インドール 3-アルデヒドを合成する PDC は、3 遺伝子が発現しており、contig 29933 が強く発現していた。インドール 3-アルデヒドからインドール 3-酢酸を合成する IAD は 4 遺伝子が確認され、contig 20217 が強く発現していた。インドール 3-ピルビン酸からインドール 3-酢酸を合成する FMO は 2 遺伝子が発現しており、contig 27226 が強く発現していた。さらに TA 以外の酵素遺伝子に関しては、それぞれの酵素についてもっとも発現している遺伝子の全長配列と推定される塩基配列をデータから獲得することができた (図 2)。

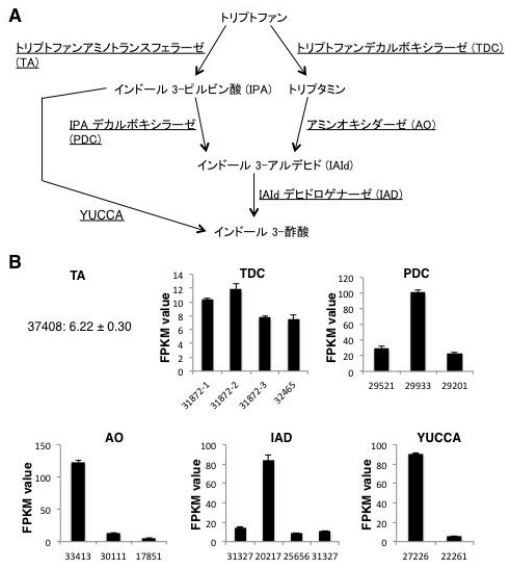


図 2 A: トリプトファン代謝経路、B: 各酵素遺伝子についての FPKM 値の比較

これにより、トリプトファン代謝経路の解析を行うための遺伝子群の配列を獲得するに至った。今後は異種発現による組換え酵素での活性を確認し、遺伝子の同定を行う予定である。

### (3) N-結合配糖化酵素候補遺伝子の単離および発現解析

トリコトミンはインドール環の窒素にグルコースが結合した構造をとっており、これまでの他の植物における配糖化酵素の研究では N-結合配糖化酵素は UDP-sugar を糖供与体とする UDP-sugar dependent N-glycosyl transferase (NGT) であることが知られている。クサギの果肉での次世代シーケンスデータ中には、NGT 相同遺伝子は 5 遺伝子が発現していることが示された。また既知の NGT と系統樹を作製したところ、なかでも contig 19290 と contig 30427 が既知の NGT と相溶性が高いことが分かった (図 3A)。また、FPKM 値による発現量を他の NGT 相同配列と比較するとこの 2 遺伝子の発現はそれほど高くないことも示された (図 3B)。このため、次に植物の部位ごとに 2 つ

の遺伝子の発現について調査した。その結果、全ての候補遺伝子について葉と萼において発現が高く、トリコトミンを合成している果肉やカルスにおいて特異的に発現している遺伝子は確認できなかった (図 3C)。今後は全ての候補配列の全長を獲得し、組換え酵素活性測定の前準備を行う。

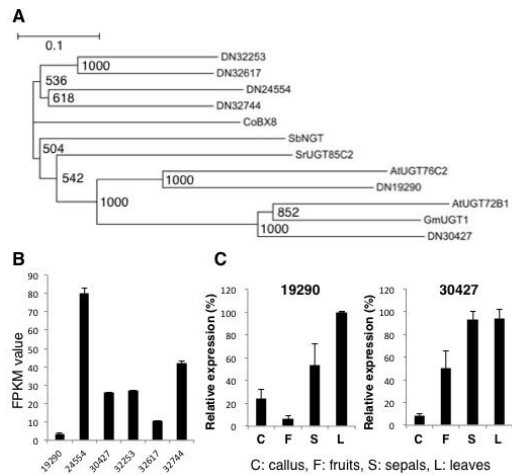


図 3 A: NGT 候補遺伝子の分子系統樹、B: 候補遺伝子の FPKM 値の比較、C: contig19290 と 30427 の部位ごとの発現比較。

### (4) カルス粗酵素における NGT 酵素活性の検討および蓄積物の同定

カルスからタンパク質を抽出し、粗酵素活性の検討を行うために、トリコトミン分子種の単離および精製を行った。単離した構造は、Trichotomine、トリコトミンに 1 分子のグルコースが結合した Trichotomine G1、トリコトミンに 2 分子のグルコースが結合した *N,N'*-di( $\beta$ -glucopyranosyl)trichotomine の 3 分子であった。また、精製の過程で非常に大量の黄色物質が確認されたため、この物質についても同定を進めた。その結果、この黄色物質はクサギ科の植物の葉において多く蓄積している Acteoside であることが示唆された (図 4)。

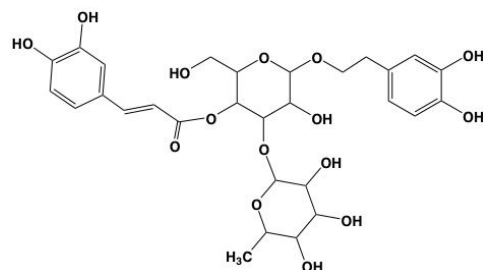


図 4 Acteoside

粗酵素溶液における NGT 活性の検討では、糖受容体としてトリプトファン、Trichotomine、Trichotomine G1 をそれぞれ

使用して、糖供与体としてUDP-グルコースを使用して活性の検討を行ったが、配糖化された生産物を獲得するには至らなかった。活性が確認できなかった原因としては酵素反応の条件が異なっていること、または使用する基質が異なっていることが考えられた。しかし、反応条件は他のN-結合配糖化酵素の文献に報告されている条件と同様であることから、おそらく糖受容体が異なっていることが考えられた。これまでの植物色素の配糖化酵素の研究から、UGTは細胞質で配糖化を行い、その後に配糖体物質は液胞へ輸送されてさらに修飾を受けることが知られている。トリコトミンも液胞に蓄積しており、カルスからの抽出物では配糖化が途中段階の構造のトリコトミン分子種も検出されることから、研究当初は、非配糖体であるトリコトミンを糖供与体として配糖化が行われていると想定していた。しかし、今回、配糖化活性を検出できなかったことから、NGTはトリコトミンが形成される以前に配糖化が起こっていることが示唆された。他に活性の検討としてはトリプタミンを糖受容体として反応を確認する予定である。現時点では、配糖化はトリプタミンもしくはトリコトミンとして二量体を形成しているインドール環の分子構造が糖受容体になると考えている。この推定のもとトリコトミンを分解して単量体構造を獲得できないか検討を行ったがこちらも好ましい結果は得られなかった。今後は、まずトリコトミン合成カルスと非合成カルスにおける遺伝子発現の比較を、再度次世代シーケンスを行うことで調査する。これにより白色カルスにおいて特異的に発現していない、もしくは発現が低下している遺伝子を抽出し、トリコトミン合成経路の解析を進める。また、今回の研究ではトリコトミン合成カルスのノックダウン体の作出には至らなかったため、今後は候補遺伝子についてノックダウン体の作出を行う。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/~ozeky/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小関 良宏(OZEKI, Yoshihiro)

東京農工大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：50185592

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし