

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も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 glucosyltransferase (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卉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、カーネーション花卉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 (AMaIT) も液胞移行型であることが予想された。

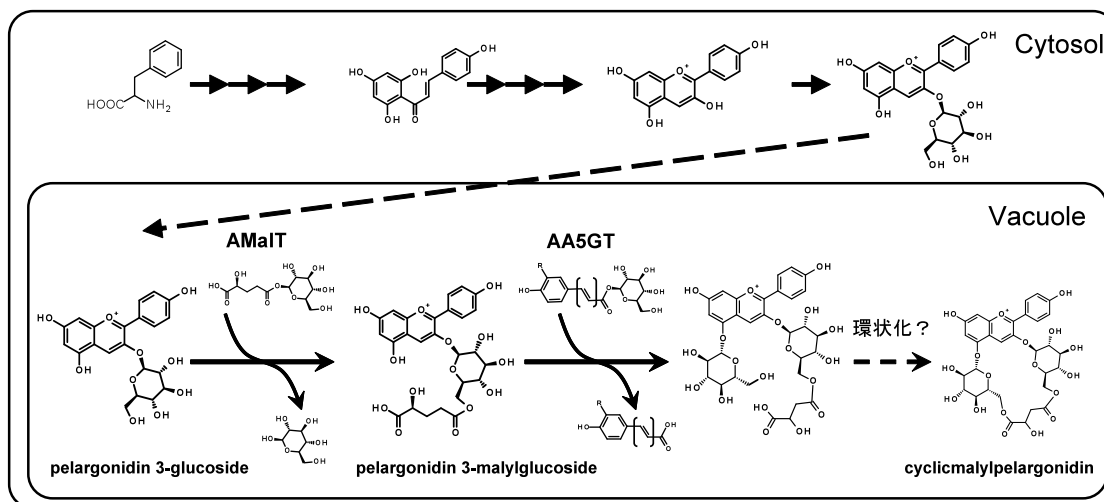


Figure 1 カーネーション花卉における推定されるアントシアニン合成経路 アントシアニンの例としてペラルゴニジンタイプの分子を示した。

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、さらにそ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 cyclimalylpelargonidin 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卉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、A5GT 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。カーネーション花卉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、花卉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、カーネーション花卉において、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、カーネーション花卉由来の 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 を蓄積している花卉に 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ボンバ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きである。デルフィニウム花卉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。デルフィニウム花卉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のと同じ degenerate primer を用いて、デルフィニウム花卉から調製した 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

デルフィニウム花卉に含まれるシアノデルフィンに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、デルフィニウム花卉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卉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を持たれる。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小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き明かされていくものと期待される。

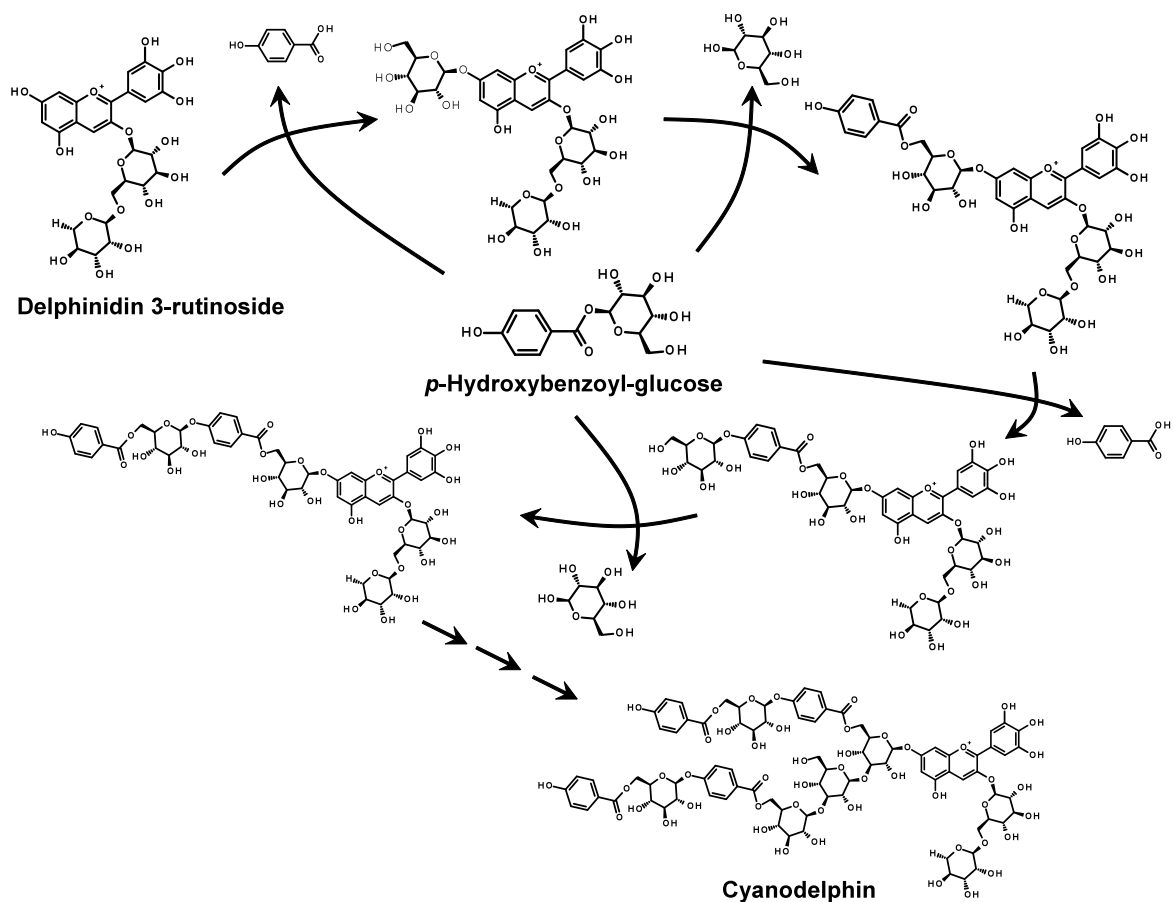


Figure 2 デルフィニウム青花弁において推定されるアントシアニン色素合成経路図

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 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.