

第3章 ハナショウブにおけるアントシアニン配糖化およびアシル化酵素の特性解明

Iris 属植物における主要な外花被含有アントシアニンは、前章で述べたように malvidin 3pCRG5G、petunidin 3pCRG5G および delphinidin 3pCRG5G であり、これらのアントシアニンは配糖化、アシル化およびメチル化の修飾を受けているが、その機構は解明されていない。

グルコシル化を始めとする配糖化は液胞中でのアントシアニンの水溶性を高め、コピグメンテーションの際に安定な形態を導き、アントシアニンの形態変化による無色化を防ぐ働きがある (Heller and Forkmann 1994, Jones *et al.* 2001, Yamazaki *et al.* 2002)。特に、ハナショウブでは、5位のグルコシル化が花色の赤色化に重要であることが指摘された(第2章)。また、脂肪族有機酸によるアシル化は分子内スタッキングによりアントシアニンの安定化をもたらし、さらに芳香族有機酸によるアシル化は青色化(深色移動)にも寄与することが報告されている (Goto and Kondo 1991)。しかしながら、これまでのところ5位の配糖化および3位のアシル化に関与する酵素の特性解明は *Iris* 属植物を含む単子葉類において全く知見が得られていないのが現状である。

そこで、本章ではハナショウブの花蕾から抽出したアントシアニン修飾酵素の特性や品種間における同酵素の活性を明らかにするとともに、本種のアントシアニン生合成における最終産物生成の反応経路についても検討した。

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の特性解明

1. 緒言

アントシアニンの5位へグルコースを付加する酵素、アントシアニン5-グルコシルトランスフェラーゼ(5GT)の特性は Kamsteeg *et al.* (1978)により最初に *S. dioica* の花の抽出液で明らかにされた。この5GTはUDP-グルコースからアントシアニン3Gおよび3RGの5-OH基へのグルコース転移を触媒しており、その後もペチュニア (Jonsson *et al.* 1984)、ストック (*Matthiola incana*) (Teusch *et al.* 1986)、シソ (Yamazaki *et al.* 1999) およびダリア (*Dahlia variabilis*) (Ogata *et al.* 2001)などで報告されてきた。しかしながら、このような報告例は双子葉植物に限られており、単子葉植物ではこれまで全く報告されていないのが現状である。第2章で示したように、ハナショウブの外花被に含有される最も主要なアントシアニンはアントシアニン3pCRG5Gであることから、その生合成には5GTの関与が不可欠である。

そこで、本節ではハナショウブにおける5GTの酵素特性に関する知見を得るために、本種の花蕾から5GT粗酵素液を調整し、その生化学的特性を明らかにするとともに、5GT活性の品種間差異についても調査した。

2. 材料および方法

1) 植物材料

ハナショウブのシアニック(有色)系として「花籬」、「水天一色」、「紫式部」、「紫宸殿」、「座間の美」の5品種を、またアシアニック(白色)系として「浮寝鳥」、「雪燕」、「磯打波」、「鶴の毛衣」、「朝日の峰」の5品種を植物材料として供試した。これらの品種は当研究室で保存されていたものである。なお、各品種は宮崎大学農学部の実験圃場

で栽培された。

2) 酵素反応における基質の調製

アントシアニン(Table 3-1)の標品については南九州大学の山口雅篤博士から、また *p*-クマロイル-CoA は塩野義製薬株式会社の加藤研治氏から分譲していただいた。また、UDP-グルコース、UDP-ガラクトース、ADP-グルコースは Sigma から、Polyclar SB-100 は和光純薬株式会社から購入した。

3) 酵素調製

開花直前の花蕾 2~3 個から 1 g の花被を採取し、氷冷した乳鉢を用いて、0.6 g の石英砂、0.6g の Polyclar SB-100 および 2.5 ml の 0.1M KPi バッファー (10 mM L-システイン含有、pH7.0) とともにホモジナイズした。以下、操作は 5°C の条件下で行った。ホモジェネートを 10,000 x g で 5 分間、2 度遠心分離し、その上清を Sephadex G-50 カラム (1 x 10 cm) に通して低分子量の物質を除去したものを粗酵素液とした。この粗酵素液は -20 °C で数週間、酵素活性をほとんど低下させずに保存することが可能であったが、凍結融解を繰り返すと活性は低下した。

4) タンパク質濃度の決定および酵素アッセイ

タンパク質濃度は、Bradford (1976) の方法により決定した。酵素アッセイに用いた標準反応液は、100 μ l 当たり 20 μ l 粗酵素液 (約 15~20 μ g のタンパク質を含む)、500 μ M delphinidin 3RG、1,200 μ M UDP-グルコースおよび 10 mM L-システインを含む 70 μ l KPi バッファー (pH7.0) の組成であった。酵素反応が 30°C、20 分間で

Table 3-1. HPLC retention times (*Rt*) and FAB-MS data of authentic anthocyanins used in this study

Anthocyanin	<i>Rt</i> (min)	[M] ⁺
Malvidin 3G	14.6	NT ^a
Malvidin 3RG	15.5	639
Malvidin 3 <i>p</i> CRG	27.0	785
Malvidin 3RG5G	9.5	NT
Malvidin 3 <i>p</i> CRG5G	23.1	947
Petunidin 3G	11.3	NT
Petuidin 3RG5G	7.2	NT
Petunidin 3 <i>p</i> CRG5G	20.5	933
Delphinidin 3G	7.6	NT
Delphinidin 3RG	8.4	611
Delphinidin 3 <i>p</i> CRG	20.6	757
Delphinidin 3RG5G	4.7	NT
Delphinidin 3 <i>p</i> CRG5G	17.0	919
Peonidin 3G	13.4	NT
Peonidin 3RG	14.4	NT
Peonidin 3RG5G	8.8	NT
Cyanidin 3G	9.6	NT
Cyanidin 3RG	10.6	NT
Cyanidin 3RG5G	6.1	NT

^a Not tested.

行われた後、Folch *et al.* (1957)の方法によりその反応を停止した。最終産物のアントシアニンは HPLC により確認した。

5) 酵素の特性

ハナショウブ品種「花籬」の花蕾から抽出した酵素の特性は、Ino and Yamaguchi (1993)および Ino *et al.* (1993)の方法により明らかにした。基質特異性を含むすべての測定は各基質の飽和濃度における反応液で行った。

6) HPLC 分析

HPLC 分析装置として、島津高速液体クロマトグラフ (LC-10) に Inertsil ODS-II カラム (6 x 100 mm) を装備して用いた。溶出システムは、移動相に A 液 [1.5% リン酸 (水溶液)] と B 液 [1.5% リン酸、20% 酢酸、25% アセトニトリル (水溶液)] を用い、35°C 下で 25% B 液から 85% B 液まで 40 分間の直線勾配グラジエント溶出 (流速 1ml/min、カラムオープン 35°C) を行った。アントシアニンは 520nm で検出した。

7) FAB-MS 分析

FAB-MS スペクトルは日本電子製質量分析計 SX102A を用い、チオグリセロールマトリックス内でポジティブモードにより測定した (Table 3-1)。FAB-MS スペクトルの分析では福井祐子氏 (サントリー株式会社 サントリー研究センター) にご協力を頂いた。

3. 結果および考察

まず、各アントシアニン標品の HPLC 分析を行い、それぞれの保持時間を求め、また一部は FAB-MS スペクトルを測定した (Table 3-1)。続いて、ハナショウブ品種「花籬」の花蕾から得た粗酵素抽出液を malvidin 3RG および UDP-グルコースとともに反応させたところ、その反応液中に基質 (malvidin 3RG、15.5 分) よりも HPLC 保持時間が短い反応産物 (9.5 分) を形成し、後者の値は malvidin 3RG5G と対応するものであった (Table 3-1)。酵素反応液から UDP-グルコースが除外されると、この産物は検出されなかった。同様に、グルコシル基受容体として delphinidin 3RG を用いた場合の反応産物は delphinidin 3RG5G と同定された。また、糖供与体として ADP-グルコースおよび UDP-ガラクトースを用いて試験を行ったが、どちらも基質としては認識されなかった。以上の結果から、ハナショウブの 5GT は UDP-グルコースからアントシアニン 3RG へのグルコシル基転移を触媒し、アントシアニン 3RG5G の生成を導くことが示された。

品種「花籬」の花蕾から得られた粗酵素抽出液を用いて、様々なアントシアニンに対する 5GT の基質特異性を調査したところ、供試したアントシアニン 3RG はすべてグルコシル基受容体としてほぼ等しく機能していた (Table 3-2)。これに対して、アントシアニン 3G および 3pCRG はどれも受容体として機能し得なかった。

シアニックおよびアシアニック品種から調製された粗酵素抽出液は、花蕾新鮮重 1 g 当たり約 3.2~4.5 mg のタンパク質を含んでいた。これらの抽出液、グルコシル基受容体として delphinidin 3RG およびグルコシル基供与体として UDP-グルコースを用いて 5GT の特異的活性が調査された (Table 3-3)。花蕾新鮮重 (g) 当たりの総 5GT 活性の値は特異的活性の値とよく比例していた。シアニック品種間における特異的活性を花色と関連づけるのは困難であった。しかし、品種「座間の美」はその活性が他の

Table 3-2. Substrate specificity of 5GT for various anthocyanins

Anthocyanin	Reaction product	Relative activity ^a (%)
Malvidin 3RG	Malvidin 3RG5G	100
Delphinidin 3RG	Delphinidin 3RG5G	98
Cyanidin 3RG	Cyanidin 3RG5G	83
Peonidin 3RG	Peonidin 3RG5G	106
Malvidin 3 <i>p</i> CRG	ND ^b	0
Delphinidin 3 <i>p</i> CRG	ND	0
Malvidin 3G	ND	0
Delphinidin 3G	ND	0
Cyanidin 3G	ND	0
Peonidin 3G	ND	0

^a The 5GT activity obtained with malvidin 3RG was expressed as 100%.

^b Not detected.

Table 3-3. Specific activity of 5GT in flowers of *I. ensata* cultivars

Flower color	Cultivars	Specific activity ($10^{-2} \times \text{pkat } \mu\text{g}^{-1}$)
Purple	Hanamagaki	68.8
Bluish purple	Suiten-issoku	55.8
Reddish purple	Murasakisikibu	62.2
	Shishinden	72.7
Purple with white vein	Zamanobi	9.6
White	Ukinedori	48.9
	Tsurunokegoromo	27.7
	Yukitsubame	1.3
	Isoutsunami	0
	Asahinomine	0

品種のものとは比べて20%にも満たなかった。一方、アシアニック5品種のうち3品種は比較的高い特異的活性を示した。このような結果はペチュニアにおいても報告されている(Jonsson *et al.* 1984)。さらに驚くべきことに、品種「浮寝鳥」および「鶴の毛衣」の活性は、シアニック品種「座間の美」のものよりもかなり高かった。このようにアントシアニンの修飾を行う5GTの遺伝子が、他のアントシアニン生合成遺伝子とは独立して発現していることは非常に興味深い。

4. 摘要

ハナショウブのシアニック(有色)系5品種およびアシアニック(白色)系5品種を植物材料として供試し、各品種の蕾から調製した粗酵素抽出液を用いて 5GT の特性を解明した。得られた結果は次のとおりである。

シアニック品種「花籬」から調製した 5GT は、UDP-グルコースからアントシアニジン 3RG へのグルコースの転移を触媒し、アントシアニジン 3RG5G を生成した。しかし、糖供与体として ADP-グルコースおよび UDP-ガラクトース、糖受容体としてアントシアニジン 3G および 3pCRG を用いた場合には糖転移反応は起きなかった。また、シアニック品種間において 5GT 活性の強弱と花色との間に明確な関連性は認められなかった。一方、アシアニック5品種のうち3品種は 5GT 活性が比較的高く、特に品種「浮寝鳥」および「鶴の毛衣」の 5GT 活性はシアニック品種「座間の美」よりも高かった。このように、5GT をコードする遺伝子が他のアントシアニン生合成遺伝子とは独立して発現していることは非常に興味深いことであった。

第 2 節 アントシアニン 3-アシルトランスフェラーゼの特性説明

1. 緒言

芳香族有機酸によるアントシアニンのアシル化において、*p*-クマロイル-CoA とカフェオイル-CoA とからアントシアニン 3RG および 3RG5G へアシル基を転移するアントシアニン 3-アシルトランスフェラーゼ (3AT) が *S. dioica* で最初に報告され (Kamsteeg *et al.* 1980)、その後、ストック (Teusch *et al.* 1987)、セイヨウキランソウ (*Ajuga reptans*) (Callebaut *et al.* 1996) などの植物種からも CoA-エステルを介して芳香族アシル基をアントシアニンの 3 位へ転移する酵素の特性が明らかにされてきた。しかしながら、その報告例は限られており、単子葉植物に至っては皆無である。前節の 5GT と同様、3AT もハナショウブの主要アントシアニンであるアントシアニン 3pCRG5G の生合成に不可欠な酵素である。

そこで、本節ではハナショウブの花蕾から 3AT を抽出し、その生化学的特性を明らかにするとともに、品種間における同酵素の活性についても検討した。さらに、5GT(前節)および 3AT の基質特異性に関して得られた知見を基にして、ハナショウブにおけるアントシアニン最終産物の生合成経路を提案した。

2. 材料及び方法

1) 植物材料

ハナショウブのシアニック系として「花籬」、「水天一色」、「紫式部」、「艶小町」、「紫宸殿」、「座間の美」の 6 品種を、またシアニック系として「浮寝鳥」、「雪燕」、「磯打波」、「鶴の毛衣」の 4 品種を植物材料として供試した。これらの品種は当研究室で保存されていたものである。なお、各品種は宮崎大学農学部の実験圃場で栽培された。

2) 酵素反応における基質の調製

アントシアニン(Table 3-1)の標品については南九州大学の山口雅篤博士から、また *p*-クマロイル-CoA は塩野義製薬株式会社の加藤研治氏から分譲していただいた。また、Polyclar SB-100 は和光純薬株式会社から購入した。

3) 酵素調製

開花直前の花蕾 2~4 個から 1 g の花被を採取し、氷冷した乳鉢を用いて、0.6 g の石英砂、0.6g の Polyclar SB-100 および 2.5 ml の 0.1M KPi バッファー (10 mM L-システイン含有、pH7.0) とともにホモジナイズした。以下、操作は 5°C の条件下で行った。ホモジェネートを 10,000 x g で 5 分間、2 度遠心分離し、その上清を Sephadex G-50 カラム (1 x 10 cm) に通して低分子量の物質を除去したものを粗酵素液とした。この粗酵素液は -20 °C で数週間、酵素活性をほとんど低下させずに保存することができた。

4) タンパク質濃度の決定および酵素アッセイ

タンパク質濃度は、Bradford (1976) の方法により決定した。酵素アッセイに用いた標準反応液は、100 µl 当たり 20 µl 粗酵素液 (約 15~20 µg のタンパク質を含む)、500 µM malvidin 3RG5G または delphinidin 3RG、300 µM *p*-クマロイル-CoA および 10 mM L-システインを含む 70 µl KPi バッファー (pH6.5) の組成であった。また、3AT および 5GT 活性の同時測定に用いた反応液は、100 µl 当たり 20 µl 粗酵素液 (約 15~20 µg のタンパク質を含む)、500µM delphinidin 3RG、1,200µM UDP-グルコース、300µM *p*-クマロイル CoA および 10 mM L-システインを含む 70 µl KPi

バッファー (pH6.5) の組成であった。酵素反応が 35°C、20 分間で行われた後、Folch *et al.* (1957) の方法によりその反応を停止した。最終産物のアントシアニン は HPLC により確認した。

5) 酵素の特性

ハナショウブ 品種「花籬」の花蕾から抽出した酵素の特性は、Ino and Yamaguchi (1993) および Ino *et al.* (1993) の方法により明らかにした。基質特異性を含むすべての測定は各基質の飽和濃度における反応液で行った。

6) HPLC 分析

HPLC 分析装置として、島津高速液体クロマトグラフ (LC-10) に Inertsil ODS-II カラム (6 x 100 mm) を装備して用いた。溶出システムは、移動相に A 液 [1.5% リン酸 (水溶液)] と B 液 [1.5% リン酸、20% 酢酸、25% アセトニトリル (水溶液)] を用い、35°C 下で 25% B 液から 85% B 液まで 40 分間の直線勾配グラジエント溶出 (流速 1ml/min、カラムオーブン 35°C) を行った。アントシアニンは 520nm で検出した。

3. 結果および考察

3AT の酵素アッセイを行う前に、各アントシアニン標品を HPLC で分析し、それぞれの保持時間を Table 3-1 にまとめた。

Malvidin 3RG5G、*p*-クマロイル CoA および品種「花籬」の花蕾からの粗酵素抽出物の反応は、基質である malvidin 3RG5G よりも長い HPLC 保持時間の反応産物を形成し、後者の値は malvidin 3pCRG5G に対応するものであった (Table 3-1)。*p*-クマロイル CoA を反応液に加えなかった場合には、この産物は検出されなかった。ま

た、アシル基受容体として **malvidin 3RG** を用いた場合も、反応産物は **malvidin 3pCRG** と同定された。

シアニックおよびアシアニック品種から調整された粗酵素抽出液は花蕾新鮮重 1g 当たり 3.1~4.5mg のタンパク質を含んでいた。これらの抽出液、アシル基受容体として **malvidin 3RG5G** または **malvidin 3RG** およびアシル基供与体として *p*-クマロイル CoA を用いて、3AT の特異的活性を調査した (Table 3-4)。花蕾新鮮重 (g) 当たりの総 3AT 活性の値は特異的活性の値とよく比例していた。シアニック品種間の特異的活性を花色と関連づけることは困難であった。一方、アシアニック 5 品種のうち、「浮寝鳥」および「雪燕」の 2 品種は比較的高い特異的活性を示した。従って、5GT と同様、3AT もその遺伝子が他のアントシアニン生合成遺伝子と独立して発現していることが示された。このような例は、アントシアニンアシル基転移酵素 (AAT) としては脂肪族有機酸の転移酵素において報告されている (Ino and Yamaguchi 1993, Ino *et al.* 1993, Yamaguchi *et al.* 1996, Yamaguchi *et al.* 1999)。

各種アントシアニンのアシル基受容体としての能力を品種「花籬」の酵素抽出液を用いた酵素アッセイにより検定した (Table 3-5)。検定に用いたアントシアニン 3RG5G はいずれも受容体として等しく機能していた。また、アントシアニン 3RG も受容体として機能したが、その活性は 3RG5G のものと比較して約 1/5 であった。一方、アントシアニン 3G はアシル基受容体として全く機能していなかった。前節においてハナショウブの 5GT がアントシアニン 3RG を基質として利用するが、アントシアニン 3G および 3pCRG は基質として利用できないことを示した。5GT および 3AT の基質特異性に関するこれらの結果から、ハナショウブにおけるアントシアニン生合成経路の末端部を提案した (Fig. 3-1)。すなわち、アントシアニン 3RG は、3AT によって 3 位がアシル化され、最終産物であるアントシアニン 3pCRG になるとともに、また

Table 3-4. Specific activity of *p*-coumaroyltransferase in flowers of *I. ensata* cultivars

Flower color	Cultivars	Specific activity ($10^{-2} \times \text{pkat } \mu\text{g}^{-1}$)	
		(Substrate)	
		Malvidin 3RG5G	Malvidin 3RG
Purple	Hanamagaki	18.97	4.02
Bluish purple	Suiten-issoku	13.31	3.03
Reddish purple	Murasakishikibu	12.30	2.45
	Tsuyakomachi	5.97	1.22
	Shishinden	4.77	1.08
Purple with white vein	Zamanobi	1.74	0.30
White	Ukinedori	0.79	0.19
	Yukitsubame	0.59	>0.01
	Isoutsunami	0	0
	Asahinomine	0	0
	Tsurunokegoromo	0	0

Table 3-5. Substrate specificity of p-coumaroyltransferase for various anthocyanins

Anthocyanin	Reaction product	Relative activity* (%)
Malvidin 3RG5G	Malvidin 3 <i>p</i> CRG5G	100
Petunidin 3RG5G	Petunidin 3 <i>p</i> CRG5G	107
Delphinidin 3RG5G	Delphinidin 3 <i>p</i> CRG5G	105
Malvidin 3RG	Malvidin 3 <i>p</i> CRG	18
Delphinidin 3RG	Delphinidin 3 <i>p</i> CRG	26
Malvidin 3G	Not detected	0
Petunidin 3G	Not detected	0
Delphinidin 3G	Not detected	0

* The acyltransferase activity obtained with malvidin 3RG5G was expressed as 100%.

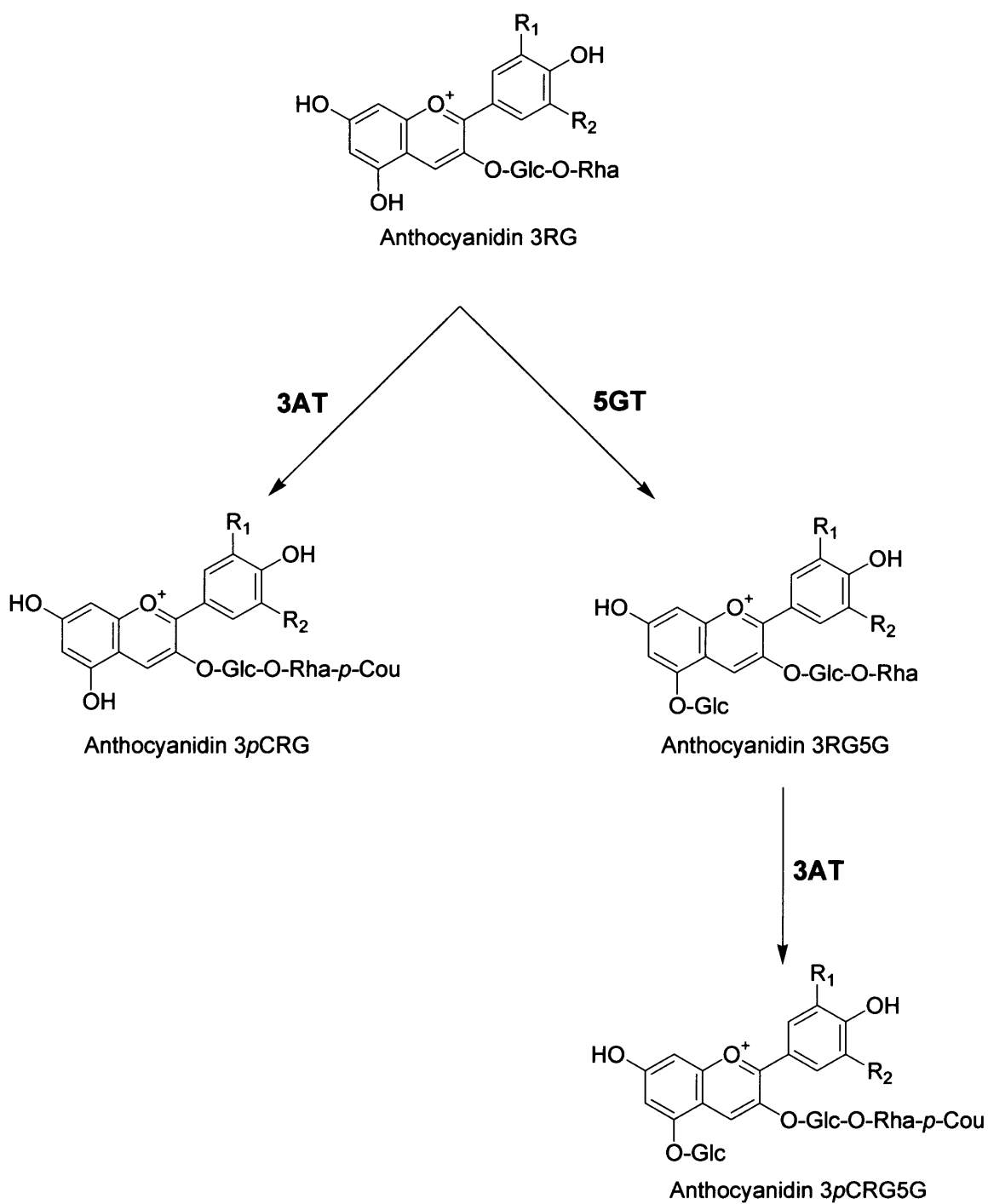


Fig. 3-1. The proposed pathway leading to the formation of end products from anthocyanidin 3RG during anthocyanin biosynthesis in flowers of *I. ensata*.

5GTによって5位がグルコシル化され、続いて3ATによってアシル化されることでもう一つの最終産物であるアントシアニジン 3pCRG5Gになると考えられる。

アントシアニジン 3RG の 5-O-グルコシル化および 3-アシル化の比率について更に調査するため、5GT および 3AT の両方の活性を同時に測定し、その結果を Table 3-6 に示した。p-クマロイル CoA の存在下では 5-O-グルコシル化の値が劇的に減少したが、それでも 3-アシル化の値よりもおよそ4倍も高かった。これらの結果は、ハナショウブにおいて主要アントシアニンの大部分がアントシアニジン 3RG5G の p-クマル酸によるアシル化体か非アシル化体で占められているという第 2 章の結果とも矛盾しなかった。著者の知る限り、ハナショウブにおける 3AT の特性に関する知見は単子葉植物で最初のものである。

Table 3-6. Specific activity of 5GT and 3AT in *I. ensata*

Donor substrate	Specific activity ($10^{-2} \times \text{pkat } \mu\text{g}^{-1}$) (reaction product)		
	Delphinidin 3RG5G	Delphinidin 3pCRG	Delphinidin 3pCRG5G
UDP-glucose	51.8	ND*	ND
<i>p</i> -Coumaroyl CoA	ND	1.5	ND
UDP-glucose and <i>p</i> -coumaroyl CoA	6.9	1.7	0.6

* Not detected.

4. 摘要

ハナショウブのシアニック(有色)系 6 品種およびアシアニック(白色)系 5 品種を植物材料として供試し、各品種の蕾から調製した粗酵素抽出液を用いて 3AT の特性を解明した。得られた結果は次のとおりである。

シアニック品種間において 3AT の活性の強弱と花色との間に明確な関連性は認められなかった。一方、アシアニック 5 品種のうち 2 品種は 3AT 活性に関しても比較的高い値を示した。5GT 同様、3AT もその遺伝子が他のアントシアニン生合成遺伝子とは独立して発現していることが明らかとなった。また、シアニック品種「花籬」から調製した 3AT は *p*-クマロイル CoA からアントシアニジン 3RG 及び 3RG5G への *p*-クマロイル基転移を触媒し、アントシアニジン 3*p*CRG 及び 3*p*CRG5G を生成したが、アントシアニジン 3G をアシル基受容体として利用することはできなかった。5GT と 3AT の基質特異性に基づき、ハナショウブにおけるアントシアニン生合成経路の末端部を提案した。