

第4章 ダッチアイリスにおけるアントシアニン配糖化およびアシル化遺伝子の単離と解析

近年、多くの植物種において遺伝子組み換えによる花色の改変が試みられている (Tanaka and Brugliera 2006)。各種のアントシアニン生合成遺伝子はそれ自体が遺伝子組換えにおける分子ツールとして必須なばかりでなく、塩基配列と酵素の特性との関連性を解明することにより花色を自由に操作することができる可能性を秘めている。このため、第1章で述べたようにアントシアニンの種類に多様性を与える 5GT や 3AT などの修飾酵素は特性調査ばかりでなく、酵素をコードする遺伝子の単離およびその特性解明も精力的に行われている。

第3章においてハナショウブの 5GT および 3AT の特性を明らかにし、本種にアントシアニンの多様性をもたらしている生合成経路の末端部を提案した。しかしながら、ハナショウブを始めとする *Iris* 属植物において、これまでのところアントシアニン配糖化およびアシル化酵素をコードする遺伝子の単離に関する報告はない。

ダッチアイリスは球根アイリスのグループに属し、切り花や庭植えとして広く用いられている *Iris* 属植物の代表的な園芸種である。本種はハナショウブと同様に、青色花卉における主要アントシアニンとして、delphinidin 3pCRG5G を含むことが報告されている (Asen *et al.* 1970)。このアントシアニンを生成するためには、5GT、3AT およびこれらをコードする遺伝子が不可欠であるが、これまでのところダッチアイリスではこれらの研究は全く着手されてこなかった。

そこで、本章ではダッチアイリスにおける 5GT および 3AT に関する分子生物学的、生化学的知見を得るため、その cDNA ライブラリーから両遺伝子の単離・解析を行った。

第1節 アントシアニン 5-グルコシルトランスフェラーゼ遺伝子の単離と解析

1. 緒言

アントシアニンおよびアントシアニジンの配糖化酵素はアミノ酸配列に基づいて各グループに分類され、それぞれのグループが基質特異性を反映していることが報告されている(Fukuchi-Mizutani *et al.* 2003)。また、配糖化酵素をコードする cDNA はこれまでに多くの植物種から単離されており(第 1 章)、5GT cDNA クローンもシソ(Yamazaki *et al.* 1999)、バーベナ(*Verbena hybrida*) (Yamazaki *et al.* 1999) 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、これまでにクローニングされている 5GT cDNA は全て双子葉植物に由来するものであり、未だ単子葉植物からは単離されていない。

そこで、本節ではダッチアイリスの花蕾から構築した cDNA ライブラリーから 5GT cDNA をクローニングし、その機能解析を試みた。

2. 材料および方法

1) 植物材料

ダッチアイリスの品種「ブルーダイヤモンド」(Fig. 4-1)の市販されている切り花を購入し、その花蕾を採取し-80°Cで保存した。なお、この品種は青紫色花卉に主要アントシアニンとして delphinidin 3pCRG5G を有していた(Imayama *et al.* 2004)。

2) cDNA ライブラリーの構築

Tanaka *et al.* (1995)の方法に従ってダッチアイリスの花蕾から抽出した Total RNAs から、Oligotex-dT30 Super Kit (Roche Diagnostics) を用いて

poly(A)⁺RNAを精製した。本種のcDNAライブラリーは、ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene)を用いて、その使用説明書に従って操作し構築した。

3) 5GT cDNA のスクリーニングおよび塩基配列の決定

ダッチアイリス cDNA ライブラリーからの 5GT cDNA のスクリーニングは、プラークハイブリダイゼーション法によった。cDNA ライブラリーは NZY プレート(7.5×12cm 角型シャーレ、NZY 寒天培地:1% NZ Amine, Type A、0.5% Yeast Extract、0.5% NaCl、1.5% Agar) 1枚当たり約 2,500 pfu (plaque forming unit) のプラークを形成させ、これを Hybond-N+メンブレン (GE Healthcare Bio-Sciences) へブロットした。その後、メンブレンを 0.4M NaOH に 20 分間浸すことでファージ DNA をメンブレンに固定し、そのメンブレンを 30%ホルムアミドハイブリダイゼーションバッファー (5×SSC、2 % Blocking reagent (w/v)、0.1 % N-lauroylsarcosine、0.02 % SDS、30% Formamide) 中で 42 °C、1 時間プレハイブリダイゼーションを行った。次に、キングソウ 3GT cDNA をプローブとして添加したハイブリダイゼーションバッファー中で、42 °C、6 時間以上ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション終了後、メンブレンの洗浄は 1 次洗浄液 (2×SSC、0.01 % SDS) 中で 55 °C、20 分間 (10 分×2 回)、さらに 2 次洗浄液 (0.1×SSC、0.01 % SDS) 中で 55 °C、30 分間 (15 分×2 回) 行った。なお、プローブ DNA は DIG DNA labeling and detection kit (Roche Diagnostics) を用いて、ジゴキシゲニン-dUDP によるランダムプライムドラベリングシステムによる標識後、NBT/BCIP により発色し検出した。

スクリーニングで得られたポジティブクローンは λ ファージベクターから Rapid Excision Kit (Stratagene) を用いて、5GT ホモログインサートを含む pBluescript (pIh5GT) を切り出した。切り出しによって得られたコロニーを 50 µg/ml のアンピシリ



Fig. 4-1. Flowers of *I. hollandica* cv. Blue Diamond.

ンを含む LB 培地 (1% Bacto-Tryptone、0.5 % Yeast Extract、1% NaCl; pH7.0) 中に 37°C で一晩振盪培養し、FlexiPrep Kit (GE Healthcare Bio-Sciences) を用いてプラスミド DNA を抽出・精製した。得られたプラスミド DNA は M13 Primer (タカラバイオ株式会社) を用いて BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) によりサイクルシーケンシング反応を行い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で塩基配列を決定した。

4) アミノ酸配列の解析

決定された塩基配列を基に NCBI の BLAST でデータベースとの相同性を検索し、推定アミノ酸配列の相同性および分子質量の算出、マルチプルアライメントの作製は GENETYX-WIN で行った。また、Clustal W (Thompson *et al.* 1994) による分子系統樹解析は近隣接合法 (Saitou and Nei 1987) によった。

5) 大腸菌における異種発現

pIh5GT を鋳型とし、クローニング用プライマーセット (5'-AAAGGATCCATGGC-GAAGCAGCACTTCC-3' および 5'-TATGGTACCCTAGTTCCTCCGACG-ACG-3') を用いて、Ih5GT の ORF の 5' および 3' 末端にそれぞれ *Bam*H I および *Kpn* I サイトを構築した。この PCR 産物を pQE30 (QIAGEN) の *Bam*H I-*Kpn* I に組み込み、pQE30Ih5GT とした。pQE30Ih5GT および pREP4 を導入した大腸菌 (菌株 M15) を、25 µg/ml カナマイシンおよび 100 µg/ml アンピシリンを含む LB 培地中で 37°C、一晩前培養した。5ml の終夜培養物を 100 ml の LB 培地 (25 µg/ml カナマイシンおよび 100 µg/ml アンピシリンを含む) に接種し、37°C で 2 時間培養した後、IPTG (Isopropyl thio-β-D-galactoside) を終濃度 1 mM になるように加えて、

25℃で 48 時間培養した。遠心分離によって菌体を回収し、1 mM ジチオスレイトール(DTT)を含む 0.1 M KPi バッファー(pH 7.0) 2 ml に懸濁した。懸濁液は TA-4201 型超音波破壊装置(株式会社カイジョー)を用いて氷上で 20 秒間超音波処理し、破碎液を 5℃、14,000 rpm で 10 分間遠心分離して一次上清を回収した。一次上清を再度 5℃、14,000 rpm で 10 分間遠心分離して回収した二次上清を粗酵素液として以後の試験に用いた。また、インサートを含まない、空の pQE30 で形質転換した大腸菌から調製した抽出液をコントロールとして使用した。

6) SDS-PAGE およびウェスタンブロットティング

SDS-PAGE は Mini Protian III electrophoresis unit (Bio-Rad) を用い、取扱説明書に従って行った。サンプルの電気泳動には 10 %ポリアクリルアミドゲルを使用し、Coomassie Brilliant blue R-250 で染色を行った。ウェスタンブロットティングには Mini Trans-blot apparatus (Bio-Rad) を用い、SDS-PAGE ゲル中のタンパク質を Hybond-ECL ニトロセルロースメンブレン (GE Healthcare Bio-Sciences) へ移した。メンブレンは 10%スキムミルクを含む PBS (80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl; pH7.5) 中で 1 時間、室温で振盪してブロッキングを施した。10%スキムミルクを含む PBS で 3,000 倍に希釈した一次抗体溶液 (Anti-His Antibody: GE Healthcare Bio-Sciences) 中にメンブレンを 1 時間浸漬し、0.05 %Tween-20 を含む PBS で 3 度洗浄を行った。続いて、7,500 倍に希釈した二次抗体溶液 (Goat Anti-Mouse IgG (H+L), AP Conjugate: Promega) に 1 時間メンブレンを浸漬して、0.05 %Tween-20 を含む PBS で 3 度洗浄し、NBT/BCIP による発色反応でシグナルを検出した。

7) 組換え酵素の *in vitro* アッセイ

5GT の酵素アッセイに用いた標準反応液の組成は 100 μ l 当たり 10 μ l 粗酵素液、500 μ M cyanidin 3RG、1,200 μ M UDP-グルコースおよび 0.1 M KPi バッファー (1 mM DTTを含む、pH6.5)であった。酵素反応を 30 °Cで 10 分間行った後、Folch *et al.* (1957)の方法によりその反応を停止させた。アッセイにより得られた最終産物のアントシアニンは、HPLCで cyanidin 3RG5G 標品とのコクロマトグラフィーにより確認した。HPLC の分析条件は第 2 章に示したとおりである。

3. 結果および考察

ダッチアイリスの 5GT cDNA をクローニングするため、花蕾から構築した cDNA ライブラリーをキンギョソウの 3GT cDNA をプローブとしてスクリーニングした。得られた 38 個のポジティブクローンについて塩基配列を決定し、NCBI の BLAST を用いてデータベースを検索したところ、18 クローンが既知の 5GT と高い相同性を示した。これらのうち、N 末端の開始メチオニンをコードしていると推定されるクローンをダッチアイリスの 5GT cDNA (以下 *Ih5GT*、GenBank accession no. AB113664)として以降の実験に用いた。

Ih5GT cDNA は 1,568bp の塩基からなり、その ORF は 463 のアミノ酸をコードしていた。*Ih5GT* の推定アミノ酸配列はシソ (AB013596、Yamazaki *et al.* 1999)、バーベナ (AB013598、Yamazaki *et al.* 1999)、ペチュニア (AB027455、Yamazaki *et al.* 2002) およびトレンニア (*Torenia hybrid cultivar*) (AB076698) の 5GT とそれぞれ 38.8、38.2、37.8 および 35.1% の相同性を示した (Fig. 4-2)。また、推定アミノ酸配列から算出した *Ih5GT* タンパク質の分子質量は 50,128Da であり、ウェスタンブロット分析においても大腸菌の菌体内で異種発現した組換え *Ih5GT* の分子質量が約

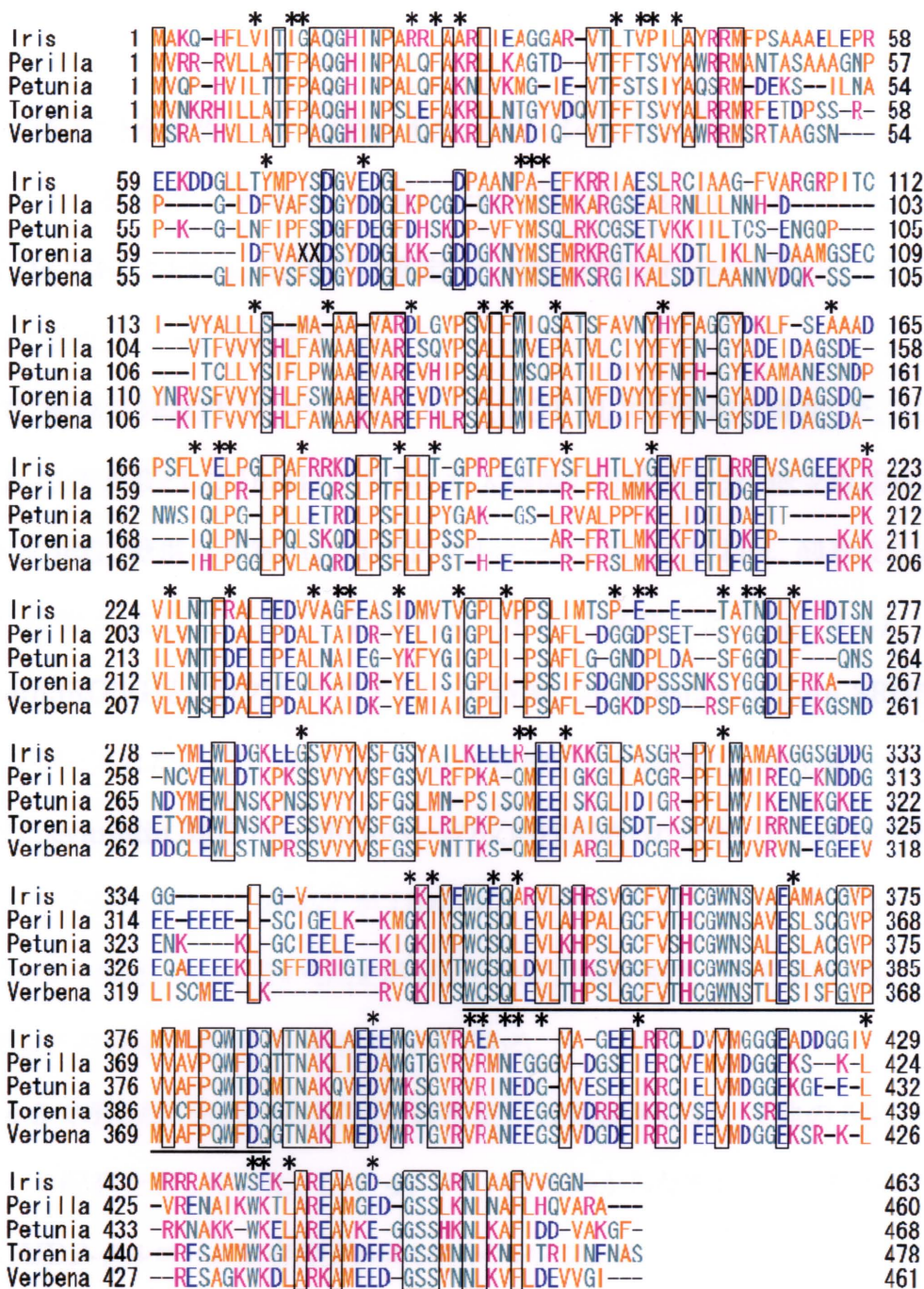


Fig. 4-2. Multiple alignment of deduced amino acid sequences of Ih5GTs. Framed letters indicate identical amino acids. Identical amino acid residues (*) in all dicot species except *Iris* are marked. The letters indicated as same colours mean similar amino acid residues, respectively. The underline shows the common motif found in glucosyltransferases. GenBank accession numbers of the 5GTs: *Iris* (AB113664); *Perilla* (AB013596); *Petunia* (AB027455); *Torenia* (AB076698); *Verbena* (AB013598).

50kDaであることを確認している(Fig. 4-3)。同じくシソ、バーベナ、ペチュニアおよびトレニアにおける 5GT の推定分子質量はそれぞれ 50,973、51,347、52,163 および 54,257 Da であることから、Ih5GT は推定アミノ酸配列および分子質量ともこれまでの報告とよく合致していることが示された。

そこで、組換え Ih5GT タンパク質について、5GT としての機能を調査した。5GT アッセイは、粗酵素液として Ih5GT を発現した大腸菌の可溶性画分、糖受容基質として cyanidin 3RG、糖供与基質として UDP-グルコースを用いて行われ、酵素反応により新規化合物が生じていることを HPLC 分析で確認した(Fig. 4-4)。標品(cyanidin3RG5G)とのコクロマトグラフィーの結果、この産物は cyanidin 3RG5G であることが同定された。一方、空の pQE30 を保持する大腸菌の可溶性画分を用いた試験では、cyanidin 3RG から 3RG5G への反応は認められなかった。以上の結果から、ダッチアイリスにおいて *Ih5GT* が UDP-グルコース:アントシアニン 5-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確認された。本研究は、単子葉植物において 5GT 遺伝子の単離に成功した最初の報告である。

Fig. 4-2 で示したように、Ih5GT はその推定アミノ酸配列において他の 5GT と共通のモチーフ配列を有していた。この 44 アミノ酸残基からなるモチーフ配列(PSPG box)は UDP-グルコース依存型グルコシルトランスフェラーゼファミリーにおいて高度に保存されており、UDP-グルコースの結合サイトとして働くと考えられている(Yamazaki *et al.* 1999, 2002)。このモチーフの他にも複数のアミノ酸残基が 5GT 間で保存されており、また他のいくつかは Ih5GT 以外の双子葉植物の 5GT でのみ保存されていた。

様々な植物のグリコシルトランスフェラーゼのアミノ酸配列に基づく分子系統樹においても、Ih5GT は双子葉植物のサブグループとは隔たりがあるものの、5GT のグルー

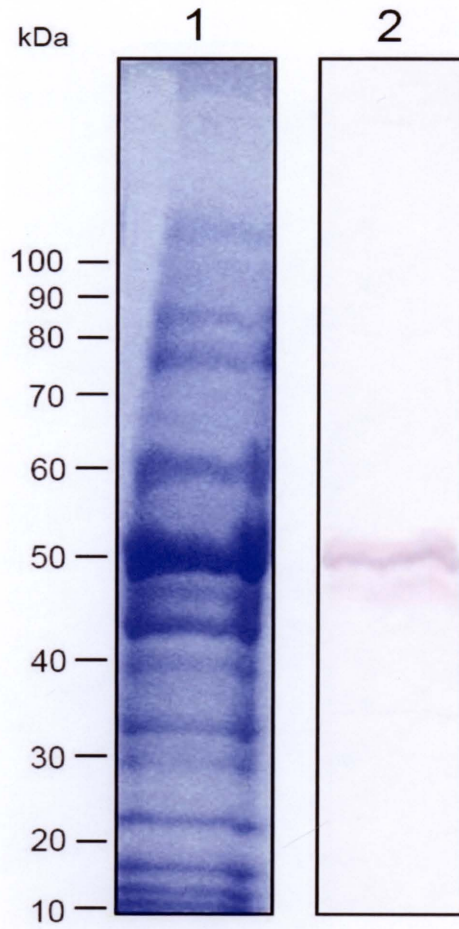


Fig. 4-3. Analysis of SDS-PAGE (1) and Western blotting (2) of recombinant Ih5GT protein expressed in *Escherichia coli*.

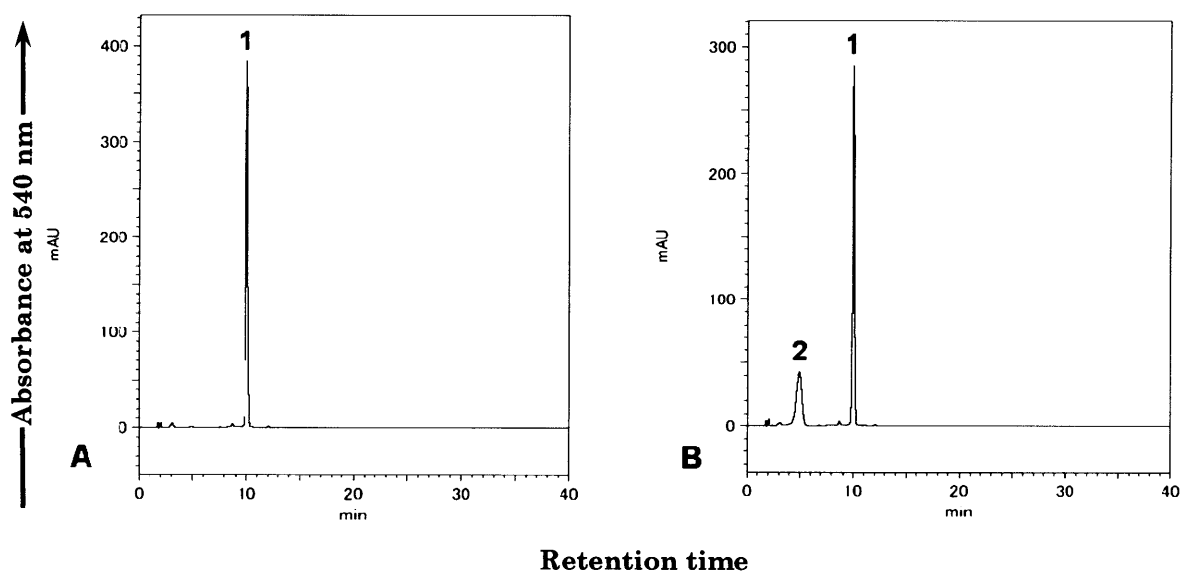


Fig. 4-4. High-performance liquid chromatographic analysis of reaction products catalyzed by Ih5GT. A: The control (UDP-glucose was omitted from the reaction mixture). B: The reaction product of Ih5GT (UDP-glucose was added in the reaction mixture). Peak numbers 1 and 2 show cyanidin 3RG and cyanidin 3RG5G, respectively.

プに属していることが示された (Fig. 4-5)。lh5GT と双子葉植物の 5GT との間の進化距離は単子葉植物の 3GT と双子葉植物の 3GT との間の進化距離と同等のものであった。以上の結果から、これらの GT は単子葉植物と双子葉植物とが種分化する以前に分化していたことが示唆された。

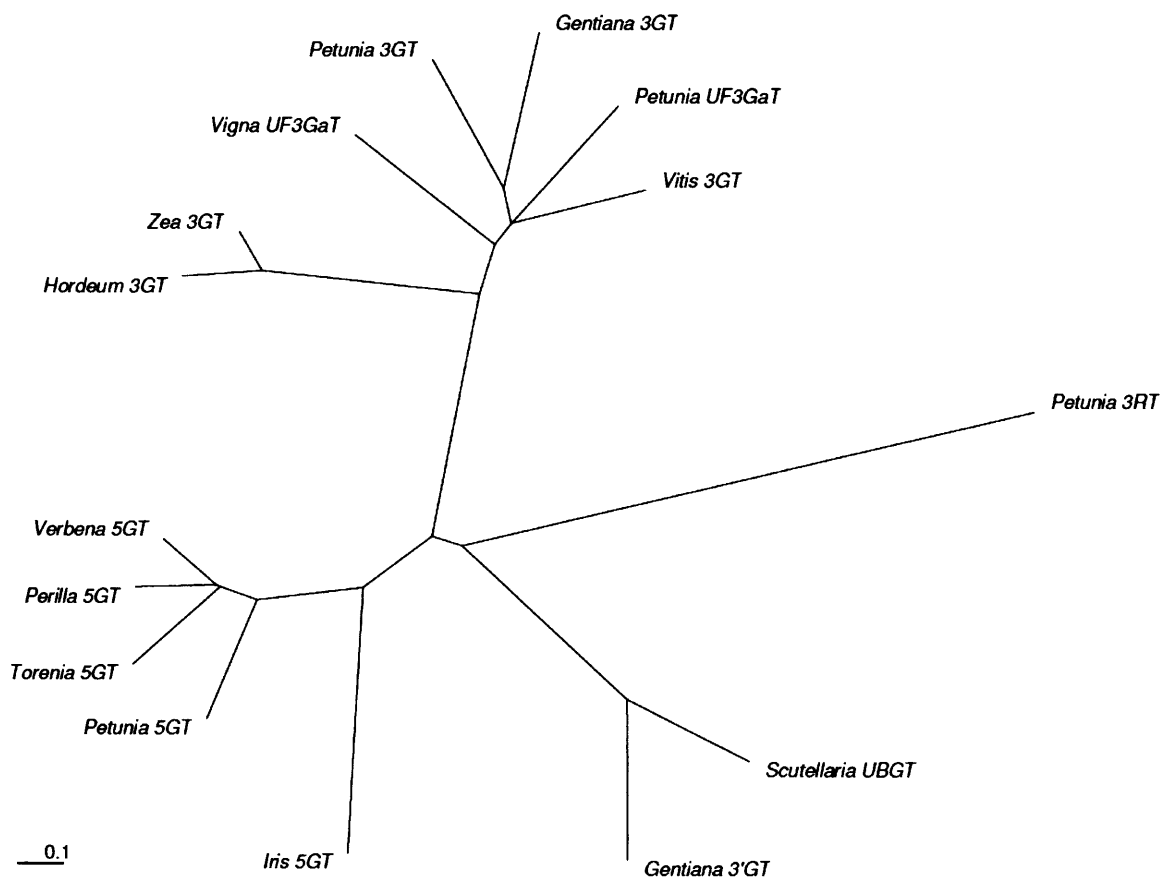


Fig. 4-5. A molecular phylogenetic tree of the deduced amino acid sequences of 5GTs, 3GTs and related glycosyltransferases. The tree was constructed by the neighbor-joining method. The lengths of the lines indicate the relative distances between nodes. Enzymes used for the alignment were as follows: *Perilla* 5GT (AB013596); *Petunia* 5GT (AB027455); *Torenia* 5GT (AB076698); *Verbena* 5GT (AB013598); *Iris* 5GT (AB113664); *Hordeum* 3GT (X15694); *Zea* 3GT (X13501); *Vitis* 3GT (BAB41019); *Petunia* 3GT (AB027454); *Gentiana* 3GT (D85186); *Petunia* 3RT (X71059); *Gentiana* 3'GT (AB076697); *Petunia* UF3GaT (AF165148); *Vigna* UF3GaT (AB009370); *Scutellaria* UBGT (AB031274).

4. 摘要

ダッチアイリスのアントシアニン配糖化酵素、5GT をコードする cDNA を単離し、その特性を解明するため、その花蕾から構築した cDNA ライブラリーをスクリーニングし、5GT 遺伝子のクローニングと機能発現解析を行った。

得られたダッチアイリスの 5GT cDNA (*Ih5GT*) は 1,568bp の塩基からなり、その ORF は 463 のアミノ酸をコードしていた。*Ih5GT* の推定アミノ酸配列は他植物種の 5GT と高い相同性を示し、推定アミノ酸配列から算出される分子質量 (50,128Da) もこれまでの報告と良く合致していた。また、大腸菌において異種発現させた組換え *Ih5GT* は UDP-グルコースから cyanidin 3RG の 5 位へのグルコース転移を触媒し、cyanidin 3RG5G を生成した。これに対して、コントロール区ではこのような反応は認められなかったことから、ダッチアイリスにおいて *Ih5GT* が UDP-グルコース:アントシアニン 5-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確認された。さらに、様々な植物種のグリコシルトランスフェラーゼのアミノ酸配列に基づく分子系統樹解析においても、*Ih5GT* は双子葉植物のサブグループとは隔たりがあるものの、5GT のグループに属していることが示された。

第2節 アントシアニン 3-アシルトランスフェラーゼ遺伝子の単離と解析

1. 緒言

アントシアニンのアシル化には、*p*-クマル酸、コーヒー酸などの芳香族有機酸とマロン酸、コハク酸などの脂肪族有機酸による二種類が関与している。これまでの研究により、アントシアニン芳香族アシル基転移酵素をコードする cDNA はリンドウ (Fujiwara *et al.* 1998) およびシソ (Yonekura-Sakakibara *et al.* 2000) から、一方アントシアニン脂肪族アシル基転移酵素の cDNA はサルビア (*Salvia splendens*) (Suzuki *et al.* 2001, 2004a)、ダリア (Suzuki *et al.* 2002)、シネラリア (*Senecio cruentus*) (Suzuki *et al.* 2003) およびキク (*Dendranthema × morifolium*) (Suzuki *et al.* 2004b) から単離され、その特性が明らかにされている。しかしながら、アントシアニンアシルトランスフェラーゼ (AAT) をコードする cDNA は、これまで全て双子葉植物においてクローニングされたものであり、単子葉植物における AAT cDNA のクローニングに関する報告は見当たらない。

そこで、本節ではダッチアイリスの cDNA ライブラリーから 3AT cDNA をクローニングし、その機能解析を行った。

2. 材料および方法

1) 3AT cDNA のスクリーニングおよび塩基配列の決定

前節で構築したダッチアイリス cDNA ライブラリーからの 3AT cDNA 単離は、PCR ベーススクリーニングにより行った (Fig. 4-6)。まず、既知の AAT のアミノ酸配列において高度に保存されている領域、モチーフ 2 (NYFGNC) の配列を基にフォワードディジェネレートプライマー、ATCR-FW (5'-AAYTAYTTYGGNAAYTG-3') を、そ

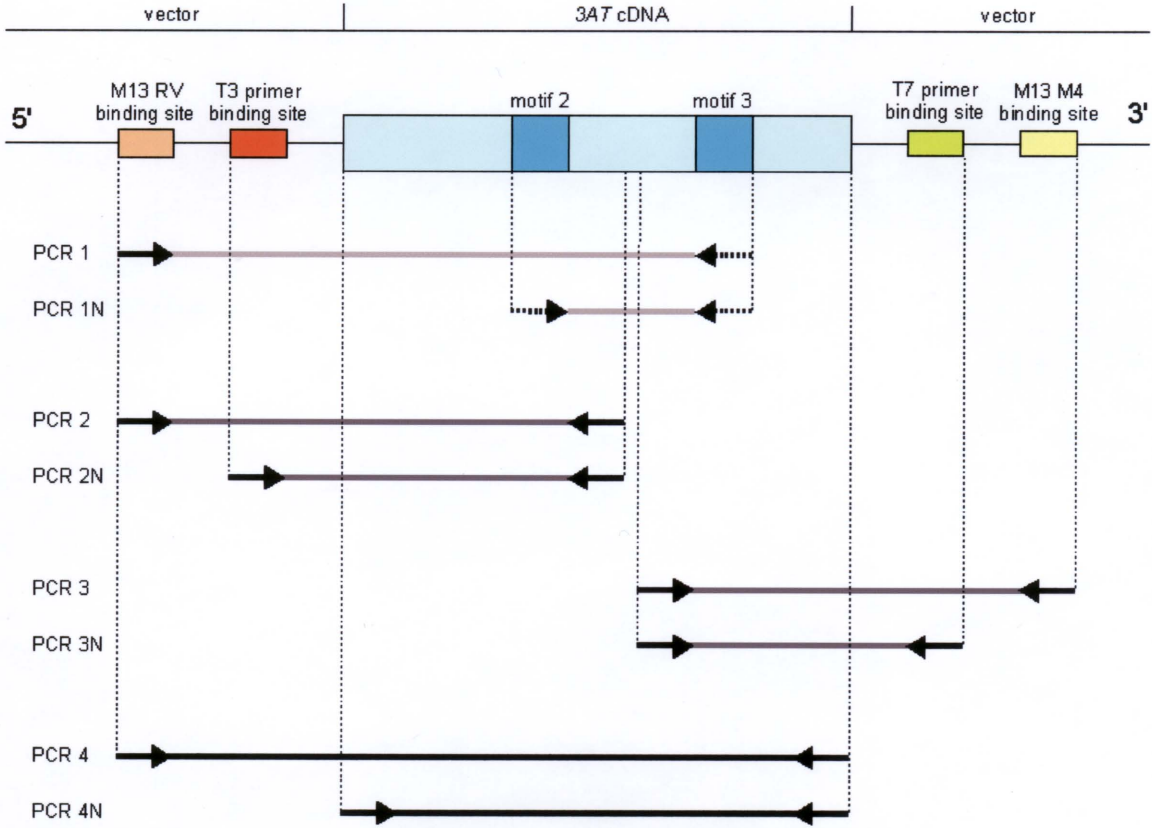


Fig. 4-6. The strategy of screening of *I. hollandica* 3AT cDNA by PCRs.

- , ← : specific primers
- ...→ , ←... : degenerate primers
- : amplicons

してモチーフ 3 (DFGWGK) の配列を基にリバーズディジェネレートプライマー、ATCR-RV (5'-YTTNCCCCANCCRAARTC-3') を作製した。PCR1 はダッチアイリス cDNA ライブラリー液 (1 μ l) を鋳型とし、1 \times PCR buffer、1 mM MgSO₄、0.2 mM dNTPs、0.1 μ M M13 Primer RV (5'-CAGGAAACAGCT- ATGAC-3'; タカラバイオ)、0.5 μ M ATCR-RV および 1U KOD -Plus- (東洋紡) からなる 50 μ l 反応系で行った。反応条件は 95 $^{\circ}$ C 2 分、(95 $^{\circ}$ C 15 秒、46 $^{\circ}$ C 30 秒 68 $^{\circ}$ C 1 分 30 秒) \times 45 サイクル、4 $^{\circ}$ C 保持である。さらに、この増幅産物 1 μ l を鋳型として、1 \times PCR buffer、1 mM MgSO₄、0.2 mM dNTPs、0.5 μ M ATCR-FW、0.5 μ M ATCR-RV および 0.4U KOD -Plus- からなる 20 μ l 反応系でネステッド PCR、PCR1N を行った。反応条件は、95 $^{\circ}$ C 2 分、(95 $^{\circ}$ C 15 秒、46 $^{\circ}$ C 30 秒、68 $^{\circ}$ C 30 秒) \times 45 サイクル、4 $^{\circ}$ C 保持とした。この反応により得られた反応産物は PCR-TRAP Cloning System (GenHunter Corporation) を用いて PCR-TRAP Vector にクローニングし、ヒートショック法により大腸菌菌株 DH5 α に導入した。形質転換後、20 μ g/ml テトラサイクリンを含む LB 寒天培地 (LB 培地 + 1.5% 寒天) 上に生じたコロニーを 20 μ g/ml テトラサイクリンを含む LB 培地 2 ml に接種して 37 $^{\circ}$ C で終夜培養し、FlexiPrep Kit でプラスミドを精製した。各クローンの塩基配列を決定し、NCBI (National Center for Biotechnology Information) の BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) で blastx 検索を行い、植物のアシルトランスフェラーゼと高い相同性を有するものを選抜した。選抜されたアシルトランスフェラーゼホモログの断片クローン (pATFG-7) の内部配列を基に、5' 側未知領域を増幅するための特異的プライマー、ATFG7-RV (5'-GATATCTCGGTTGGATG-3') および 3' 側未知領域を増幅するための特異的プライマー、ATFG7-FW (5'-GACGTCATAAGGAAGGCTG-3') を設計した。PCR1 と同様にライブラリー液

1 μ l を鋳型とし、1 \times PCR buffer、1 mM MgSO₄、0.2 mM dNTPs、0.3 μ M M13 Primer RV、0.3 μ M ATFG7-RV および 0.4U KOD -Plus-からなる 20 μ l 反応系で PCR2 を、M13 Primer M4 (5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'; タカラバイオ株式会社) と ATFG7-FW とのプライマーセットで PCR3 を行った。このときの反応条件は 95 °C 2 分、(95 °C 15 秒、50 °C 30 秒、68 °C 1 分) \times 30 サイクル、4 °C 保持とした。さらに、PCR2 の増幅産物を鋳型とし、T3 Promoter Primer (5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3'; Invitrogen) と ATFG7-RV とのプライマーセットで PCR2N を、また PCR3 の増幅産物を鋳型とし、T7 Promoter Primer (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'; Invitrogen) と ATFG7-FW とのプライマーセットで PCR3N を行った。その反応条件は PCR2 および 3 と同じであった。それぞれの PCR で得られた増幅産物を PCR1N 同様 PCR-TRAP Vector にクローニングし、その塩基配列を決定した。PCR1N、PCR2N および PCR3N の増幅断片の塩基配列情報を基に、GENETYX-WIN Version 5.2.3 プログラム (GENETYX CORPORATION) を用いてダッチアイリス AT のコンティグを作製した。コンティグの塩基配列から導かれる推定アミノ酸配列をもとにダッチアイリス AT の open reading frame (ORF) を割り出し、ORF を増幅するための特異的プライマー、AT5'FW (5'-ATGAGCTTCACAGTGACAAAG-3') および AT3'RV-KpnI (5'-ATAGGTACCCTACATGAGCGGTGCC-3'; 下線部は *Kpn* I サイト) を設計した。再びライブラリー液を鋳型として M13 Primer M4 と AT5'FW とのプライマーセットで PCR4 を行い、さらにその増幅産物を鋳型に AT5'FW と AT3'RV-KpnI とのプライマーセットで PCR4N を行った。PCR4 および PCR4N の反応条件は 95 °C 2 分、(95 °C 15 秒、50 °C 30 秒、68 °C 1 分 30 秒) \times 30 サイクル、4 °C 保持であった。増幅

産物は、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen) を用いて pCR-Blunt II-TOPO vector にクローニングし、塩基配列を確認した。

2) アミノ酸配列の解析

決定された塩基配列を基に NCBI の BLAST でデータベースとの相同性を検索し、推定アミノ酸配列の相同性および分子質量の算出、マルチプルアライメントの作製は GENETYX-WIN で行った。また、Clustal W (Thompson *et al.* 1994) による分子系統樹解析は近隣接合法 (Saitou and Nei 1987) によった。

3) 大腸菌における異種発現

3AT cDNA をクローニングしたプラスミドを *Kpn* I で消化し、1 % アガロースゲルで電気泳動し約 1.3kB の断片を回収した。この断片および *Kpn* I で消化し CIP 処理を施した pQE32 ベクター (QIAGEN) を、DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (タカラバイオ) でライゲーションし pQE32Ih3AT コンストラクトを作成した。あらかじめ pREP4 が導入されている大腸菌 (菌株 M15) にヒートショック法で pQE32Ih3AT を導入し、25 µg/ml カナマイシンおよび 50 µg/ml カルベニシリンを含む LB 寒天培地上でコロニーを得た。得られたコロニーを 25 µg/ml カナマイシンおよび 50 µg/ml カルベニシリンを含む 2×YTM 培地 (1.6 % Bacto-Trypton、1 % Yeast Extract、0.5 % NaCl、1 % MgSO₄·7H₂O; pH7.0) 1 ml に接種して一晩、37°C で前培養し、その終夜培養物 0.5 ml を 50 ml の 2×YTM 培地 (25 µg/ml カナマイシンおよび 50 µg/ml カルベニシリンを含む) に接種して 37 °C で 4 時間培養した。組換え Ih3AT タンパク質の発現誘導には終濃度 1 mM の IPTG を添加し、25°C で 24 時間振盪培養を行った。培養物を遠心分離して集菌し、SK ミル (トッケン) を用いて菌体を破砕して 1 ml の 0.1M KPi

バッファー(1 mM DTTを含む、pH 6.5)で懸濁した。懸濁液を5°C、14,000 rpmで10分間遠心分離して一次上清を回収し、再度5°C、14,000 rpmで10分間遠心分離して回収した二次上清を粗酵素液として以後の試験に用いた。

4) SDS-PAGE およびウェスタンブロットティング

SDS-PAGEはMini Protian III electrophoresis unit (Bio-Rad)を用い、取扱説明書に従って行った。サンプルの電気泳動には10%ポリアクリルアミドゲルを使用し、Coomassie Brilliant blue R-250で染色を行った。ウェスタンブロットティングにはMini Trans-blot apparatus (Bio-Rad)を用い、SDS-PAGEゲル中のタンパク質をHybond-ECLニトロセルロースメンブレン (GE Healthcare Bio-Sciences)へ移した。メンブレンは10%スキムミルクを含むPBS(80 mM Na₂HPO₄、20 mM NaH₂PO₄、100 mM NaCl; pH7.5)中で1時間、室温で振盪してブロッキングを施した。10%スキムミルクを含むPBSで3,000倍に希釈した一次抗体溶液 (Anti-His Antibody: GE Healthcare Bio-Sciences)中にメンブレンを1時間浸漬し、0.05%Tween-20を含むPBSで3度洗浄を行った。続いて、7,500倍に希釈した二次抗体溶液 (Goat Anti-Mouse IgG (H+L), AP Conjugate: Promega)に1時間メンブレンを浸漬して、0.05%Tween-20を含むPBSで3度洗浄し、NBT/BCIPによる発色反応でシグナルを検出した。

5) 組換え酵素の *in vitro* アッセイ

3ATの酵素アッセイに用いた標準反応液の組成は100 µl当たり20 µl粗酵素液、500 µM petunidin 3RG5G、300 µM *p*-クマロイルおよび0.1 M KPi バッファー(1 mM DTTを含む、pH6.5)であった。酵素反応を30°Cで20分間行った後、Folch *et*

al. (1957)の方法によりその反応を停止させた。アッセイにより得られた最終産物のアントシアニンは、HPLCにより確認した。HPLCの分析条件は第2章に示したとおりである。酵素反応に用いたアントシアニンの標品は **petunidin 3RG5G**、**petunidin 3pCRG5G** であり、また *p*-クマロイル CoA は田中良和博士(サントリー株式会社 サントリー研究センター)より分譲して頂いた。

3. 結果および考察

ダッチアイリスの 3AT cDNA をクローニングするため、当初は 5GT の場合と同様に、他植物種の 3AT cDNA をプローブとしてダッチアイリス cDNA ライブラリーのスクリーニングを試みたが、成功しなかった。そこで、既知の AAT のアミノ酸配列において広く保存されている領域(モチーフ 2 および 3, Fig. 4-6)を基に PCR によるスクリーニングを行った。6 段階の PCR (Fig. 4-6, PCR1~PCR3N) から得られた最長のコンティグ (*Ih3AT*) は、1,475bp の塩基対からなり、その ORF は 429 のアミノ酸をコードしていた。BLAST 検索の結果、*Ih3AT* 推定アミノ酸配列は植物のアシルトランスフェラーゼのものと一定の相同性を示した。しかし、既知の AAT との類似度は低く、サルビアの *Ss3AT* (AY395719、Suzuki *et al.* 2004)、リンドウの *Gt5AT* (AB010708、Fujiwara *et al.* 1998)、ダリアの *Dv3MaT* (AF489108、Suzuki *et al.* 2002) およびシソの *Pf5MaT* (AF405204、Suzuki *et al.* 2001) とそれぞれ 19.8、20.8、21.2 および 19.8% の相同性を示したのみであった。また、*Ih3AT* の推定分子質量は 47,677Da であり、組換え *Ih3AT* のウェスタンブロット分析においても分子質量が約 50kDa であることを確認した (Fig. 4-7)。これらの値は *Ss3AT*、*Gt5AT*、*Dv3MaT* および *Pf5MaT* のもの (50,991、52,739、51,301 および 49,124Da) と一致していた。

次に、*Ih3AT* の 3AT 酵素活性を確認するため、組換え *Ih3AT* を発現した大腸菌抽出液の可溶性画分を用いて調査を行った。酵素アッセイにはアシル基受容基質として *petunidin 3RG5G*、アシル基供与基質として *p*-クマロイル-CoA を用い、酵素反応により新規化合物が合成されていることを HPLC 分析により確認した (Fig. 4-8)。コクロマトグラフィーの結果から、これらの産物は *petunidin 3pCRG5G* であると同定された。一方、*p*-クマロイル-CoA を除いた反応液や粗酵素液を加えていない *Ih3AT* 反応液では、これらの産物の生成は認められなかった。以上の結果から、*Ih3AT* が 3AT

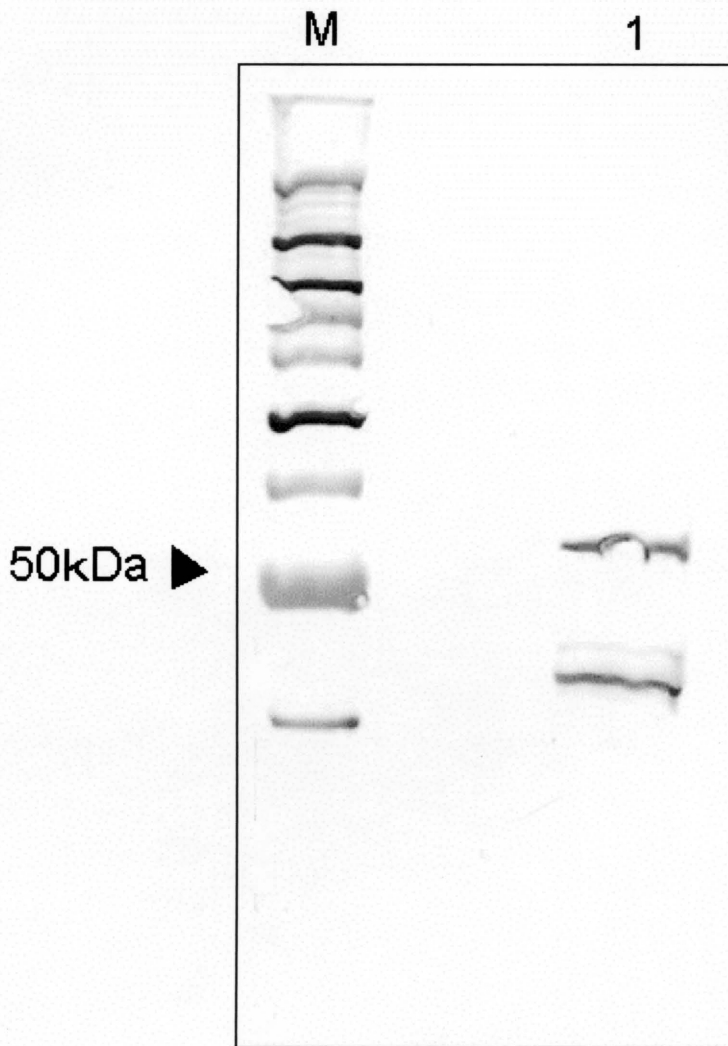


Fig. 4-7. Western blotting of Ih3AT proteins expressed in *E. coli*. Lane M, Molecular markers; Lane 1, a soluble fraction of *E. coli* harboring pQE32Ih3AT. Black arrow shows 50 kDa.

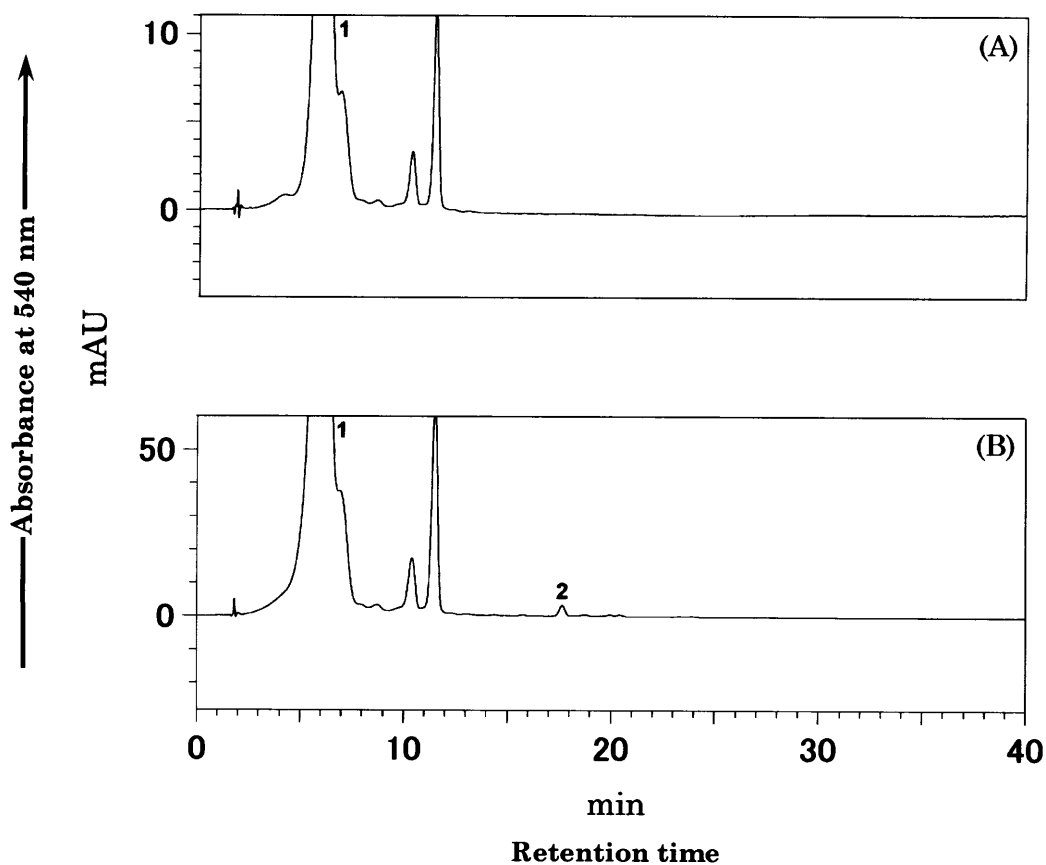


Fig. 4-8. High-performance liquid chromatographic analysis of reaction products catalyzed by Ih3AT.

(A) A control (*p*-coumaroyl-CoA was omitted from the reaction mixture).

(B) The reaction product of Ih3AT (*p*-coumaroyl-CoA was added in the reaction mixture).

Peak numbers 1 (Rt: 6.0 min) and 2 (Rt: 17.6 min) show petunidin 3RG5G and petunidin 3*p*CRG5G, respectively.

活性を有することが示された。本研究は、単子葉植物において **3AT** 遺伝子の単離に成功した最初の報告である。

AAT 間の推定アミノ酸配列におけるマルチプルアライメントの結果、**Ih3AT** のモチーフ 2 および 3 の **F**(フェニルアラニン)は **Y**(チロシン)となっていたが、モチーフ 1 (**HXXXD**)、モチーフ 2(**YFGNC**)およびモチーフ 3(**DFGWGK**)ともにほぼ保存されていた (Fig. 4-9)。フェニルアラニンおよびチロシンは芳香環を有する疎水性アミノ酸であり、その化学的性質が類似していることから、これらのアミノ酸置換はモチーフの構造、さらには酵素の特性にあまり影響を与えないのかもしれない。

しかし、**BAHD** ファミリーを対象とした、推定アミノ酸配列における分子系統分析では、**Ih3AT** は AAT のグループよりもむしろタキソールの生合成に関与するアセチルトランスフェラーゼのグループにより近いことが示された (Fig. 4-10)。このような例は、サルビアの **Ss5MaT2**(アントシアニン 5-*O*-グルコシド-4'''-*O*-マロニルトランスフェラーゼ、**AY383734**)においても報告されている (Suzuki *et al.* 2004)。**Ss5MaT2** はマロニル-CoA からアントシアニンの 5-*O*-グルコシル残基の 4'''-ヒドロキシル基へのマロニル基転移を触媒しているが、Fig. 4-10 に示したように、AAT のサブグループからは系統発生的に離れている。しかも、アライメント解析の結果から **Ss5MaT2** はモチーフ 2 に対応する配列を欠くことが判明しているが、その原因については未だ解明されていない。このように AAT において系統発生的に分岐した酵素が同様の機能を有していることは非常に興味深い。

Dv3MaT	1	MDNIPNLTILEHSRISP-PPSTIGHR-SLELTFEDI-AWLLFPPVHH-LYEFHFPYSKS-	55
Gt5AT	1	MEQIQMVKLEKQVTP-PSDSTDVELSLPVTFFDI-PWLHLNKMQS-LLEFYDFPYPR-	56
Pf5MaT	1	---MTTTL-LETCLILPP-PTD---EVSIEPLSFFDM-KWLHFHP-LRRLLEFDHPCKSKP-	49
Ss3AT	1	---MAITV-LESCL-VAPPPGSVPDQ-TLPLTFFDI-NWLHFHPML-QLIFYEFPSCNP-	51
Ih3AT	1	MSFTVTK-MAP-ELLVPAEAT--PNCV-LELSEMDRSPCLRYHVELIFV--VDRGIG-PA	52
Dv3MaT	56	HFTETVIPNLKHSISITLQHYFFVFGKLIIVYPNPH-DSTRKPEIRHVEGDSVALTFAETT	114
Gt5AT	57	HFLDTPVIPNLKASLSLTLKHYPVLSGNLL-MPIKSGEMP-KFQYSRDEGDSITLIVAESD	114
Pf5MaT	50	QFLDAIVPHLKQSLSLTLKHYPVAGNLLY-PSSNTDQKP--RLRCVAGDSVPLTIAEST	106
Ss3AT	52	HFLQTVVPKPKQSLSLTLKHFFPLSAHLVY-PSSLEDM-PFYRFRS--GDSVPTVSESG	107
Ih3AT	53	DVIRKAASKV---L-VP--YY-EVAGRIVVNSNTG-E--PEVVCSEGE-A--VFVE--AY	97
Dv3MaT	115	LDFNDSANHPRKCFNYPLVPPGLNAVKES-DY-VTLPVFVSVQVITVEPNSGISISGLT-N	171
Gt5AT	115	QDFDYLKGHQLVDSNDLHGLFYVMPRVIRTMQDYKV-IPLVAVQVITVEPNSGIAVAULT-A	172
Pf5MaT	107	TDF-DMLTGNHARDADQFYDFVAPMPPIAEFECKIVPVFSL-QVITVEPNSGICIGLS-N	163
Ss3AT	108	EDFYDFV-GNYNQADKYYNYVPQLPPIVEESDRKLMKVFAV-QLITVEPNSGVCVGIT-T	164
Ih3AT	98	ADC-SLG--DVKFLDGLP-LAMHKDELLPKESNEDGVI-FLV-QVITVEPNSGFTVGIKTM	151
Dv3MaT	172	HSLSLSDANTFRG-FL-KA-WASVCETGEDQPFLLKNGSP---EVFDFRVVNPQLYE--NR	222
Gt5AT	173	HSIADAKS-FVMFI-NA-WAYINKFGKDADLLSANLL---PSFDRSIIK-DLYGLEET	224
Pf5MaT	164	HCCLGDARSVVG-FV-L-AWASINKFEGG-DEEFLSENGE-SLPIFDRSLIKDPLEIDTIF	218
Ss3AT	165	HCVSDAPSFLS-F--LSSWSAIS-RGDDEELVAQNCK-SLPVDFRSLINYPKLDLSLY	219
Ih3AT	152	-HAIFDGVGASQFMKAI---GELAK-GHQOPTVKPIWSRDAIPN--EQANPNPNHN-QLS	203
Dv3MaT	223	<u>L-NQTR--LGTGTF--YQAPSLVGSSSDRVRATFVLARTHISGLKKQVLTQL----</u> PM-LEY	272
Gt5AT	225	FWNEMQDVLLEMFSRFG--SKPPRFN-KVRATYVLSLAEIQKLNKVLN-LRGSEPT-IRV	279
Pf5MaT	219	WKVLRNIPILKPSFF-LPTNRVRATFVLSQSDIKRLKH-LANNLVQPSS-----F-V-V	269
Ss3AT	220	WKNAQRMPLQSR-HPSMPTNRIRSTYIFTQSQIQKLSIQE-KLPNSTRIT--SF-VAI	274
Ih3AT	204	LPPGALPSLPAFQFHYYIIDISP-DYVSQ-----LKNEFAAAT-GR--KCT-E-FDVL	251
Dv3MaT	273	TSSFVTTCGYIWSIVKSLVNMG-EKKGED--ELEQF-IVSVGCRSRLDPELPE-NYFGN	327
Gt5AT	280	TT-FTMTCGYVWTCMVKSKDDVVSESSNDENELEYF-SFTADCRGLLTPPP-NYFGN	336
Pf5MaT	270	AAA-----YIWSMVKSGDGEANAP----EL---F-VIPADARGRTNPPVPA-NYFGN	314
Ss3AT	275	A-A-----YIWSLAKSLRSVADNDNDGDGA-F-F-LIPIDLPRLDPAVPG-NYFGN	323
Ih3AT	252	--AKV-----WQCRTRAINFDK-DVQVHL--S--FPVNVRAELR-HLLPP-PEGGYGN	296
Dv3MaT	328	GSAPCIVTIKN-GVLKGENGF-VMAAKLIGEG-ISKMVN-K-KG--GILEYADRWYDGFK	380
Gt5AT	337	CLASCVAKATHKE-LVGDKGL-LVAVAAIGEA-IEKRLH-NEKG---VLADAKTWLSESN	389
Pf5MaT	315	CI-VGGVVKVEHEKMAGNEG--FVAIAEAIAGEIKNMN-D-KE--EILKGAENWLSEIW	367
Ss3AT	324	CLSF-ALPRIGRRELGGEGM-FAAAKAA-AEAIEKRTS-D-KK---ILESVEKWSGEIR	375
Ih3AT	297	GIQPRYLKAQSEH-VAEA-ALLFEVVDAIT--VA-KEDATA-KFWRW-MK-GDPRE-ERP	347
Dv3MaT	381	-IPA-RK-MGISGTPKLNFDYDIFGWGKAMKYEVVSDIDYSASVLSACKESAQDF-EIGV	436
Gt5AT	390	GIPS-KRFLGITGSPKFDYGVDFGWGKPAKFDITSVDYAEIYVIQSRDFEKGV-EIGV	447
Pf5MaT	368	KCMG-MSVLGTSKSPKFDLSNADFGWGKARKLEVVSDIDGKYTMSLNCNS-DC--GLEVGL	423
Ss3AT	376	EAVQ-KSFFSVAGTTRMNQYADFGWGKARKQEILSVDGKEYAMTLCKARDFEGGLEVCM	434
Ih3AT	348	AAADTYTVLNVSDWRRVGFIDVDFGWGKPRSLVPTNDE--KH-IGSCFLLNSPAPKK-GV	403
Dv3MaT	437	CFFSMQM-EA-FGKIFNDGLESIAIS-	460
Gt5AT	448	SLPKIHM-DA-FAKIFEEGFC-SLS--	469
Pf5MaT	424	SLPGERM-EA-FAAIFADGLAKLDSS-	447
Ss3AT	435	SLPNHIM-KA-FDS-YI---AKPAACD	455
Ih3AT	404	RIMTNCIVKEHYEA-FDREMKKMAPLM	429

Fig. 4-9. Multiple alignment of deduced amino acid sequences of AATs. Framed letters indicate identical amino acids. The letters indicated same color mean similar amino acid residues. The underline shows the common motif found in AATs. GenBank accession numbers of the AATs: Dv3MaT (AF489108); Gt5AT (AB010708); Pf5MaT (AF405204); Ss3AT (AY395719).

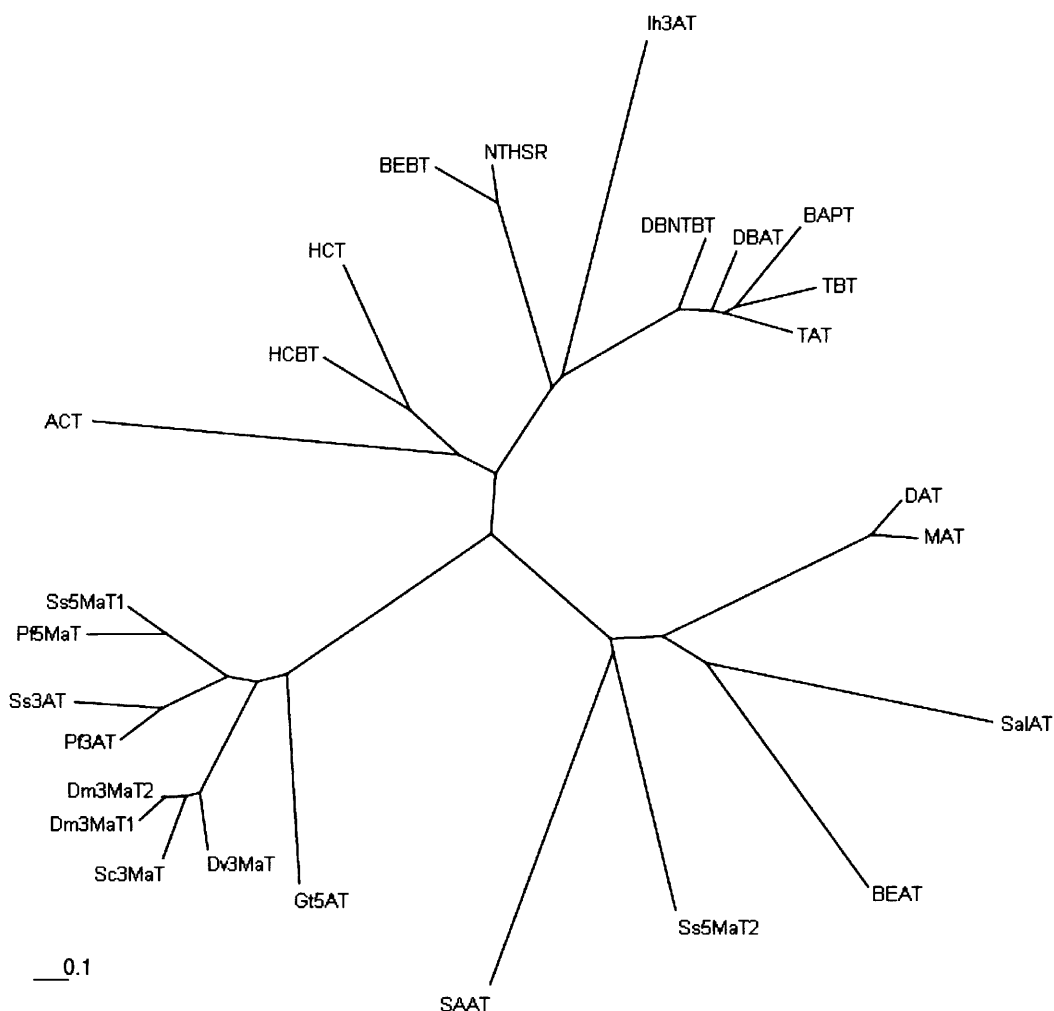


Fig. 4-10. A molecular phylogenetic tree of the deduced amino sequences of Ih3AT and other acyltransferases belonging to the BAHD family. The tree was constructed by the neighbor-joining method. The lengths of the lines indicate the relative distances between nodes. Enzymes used for the alignment were as follows: Ih3AT (this study), Pf5MaT (AF405204), Gt5AT (AB010708), Pf3AT (AB029340), Ss5MaT1 (AF405707), Ss5MaT2 (AY383734), Sc3MaT (AY190121), Dm3MaT1 (AY298809), Dm3MaT2 (AY298810), Dv3MaT (AF489108), Ss3AT (AY395719), HCBT (Z84386), DAT (AF053307), MAT (AF253415), HCT (AJ507825), ACT (AJ507825), NTHSR (T03274), BEBT (AF500200), BAPT (AY082804), TBT (AF297618), DBAT (AF193765), TAT (AF190130), DBNTBT (AF466397), BEAT (AF043464), SAAT (AF193789), and SalAT (AF339913).

4. 摘要

ダッチアイリスのアントシアニンアシル化酵素、3AT をコードする cDNA を単離・解析するため、その花蕾から構築した cDNA ライブラリーをスクリーニングし、3AT 遺伝子のクローニングと機能発現解析を行った。

得られたダッチアイリスの 3AT cDNA (*Ih3AT*) は 1,475bp の塩基対からなり、その ORF は 429 のアミノ酸をコードしていた。BLAST 検索の結果、*Ih3AT* 推定アミノ酸配列は他植物種のアシルトランスフェラーゼのものと一定の相同性を示したが、既知のアントシアニンアシルトランスフェラーゼ(AAT)との相同性は低かった。また、*Ih3AT* の推定分子質量(47,677Da)は既知の AAT のものとほぼ一致していた。組換え *Ih3AT* 粗酵素抽出液、*p*-クマロイル-CoA および petunidin 3RG5G を用いた酵素アッセイの結果、反応産物として petunidin 3pCRG5G が合成されることを確認した。一方、コントロール区では petunidin 3pCRG5G の生成は認められなかったことから、*Ih3AT* が 3AT 活性を有することが示された。