

すずき ひろ かず

氏 名 鈴木 宏 和
 授 与 学 位 博士 (工学)
 学位授与年月日 平成 16 年 3 月 25 日
 学位授与の根拠法規 学位規則第 4 条第 1 項
 研究科, 専攻の名称 東北大学大学院工学研究科 (博士課程) 生物工学専攻
 学位論文題目 アントシアニン生合成に関与するマロニル基転移酵素の研究
 指 導 教 官 東北大学教授 西野 徳三
 論文審査委員 主査 東北大学教授 西野 徳三 東北大学教授 野澤 庸則
 東北大学教授 熊谷 泉

論 文 内 容 要 旨

アントシアニンは赤色から青色を呈する植物フラボノイド化合物で、その幅広い色彩ならびに抗酸化作用などといった多様な生理活性により、多方面での産業的利用が期待されている。多くのアントシアニンは配糖化さらにはアシル化を受けた形で天然に存在するが、アントシアニンのマロニル化酵素に関してはその実体が長らくの間明らかでなかった。本研究ではアントシアニン生合成に関与するマロニル基転移酵素の生化学的ならびに分子生物化学的研究を行い、またその工学的有用性についての検討も行った。

赤サルビア花卉由来のマロニル基転移酵素

赤サルビア花卉には 1 つの芳香族アシル基と 2 つのマロニル基が結合したアントシアニン (salvianin, 図 1) が蓄積する。本研究では赤サルビア花卉の粗酵素液中に malonyl-CoA と bisdemalonylsalvianin から CoASH と monodemalonylsalvianin を生成する酵素活性 (5MaT1 活性, 図 1) を見出し、本酵素活性の本体 (Ss5MaT1) を各種クロマトグラフィーを用いて均一に精製した。つづいて常法にしたがい本酵素遺伝子をクローニングしたところ、Ss5MaT1 の推定アミノ酸配列は、近年植物を中心として数多く見出されている一群のアシル基転移酵素 (versatile acyltransferase, VAT) のものと 20% 程度の配列同一性を示し、また VAT に特徴的な 2 つの高度保存配列 (HXXXD, motif 1 ; DFGWG, motif 3) を含んでいたことから、Ss5MaT1 もまた VAT ファミリーの一員であると考察した。また既知のアントシアニン-アシル基転移酵素 (AAT) には AAT 特異的に出現する第 3 の保存配列 (YFGNC, motif 2) が見い出された。VAT は現在知られているものだけでもアントシアニン、ファイトアレキシン、タキソール、花の芳香成分、果実の風味成分、およびモルヒネなどといった植物二次代謝を中心とした幅広い生合成に関与して

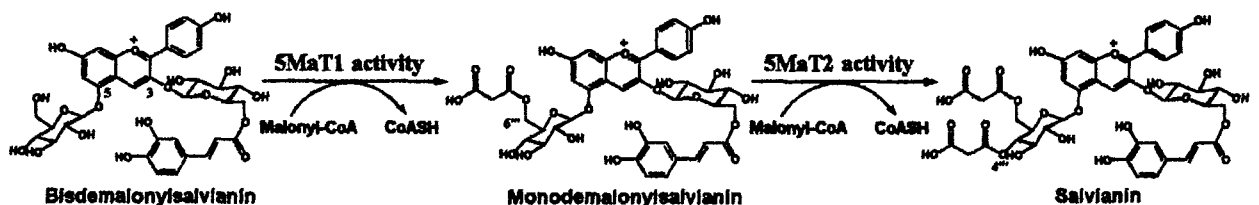


図 1 赤サルビア花卉の粗酵素液に見出された 5MaT1 活性および 5MaT2 活性

おり、またシロイヌナズナのゲノム中には VAT 遺伝子が 70 個以上も見出されていることから、本酵素ファミリーは多彩な生理的意義を担う大きなファミリーであると考えられる。VAT ファミリーの系統樹解析の結果から VAT ファミリー中において AAT は近縁関係にあり、これら AAT はおそらくサブファミリーに分類できるものと考察した。また酵素反応速度論解析の結果、Ss5MaT1 反応は malonyl-CoA を第 1 結合基質、shisoicinn を第 2 結合基質、malonylshisonin を第 1 解離生成物、そして CoASH を第 2 解離生成物とした Ordered Bi Bi 機構 (図 2 a) で進行することが強く示唆された。そしてアラニン-スキャンニング変異導入解析ならびに pH 依存的な速度論解析の結果から、本酵素の触媒機構には motif 1 中のヒスチジン残基が関与するものと考察した (図 2 b)。

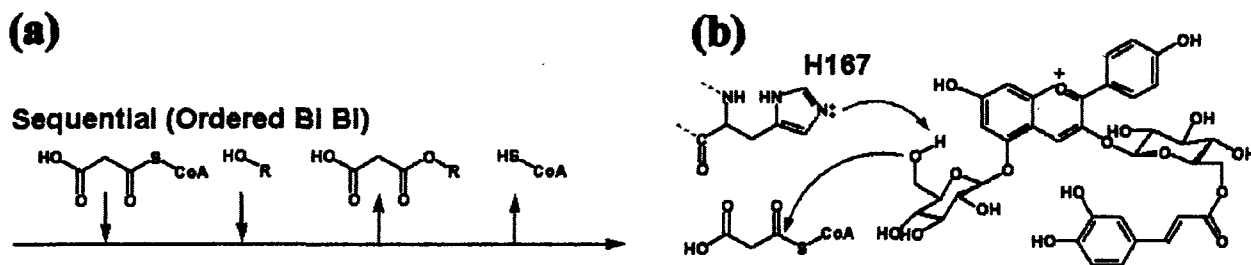


図 2 Ss5MaT1 反応の推定反応機構(a)および推定触媒機構(b)

AAT 遺伝子の網羅的クローニング

アントシアニンのアシル化は植物種により様々であるが、重要なことにアシル化がアントシアニンに及ぼす利点は、アシル基の種類、数、および位置によって変化する。このことから、自然界に存在するであろう新規な基質特異性をもつ AAT の遺伝子を幅広く取得することは、アントシアニンの産業的利用において有用と考えられる。しかしながら植物組織から AAT を単離してそのアミノ酸配列を解析することは容易ではなく、また基質特異性の異なる AAT の配列同一性は低かったことから新規な基質特異性をもつ AAT の遺伝子を配列相同性にもとづいた手法によりクローニングすることは非常に困難であると考えられる。そこで本研究では motif 2 および motif 3 を用いた縮重 PCR 法に基づいた網羅的 AAT 遺伝子クローニング法 (図 3) を設計し、本方法を用いて新規な基質特異性および位置選択性を有する AAT (Dv3MaT, Sc3MaT, Dm3MaT1, Dm3MaT2; 図 4)、さらにフラボノール配糖体ならびにイソフラボン配糖体といったアントシアニン以外のフラボノイド配糖体に対して高い特異性を示すマロニル基転移酵素 (Lp3MaT1, Vh3MaT2, Vh3MaT2, Gm7MaT1, Gm7MaT2; 図 4) の遺伝子を取得した。VAT ファミリーの系統樹解析 (図 5) では本酵素群はいずれも近縁関係にあり、本酵素群は motif 2 を共有しながら VAT ファミリーの中でフラボノイド配糖体アシル基転移酵素サブファミリーを形成しているものと考察した。本酵素遺伝子群は大腸菌、酵母および異種植物中において機能的に発現し、取得した遺伝子はフラボノイド化合物の産業的利用において重要な役割を果たすものと考察した。

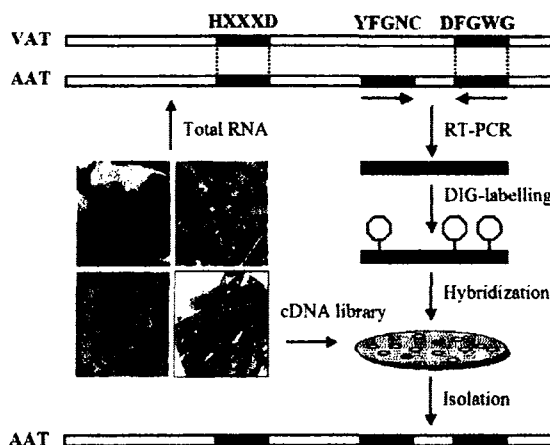


図 3 AAT 遺伝子の網羅的クローニング法

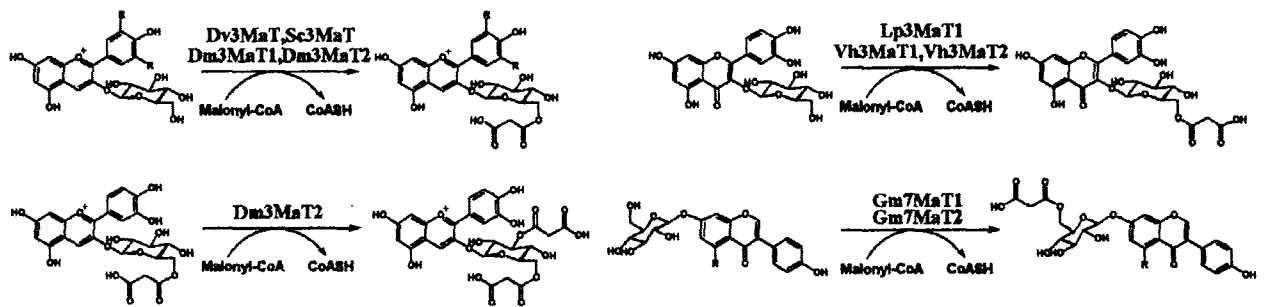


図4 AAT遺伝子の網羅的クローニング法を用いてその遺伝子を単離したフラボノイド配糖体アシル基転移酵素 (R = -H or -OH)

系統学的に離れたマロニル基転移酵素

本研究では salviainin 生合成の最終段階が 5MaT2 活性 (図 1) により触媒されることを見出した。本酵素活性の本体 (Ss5MaT2) の遺伝子は、遺伝子の配列相同性に基づいたいかなる手法を用いても単離することができず、そこで赤サルビア花卉の粗酵素液から Ss5MaT2 を精製することで本酵素遺伝子のクローニングを行った。Ss5MaT2 の推定アミノ酸配列中には VAT ファミリーの 2 つの高度保存配列 (motif 1 および motif 3) が見出され、本酵素もまた VAT ファミリーの一員であることが示唆されたが、本配列は Ss5MaT1 のものと 24% の配列同一性しか示さず、他のフラボノイド配糖体アシル基転移酵素に対する配列同一性も著しく低いものであった (21-25%)。

その一方で BEAT (acetyl-CoA:benzylalcohol acetyltransferase) に対し最大の配列同一性 (31%) を示し、さらにその配列中には VAT ファミリーのうちのフラボノイド配糖体アシル基転移酵素サブファミリー特異的に見出される第 3 の保存配列 (motif 2) も見出されなかった。VAT ファミリーの系統樹解析 (図 5) からフラボノイド配糖体アシル基転移酵素サブファミリー内のタンパク質はおおよそ近縁のタンパク質から派生してきたと考えられるが、その一方で Ss5MaT2 は BEAT 様タンパク質から AAT 活性を獲得した、すなわち平行進化してきたタンパク質であるものと考えられる。

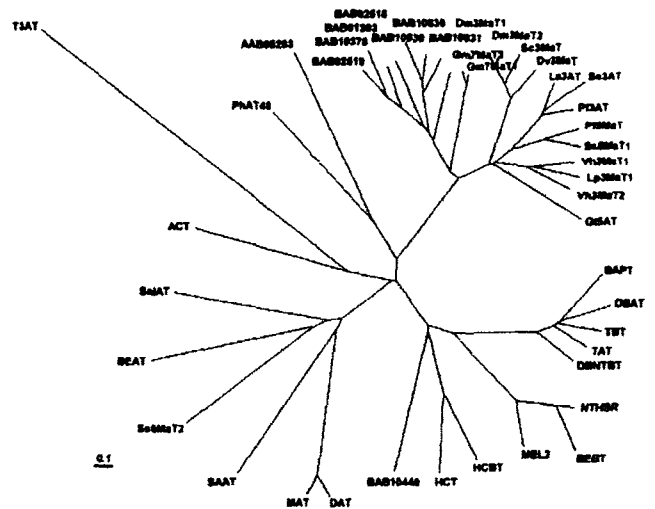


図5 VATファミリーの系統樹解析

アントシアニンのマロニル化

アントシアニンのマロニル化は *in vitro* および *in vivo* いずれにおいてもアントシアニンの色彩に影響を与えない一方で、アントシアニンの構造や呈色を顕著に安定化する効果が見出され、アントシアニンのマロニル化の生物学的意義の裏付けが得られた。昆虫は赤色をよく認識し鳥類は青色をよく認識することから、原始的な植物は花色としてまず赤色を獲得したと考えられており、よってマロニル基転移酵素も植物進化過程の比較的初期においてアントシアニンの赤色呈色の安定化のために獲得されたものと考えられる。またマロニル化はアントシアニンの水溶性を増加させ、さらにその構造安定化効果からフラボノイド化合

物の薬物動態に影響を与えることが示唆されていることから、フラボノイド化合物の染料利用のみならず医薬利用においてもマロニル基転移酵素は重要な役割を果たすものと考察した。

新規な基質特異性を有するアントシアニン-アシル基転移酵素の創出

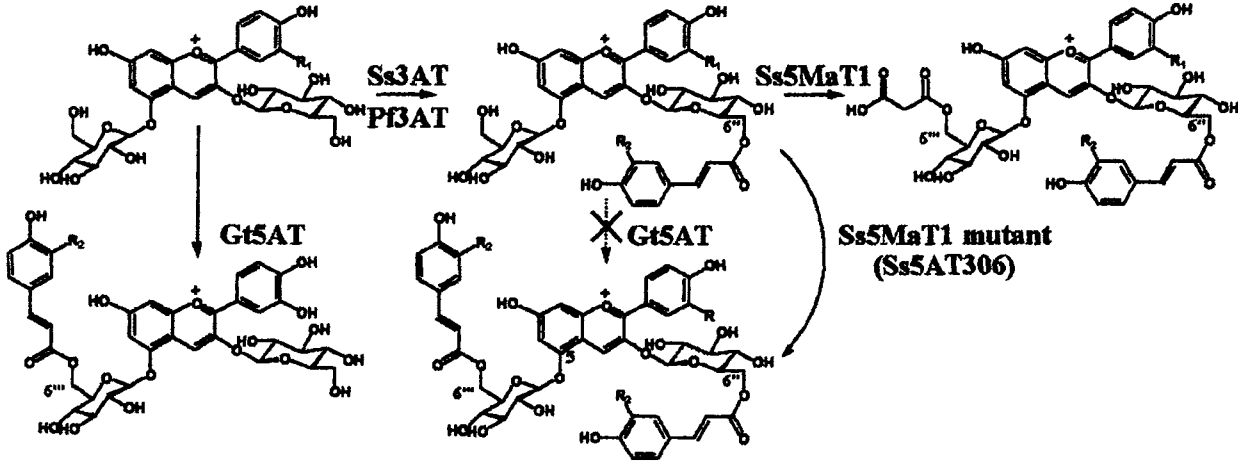


図6 既知の芳香族アシル基転移酵素 (Gt5AT, Ss3AT, Pf3AT) ならびに Ss5AT306 が触媒するアントシアニンの芳香族アシル化反応 ($R_1 = -H$ or $-OH$; $R_2 = -H$ or $-OH$)

マロニル化と異なり、アントシアニンの芳香族アシル化はアントシアニンをより青色にすることが知られている。このことから芳香族アシル基転移酵素は遺伝子工学的な花色改変に有効と考えられているが、現在のところ 2 種類の芳香族アシル基転移酵素遺伝子 (6''位 hydroxycinnamyl 基転移酵素: Gt5AT; 6'位 hydroxycinnamoyl 基転移酵素: Ss3AT, Pf3AT; 図6) しか報告されておらず、2 個以上の芳香族アシル基がついたアントシアニンの遺伝子工学的生合成経路は確立されていない。そこで本研究では Ss5MaT1 の malonyl-CoA 特異性を改変することで hydroxycinnamoyl-CoA を基質とし得る Ss5MaT1 部位特異的置換体 (Ss5AT306, 図6) を作製した。本酵素はアントシアニンに 2 つ目の芳香族アシル基を転移できる点で新規で、6''位 hydroxycinnamyl 基転移酵素との共同により、アントシアニンの di-hydroxycinnamyl 化を直列反応したがついて安定に触媒できるものと考えられる。本酵素反応のアントシアニン生成物は天然には見出されていない構造をもったアントシアニンで、そのアントシアニン基質と比較すると、極大吸収波長が広域 pH 範囲 (pH 1-9) において平均的に 5 nm ほど長波長側へ移動しており、さらにモル吸光係数の増加 (図7) ならびにコピグメント効果の増強も観測された。以上の結果から本酵素遺伝子は遺伝子工学的な花色改変に有効であるものと考察した。

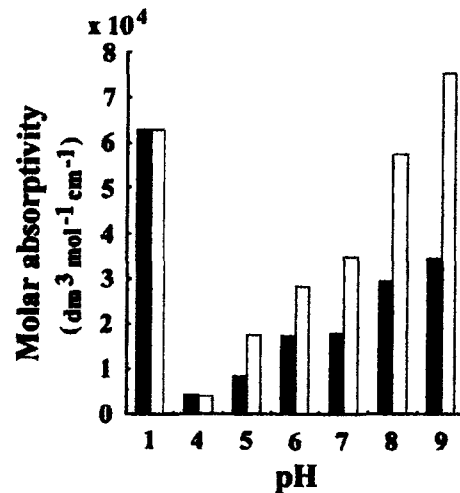


図7 Ss5AT306 反応のアントシアニン生成物 (白; $R_1 = -OH$, $R_2 = -H$) およびそのアントシアニン基質 (黒) のモル吸光係数の比較 ($R_1 = -H$ or $-OH$; $R_2 = -H$ or $-OH$)

論文審査結果の要旨

アントシアニンは赤色から青色を呈する植物フラボノイド化合物で、その幅広い色彩ならびに抗酸化作用などといった多様な生理活性により、多方面での産業的利用が期待されている。著者は、その実体が長らくの間明らかでなかったアントシアニン生成に関与するマロニル基転移酵素に注目し、様々な基質特異性および位置選択性を示すマロニル基転移酵素の遺伝子塩基配列、一次構造、諸性質、生理的意義、触媒重要残基、触媒機構、および基質結合領域などを明らかにした。また、マロニル基転移酵素のアシル-CoA 基質特異性をタンパク質工学的に改変し、新規な基質特異性を有するアントシアニン-アシル基転移酵素を創出した。本論文は、以上の研究成果についてまとめたもので、全文 12 章から構成される。

第 1 章は序論であり、本研究の背景および目的を述べている。

第 2 章では、最初にその遺伝子が特定された赤サルビア花卉由来のアントシアニン-6th位マロニル基転移酵素に関する知見を記述している。

第 3 章では、赤シソ葉由来のアントシアニン-6th位マロニル基転移酵素に関する知見を記述している。

第 4 章では、赤ダリア花卉由来のアントシアニン-6th位マロニル基転移酵素に関する知見、ならびにアントシアニンのマロニル化の生理的意義およびその有効性に関する知見を記述している。

第 5 章では、青サイネリア花卉由来のアントシアニン-6th位マロニル基転移酵素に関する知見を記述している。

第 6 章では、様々なアントシアニン-アシル基転移酵素遺伝子群をハイスループットにクローニングする方法を提案し、本方法を用いて西洋キク花卉由来のアントシアニン-6th位マロニル基転移酵素ならびにアントシアニン-3th位マロニル基転移酵素の遺伝子をクローニングしている。また、それらに関する酵素学的知見ならびに本酵素群の基質特異性を決定する重要アミノ酸残基に関する知見を記述している。

第 7 章では、ヒメオドリコソウ花卉ならびにバーベナ花卉由来のフラボノール配糖体特異的 6th位マロニル基転移酵素に関する知見を記述している。

第 8 章では、大豆根由来のイソフラボン配糖体に特異的な 6th位マロニル基転移酵素に関する知見を記述している。

第 9 章では、赤サルビア花卉由来のアントシアニン-4th位マロニル基転移酵素に関する知見を記述している。そして本酵素群の分子進化に関する考察を行っている。

第 10 章では、赤サルビア花卉由来のアントシアニン-6th位マロニル基転移酵素の酵素反応メカニズムに関する知見を記述している。

第 11 章では、赤サルビア花卉由来のアントシアニン-6th位マロニル基転移酵素のアシル-CoA 基質特異性を改変した新規アシル基転移酵素に関する知見、ならびに本酵素が生成する人工的アントシアニンに関する知見を記述している。

第 12 章では、本論文を総括している。

以上要するに、本論文はアントシアニンおよびその他フラボノイド化合物のマロニル化酵素の遺伝子を幅広く取得し、それらに関する様々な諸特性を明らかにしたものである。アントシアニンのマロニル化の有効性から、本酵素群はアントシアニンの産業的利用に大きく寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。