

日本植物学会企画シンポジウム 植物科学最前線

「多様な物質を生み出す力 - 二次代謝の機能と制御

オーガナイザー

加藤 美砂子

お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科ライフサイエンス専攻
〒112-8610 文京区大塚 2-1-1

青木 俊夫

日本大学生物資源科学部
〒252-0880 神奈川県藤沢市亀井野 1866

本特集は、日本植物学会第 75 回大会のシンポジウム「多様な物質を生み出す力 - 二次代謝の機能と制御-」の内容を総説にして取りまとめたものです。このシンポジウムは、最近の植物科学研究の手法、現状、今後の展開について発表・討議する総説的・教育的なシンポジウムとして日本植物学会広報委員会によって企画されました。

かつて、植物の二次代謝は必須の一次代謝とは異なり、植物の生活には直接必要ではない物質の代謝であると認識されていました。しかし、近年の研究技術の進歩と相まって、二次代謝研究は飛躍的な展開を遂げ、二次代謝産物の積極的な役割が注目を浴びています。生体防御の手段として、昆虫等の誘因物質として、シグナル伝達物質として等々、まさに、長い歴史の中で植物が備え持つようになった生存戦略に二次代謝は大きな貢献をしています。多彩という言葉がよく似合う二次代謝産物の構造の多様性は、複雑に進化した生合成系の酵素に支えられ、それが生物多様性へつながっています。本シンポジウムでは、こうした二次代謝産物をつくりだす原動力に焦点をあて、さまざまな角度から二次代謝研究にアプローチしている若手・中堅研究者を精選し、講演をお願いしました。

本特集は、講演者の最新の研究成果を盛り込んだ内容をまとめました。魅力的な二次代謝ワールドへ皆様を誘います。本特集を十分にお楽しみいただき、皆様の今後の研究の糧としてくださいれば嬉しく思います。

黄花ツバキ属植物キンカチャの花色発色機構

谷川 奈津

農業・食品産業技術総合研究機構 花き研究所

〒305-8519 茨城県つくば市藤本 2-1

The mechanism of yellow flower coloration of *Camellia chrysanthra*

Key words: aluminum; *Camellia chrysanthra*; flavonols; yellow flower.

Natsu Tanikawa

National Institute of Floricultural Science, National Agriculture and Food Research Organization

2-1 Fujimoto, Tsukuba, Ibaraki 305-8519, Japan

1. はじめに

ツバキ属植物は、中国南部を中心にアジア東南部に広く分布し、現在約250種以上が知られている。このうち古くから花の観賞を目的に利用されてきたのは、日本のヤブツバキ (*Camellia japonica*)、ユキツバキ (*C. rusticana*) サザンカ (*C. sasanqua*)、中国のトウツバキ (*C. reticulata*) で、これらを中心にツバキの園芸品種は発達してきた(箱田 2006)。欧米において種間雑種品種育種が盛んに行われるようになり、ここ数十年は日本でも中国やベトナムから導入された様々な種を用いた種間交雑育種が盛んになっている(吉川&吉川 1990)。ツバキ園芸品種の花色は、白やアンチシアニン色素による桃～赤の範囲にあり、濃黄色花色のものが無い。そのため濃黄色花色品種を作り出すことが大きな育種目標の一つになっている。黄色品種作出の交配親として期待されているのが、黄色花色を有するツバキ属植物である。黄花ツバキ属植物は、中国南部からベトナム北部を中心に約50種が分布していることが報告されている(箱田 2006)。このうち1965年に中国南部の廣西壯族自治区で報告された鮮やかな濃黄色花色のキンカチャ (*Camellia chrysanthra*, 金花茶) (Hu 1965)が、黄色品種育成のために最も利用されているツバキ属植物である。

黄花ツバキ属植物の花色に関する研究は、主にキンカチャにおいて進められてきた。キンカチャの黄色花色の発色の仕組みについては長い間議論をされてきた。多くの植物では、濃黄色花色はカロテノイド色素によって発色している。キンギョソウやカーネーションのように、黄色フラボノイドのオーロンやカルコンによって発色している植物もある。キンカチャ花弁には、3種類のフラボノール(いずれもケルセチン誘導体)とカロテノイドが存在することが報告されていた(Miyajima et al. 1985, Scogin 1986)。キンカチャ花弁では、表皮細胞の液胞部分が黄色く発色していることが観察されるので、水溶性化合物の関与が考えられ、3種類のフラボノイドのうち淡黄色色素であるケルセチン 7-グルコサイドがキンカチャの主要黄色色素であるとされてきた(Miyajima et al. 1985)。しかし、ケルセチン 7-グルコサイドはごく淡い黄色色素であるため、キンカチャの濃い黄色発色を担う色素としては疑問が残されていた。

キンカチャは年によって黄色の濃淡の異なる花を咲かせたり、互いにクローンであるはずの接

木苗が個体ごとに黄色の濃淡の異なる花を咲かせたりする。このことから、キンカチャの黄色発色には何か不安定な発色要因が存在すると考えられた。ケルセチン誘導体にはアルミニウムと錯体を形成して濃黄色を発色する性質があり、キンカチャと同じ *Thea* 亜属に分類されるチャ (*C. sinensis*, 茶) (Chang & Bartholomew 1984) は、代表的なアルミニウム蓄積植物である (Chenery 1955, Matsumoto et al. 1976)。これらのことについて着目し、キンカチャ花弁の黄色発色におけるアルミニウムの関与について実験を行った。

2. 黄花ツバキ属植物の花弁に含まれるカロテノイド

キンカチャ花弁でも、カロテノイドは生合成されており、カロテノイドを蓄積する細胞内小器官のクロモプラスチド粒子が観察されている (Miyajima et al. 1985)。蓄積量が少ないとされているものの、カロテノイドに関する具体的な含有量や成分組成についての報告は少ない。そこでキンカチャをはじめとする 7 種の黄花ツバキ属植物について、HPLC (high performance liquid chromatography) 分析により花弁のカロテノイドの含有量や成分について調べた (谷川ら 2010)。7 種の黄花ツバキ属植物の花弁に含まれる総カロテノイド含有量は、ルテイン等量で 0.8~11.3 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FW であった (表 1)。淡黄色花色のトルコギキョウ花弁のカロテノイド含有量がルテイン等量で 16 nmol $\cdot \text{g}^{-1}$ FW (9 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FW に相当) と報告されており (Nakayama et al. 2006)，これと比較していずれも同程度以下であった。したがってこれらの黄花ツバキ属植物では、カロテノイドは多少は花弁の黄色発色に寄与していると考えられるものの、濃黄色の発色には充分な濃度ではないことが示された。カロテノイド成分として、violaxanthin, luteoxanthin, (9Z)-violaxanthin, antheraxanthin, β -cryptoxanthin, β -carotene が検出された。これらはいずれも両端に β 環をもつ β -カロテン誘導体である。また、いずれの種も同様なカロテノイド成分組成であり、黄花ツバキ属植物では、花弁のカロテノイド生合成系や蓄積能力において種間差が小さいという傾向が認められた (表 1)。

表 1. 黄花ツバキ属植物の花弁のカロテノイド

2, Violaxanthin; 3, luteoxanthin 4, (9Z)-violaxanthin; 7, antheraxanthin; 8, β -cryptoxanthin; 9, β -carotene。
1, 5, 6 は未同定のカロテノイド成分。(谷川ら 2010)

花の数	分析した 総カロテノイド含有量 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FW) ^y	カロテノイド成分の組成比 (%)										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	Others	
<i>C. chrysanthia</i> (No. 564)	n=3	0.8 ± 0.4 ^x	4.4	12.2	15.5	19.9	10.9	3.4	13.7	4.7	1.8	13.5
<i>C. chrysanthia</i> (No. 566)	n=2	11.3	7.0	21.8	8.7	27.7	9.9	2.4	9.5	1.9	1.2	9.9
<i>C. chrysanthia</i> var. <i>phaeopubisperma</i>	n=4	2.4 ± 0.4	4.3	9.1	12.3	23.4	12.7	4.2	14.4	4.1	3.2	12.3
<i>C. cucphuongensis</i>	n=5	1.6 ± 0.3	5.1	4.5	8.2	23.0	18.4	— ^z	23.3	2.0	4.3	11.2
<i>C. fusuiensis</i>	n=3	3.9 ± 0.5	8.7	14.4	4.5	29.3	12.8	1.7	14.7	1.9	3.2	8.8
<i>C. impressinervis</i>	n=2	2.1	4.7	18.7	10.9	26.6	9.7	8.3	5.8	1.3	4.0	10.0
<i>C. ptilosperma</i>	n=3	3.8 ± 0.6	7.7	16.6	7.2	25.0	14.5	—	14.4	2.2	2.2	10.2
<i>C. quephongensis</i>	n=3	7.4 ± 1.2	3.9	11.5	6.4	29.1	16.7	1.2	15.0	2.3	5.4	8.5

^z—：検出不可

^yルテイン等量

^x3花以上測定できたものについて標準誤差 (SE) を付した。

3. キンカチャの黄色花色発色機構

同じキンカチャ系統から枝を採集して接ぎ木増殖した株でありながら、濃黄色花を咲かせる個

体（図 1a）と淡黄色花を咲かせる個体（図 1b）が生じる。これらの花弁を比較することで、キンカチャの濃黄色発色の仕組みの解明を試みた。対照として白いヤブツバキ（図 1c）の花を用いた。

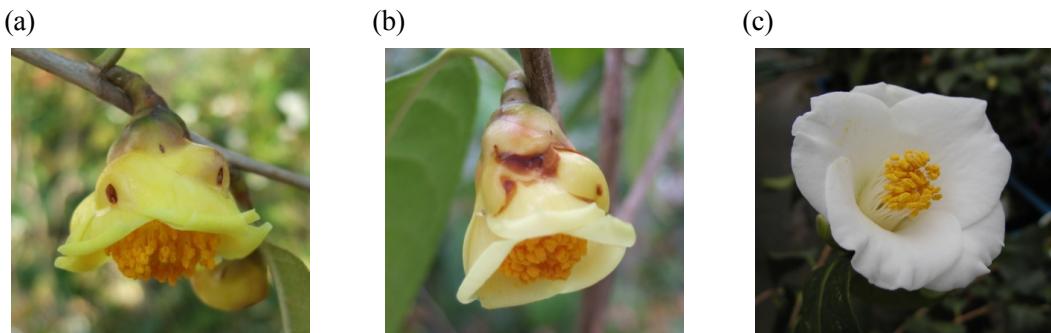


図 1. (a) 濃黄色キンカチャ, (b) 淡黄色キンカチャ, (c) 白色ヤブツバキ (Tanikawa et al. 2008)

3-1. 花弁の吸収スペクトル

人間は、およそ 400-500 nm の波長の光を吸収する物質を黄色として認識する。多くのカロテノイドは約 440 nm 付近に 2 つか 3 つの吸収極大を伴い、400-500 nm の波長領域に大きな吸収を持つため、カロテノイドを作る花では鮮やかな濃い黄色の花色になる。一方、フラボノイドは一般に約 360 nm 付近に吸収極大を持ち、400-500 nm の波長領域における光の吸収が小さいため、フラボノイドによる花色は、無色、あるいは淡い黄色にとどまる。

キンカチャ花弁の吸収スペクトルを測定したところ、カロテノイドのスペクトルとは異なり、420 nm 付近に吸収極大が認められた（図 2）。白いヤブツバキでは、400-700 nm の波長領域で吸収極大は認められず、吸収もキンカチャと比べて小さいことが示された。

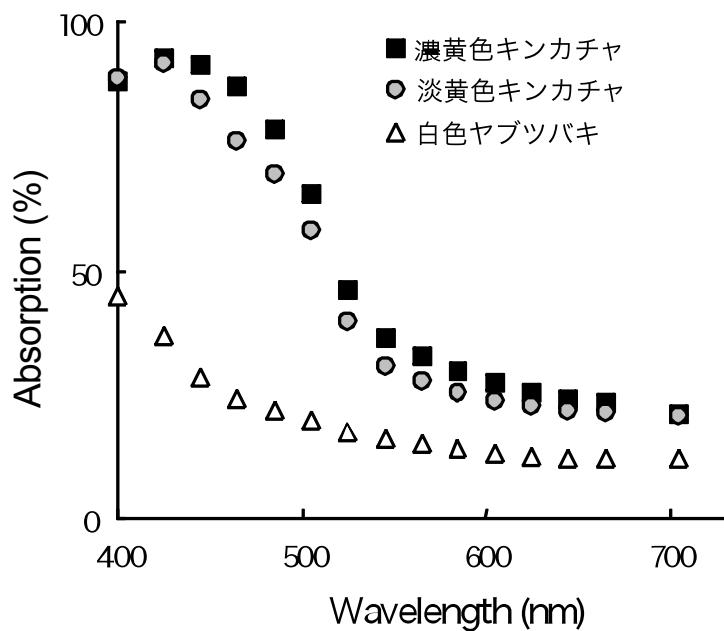


図 2. キンカチャおよび白色ヤブツバキ花弁の吸収スペクトル (Tanikawa et al. 2008)

3-2. キンカチャ花弁の pH, フラボノイド, アルミニウム

キンカチャの濃黄色花と淡黄色花, および白色ヤブツバキの花弁について, pH, 主要フラボノイド成分とアルミニウムの含有量を調べた。pH はすり潰した花弁について測定した。フラボノイドは, HPLC により 360 nm の光波長で検出することで分析を行った。アルミニウム含有量は ICP-AES 分析（誘導結合プラズマ発光分光分析）により測定した。フラボノイドには pH が高いほど黄色化する性質がある。濃黄色キンカチャ花弁と淡黄色キンカチャ花弁の pH は, いずれも同じ 5.8 であった（表 2）。濃黄色花弁と淡黄色花弁のいずれからも, 3 種類のフラボノール, ケルセチン 3-ルチノサイド, ケルセチン 3-グルコサイド, ケルセチン 7-グルコサイド（図 3）が検出された。それぞれの含有量は, キンカチャの主要黄色色素として報告されているケルセチン 7-グルコサイドを含めて, 濃黄色花弁と淡黄色花弁で大きな違いは認められなかった（表 2）。一方, アルミニウム含有量は, 濃黄色花弁と淡黄色花弁で大きな違いが認められた。濃黄色花弁のアルミニウム含有量は, 淡黄色花弁よりも約 3 倍高かった（表 2）。白いヤブツバキの花弁の pH は 4.2 であり, キンカチャの花弁より低かった。ヤブツバキもアルミニウムを蓄積する植物であるが (山田 1980), 本研究で使用した花ではアルミニウム含有量が濃黄色キンカチャ花弁の 21% と少なかった。また HPLC クロマトグラムにおいてフラボノイドと推定されるピークは非常に小さく, ヤブツバキの花弁ではフラボノイドをほとんど蓄積しないことが示唆された。

表 2. 花弁の pH, 主要フラボノイド成分とアルミニウムの含有量 (Tanikawa et al. 2008)

	濃黄色キンカチャ	淡黄色キンカチャ	白色ヤブツバキ
pH	5.8 ± 0.1	5.8 ± 0.1	4.2 ± 0.1
成分含有量 ($\mu\text{mol/g FW}$)			
ケルセチン 7-グルコサイド	1.75 ± 0.09	1.64 ± 0.04	—
ケルセチン 3-ルチノサイド	2.42 ± 0.14	2.04 ± 0.07	—
ケルセチン 3-グルコサイド	0.67 ± 0.03	0.55 ± 0.02	—
総フラボノール	4.84 ± 0.25	4.23 ± 0.11	—
アルミニウム	2.33 ± 0.18	0.79 ± 0.08	0.48 ± 0.05

—: 検出不可

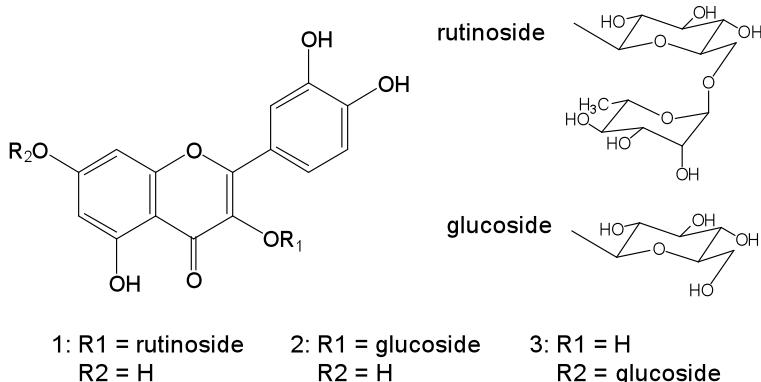


図 3. キンカチャ花弁に含まれる 3 種類のフラボノール

1, ケルセチン 3-ルチノサイド; 2, ケルセチン 3-グルコサイド; 3, ケルセチン 7-グルコサイド

3-3. フラボノイドに対するアルミニウムの作用

キンカチャ花弁に含まれる主要フラボノールの一つであるケルセチン 3-ルチノサイドを、キンカチャ花弁と同じ pH 5.8 の 0.1 M 酢酸緩衝液で 50 μM 濃度の溶液に調整した。このときケルセチン 3-ルチノサイド溶液はほぼ無色で(図 4a-0)，約 350 nm に吸収極大があり，400-500 nm の波長領域にはほとんど吸収が認められない吸収スペクトルを示した(図 4b-0)。これに 0.1 M 酢酸緩衝液(pH 5.8)に溶解した塩化アルミニウムを，0 μM から 50 μM になるように 5 μM ずつ添加していき，溶液の色の変化とそれに伴う吸収スペクトルの変化を調べた。添加したアルミニウム量が増加するにつれて，吸収極大が 350 nm から約 420 nm に移動し，400-500 nm の波長領域における吸収が増加するとともに(図 4b)，溶液の黄色が濃く発色した(図 4a)。キンカチャ花弁の吸収スペクトルにおける吸収極大も約 420 nm であり(図 2)，ケルセチン 3-ルチノサイドとアルミニウムによって形成される吸収スペクトルの特徴と類似していることが示された。

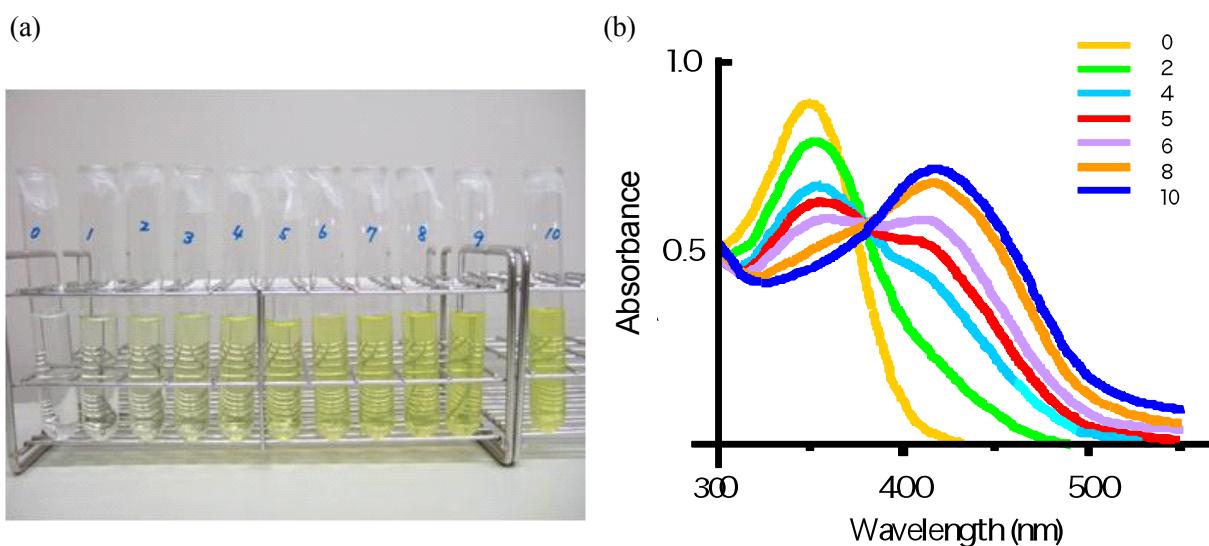


図 4. アルミニウムを添加したケルセチン 3-ルチノサイド溶液の色と吸収スペクトル

(a) 50 μM ケルセチン 3-ルチノサイドに AlCl_3 を 0 μM (左端) から 50 μM (右端) まで 5 μM ずつ添加したときの溶液の色の変化 (0.1 M 酢酸緩衝液, pH 5.8)。(b) 各溶液の吸収スペクトル。スペクトルの番号は(a)の溶液の番号に対応。(Tanikawa et al. 2008)

3-4. 陽イオン交換クロマトグラフィーを用いてアルミニウムの影響を調べる

キンカチャ花弁から黄色色素を蒸留水(DIW)で抽出し，一部を陽イオン交換樹脂に通して，抽出液中のアルミニウムを含む陽イオン類の除去を試みた。DIW 抽出液，カラム処理液，カラム処理液に塩化アルミニウムを添加した溶液，それぞれを 0.1 M 酢酸緩衝液(pH 5.8)に調整し，溶液の色と吸収スペクトルを比較した。DIW 抽出液(図 5a-1)を陽イオン交換樹脂に通すと，溶液の黄色が淡くなり(図 5a-2)，420 nm 付近の吸収が減少した(図 5b-2)。これに塩化アルミニウムを添加すると黄色の濃さが回復するとともに(図 5a-3)，420 nm 付近の吸収も回復した(図 5b-3)。DIW 抽出液の吸収スペクトルで，はっきりとした 420 nm の吸収極大が認められなかつたのは，クエン酸などの有機酸類にもアルミニウムイオンをキレートする性質があるため(Hue et al. 1986)，無傷な状態での花弁と異なり，花弁組織をすりつぶしたことで生じる様々な有機物によってアルミニウムイオンがキレートされたことが一因ではないかと考えられた。

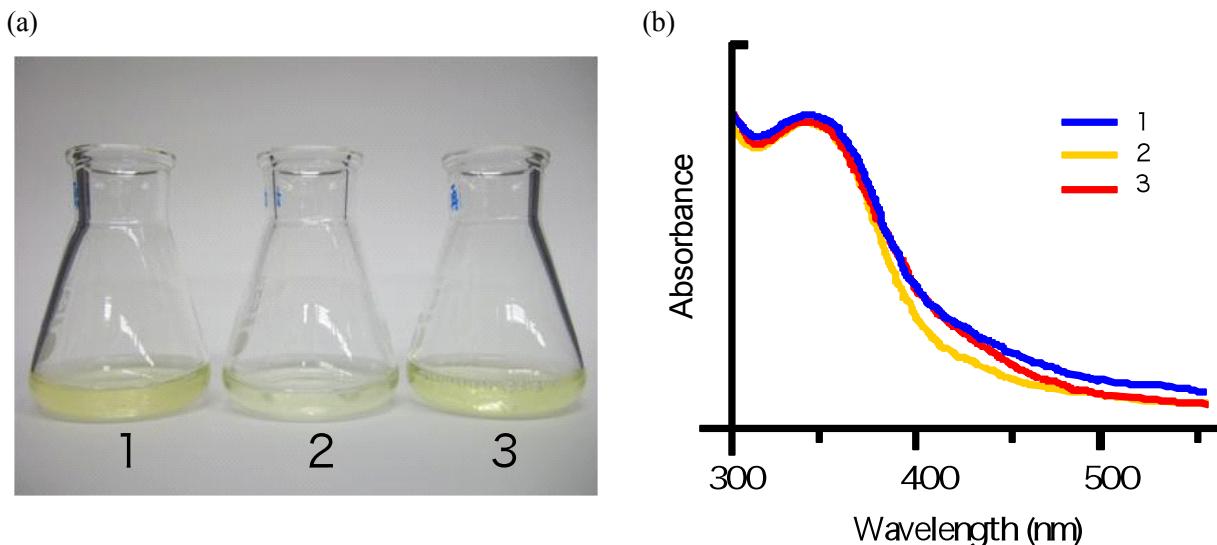


図 5. キンカチャ花弁の抽出液の色と吸収スペクトル

(a)溶液の色。1, 花弁抽出液; 2, 陽イオン交換カラム処理液; 3, 陽イオン交換カラム処理液に AlCl_3 を添加したもの (いずれも 0.1 M 酢酸緩衝液, pH 5.8)。(b)各溶液の吸収スペクトル。スペクトルの番号は(a)の溶液の番号に対応。(Tanikawa et al. 2008)

4. 結論

以上の結果から、キンカチャの黄色花色は花弁に蓄積されるフラボノールのケルセチン誘導体とアルミニウムの相互作用によって発色すると結論した。アルミニウムイオンは、フラボノールの A 環の 3 位および 5 位の水酸基の他、B 環の *o*-ジヒドロキシル基に結合する (Markham & Mabry 1968)。キンカチャ花弁の 3 種類のケルセチン誘導体は、いずれも B 環に *o*-ジヒドロキシル基を有しており、アルミニウムのキレート結合により黄色の濃色化に貢献しうる。

これまでアントシアニン色素による青色花色の発色において、アルミニウムなどの金属イオンを必要とする例が報告されており、アジサイ (アルミニウム), ツユクサ (マグネシウム), ヤグルマギク (鉄, マグネシウム, カルシウム), サルヴィア (マグネシウム) (Takeda 2006), ケシ (鉄, マグネシウム) (Yoshida et al. 2006), チューリップの花底部分 (鉄) (Shoji et al. 2007) の報告がある。金属イオンによって黄色花色を発色する植物についてはこれまで例がなく、キンカチャが初めての報告であると考えている。

5. おわりに

万葉集 12 卷 3101 に「紫は 灰さすものぞ 海石榴市の 八十の街に 逢へる子や誰」という歌がある。「海石榴」とはツバキのことである。布の染色においてツバキの灰が紫染めに用いられたことから、このような表現が生まれた。ツバキの灰分はアルミニウム塩が多くて鉄塩が少ないため、紫染めの際にタンニン質が発色せず、紫色が美しく発色するのだという (資源植物事典 1949)。こうしてみると、キンカチャの花は自分自身をアルミニウムによって染めているかのようである。

キンカチャは 1979 年に日本に導入され、翌 1980 年からキンカチャを使った交雑育種が開始された (箱田 2006)。以来 30 年の間に多くのキンカチャ雑種品種が作出されている。しかし、これら雑種品種の花色はクリーム色ないしは淡黄色の範囲にあって、鮮やかな濃い黄色花色の品種は作出されていない (箱田 2006, Hwang et al. 1992, 西本ら 2004)。これまで行われた交雑育種では、

キンカチャの交配相手に白花のヤブツバキ系品種を用いた例が多いようである(箱田 2006)。今回調査した白いヤブツバキでは、pHはキンカチャ花弁より低く、フラボノイドについてはほとんど蓄積が認められなかった。しかし白花ヤブツバキとキンカチャの交配で得られた雑種後代では、花弁にフラボノイドを蓄積し、総フラボン・フラボノール含有量ではキンカチャと同等またはそれ以上の含有量を有する系統も存在すると報告されている(西本ら 2004)。これらは、pHや生合成されるフラボノイドの種類、アルミニウムの蓄積量において、濃黄色花色を発色する条件を満たしていないのかもしれない。花弁のpHが高く、アルミニウムとの結合により黄色化するケルセチンタイプのフラボノイドを蓄積する雑種後代が作出されれば、より濃い黄色を発色するものと考えられる。また、その黄色発色の仕組みから、淡い黄色の雑種後代系統であってもできるだけ黄色を濃く発色させて観賞するには、アルミニウム含有量の多い培土に植える、あるいは地植えでじっくり育ててアルミニウムの蓄積を待つといったことも効果があるのではないかと推定される。

「濃黄色花色はカロテノイドにより発色し、淡黄色花色はフラボノイドにより発色している」という一般則は、時に先入観となり、見た目の黄色の濃さにもとづいてカロテノイドかフラボノイドのどちらか一方の分析実験を行い、他方の分析を行うことなく、その花色発色について論じられてしまう場合がある(Nakayama et al. 2006)。また、カロテノイドとフラボノイドが共存する花も多く存在する。こういった植物において、それぞれの化合物の黄色発色における貢献度を評価するには、花弁そのものの吸収スペクトルや反射スペクトルを測定して判別するなど、慎重な議論が必要と感じている。黄色花色の発色に金属が関与する植物が他にも存在するのかは、今後の興味深い課題である。今回のキンカチャの実験のように、花弁の吸収スペクトルを測定して420 nm付近の吸収極大を指標にすることで、フラボノイドと金属によって黄色花色を発色している植物が見出されることが期待される。

引用文献

- Chang, H. T. & Bartholomew, B. 1984. *Camellias*. B.T. Batsford Ltd., London.
- Chenery, E. M. 1955. A preliminary study of aluminium and the tea bush. *Plant Soil* 6: 174-200.
- 箱田直紀 2006. 黄花ツバキの系譜と育種の現状. 恵泉女学園大学園芸文化研究所報告 3: 43-69.
- Hu, H. H. 1965. New species and varieties of *Camellia* and *Theopsis* of China (1). *Acta Phytotax. Sinica* 10: 131-142.
- Hue, N. V., Craddock, G. R. & Adams, F. 1986. Effect of organic acids on aluminum toxicity in subsoils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 50: 28-34.
- Hwang, Y. J., Yoshikawa, K., Miyajima, I. & Okubo, H. 1992. Flower colors and pigments in hybrids with *Camellia chrysanthus*. *Sci. Hortic.* 51: 251-259.
- Markham, K. R. & Mabry, T. J. 1968. A procedure for the ultraviolet spectral detection of *ortho*-dihydroxyl groups in flavonoids. *Phytochemistry* 7: 1197-1200.
- Matsumoto, H., Hirasawa, E., Morimura, S. & Takahashi, E. 1976. Localization of aluminium in tea leaves. *Plant Cell Physiol.* 17: 627-631.
- Miyajima, I., Uemoto, S., Sakata, Y., Arisumi, K. & Toki, K. 1985. Yellow pigment of *Camellia chrysanthus* Flowers. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.* 29: 257-266.

- Nakayama, M., Miyasaka, M., Maoka, T., Yagi, M. & Fukuta, N. 2006. A carotenoid-derived yellow *Eustoma* screened under blue and ultraviolet lights. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 75: 161-165.
- 西本慎一・橋本文雄・清水圭一・坂田祐介 2004. キンカチャ×ヤブツバキ種間雑種の花色. 園学雑. 73: 189-191.
- Scogin, R. 1986. Floral pigments of the yellow *Camellia*, *Camellia chrysanthia* (Theaceae). *Aliso* 11: 387-392.
- 資源植物事典. 1949. ツバキの項. pp. 465-467. 北隆館. 東京.
- Shoji, K., Miki, N., Nakajima, N., Momonoi, K., Kato, C. & Yoshida, K. 2007. Perianth bottom-specific blue color development in tulip cv. Murasakiuishi requires ferric ions. *Plant Cell Physiol.* 48: 243-251.
- Takeda, K. 2006. Blue metal complex pigments involved in blue flower color. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* 82: 142-154.
- Tanikawa, N., Kashiwabara, T., Hokura, A., Abe, T., Shibata, M., & Nakayama, M. 2008. A peculiar yellow flower coloration of camellia using aluminum-flavonoid interaction. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 77: 402-407.
- 谷川奈津・山溝千尋・大宮あけみ 2010. 黄花ツバキ属植物の花弁のカロテノイド成分. 花き研報. 10: 75-79.
- 山田秀和 1980. ツバキ科植物のフッ素吸収に関する生物地球化学的研究. 京都府立大学学術報告 農学 32: 138-170.
- 吉川和男・吉川宜宏 1990. ツバキの種間交雑について. 西武舞鶴植物研究所報告 5: 56-75.
- Yoshida, K., Kitahara, S., Ito, D., & Kondo, T. 2006. Ferric ions involved in the flower color development of the Himalayan blue poppy, *Meconopsis grandis*. *Phytochemistry* 67: 992-998.

植物由来テルペン生合成酵素遺伝子の効率的機能解析法の開発 —セスキテルペンを中心に—

原田 尚志

神戸天然物化学株式会社 バイオ創薬事業部 技術開発部
〒651-2241 神戸市西区室谷 1-1-1 KNC バイオリサーチセンター

Development of efficient functional analysis of plant terpene biosynthetic genes:
mainly of sesquiterpene biosynthetic genes

Key words: cytochrome P450; pathway engineering; sesquiterpene biosynthesis.

Hisashi Harada

Technology Development Dept., Biotechnology & Drug Discovery Div.,
KNC Laboratories Co., Ltd.

KNC Bioresearch Center, 1-1-1 Murodani, Nishi-ku, Kobe, 651-2241, Japan

1. はじめに

テルペン（テルペノイド・イソプレノイド）やフラボノイド、アルカロイド等のいわゆる二次代謝産物は、植物が生産する有機化合物の中でも特に多様性に富む化合物である。とりわけテルペン化合物は、これまでに植物を含め、動物、微生物などから約 40,000 種類が単離されており (Roberts 2007)，自然界で最も複雑な化合物集団を形成している。テルペン化合物には生理活性物質や機能性物質など、市場価値の高い化合物が数多く含まれることから、様々な分野で活用されている。例えば、クスノキから得られるモノテルペンのショウノウ（樟脑, camphor）は、古くから防虫剤、防腐剤、医薬品などとして用いられ、特に合成樹脂セルロイドの可塑剤として 20 世紀半ばまで世界の産業を支える重要な化合物であった。また、ヨモギの一種クソニンジン (*Artemisia annua*) に含まれるセスキテルペングラクトンであるアルテミシン (artemisinin) とその誘導体は、ハマダラカが媒介する原虫性疾患である熱帯マラリアに対し、現在最も有効な治療薬の一つである (White 2008)。タキソール (taxol) は太平洋イチイ (*Taxus brevifolia*) 樹皮に含まれるジテルペン化合物であり、制がん剤として卵巣がんや乳がんの治療に利用されている (Jennewein & Croteau 2001)。また、カニ、エビ、赤身魚などの海洋生物に多く含まれる赤色カルテノイドのアスタキサンチン (astaxanthin) は、優れた抗酸化特性を持つことから健康食品や化粧品、鶏卵や養殖魚の色揚げ剤などとして近年用いられている (Misawa 2009)。これら以外にも多くのテルペン化合物とその類縁体が、医薬品原料、健康食品、工業原料、香料、着色料、食品添加物、農薬などとして流通しており、産業界において非常に有用な化合物群であると言える。本稿ではテルペン最大の化合物群であるセスキテルペンに焦点を当て、大腸菌を利用したセスキテルペン化合物の生産システム、およびそれを利用した生合成関連酵素遺伝子の機能解析法の開発研究に関する話題を中心に、最近の知見を交えながら紹介する。

2. テルペソ化合物の生合成経路

天然から単離されるテルペソ化合物は、複雑な構造を持つものが数多く存在するが、その生合成初期経路は驚くほどシンプルで規則的である。テルペソ化合物の生合成は生物種を問わず、イソブレン骨格であるイソペントニル 2 リン酸 (IPP) とその異性体であるジメチルアリル 2 リン酸 (dimethylallyl diphosphate, DMAPP) を原料として、IPP の連続縮合によりグラニル 2 リン酸 (GPP), フアルネシル 2 リン酸 (FPP), グラニルグラニル 2 リン酸 (GGPP) 等の直鎖状イソブレノイドを生成することから始まる (Ajikumar et al. 2008)。この IPP の生合成経路には、メバロン酸を中間体とするメバロン酸経路と、メバロン酸が関与しない別の生合成ルートである非メバロン酸経路 (MEP 経路) が存在する (Harada & Misawa 2009)。メバロン酸経路は、植物、動物、酵母など真核生物の細胞質、一部の放線菌やアーキアに存在しており、MEP 経路は植物の色素体やバクテリアに存在している (Kuzuyama & Seto 2003)。この経路によって合成された GPP, FPP, GGPP 等を基質とし、テルペソ合成 (環化) 酵素によってモノテルペソ (C_{10}), セスキテルペソ (C_{15}), ジテルペソ (C_{20}), トリテルペソ (C_{30}), カロテノイド (C_{40} , テトラテルペソ) 等の様々なテルペソ化合物が合成される。植物においては、モノテルペソ、ジテルペソ、カロテノイドが色素体で、セスキテルペソとトリテルペソが細胞質で合成される (図 1)。さらに、合成されたテルペソ化合物は多くの場合、シトクロム P450 モノオキシゲナーゼ (cytochromes P450 monooxygenase, P450)

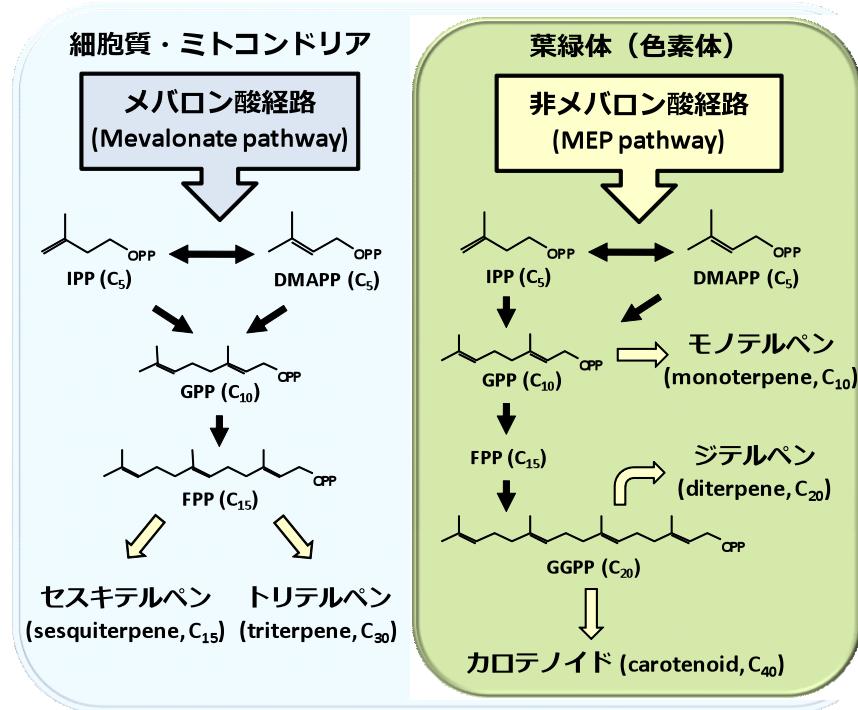


図 1 植物におけるテルペソ生合成経路

を始めとするテルペソ変換酵素による修飾反応等を経ることにより、多種多様な構造と機能を持つテルペソ化合物が合成されることが知られている。近年のゲノムプロジェクトの成果によると、高等植物の P450 遺伝子数は他の生物種と比べて桁違いに多く、シロイスナズナ (*Arabidopsis thaliana*) では 273 個、イネ (*Oryza sativa*) では 458 個もの P450 遺伝子の存在が確認されており (大村ら 2003)、多くの遺伝子が二次代謝産物の合成に関与

することが報告されている。したがって植物由来テルペソ化合物の種類や構造多様性は、テルペソ合成 (環化) 酵素だけではなく、テルペソ修飾酵素の種類と数にも依存していると考えられる。

3. 大腸菌を用いたテルペソ化合物の効率的生産システムの開発

天然より抽出、精製して得られるテルペソ化合物の量は一部の例外を除き少なく、有用なテルペソ化合物を著量得ることは困難な場合が多い。化学合成は重要なテルペソ化合物生産方法の一つであり、合成が比較的容易なモノテルペソやカロテノイドを中心に実用されている (Kusama et al. 2000, Jackson et al. 2008)。しかしながら化学合成法は、構造が複雑なテルペソ化合物の生産には、労力やコスト面から非効率である。そのため、植物や微生物を利用した、バイオテクノロジーによるテルペソ化合物の生産研究が近年盛んに行われてきた。

パスウェイエンジニアリング (pathway engineering) は、遺伝子組換えにより宿主生物の生合成経路を代謝工学的に改変して目的化合物を生産する技術であり、代謝工学や合成生物学分野で注目を集めている技術の一つである (Misawa 2011)。テルペソ化合物生産においては、植物、大腸菌、酵母などを中心に研究が進んでおり、特に遺伝子資源や情報が充実している大腸菌は、パスウェイエンジニアリング研究に頻繁に用いられている。大腸菌は他のバクテリアと同様、MEP 経路により IPP と DMAPP を合成しており、さらにそれに続く酵素により FPP まで合成できるが、その產生量はごく僅かである。そこで、菌体内の FPP 量増産を目的に様々な研究が行われてきた。IPP イソメラーゼ (IPP isomerase) は、IPP と DMAPP の異性化反応を両方向に触媒する酵素であるが、酵母由来 (1型) の IPP イソメラーゼ遺伝子 (*Scidi*) を大腸菌に高発現させると、FPP の产生量が上昇することが報告されている (Kajiwara et al. 1997)。MEP 経路内の 1-デオキシ-D-キシリロース 5-リン酸 (1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate, DXP) 合成酵素遺伝子 (*dxs*)、または DXP レダクトイソメラーゼ (DXP reductoisomerase) 酵素遺伝子 (*dsr*) を高発現させた場合でも、やはり FPP の増産に効果のあることが示されている (Albrecht et al. 1999)。しかしながら、これらの遺伝子を用いた場合でも、生産量はせいぜい数倍程度増加する程度であった。

これに対し、MEP 経路のみを持つ大腸菌に異種メバロン酸資化酵素遺伝子群を導入・発現させる方法での FPP 増産も試みられている。例えば Martin ら (2003) は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来のメバロン酸資化酵素遺伝子群と、アルテミシンの前駆体であるセスキテルペソのアモルファジエン (amorpha diene) 合成酵素遺伝子 (*ADS*) を共発現する大腸菌を用い、D-メバロン酸ラクトン (D-mevalonolactone, MVL) 存在下で培養すると、*ADS* のみを発現するコントロール株と比較して最大 36 倍ものアモルファジエン増産効果があることを報告している。一方筆者ら (2009) は、MVL よりも構造が単純でさらに安価である、アセト酢酸リチウム塩 (Li acetoacetate, LAA) を基質として利用できる生産系を開発した。本系では、放線菌 *Streptomyces* sp. CL190 株由来のメバロン酸資化酵素遺伝子群 (2型 *idi* を含む) に加え、*S. cerevisiae* 由来の 1型 *idi* と、アセト酢酸からアセトアセチル-CoA (acetoacetyl-CoA) を合成する酵素であるラット (*Rattus norvegicus*) 由来アセト酢酸-CoA リガーゼ (acetoacetate-CoA ligase) 遺伝子 (*Aacl*) を高発現するプラスミド (pAC-Mev/*Scidi/Aacl*) を構築した (図 2)。これらのプラスミドとリコペン (lycopene) 產生用プラスミド (pCRT-EIB) とを共導入した大腸菌を LAA 存在下で培養すると、pCRT-EIB のみのコントロール株と比較して約 12 倍(菌体乾重量 1 g 当たり 12.5 mg 相当)のリコペンを生産できた。さらに、pAC-Mev/*Scidi/Aacl* とハナショウガ (*Zingiber zerumbet*) より取得した α -フムレン (α -humulene)

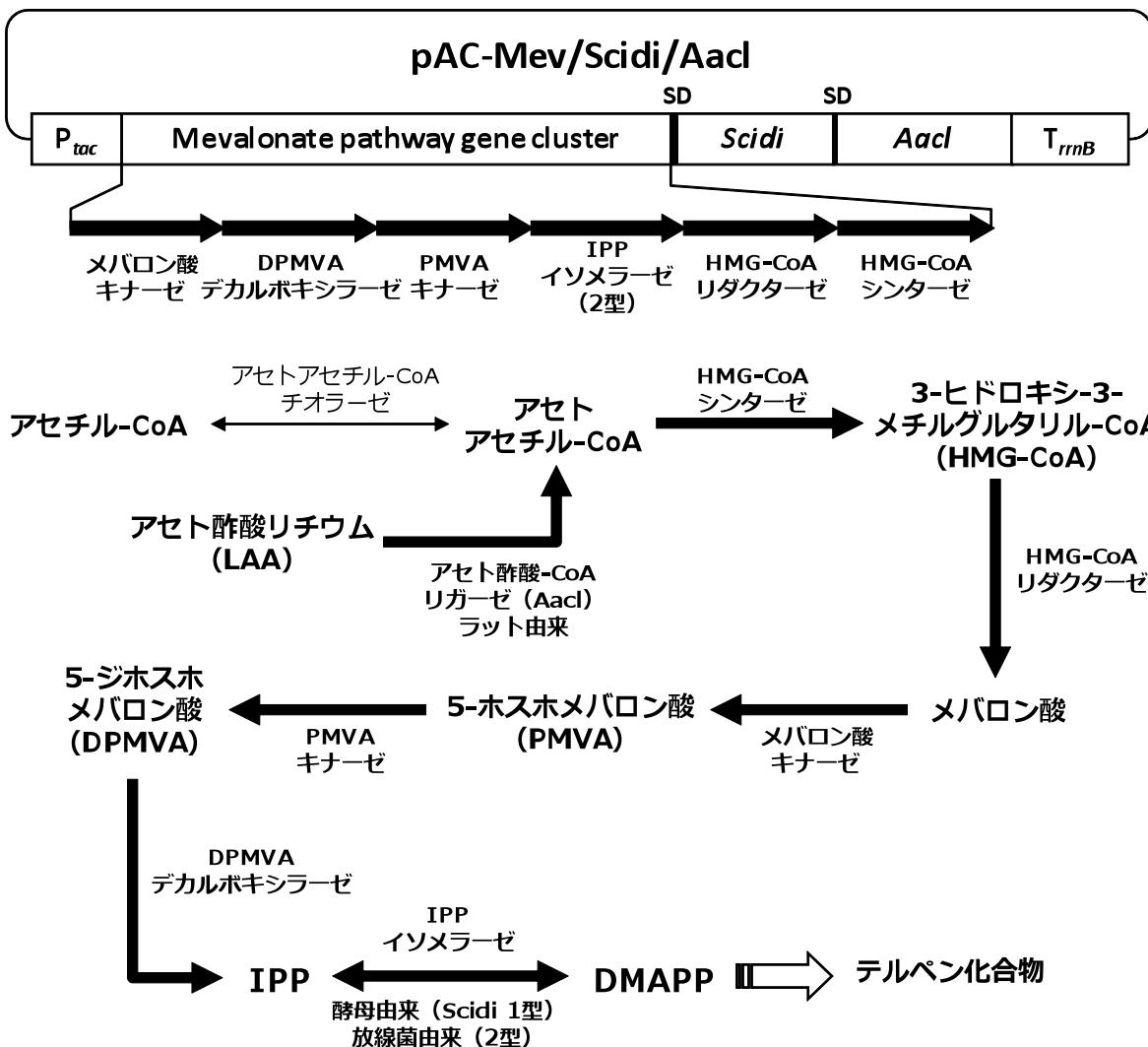


図 2 プラスミド pAC-Mev/Scidi/Aacl の構造と各酵素が触媒する代謝経路マップ。太矢印は pAC-Mev/Scidi/Aacl に含まれる酵素遺伝子を示す。

合成酵素遺伝子 (ZSSI) 発現プラスミドとを共導入した場合でも同様に、MVL または LAA を基質として ZSSI のみのコントロール株の約 11 倍（培養液 1 L 当たり 1 g 相当）の増産効果を示した。このように、外来のメバロン酸資化酵素遺伝子群を利用する方法は、大腸菌を利用したテルペノン化合物生産のためのパスウェイエンジニアリング研究において、現在のところ最も強力で効果的なツールである。

4. セスキテルペン生合成酵素の機能解析

メバロン酸資化酵素遺伝子群を発現する大腸菌を用いた生産システムは、新規に取得した植物由来セスキテルペン合成（環化）酵素遺伝子の機能解析にも非常に有用であると思われた。そこで筆者らは、ショウガ科植物を中心に既知配列を元に degenerate PCR にて取得した複数のセスキテルペン合成（環化）酵素の候補遺伝子について、上述のシステムにて機能解析を行った（図 3）。その結果、ハナショウガから得られた 5 個の候補遺伝子のうち、前述した ZSSI に加えて β -オイ

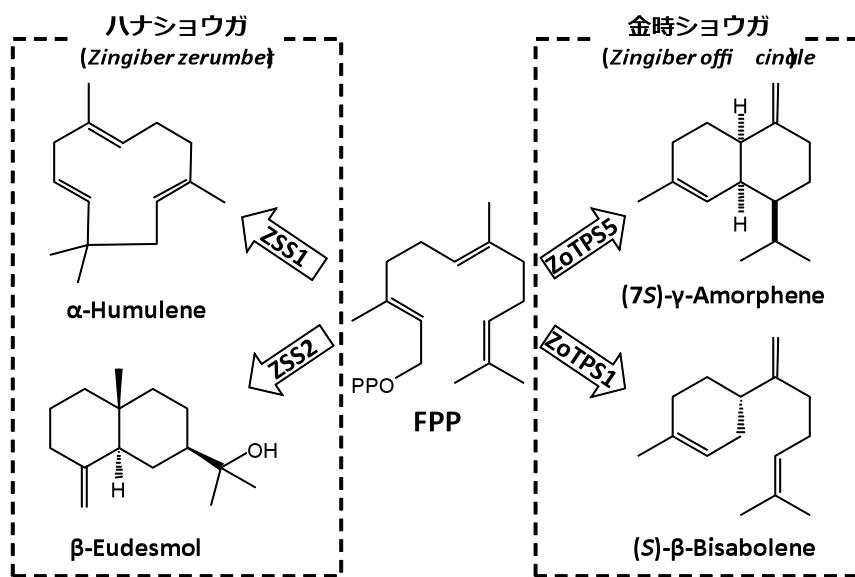


図3 ショウガ科植物より単離・機能同定したセスキテルペン合成（環化）酵素遺伝子。矢印中に酵素名を示した。

デスマール (β -eudesmol) 合成酵素遺伝子 (ZSS2) を機能同定に貢献した (Yu et al. 2008a & 2008b)。また、同じショウガ科植物である金時ショウガ (*Zingiber officinale*) から取得した 15 個の候補遺伝子のうち、既知遺伝子であるゲルマクレン D (germacrene D) 合成酵素遺伝子 (ZoGDS) の他に、新規遺伝子である β -ビサボレン (β -bisabolene) 合成酵素遺伝子 (ZoTPS1)

と、 γ -アモルフェン (γ -amorphene) 合成酵素遺伝子 (ZoTPS5) の機能同定に成功した (Fujisawa et al. 2010)。さらにこの系を用い、キリンホールディングス（株）の杉村らは京都大学の矢崎らと共に、アサ科植物でビールの原料にも用いられているホップ (*Humulus lupulus*) より、モノテルペノンのリナロール (linalool) とセスキテルペンのネロリドール (nerolidol) を同時に合成する酵素遺伝子 (*HILIS/NES*) の機能同定に成功している (杉村ら 2010)。

セスキテルペン化合物の構造多様性は、合成酵素の種類以外にもそれに続く酵素、すなわちセスキテルペンの修飾反応を担う修飾酵素の多様性に起因するところが大きい。植物がつくる様々な二次代謝産物と同様に、セスキテルペンの生合成にも P450 を介した修飾反応が重要な役割を果たしている。例えば、アルテミシニンの生合成において、ADS によってアモルファジエンが合成された後、P450 である CYP71AV1 を介した 3 段階の水酸化反応を経て、中間体のアルテミシニン酸 (artemisinic acid) へと変換されている (Arsenault et al. 2008)。また、綿花 (*Gossypium arboreum*) に含まれるファイトアレキシンであるゴシポール (gossypol) の生合成においては、 δ -カジネン (δ -cadinene) が δ -カジネン合成酵素 (CAS) によって合成された後、P450 である CYP706B1 によって 8-ヒドロキシ- δ -カジネン (8-hydroxy- δ -cadinene) へと代謝される (Luo et al. 2001)。P450 の生化学的な機能解析は、目的 P450 を大腸菌、酵母、昆虫細胞などで発現、精製した酵素を用いての *in vitro* による解析手法が一般的に用いられているが、比較的不安定な膜結合型酵素であることから、取り扱いが難しい場合が多い。そこで近年では、セスキテルペン合成から P450 による変換までの一連の反応を *in vivo* での方法、すなわち大腸菌や酵母によるバイオコンバージョン (bioconversion) を利用した方法についての報告も増えている。例えば、アルテミシニン酸までの生合成経路に必要な ADS, CYP71AV1, NADPH-P450 オキシドリダクター (NADPH-P450 oxidoreductase) を導入、発現させた大腸菌や酵母を用いて、培養液 1 L 当たり 100 ~ 300 mg 以上のアルテミシニン酸合成例が報告されている (Arsenault et al. 2008)。また 8-ヒドロキシ- δ -カジネンの場合においても同様に、CAS, CYP706B1, NADPH-P450 オキシドリダクター

ゼを導入した大腸菌にて、培養液 1 L 当たり 100 mg 程度の 8-ヒドロキシ- δ -カジネンが得られている (Chang et al. 2007)。

最近筆者ら (2011) は、前述したセスキテルペソ合成酵素遺伝子の機能解析系を改変することにより、効率的に P450 の機能解析が可能なシステムを開発した。このシステムでは、メバロン酸資化酵素遺伝子群の下流に P450 還元系酵素遺伝子を連結した発現プラスミドを作製し、これをセスキテルペソ合成遺伝子および P450 遺伝子の発現プラスミドと共に導入することにより、セスキテルペソ合成から P450 による修飾反応までを同時に行わせることが出来る。P450 還元系酵素遺伝子として、比較的汎用性が高いシロイヌナズナ由来の NADPH-P450 オキシドリダクターゼ 2 遺伝子 (*ATR2*)、シアノバクテリア *Nostoc* sp. PCC7120 由来のフェレドキシン (ferredoxin) とフェレドキシン還元酵素 (ferredoxin reductase) 遺伝子 (*NsFER* と *NsRED*)、金時ショウガ由来の NADPH-P450 reductase 遺伝子 (*ZoRED1* または *ZoRED2*) を連結したプラスミドを作製しているが、それ以外にも各種の P450 還元酵素遺伝子が連結可能である。これまでに本システムを利用して、ハナショウガに豊富に含まれるセスキテルペソであるゼルンボン (zerumbone) の生合成中間体であり、 α -フムレンの水酸化によって生成する 8-ヒドロキシ α -フムレン (8-hydroxy α -humulene) への反応を触媒する、 α -フムレン-8-ヒドロキシラーゼ (α -humulene-8-hydroxylase) 酵素遺伝子 (*CYP71BA1*) を機能同定することができた (図 4)。同様に、これまでには収量が少ないと正確

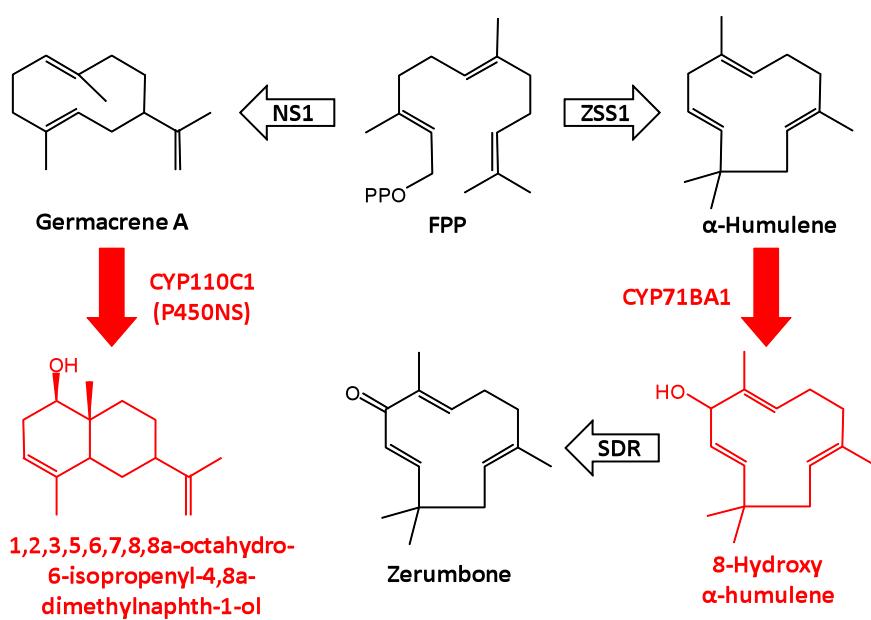


図 4 セスキテルペソの水酸化反応を行う P450 モノオキシゲナーゼの機能解析例。赤で示した部分が P450 による修飾反応を示す。

5. おわりに

ここまで植物由来のセスキテルペソを中心に、大腸菌による効率的な生産システムと生合成遺伝子の機能解析法について紹介した。セスキテルペソに限ったことではないが、植物がつくる多様なテルペソ化合物の生合成関連酵素およびその遺伝子の正体が徐々に明らかになりつつあるものの、生合成経路の全容が解明されているものはまだほんの僅かである。近年、代謝産物の網羅的解析を行うメタボロミクス研究やシステムバイオロジーといった研究分野が注目を集めており、

な機能同定が困難であつた、*Nostoc* sp. PCC7120 由来のゲルマクレン A (germacrene A) 水酸化を行う P450 遺伝子 (*CYP110C1*, *P450NS*, Agger et al. 2008) に関しても、1 L の培養菌体からゲルマクレン A 水酸化産物の精製と構造決定を行うことで機能同定に成功している

(図 4)。

個々の代謝関連分子だけではなくそれらのネットワークを考慮した研究が試みられてきている。これら多面的なアプローチからの研究によって、今後様々なテルペノイドの生合成経路が明らかになることを期待したい。

謝辞

本研究を進めるにあたりお世話になった、近畿大学農学部の内海 龍太郎先生、余 豊年氏、岡本 尚氏、日本女子大学家政学部の新藤 一敏先生、東京大学生物生産工学研究センターの葛山 智久先生、石川県立大学生物資源工学研究所の大山 菅爾先生、三沢 典彦先生、八反 順一郎氏、キリンホールディングス株フロンティア技術研究所の水谷 悟所長、梅基 直行氏、杉村 哲氏、藤澤 雅樹氏に、この場を借りて心より感謝申し上げる。

引用文献

- Agger, S.A., Lopez-Gallego, F., Hoye, T.R., Schmidt-Dannert, C. 2008. Identification of sesquiterpene synthases from *Nostoc punctiforme* PCC 73102 and *Nostoc* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 190: 6084-6096.
- Ajikumar, P.K., Tyo, K., Carlsen, S., Mucha, O., Phon, T.H. & Stephanopoulos, G. 2008. Terpenoids: Opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms. *Mol. Pharmaceutics* 5: 167-190.
- Albrecht, M., Misawa, N. & Sandmann, G. 1999. Metabolic engineering of the terpenoid biosynthetic pathway of *Escherichia coli* for production of the carotenoids β-carotene and zeaxanthin. *Biotechnol. Lett.* 21: 791-795.
- Arsenault, P.R., Wobbe, K.K., & Weathers, P.J. 2008. Recent advances in artemisinin production through heterologous expression. *Curr. Med. Chem.* 15: 2886-2896.
- Chang, M.C.Y., Eachus, R.A., Trieu, W., Ro, D.K., Keasling, J.D. 2007. Engineering *Escherichia coli* for production of functionalized terpenoids using plant P450s. *Nat. Chem. Biol.* 3: 274-277.
- Fujisawa, M., Harada, H., Kenmoku, H., Mizutani, S., & Misawa, N. 2010 Cloning and characterization of a novel gene that encodes (S)-β-bisabolene synthase from ginger, *Zingiber officinale*. *Planta* 232: 121-130; Erratum, 232: 131.
- Harada, H., & Misawa, N. 2009. Novel approaches and achievements in biosynthesis of functional isoprenoids in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84: 1021-1031.
- Harada, H., Yu, F., Okamoto, S., Kuzuyama, T., Utsumi, R. & Misawa, N. 2009. Efficient synthesis of functional isoprenoids from acetoacetate through metabolic pathway-engineered *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81: 915-925.
- Harada, H., Shindo, K., Iki, K., Teraoka, A., Okamoto, S., Yu, F., Hattan, J., Utsumi, R. & Misawa, N. 2011. Efficient functional analysis system for cyanobacterial or plant cytochromes P450 involved in sesquiterpene biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90: 467-476.
- Jackson, H., Braun, C.L. & Ernst, H. 2008. The chemistry of novel xanthophyll carotenoids. *Am. J. Cardiol.* 101: 50D-57D.
- Jennewein, S. & Croteau R. 2001. Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological

- applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 13-19.
- Kajiwara, S., Fraser, P.D., Kondo, K. & Misawa, N. 1997. Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 324: 421-426.
- Kusama, H., Hara, R., Kawahara, S., Nishimori, T., Kashima, H., Nakamura, N., Morihira, K. & Kuwajima, I. 2000. Enantioselective Total Synthesis of (-)-Taxol. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 3811-3820.
- Kuzuyama, T. & Seto, H. 2003. Diversity of the biosynthesis of the isoprene units. *Nat. Prod. Rep.* 20: 171-183.
- Luo, P., Wang, Y.H., Wang, G.D., Essenberg, M., & Chen, X.Y. 2001. Molecular cloning and functional identification of (+)- δ -cadinene-8-hydroxylase, a cytochrome P450 monooxygenase (CYP706B1) of cotton sesquiterpene biosynthesis. *Plant J.* 28: 95-104.
- Martin, V.J., Pitera, D.J., Withers, S.T., Newman, J.D. & Keasling, J.D. 2003. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat. Biotechnol.* 21: 796-802.
- Misawa, N. 2009. Pathway engineering of plants toward astaxanthin production. *Plant Biotechnol.* 26: 93-99.
- Misawa, N. 2011. Pathway engineering for functional isoprenoids. *Curr. Opin. Biotechnol.* Epub ahead of print.
- 大村恒雄, 石村翼, 藤井義明 2003. P450 の分子生物学. 講談社サイエンティフィク. 東京
- Roberts, S.C. 2007. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nat. Chem. Biol.* 3: 387-395.
- 杉村哲, 鶴丸優介, 原田尚志, 三沢典彦, 矢崎一史, 梅基直行 2010. ホップ (*Humulus lupulus L.*) におけるリナロール・ネロリドール合成酵素遺伝子の同定. 日本農芸化学会大会講演要旨集 p39
- White, N.J. 2008. Qinghaosu (artemisinin): the price of success. *Science* 18: 330-4.
- Yu, F., Okamoto, S., Nakasone, K., Adachi, K., Matsuda, S., Harada, H., Misawa, N. & Utsumi, R. 2008a. Molecular cloning and functional characterization of α -humulene synthase, a possible key enzyme of zerumbone biosynthesis in shampoo ginger (*Zingiber zerumbet* Smith). *Planta* 227: 1291-1299.
- Yu, F., Harada, H., Yamasaki, K., Okamoto, S., Hirase, S., Tanaka, Y., Misawa, N. & Utsumi, R. 2008b. Isolation and functional characterization of a β -eudesmol synthase, a new sesquiterpene synthase from *Zingiber zerumbet* Smith. *FEBS Lett.* 582: 565-572.

イソフラボノイド生合成酵素遺伝子のディスカバリー から見えてきた多様性

明石智義

日本大学生物資源科学部応用生物科学科

〒252-0880 神奈川県藤沢市龜井野1866

Diversity of enzymes in isoflavonoid pathway

Key words: isoflavanoid; P450; phytoalexin; prenyltransferase; soybean.

Tomoyoshi Akashi

Department of Applied Biological Sciences, Nihon University

Fujisawa, Kanagawa 252-0880, Japan

1. はじめに

植物界に広く分布するフラボノイドは非常に多様な構造を持つが、これらはいずれもフェニルプロパノイド (C6-C3) 由来のCoA エステルにマロニルCoA由来のC2 単位が縮合・閉環したカルコンより生合成される(Ayabe et al. 2010)。フラボノイドには色素成分や紫外光からの防御物質として働くものが知られている。また多くのマメ科植物では、エリシターに応答して特徴的なイソフラボノイド型ファイトアレキシンの生合成系が活性化する。マメ科ではプロカルパンやイソフラパン型の骨格を持つイソフラボノイドの多くが病原微生物からの防御に重要な役割を果たす一方、ダイズなどでは一部のイソフラボノイド（イソフラボン）が根粒細菌と共生して窒素固定を行う際の根粒細菌の遺伝子発現を誘導するシグナル物質となることも知られている (Dewick 1993)。

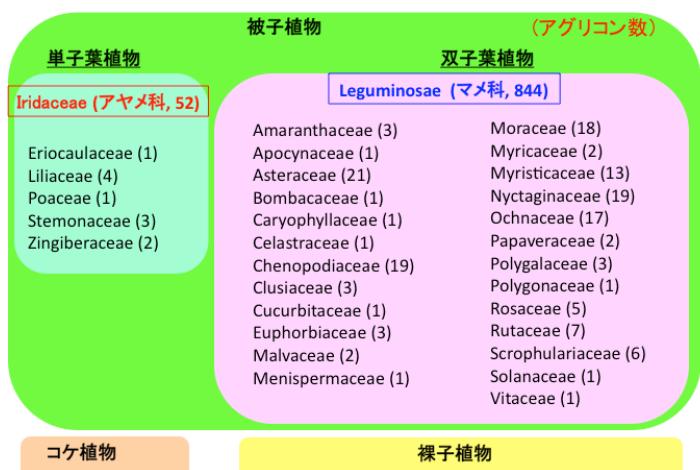
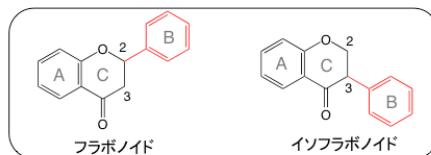


図1 植物におけるイソフランゴノイドの分布

ファイトアレキシン(vestitol)の生合成酵素遺伝子について、重複した遺伝子族ほぼすべてに至る網羅的な解析がなされた (Shimada et al. 2007)。これら生合成遺伝子の多くは、酵素精製とアミノ酸配列情報に基づくクローニングや、あらかじめタンパク質の種類がわかっている場合はコンセンサス配列に基づくPCRと異種細胞系での機能解析により同定されている (青木 2009)。私たちは塩基・アミノ酸配列情報を必要とせず、酵素活性を指標にして目的酵素を持つクローンを単離する「機能発現スクリーニング法」を最近用いている (Akashi et al. 2003 and 2005a)。この手法は植物cDNAを大腸菌や酵母などの異種細胞系で発現させ、目的の酵素活性を持つクローンを生化学的アッセイで取得し、原因遺伝子を同定するもので新規の遺伝子を取得する際に特に有効である。

本稿では、非マメ科植物でのイソフラボノイド生合成を取り上げ生合成系の分子進化を考察するとともに、マメ科のイソフラボノイドの修飾に関わる多様なプレニル転移酵素について紹介したい。

2. 单子葉アヤメ属植物のイソフラボノイド生合成機構

イソフラボノイドの約90%は双子葉のマメ科植物に存在するが、マメ科以外でもコケ植物、裸子植物、被子植物で存在が確認されている(Dewick 1993, Mackova et al. 2006, Reynaud et al. 2005)

(図1)。マメ科以外では特定の分類群に偏ることは少なく、散在的に分布している。しかし单子葉のアヤメ科アヤメ属(*Iris*)植物はマメ科に次いでイソフラボノイドを蓄積することが知られ、これまでに20種以上の植物で存在が確認されている。

イソフラボノイドの骨格は、イソフラボノイド合成酵素(IFs)によるアリール基転位を伴うヒドロキシル化反応によりフラバノンよりつくられるが、この反応はマメ科ではCYP93CサブファミリーのシトクロムP450 (P450)が担う(綾部・明石 2006, Ayabe and Akashi 2006) (図2)。イソフラボンは引き続くカルボキシルエステラーゼ様の脱水酵素による反応で2-ヒドロキシイソフラバノンよりつくられる (Akashi et al. 2005a)。なぜイソフラボノイドは限られた植物に存在するのであろうか? 私たちは、系統的に離れた植物が生産するイソフラボノイドの生合成機構を解析し、植物の系統進化と特異な二次代謝系の成立についての知見を得る目的でアヤメ属植物のIFs cDNAの同定を試みた。

イソフラボン配糖体を高蓄積するアヤメ属ジャーマンアイリス(*Iris germanica*)の培養不定根を誘導し(Akashi et al. 2005b), cDNAライブラリーを作成した。酵母発現系を用いた機能発現スクリーニングによりイソフラボノイド生成活性を示すシングルクローンを同定した。得られたクロー

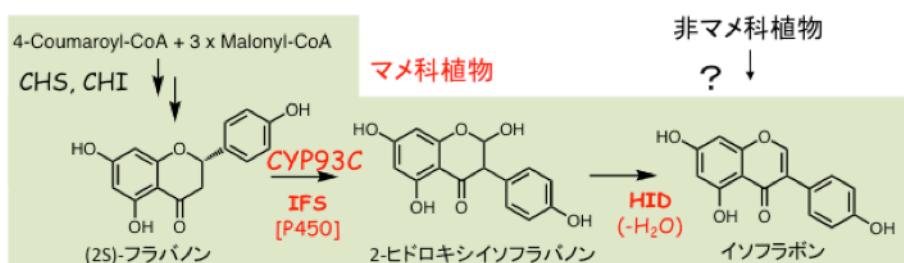


図2 マメ科植物でのイソフラボン生合成。IFS、イソフラボノイド合成酵素; HID、2-ヒドロキシイソフラバノン脱水酵素。

ンがコードするタンパク質(Iris-IFS)はP450であったが、既知のマメ科のIFS(CYP93Cサブファミリー)とは分子系統的に離れた位置に存在し、互いのアミノ酸配列の同一性は35%程度しかなかった(図3)。单子葉類と真正双子葉類の分岐年代は約1億5000万年前と推定されている。アヤメ属のIFSを含むフェニルプロパノイド・フラボノイド系P450の分子系統樹を作成し、各P450の分岐年代を推定すると、アヤメ属とマメ科のIFSは3億年以上前にすでに分岐していたことが推測された。おそらくアヤメ属とマメ科のIFSは、収斂により祖先型P450から異なる進化を遂げて同じイソフラボノイド生合成機能を持つようになったと推測される。

さて IFS タンパク質が触媒する珍しい転位反応

はどう行われているのだろうか？ マメ科 IFS による反応では、2-ヒドロキシイソフラボンとともに副生成物の3-ヒドロキシフラボンを生成する。その反応は、基質フラボンの3位の水素がはじめに引き抜かれてラジカルが生じ、その後アリール基の転位と2位のヒドロキシル化がおこると考えられている(Hashim et al. 1990)。副生成物の3-ヒドロキシフラボン(3位の水素が引き抜かれた後に同じ位置にヒドロキシル基が導入されて生成する)の存在が、上記の反応機構の証拠の一つとなっている。Iris-IFS を発現した組換え酵母ミクロソームを用いてアッセイを行うと、NADPH 存在下でフラボン(naringenin)から2-ヒドロキシイソフラボンとともに少量の3-ヒドロキシフラボンおよびフラボンを生成した(図4)。3-ヒドロキシフラボンの生成は、マメ科 IFS と同じ機構で反応が行われていることを示唆している。マメ科の IFS ではホモロジーモデリングと部位特異的変異導入により、反応に必須な鍵アミノ酸残基が同定されている(Sawada et al. 2002, Sawada and Ayabe 2005)。しかしこれらのアミノ酸残基は Iris-IFS では保存されていなかった。Iris-IFS では異なる残基

が反応に関わっていると予想され、今後変異導入などにより明らかにしたい。

ダイズのイソフラボンは疾病の予防、改善につながるファイトエストロジェンとして注目されている。IFS を用いれば本来イソフラボンを蓄積しない植物でも生産できることが期待される。実際にそのような試みがなされているが、これまでのところ組換え植物

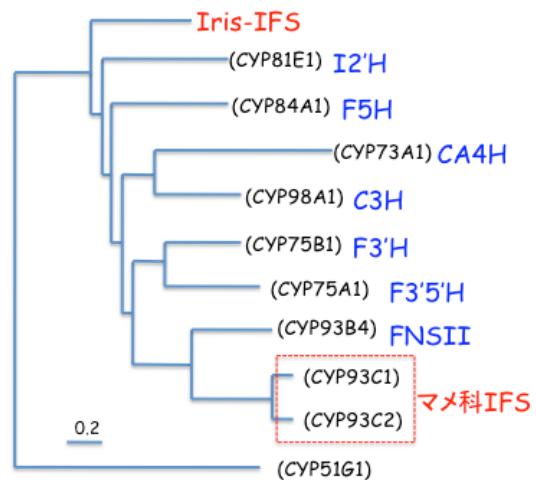


図 3 フェニルプロパノイド・フラボノイド生合成系 P450 の分子系統樹。系統樹は ClastalW を用い近隣結合法で作成した。

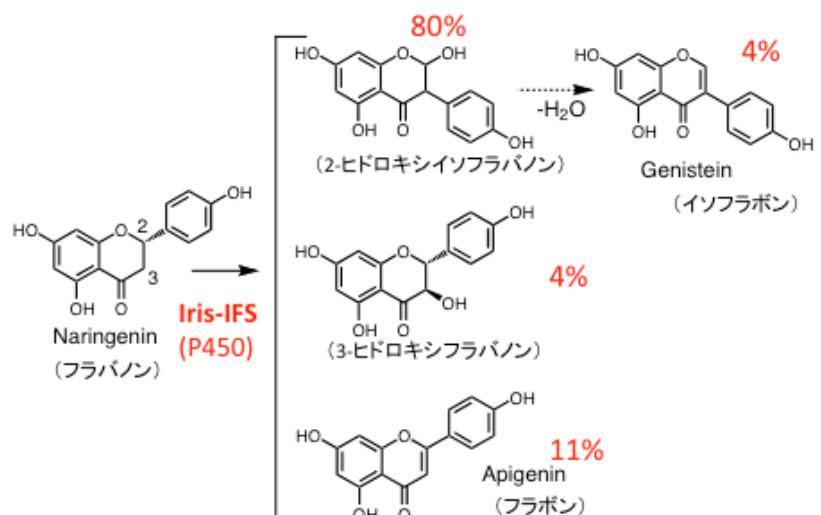


図 4 Iris-IFS 発現組換え酵母ミクロソームを用いたアッセイ。

でのイソフラボン生産量は必ずしも高くない。Iris-IFS はマメ科 IFS と比較すると *in vitro* で約 20 倍高い活性を示した。高いイソフラボノイド生産能を示す Iris-IFS は、植物のメタボリックエンジニアリングに有用であると考えられ、現在組換え植物でのイソフラボン生産を試みている。

ジャーマンアイリス培養不定根は、高度に修飾されたイソフラボンを蓄積する。その生合成には酸化酵素、O-メチル基転移酵素、糖転移酵素の関与が想定される。アヤメ属植物のイソフラボノイド代謝系の酵素はマメ科のものとは独自に進化してきたと推測され、IFS 以外のフラボノイド系酵素タンパク質も既知の酵素とは異なるユニークな構造を持っている可能性がある。現在ジャーマンアイリス不定根の EST 解析を進めており、これらの配列情報の利用や機能発現スクリーニング法により、生合成酵素遺伝子の同定を行う予定である。

3. ダイズのファイトアレキシン生合成に関わるプレニル基転移酵素

Glyceollin は、プロトカルパン骨格に C5 イソプレン単位が付加し、環状エーテルを形成したダイズの主要なファイトアレキシンである（図 5）。Glyceollin はプレニル基の付加位置とその後の環化様式の違いから、3 種類の異性体(glyceollin I, II, III)が存在する。その生合成系の酵素遺伝子の多くはすでに同定されたが、経路後半のダイズ特有の反応を担う酵素については遺伝子レベルの知見はなかった。特にプロトカルパン(glycinol)の 2 位と 4 位にプレニル基を転移する酵素は、1980 年代に活性が検出され、glyceollin 生合成酵素の中で唯一色素体に局在すると示唆されているが、実体は不明であった。

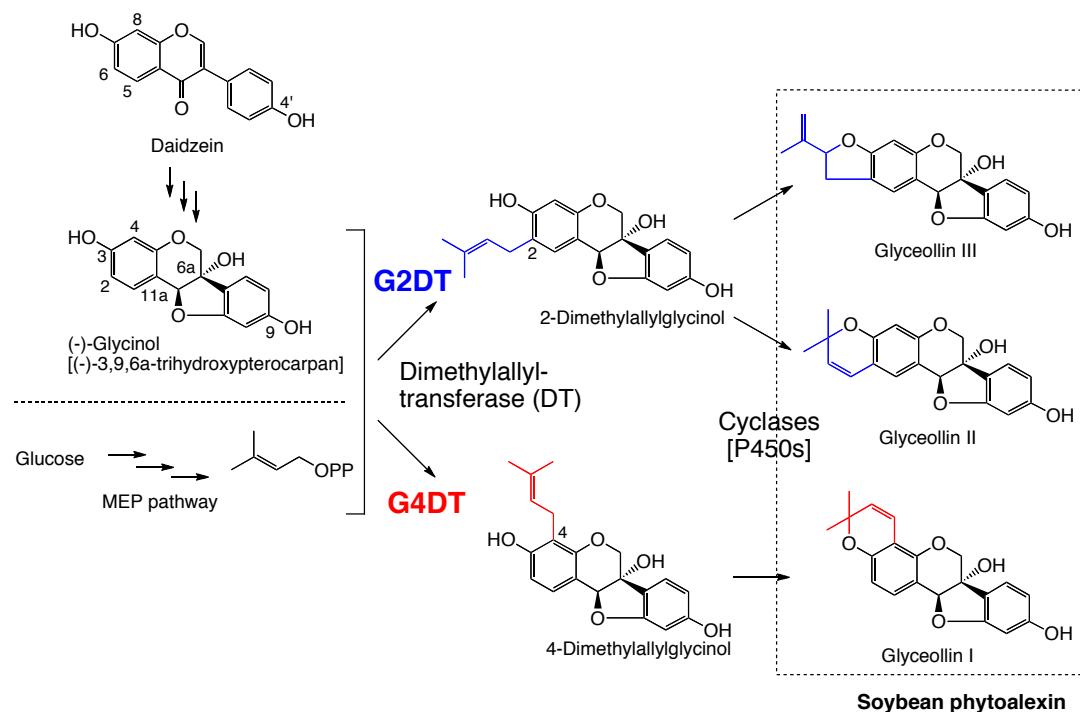


図 5 ダイズのグリセオリンの生合成経路。

筆者らはプロトカルパンへのプレニル基転移反応がトコフェロール合成系の homogentisate phytoltransferase (HPT) と反応が類似していることから、HPT アミノ酸配列をもとにダイズ EST デ

ータベースを検索し、50%以上の同一性を示す3つの候補配列(PT1, PT2, PT3)を選抜した。このうちPT2はダイズ疫病菌が感染した細胞のESTライブラリーで強く発現しており、酵母発現系を用いた機能解析によりglyceollin Iの生合成に関わる(-)-glycinol 4-dimethylallyltransferase(G4DT)であることがわかった(Akashi et al. 2009)。その後ダイズのゲノム配列が明らかにされたことからデータベースを再度検索し、新たに3つのホモログ(PT4, PT5, PT6)を見いだした。それぞれを酵母で発現させて機能解析を行うと、PT6はglyceollin II, IIIの生合成に関わる(-)-glycinol 2-dimethylallyltransferase(G2DT)であることがわかった。またPT4, PT5はそれぞれイソフラボノイドのクメステロール及びイソフラボンをプレニルのアクセプターにすることがわかった。

マメ科のクララ(*Sophora flavescens*)からはフラバノンの8位にプレニル基を転移する酵素遺伝子(SfN8DT-1, SfN8DT-2)が同定されている(Sasaki et al. 2008)。系統樹上ではPT2, PT3, PT4, PT5, PT6はSfN8DTとは別のクレードに属している。ダイズでは進化の過程でイソフラボノイドを基質にするプレニル基転移酵素が生じ、多様な機能を持つようになったと想定される。アクセプターの構造を決めるタンパク質構造に興味が持たれ、今後各配列の比較や変異導入により明らかにしたい。

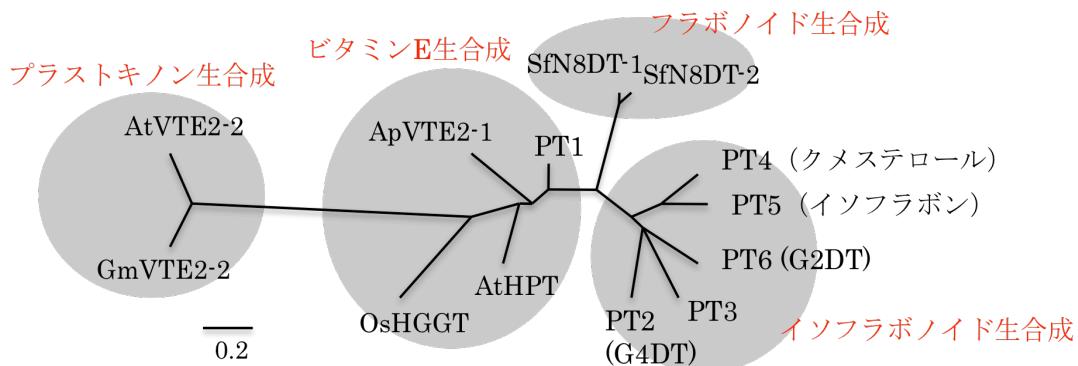


図6 植物のプレニル基転移酵素の分子系統樹。系統樹は ClastalW を用い近隣結合法で作成した。

引用文献

- 青木俊夫 2009. マメ科モデル植物のゲノム情報とバイオリソースを利用した天然物生合成遺伝子の同定. フアルマシア, 45: 881-886.
- 綾部真一・明石智義 2006. フラボノイド, イソフラボノイド. 山村・長谷川 (編) 天然物化学 (植物編) . pp. 387-398. アイピーシー出版部. 東京.
- Akashi, T., Sawada, Y., Shimada, N., Sakurai, N., Aoki, T. & Ayabe, S. 2003. cDNA cloning and biochemical characterization of S-adenosyl-L-methionine: 2,7,4'-trihydroxyisoflavanone 4'-O-methyltransferase, a critical enzyme of the legume isoflavanoid phytoalexin pathway. *Plant Cell Physiol.* 44: 103-112.
- Akashi, T., Aoki, T. & Ayabe, S. 2005a. Molecular and biochemical characterization of 2-hydroxyisoflavanone dehydratase. Involvement of carboxylesterase-like proteins in leguminous isoflavanone biosynthesis. *Plant Physiol.* 137: 882-891.

- Akashi, T., Ishizaki, M., Aoki, T. & Ayabe, S. 2005b. Isoflavonoid production by adventitious root cultures of *Iris germanica* (Iridaceae). *Plant Biotechnol.* 22: 207-215.
- Akashi, T., Sasaki, K., Aoki, T., Ayabe, S. & Yazaki, K. 2009. Molecular cloning and characterization of a cDNA for pterocarpan 4-dimethylallyltransferase catalyzing the key prenylation step in the biosynthesis of glyceollin, a soybean phytoalexin, *Plant Physiol.* 149: 683-693.
- Ayabe, S. & Akashi, T. 2006. Cytochrome P450s in flavonoid metabolism. *Phytochem. Rev.* 5(2-3): 271-282.
- Ayabe, S., Uchiyama, S., Aoki, T. & Akashi, T. 2010 Plant Phenolics: Phenylpropanoids. In Lew Mander and Hung-Wen (Ben) Liu (eds) Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology, Volume 1: Natural Products Structural Diversity-I Secondary Metabolites: Organization and Biosynthesis. pp. 929-976, Elsevier.
- Dewick, P.M. 1993. Isoflavonoids. In: JB Harborne, (ed.) The Flavonoids. Advances in Research since 1986. pp. 117–238. Chapman and Hall, London.
- Hashim, M.F., Hakamatsuka, T., Ebizuka, Y. & Sankawa, U. 1990. Reaction mechanism of oxidative rearrangement of flavanone in isoflavone biosynthesis. *FEBS Lett.* 271:219–222.
- Mackova, Z., Koblovska, R. & Lapcik, O. 2006. Distribution of isoflavonoids in non-leguminous taxa – an update. *Phytochemistry* 67: 849–855.
- Reynaud, J., Guilet, D., Terreux, R., Lussignol, M. & Walchshofer, N. 2005. Isoflavonoids in non-leguminous families: an update. *Nat. Prod. Rep.* 22: 504–515.
- Sasaki, K., Mito, K., Ohara, K., Yamamoto, H. & Yazaki, K. 2008. Cloning and characterization of naringenin 8-prenyltransferase, a flavonoid-specific prenyltransferase of *Sophora flavescens*. *Plant Physiol.* 146: 1075–1084.
- Sawada, Y., Kinoshita, K., Akashi, T., Aoki, T. & Ayabe, S. 2002. Key amino acid residues required for aryl migration catalyzed by the cytochrome P450 2-hydroxyisoflavanone synthase. *Plant J.* 31: 555–564.
- Sawada, Y. & Ayabe, S. 2005. Multiple mutagenesis of P450 isoflavonoid synthase reveals a key active-site residue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330: 907–913.
- Shimada, N., Sato, S., Akashi, T., Nakamura, Y., Tabata, S., Ayabe S. & Aoki, T. 2007. Genome-wide analyses of the structural gene families involved in the legume-specific 5-deoxyisoflavonoid biosynthesis of *Lotus japonicus*. *DNA Res.* 14: 25-36.

液胞移行型タンパク質によるアントシアニンの修飾反応

佐々木 伸大

東京農工大学大学院工学研究院生命機能科学部門

〒184-8588 東京都小金井市中町2-24-16

Anthocyanin modification catalyzed by vacuolar proteins.

Key words: anthocyanin; carnation; delphinium; glucosyltransferase.

Nobuhiro Sasaki

Division of Biotechnology and Life Science, Institute of Engineering, Tokyo University of

Agriculture and Technology

2-24-16 Naka-cho, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan

1. はじめに

植物は花、葉、果皮等、様々な器官・組織で植物色素を合成している。中でも、最も多様な色彩を持つ色素グループはアントシアニンである。代表的な植物の二次代謝産物であるアントシアニンは、橙～赤～青～紫といった花色や果皮の発色のもととなっている。アントシアニン分子は植物体内ではその基本骨格となるアグリコンが合成された後に、糖や有機酸によって修飾されることで完成する。アントシアニンのアグリコンは一般には6種類しか存在しないにもかかわらず、これほど多種多様な色彩を持つのは、これらの糖や有機酸による複雑な修飾が一因である (Yoshida et al. 2009)。これまでの研究でアントシアニン分子の生合成経路が明らかとされてきた。特にアグリコンの合成についてはすでにほぼ全ての反応段階に関わる酵素や遺伝子が単離され、それらの反応機構についても解析がなされている (Tanaka et al. 2008)。アントシアニンの糖や、有機酸による修飾反応について多くの研究報告がなされている。アントシアニン分子への糖転移反応は UDP-sugar 依存的に糖転移を触媒する酵素である UDP-sugar glucosyltransefase (UGT) によって触媒されることが、また、有機酸転移反応はアシル-CoA 依存型のアシル基転移酵素によって触媒されることが知られている (Yonekura-Sakakibara et al. 2009)。これらの酵素は細胞質局在型の酵素として知られており、一般にはアントシアニンはそのアグリコンが合成されてから、糖や有機酸の修飾を受けて、分子として完成された後に液胞内へと輸送され、蓄積されると考えられている (Ozeki et al. 2011)。しかし、最近になって、アントシアニンへの有機酸転移反応や糖転移反応の一部が液胞移行型の酵素によって触媒されていることが、酵素レベル、遺伝子レベルで明らかとされつつある。そこで、本稿では近年当研究室で報告してきた液胞移行型タンパク質によるアントシアニン修飾酵素反応について紹介する。

2. カーネーションにおけるアントシアニン-リンゴ酸転移酵素反応

赤色のカーネーションは pelargonidin 3-glucoside (Pg3G) のグルコース分子がさらにリンゴ酸によって修飾された pelargonidin 3-malylglucoside (Pg3mG) を主色素として持つことが知られている。アントシアニン分子への脂肪族有機酸の転移反応はアシル-CoA 依存型のアシル基転移酵素によって触媒されることが報告されている (D'Auria 2006) が、リンゴ酸の転移反応については報告が無かった。リンゴ酸-CoA は商業的に販売されていないため、著者らのグループではカーネーション花弁から低分子化合物を抽出し、その抽出液をアシル基供与体として、カーネーション花弁から抽出した粗酵素液を用いて Pg3G をアシル基受容体として反応させたところ、Pg3mG の生成が確認された。精製したアシル基受容体の質量分析を行なったところ、リンゴ酸とグルコースが脱水縮合したものであることが予想された。そこで、リンゴ酸グルコースを化学的に合成し、それがアシル基供与体として働くかについて検討したところ、抽出物と同様にアシル基供与体として働くことが示された。このことから、カーネーションにおいてアントシアニンへのリンゴ酸転移反応は、アシルグルコース依存型のアシル基転移酵素 (AAT) によって触媒されることが示された (Abe et al. 2008)。それまで、アントシアニンへのアシル基転移について芳香族有機酸については AAT 型のものが報告されていたが、脂肪族有機酸の転移については初めての報告であった。AAT 型のアシル基転移酵素は液胞移行型であることが示されている (Hause et al. 2002) ことから、カーネーションにおけるアントシアニンリンゴ酸転移酵素 (AMaT) も液胞移行型であることが予想された。

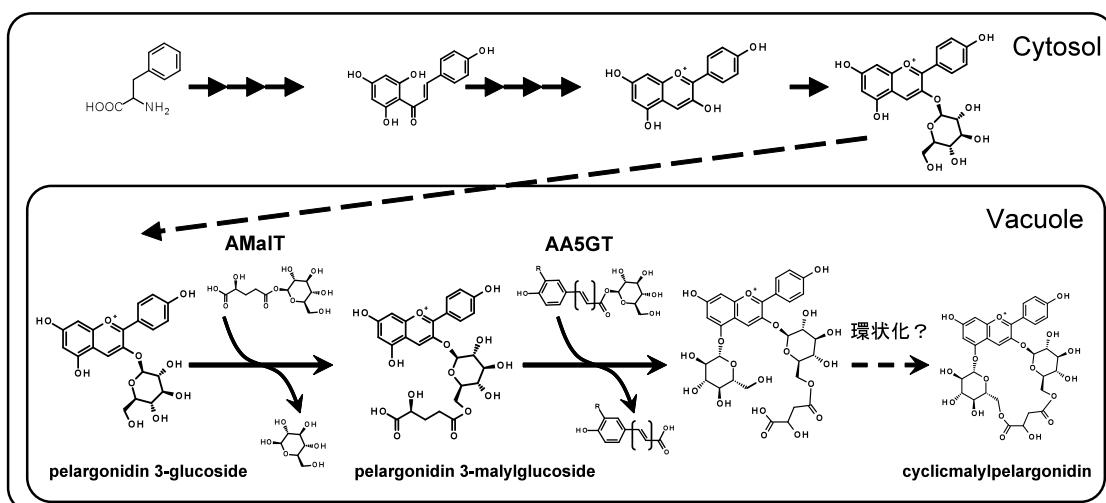


Figure 1 カーネーション花弁における推定されるアントシアニン合成経路 アントシアニンの例としてペラルゴニジンタイプの分子を示した。

3. カーネーションにおけるアントシアニン 5 位配糖体化酵素反応

濃桃色のカーネーションが持つ主なアントシアニン分子は pelargonidin の 3 位と 5 位がグルコース 1 分子ずつで修飾され、さらにこれらのグルコースが 1 分子のリンゴ酸によって架橋された cyclicmalylpelargonidin を持つことが知られている (Nakayama et al. 2000)。アントシアニンの 5 位への糖転移酵素 (anthocyanin 5-glucosyltransferase, A5GT) については他の植物種では報告がある

にも関わらず、カーネーションにおいてはこれまでに報告は無かった。当研究室でもカーネーション花弁から抽出した粗酵素液を用いて、植物二次代謝において糖転移反応では一般的な糖供与体である UDP-glucose を用いてアントシアニンへの 5 位糖転移酵素活性について検討したが、AA5GT 活性を見出すことはできなかった。そこで、カーネーションにおいてアントシアニンの 5 位への糖転移反応が、UGT とは別の酵素によって触媒されている可能性について検討した。カーネーション花弁から抽出した低分子化合物群を糖供与体、cyanidin 3-glucoside (Cy3G) を糖受容体として、花弁由来の粗酵素液を用いて酵素反応を行なったところ、cyanidin 3,5-diglucoside の生成が確認された。そこで、この低分子化合物を酵素活性を指標にして精製し、質量分析や NMR 分光法を用いて解析した結果、バニリン酸とグルコースがエステル結合した vanillyl- β -D-glucose (VG) であることが判明した。このことから、カーネーション花弁において、アントシアニンの 5 位糖転移反応は UGT ではなく、acyl-glucose:anthocyanin glucosyltransferase (AA5GT) によって触媒されることが示された。また、この新規の糖転移酵素を 7 段階の精製ステップを経て精製し、その N 末端と内部アミノ酸配列を解析した。その結果、N 末端のメチオンを欠失していることが分かった。アミノ酸配列情報をもとに設計した degenerate primer を用いて、カーネーション花弁由来の cDNA を鋳型とした PCR 法によって、cDNA 断片を単離した。その後、5'-rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法、3'-RACE 法を行なって全長 cDNA を単離した。単離した AA5GT 候補 cDNA はその予想アミノ酸配列から、液胞移行と思われるシグナルペプチドを有していること、また、糖加水分解酵素の一種である glycoside hydrolase family 1 に属するタンパク質であることが判明した。このシグナルペプチドを欠失させた AA5GT 候補タンパク質を大腸菌を用いて生産させ、その AA5GT 活性を検討した。その結果、このタンパク質が AA5GT 活性を持っていることが確認された。また、この遺伝子の発現パターンがカーネーションにおけるアントシアニン蓄積パターンと一致したこと、さらに Pg3MG を蓄積している花弁に AA5GT 候補 cDNA を一過的に導入し蛍光顕微鏡観察したところ、アントシアニンの 5 位配糖体に特有の蛍光が観察されたことから、この cDNA が AA5GT をコードしているものと結論付けた (Matsuba et al. 2010)。実際にこのタンパク質が液胞に移行するかについて検討するために、AA5GT シグナルペプチドを GFP タンパク質の N 末端に融合するように構築したコンストラクトを、タマネギ表皮細胞へパーティクルポンベードメント法によって一過的に導入した。その結果、GFP の蛍光が液胞内に観察されたことから、AA5GT タンパク質が液胞移行型である可能性が示唆された (Matsuba et al. 2010)。

4. デルフィニウムにおけるアントシアニン 7 位配糖体化酵素反応

デルフィニウムはその独特な青い花が人気の花である。デルフィニウム花弁の主色素はシアノデルフィンと呼ばれる delphinidin 3-rutinoside の 7 位が複数の糖と有機酸で複雑に修飾されたアントシアニンであることが知られている (Hashimoto et al. 2002, 図 2)。これまでアントシアニンへの糖転移酵素については数多くの研究報告があるにも関わらず、7 位への糖転移酵素についての報告はなかった。そこで、カーネーションで見出されたアシルグルコース依存型の糖転移酵素によってアントシアニンの 7 位配糖体化反応が触媒される可能性を探った。デルフィニウム花弁から調製した粗酵素液と、糖受容体として cyanidin 3-glucoside を糖供与体として VG を基質として

酵素反応を行なった。反応産物を HPLC を用いて解析したところ、糖転移によって生じたと思われるピークが観測された。この生成物を精製し、質量分析ならびに NMR 分光法によって確認した結果、cyanidin 3,7-diglucoside (Cy3,7dG) であることが判明した。このことからデルフィニウムにおいてアントシアニンの 7 位配糖体化反応は、acyl-glucose dependent anthocyanin 7-glucosyltransferase (AA7GT) によって触媒されているものと考えられた。そこで、カーネーションから AA5GT を単離するのに使用したものと同じ degenerate primer を用いて、デルフィニウム花弁から調製した cDNA を鋳型として PCR を行い、AA7GT 候補 cDNA 断片を獲得した。さらに 5'-, 3'-RACE 法を行い、その全長 cDNA を獲得した。獲得した AA7GT の推定アミノ酸配列には液胞移行シグナルと予想される配列が存在していたため、この領域が欠損したタンパク質が大腸菌で合成されるように構築したプラスミドを大腸菌へ導入した。この組換え大腸菌で生産させたタンパク質が、AA7GT 活性を持っていたことから、この cDNA が AA7GT をコードしているものと結論付けた (Matsuba et al. 2010)。

5. デルフィニウムにおけるさらなるアントシアニンの修飾反応

デルフィニウム花弁に含まれるシアノデルフィンは前述したようにアントシアニンの 7 位のグルコースがさらに複数のグルコースと *p*-hydroxybenzoic acid (pHBA) によって修飾されている。アントシアニンの 7 位へのグルコースの転移反応が液胞移行型の酵素によって触媒されることから、その後の修飾反応も液胞移行型の酵素によって触媒されると考えるのが妥当であると思われる。これまでにも芳香族有機酸の転移反応が液胞移行型の酵素によってアシルグルコース依存的に触媒されることが報告されていた (Gläßgen & Seitz 1992) ことから、デルフィニウムにおいてもアントシアニンへの pHBA の転移反応がアシルグルコース依存的な酵素によって触媒されるかについて検討した。先の AA7GT 反応によって獲得した Cy3,7dG をアシル基受容体、pHBG をアシル基供与体として、デルフィニウム花弁から調製した粗酵素液を用いて酵素反応を行なった。反応生成物を HPLC を用いて確認したところ、新たなピークが確認された。この反応生成物を精製し、質量分析ならびに NMR 分光法によって確認したところ、Cy3,7dG の 7 位のグルコースの 6 位に pHBA がエステル結合した物質であることが判明した。さらに反応時間を数時間から一晩まで延長したところ、HPLC クロマトグラム上に新たなピークが 2 本観測された。これらの分子量を解析した結果、Cy3,7dG に pHBA と glucose が 1 分子ずつ脱水縮合したものと、2 分子の pHBA と 1 分子の glucose が脱水縮合した分子量と一致した。これらの結果から、デルフィニウムの青色花弁でのシアノデルフィンの生合成経路は、delphinidin 3-rutinoside が合成された後に、液胞内において 7 位が配糖体化され、さらにそれに続けて、pHB と glucose が 1 分子ずつ転移されていくことで合成されるものと推定された (Fig. 2)。

6. おわりに

これまで、アントシアニン分子は基本的には細胞質で完成された後に、液胞へ輸送され蓄積されると考えられてきた。しかし、デルフィニウムにおけるシアノデルフィンのような分子も、その後半は糖と有機酸による修飾反応であり、それらの多くの反応が液胞内で行なわれる可能性が高いと思われる。もともとはアシルグルコースも二次代謝産物の一種であったと思われるが、そ

の蓄積場所である液胞内で、それらを利用して新たな分子を合成する代謝経路を獲得したことは二次代謝産物の種類を増やす上で有効な進化上の手段であったと考えられる。特に、上述のデルフィニウムの例のように、1種類のアシルグルコースを糖とアシル基の両方の供与体として利用するという戦略は非常に興味が持たれる。今後、他の植物種においても同様の代謝経路を研究することで複雑な二次代謝産物の合成経路についての更なる手がかりが得られるものと期待される。

本稿では近年報告された液胞移行型のアントシアニン修飾酵素について述べてきた。しかし、これまでの報告ではそれらのタンパク質が、液胞移行シグナルを持っていること、また、最終的に液胞内に輸送されていることが示唆されている。しかし、液胞移行型の酵素によって触媒されるアントシアニンの修飾反応が実際に液胞内で行なわれているのか、あるいは pre-vacuole や液胞への輸送途上の中器官内で行なわれているのかについては、さらなる検討が必要である。これらの問題は、今後、未だに決着をみていない細胞内のアントシアニンの輸送経路の問題と併せて解明かされていくものと期待される。

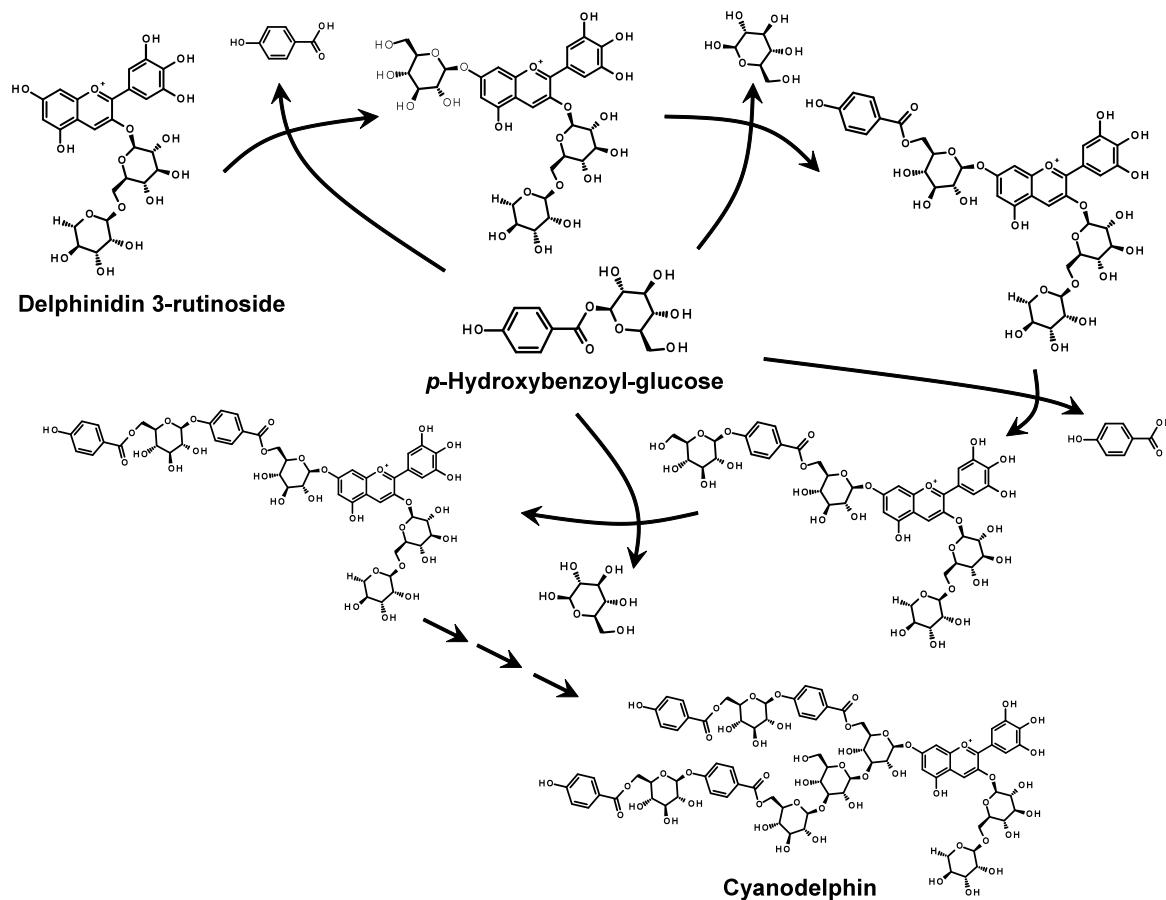


Figure 2 デルフィニウム青花弁において推定されるアントシアニン色素合成経路図

引用文献

- Abe, Y., Tera, M., Sasaki, N., Okamura, M., Umemoto, N., Momose, M., Kawahara, N., Kamakura, H., Goda, Y., Nagasawa, K. & Ozeki, Y. 2008. Detection of 1-*O*-malylglucose: pelargonidin N. Sasaki-5

- 3-O-glucose-6"-O-malyltransferase activity in carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373: 473-477.
- D'Auria, J.C. 2006. Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 331-340.
- Gläßgen, W.E. & Seitz, H.U. 1992. Acylation of anthocyanins with hydroxycinnamic acids via 1-O-acylglucosides by protein preparations from cell cultures of *Daucus carota* L. *Planta* 186: 582-585.
- Hashimoto, F., Tanaka, M., Maeda, H., Fukuda, S., Shimizu, K. & Sakata, Y. 2002. Changes in flower coloration and sepal anthocyanins of Cyanic delphinium cultivars during flowering. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 1652-1659.
- Hause, B., Meyer, K., Viitanen, P.V., Chapple, C. & Strack, D. 2002. Immunolocalization of 1-O-sinapoylglucose:malate sinapoyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 215: 26-32.
- Matsuba, Y., Sasaki, N., Tera, M., Okamura, M., Abe, Y., Okamoto, E., Nakamura, H., Funabashi, H., Takatsu, M., Saito, M., Matsuoka, H., Nagasawa, K. & Ozeki, Y. 2010. A novel glucosylation reaction on anthocyanins catalyzed by acyl-glucose-dependent glucosyltransferase in the petals of carnation and delphinium. *Plant Cell* 22: 3374-3389.
- Nakayama, M., Koshioka, M., Yoshida, H., Kan, Y., Fukui, Y., Koike, A. & Yamaguchi, M. 2000. Cyclic malyl anthocyanins in *Dianthus caryophyllus*. *Phytochemistry* 55: 937-939.
- Ozeki, Y., Matsuba, Y., Abe, Y., Umemoto, N. & Sasaki, N. 2011. Pigment Biosynthesis I. Anthocyanins. In: Ashihara, H., Crozier, A. & Komamine, A. (eds.) *Plant Metabolism and Biotechnology*. pp. 321-342. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.
- Tanaka, Y., Sasaki, N. & Ohmiya, A. 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J.* 54: 733-749.
- Yonekura-Sakakibara, K., Nakayama, T., Yamazaki, M. & Saito, K. 2009. Modification and Stabilization of Anthocyanins. In: Kevin, G., Kevin, D. & Chris, W. (eds.) *Anthocyanins*. pp169-190. Springer Science+Business, New York.
- Yoshida, K., Mori, M. & Kondo, T. 2009. Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology. *Nat. Prod. Rep.* 26: 884-915.

ニコチン生合成のマスター遺伝子；低ニコチン変異体からのアプローチ

庄司 翼・橋本 隆

奈良先端科学技術大学院大学、バイオサイエンス研究科

〒630-0101 奈良県生駒市高山町 8916-5

Master genes for nicotine biosynthesis in tobacco; approach using low-nicotine mutants

Key words: alkaloids; jasmonates; nicotine; tobacco; transcription factors

Tsubasa Shoji & Takashi Hashimoto

Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology

Takayama 8916-5, Ikoma, Nara 630-0101, Japan

1. はじめに

植物が蓄積する多種多様の二次代謝産物は古来より医薬、嗜好品、染料などとして人類の健全な社会生活に貢献してきた。二次代謝に関する研究は、従来は天然物化学による化合物の単離・同定と生合成経路の推定、及び生化学による生合成酵素の特徴付けが主流であった。近年、分子生物学の発展を背景に、生合成酵素遺伝子のクローニングが盛んに行なわれ、それらがより普遍的な一次代謝酵素遺伝子から進化してきたことが明らかとなってきた。特に、進化的にも古く広範な植物種の存在するフラボノイド類の生合成は分子レベルでよく研究され、酵素遺伝子や制御機構がかなり解明されている。一方、アルカロイドなどの他の典型的な二次代謝産物は、被子植物がそれぞれの科や属に分岐した進化の後期段階で爆発的に生じたものであり、フラボノイド生合成とは異なる独自の制御機構をもつものと考えられる。

アルカロイドは含窒素性でしばしば塩基性を示す二次代謝産物の総称である。頸花植物の約20%の種に見出され、その化学構造は分かっているものだけでも12,000種類に及ぶ(Roberts & Wink 1998)。多くのアルカロイドは、アミノ酸やヌクレオチド類から合成され、その前駆体や生合成経路によって区分されることが多い(Ziegler & Facchini 2008)。テルペノイドやフェニルプロパノイドの場合とは異なり、各々のアルカロイドグループは独立にその生合成経路を確立してきたとされている。

タバコ属植物特有のアルカロイドであるニコチン及びその類縁化合物は、その強い殺虫性から植物にとっては防御物質としての意味をもっている(Baldwin et al. 1998)。タバコの葉が害虫により食べられると、その情報が葉から根に伝達され、傷害ホルモンであるジャスモン酸がニコチン生

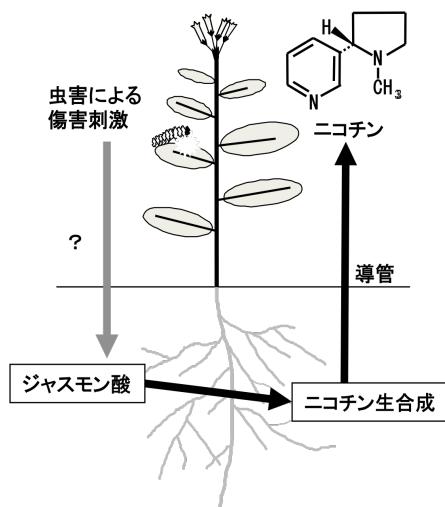


図1 ニコチン生合成、蓄積の虫害による誘導

合成遺伝子群を根の先端部分で活性化する。根端で合成されたニコチンの大部分は導管を伝わって地上部へ転流され、全草に蓄積する(Shoji & Hashimoto 2011a) (図1)。ニコチンはオルニチンとアスパラギン酸を前駆体とする反応経路によって合成される(図2)。オルニチンは対称ジアミンであるプロレッシンを経由してピロリジン環をもつN-メチルピロリニウムカチオンに、アスパラギン酸は補酵素であるNADと共に通の経路(Katoh & Hashimoto 2004)によってピリジン環をもつニコチン酸にそれぞれ変換される。経路の終盤は両環の縮合を含む複数の反応から構成されるとされているがその詳細は未解明である(De Boer et al. 2009, Kajikawa et al. 2009, Kajikawa et al. 2011)。

2. ニコチン制御遺伝子座にクラスター化するERF型転写因子遺伝子

1930年代にキューバ原産のタバコ系統がアルカリドをほとんど含まないことが発見された。この低ニコチン系統は米国農務省で遺伝学的解析がなされ、2つの遺伝子座 *NICOTINE1* (*NIC1*) と

NICOTINE2 (*NIC2*)における半優性変異が原因であることが判明した(Legg et al. 1971)。この変異体においてほぼ全てのニコチン生合成遺伝子が発現抑制されていること(Hibi et al. 1994, Katoh et al. 2007, Shoji et al. 2009, Shoji et al. 2010, Kajikawa et al. 2011)から、*NIC1* と *NIC2* は制御遺伝子であることが推定された。EST情報の蓄積を背景として、タバコ cDNA アレイを用いたマイクロアレイ解析が近年可能となった。我々は、野生型と *nic1nic2* 二重変異体の根における遺伝子発現をタバコマイクロアレイで網羅的に検索し、既知のニコチン合成、輸送に関わる全ての遺伝子が変異体で発現抑制されていることが確認されるとともに、APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR (AP2/ERF)ファミリー(Nakano et al. 2006)のグループ IXa に属する転写因子遺伝子 *ERF189* の発現が変異体で見られないことを明らかとした(図3, Shoji et al. 2010)。IXa グループの ERF 遺伝子はタバコゲノムに少なくとも 25 遺伝子存在し、それらはアラビドプシスの AtERF1, AtERF2 に近いクレード 1 と *ERF189* を含むクレード 2 に分別される。*ERF189* を含めクレード 2 の複数の遺伝子の発現は *nic2* 変異特異的に顕著に発現抑制されていた。ゲノムサザンと PCR の結果、この特異的な発現抑制はクレード 2 に属する ERF のうち、複二倍体タバコ(*Nicotiana tabacum*)の祖先種の 1 つである *N. tomentosiformis* に由来する遺伝子が、*nic2* 変異体ゲノムで欠失していることに起因しており、これら欠失遺伝子(少なくとも 7 遺伝子)は変異の原因遺伝子座 *NIC2* に強く連鎖していることが分かった。一方、クレード 1 やクレード 2 に属しても別の祖先種である *N. sylvestris* 由来の ERF 遺伝子などは変異の影響を受けなかった。

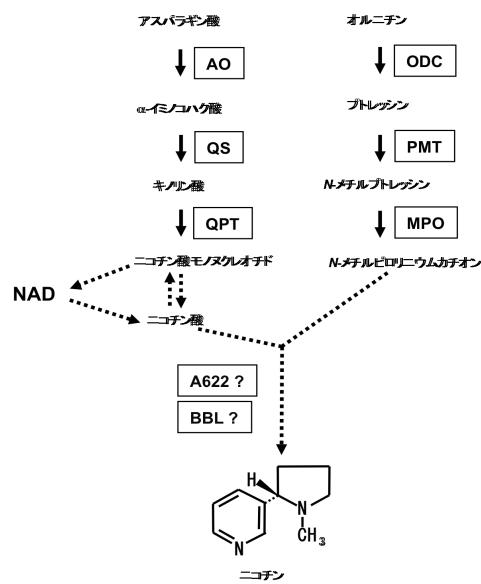


図2 ニコチン生合成経路
ピリジン環とピロリジン環の合成以降、両環の縮合を含む部分は未解明である。PIPファミリーのNADH依存性酸化還元酵素A622とベルベリン架橋酵素ファミリーのBBLが関与することが提唱されている。NIC遺伝子により制御される遺伝子は四角で囲った。AO, aspartate oxidase (アスパラギン酸酸化酵素); QS, quinolinate synthase (キノリン酸合成酵素); QPT, quinolinate phosphoribosyl transferase (キノリン酸ホスホリボシリル基転移酵素); ODC, ornithine decarboxylase (オルニチン脱炭酸酵素); PMT, putrescine N-methyltransferase (プロレッシンN-メチル基転移酵素); MPO, N-methylputrescine oxidase (N-メチルプロレッシン酸化酵素)

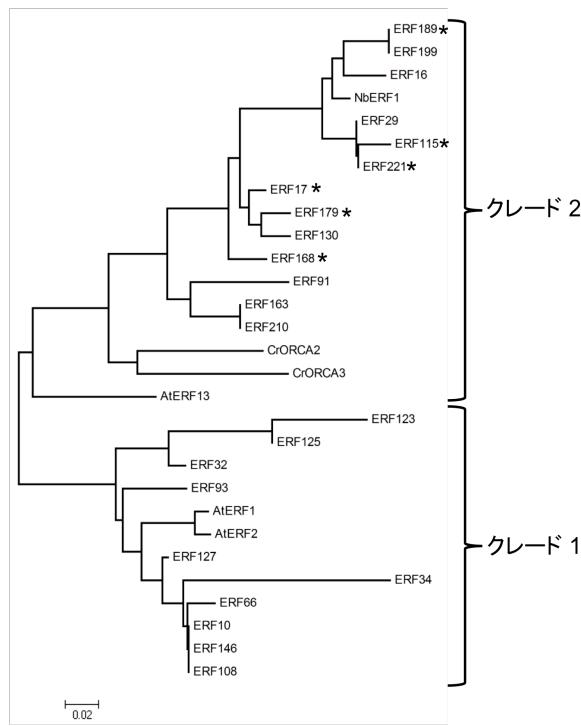


図3 AP2/ERFファミリーのグループXiaに属するタンパク質の分子系統樹
DNA結合ドメインであるAP2/ERFドメインのアミノ酸配列をClustal Wによりマルチアライメントし、MEGA4を用いてNJ法で分子系統樹を作製した。*nic2*変異体において欠失が確認された遺伝子は*印で示した（ただしドメイン内に停止コドンのある*ERF104*は図示していない）。*N. benthamiana*のNbERF1、ニチニチソウ (*Catharanthus roseus*)のCrORCA2とCrORCA3、及び、アラビドブンスのAtERF1 (At4g17500)、AtERF2 (At5g47220)、AtERF13 (At2g44840)を加えた。

3. ERF転写因子によるニコチン生合成遺伝子の制御

タバコ形質転換毛状根を用いた解析で、クレード2のERF遺伝子がニコチン含量を左右するマスター制御因子であることが示された(Shoji et al. 2010)。*ERF189*を過剰発現するとニコチン含量が野生型タバコで約2-3倍に、*nic1nic2*変異体で野生型並みになった。逆に、クレード2のERFを特異的にRNA干渉法で発現抑制したり、ドミナント抑制型の*ERF189*や*ERF179*を発現させたりするとニコチン合成が抑えられた。この結果は、*N. benthamiana*の相同遺伝子NbERF1の発現抑制で得られる結果とも一致した(図3, Todd et al. 2010)。

ERF転写因子はニコチン生合成遺伝子プロモーター内の特定シス配列(図5)に結合し、転写活性化に働く(Shoji et al. 2010, De Boer et al. 2011, Shoji & Hashimoto 2011b, 2011c)。*ERF189*とグルココルチコイド受容体の融合タンパク質をタバコ毛状根で発現させて、デキサメタドン依存的に*ERF189*を活性化させると、すべてのニコチン生合成遺伝子が転写誘導される(Shoji et al. 2010)。ま

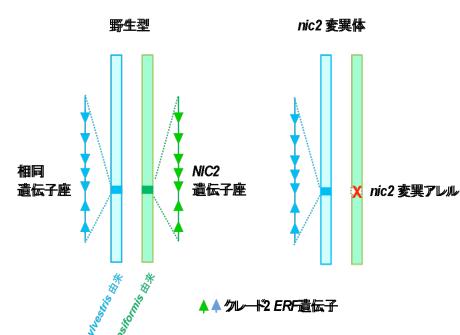


図4 クレード2 ERF遺伝子のクラスター化
*N. tomentosiformis*由来の染色体領域に存在する
*NIC2*遺伝子座と*N. sylvestris*由来の領域の相同遺
伝子座にそれぞれクラスター化するクレード2 ERF
遺伝子を模式した。

図4に示すように、クレード2のERFは、*N. tomentosiformis*に由来する*NIC2*遺伝子座とそれと相同な*N. sylvestris*に由来する遺伝子座それぞれにクラスター状に存在しており、*nic2*変異体では*NIC2*遺伝子座が失われている（全てもしくは大半）と考えられた。

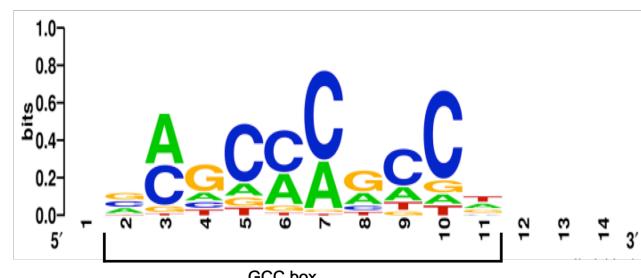


図5 *ERF189*の結合配列特異性
PMTプロモーターに存在するGCC boxの周辺配列を順次一塩基置換したプローブを作製し、組換え*ERF189*への結合性をEMSAで検討した(Shoji & Hashimoto 2011c)。得られたデータを100仮想配列で代表し、WebLogoを用いて配列ロゴとして表した。

た、こうした誘導性の大半はシクロヘキシミド存在下でも起こることから、他の因子の翻訳を介さずに *ERF189* は生合成遺伝子を活性化することが分かった。生合成遺伝子の 1 つであるプロトレスン *N*-メチル基転移酵素(*PMT*)の発現には転写開始点の近傍にある GCC box が重要であることが知られていた(Xu & Timko 2004)。クレード 2 の *ERF* は、この *PMT* プロモーター内の GCC box へ *in vitro* で結合するとともに、一過的発現系を用いたトランスクレティベーション解析で、これら *ERF* は、この GCC box を介して *PMT* プロモーターを活性化することが示された(Shoji et al. 2010, De Boer et al. 2011)。一方、クレード 1 の *ERF* は *PMT* プロモーターの GCC 配列には結合せず、プロモーターを活性化することはなかった(Shoji et al. 2010)。

4. ERF 転写因子レギュロンへの一次代謝遺伝子のリクルート

二次代謝産物の広義での合成系は、前駆体や代謝中間体を供給する一次代謝経路とそれに続く二次代謝に特異的な部分から構成される。ニコチン合成に特異的な *PMT* などとは異なり、ピリジン環合成に関わるキノリン酸ホスホリボシル基転移酵素(*QPT*)は、ニコチン合成に必要なニコチン酸の供給と並行して、補酵素として重要な NAD 合成にも関わる一次代謝酵素である(Katoh & Hashimoto 2004)。

タバコには *QPT* をコードする 2 つの遺伝子 *QPT1* と *QPT2* (いずれも *N. tomentosiformis* に由来する) が存在する(Sinclair et al. 2000)。*QPT1* はすべての器官でジャスモン酸処理の有無にかかわらず構的に発現するのに対して、*QPT2* は他のニコチン生合成遺伝子と同様にジャスモン酸応答性、根特異性を示し、かつ *NIC* 遺伝子の制御を受ける。実際、*ERF189* の過剰発現や機能抑制型 *ERF189* の発現は *QPT2* の発現にのみ影響を与えた(Shoji & Hashimoto 2011c)。*QPT2* 遺伝子のプロモーター領域には 3 つの機能的な *ERF189* 結合配列が存在し、いずれも *ERF189* による *QPT2* プロモーターの活性化に寄与することが、*in vitro* 結合解析、一過的発現系を用いたトランスクレティベーション解析、及び、タバコ形質転換毛状根を用いたプロモーター解析から分かった。一方、*QPT1* プロモーターは *ERF189* に結合せず、またその制御を受けなかった。

トマト、アラビドプシスなどのグノムには *QPT* 遺伝子は 1 コピーしか存在していない。タバコにおいて、遺伝

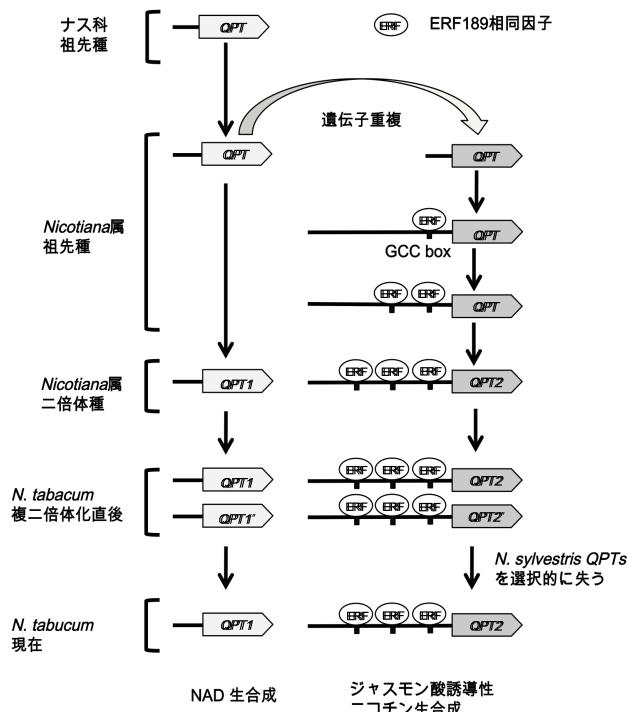


図6 タバコ *QPT* 遺伝子の進化

ナス科祖先種において、NAD合成系に関わる 1 つの *QPT* 遺伝子と *ERF189* 相同因子が存在したが、この時点では *ERF* は *QPT* を制御していなかった。タバコ属祖先種で、遺伝子重複により 2 つ目の *QPT* 遺伝子が生まれたと考えられる。2 つの内 1 つの *QPT* 遺伝子は 3 つの *ERF189* 結合配列を順次獲得し、ジャスモン酸応答性の *ERF189* とその相同因子の制御下に取り込まれた。*N. tabacum* の複二倍体化直後には 2 組の 2 つの *QPT* 遺伝子（計 4 つ）が存在したが、*N. sylvestris* 由来の遺伝子はのちに失われた。

子重複によって生じた互いに相同的な 2 つの *QPT* 遺伝子のうち、1 つの遺伝子がプロモーター領域に複数の ERF189 結合性シス配列を獲得することで、ERF が制御するニコチン生合成レギュロンに取り込まれ、ニコチン合成の獲得で必要となったピリジン環供給量の増加に対応したと考えられた(図 6)。

5. ERF 転写因子とジャスモン酸シグナル伝達系

植物は昆虫や草食動物から身を守るために防御物質としてアルカロイドをはじめとした二次代謝産物を蓄積する。そのため、タバコのニコチンと同様に傷害刺激に応答するジャスモン酸シグナルにより生合成が活性化される代謝産物が多い (Gundlach et al. 1992, Blechert et al. 1995, Yukimune et al. 1996)。高等植物は普遍的なコアとなるジャスモン酸シグナル経路を持っている(図 7, Browne et al. 2009, 庄司・橋本 2010)。ジャスモン酸非存在下では bHLH ファミリーの MYC2 転写因子に結合した JAZ リプレッサーがコリプレッサーを含む複合体を標的遺伝子近傍にリクルートする(Pauwels et al. 2010)。この複合体はクロマチン構造変換を促し、標的遺伝子の発現を積極的に抑制すると考えられている。活性型ジャスモン酸であるジャスモン酸イソロイシンが COI1 に結合すると、JAZ がユビキチン化を受けた後に分解される。そして、JAZ から解放された MYC2 は転写活性化因子として機能することが可能となる。

タバコにもジャスモン酸伝達系を構成する COI1, JAZ, MYC2 は保存されており、いずれの機能を阻害してもニコチンのジャスモン酸応答性は失われる(Shoji et al. 2008, Todd et al. 2010, Shoji & Hashimoto 2011c)。特に転写因子である MYC2 はニコチン生合成遺伝子プロモーター内の G box に結合して直接に転写活性化するばかりでなく(図 7)、ニコチン制御に関わるクレード 2 の *ERF* の発現も直接または間接に制御することが示された(Shoji & Hashimoto 2011c)。クレード 2 の *ERF* はいずれもジャスモン酸応答性を示すが(Shoji et al. 2010), その応答性は MYC2 に依存するものと考えられる。

6. 有用天然物生産に向けて

代謝改変のために、代謝流量に影響する律速段階の改変や新たな経路の付加などの手法がこれまでに試みられてきたが成功例は限られている(Yun et al. 1992)。多段階からなる経路全体を統括的にコントロールする制御因子を改変することで、最終産物の生産性を飛躍的に増大できる可能性がある(Broun 2004, Grotewold 2008)。本稿で紹介したニコチン生合成のマスター転写因子は、低ニコチン変異の原因遺伝子座にコードされていることからも、アルカロイド量を植物体内で実際にコントロールしていることが裏付けされている。また、生合成遺伝子プロモーターの特定配列

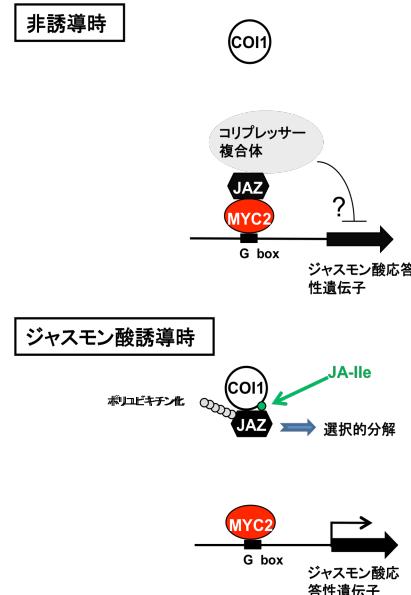


図7 ジャスモン酸シグナル伝達系
COI1, JAZ, MYC2はタバコでも保存されており、ニコチン生合成のジャスモン酸誘導性にいずれも必要である。

に直接働きかけることも明らかとされ、マスター転写因子を活用した新たな代謝改変の格好の標的になりえる。さらに、本因子と高い相同意を示すニチニチソウ (*Chatharanthus roseus*, キヨウチクトウ科) のジャスモン酸誘導性転写因子 ORCA が、タバコ (ナス科) のニコチン生合成とは進化的に独立であるインドールアルカロイド生合成を部分的に制御する点は特に興味深い(図 3, Menke et al. 1999, van der Fits & Memelink 2000, Shoji & Hashimoto 2011d)。相同因子が他のジャスモン酸応答性の有用生理活性天然物合成系 (Gundlach et al. 1992, Blechert et al. 1995, Yukimune et al. 1996)にもリクルートされている可能性もある。

引用文献

- Baldwin, I.T. 1998. Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attacks in native populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8113-8118.
- Blechert, S., Brodschelm, W., Hölder, S., Kammerer, L., Kutchan, T.M., Müller, M.J., Xia, Z.Q. & Zenk, M.H. 1995. The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4099-4105.
- Broun, P. 2004. Transcription factors as tools for metabolic engineering in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 202-209.
- Browse, J. 2009. Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Ann. Rev. Plant Biol.* 60: 183-205.
- De Boer, K., Lye, J.C., Aiken, C.D., Su, A.K. & Hamill, J.D. 2009. The *A622* gene in *Nicotiana glauca* (tree tobacco): Evidence for a functional role in pyridine alkaloid synthesis. *Plant Mol. Biol.* 69: 299-312.
- De Boer, K., Tilleman, S., Pauwels, L., Bossche, R.V., De Sutter, V., Vanderhaeghen, R., Hilson, P., Hamill, J.D. & Goossens, A. 2011. APETALA2/ETHYENE RESPONSE FACTOR and basic helix-loop-helix transcription factors cooperatively mediate jasmonate-elicited nicotine biosynthesis. *Plant J.* 66: 1053-1065.
- Grotewold, E. 2008. Transcription factors for predictive plant metabolic engineering: are we there yet? *Curr. Opin Biotechnol.* 19:138-144.
- Gundlach, H., Müller, M.J., Kutchan, T.M. & Zenk, M.H. 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2389-2393.
- Hibi, N., Higashiguchi, S., Yamada, Y. & Hashimoto, T. 1994. Gene expression in tobacco low-nicotine mutant. *Plant Cell* 6: 723-735.
- Kajikawa, M., Hirai, N. & Hashimoto, T. 2009. A PIP-family protein is required for biosynthesis of tobacco alkaloids. *Plant Mol. Biol.* 69: 287-298.
- Kajikawa, M., Shoji, T., Katoh, A. & Hashimoto, T. 2011. Vacuole-localized berberine bridge enzyme-like proteins are required for a late step of nicotine biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* 155: 2010-2022.
- Katoh, A. & Hashimoto, T. 2004. Molecular biology of pyridine nucleotide and nicotine biosynthesis. *Front. Biosci.* 9: 1577-1586.
- Katoh, A., Shoji, T. & Hashimoto, T. 2007. Molecular cloning of *N*-methylputrescine oxidase from tobacco. *Plant Cell Physiol.* 48: 550-554.

- Legg, P.G. & Collins, G.B. (1971) Inheritance of percent total alkaloids in *Nicotiana tabacum* L. II. genetic effects of two loci in Burley21 X LA Burley21 populations. *Can. J. Genet. Cytol.* 13: 287-291.
- Menke, F.L.H., Champion, A., Kijne, J.W. & Memelink, J. 1999. A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene Str interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. *EMBO J.* 18: 4455-4463.
- Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T. & Shinshi, H. 2006. Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol.* 140: 411-432.
- Pauwels, L., Barbero, G.F., Geerinck, J. & Tillemen, S. et al. 2010. NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signaling. *Nature* 464: 788-791.
- Roberts, M.F. & Wink, M. 1998. Alkaloids; biochemistry, ecology, and medicinal applications. Plenum, New York.
- 庄司 翼・橋本 隆 2010. ジャスモン酸応答；COI1-JAZ-MYC2 シグナリングカスケードの分子機構. 植物のシグナル伝達；分子と応答. pp. 92-98. 共立出版. 東京.
- Shoji, T. & Hashimoto, T. 2011a. Nicotine biosynthesis. In: Ashihara, H., Crozier, A., Komamine, A. (eds) Plant metabolism and biotechnology. pp. 191-216. Wiley, New York.
- Shoji, T. & Hashimoto, T. 2011b. Tobacco MYC2 regulates jasmonate-inducible nicotine biosynthesis genes directly and by way of the NIC2-locus ERF genes. *Plant Cell Physiol.* 52; 1117-1130.
- Shoji, T. & Hashimoto, T. 2011c. Recruitment of a duplicated primary metabolism gene into the nicotine biosynthesis regulon in tobacco. *Plant J. in press*
- Shoji, T. & Hashimoto, T. 2011d. Jasmonate-responsive transcription factors; new tools for metabolic engineering and gene discovery. In: Chandra, S., Lata, H., Varma, A. (eds) Biotechnology for medicinal plants; micropropagation and improvement. Springer, New York. *in press*
- Shoji, T., Inai, K., Yazaki, Y., Sato, Y., Takase, H., Shitan, N., Yazaki, K., Goto, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K. & Hashimoto, T. 2009. Multidrug and toxic compound extrusion-type transporters implicated in vacuolar sequestration of nicotine in tobacco roots. *Plant Physiol.* 149: 708-718.
- Shoji, T., Kajikawa, M. & Hashimoto, T. 2010. Clustered transcription factors regulate nicotine biosynthesis in tobacco. *Plant Cell* 22: 3390-3409.
- Shoji, T., Ogawa, T. & Hashimoto, T. 2008. Jasmonate-induced nicotine formation in tobacco is mediated by tobacco COII and JAZ genes. *Plant Cell Physiol.* 49: 1003-1012.
- Sinclair, S.J., Murphy, P.J., Birch, C.D. & Hamill, D. 2000. Molecular characterization of quinolinate phosphoribosyltransferase (QPRTase) in *Nicotiana*. *Plant Mol. Biol.* 44: 603-617.
- Todd, A.T., Liu, E., Polvi, S.L., Pammett, R.T. & Page, J.E. 2010. A functional genomic screen identifies diverse transcription factors that regulate alkaloid biosynthesis in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* 62: 589-600.
- van der Fits, L. & Memelink, J. 2000. ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science* 289: 295-297.
- Xu, B. & Tinko, M.P. 2004. Methyl jasmonate induced expression of the tobacco putrescine N-methyltransferase genes requires both G-box and GCC-motif elements. *Plant Mol. Biol.* 55: 743-761.

- Yukimune, Y., Tabata, H., Higashi, Y. & Hara, Y. 1996. Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nat. Biotechnol.* 14: 1129-1132.
- Yun, D.J., Hashimoto, T. & Yamada, Y. (1992) Metabolic engineering of medicinal plants: Transgenic *Atropa belladonna* with an improved alkaloid composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 11799-11803.
- Ziegler, J. & Facchini, P.J. 2008. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Ann. Rev. Plant Biol.* 59: 735-769.

共発現解析による二次代謝関連遺伝子の機能同定

平井 優美

理化学研究所 植物科学研究センター 代謝システム解析チーム
〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-22

Functional identification of secondary metabolism-related genes by coexpression analysis

Keywords: coexpression analysis; functional genomics;
metabolomics; secondary metabolite; transcriptomics.

Masami Yokota Hirai

Metabolic Systems Research Team, RIKEN Plant Science Center
1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan

1. はじめに

日本ではまだまだ高額な実験であるものの、マイクロアレイによるトランск립トーム解析へのハードルが低くなつて久しい。公開データベースに登録されたマイクロアレイデータの利用については費用がかからないため、すべての研究者に扉が開かれている。マイクロアレイデータベースの情報を利用した二次データベース、ウェブツールはいまや数多く存在し、これらを利用して遺伝子機能を予測することは、最近では一般的な方法論となつてきている。一方、トランスク립トーム解析技術に遅れて始まつたメタボローム解析技術の開発も、最近では一段落して、代謝のみならずさまざまな現象への興味から「メタボローム分析をしてみよう」と思う研究者が増えてきたようである。筆者はここ10年ほど、トランスク립トーム、メタボローム解析を使った代謝研究を行つてゐるが、トランスク립トームとメタボロームデータの統合解析という方法論は、二次代謝に関わる遺伝子の機能同定において非常に力を發揮すると感じている。本稿では、筆者の研究を例として、トランスク립トミクスとメタボロミクス／ターゲット代謝プロファイリングによる二次代謝の遺伝子機能同定を紹介する。

2. 二次代謝の転写レベル制御

代謝は細胞内外の環境変動に応じて調節されている。例えば、土壤中の必須栄養元素が乏しい環境では、その元素を吸收・同化する機能が向上するように遺伝子発現が変化する。別の例では、特定のアミノ酸の細胞内濃度が上昇すると、そのアミノ酸による自身の生合成経路のフィードバック抑制が多くの場合酵素活性レベルでかかり、他のアミノ酸との量的バランスが保たれる。このアミノ酸量の調節に代表されるように、一次代謝においては代謝の恒常性が保たれるような制御が重要であると考えられる。環境変動のわずかな変化に応答して代謝を微調整するために、タンパク質レベル、酵素活性レベルでの制御が重要である。これに対し、強光ストレス下でのアントシアニン蓄積のように、特定の環境下での生理機能を担う二次代謝産物の蓄積には、その生合成経路全体を一斉に促進・抑制するような制御の仕組みが適していると考えられる。少数の転

写制御因子によって、生合成に関与する酵素群や輸送体をコードする遺伝子の発現を一括制御して、代謝産物量をダイナミックに変化させるメカニズムが考えられる。アントシアニン、グルコシノレート、アルカロイドの生合成経路などにその例が見られる(Beekwilder et al. 2008, Gigolashvili et al. 2007a,b, Hirai et al. 2007, Malitsky et al. 2008, Sønderby et al. 2007, 2010, Tohge et al. 2005, van der Fits&Memelink 2000, Zhang et al. 2011 ほか)。

トランスクリプトーム、メタボローム解析に関する筆者の経験では、一次代謝産物の蓄積量の変動は、関連する遺伝子の転写産物(mRNA)の蓄積量の変動では説明できない例が多く、逆に二次代謝産物ではよく説明できた(Hirai et al. 2004)。これは上述の制御メカニズムの違いによると考えられる。

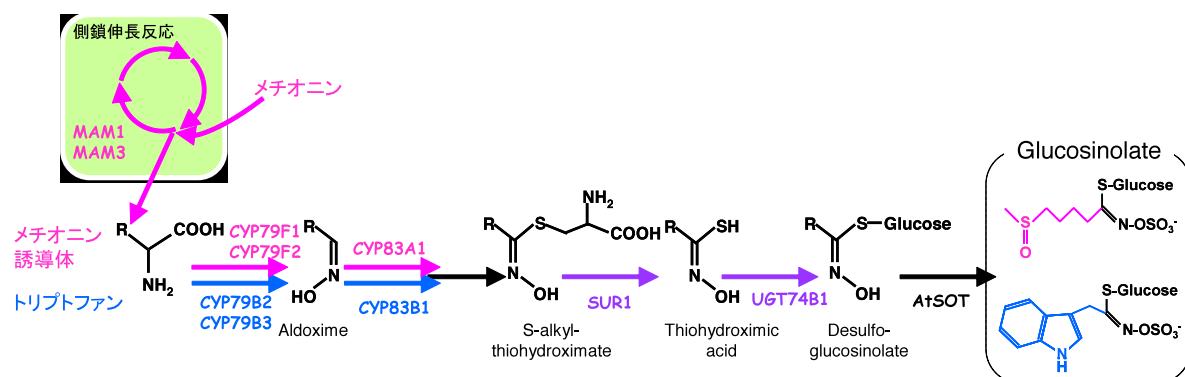
3. 二次代謝に関わる遺伝子の同定

3-1. 個別研究による機能同定—シロイスナズナのオミクス解析

筆者らは、硫黄栄養(土壌や培地中の硫酸イオン)欠乏に対する植物の応答反応を解明する目的で、硫黄欠乏ストレス下のシロイスナズナの経時的なトランスクリプトーム解析とメタボローム解析を行った(Hirai et al. 2003, Hirai et al. 2005)。このとき、一次代謝である硫黄同化経路やアミノ酸生合成経路などの各酵素遺伝子は、統一的に説明できる発現変化を示さなかったが、二次代謝であるアントシアニン生合成経路の酵素遺伝子群やグルコシノレート生合成経路の酵素遺伝子群は、それぞれ同調的に発現が変化していた。逆に、同調的に発現する遺伝子群、つまり「共発現」する遺伝子群は、同じ生理機能に関与する可能性が高いと予測できる。この実験では、既知のグルコシノレート生合成遺伝子群と共に発現する putative sulfotransferase とアノテーションが付いた遺伝子が3つあった。シロイスナズナゲノム中には putative sulfotransferase 遺伝子が18個あり、アミノ酸配列を元に系統樹を書くと、上記の3つ(*AtSOT16, 17, 18*)が1つのクレードをなしており、共通の基質に対する反応が予想された。一方、グルコシノレートの生合成経路はほぼ明らかになっており、いくつかの酵素遺伝子は同定されていた(図1のピンク、青、紫字で書かれた遺伝子)が、硫酸転移反応に関わる遺伝子は未同定であった(図1)。これらの結果から、上記の3遺伝子はいずれもグルコシノレート生合成の硫酸転移酵素をコードしていると予測した。定法

図1 グルコシノレートの生合成経路

グルコシノレートは主にアブラナ科の植物に見られる二次代謝産物であり、アミノ酸を前駆体として作られる。シロイスナズナのアクセッショング Columbia では、主にメチオニンとトリプトファンが前駆体となる。側鎖(構造式のピンクと青の部分)はいろいろな修飾を受けて、多数の分子種が存在する。



に従って AtSOT16, 17, 18 の組換えタンパク質を作成し, *in vitro* の酵素活性測定を行った結果, 3つとも予想された基質に硫酸基を付加する活性を持っており, 予測遺伝子機能が正しいことが示された(Hirai et al. 2005)。また, この他に複数のグルコシノレート生合成関連遺伝子の候補が予測できた。この研究から, 転写産物の網羅的解析によって共発現する遺伝子を見つけ, その配列情報と生合成経路の情報を利用して機能を推定する, という戦略が特に二次代謝に関わる機能ゲノミクスにおいて非常に有効であることが分かった。

3 – 2. 個別研究による機能同定－非モデル植物

上記は, 全ゲノムが解読されたシロイヌナズナのマイクロアレイ解析と, そのデータを用いた共発現解析によって, 二次代謝 (グルコシノレート) 生合成に関わる遺伝子群を予測・同定した例である。研究の当初の目的がグルコシノレート関連遺伝子の同定にあったわけではなく, ある意味で研究の副産物として遺伝子機能予測ができた, という点でも「オミクス的」な仕事であり, 「データから仮説を構築」した (= 遺伝子機能を予測した) ということになる。次章で述べるが, 「遺伝子共発現解析」は後に, シロイヌナズナの遺伝子機能を予測する一般的なツールとなった (Aoki et al. 2007, Saito et al. 2008)。だが, いわゆる「オミクス以前」にも, 広義の遺伝子共発現解析, 代謝産物と遺伝子との共起解析によって, 二次代謝関連の遺伝子が多数単離されている。

アルカロイドなどの生合成では, ジャスモン酸類や他のエリシターによって誘導される例が多く知られている。そこで生合成遺伝子の単離を目的として, ジャスモン酸類などによる誘導条件と非誘導条件とで植物 (培養細胞) から転写産物を抽出し, ディファレンシャルディスプレイ, cDNA サブトラクション, cDNA-RFLP, マイクロアレイなどの方法により誘導条件下で特異的に発現している遺伝子 (cDNA) を網羅的に単離するという研究が行われている。これにより, ベンジルイソキノリンアルカロイド (ケシ, エリシター処理) (Zulak et al. 2007), テルペノイドインドールアルカロイド (ニチニチソウ, メチルジャスモン酸処理) (Rischer et al. 2006), タキゾール (イチイ, メチルジャスモン酸処理) (Jennewein et al. 2001, 2004, Schoendorf et al. 2001), キュウリの揮発性成分 (ハダニなどのストレス) (Mercke et al. 2004), ニコチンなど (タバコ BY-2, メチルジャスモン酸処理) (Goossens et al. 2003, Morita et al. 2009), フラボノイド (タルウマゴヤシ, メチルジャスモン酸処理など) (Farag et al. 2009), トリテルペノイド (タルウマゴヤシ, メチルジャスモン酸処理など) (Achnine et al. 2005, Naoumkina et al. 2010), イソフラボノイド (ダイズ, エリシター処理) (Latunde-Dada et al. 2001, Schopfer&Ebel 1998, Schopfer et al. 1998)などの生合成遺伝子が予測, 単離された。これらは, 共発現関係の抽出に, 遺伝子発現の環境応答を利用した例であるといえる。

一方, 植物間の遺伝子型の違いを利用して研究した研究例もある。同種の植物であるが特定の二次代謝産物の蓄積パターンが異なる成分変種や, 同属の植物で代謝産物のプロファイルの異なる種などを材料に用いて, 興味のある代謝産物を含む方の植物でのみ発現している遺伝子を単離する方法である。上記と同様に, ディファレンシャルディスプレイ, cDNA サブトラクション, cDNA-RFLP, マイクロアレイなどの方法を用いて, 蓄積量に差のある転写産物を一括して解析する。こうした研究で, アントシアニン (シソの成分変種間) (Yamazaki&Saito 2011), バラの香り成分 (品種間) (Guterman et al. 2002), トマトの香り成分 (イントログレッショングループ) (Tieman et al. 2006), メチ

ルケトン（トマトのアクセッション、種間雑種）(Ben-Israel et al. 2009, Fridman et al. 2005), フラボン（ガーベラの品種間）(Martens&Forkmann 1999), モルヒネ（ケシ属の種間）(Gesell et al. 2009, Ziegler et al. 2006)の生合成遺伝子などが見つかっている。

また、発生段階に従った遺伝子発現の変化も共発現関係を見つけるのに利用できる。マイクロアレイを用いた、イチゴ果実の成熟における遺伝子発現変化のパターンから、香り成分の生合成に関わる酵素遺伝子が単離された(Aharoni et al. 2000)。

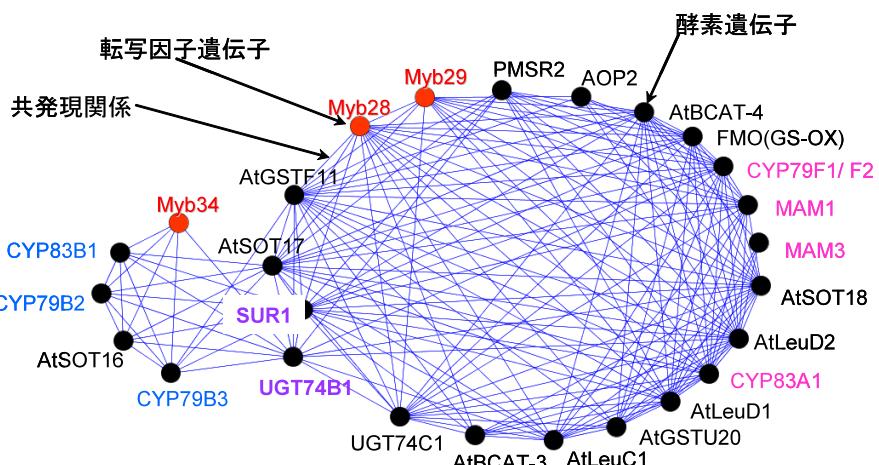
いずれの場合でも、メタボローム解析や特定の二次代謝産物にターゲットした分析によって得られる代謝産物プロファイルを、遺伝子発現プロファイルと詳細に対比させることにより、二次代謝産物の基本炭素骨格を作る遺伝子、側鎖修飾に関わる遺伝子などを見つけることができる。

3-3. 公開マイクロアレイデータを利用した機能同定

シロイスナズナにおいては2000年代前半に、国際コンソーシアムによって組織的にマイクロアレイデータが収集、公開された(Craigon et al. 2004, Goda et al. 2008, Kilian et al. 2007, Schmid et al. 2005)。これは、どの遺伝子が、いつ、どの器官で、どういう条件で発現するかをカタログ化しておこうという試みであった。約22,000遺伝子についての、1,000枚を超えるマイクロアレイ解析で得られる情報は膨大であるため、結果を視覚化したり、検索を容易にしたりするためのウェブツールや二次データベースが多数開発された。筆者がよく用いる ATTED-II (<http://atted.jp/>) (Obayashi&Kinoshita 2010)は、国際コンソーシアムで得られた AtGenExpress expression atlas のデータを基に、遺伝子共発現解析を容易に行えるようにした優れたデータベースである。任意の2遺伝子間の発現パターンの類似度を、ピアソンの相関係数を用いて表しており、発現パターンが全く同じならば1、無関係ならば0となる。適当な閾値を決め、その値より大きな値を示す遺伝子ペアを「共発現している」とする^(注)。章3-1で述べたとおり、筆者らは、硫黄欠乏条件のマイクロアレイデータを用いた共発現解析によってグルコシノレート生合成遺伝子を推定していたが、のちに公開された ATTED-II を用いて共発現解析をすると、候補遺伝子がより絞り込まれる上に、より詳細な機能推定が可能であることがわかった。図2にその解析例を示す。これは、ATED-II で絞り込んだグルコシノレート生合成の候補遺伝子と既知遺伝子をピックアップして、相関係数が0.6以上の遺伝子ペアを線で結んだものである。このようにして共発現の関係を視覚化したもののが共発現ネットワークと呼んでいる。この図を見ると、メチオニンを前駆体とする生合成酵素

図2 遺伝子共発現ネットワーク

筆者らが研究を開始した当時に既知だった酵素遺伝子をピンク（メチオニンを前駆体とするもの）、青（同トリプトファン）、紫（同両方）で示しており、図1と対応している。赤字は転写因子遺伝子。



遺伝子と、トリプトファンのそれとは異なるグループを形成しており、また両方の生合成に関わる酵素遺伝子はその中間に位置していることがわかる。これにより、硫黄欠乏のマイクロアレイデータを使った共発現解析では「グルコシノレートの生合成に関与する」としか予測できなかつた遺伝子が、「メチオニン系のグルコシノレートの生合成に関与する」というように、より詳しく機能予測できた。この図では3つの転写因子遺伝子を示したが、そのうちの *Myb34* はトリプトファン系のグルコシノレート生合成酵素遺伝子 *CYP79B2*, *CYP79B3*, *CYP83B1* を正に制御することが知られていた。これらのことから、*Myb28*, *Myb29* 遺伝子はメチオニン系の酵素遺伝子群を正に制御する転写因子であると推定した。これらの遺伝子のノックアウト変異体や過剰発現体を用いた実験から、両遺伝子は予測どおりメチオニン系のグルコシノレート生合成を制御する転写因子であることが示された(Hirai et al. 2007)。また、図2に黒字で示した酵素遺伝子の多くについても、筆者ら(Sawada et al. 2009a)や他の研究グループによってグルコシノレート生合成に関与することが証明されている。

さらに、図2には示さなかつたが、グルコシノレート生合成に関与するトランスポーター遺伝子も同様の共発現解析で見つけることができた。メチオニン系の生合成遺伝子と共に発現する機能未知遺伝子の中に、動物の胆汁酸トランスポーターに配列の類似した遺伝子 *BASS5* があった。一方、図1に示したメチオニンの側鎖伸長反応は葉緑体で、グルコシノレートの基本骨格を作る反応は細胞質で起こることから、筆者らは、*BASS5* はグルコシノレート生合成中間体の輸送に関する葉緑体膜上のトランスポーターをコードすると予測した。直接の輸送活性は示されていないものの、この予測機能もほぼ証明されている(Gigolashvili et al. 2009, Sawada et al. 2009b)。

グルコシノレートやフラボノイドには側鎖の修飾の異なるさまざまな分子種が存在し、葉、根、種子などで異なる分布を示す。器官間の二次代謝産物プロファイルの違いと、遺伝子の器官特異的な発現パターンの違いとを照らし合わせたり、候補遺伝子の機能破壊株の二次代謝産物プロファイルを調べたりすることでも、予測遺伝子機能（酵素の基質特異性など）を絞り込むことができる(Yonekura-Sakakibara et al. 2008, Yonekura-Sakakibara et al. 2007)。また、Matsuda et al. (2009)は、AtGenExpress expression atlas の一部である器官別、発生段階ごとのマイクロアレイデータ(Schmid et al. 2005)に対応するメタボロームデータを取得し、代謝産物の器官、発生段階特異的な蓄積を明らかにした(AtMetExpress metabolite accumulation atlas)。AtGenExpress, AtMetExpress のデータの対応によって、*in silico* で代謝に關わる遺伝子機能予測が可能となった。

^(注)最近の ATTED-II では、ピアソンの相関係数そのものではなく、改良した指標を用いている。

4. おわりに

本稿では、公開マイクロアレイデータを利用した共発現解析として ATTED-II を使ったシロイスナズナの例を紹介したが、ATTED-II 以外にも多数のツールがある。また、イネ、ダイズ、ポプラなど、シロイスナズナ以外の共発現解析ツールも出てきた(Obayashi et al. 2011, Ogata et al. 2010)。自前でトランск립トーム解析を行う場合には、マイクロアレイに代わり、日々コストが下がってきて次世代シーケンサーによる解析が増えてくるだろう。こうした技術やツールの進歩により、これまであまり手の付けられていなかつた多様な二次代謝産物の生合成の解明が

可能になってくると思われる。

引用文献

- Achnine, L., Huhman, D.V., Farag, M.A., Sumner, L.W., Blount, J.W. & Dixon, R.A. 2005. Genomics-based selection and functional characterization of triterpene glycosyltransferases from the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J.* 41: 875-887.
- Aharoni, A., Keizer, L.C., Bouwmeester, H.J., Sun, Z., Alvarez-Huerta, M., Verhoeven, H.A., Blaas, J., van Houwelingen, A.M., De Vos, R.C., van der Voet, H., Jansen, R.C., Guis, M., Mol, J., Davis, R.W., Schena, M., van Tunen, A.J. & O'Connell, A.P. 2000. Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell* 12: 647-662.
- Aoki, K., Ogata, Y. & Shibata, D. 2007. Approaches for extracting practical information from gene co-expression networks in plant biology. *Plant Cell Physiol.* 48: 381-390.
- Beekwilder, J., van Leeuwen, W., van Dam, N.M., Bertossi, M., Grandi, V., Mizzi, L., Soloviev, M., Szabados, L., Molthoff, J.W., Schipper, B., Verbocht, H., de Vos, R.C., Morandini, P., Aarts, M.G. & Bovy, A. 2008. The impact of the absence of aliphatic glucosinolates on insect herbivory in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 3: e2068.
- Ben-Israel, I., Yu, G., Austin, M.B., Bhuiyan, N., Auldridge, M., Nguyen, T., Schauvinhold, I., Noel, J.P., Pichersky, E. & Fridman, E. 2009. Multiple biochemical and morphological factors underlie the production of methylketones in tomato trichomes. *Plant Physiol.* 151: 1952-1964.
- Craigon, D.J., James, N., Okyere, J., Higgins, J., Jotham, J. & May, S. 2004. NASCArrays: a repository for microarray data generated by NASC's transcriptomics service. *Nucleic Acids Res* 32: D575-577.
- Farag, M.A., Deavours, B.E., de Fatima, A., Naoumkina, M., Dixon, R.A. & Sumner, L.W. 2009. Integrated metabolite and transcript profiling identify a biosynthetic mechanism for hispidol in *Medicago truncatula* cell cultures. *Plant Physiol.* 151: 1096-1113.
- Fridman, E., Wang, J., Iijima, Y., Froehlich, J.E., Gang, D.R., Ohlrogge, J. & Pichersky, E. 2005. Metabolic, genomic, and biochemical analyses of glandular trichomes from the wild tomato species *Lycopersicon hirsutum* identify a key enzyme in the biosynthesis of methylketones. *Plant Cell* 17: 1252-1267.
- Gesell, A., Rolf, M., Ziegler, J., Diaz Chavez, M.L., Huang, F.C. & Kutchan, T.M. 2009. CYP719B1 is salutaridine synthase, the C-C phenol-coupling enzyme of morphine biosynthesis in opium poppy. *J. Biol. Chem.* 284: 24432-24442.
- Gigolashvili, T., Engqvist, M., Yatusevich, R., Muller, C. & Flugge, U.I. 2007a. HAG2/MYB76 and HAG3/MYB29 exert a specific and coordinated control on the regulation of aliphatic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 177: 627-642.
- Gigolashvili, T., Yatusevich, R., Berger, B., Muller, C. & Flugge, U.-I. 2007b. The R2R3-MYB transcription factor HAG1/MYB28 is a regulator of methionine-derived glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 51: 247-261.
- Gigolashvili, T., Yatusevich, R., Rollwitz, I., Humphry, M., Gershenson, J. & Flugge, U.I. 2009. The plastidic bile acid transporter 5 is required for the biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21: 1813-1829.

- Goda, H., Sasaki, E., Akiyama, K., Maruyama-Nakashita, A., Nakabayashi, K., Li, W., Ogawa, M., Yamauchi, Y., Preston, J., Aoki, K., Kiba, T., Takatsuto, S., Fujioka, S., Asami, T., Nakano, T., Kato, H., Mizuno, T., Sakakibara, H., Yamaguchi, S., Nambara, E., Kamiya, Y., Takahashi, H., Hirai, M.Y., Sakurai, T., Shinozaki, K., Saito, K., Yoshida, S. & Shimada, Y. 2008. The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design, data evaluation, model data analysis and data access. *Plant J.* 55: 526-542.
- Goossens, A., Häkkinen, S.T., Laakso, I., Seppänen-Laakso, T., Biondi, S., De Sutter, V., Lammertyn, F., Nuutila, A.M., Söderlund, H., Zabeau, M., Inzé, D. & Oksman-Caldentey, K.-M. 2003. A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 8595-8600.
- Guterman, I., Shalit, M., Menda, N., Piestun, D., Dafny-Yelin, M., Shalev, G., Bar, E., Davydov, O., Ovadis, M., Emanuel, M., Wang, J., Adam, Z., Pichersky, E., Lewinsohn, E., Zamir, D., Vainstein, A. & Weiss, D. 2002. Rose scent: genomics approach to discovering novel floral fragrance-related genes. *Plant Cell* 14: 2325-2338.
- Hirai, M.Y., Fujiwara, T., Awazuhara, M., Kimura, T., Noji, M. & Saito, K. 2003. Global expression profiling of sulfur-starved *Arabidopsis* by DNA macroarray reveals the role of *O*-acetyl-l-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. *Plant J.* 33: 651-663.
- Hirai, M.Y., Klein, M., Fujikawa, Y., Yano, M., Goodenowe, D.B., Yamazaki, Y., Kanaya, S., Nakamura, Y., Kitayama, M., Suzuki, H., Sakurai, N., Shibata, D., Tokuhisa, J., Reichelt, M., Gershenson, J., Papenbrock, J. & Saito, K. 2005. Elucidation of gene-to-gene and metabolite-to-gene networks in *arabidopsis* by integration of metabolomics and transcriptomics. *J. Biol. Chem.* 280: 25590-25595.
- Hirai, M.Y., Sugiyama, K., Sawada, Y., Tohge, T., Obayashi, T., Suzuki, A., Araki, R., Sakurai, N., Suzuki, H., Aoki, K., Goda, H., Nishizawa, O.I., Shibata, D. & Saito, K. 2007. Omics-based identification of *Arabidopsis* Myb transcription factors regulating aliphatic glucosinolate biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 6478-6483.
- Hirai, M.Y., Yano, M., Goodenowe, D.B., Kanaya, S., Kimura, T., Awazuhara, M., Arita, M., Fujiwara, T. & Saito, K. 2004. Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 10205-10210.
- Jennewein, S., Rithner, C.D., Williams, R.M. & Croteau, R.B. 2001. Taxol biosynthesis: taxane 13 alpha-hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 13595-13600.
- Jennewein, S., Wildung, M.R., Chau, M., Walker, K. & Croteau, R. 2004. Random sequencing of an induced *Taxus* cell cDNA library for identification of clones involved in Taxol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 9149-9154.
- Kilian, J., Whitehead, D., Horak, J., Wanke, D., Weinl, S., Batistic, O., D'Angelo, C., Bornberg-Bauer, E., Kudla, J. & Harter, K. 2007. The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J.* 50: 347-363.
- Latunde-Dada, A.O., Cabello-Hurtado, F., Czitrich, N., Didierjean, L., Schopfer, C., Hertkorn, N.,

- Werck-Reichhart, D. & Ebel, J. 2001. Flavonoid 6-hydroxylase from soybean (*Glycine max* L.), a novel plant P-450 monooxygenase. *J. Biol. Chem.* 276: 1688-1695.
- Malitsky, S., Blum, E., Less, H., Venger, I., Elbaz, M., Morin, S., Eshed, Y. & Aharoni, A. 2008. The transcript and metabolite networks affected by the two clades of *Arabidopsis* glucosinolate biosynthesis regulators. *Plant Physiol.* 148: 2021-2049.
- Martens, S. & Forkmann, G. 1999. Cloning and expression of flavone synthase II from *Gerbera* hybrids. *Plant J.* 20: 611-618.
- Matsuda, F., Hirai, M.Y., Sasaki, E., Akiyama, K., Yonekura-Sakakibara, K., Provart, N.J., Sakurai, T., Shimada, Y. & Saito, K. 2009. AtMetExpress development: A phytochemical atlas of *Arabidopsis thaliana* development. *Plant Physiol.* 152: 566-578.
- Mercke, P., Kappers, I.F., Verstappen, F.W., Vorst, O., Dicke, M. & Bouwmeester, H.J. 2004. Combined transcript and metabolite analysis reveals genes involved in spider mite induced volatile formation in cucumber plants. *Plant Physiol.* 135: 2012-2024.
- Morita, M., Shitan, N., Sawada, K., Van Montagu, M.C., Inze, D., Rischer, H., Goossens, A., Oksman-Caldentey, K.M., Moriyama, Y. & Yazaki, K. 2009. Vacuolar transport of nicotine is mediated by a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter in *Nicotiana tabacum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 2447-2452.
- Naoumkina, M.A., Modolo, L.V., Huhman, D.V., Urbanczyk-Wojniak, E., Tang, Y., Sumner, L.W. & Dixon, R.A. 2010. Genomic and coexpression analyses predict multiple genes involved in triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 22: 850-866.
- Obayashi, T. & Kinoshita, K. 2010. Coexpression landscape in ATTED-II: usage of gene list and gene network for various types of pathways. *J. Plant Res.* 123: 311-319.
- Obayashi, T., Nishida, K., Kasahara, K. & Kinoshita, K. 2011. ATTED-II updates: condition-specific gene coexpression to extend coexpression analyses and applications to a broad range of flowering plants. *Plant Cell Physiol.* 52: 213-219.
- Ogata, Y., Suzuki, H., Sakurai, N. & Shibata, D. 2010. CoP: a database for characterizing co-expressed gene modules with biological information in plants. *Bioinformatics* 26: 1267-1268.
- Rischer, H., Oresic, M., Seppanen-Laakso, T., Katajamaa, M., Lammertyn, F., Ardiles-Diaz, W., Van Montagu, M.C., Inze, D., Oksman-Caldentey, K.M. & Goossens, A. 2006. Gene-to-metabolite networks for terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 5614-5619.
- Sønderby, I.E., Burow, M., Rowe, H.C., Kliebenstein, D.J. & Halkier, B.A. 2010. A complex interplay of three R2R3 MYB transcription factors determines the profile of aliphatic glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 153: 348-363.
- Sønderby, I.E., Hansen, B.G., Bjarnholt, N., Ticconi, C., Halkier, B.A. & Kliebenstein, D.J. 2007. A systems biology approach identifies a R2R3 MYB gene subfamily with distinct and overlapping functions in regulation of aliphatic glucosinolates. *PLoS ONE* 2: e1322.
- Saito, K., Hirai, M.Y. & Yonekura-Sakakibara, K. 2008. Decoding genes with coexpression networks and metabolomics - 'majority report by precogs'. *Trends Plant Sci.* 13: 36-43.

- Sawada, Y., Kuwahara, A., Nagano, M., Narisawa, T., Sakata, A., Saito, K. & Hirai, M.Y. 2009a. Omics-based approaches to methionine side chain elongation in *Arabidopsis*: characterization of the genes encoding methylthioalkylmalate isomerase and methylthioalkylmalate dehydrogenase. *Plant Cell Physiol.* 50: 1181-1190.
- Sawada, Y., Toyooka, K., Kuwahara, A., Sakata, A., Nagano, M., Saito, K. & Hirai, M.Y. 2009b. *Arabidopsis* bile acid: sodium symporter family protein 5 is involved in methionine-derived glucosinolate biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 50: 1579-1586.
- Schmid, M., Davison, T.S., Henz, S.R., Pape, U.J., Demar, M., Vingron, M., Scholkopf, B., Weigel, D. & Lohmann, J.U. 2005. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat. Genet.* 37: 501-506.
- Schoendorf, A., Rithner, C.D., Williams, R.M. & Croteau, R.B. 2001. Molecular cloning of a cytochrome P450 taxane 10 beta-hydroxylase cDNA from *Taxus* and functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 1501-1506.
- Schopfer, C.R. & Ebel, J. 1998. Identification of elicitor-induced cytochrome P450s of soybean (*Glycine max* L.) using differential display of mRNA. *Mol Gen Genet.* 258: 315-322.
- Schopfer, C.R., Kochs, G., Lottspeich, F. & Ebel, J. 1998. Molecular characterization and functional expression of dihydroxypterocarpan 6a-hydroxylase, an enzyme specific for pterocarpanoid phytoalexin biosynthesis in soybean (*Glycine max* L.). *FEBS Lett.* 432: 182-186.
- Tieman, D., Taylor, M., Schauer, N., Fernie, A.R., Hanson, A.D. & Klee, H.J. 2006. Tomato aromatic amino acid decarboxylases participate in synthesis of the flavor volatiles 2-phenylethanol and 2-phenylacetaldehyde. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 8287-8292.
- Tohge, T., Nishiyama, Y., Hirai, M.Y., Yano, M., Nakajima, J.-i., Awazuhara, M., Inoue, E., Takahashi, H., Goodenow, D.B., Kitayama, M., Noji, M., Yamazaki, M. & Saito, K. 2005. Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing a MYB transcription factor. *Plant J.* 42: 218-235.
- van der Fits, L. & Memelink, J. 2000. ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science* 289: 295-297.
- Yamazaki, M. & Saito, K. 2011. Molecular genetic study on the anthocyanin chemotypes of *Perilla frutescens* var. *crispa*. *Nat Prod Commun* 6: 423-427.
- Yonekura-Sakakibara, K., Tohge, T., Matsuda, F., Nakabayashi, R., Takayama, H., Niida, R., Watanabe-Takahashi, A., Inoue, E. & Saito, K. 2008. Comprehensive flavonol profiling and transcriptome coexpression analysis leading to decoding gene-metabolite correlations in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 2160-2176.
- Yonekura-Sakakibara, K., Tohge, T., Niida, R. & Saito, K. 2007. Identification of a flavonol 7-O-rhamnosyltransferase gene determining flavonoid pattern in *Arabidopsis* by transcriptome coexpression analysis and reverse genetics. *J. Biol. Chem.* 282: 14932-14941.
- Zhang, H., Hedhili, S., Montiel, G., Zhang, Y., Chatel, G., Pré, M., Gantet, P. & Memelink, J. 2011. The basic helix-loop-helix transcription factor CrMYC2 controls the jasmonate-responsive expression of the ORCA genes that regulate alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant J.* 67: 61-71.

- Ziegler, J., Voigtlander, S., Schmidt, J., Kramell, R., Miersch, O., Ammer, C., Gesell, A. & Kutchan, T.M. 2006. Comparative transcript and alkaloid profiling in Papaver species identifies a short chain dehydrogenase/reductase involved in morphine biosynthesis. *Plant J.* 48: 177-192.
- Zulak, K.G., Cornish, A., Daskalchuk, T.E., Deyholos, M.K., Goodenowe, D.B., Gordon, P.M., Klassen, D., Pelcher, L.E., Sensen, C.W. & Facchini, P.J. 2007. Gene transcript and metabolite profiling of elicitor-induced opium poppy cell cultures reveals the coordinate regulation of primary and secondary metabolism. *Planta* 225: 1085-1106.