

第3章 アントシアニン生合成酵素遺伝子の機能解析

種々の植物種では、アントシアニン生合成酵素の特性が植物体またはその培養物から抽出した酵素により明らかにされている (Heller and Forkmann 1994、Forkmann and Heller 1999、Springob *et al.* 2003)。また、植物のゲノム解析が進み、アントシアニン生合成に関与する多くの遺伝子も単離・解析され、DDBJ や NCBI などのデータベースに登録されている。さらに、単離された遺伝子の異種発現により、酵素の基質特異性ばかりでなく、*Medicago truncatula* の CHS (Ferrer *et al.* 1999) や CHI (Jez *et al.* 2000) およびシロイヌナズナ ANS (Wilmouth *et al.* 2002) ではその三次元構造も解析され、詳細な酵素機能が明らかにされつつある。しかしながら、データベースに登録されているアントシアニン生合成遺伝子の多くは、遺伝子間のホモロジーを基に単離されたものであり、コードするタンパク質の機能を解析するまでに至っていない。そのため、多くのアントシアニン生合成酵素の基質特異性や構造特性などが明らかにされていないのが現状である。

ダッチアイリスにおけるアントシアニンの生合成経路を解明するためには、その遺伝子を単離するばかりでなく、単離した遺伝子がコードするタンパク質の機能を解析することも必要である。さらに、アントシアニン生合成酵素の機能、特に基質特異性に関する知見を蓄積することは、本種を含む観賞用植物種における花色の分子育種を促進するためにも極めて重要である。しかしながら、これまでのところ *Iris* 属では、ダッチアイリスにおける *5GT* (Imayama *et al.* 2004) および *3AT* (Yoshihara *et al.* 2006) cDNA の異種発現解析が報告されているにすぎない。

そこで、本章では前章・第1節で単離したアントシアニン生合成遺伝子のうち、アントシアニンとフラボン生合成の分岐点に位置する *F3H* cDNA、アントシアニンの安定性に重要である *3GT* cDNA を大腸菌において異種発現させ、その酵素特性を明らかにした。さらに、分子遺伝学的知見がこれまでほとんど得られていないアントシアニンのメチル化に関与する *O*-メチルトランスフェラーゼ (OMT) の単離とその機能解析も試みた。

第1節 フラバノン3-ヒドロキシラーゼ遺伝子の異種発現解析

1. 緒言

アントシアニンおよびフラボノールの生合成を導く重要な反応であるである、フラバノンからジヒドロフラボノールへの水酸化は、フラバノン3-ヒドロキシラーゼ (F3H) によって触媒される (Fig. 3-1)。F3H は補因子として2-オキソグルタル酸、 Fe^{2+} およびアスコルビン酸を要求することから、2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ (2-ODD) に分類される。F3H の酵素学的な機能は、ストック (*Mattiola incana*) において最初に報告され (Forkmann *et al.* 1980)、次いでパセリ (*Petroselinum crispum*) の培養細胞でも F3H 活性が確認された (Britsch *et al.* 1981)。また、F3H 活性はキンギョソウ (Forkmann and Stotz 1981)、およびペチュニア (Froemel *et al.* 1985、Britsch and Grisebach 1986) に加え、その他の植物種の花蕾でも見出されている (Forkmann and Stotz 1984)。

一方、F3H のゲノム DNA クローンあるいは cDNA クローンは、これまでにキンギョソウ (Martin *et al.* 1991)、シロイヌナズナ (Pelletier and Winkel-Shirley 1996)、アスター (*Callistephus chinensis*) (Britsch *et al.* 1993)、カーネーション (*Dianthus caryophyllus*) (Britsch *et al.* 1993、Dedio *et al.* 1995)、イチヨウ (*Ginkgo biloba*) (Shen *et al.* 2006)、オオムギ (*Hordeum vulgare*) (Meldgaard *et al.* 1992)、*Malus* sp. (Davies 1993)、ストック (Britsch *et al.* 1993)、アルファルファ (Charrier *et al.* 1995)、シソ (*Perilla frutescens*) (Gong *et al.* 1997)、ペチュニア (Britsch *et al.* 1992)、ブドウ (Spavoli *et al.* 1994)、およびトウモロコシ (Deboo *et al.* 1995) などの植物種において単離・解析されている。これらの植物種の F3H cDNA クローンから推定したアミノ酸配列の比較により、植物種間で配列が高度に保存されていることが明らかにされた (Forkmann and Heller 1999)。しかしながら、cDNA がコードする F3H の酵素学的特性はペチュニアで行われているのみであり (Britsch *et al.* 1992)、植物における F3H の分子的小および生化学的特性に関する知見は極めて不足している。

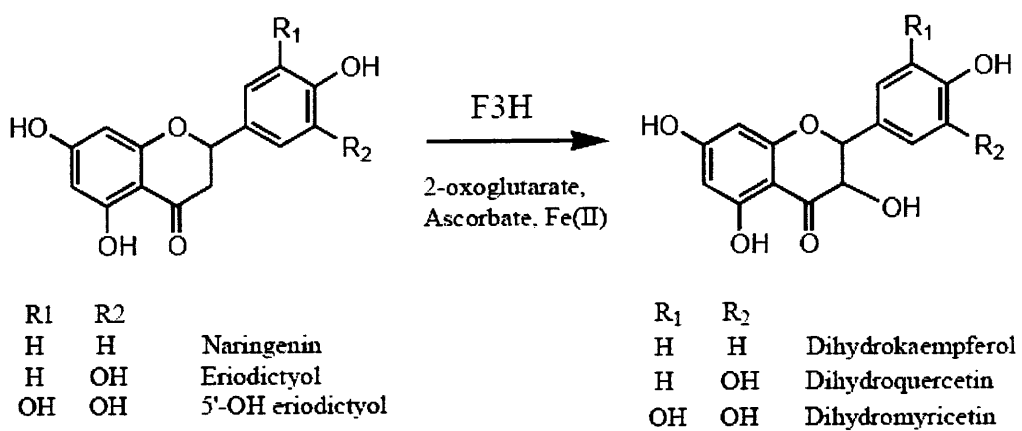


Fig. 3-1. Hydroxylation of flavanones catalyzed by flavanone 3-hydroxylase (F3H).

そこで本節では、前章第1節で単離したダッチアイリス *F3H* cDNA を大腸菌において異種発現させ、F3H の分子のおよび生化学的特性を解析した。

2. 材料および方法

1) 基質

IhF3H 組換えタンパク質の異種発現用のフラバノン基質としてナリンゲニン (naringenin)、エリオジクチオール (eriodictyol)、ホモエリオジクチオール (homoeriodictyol)、サクラネチン(sakuranetin)、イソサクラネチン (isosakuranetin)、ヘスペレチン (hesperetin)、リキリチゲニン (liquilitigenin)、ピノセンブリン (pinocembrin) および2,3-ジヒドロフラボン (2,3-dihydroflavone) を、また、ジヒドロフラボノール基質としてジヒドロケンフェロール (dihydrokaempferol) を供試した。これらのうち、naringenin は Sigma-Aldrich Japan K.K.より、eriodictyol、homoeriodictyol、sakuranetin、isosakuranetin、hesperetin、liquilitigenin および pinocembrin はフナコシ株式会社より、2,3-dihydroflavone は和光純薬工業株式会社より購入した。さらに、dihydrokaempferol は岩科 司 博士 (国立科学博物館筑波研究資料センター筑波実験植物園) から譲渡されたものを用いた。

2) IhF3H 組換えタンパク質の異種発現および精製

前章・第1節で単離した *IhF3H* cDNA の ORF の両末端に、2つの制限酵素サイト (*Bam*HI および *Kpn*I) を構築するため、2種類のプライマー、forward primer [5'-AAA GGA TCC ATG GCT CCC GGT GCA AGC A-3' (: *Bam*HI 部位、 : 開始メチオニン)]、および reverse primer [5'-ATA GGT ACC TCA AGC AAA GAT TCC ATT AA-3' (: *Kpn*I 部位、 : 終止コドン)]を用いて PCR 増幅を行った。増幅した断片は pCR®-Blunt II-TOPO® vector (Invitrogen Japan K.K.) へサブクローニングし、*Bam*HI および *Kpn*I で切断した。続いて、制限酵素処理した断片は pQE1hOMT2 を作製するため、pQE30 発

現ベクター (QIAGEN K.K.) の *Bam*HI-*Kpn*I サイトへライゲーションした。

N 末端に 6 × His-tag をもつ組換えタンパク質を産生するため、pQE1hF3H1、pQE1hF3H2 および pQE1hF3H3 プラスミドは大腸菌 M15 菌株へ導入した。プラスミドを有する大腸菌を 37 °Cで一晩、培養し、その終夜培養物を 20 ml の LB 培地 (100 µg/ml アンピシリンおよび 25 µg/ml カナマイシンを含む) に 1/100 量加え、OD₆₀₀ = 0.6 まで 37 °Cで前培養した。タンパク質の誘導は、培養物を 25 °Cまで冷却した後、100 mM IPTG を終濃度 0.5 mM となるよう添加し、25 °C、24 時間振とう培養することにより行った。誘導をかけた大腸菌を収集、SK ミル (有限会社トッケン) により菌体を破碎し、菌体重量の 5 倍量の 1 mM ジチオスレイトール (DTT) を含む 100 mM リン酸カリウム (KPi) 緩衝溶液 (pH 7.0 または 5.5) で再懸濁した。4°C、14,000 rpm、10 分間の遠心分離を 2 回繰り返し、その上清を粗酵素抽出物として使用した。粗酵素抽出物中のタンパク質濃度は Bradford 法 (Bradford 1976) によって測定し、更なる解析に用いた。

3) SDS-polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE) および Western blot 分析

SDS-PAGE (Laemmli 1970) は、Mini Protean III electrophoresis unit (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いて行った。大腸菌破碎物の可溶性画分を、等量の 2 × sample buffer (125 mM Tris-HC, pH 6.8, 20 % グリセロール、0.01 % ブロモフェノールブルー、10 % 2-メルカプトエタノール、4 % SDS) と混合し、100 °Cで 5 分間煮沸してタンパク質を変性させた。コームに変性させたサンプルをアプライし、分離したタンパク質は Coomassie brilliant blue R-250 (CBB R-250) を用いて染色し、可視化した。

また、SDS-PAGE で展開したタンパク質は、ニトロセルロースメンブレン (Hybond-ECL、GE Healthcare UK Ltd.) 上に Mini Trans-Blot apparatus (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いてプロットした。非特異的な結合サイトを 1 %スキムミルクを含む Tween-PBS [(0.05 % Tween-20, 1 × リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)] で 1 時間ブロッキングした後、1 %スキムミルクを含む Tween-PBS で 1 / 3,000 に希釈した一次抗体

(anti-His antibody、GE Healthcare UK Ltd.) と室温で1時間以上反応させた。メンブレンを Tween-PBS 中で室温、10 分間、3 回洗浄した後、1 / 7,500 に希釈した二次抗体 [Gort anti-mouse IgG (H+L)、alkaline phosphatase conjugate、Promega Co. Ltd.] と室温、1 時間反応させ、再度 Tween-PBS 中で室温、10 分間、3 回洗浄した。二次抗体の検出は NBT/BCIP stock solution (Roche Diagnostics K.K.) を使用した。

4) IhF3H の活性測定

F3H 酵素反応は、500 μ M の各基質、1 mM 2-オキソグルタル酸、100 μ M Fe₂SO₄、1 mM アスコルビン酸、1mM DTT、100 mM KPi (pH 7.0) を含む反応溶液に、50 μ g の IhF3H を添加することで反応を開始させた。35 $^{\circ}$ C、40 分間インキュベーションした後、100 %酢酸を 4 μ l 加えることにより、反応を停止させた。反応産物は室温、14,000 rpm、2 分間遠心した後、上清を Millipore Express Membrane Filter (0.22 μ m、13 mm、Nihon Millipore K.K.) でろ過した。反応産物は、前章・第2節と同様の島津 HPLC システムにより分析した。溶出システムは、移動相 (流速 1 ml/min) として、A 液 (10 %酢酸、0.1 %リン酸) と B 液 [アセトニトリル : 水 = 1 : 1 (v/v)] を使用した。B 液 : A 液 = 60 : 40 を初発として、35 $^{\circ}$ C 下で流速 1 ml/min の A 液に 1 %/min の直線勾配をかけて B 液を流し、40 分間のグラジエント溶出を行った。フラバノンの検出は、フォトダイオードアレイ紫外可視検出器により 320 nm で計測し、各成分の保持時間および面積の算出は LC ワークステーション CLASS-VP Ver.6.1 によった。酵素反応により得られた新規ピークの同定は、液体クロマトグラフ質量分析計 (島津 LCMS-2010EV システム) を使用し、以下の条件で行った。eriodictyol、homoeriodictyol、naringenin および hesperetin 用の移動相には、ギ酸 : アセトニトリル : 水 = 1 : 25 : 75 溶液を、pinocembrin および isosakuranetin 用の移動相には、ギ酸 : アセトニトリル : 水 = 1 : 30 : 70 溶液を使用し、Senshu-pack PEGASIL-ODS I.D. 2.0 mm \times 150 mm カラム (株式会社センシュー科学) で流量 0.2ml/min のイソクラティック分析によった。

3. 結果および考察

組換え IhF3H タンパク質を発現させた大腸菌の可溶性画分の SDS-PAGE および Western blot 分析により、IhF3H1、IhF3H2 および IhF3H3 をロードした各レーンにおいて、約 41 - 42 kDa の位置にバンドが確認された (Fig. 3-2B)。この値は、各 *F3H* cDNA の推定アミノ酸配列より算出されたタンパク質の推定分子質量と一致していたが、40 kDa よりも低い位置にさらに一本のバンドが確認された (Fig. 3-2B)。ペチュニアの花の粗抽出物において、41.6 kDa のネイティブ型ペチュニア F3H は、速やかなタンパク質分解によって 38 kDa の断片を生じ、その後、ゆっくりとしたタンパク質分解によって 34 kDa のポリペプチドへ、そしてさらに短い断片へと分解することが報告されている (Britsch *et al.* 1992、Lukačín *et al.* 2000b)。また、最初のタンパク質分解は、F3H タンパク質の C 末端部で起こり、N 末端は 38 kDa の断片においても保たれることも明らかにされている (Lukacin *et al.* 2000b)。組換え IhF3H は N-末端に 6 × His-tag を有すること、IhF3H の Western blot 分析において 41 kDa と 38 - 39 kDa の 2 本のバンドが確認されることから、IhF3H においても、ペチュニアで報告されたタンパク質分解と同様の現象が起こったことが示唆される。また、このタンパク質の分解は抽出時の KPi buffer の pH を 5.5 に設定することにより、抑制することができた (Fig. 3-2C)。

IhF3H を発現させた大腸菌破碎物の可溶性画分は、naringenin、2-オキシグルタル酸、Fe(II)、およびアスコルビン酸とともにインキュベートし、F3H 活性の調査に用いた。ネガティブコントロールとして用いた pQE30 empty vector を持つ大腸菌可溶性画分の反応溶液では、naringenin 以外のピークは検出されなかったが (Fig. 3-3A)、IhF3H1、IhF3H2 および IhF3H3 を発現した大腸菌可溶性画分の反応産物では新規ピークが検出された (Fig. 3-3B ~ D)。コクロマトグラフィーおよび λ_{\max} から、この新規ピークは dihydrokaempferol であることが確認された。そのため、*IhF3H1*、*IhF3H2* および *IhF3H3* cDNA はすべて、naringenin から dihydrokaempferol への反応を触媒する機能を持ったフラバノン 3-ヒドロキシラーゼをコードしていることが明らかになった。

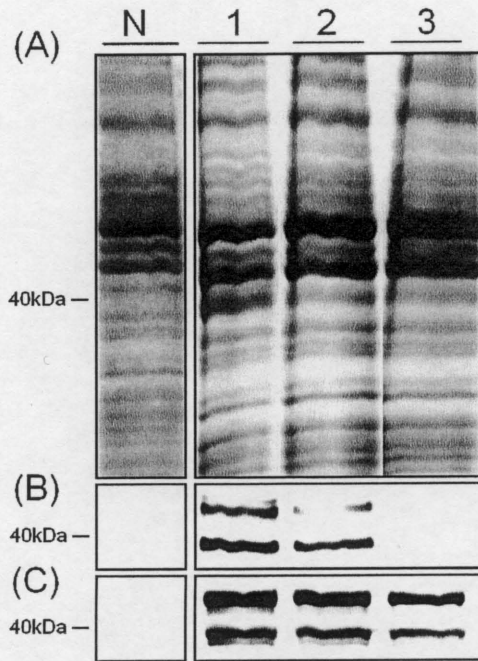


Fig. 3-2. Analysis of SDS-PAGE and Western blotting of IhF3Hs proteins expressed in *Escherichia coli*. Lane N, A negative control (a soluble fraction of *E. coli* harboring empty vector); Lanes 1-3, Soluble fractions of *E. coli* harboring pQEIhF3H1 (lane 1), pQEIhF3H2 (lane 2) and pQEIhF3H3 (lane 3).

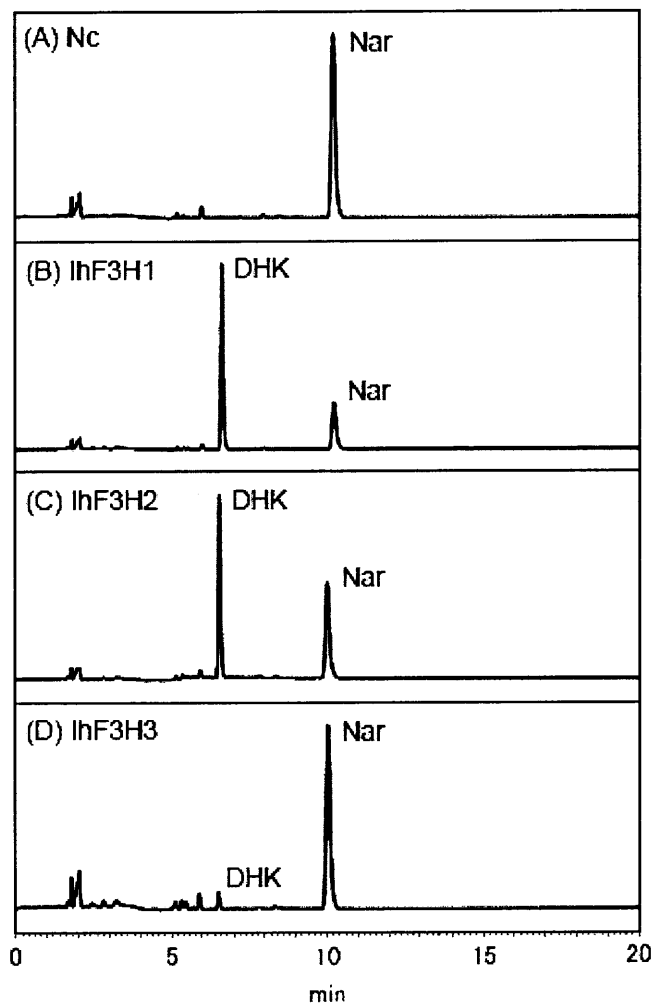
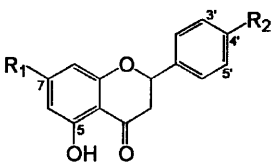
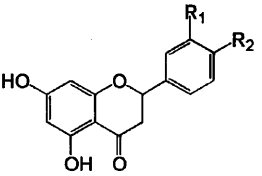
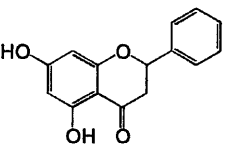
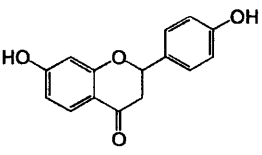
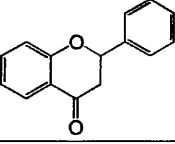


Fig. 3-3. High-performance liquid chromatographic analysis of reaction products catalyzed by IhF3Hs. A, A control [no reaction products from the protein extract of *Escherichia coli* transformed with an empty vector (pQE30)]; B-D, The reaction products from the protein extracts of transformed *E. coli* expressing IhF3H1 (B), IhF3H12 (C) and IhF3H13 (D). Peak numbers 1 (HPLC retention time (R_t) 10.4 min) and 2 (R_t 6.7 min) show naringenin (Nar) and dihydrokaempferol (DHK), respectively.

Table 3-1. Substrate specificity of recombinant IhF3H1 and IhF3H2 for various flavanones

Substrate	Relative activity(%) ^a		
	IhF3H1	IhF3H2	
	Naringenin (R ₁ =OH, R ₂ =OH)	100	100
	Sakuranetin (R ₁ =OCH ₃ , R ₂ =OH)	<1	<1
	Isosakuranetin (R ₁ =OH, R ₂ =OCH ₃)	100	81
	Eriodictyol (R ₁ =OH, R ₂ =OH)	98	95
	Homoeriodictyol (R ₁ =OCH ₃ , R ₂ =OH)	194	133
	Hesperetin (R ₁ =OH, R ₂ =OCH ₃)	22	28
	Pinocembrin	39	27
	Liquiritigenin	282	183
	Flavanone	n.d.	n.d.

^aThe F3H activity obtained with naringenin was expressed as 100%.

さらに、活性が高かった *IhF3H1* および *IhF3H2* を用いて種々のフラバノンに対するアッセイを行った。その結果、両 *IhF3H* は 5-デオキシフラバノンである *liquiritigenin* に対して最も高い活性を示し、*sakuranetin* に対する活性は最も低かった (Table 3-1)。また、その他のフラバノンに対する活性の傾向は、*IhF3H1* および *IhF3H2* とも類似していた。*IhF3H* のフラバノン基質に対する活性の比較から、その A 環 5 位の水酸基、および B 環 3'位あるいは 4'位の *O*-メチル基は *IhF3H* 活性に大きな影響を及ぼさないが、A 環 7 位の *O*-メチル基は *IhF3H* 活性を劇的に減少させる傾向があった。しかしながら、*IhF3H* は分析したフラバノンのほぼすべてに活性を示したことから、*IhF3H* の基質特異性は非常に幅広く、柔軟性に富んでいるものと考えられる。さらに、前章・第 2 節での *F3H* 遺伝子の発現解析において、この遺伝子が分析した葉や花器官のすべてで発現していたことから、*IhF3H* はアントシアニンの生合成のみならず、その他のフラボノイド類の生合成に関与している可能性も示唆される。

F3H 活性が詳細に分析されているペチュニアと *IhF3H* を比較した場合、両酵素はフラバノン基質の A 環 7 位の *O*-メチル基の影響に加え、その他の基質に対する活性強度も非常に類似していた (Schröder *et al.* 2004、Wellmann *et al.* 2004)。このことは、両種間において *F3H* の機能がよく保存されていることを指摘している。筆者の知る限り、これまで *F3H* の基質特異性に関する報告はペチュニア *F3H* のみであり、他種植物での報告は見当たらない。本研究は、*F3H* の基質特異性を植物種間で比較した、最初の報告である。

4. 摘要

アントシアニンおよびフラボノールの生合成を導く重要な反応である、フラバノンからジヒドロフラボノールへの水酸化は、フラバノン 3-ヒドロキシラーゼ (*F3H*) によって触媒される。本節では、ダッチアイリスの *F3H* をコードする 3 つの cDNA クローン (*IhF3H1* ~ *3*) を大腸菌に組み込み、6 × His-Tag との融合タンパク質として発現させ、機能解析を行った。*F3H* の主要な基質である *naringenin* を用いた酵素アッセイにより、*IhF3H1*、*Ih3H2*

および IhF3H3 のすべてがフラバノンからジヒドロフラボノールへの反応を触媒する活性を持つことが示された。また、活性が高かった IhF3H1 および IhF3H2 を用いて種々のフラバノンに対する基質特異性を分析したところ、これらの酵素は分析したフラバノンのほぼすべてに活性を示したが、その A 環 7 位の *O*-メチル化が F3H 活性を大幅に減少させる傾向が認められた。さらに、IhF3H はペチュニア F3H の機能と非常に類似していることが指摘された。

第2節 アントシアニン3-グルコシルトランスフェラーゼ遺伝子の異種発現解析

1. 緒言

アントシアニン生合成経路において、ロイコアントシアニンから合成されるアントシアニンは、最初の有色の化合物である。しかしながら、その不安定さ故に植物器官中で検出されず、その配糖体であるアントシアニン3G(アントシアニン)が最初の安定な有色化合物として検出される。そのため、アントシアニンの安定化には3位のグリコシル化が必須であり、それに関わる配糖化酵素は植物が多彩な花色を呈するための重要な酵素の一つであると言える。

多くの植物種のアントシアニン生合成において、この3位のグリコシル化はグルコースが用いられる。アントシアニンの3位へUDP-グルコースからグルコースを転移する、UDP-グルコース: アントシアニン3-O-グルコシルトランスフェラーゼ(3GT、Fig. 3-4)は、これまでにアントシアニンが蓄積する器官から精製され、その活性特性が明らかにされてきた(Saleh *et al.* 1976a, b, Hellar and Forkmann 1994, Do *et al.* 1995, Holton and Cornish 1995, Ogata *et al.* 1998, Tanaka *et al.* 1998)。さらに、3GTをコードするcDNAクローンもトウモロコシ(Fedoroff *et al.* 1984, Furtec *et al.* 1988, Ralston *et al.* 1988)、オオムギ(Wise *et al.* 1990)、キンギョソウ(Martin *et al.* 1991)、リンドウ(*Gentiana triflora*) (Tanaka *et al.* 1996)、シソ(Gong *et al.* 1997)、ブドウ(Ford *et al.* 1998)およびペチュニア(Yamazaki *et al.* 2002)において単離・解析されている。しかしながら、観賞用単子葉植物種において3GTの分子的小よび生化学的特性に関する報告はこれまでに全く見当たらないのが現状である。

そこで、本節では前章・第1節で単離したダッチアイリスの3GTcDNAを大腸菌において異種発現させ、種々のアントシアニンに対する3-O-グルコシル化活性を分析した。

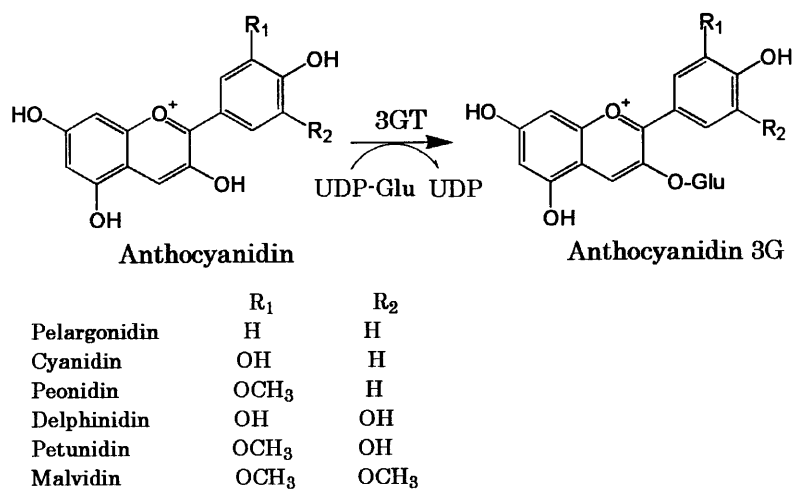


Fig. 3-4. Glucosylation of anthocyanidins catalyzed by UDP-glucose: anthocyanidin 3-*O*-glucosyltransferase (3GT).

2. 材料および方法

1) アントシアニン、アントシアニンおよび UDP-グルコース

アントシアニンとして、デルフィニジン (delphinidin)、マルビジン (malvidin)、シアニジン (cyaniding)、ペオニジン (peonidin) およびペラルゴニジン (pelargonidin) を、またアントシアニンとして delphinidin 3-glucoside (delphinidin 3G)、malvidin 3G、cyanidin 3G および peonidin 3G を供試した。delphinidin、malvidin、cyanidin、peonidin、pelargonidin、delphinidin 3G、malvidin 3G、cyanidin 3G および peonidin 3G はフナコシ株式会社より購入し、pelargonidin 3G は山口雅篤博士 (南九州大学) より譲渡された。さらに、UDP-グルコースは Sigma Aldrich Japan K.K.より購入したものをを用いた。

2) 大腸菌における Ih3GT の異種発現

大腸菌発現用ベクター (pQE30 vector、QIAGEN K.K.) に前章・第 1 節で単離した *Ih3GT* cDNA を導入するため、KOD -Plus- DNA polymerase (東洋紡績株式会社)、および 2 種類のプライマー、forward primer [5'-AAA GCA TGC ATG GGT CAG TCG AGC ATC-3' (: *SphI* 部位、 : 開始メチオニン)]、reverse primer [5'-TAT GGT ACC TCA AGC TGC AAA CAC AAT C-3' (: *KpnI* 部位、 : 終止コドン)] を用いた PCR 増幅により、ダッチアイリス *3GT (Ih3GT)* ORF の 5' および 3' 末端に *SphI* および *KpnI* 制限酵素部位を構築した。PCR によって増幅した断片は pCR® -Blunt II-TOPO® vector (Invitrogen Japan K.K.) へ組み込み、*SphI* および *KpnI* で切断した。制限酵素処理した 5'-*SphI*/*3GT*/*KpnI*-3' 断片は、同じく *SphI* および *KpnI* で切断した pQE30 vector (QIAGEN K.K.) へ挿入し、pQE*Ih3GT* 発現ベクターとした。pQE*Ih3GT* プラスミドは、pREP4 を有する大腸菌 M15 株に導入した。組換え *Ih3GT* タンパク質の発現誘導は、誘導時間を 48 時間とした他は、前節と同様に行った。誘導をかけた大腸菌を収集し、菌体重量の 5 倍量の 1 mM DTT を含む 100 mM KPi (pH 7.0) で再懸濁した。懸濁液中の大腸菌細胞は Imayama *et al.* (2004) の方法に従って破碎し、4 °C、14,000 rpm で 10 分間、2 回遠心分離し、得られた可溶性

画分を粗酵素抽出物として次の実験に用いた。

3) SDS-PAGE および Western blot 分析

10%のポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE および Western blot 分析は、前節と同様の方法により行った。

4) 酵素活性の測定

Ih3GT 酵素反応は、500 μ M アントシアニジン、1.2 mM UDP-グルコース、1 mM DTT を含む 100 mM KPi (pH 7.0) の反応溶液に、10 μ l の大腸菌破砕物の可溶性画分を加えることで開始させ、30 $^{\circ}$ C で 20 分間インキュベートした後、Forch *et al.* (1957) の方法に一部改変を加えた停止液 (メタノール : クロロホルム : ギ酸 = 20 : 40 : 3) を 50 μ l 加えることによって反応を停止させた。なお、pQE30 empty vector を持つ大腸菌の可溶性画分はネガティブコントロールとして使用し、アントシアニジンは、delphinidin、malvidin、cyanidin、peonidin および pelargonidin を使用した。反応産物は室温、14,000 rpm、2 分間遠心した後、上清を Millipore Express Membrane Filter (0.22 μ m, 13mm, Nihon Millipore K.K.) でろ過し、前章・第2節で述べた HPLC システムにより分析した。反応産物は既知のアントシアニン (delphinidin 3G、malvidin 3G、cyanidin 3G、peonidin 3G および pelargonidin 3G) とのコクロマトグラフィー、およびそれらの λ_{\max} を比較することによって同定した。

3. 結果および考察

pQEIh3GT を持つ大腸菌の可溶性画分は SDS-PAGE によって分離し、CBB R-250 によって染色した (Fig. 3-5A)。組換え Ih3GT タンパク質の分子質量は Western blot 分析によって約 50kDa であることが示され (Fig. 3-5B)、この値は Ih3GT cDNA の推定アミノ酸配列より算出されたタンパク質の推定分子質量 (49,558 Da) と合致していた。また、

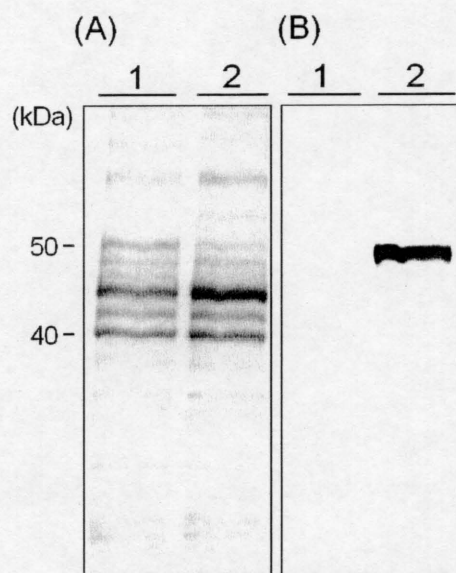


Fig. 3-5. Analyses of SDS-PAGE (A) and Western blotting (B) of Ih3GT protein expressed in *Escherichia coli*. Twenty μg of soluble fraction of *E. coli* lysates were loaded. Lane 1, pQE30 (empty vector) as a negative control; Lane 2, crude Ih3GT.

pQEIh3GT を持つ大腸菌破碎物の可溶性画分は、糖受容体である delphinidin、糖供与体である UDP-グルコースとともに、3GT 酵素活性の測定に用いた。この反応系から UDP-グルコースを除いた場合、アントシアニン以外のピークは検出されなかったが (Fig. 3-6A)、UDP-グルコースを反応溶液に添加した場合には、delphinidin 3G のピークが検出された (Fig. 3-6B)。このことは、組換え Ih3GT タンパク質が UDP-グルコース存在下において、delphinidin から delphinidin 3G への反応を触媒することを示している。さらに、種々のアントシアニンに対する活性の測定でも、調査したすべてのアントシアニンに対してグルコシル基転移活性が確認された (Table 3-2)。これらの結果から、Ih3GT cDNA が、UDP-グルコースからアントシアニンの 3 位へグルコシル基の転移を触媒する、アントシアニン 3-O-グルコシルトランスフェラーゼをコードしていることが明らかにされた。

Table 3-2 に示したように、Ih3GT はそれぞれのアントシアニンに対して異なる活性を示した。最も高いグルコシル基転移活性を示したのは、malvidin に対してであり、pelargonidin に対する活性は最も低かった。基質に対して異なる 3GT 活性は、リンドウでも報告されているが (Tanaka *et al.* 1996)、ペチュニアでは 3GT 活性にアントシアニン間での差異は観察されていない (Yamazaki *et al.* 2002)。そのため、3GT の基質特異性は植物種間で変異しているものと考えられる。本研究において、Ih3GT の糖転移活性が pelargonidin に対して示されたことは非常に興味深い。著者の知る限り、これまでの報告では *Iris* 属植物種において pelargonidin 型アントシアニン検出されていない。従って、本属植物種における pelargonidin 型アントシアニンの欠失の原因は、3GT の基質特異性によるものではなく、ジヒドロフラボノールからロイコアントシアニンへの反応を触媒する、DFR の基質特異性によるものだと考えられる。すなわち、ダッチアイリスの DFR は dihydrokaempferol を基質として受容できないため、pelargonidin 型アントシアニンを生産できないのである。今後、このことは、前章・第 1 節で単離された DFR cDNA の機能解析によって証明されるであろう。

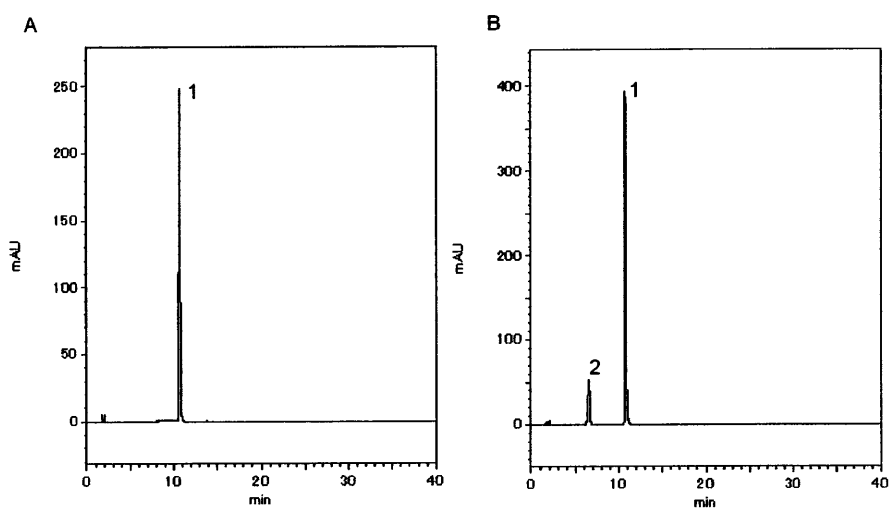


Fig. 3-6. High-performance liquid chromatographic analysis of reaction products catalyzed by Ih3GT. A: A control (UDP-glucose was omitted from the reaction mixture); B: The reaction product of Ih3GT (UDP-glucose was added in the reaction mixture). Peak numbers 1 and 2 show delphinidin 3G and delphinidin, respectively.

Table 3-2. Substrate specificity on glucosylation by Ih3GT expressed in *Escherichia coli*

Anthocyanidin	Reaction product	Specific activity ($10^{-2} \times \text{pkat } \mu\text{g}^{-1}$)
Delphinidin	Delphinidin 3-glucoside	47.7 \pm 4.8
Malvidin	Malvidin 3-glucoside	98.4 \pm 1.8
Peonidin	Peonidin 3-glucoside	58.7 \pm 5.4
Cyanidin	Cyanidin 3-glucoside	48.5 \pm 7.8
Pelargonidin	Pelargonidin 3-glucoside	24.3 \pm 1.7

Data are mean values of triplicate incubations \pm SD.

4. 摘要

アントシアニン生合成において、UDP-グルコース:アントシアニン 3-*O*-グルコシルトランスフェラーゼ (3GT) は、UDP-グルコースからアントシアニンの 3 位の水酸基へのグルコシル基の転移を触媒し、最初の安定なアントシアニンをもたらす。本節では、前章で単離したダッチアイリス 3GT cDNA クローン (*Ih3GT*) に関する大腸菌での異種発現解析を行った。6 × His-Tag との融合タンパク質の *Ih3GT* タンパク質の SDS-PAGE および Western blot 分析によって示された約 50 kDa の分子質量は、*Ih3GT* cDNA の推定アミノ酸配列より算出されたタンパク質の推定分子質量 (49,558 Da) と一致していた。また、酵素活性の分析により、*Ih3GT* cDNA が UDP-グルコースからアントシアニンの 3 位へグルコシル基を転移する機能を持った 3GT タンパク質をコードしていることが確認された。さらに、*Ih3GT* の異種発現タンパク質は、調査したアントシアニンの種類に関係なく活性を有することが明らかになった。

第3節 *S*-アデノシル-*L*-メチオニン依存性 *O*-メチルトランスフェラーゼ遺伝子の単離とその異種発現解析

1. 緒論

S-アデノシル-*L*-メチオニン (SAM)-依存性 *O*-メチルトランスフェラーゼ (OMTs) によって触媒される *O*-メチル化は、細菌、菌類、植物および動物を含む様々な生物種において起こる普遍的な反応である (Ibrahim *et al.* 1998)。植物において、OMT はフラボノイドやリグニンのようなフェニルプロパノイドなどの二次代謝産物のメチル化に重要な役割を担っている。すなわち、フラボノイドへのメチル化は、花色の変化や生体防御機能などを付与する重要な修飾であり、カフェ酸やカフェ酸-CoA などのフェニルプロパノイドのメチル化は、リグニン合成の中間産物の生産とともに、アントシアニンのアシル基供与体をもたらすものと考えられる。そのため、OMT をコードする cDNA の単離と解析は、花色の発現機構を解明し、その育種を進めていく上でも有用である。

カフェオイル CoA 3-*O*-メチルトランスフェラーゼ (CCoAMT) は、パセリの細胞培養物から最初に獲得された (Schmitt *et al.* 1991)。次いで、カフェ酸/5-ヒドロキシフェルラ酸 *O*-メチルトランスフェラーゼがアスペン (*Populus tremuloides*) (Bugos *et al.* 1991) から、カフェ酸 *O*-メチルトランスフェラーゼ (COMT) がアルファルファ (Gouri *et al.* 1991)、トウモロコシ (Collazo *et al.* 1992) から、フラボノイド *O*-メチルトランスフェラーゼ (FOMT) がニチニチソウ (*Catharanthus roseus*) (Cacace *et al.* 2003)、イネ (*Oryza sativa*) (Kim *et al.* 2006) などから単離・解析された。また、分子生物学的解析により、植物 OMTs の共通の特徴と分類法が Ibrahim *et al.* (1998) によって報告された。さらに、アルファルファにおいてはカルコン *O*-メチルトランスフェラーゼ (ChOMT、Zubieta *et al.* 2001)、イソフラボン *O*-メチルトランスフェラーゼ (IOMT、Zubieta *et al.* 2001)、COMT (Zubieta *et al.* 2002) および CCoAOMT (Ferrer *et al.* 2005) の結晶構造解析も進んでいる。

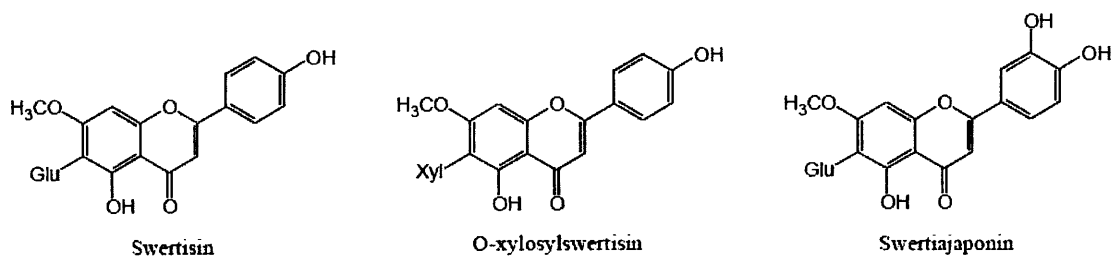


Fig. 3-7. Methylated flavones detected in *Iris hollandica* (Asen *et al.* 1970).

単子葉観賞用植物種であるダッチアイリスでは、コピグメントとして swertisin、*O*-キシロシルスウェルチジン (*O*-xylosylswertisin) およびスウェルチアヤポニン (swertiajaponin) の存在が報告されている (Asen *et al.* 1970) (Fig. 3-7)。しかしながら、アヤメ科植物の OMT に関する分子のおよび生化学的特性に関する報告は全くないのが現状である。そこで、本節ではダッチアイリスの花蕾からの OMT cDNA の単離し、その異種発現解析を試みた。

2. 材料および方法

1) 基質材料

OMT cDNA の異種発現用基質として、*p*-クマル酸、カフェ酸、フェルラ酸、ベンザルアセトフェン (benzalacetophene) (カルコン)、naringenin、2, 3-dihydroflavone (フラバノン)、アピゲニン (apigenin)、isovitexin、swertidin、dihydrokaempferol、ケルセチン (quercetin)、ルチン (rutin)、cyanidin、delphinidin、delphinidin 3*p*CRG5G、delphinidin 3*p*CRG、delphinidin 3RG、カテコール (catechol)、グアヤコール (guaiacol) およびオルシノール (orcinol) を供試した。*p*-クマル酸、カフェ酸はナカライテスク株式会社から、cyanidin、delphinidin はフナコシ株式会社から、apigenin、naringenin、quercetin、rutin は Sigma-Aldrich Japan K.K. から、catechol、フェルラ酸、guaiacol、orcinol、benzalacetophene、2,3-dihydroflavone は和光純薬工業株式会社から購入した。また、delphinidin 3*p*CRG5G、delphinidin 3*p*CRG および delphinidin 3RG は山口雅篤博士 (南九州大学) より、および dihydrokaempferol、isovitexin および swertidin は岩科 司博士 (国立科学博物館筑波研究資料センター筑波実験植物園) から譲渡された。

2) OMT をコードする cDNA のクローニング

完全長の OMT cDNAs は、Imayama *et al.* (2004) によって構築されたダッチアイリス花蕾の cDNA ライブラリーからのランダムシーケンスによって獲得した。プラスミドへ

の切り出し、精製およびシーケンシング反応は、前章・第1節と同様に行った。得られた2つの *OMT* ホモログ完全長 cDNA クローンはそれぞれ *IhOMT1* および *IhOMT2* と称した。これら cDNA の塩基配列および推定アミノ酸配列の解析は、前章・第1節の方法に従った。

3) RT-PCR 分析

IhOMT1 および *IhOMT2* 転写産物を検出するために、遺伝子特異的プライマー (*IhOMT1*、5'-GGA GGA GGT ACG GCG CCG A-3' および 5'-GGG GTA CTT GGT GAC GAT CGC C-3'、*IhOMT2*、5'-CAT GCG TCC GCT CGT GCT C-3' および 5'-GGA AGG CCG CGA TCA C-3') を設計し、RT-PCR 分析を行った。逆転写反応および PCR 増幅に関して、アニーリング温度を 55 °C (*IhOMT1*)、52 °C (*IhOMT2*) に設定した他は、前章・第2節と同様の方法により行った。

4) *IhOMT1* および *IhOMT2* 組換えタンパク質の異種発現および精製

IhOMT1 cDNA の完全長 ORF は *SphI* サイトを付加したプライマー、5'-AAA GCA TGC ATG GAT TCT ACT CCG GTG-3' (: *SphI* 部位、 : 開始メチオニン)、およびベクター特異的プライマーである M13M4 (pBluescript ベクターのマルチクローニングサイト内の *PstI* サイトを利用するため) を用いて PCR により増幅した。増幅した断片は pCR®-Blunt II-TOPO® vector (Invitrogen Japan K.K.) へサブクローニングし、*SphI* および *PstI* で切断した。続いて、制限酵素処理した断片は pQE1*IhOMT1* を作製するため、pQE30 発現ベクター (QIAGEN K.K.) の *SphI*-*PstI* サイトへライゲーションした。*IhOMT2* cDNA の ORF は2つの制限酵素サイト(*KpnI* および *HindIII*) を開始コドンおよび終止コドンの直後に導入するため、2種類のプライマー、forward primer [5'-AAA GGT ACC ATG CCA GGA CTG AAT GCT GCA G-3' (: *SphI* 部位、 : 開始メチオニン)]、および reverse primer [3'-TAT AAG CTT CTA AGG AAA GAG CTC AAT GAG GCT-3' (: *HindIII* 部位、 : 終止

コドン)] を用いて PCR 増幅を行った。増幅した断片は pCR[®]-Blunt II-TOPO[®] vector (Invitrogen Japan K.K.) へサブクローニングし、*KpnI* および *HindIII* で切断した。次いで、制限酵素処理した断片は pQE1hOMT2 を作製するため、pQE30 発現ベクター (Qiagen K.K.) の *KpnI*-*HindIII* サイトへライゲーションした。

N 末端に 6 × His-tag をもつ組換えタンパク質を産生するため、pQE1hOMT1 および pQE1hOMT2 プラスミドは大腸菌 M15 菌株へ導入した。タンパク質の誘導および粗酵素抽出物の調整は、本章・第 1 節で述べた方法により行った。6 × His-tag 融合タンパク質の精製は、His Microspin Purification Module (GE Healthcare UK Ltd.) を使用した。Ni-NTA に結合させた His-tag タンパク質は 0.4 M イミダゾールで溶出後、イミダゾールは Microcon YM-30 (Nihon Millipore K.K.) を通すことにより除去した。精製したタンパク質は、その濃度を Bradford 法 (Bradford 1976) によって測定し、さらなる解析に用いた。

5) SDS-PAGE および Western blot 分析

10 %のポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE および Western blot 分析は、本章・第 1 節で述べた方法により行った。

6) IhOMT1 および IhOMT2 の活性測定

OMT 酵素反応は、500 μM の各基質、1 mM SAM、1 mM DTT、100 mM KPi (pH 7.0) を含む反応溶液に、精製した 1 μg の IhOMT1 あるいは 20 μg の IhOMT2 を添加することで反応を開始させた。35 °C、40 分間インキュベーションした後、本章・第 1 節と同様の方法で反応を停止させ、フィルター濾過した。反応産物は、前章・第 2 節で述べた島津 HPLC 分析システムにより分析した。フラボノイド、カフェ酸、フェルラ酸および *p*-クマル酸の溶出は前章・第 2 節と同様のシステムで分離した。検出波長は、アントシアニンが 540 nm、フラボノイド、カフェ酸、フェルラ酸および *p*-クマル酸 が 320 nm、orcinol などのフェ

ニルプロパノイドが 254 nm にそれぞれ設定し、フォトダイオードアレイ紫外可視検出器により計測した。各成分の保持時間および面積の算出は LC ワークステーション CLASS-VP Ver.6.1 によった。

さらに IhOMT1 については、メチル基受容体としてカフェ酸、メチル基供与体として SAM を使用し、pH および温度が酵素活性に及ぼす影響を調査した。反応溶液の pH は、4.0 から 6.0 を 100 mM クエン酸-クエン酸緩衝溶液、pH 6.0 から 8.0 を 100 mM KPi、および pH 8.0 から 9.5 を 100 mM Tris-HCl で調製した。各 pH での IhOMT1 活性は 35 °C で測定した。また、IhOMT1 の各温度における活性は 100 mM KPi (pH 7.0) の反応溶液中で、20 °C から 55 °C まで測定した。

3. 結果および考察

ダッチアイリス花蕾 cDNA ライブラリーのランダムシーケンスにより、2 種の OMT をコードする完全長 cDNA が得られた。IhOMT1 (Genbank accession number. AB183825) の塩基配列は全長 1,303 bp であり、推定分子質量 40,193 Da、pI 5.54 を示す 365 のアミノ酸をコードする ORF を含んでいた。IhOMT1 と既知の SAM 依存性 OMT 間でアミノ酸配列の比較を行った結果、他種植物のカフェ酸 OMT (COMT) と 64 - 67% の高い同一性を示した。IhOMT1 と 31.5 % の同一性を示す、もう一方のクローンである IhOMT2 (Genbank accession number. AB258439) は全長 1,441 bp であり、40,385 Da および 5.50 の pI を示す 369 のアミノ酸をコードしていた。IhOMT2 と他の OMT 間でアミノ酸配列を比較した結果、*Rosa hybrida* 由来の orcinol OMT (OoMT) (Lavid *et al.*, 2002) と 43 - 45% の最も高い同一性を示した。BLAST 検索の結果では、その他にアルカロイド OMT、フラボノイド OMT、イソフラボノイド OMT、フェニルプロパノイド OMT と 38 - 43% の同一性が示されたが、COMT とは 29 - 31% の低い同一性しか示さなかった。

IhOMT1、IhOMT2、および基質特異性が明らかになっている SAM 依存性 OMT ファミリーのマルチプルアライメントを Fig.3-8 に示した。この図から、IhOMT1 および IhOMT2

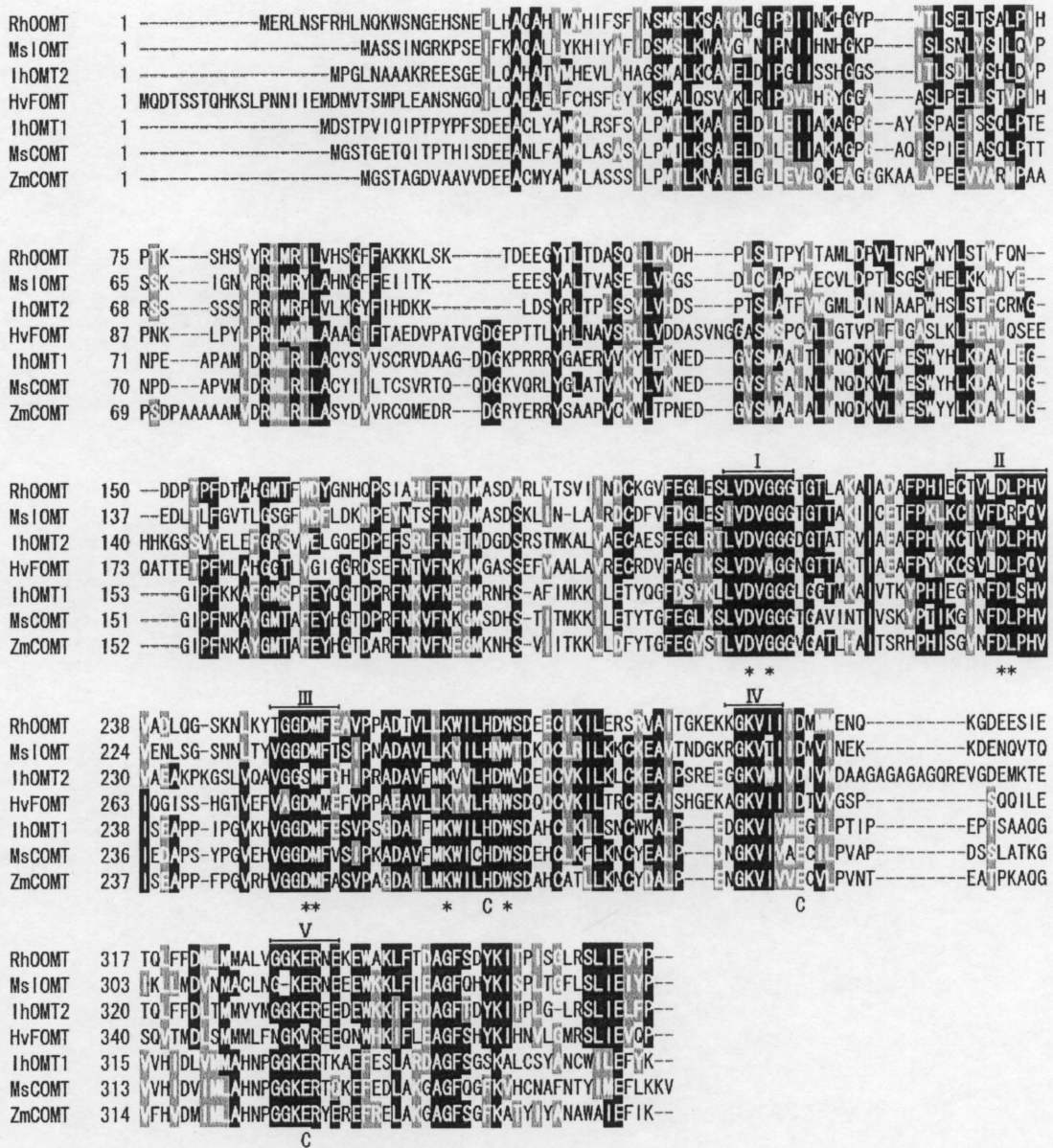


Fig. 3-8. Multiple alignment of deduced amino acid sequences of IhOMT1, IhOMT2 and other SAM-dependent-OMT family members. Black and gray shaded boxes show identical and similar amino acids, respectively. Region 1 through region 5 motifs are conserved among plant SAM-dependent OMTs. *, SAM binding; C, catalytic residue. Genbank accession numbers are as follows: RhOOMB (*Rosa hybrida*, AAM23004), MsIOMB (*Medicago sativa*, AAC49927), HvFOMB (*Hordeum vulgare*, CAA54616), MsCOMT (*M. sativa*, AAB46623), ZmCOMT (*Zea mays*, AAB03364).

は植物 OMT に特徴的なモチーフであると提唱されている、共通配列 (領域 I-V) を含んでいることが明らかになった。このアライメントにおいて、N 末端領域は変化に富んでいるものの、これらの領域は高度に保存されていた。これまでに、領域 I および IV は SAM および金属イオン結合サイトであると見なされている (Ibrahim *et al.* 1998)。また、アルファアルファにおいて ChOMT および IhOMT の構造特性が示され、3 つの触媒残基と SAM 結合残基が示されている (Zubieta *et al.* 2001)。このような触媒残基は IhOMT1 (His-271、Glu-299、Glu-331) および IhOMT2 (His-264、Glu-295、Glu-336) の C 末端においても見出された。

分子系統樹解析は、IhOMT1 がトウモロコシの COMT (Collazo *et al.* 1992) およびサトウキビ (*Saccharum officinarum*) の COMT (Selman-Housen *et al.* 1999) のような単子葉植物のクラスターと密接に関連していることを示した (Fig. 3-9)。一方、IhOMT2 はアルカロイド、フラボノイド、イソフラボノイド、フェニルプロパノイドおよびオルシノール OMT からなるヘテロログスなクラスターに位置し、ブートストラップ確率は低いものの、そのグループの中でもオオムギの F7OMT (Christensen *et al.* 1998) と最も近接していた (Fig. 3-9)。加えて、*IhOMT1* 転写産物は葉、花蕾、完全に開いた花において発現していたが、*IhOMT2* 転写産物の発現は葉では確認されなかった (Fig. 3-10)。このことから、IhOMT1 は葉および花器官で、IhOMT2 は花器官で特異的に発現し、機能するタンパク質であることが推測された。

次いで、pQEIhOMT1 および pQEIhOMT2 を持つ大腸菌からの粗抽出物として調製した可溶性画分を SDS-PAGE によって分離し (Fig. 3-11A)、Western blot により検出したところ、IhOMT1 および IhOMT2 組換えタンパク質はおよそ 40 kDa と推定された (Fig. 3-11B)。これらの値は、先に述べた IhOMT1 (40,193 Da) および IhOMT2 (40,385 Da) の推定分子質量と一致していた。

IhOMT1 の機能解析として、まず、IhOMT1 を発現した大腸菌抽出物の可溶性画分、カフェ酸、および SAM を用いた SAM 依存性 OMT アッセイを行った。その結果、Fig.3-12

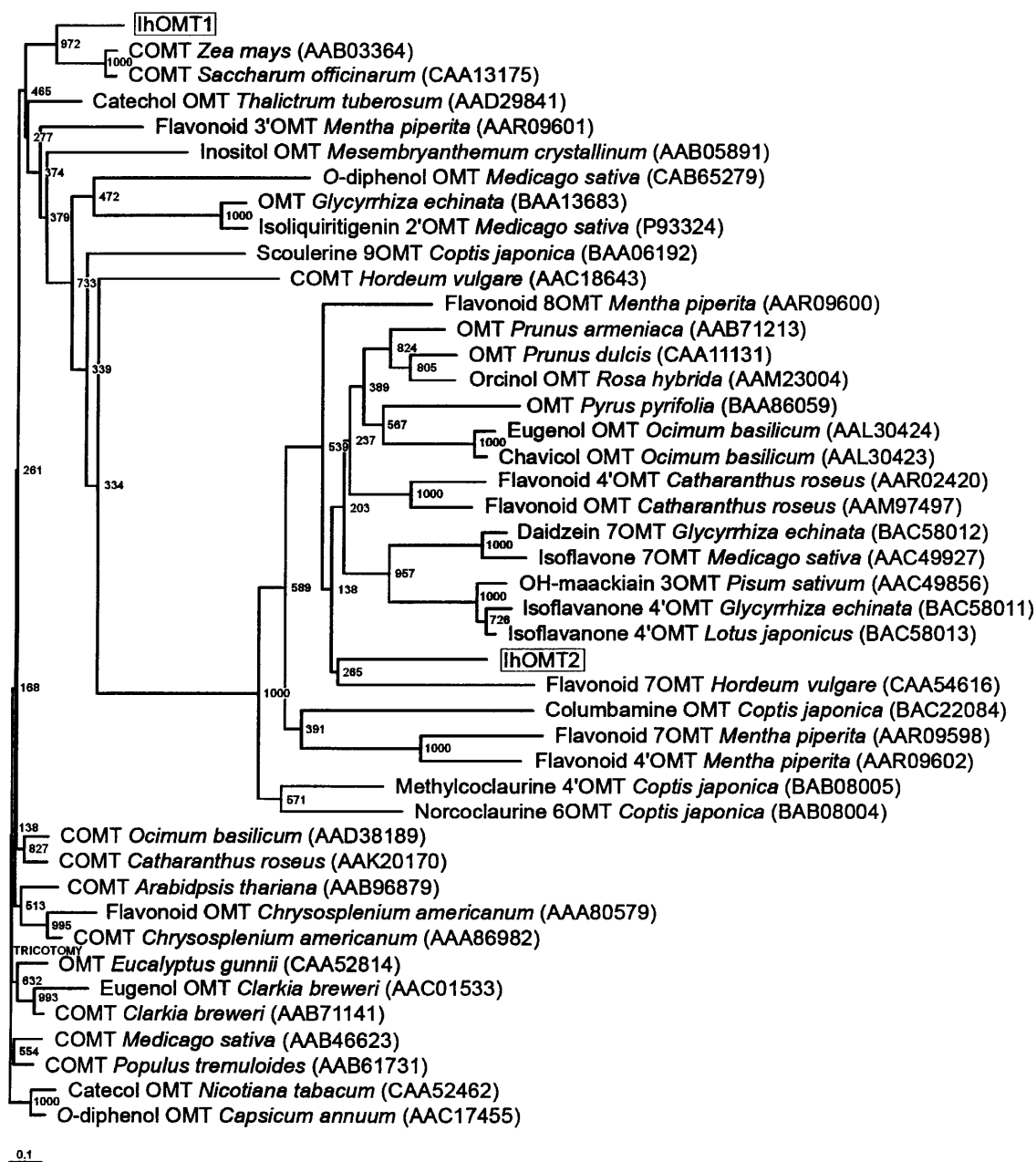


Fig. 3-9. A molecular phylogenetic tree of the deduced amino sequences of IhOMT1, IhOMT2 and other SAM-dependent-OMT family members. The tree was constructed by the neighbor-joining method. The numbers at the branches are the bootstrap values that indicate confidence level each branch based on 1000 repetitions of the analysis.

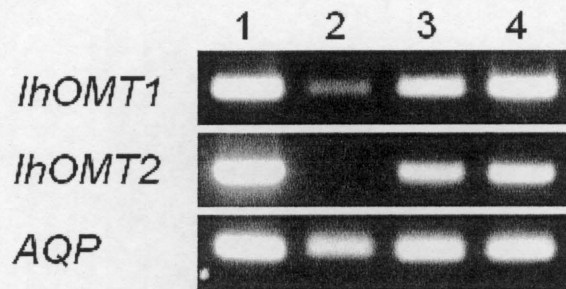


Fig. 3-10. Analysis of RT-PCR for *IhOMT1* and *IhOMT2* transcripts of *Iris hollandica*. PCR amplification was carried out with *IhOMT1*, *IhOMT2* and *AQP*-specific primers using one of the following templates: lane 1, the plasmids of *IhOMT1*, *IhOMT2* and *AQP* used as positive controls; lanes 2-4, total RNA extracted from leaves (lane 2), flower buds (lane 3) and fully opened flowers (lane 4) of *I. hollandica*.

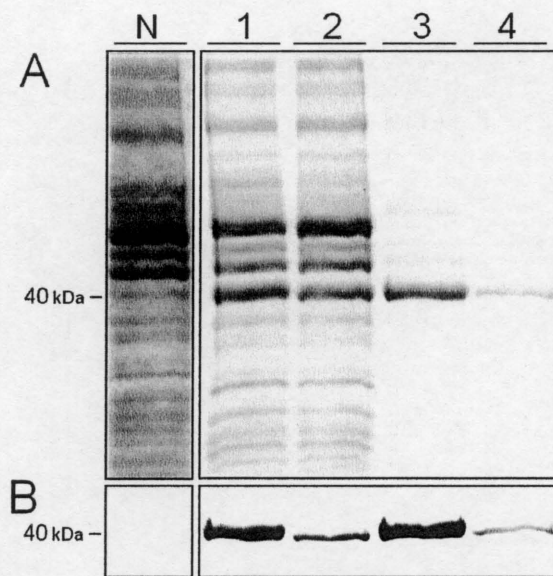


Fig. 3-11. Analyses of SDS-PAGE (A) and gel blot (B) of recombinant IhOMT1 and IhOMT2 proteins expressed in *Escherichia coli*. Twenty μg of soluble fraction of *E. coli* lysates (lanes N, 1 and 2) and 5 μg of purified His-tagged protein (lanes 3 and 4) were loaded. Lane N, pQE30 (empty vector) as a negative control; lane 1, crude IhOMT1; Lane 2, crude IhOMT2; lane 3, purified IhOMT1; lane 4, purified IhOMT2.

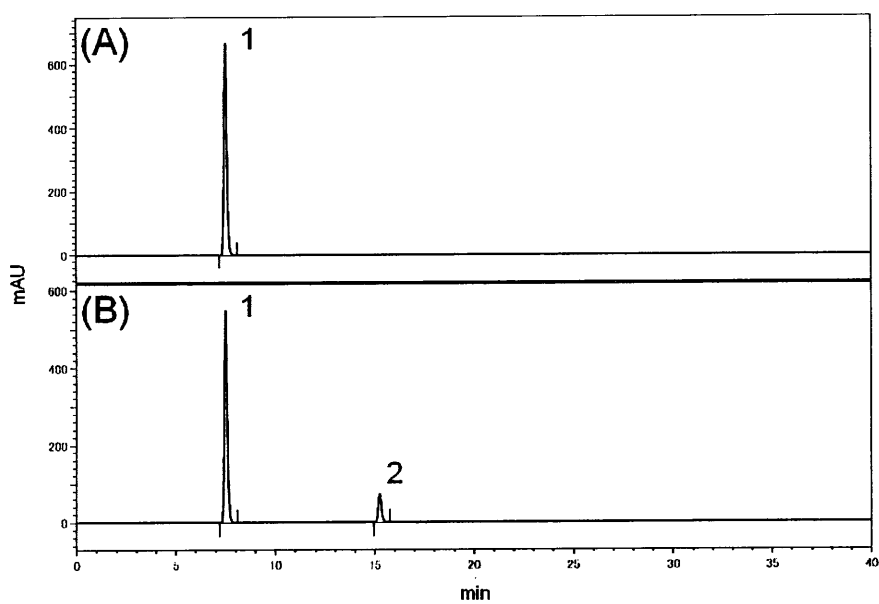


Fig. 3-12. High-performance liquid chromatographic analysis of reaction products catalyzed by purified recombinant lhOMT1. (A) A control (SAM was omitted from the reaction mixture); (B) The reaction product of lhOMT1 (SAM was added to the reaction mixture). Peak numbers 1 (HPLC retention time (R_t), 7.51 min) and 2 (R_t , 15.25 min) are caffeic acid and ferulic acid, respectively.

に示したように、SAM を反応溶液に加えた場合にのみ、反応産物としてフェルラ酸が検出された。一方、IhOMT1 の基質として種々のフラボノイドおよびフェニルプロパノイドを使用した場合には活性が検出されず、IhOMT1 はこれらの物質をメチル基受容体として認識しないことが示された。この結果は、IhOMT1 が SAM からカフェ酸へのメチル基の転移を触媒し、フェルラ酸をもたらす、SAM 依存性 COMT をコードしていることを示している。

フェルラ酸はリグニンやリグナンの生合成に関与するモノリグノールの前駆体の一つとして、重要な物質である (Lewis and Davin 1999, Anterola and Lewis 2002)。しかしながら、IhOMT1 cDNA はダッチアイリスの花蕾から構築された cDNA ライブラリーより単離されており、このことは、IhOMT1 によって形成されたフェルラ酸はリグニン生合成には直接関与していないことを指摘している。そのため、花蕾および花のカフェ酸、あるいはフェルラ酸は、抗菌性防御化合物 (Siqueira *et al.* 1991) およびリグナンの前駆体として、あるいはそのいずれかとして働いているものと考えられる。

さらに、カフェ酸と SAM を用いて、IhOMT1 活性に及ぼす pH および温度の影響について調査した。まず、pH についてみると、pH 7.5 の 100 mM KPi および pH 8.0 の 100 mM Tris-HCl 緩衝溶液において、IhOMT1 の最大活性 (4.035×10^{-3} から 4.615×10^{-3} pkat/ μ g) が認められた (Fig. 3-13A)。この pH 値は、他種植物の COMT 活性についての至適 pH (pH 6.0 から 8.0 の範囲) の報告と一致していた (Poullton and Butt 1975, Poulton *et al.* 1976, Fric and Kutchan 1999, Gang *et al.* 2002)。次に、温度については、35 °C [100 mM KPi (pH 7.0)] で IhOMT1 の最大活性 (2.654×10^{-3} pkat/ μ g) が確認された (Fig. 3-13B)。この値は、*Thalictrum tuberosum* の OMTII:1-1 がカフェ酸に対して最大活性を示す至適温度と一致していた (Frick and Kutchan 1999)。本研究は、アヤメ科植物のフェニルプロパノイド生合成に関与する COMT cDNA クロンの単離とその特性解明に関する最初の報告である。

一方、IhOMT2 の SAM 依存性 OMT アッセイにおいて、IhOMT1 とは対照的に、カフ

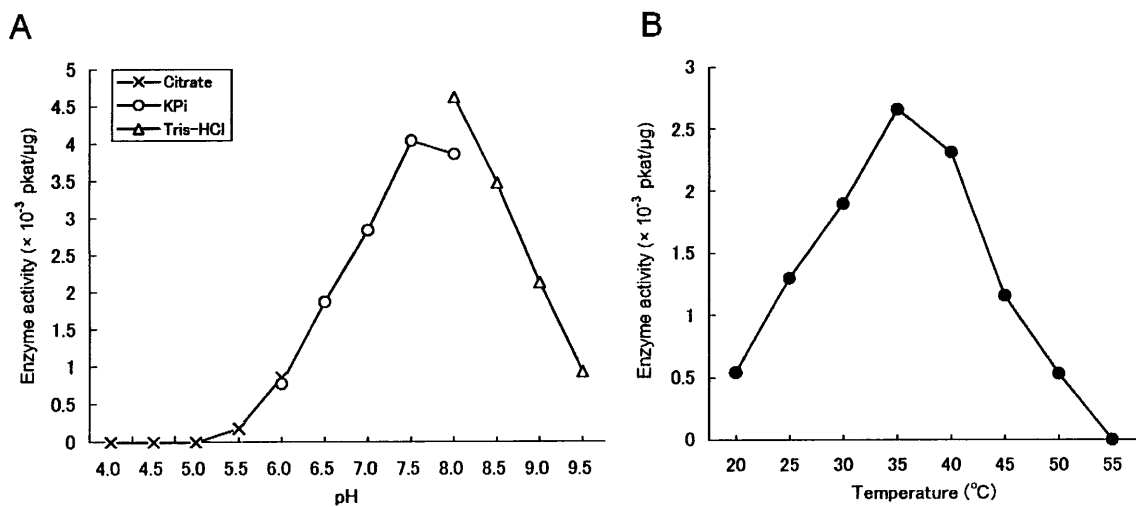


Fig.3-13. Effects of pH (A) and temperature (B) on recombinant IhOMT1 activity. The pH value of the reaction mixture was adjusted from 4.0 to 6.0 in 100mM citrate buffer, 6.0 to 8.0 in 100 mM KPi and 8.0 to 9.5 in 100 mM Tris-HCl, and IhOMT1 activity was measured at 35 °C. The activity for temperature was assayed in reaction mixtures containing 100 mM KPi (pH 7.0) at temperatures of 20 to 55 °C. Data are mean values of duplicate incubations.

ェ酸、あるいは先に述べた種々のフラボノイドやフェニルプロパノイド種のいずれに対しても、IhOMT2 活性は検出されなかった。

酵素機能と酵素遺伝子の部位特異的発現の関係について、IhOMT1 や IhOMT2 と他種植物の OMT と比較してみる。コウシンバラ (*Rosa chinensis*) においてカフェ酸に対して高い活性を示し、COMT と同一性の高い RcOMT2 は、花器官および葉で発現しているが、オイゲノール (oigenol) やイソオイゲノール (isooigenol) を効率的にメチル化する RcOMT1 は花器官において高度に発現している (Wu *et al.* 2003)。また、IhOMT2 と 44.2%の同一性を示すバラの OOMT も、葉ではなく、花器官で発現している (Lavid *et al.* 2002)。ダッチアイリスにおいても、カフェ酸に対して高い活性を示し、なおかつ他種植物の COMT と同一性が高い IhOMT1 は花器官および葉で、一方、他種植物のフラボノイドや OOMT と同一性が高い IhOMT2 は花器官で発現していた (Fig. 3-10)。加えて、swertidin および swertiajaponin のようなメチル化フラボン、ダッチアイリスにおいて花のコピグメントとして報告されている (Asen *et al.* 1970)。これらのことから、IhOMT2 の基質としてフラボノイド、もしくは oigenol や isooigenol のような香気性フェニルプロパノイドであると推測される。しかしながら、本実験のフラボン (apigenin、isovitexin、luteolin) や香気性フェニルプロパノイド (catechol、eugenol、orcinol) では IhOMT2 の基質活性が認められなかったため、更なる物質の基質検定が必要である。

4. 摘要

植物の *O*-メチルトランスフェラーゼ (OMT) は、フラボノイドやフェニルプロパノイドなどの二次代謝産物のメチル化に重要な役割を担っている。本節では、ダッチアイリス花蕾の cDNA ライブラリーより、*IhOMT1* および *IhOMT2* の 2 つの cDNA のクローンの単離に成功した。*IhOMT1* cDNA は推定分子質量 40,193 Da、pI 5.54 を示す 365 のアミノ酸残基からなるタンパク質をコードする ORF を有していた。一方、*IhOMT2* cDNA は推定分子質量 40,385 Da、pI 5.50 を示す 369 のアミノ酸残基からなるタンパク質をコードす

る ORF を有していた。また、IhOMT1 と IhOMT2 との同一性は、31.5 %であった。組換え IhOMT1 および IhOMT2 の Western blot 分析によって、両者とも約 40 kDa の分子質量であり、前述の推定分子質量と一致することが示された。組換え IhOMT1 を用いた酵素機能の解析により、*IhOMT1* cDNA が、SAM からカフェ酸 3 位へのメチル基の転移を触媒し、フェルラ酸をもたらす、SAM 依存性 COMT をコードすることが示された。さらに、その至適 pH は 7.5~8.0、至適温度は 35 °C であった。これに対して、IhOMT2 はカフェ酸を含む種々のフェニルプロパノイドへの SAM 依存性 OMT アッセイにおいて、その活性が認められなかった。