

バクテリアの酵素遺伝子を利用した植物のリグ ナン生合成の改変に関する研究

Study of modification of lignan biosynthesis in plants
by use of the bacterial enzyme gene.

2015.3

東京農工大学大学院
生物システム応用科学府
生物システム応用科学専攻
田村尚之

目次

略称	5
序文	6
序文 図表	9
1.1 緒言	11
1.2 材料、および方法	15
1.2.1 植物発現用ベクターpBF2: <i>mpinZ</i> の作出	15
1.2.1.1 ヒートショック法による大腸菌の形質転換	
1.2.1.2 大腸菌からのプラスミド DNA の回収	
1.2.1.3 フェノール・クロロホルム抽出を用いたタンパク質の除去	
1.2.1.4 イソプロパノール沈殿によるプラスミド DNA の回収	
1.2.1.5 プラスミド DNA の制限酵素処理	
1.2.1.6 電気泳動・ゲル切り出しによる <i>pinZ</i> およびプラスミドベクター断片の回収	
1.2.1.7 ホストベクターの制限酵素処理と脱リン酸化処理	
1.2.1.8 脱リン酸化処理したホストベクターと <i>pinZ</i> のライゲーション	
1.2.1.9 ライゲーション反応液を用いた大腸菌の形質転換	
1.2.1.10 ラピッドチェックによる形質転換菌の選抜	
1.2.1.11 コロニーPCR による形質転換菌の選抜	
1.2.1.12 ライゲーションしたプラスミドベクターの確認	
1.2.2 <i>mpinZ</i> 組換え BY-2 細胞、 <i>mpinZ</i> 遺伝子組換えシロイヌナズナの作出	21
1.2.2.1 アグロバクテリウム LBA4404 株のコンピテントセルの作製	
1.2.2.2 エレクトロポレーション法による LBA4404 株へのバイナリーベクターの導入	
1.2.2.3 コロニーPCR によるプラスミド DNA 導入の確認	
1.2.2.4 pBF2: <i>mpinZ</i> 導入アグロバクテリウムを用いた <i>Nicotiana tabacum</i> cv. Bright Yellow-2 (BY-2) の形質転換	
1.2.2.5 組換え <i>mpinZ</i> 遺伝子を導入した組換えシロイヌナズナ (<i>mpinZ</i> 組換え個体) の作出	
1.2.2.6 <i>mpinZ</i> 組換え個体 T1 種子の播種	
1.2.2.7 <i>mpinZ</i> 組換え個体 T2 種子の播種及び同 T3 種子を用いた後代検定法によるホモラインの選抜	
1.2.3 <i>mpinZ</i> 組換えシロイヌナズナからの cDNA の調製及び半定量的 RT-PCR に	

による発現量の解析	26
1.2.3.1 全 RNA の抽出	
1.2.3.2 塩化リチウムを用いた RNA ペレットからの不純物の除去	
1.2.3.3 全 RNA からの cDNA の合成	
1.2.3.4 半定量的 RT-PCR による遺伝子の増幅	
1.2.3.5 トランスクリプトーム解析による全 RNA の解析	
1.2.4 <i>mpinZ</i> 組換えシロイヌナズナのトランスクリプトーム解析	29
1.2.5 大腸菌、BY-2 細胞、シロイヌナズナからの粗酵素液の抽出	30
1.2.5.1 大腸菌からの粗酵素液の調製	
1.2.5.2 Brad-Ford 法を用いたタンパク質の定量	
1.2.5.3 BY-2 細胞からの粗酵素抽出	
1.2.5.4 <i>pinZ</i> 組換えシロイヌナズナからの粗酵素抽出	
1.2.5.5 SYK-6 株由来の PinZ の His-tag 精製	
1.2.6 免疫染色による PinZ の検出	32
1.2.6.1 SDS-PAGE	
1.2.6.2 ウェスタンブロットティング	
1.2.6.3 一次抗体と二次抗体の結合処理	
1.2.6.4 蛍光反応液の調製	
1.2.7 HPLC 分析による PinZ 活性の検出	34
1.2.7.1 BY-2 から抽出した粗酵素を用いた反応液の調製と分析試料の作製	
1.2.7.2 HPLC-DAD 分析による反応液の解析	
1.2.7.3 <i>mpinZ</i> 組換えシロイヌナズナ粗酵素反応液の調製と分析試料の作成	
1.2.8 粗酵素反応液に含まれる分子種の LC-MS による同定	36
1.2.8.1 UPLC-MS による粗酵素反応物に含まれる分子種の同定	
1.2.9 四重極タンデム UPLC-MS/MS 分析によるリグナンの定量	37
1.2.9.1 四重極タンデム UPLC-MS/MS 分析によるリグナンの定量	
1.2.10 野生型系統および <i>mpinZ</i> 組換えシロイヌナズナのメタボローム解析	39
1.2.10.1 試料液の調製	
1.2.11 PinZ の光学異性体に対する基質特異性の解析	40
1.2.11.1 試料液の調製	
1.2.11.2 順相 HPLC の構成	
1.3 結果および考察	41
1.3.1 コドン使用頻度に基づいて <i>pinZ</i> のコドンを改変した <i>mpinZ</i> の構築と合成	41
1.3.2 <i>mpinZ</i> 組換え BY-2 細胞の作出と PinZ 活性の検出	42
1.3.3 <i>mpinZ</i> 組換え BY-2 細胞の LC-MS 分析による分子種の同定	43

1.3.4	<i>mpinZ</i> をホモ接合で有する組換えシロイヌナズナの作出	44
1.3.5	<i>mpinZ</i> 組換えシロイヌナズナの半定量的 RT-PCR	45
1.3.6	免疫染色による <i>mpinZ</i> 組換えシロイヌナズナからの PinZ の検出	47
1.3.7	<i>mpinZ</i> 組換えシロイヌナズナの見た目の表現型の解析	48
1.3.8	<i>mpinZ</i> 組換えシロイヌナズナの PinZ 活性の定量	49
1.3.9	シロイヌナズナ粗酵素反応液に含まれる分子種の LC-MS による同定	50
1.3.10	PinZ の光学異性体に対する基質特異性の解析	51
1.3.11	<i>mpinZ</i> 組換えシロイヌナズナに含まれるリグナンの定量	53
1.3.12	<i>mpinZ</i> 組換えシロイヌナズナのトランスクリプトーム解析	54
1.3.13	リグナン生合成経路に関わる他の分子種の組成変化の探索	55
1.4	図表	56
	結言	85
	参考文献	86
	謝辞	

略称

<i>Sphigobium paucimobilis</i> SYK-6	SYK-6
Pinoresinol reductase from SYK-6	PinZ
Codon modified pinoresinol reductase	mPinZ
Kanamycin	Kan
Streptomycin	Str
Ampicilin	Amp
Pinoresinol	Pin or PR
Lariciresinol	Lar or LR
Secoisolariciresiol	Seco
Epipinoresinol	Epi
Pinoresinol mono-glucoside	Pin-Glc
Lariciresinol mono-glucoside	Lar-Glc
<i>Nicotiana tabacum</i> Blight Yellow-2	BY-2
<i>Arabidopsis thaliana</i>	At or Ara
Pinoresinol reductase 1	PrR1
Pinoresinol reductase 2	PrR2
<i>Actin 2</i>	<i>Act2</i>
Murashige-Skoog	MS
Wild-type plant	Wt or Wild or Wild type

序文

自然界には多様な生育環境に適応した、多様な微生物が存在している。それぞれの環境下において存在する有機物および無機物や、共存する生物の代謝産物を代謝・分解し、資化できるように変異した菌が生き残り、生育してきた。

進化の過程でシダ植物や樹木・草本類は、地球の重力への抵抗、微生物、動物などからの傷害などのストレスへの抵抗や垂直・水平方向への肥大成長を促進するために、二次細胞壁を発達させてきた[1]。植物の二次細胞壁は、主にセルロース・ヘミセルロースなどの多糖繊維と、リグニンと呼ばれる、芳香族化合物の重合体によって構成される[2]。

自然界には、リグニンの部分構造を有した低分子（一般には、分子量数百程度）の芳香族化合物を唯一の炭素源として生育できるバクテリアがあり、古くからその存在が指摘され、研究が進められてきた[3]。近年では 19 種類以上のバクテリアがリグニンに構造が良く似た低分子の芳香族化合物を代謝することが報告されている[4]。

α -プロテオバクテリアに属する *Sphingobium paucimobilis* SYK-6 株(以下、SYK-6 株)は、パルプ廃液から発見された菌であり、多数の低分子芳香族化合物を唯一の炭素源として生育が可能である[5]。この SYK-6 株からは、低分子芳香族化合物の代謝に関わる酵素の遺伝子が多数単離され、現在までに 20 以上が報告されている。

SYK-6 株から単離された低分子芳香族化合物の代謝に関わる遺伝子の一つである *pinZ* は、ピノレジノールとラリシレジノールを各々ラリシレジノールとセコイソラリシレジノールへと、またシリングレジノールを 5-5'ジメトキシラリシレジノールへと還元的に変換する酵素 PinZ をコードしている(Fig.1)。同様の反応を触媒する酵素の遺伝子は、*Novosphingobium aromaticivorans* DSM 1244 から単離されている[6]。

一方、植物に含まれる二次代謝物のうち、ヒドロキシケイ皮酸類やヒドロキシケイ皮アルコール類が植物細胞質中で 8-8'炭素間結合によって結合した 2 量体とその類縁化合物をリグナンと総称する[7](Fig. 2)。リグナンはピノレジノールを起点として、順次ラリシレジノール、セコイソラリシレジノールなどを經由するリグナン生合成経路によって代謝されることで多様な分子種を生成する。リグナンには抗酸化活性や抗ウイルス活性を有する化合物が多く含まれており、抗ガン剤の原料や健康食品の成分としても利用されている[2,8,9]。これまでに植物からピノレジノール及びラリシレジノールを変換する酵素遺伝子は多数単離されているものの、微生物から同様の機能を有する酵素の遺伝子が単離されたのは前述の *pinZ* が初の事例である[3,4,6]。

SYK-6 株の PinZ は、多くの植物が持つピノレジノールレダクターゼ (PrR) やピノレジノール-ラリシレジノールレダクターゼ (PLR) と同様に、ピノレジノールのフロフラン環を還元開裂する酵素である。また、PinZ はこれまでに報告されている植物由来のピノレジノールレダクターゼよりも比活性が高く、近年シロイヌナズナから精製されたピノレジノールレダクターゼと比較すると、約 1,500 倍以上の比活性を有している[6, 10]。

本研究では、上述の強力な比活性を有する **PinZ** をコードする遺伝子 *pinZ* を遺伝子工学的な手法により植物細胞内で発現させ、植物中に含まれるリグナンの質的量的変化を試みた。

序文 図表

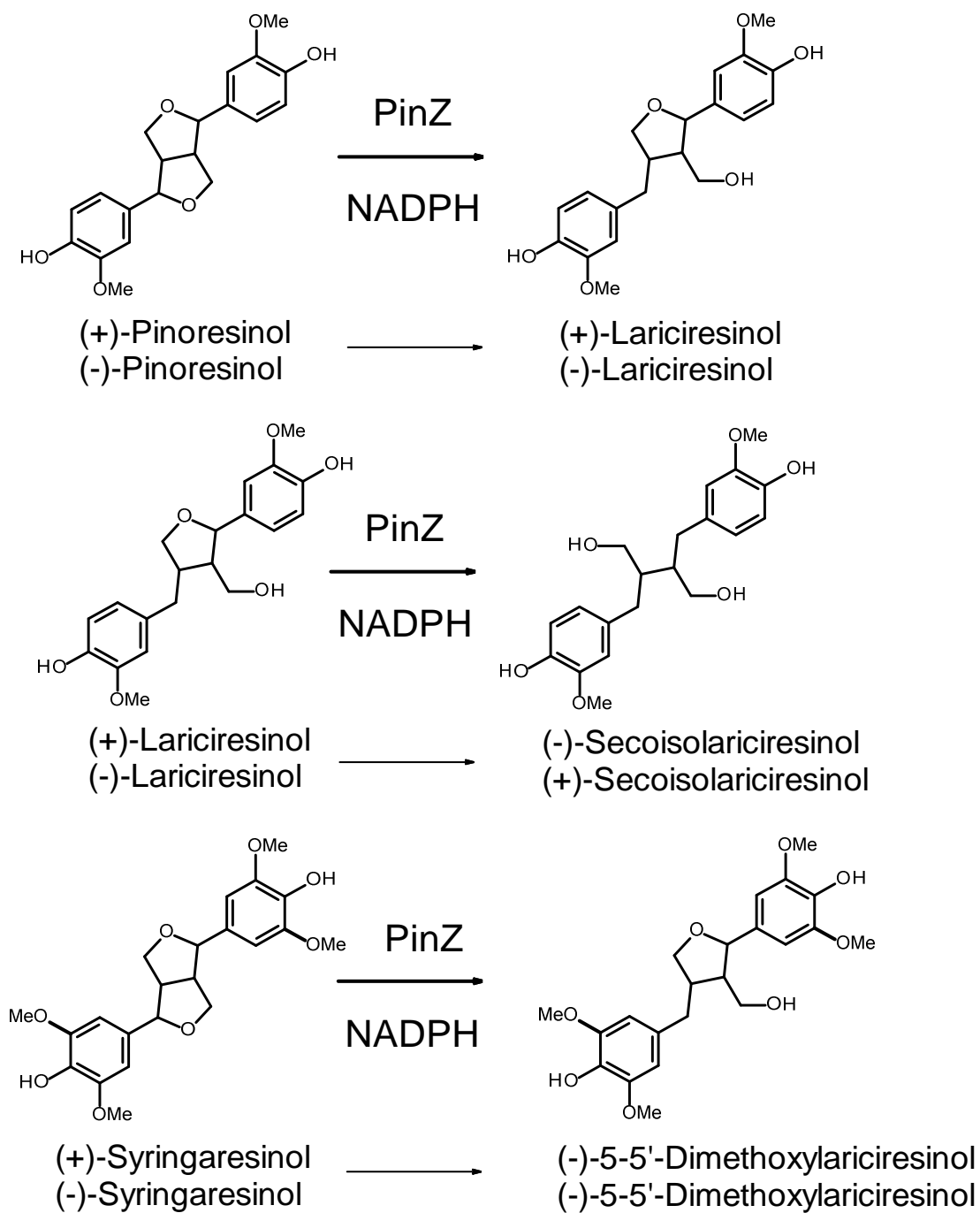


Figure 1 Catalytic activities of PinZ from SYK-6.

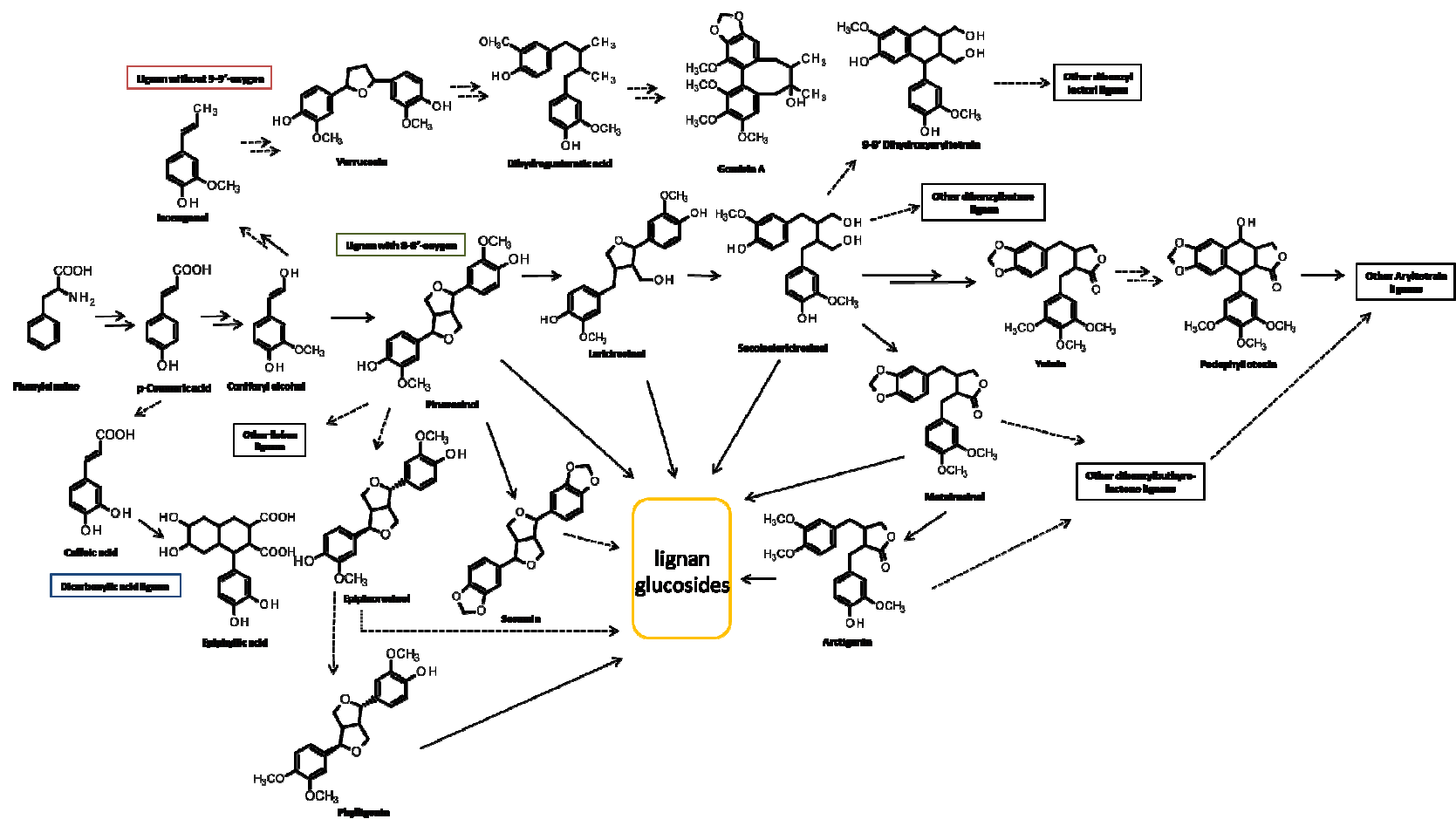


Figure 2 Main lignan biosynthetic pathway

Solid arrows represent pathways substantiated by experiments.

Broken arrows represent pathways assumed based on comparison of chemical structures.

1.1 緒言

植物から溶媒により抽出される成分には、薬効や毒性を示す成分が存在し、古来より薬・毒として用いられてきた。近年ではこの植物の抽出成分に含まれる多種多様な化合物を同定・単離し、生理活性作用や有用性の研究が進められている[2,8]。植物によって抽出成分の存在や化合物の種類、蓄積量は大きく異なり、その植物の性質を特徴づける成分として捉えることもできる。抽出成分のうちフェニルアラニンを出発基質とした分子種は、**general phenylpropanoid pathway** を経由して生成される。**general phenylpropanoid pathway** から分岐したモノリグノール生合成経路を経由する抽出成分は、*p*-クマリルアルコール、コニフェリルアルコール、シナピルアルコールなどのモノリグノール、**general phenylpropanoid pathway** 中の中間生成物や、中間生成物から生合成されるクマリン、リグナン、ノルリグナン、フラボノイドやアントシアニンなどが存在する(Fig.1-1)。これらは分子の結合様式によってそれぞれの分子種群に分類される。また、これらの分子種群はそれぞれ生合成経路が存在し、更に変換されて多様な種類の分子種が生成される[11]。

リグナンは、**general phenylpropanoid pathway** 中から生成されるモノリグノールやケイ皮アルコールおよびケイ皮酸類などが、ラッカーゼやペルオキシダーゼによってラジカル化され、8-8炭素間で結合した二量体の総称である(Fig.1-2)。リグナンは重合する際に分子の立体構造を制御するディリジェントプロテインが関与し、光学的に活性である[2]。また、生成したリグナンは、更に別の酵素によって変換され、フロフラン、フラン、ジベンジルブチロラクトン、ジベンジルブチロラクトール、ジベンゾイルブタン、アリルテトライン、アリルナフタレン、ジベンゾシクロオクタジエンなどの構造を持つ、多様な分子種が生成する(Fig.1-3)。リグナンは植物種や植物中の組織間でも蓄積量や組成が大きく異なっている[12,13]。また、Deyama らの論文では、196種類ものリグナンの分子種が紹介され、それらの生理活性作用について報告がなされているが、これらの分子種の配糖体や、光学異性体などが存在するため、非常に多様で多くの分子種があることが推測される[8]。近日も新しいリグナンや新たな植物種からリグナンが単離されているが、それらがどのような生合成経路を経由して生成しているかは、未知な部分も多い[7]。またリグナンが植物細胞中で生理的にどのような役割を有しているか、その本質的な理解には至っていない。一つの推測であるがリグナンには抗酸化活性、抗真菌活性、抗ウイルス活性などを示す分子種が存在する[14]。また、真菌の破砕液を添加した培地で亜麻を培養するとピノレジノールレダクターゼの発現量が増加することや、亜麻の種子においてピノレジノール・ラリシレジノールレダクターゼ遺伝子上流にある非翻訳配列には環境ストレスにตอบสนองして生成されるアブシシン酸のシスエレメントは存在することから、リグナンは外的ストレスに対して抵抗する役割を担っている可能性が考えられる[15,16]。

Deyama によると、リグナンはその構造の違いに応じて、抗酸化活性、抗腫瘍活性、抗ウイルス活性、c-AMP の抑制、肝臓の保護など、多様な活性を有している[8]。ほとんどのリグナンからは何らかの薬理作用が報告されているが、優れた薬理作用を有するリグナンの分子種を精製し、抗ガン剤の半合成の原料として、または健康食品の成分として用いられているものも存在する。例えば、メギ科に属するポドフィルム (*Podophyllum peltatum*) の根および茎根には、ポドフィロトキシンが含まれており、米国では寫下剤として用いられている[4]。また、ポドフィロトキシンから誘導されるエトポシドやテニポシドやエトホポスなどは、抗ウイルス活性や抗リウマチ活性、抗腫瘍活性などを示し、抗ガン剤や抗ウイルス剤としても用いられている[4]。更に、ゴマ (*Sesamum indicum*) の種子に豊富に含まれるセサミンは、抗酸化活性、抗高血圧作用があり、近年は日本でも健康食品の主成分として注目を集めている[31]。セサミンに構造が類似しているフロフラン、フラン、ジベンジルブチロラクトン、ジベンジルブチロラクトールは人に摂取された際、腸内の細菌叢によってエンテロラクトン、エンテロラクトールと呼ばれる哺乳類リグナンへと還元される[17]。哺乳類リグナンもまた抗酸化作用や女性ホルモン様の生理活性作用を有しており、抗ガン作用や高血圧の防止、血管系の疾病に効果を示すことが示唆されている[8]。

上述のようにリグナンはそれを生産する植物自体に対して、また摂取するヒトに対して非常に有用な生理活性が多く存在しているが、植物種や組織に応じて含有量や組成が異なるため、目的の分子種だけを回収するためには、それを有する植物を収穫し、精製しなくてはならない[12, 13]。また、植物内の含有量が少なければ、それだけ多くの植物を回収する必要がある。更に、近年の健康食品や医薬品需要の増加によって、高含有植物の乱獲や価格高騰も懸念される。いくつかの分子種においては、全合成法も確立されているが、不斉炭素原子を有し、複雑な構造を有するリグナンは合成するには、多くの段階を踏む必要がある[9,20,21]。そのため、現在、産業として利用されているリグナンや改変リグナンは植物から直接抽出されたものか、リグナンから半合成によって調製されている物がほとんどである[22, 23]。

これらの問題を解決するための一つの方法として、遺伝子工学的手法を用いた、リグナン生合成経路の改変が検討されている。植物種によってリグナン生合成経路は差違が見られるが、外来遺伝子の導入により特定の分子種までの生合成経路を新たに植物内に構築したり、一部の反応段階を強化したりすることで、目的のリグナンを増産する試みがなされている。例を挙げるとリグナン生合成経路で働く酵素の中で最も良く研究されているのは、リグナン生合成経路の最上流に位置する、ピノレジノールをラリシレジノールへ変換する酵素(EC 1.23.1.1)、即ちピノレジノールレダクターゼ (PrR)、或いはピノレジノール-ラリシレジノールレダクターゼ (PLR) である[24-27]。これらの酵素は、リグナン生合成の量的制御に関わる重要な酵素であるとされ、既に複数の植物種でこれらの酵素をコードする遺伝子やその cDNA が単離されている。PrR、PLR と異なる

る呼称が付けられてはいるのは、これらの基質特異性の違いを反映した呼び名であるため、前者はピノレジノールを、後者はピノレジノールとその還元生成物であるラリシレジノールを基質とし、NADPH の存在下で各々を還元する類似した酵素である。1993年にはレンギョウ(*Forsythia intermedia*)から PLR が単離・精製され、立体特異的な基質認識をする酵素であることが示された[19]。また、1996年には同種から PLR をコードする遺伝子も単離されている[26]。この他、ベイスギ、ポプラ、シロイヌナズナ、ポテト、タバコなど、現在では 50 種以上の植物から PLR の遺伝子や cDNA が単離されている[28]。これまでに植物から精製された PLR や単離された遺伝子や cDNA に由来する組換え PLR や PrR の基質特異性を評価した多くの実験結果から、既知の PLR や PrR のほとんどは、ピノレジノールやラリシレジノールに存在する 2 つのエナンチオマー(+体と-体)のいずれかに対して、より強い基質特性を示すことが分かっている[19]。しかしながら PLR や PrR が示すこのエナンチオ選択性が、植物生理学的に何を意味するのかは未知であり、研究が進められている。

PLR についても、その強制発現や発現促進によってリグニン蓄積を変化させる試みがいくつか報告されている。例えば、レンギョウ(*Forsythia intermedia*)の PLR 遺伝子を小麦で強制発現させると、セコイソラリシレシノールの蓄積量が増加する[29]。また、亜麻(*Linum usitatissimum*)の PLR 遺伝子をトウダイグサ(*Phyllanthus amarus*)に導入して高発現させると、代謝経路の下流に存在するフィランチンの蓄積量が僅かに増加する[30]。更に、朝鮮レンギョウ(*Forsythia koreana*)の培養細胞で PLR 遺伝子を発現抑制させると、ピノレシノールの配糖体の蓄積量が 20 倍以上に増加し、代謝経路の下流に位置するリグナンの減少が見られている[31]。これらに加えて、朝鮮レンギョウの培養細胞において、PLR 遺伝子を発現抑制させ、更にゴマ(*Sesamum indicum*)から単離されたピペリトール-セサミン合成酵素(CYP81Q1)の cDNA を導入して高発現させると、野生型では生産しないセサミンが合成される。これらの結果から、リグナン生合成経路の人為的な改変により、特定のリグナンの生成を変化させることが可能であることがわかる[31]。また、これまでの報告から、リグナン生合成経路の最も上流に位置する酵素の一つである、ピノレジノールレダクターゼの活性は、下流の位置する分子種の蓄積量や組成に大きな影響を与えることが推測される。

本研究では先に述べたバクテリア SYK-6 株から単離された、PrR 遺伝子産物を植物の細胞質中に蓄積させ、組換え植物でのリグナンの蓄積量および組成の改変を試みた。SYK-6 株由来の PrR である PinZ は、植物に由来する PrR や PLR と比較して、ピノレジノールに対する非常に高い還元活性(比活性)を有している。福原らによると、大腸菌中で生産させた組換え PinZ と、シロイヌナズナから cDNA を単離・同定し、大腸菌で生産させた組換え AtPrR1 を比較すると、PinZ は約 1,500 倍の高いピノレジノール還元活性を有していた[6]。この非常に高い活性を有している PinZ は、これまで利用されてきた植物由来のピノレジノールレダクターゼ以上に、リグナン生合成経路の人為

的改変において有用であると考えられる。また、従来は植物の遺伝子を用いてリグナン代謝の改変が試みられてきたが、本研究では遺伝子の出所を植物以外の生物に求めたところも、今後の研究の展開を考える上では重要な点である。Butt らによりリグナン変換能を有する細菌は既に 20 種以上単離されており[32]、これらの微生物の比活性が解明されることで、今後さらに有用な酵素遺伝子が単離される可能性がある。

上記のような背景の下、本研究では PinZ をコードする *pinZ* 遺伝子を用いて、植物中のリグナン生合成経路を改変することを試みた。また、供試植物としては、シロイヌナズナを用いた。その理由としては、遺伝子導入、交配、種子生産などの実験操作が簡便、かつ容易であることが挙げられる。植物と細菌ではコドン使用頻度が大きく異なるため、まず *pinZ* アミノ酸コード領域を網羅する DNA を化学的に全合成した。これを植物発現ベクターに挿入後、シロイヌナズナを形質転換した。形質転換当代の種子を出発材料に自家受粉によりホモ接合系統を得て、それを用いて種々の実験を行った。具体的には、形質転換植物における導入遺伝子の発現、ピノレジノール還元活性やリグナン組成の評価、リグナン以外の代謝物の変動の確認などである。

更に、既報の結果から、PinZ はなピノレジノールのエナンチオマーに対する明確な基質選択性を示さないことが明らかにされているため、植物内で生産する PinZ についても、そのエナンチオ選択性を定性的に評価した[6]。

1.2 材料および方法

1.2.1 植物発現用ベクターpBF2:*mpinZ*の作出

SYK-6 株由来のピノレジノールレダクターゼ(*pinZ*)にコードされたタンパク質のアミノ酸配列を DDBJ/EMBL/GenBank から入手し、*pinZ* のコドン使用頻度をバクテリア型からシロイヌナズナのそれに再構成した。再構成する際に、遺伝子のメチル化の対象となる GC モチーフ及び CNG モチーフが極力少なくなるように塩基配列をデザインし、この配列を基に cDNA を DNA 合成機にて化学合成した。又、転写効率を向上させる目的で *pinZ* cDNA のすぐ上流にアデニン 4 残基を付加した。更に、クローニングベクター上の *pinZ* cDNA の加工性を改良する目的で、合成した cDNA の末端に *Bam*HI と *Sac*I の制限酵素サイトを付加した(合成した *pinZ* を、以降 *mpinZ* と呼ぶ)(Fig. 1-4)。

また、*PinZ* のエナンチオ選択性を解析するため、長岡科学技術大学政井研究室より SYK-6 株由来の *pinZ* を受領した。SYK-6 株由来の *pinZ* は pET-16 ベクターに組み込まれた状態であった。DNA の操作および培地の組成などは、Molecular Cloning の方法に従った。クローニングに使用された大腸菌は、DNA の増幅用には XL-1 株、タンパク質発現用には BL21(DE3)株であった。遺伝子のサブクローニングとしては pUC18 ベクターを、酵素大腸菌で生産させる際には pET-DUET ベクターを、植物細胞で遺伝子を発現させる際には pBF2 ベクターを使用した。

制限酵素 *Bam*H I と *Sac*I を用いて、pIDT-SMART から *mpinZ* を切り出し、pUC18 ベクターに組み込み、遺伝子をサブクローニングした。サブクローニングされた *mpinZ* を再度切り出し、pBF2 ベクターに連結して、植物発現用ベクター pBF2:*mpinZ* を作出した。

1.2.1.1 ヒートショック法による大腸菌の形質転換

1. pIDTSMART-Amp⁺:*pinZ* 粉末を受領し、20 μ L MilliQ に溶解した。5 μ L 取り、-20 $^{\circ}$ C で保存した。残りの液は-30 $^{\circ}$ C で保存した。
2. 大腸菌のコンピテントセルを氷上で溶解し、大腸菌液 100 μ L に対し、プラスミドを含む液 1 μ L 加え、氷上で 30 分放置した。
3. 42 $^{\circ}$ C で 90 秒間湯浴し、直ぐに 2 分間氷上に静置した。
4. SOC 培地 1 mL を加え、36 $^{\circ}$ C に設定したインキュベーターで 30 分間予備培養した。
5. 常温、10,000 rpm で 1 分間遠心して集菌し、デカンテーションで上清を捨て、ピペットで残った上澄みに再懸濁した。
6. 抗生物質を含む LB 固形培地に菌懸濁液を塗布し、37 $^{\circ}$ C インキュベーターで一晩静置培養した。
7. 大腸菌コロニーを白金耳で取り、抗生物質を含む LB 液体培地に懸濁した。

8. 37°Cで一晩静置培養し、4°Cで保存した。

1.2.1.2 大腸菌からのプラスミド DNA の回収

1. 1.2.1.2 で作出した大腸菌株を Amp 100 mg/L を含む LB 液体培地 10 mL に植菌し、振盪培養槽を用いて 37°C 130 rpm で培養した。
2. 培養液全量を遠心管に移し、4°C、3,500 rpm で 10 分間遠心し、上清を捨てた。
3. 菌体ペレットに冷 Sol. I 200 μ L を加えて再懸濁し、マイクロチューブに移して氷上にて 15 分間静置した。
4. Sol. II 400 μ L を加え、粘り気が出る程度に転倒混和して氷上にて 5 分間静置した。
5. Sol. III 300 μ L を加え、凝集物が崩れない程度に転倒混和して氷上にて 10 分間静置した。
6. 4°C、15,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を別の 1.5 mL マイクロチューブに回収した。
7. 10 mg/mL RNaseA を 2 μ L を加え、インキュベーターで 37°C にて 20 分間静置し、RNA を消化させた。

1.2.1.3 フェノール・クロロホルム抽出を用いたタンパク質の除去

1. 回収した溶液に等量の PCI を加え、ボルテックスミキサーで混和した。
2. 常温、15,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上澄みを新しいマイクロチューブに回収した。
3. 手順 1,2 をもう一度繰り返した。

・プラスミド回収用 Sol. I 溶液

50 mM	glucose
25 mM	Tris-HCl(pH8.0)
10 mM	EDTA(pH8.0)

・プラスミド回収用 Sol. II 溶液

0.2 N	NaOH
1%	SDS

・プラスミド回収用 Sol. III 溶液

CH ₃ COOK	88.2 g
CH ₃ COOH	34.5mL
<hr/>	
	300 mL

・PCI 溶液(フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール=25:24:1 (v:v:v)を 0.1 M Tris-HCl (pH8.0)でバッファライズしたもの)

1.2.1.4 イソプロパノール沈殿によるプラスミド DNA の回収

1. 等量のイソプロパノールを加え、転倒混和した。
2. 15 分間静置して沈殿を熟成させた。
3. 15,000 rpm で 20 分間遠心分離し、上澄みを捨てた。
4. 70 %EtOH 200 μ l を加えて DNA ペレットとチューブ壁面を洗浄し、デカンテーションで上澄みを捨てた。
5. 再度 70%EtOH を 200 μ L 加えて 5 分間遠心し、ピペットで上澄みを除いた。
6. 減圧乾燥を行い、MilliQ 30 μ L に溶解した。

1.2.1.5 プラスミド DNA の制限酵素処理

1. 処理する DNA 溶液に応じて反応スケール (30 μ L) を決めた。
2. 溶液を加えて、37°C で 1 晩培養した。
3. 操作 1.2.1.3 を行い、酵素を失活除去した。
4. 3 M 酢酸ナトリウムを DNA 液の 1/10 量加え、操作 1.2.1.4 を行い、切断された DNA 断片を回収した。

・制限酵素処理溶液の組成

Plasmid DNA	25 μ L
<i>SacI</i>	1.5 μ L
<i>BamHI</i>	1.5 μ L
0.5×K buffer	1.5 μ L
<u>Milli Q</u>	<u>0.5 μL</u>
	30 μ L

1.2.1.6 電気泳動・ゲル切り出しによる *pinZ* およびプラスミドベクター断片の回収

1. 試料液を作成し、2 μ L と 20 μ L に分けて 0.8%アガロースゲルにアプライし、100 V で電気泳動を行った。色素がアガロースゲル作製プレートに描かれたラインの 3 本前位に来るまで泳動を行った。
2. ゲルを泳動方向に半分に切断し、内 2 μ L の試料液を流したゲルを 0.1%エチジウムブロマイド溶液で 20 分間染色し、紫外線を当てて目的のバンドを目視し、その位置を切り出した。
3. 切り出したゲルを 20 μ L アプライしたゲルと合わせて、目的のバンドの位置を確認

し、ゲルを切り出した。

4. 切り出したゲル片をマイクロチューブに取り、キット (Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-up system) を用いて DNA 断片を回収した。最終的な溶液は DNA 断片を含む 50 μ L MilliQ に溶解した液となった。

・試料液組成

DNA を含む溶液	18 μ L
<u>Dye buffer</u>	<u>4μL</u>
	22 μ L

1.2.1.7 ホストベクターの制限酵素処理と脱リン酸化処理

1. 脱リン酸化反応液を調製した。
2. 37°C で 30 分間インキュベーターに静置した。
3. 操作 1.2.1.3 を行った。
4. 3 M 酢酸ナトリウムを 3 μ L 加え、操作 1.2.1.4 を行い、DNA 溶液を回収した。

・脱リン酸化反応液

DNA 溶液	30 μ L
10 \times PAP buffer	2 μ L
<u>PAP</u>	<u>1 μL</u>
	33 μ L

1.2.1.8 脱リン酸化処理したホストベクターと *pinZ* のライゲーション

1. ライゲーション反応液を調製した。
2. 16 °C で一晩水浴した。

・ライゲーション反応液

10 \times reaction buffer	1 μ L
Vector DNA(pBF2)	2 μ L
Insert DNA(pinZ)	2 μ L
Milli Q	4 μ L
<u>T4 DNA Ligase</u>	<u>1 μL</u>
	10 μ L

1.2.1.9 ライゲーション反応液を用いた大腸菌の形質転換

1. 操作 1.2.1.1 を用いてライゲーション反応液を大腸菌に形質転換した。

1.2.1.10 ラピッドチェックによる形質転換菌の選抜

1. TE buffer(pH8.0)1 mL に対し、0.1%SDS を加えてラピッドバッファーを作成した。
2. 導入したベクターに合わせて抗生物質を加えた LB 培地を 500 μ L ずつ 2 mL マイクロチューブに加えた。
3. 形質転換し、一番培養した大腸菌を爪楊枝でピックアップし、操作 2.の液に浸し、植菌した。
4. 37°Cのインキュベーターで 2~4 時間培養した。時々マイクロチューブを良く振り、菌を攪拌した。
5. 常温、10,000 rpm、1 分間遠心分離を行い、デカンテーションで上清を捨て、菌体を回収した。
6. ラピッドバッファーを 20 μ L、PCI 溶液を 20 μ L 加えて、マイクロチューブを指ではじいて良く攪拌した。
7. 常温、10,000 rpm、5 分間遠心分離を行い、上清を回収した。
8. 目的の分子量に応じた濃度のアガロースを用いてゲルを作成し、操作 7.で回収した上清を加えた。また、1 レーンはネガティブコントロールとして、形質転換したベクターだけをアプライした。
9. ゲルのウェル側の移動層に、10 mL の RNAase 溶液を加えて、電気泳動を行った。
10. 1% エチジウムブロマイド溶液に浸し、DNA を染色した。
11. 紫外線下で DNA を観察し、形質転換した菌を回収した。

1.2.1.11 コロニーPCR による形質転換菌の選抜

1. 形質転換した大腸菌を 50 μ g/mL のカナマイシン(Km)を含む LB 寒天培地で一晩培養した。
2. PCR 反応液を調製し、氷冷しながら PCR チューブに 8 μ L ずつ分注した。
3. 各コロニーを爪楊枝で取り、LB 固形培地に挿してセレクションプレートを作成し、挿した爪楊枝を分注した PCR チューブに漬けた。セレクションプレートは 37°Cで一晩培養した。
4. 蓋をしっかりと締め、Astec 製 PCRcyclar を用いて、PCR を行った。反応時間は以下の通りである。

Seg1	94°C 5 min	1 time
Seg2	94°C 30 sec:54°C 30 sec:72°C 1 min	30 cycles
Seg3	72°C 5 min	1 time
Seg4	20°C 1 h	1 time

5. PCR した反応液 4 μ L に Dye 1 μ L を加えて 1.2.1.6 を行い、電気泳動した。

6. 電気泳動後、エチジウムブロマイドに 20 分間浸し、紫外線で DNA が増幅されていた試料を目視した。
7. 増幅が確認されていた大腸菌をセレクションプレートから白金耳で取り、新たな 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Km を含む LB 寒天培地ストリークし、37°C で一晚培養してマスタープレートとし、4°C で保存した。以降の実験ではマスタープレートに保存した菌を用いた。

・ PCR 反応液

Milli Q	72.5 μL
10× Ex <i>Taq</i> buffer	10 μL
dNTP mix	10 μL
Forward primer	4 μL
Reverse primer	4 μL
<u>Ex <i>Taq</i> polymerase</u>	<u>0.5 μL</u>
	100 μL

1.2.1.12 ライゲーションしたプラスミドベクターの確認

1. 選抜した菌から抗生物質を含む LB 液体培地を使用し、1.2.1.2~1.2.1.4 と同様に行いプラスミドを回収した。
2. 1.2.1.5 と同様の方法で切断を試みた。酵素処理液の組成は以下の通りである。
3. 1.2.1.6 と同様の方法で、目的断片を目視した。

組成

DNA 溶液

Plasmid DNA	3 μL
<i>SacI</i>	0.5 μL
<i>Bam</i> HI	0.5 μL
0.5× K buffer	1 μL
<u>Milli Q</u>	<u>5 μL</u>
	10 μL

1.2.2 *mpinZ*組換え BY-2 細胞、*mpinZ* 遺伝子組換えシロイヌナズナの作出

1.2.1 にて作出した植物発現用ベクター pBF2:*mpinZ* をエレクトロポレーション法にてアグロバクテリウム LBA4404 株 (*Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404) に導入した。pBF2:*mpinZ* が導入された菌を培養し、回収した。回収されたアグロバクテリウム LBA4404 株と BY-2 細胞を共培養し、バイナリーベクター法にて RB-LB に挟まれた T-DNA 領域を BY-2 細胞に組込んだ。遺伝子が導入された BY-2 細胞を選抜し、以降の実験に用いた。

また、シロイヌナズナにおいては、pBF2:*mpinZ* ベクターを株式会社 InPlanta に送付し、フローラルディップ法にて T-DNA 領域を組込んだ。感染処理を行った系統から種子を回収し、抗生物質選抜によって遺伝子が組込まれた系統を選抜した。DNA に導入された *mpinZ* をホモ接合で保持する系統を選抜するため、後代検定法を用いた。

1.2.2.1 アグロバクテリウム LBA4404 株のコンピテントセルの作製

1. -80°C で保存したアグロバクテリウム LBA4404 株を含む液 150 μL を Str 50 mg/L を加えた YEP 液体培地 10 mL に加え、 28°C で一晩培養した。
2. 全量を無菌的に遠心管に移し、3,500 rpm で 10 分間遠心分離した。
3. 上清を捨て、10%グリセロール溶液 5 mL を加えてピペッティングし、ペレットを撹拌した。
4. 遠心管に移し、3,500 rpm で遠心分離した。
5. 上清を捨て、10%グリセロール溶液 5 mL を加えてピペッティングし、ペレットを撹拌した。
6. 上清を捨て、10%グリセロール溶液 200 μL を加えてペレットを撹拌し、マイクロチューブに移して氷中で冷却した。
7. 50 μL ずつマイクロチューブに取り、液体窒素で凍結した後、 -80°C で保存した。

・ 10%グリセロール溶液

1 液

sucrose	9.31 g
glycerol	10 mL
MilliQ	Up to 80 mL

2 液

2 M MgCl_2	50 μL
MilliQ	Up to 20 mL

1,2 液をオートクレーブにかけ、冷えたら無菌的に混合

・ YEP 培地

Bacto-peptone	1.0 g
Bacto-Yeast extract	1.0 g
NaCl	0.5 g
(Agar	1.5 g)
<hr/>	
Water	Up to 100 mL

1.2.2.2 エレクトロポレーション法による LBA4404 株へのバイナリーベクターの導入

1. 2 μ L のプラスミド DNA を解凍した LBA4404 株コンピテントセル 50 μ L に加え、氷上で 30 分間静置した。この際キュベットも冷却した。
2. 菌をキュベットに移し、電圧 2.5 kV キャパシタンス 25 μ F 抵抗 200 Ω の設定でジーンパルサーで通電した。
3. SOC 培地 1 mL を加え、マイクロチューブに 28°C で 4 時間静置した。
4. 10,000 rpm で 30 秒間で遠心分離し、無菌的に上澄を取り除き、再懸濁して 50 μ g/mL の Km を含む YEP 固形培地にコンラージした。
5. 28°C で 2 晩培養した。

1.2.2.3 コロニー PCR によるプラスミド DNA 導入の確認

1. 1.2.1.11 と同様に行った。泳動結果からベクターが導入されたコロニーを選抜し、ストリークして保存した。

1.2.2.4 pBF2:mpinZ 導入アグロバクテリウムを用いた *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow-2 (BY-2) の形質転換

1. pBF2:pinZ 導入 LBA4404 株をマスタープレートから白金耳で取り、最終濃度がそれぞれ 50 mg/L となるように Km、Str を加えた YEP 培地で 28 °C、一晩振盪培養した。
2. 培養液を 1 mL 取り、最終濃度がそれぞれ 50 mg/L となるように Km、Str を加えた YEP 培地で 28°C、6 時間浸透培養した。
3. 操作 2. の培養液を 1 mL をマイクロチューブに取り、10,000rpm で 30 秒間遠心分離し、菌体を上清 500 μ L に再懸濁した。
4. プラスチックシャーレ上にて、培養液 3 日目 BY-2 溶液 4 mL、本培養液 100 μ L、20 mg/mL となるように EtOH に溶解したアセトシリンゴン 5 μ L を混合し、パラフィルムで封をして 28 °C、暗所で 48 時間静置培養し、共存培養を行った。
5. 培養液に LS 培地 6 mL を加えて培養液を遠心チューブに回収した。
6. 1,000 rpm で 1 分間遠心、ピペットで上澄みを取り除いた。
7. LS 液体培地 4 mL を加えて細胞を再懸濁し、同様に遠心して上澄を捨てた。

8. 操作 7.を 2 回繰り返した。
9. 懸濁液を 500 mg/L のカルベニシリン(Car)を含む LS 液体培地で 10 倍希釈し、そこから 1mL を Km が 200 mg/L, Car が 500 mg/L になるように加えた LS 平板培地に広げた。余分な水分は取り除いた。
10. パラフィルムで封をし、28 °C で大豆大になるまで培養した。

・ LS 培地

MS 1	100 mL
MS 2	10 mL
MS 3	10 mL
Modified LS-VT	2.5 mL
KH ₂ PO ₄	20 mg
0.2mg/mL 2,4-D	1 mL
<u>Sucrose</u>	<u>30 g</u>
	1 L(pH5.8)

(Agar 9 g)

・ MS(Murashige-Skoog)培地ストック溶液

・ MS1(10 倍濃度・1L)

NH ₄ NO ₃	16.5 g
KNO ₃	19 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	4.4 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	3.7 g
KH ₂ PO ₄	1.7 g

・ MS2(100 倍濃度・1L)

FeSO ₄ · 7H ₂ O	2.78 g
EDTA · 2Na	3.73 g

・ MS3(100 倍濃度・1L)

MnSO ₄ · 4H ₂ O	2.23 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.86 g
CoCl ₂ · 6H ₂ O	2.5 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	2.5 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	25 mg

KI	83 mg
H ₃ BO ₃	0.62 g

・ MS4(100 倍濃度・ 1L)

Nicotinic acid	50 mg
Pyridoxine hydrochloride	50 mg
Thiamine hydrochloride	10 mg
<i>myo</i> -Inositol	10 g
L-Glycine	0.2 g

・ Modified LS-VT(400 倍濃度)

Thiamine・ HCl	40 mg
<u><i>myo</i>-inositol</u>	<u>4 g</u>
	100 mL

1.2.2.5 組換え *mpinZ* 遺伝子を導入した組換えシロイヌナズナ (*mpinZ* 組換え個体) の作出

シロイヌナズナにおいては、ベクター-pBF2:*mpinZ*を(株) In planta に送付し、遺伝子導入個体 T₁ 種子を受領した。

1.2.2.6 *mpinZ* 組換え個体 T₁ 種子の播種

1. 種子滅菌液を調製した。組成は下記の通りである。
2. マイクロチューブに 3~400 粒程度のシロイヌナズナ *PinZ* T₁ 種子を取った。
3. 100% EtOH 1 mL を加え、ボルテックスして液をピペットで取り除いた。
4. 操作 3. をもう一度繰り返した。
5. クリーンベンチにて、種子滅菌液を加え、ボルテックスして 5 分静置した。
6. 種子滅菌液を取り除き、滅菌水 1 mL を加え、ボルテックスして種子を洗った。
7. 操作 6. を後 2 回繰り返した。
8. 種子に 0.1% アガロース液を 200 μ L 加えて種子を攪拌し、0.8%寒天 MS 固形培地 (Km 50 μ g/mL) に種子アガロース液を滴下し、スポット状に播種した。
9. 冷蔵庫にて 2 日間暗所で保存し、休眠打破した。
10. 植物培養室にて 2 週間培養を行った。
11. 抗生物質にて選抜された個体を、抗生物質を含まない 0.8%寒天 MS 固形培地に移し、2 週間培養した。
12. 培養した個体を下記組成の土に植替え、6 週間栽培した。種子が回収出来るまで成熟した後、種子を回収した。

・ 種子滅菌液

3% Tween20	100 μ L
HClO	50 μ L
超純水	900 μ L

・ MS 培地

MS 1	100 mL
MS 2	10 mL
MS 3	10 mL
MS 4	10 mL
<u>Sucrose</u>	<u>30 g</u>
up to	1L(pH5.8)
(Agar 9.0 g)	

・ 土組成

黒土：バーミキュライト＝1:1

1.2.2.7 *mpinZ*組換え個体 T₂ 種子の播種及び同 T₃ 種子を用いた後代検定法によるホモラインの選抜

1. 1.2.2.6 と同様に種子を滅菌・播種し、栽培して種子を回収した。
2. 操作 1. で回収した T₃ 種子を各ライン毎に 50 μ g/mL の Km を含む MS 固形培地に 1 粒ずつ播種し、2 週間培養した。
3. 培養した系統内で、白色化して枯死していない系統を選抜した。
4. 操作 2.3. を再度行い、同様に枯死するか確認した。

1.2.3 *mpinZ* 組換えシロイヌナズナからの cDNA の調製及び半定量的 RT-PCR による発現量の解析

シロイヌナズナの野生型系統と *mpinZ* 組換えシロイヌナズナ 7 系統を MS 固形培地にて培養し、4 週齢の各系統の茎を回収した。また、MS 固形培地にて 4 週間培養したのち、土(バーミキュライト:パーライト:ピートモス=2:1:1 v/v)を入れたプラントポットに移しさらに 4 週間培養した。計 8 週齢になるまで培養したシロイヌナズナの茎を回収し、乳鉢に入れて液体窒素で凍結し、磨砕した。粉末を 2 ml マイクロチューブに回収し、1 mL の Trizol 試薬を加え、勢いよく攪拌した。その後は Trizol 試薬の手法に従い、全 RNA を回収した。回収された RNA 全量に対し 10 N の LiCl を 1/4 量加えて攪拌し、凍結させて全 RNA を沈殿させた。RNA を回収して、50 μ l の nuclease free water に溶解し、再度同様の操作を行い、全 RNA を精製した。精製された全 RNA から Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(Roche)を用いて 1 本鎖 cDNA を合成した。*mpinZ*、シロイヌナズナ内在性のピノレジノールレダクターゼ、*Atpr1* (At1g32100) および *Atpr2* (At4g13660)、ハウスキーピング遺伝子である *Atact2* (At3g18780) の発現量を解析するため、半定量的 RT-PCR を行い、それぞれの cDNA を増幅した。増幅された cDNA を電気泳動し、エチジウムブロマイド液で染色した。これを UV トランスイルミネーターで観察した。

1.2.3.1 全 RNA の抽出

1. 1.2.2.8 で回収した系統の種子に 1.2.2.7 を行い、培養した。
2. 4 週齢個体の根と、8 週齢個体の茎をそれぞれの系統から回収し、液体窒素と乳鉢を用いて破碎した。
3. 2 mL マイクロチューブに 500 μ L 程度回収し、すぐに Trizol 試薬を 1 mL 加えてタッピングし攪拌した。液体窒素が気化して暴発しないように時々蓋を開けながら、完全に Trizol 試薬が浸透するまで行った。
4. 15,000 rpm, 4°C で 10 分間遠心分離し、上清を別のマイクロチューブに回収した。
5. 室温で 5 分静置した。
6. 200 mL のクロロホルムを加えて、激しく攪拌した。
7. 操作 3. を繰り返した。この時、中間層のタンパク質を吸わないように、注意深く上清を回収した。
8. 回収した上清に対し 0.5 倍量の High-salt buffer とイソプロパノールを加え、良く混合した。High-salt buffer の組成は下記に記載する。
9. 10 分間常温で静置した。
10. 15,000 rpm, 4°C で 10 分間遠心分離し、全 RNA ペレットを得た。
11. 上澄みをデカンテーションし、1 mL の 75% エタノールを加えて、ペレットをマイクロチューブから剥がしつつ、崩さないように Wash した。

12. 8,000 rpm, 4°Cで10分間遠心分離し、ピペットマンを用いて上澄みを注意深く捨てた。
13. RNAのペレットが乾ききらないように注意深く観察しながら、チューブ内を乾かした。
14. 30~50 mLのRNAase free waterを加え、RNAペレットを溶解した。
15. 1 mL取り、RNAase free waterで10倍希釈し、吸光光度計でRNA量を測定した。

・ High-salt buffer

NaCl 1.2 M

Sodium citrate 0.8 M

1.2.3.2 塩化リチウムを用いたRNAペレットからの不純物の除去

1. 1.2.3.1で回収したRNA溶液の4分の1量の滅菌した10 N LiCl液を加えて良く攪拌した。
2. スピンドアウンして、冷凍庫(-20°C)で1時間以上保存した。
3. 4°C, 15,000 rpmで10分間遠心分離し、上澄みを除去した。
4. 1 mLの75%エタノールを加えて、ペレットをマイクロチューブから剥がしつつ、ペレットを崩さないように洗浄した。
5. 10,000 rpm, 4°Cで10分間遠心分離し、ピペットマンを用いて上澄みを注意深く捨てた。
6. RNAのペレットが乾ききらないように注意深く観察しながら、チューブ内を乾かした。
7. 30~50 mLのRNAase free waterを加え、RNAペレットを溶解した。
8. 1 mL取り、RNAase free waterで10倍希釈し、吸光光度計でRNA量を測定した。
9. 操作1~8を再度繰り返した。
10. 吸光度 A_{260}/A_{280} が2.0以上にならない場合、操作1~8を繰り返した。RNA濃度が希釈され過ぎないように、最終的に溶解するRNase free waterの量を調節した。
11. 回収後、-20°Cにて保存した。

1.2.3.3 全RNAからのcDNAの合成

1. 保存した全RNA溶液を60°Cで15分間温浴し、RNA溶液を溶解させた。時々タッピングしてスピンドアウンした。
2. RNA溶液を1~2 mL取り、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(Roche)を用いてcDNAを合成した。

1.2.3.4 半定量的RT-PCRによる遺伝子の増幅

1. 合成した cDNA を 2 μL 取り、PCR 溶液を 18 μL 加えた。
2. タッピングしてスピンドウンし、PCR を行った。

Seg1	94°C 5 min	1 time
Seg2	94°C 30 sec:54°C 30 sec:72°C 1 min	22 または 30 cycles
Seg3	72°C 5 min	1 time
Seg4	20°C 1 h	1 time

・ PCR 反応液

Milli Q	71.5 μL
10× Ex <i>Taq</i> buffer	10 μL
dNTP mix	10 μL
Forward primer	4 μL
Reverse primer	4 μL
<u>Ex <i>Taq</i> polymerase</u>	<u>0.5 μL</u>
	100 μL

3. PCR 反応液を操作 1.2.1.7 にて電気泳動し、DNA の増幅を確認した。

使用したプライマーは下記の通りである (Table 1-1)。

1.2.3.5 トランスクリプトーム解析による全 RNA の解析

1. 1.2.3.2 を用いて、全 RNA を調製した。
2. 試料をかずさ DNA 研究所に送付し、RNA-seq を行った。

1.2.4 *mpinZ*組換えシロイヌナズナのトランスクリプトーム解析

1.2.3 に従い、野生型系統と *mpinZ*組換えシロイヌナズナから 4 週齢の根と 8 週齢の茎を回収し、全 RNA を回収した。10 N の LiCl にて 2 度精製した。精製された全 RNA をかずさ DNA 研究所に送付し、一本鎖 cDNA を合成し、DNA シーケンサーにて全 RNA の発現量を解析した。

1.2.5 大腸菌、BY-2 細胞、シロイヌナズナからの粗酵素液の抽出

野生型系統大腸菌 BL21(DE3)株と 1.2.1 の操作を行い作出した、pET-DUET:*pinZ* を導入された大腸菌 BL21(DE3)を IPTG 100 μ M を加えた LB 液体培地にて培養し、集菌して 50 mM Tris-HCl(pH7.5)を加え、氷上で超音波破碎した。再度遠心して上清を回収し、粗酵素液とした。

野生型系統および *mpinZ* 組換え BY-2 細胞の細胞塊を液体窒素で破碎し、50 mM Tris-HCl(pH7.5)を加えて氷上で 20 分静置した。15,000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心分離して上清を回収し、上清を回収した。同様の操作を行い、粗酵素液とした。

野生型系統および *mpinZ* 組換えシロイヌナズナについては、1.2.3 に従い、4 週齢の根と 8 週齢の茎を回収し、液体窒素にてそれぞれ磨砕した。磨砕された粉末を回収し 50 mM Tris-HCl(pH7.5)を加えて氷上で 20 分静置した。15,000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心分離して上清を回収し、上清を回収した。同様の操作を行い、粗酵素液とした。

粗酵素液に含まれる総たんぱく質の量を Brad-ford 法にて定量した。Protein assay buffer(Bio-Rad 社)の手法に従って試料の総たんぱく質量を定量した。

また、*pinZ* が導入された大腸菌からアフィニティークロマトグラフィーにて PinZ を精製した。pET-DUET:*mpinZ* を導入した大腸菌から粗酵素を回収し、His Spin Trap TALON (GE healthcare Life Sciences)キットの手法に従い精製した。

1.2.5.1 大腸菌からの粗酵素液の調製

1. 大腸菌 BL21(DE3)株を、抗生物質を含む LB 液体培地に植菌し、OD₆₀₀=0.3~0.6 になるまで培養した。
2. IPTG 100 mM を 10 μ l 加えて 2 時間培養し、タンパク質を発現させた。
3. 培養液を 15 ml ファルコンチューブに取り、3,500 rpm、4 $^{\circ}$ C、10 分間遠心分離し、上澄みを捨てた。
4. 50 mM Tris-HCl(pH7.5)を 200 mL 加えて、ピペティングで良く攪拌した。
5. 2 mL マイクロチューブに菌体を回収し、氷上で 10 分間静置した。
6. Handysonic を用いて、強度 8 で、10 秒破碎、50 秒冷却のサイクルを 6 分間繰り返した。
7. 15,000 rpm、4 $^{\circ}$ C、10 分間遠心分離し、上澄みを回収した。
8. 操作 7.を繰り返し、粗酵素液とした。

1.2.5.2 Brad-Ford 法を用いたタンパク質の定量

1. 1 mg/mL のアルブミン牛血清製コーンフラクションを作製し 1.2 μ L、2.5 μ L、7 μ L、10 μ L を分注し、50 mM Tris-HCL(pH 7.4)を用いて 800 μ L にメスアップした。
2. 1.2.1.5 で抽出した粗酵素液を 1 μ L 取り、800 倍に希釈した。
3. 200 μ L Protein assay buffer(Bio-Rad 社)を 1)、2)で作製した液に加え、常温で、加

えた直後から 30 分間、正確に反応させた。

4. 反応液を吸光光度計にて、595 nm の吸収波長を測定した。

1.2.5.3 BY-2 細胞からの粗酵素抽出

1. 1.2.2.5 において回収した BY-2 細胞を 4 週間培養したものを試料とした。
2. 乳鉢に液体窒素を入れ十分に冷えた後に、固形培地で培養した BY-2 を入れ、破碎した。
3. 破碎した粉末を十分に冷やしたマイクロチューブに取った。
4. 氷上で、50 mM Tris-HCL(pH 7.4) 500 μ L をマイクロチューブに加え、20 分間放置した。
5. 4°C, 15,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上澄みを別のマイクロチューブに取った。
6. 操作 5.をもう一度繰り返し、上澄 500 μ L を回収し、粗酵素液とした。
7. Brad-ford 法にて総タンパク量を推定した。

1.2.5.4 *pinZ* 組換えシロイヌナズナからの粗酵素抽出

1. 4 週齢個体の根と、8 週齢個体の茎をそれぞれの系統から回収し、液体窒素と乳鉢を用いて破碎した。
2. 破碎した粉末を十分に冷やしたマイクロチューブに回収した。
3. 氷上で、50mM Tris-HCL(pH7.4) 500 μ L をマイクロチューブに加え、20 分間放置した。
4. 4°C, 15,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上澄みを別のマイクロチューブに取った。
5. 操作 5.をもう一度繰り返し、上清 500 μ L を回収し、粗酵素液とした。

1.2.5.5 SYK-6 株由来の PinZ の His-tag 精製

1. 1.2.4.1 の手法を用いて大腸菌から粗酵素を回収した。
2. 回収した粗酵素を His Spin Trap TALON (GE healthcare Life Sciences)キットを用いて生成した。
3. 50 mM Tris-HCl (pH7.5)を溶出液として酵素を回収した。

1.2.6 免疫染色による PinZ の検出

1.2.5 の手法に従い、野生型系統および *pinZ* が導入された BL21(DE3) 株、野生型系統および *mpinZ* 組換えシロイヌナズナの 6 週齢の茎から粗酵素を回収し、2-メルカプトエタノールで粗酵素を変性させた。変性させた試料に染色液を加え、10%ポリアクリルアミドゲルを作成し、ゲル 1 枚当たり 30 mA、250 V に設定し、SDS-PAGE を行った。

ゲルを切り出し、ウェスタンブロッティングにて PVDF 膜にタンパク質を転写した。その後、PVDF 膜を 1%スキムミルクで 1 時間ブロッキングした。次いで 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のウサギ由来抗 PinZ 抗体を結合させ、次いで 50 ng/mL Anti-rabbit-HRP 抗体を結合させた。タンパク質の検出は Chemical luminescence Kit(ATTO)を用いて化学発光させた。これを蛍光検出器にて検出した。

1.2.6.1 SDS-PAGE

1. タンパク質変性溶液を作成し、粗酵素液を 1 mg/mL になる様に 2 mL マイクロチューブに加えた。
2. めだまクリップで蓋を強く締め、沸騰した湯内で 5 分間煮沸した。
3. Dye を加えて、試料液とした。
4. 10%ポリアクリルアミドゲルを作成し、各レーンに 1 mg のタンパク質が入る様に調節しながら、アプライした。また、分析する試料と同様にアプライしたゲルをもう 1 枚用意した。
5. ゲル 1 枚当たり 30 mA、250 V で電気泳動した。Dye であるプロモフェノールブルーがゲル下部に到達した際に停止させた。
6. ゲルの内、1 枚は CBB 染色を行った。もう 1 枚は切り出し、以降の分析に使用した。

1.2.6.2 ウェスタンブロッティング

1. 1.2.6.1 にて調製したゲルより上下 1 mm だけ大きく切った PVDF 膜を 1 枚作成し、水分を弾かなくなるまで 100% MeOH に浸した。
2. PVDF 膜より上下 1 mm だけ大きく切った厚手の濾紙 6 枚作成し、western blotting buffer に浸した。
3. 陰極側から、濾紙 3 枚、ゲル、PVDF 膜、濾紙 3 枚と重ねた。各層に空気が入らないように上から注意深く押し、周囲に漏れたバッファーを軽く拭き取った。
4. 濾紙の大きさに対し、1 mA/cm^2 の電流量に合わせ、タンパク質を PVDF 膜に転写した。
5. 1 時間程度、抵抗が 10 Ω を超えた時点でブロッティングを終了し、タンパク質が転写された PVDF 膜を回収した。その際、タンパク質が転写された面に触れないよ

うに注意深く操作した。

6. 10 mL の PBS 緩衝液に浸し、振盪機で振盪した。

1.2.6.3 一次抗体と二次抗体の結合処理

1. 1.2.6.2 に調製したメンブレンの PBS 緩衝液を捨て、1 % スキムミルクを 10 mL 加えて 1 時間振盪した。
2. スキムミルクを捨て、0.1 % Tween20 を加えた PBS 緩衝液 10 mL を加えて 10 分間洗浄した。
3. 上記を計 3 回行った。
4. 洗浄液を捨て、0.1 mg/mL の抗 PinZ 一次抗体を含む PBS を 15 mL 加えて 1 時間振盪した。
5. 2.3 を繰り返した。
6. 洗浄液を捨て、1 万倍に希釈した抗ウサギ二次抗体を含む PBS を 15 mL 加えて 10 分間振盪した。
7. 2.3 を繰り返した。

1.2.6.4 蛍光反応液の調製

1. 1.2.6.3 にて調製した PVDF 膜を、シャーレに移した。
2. ケミカルルミネッセンスキット(ATTO)を 5 mL を極小ビーカーに調製し、PVDF 膜にまんべんなくかけた。
3. 3 min 静置し、PVDF 膜をカードスリーブに空気を抜きながら挟み、蛍光検出器にて観察した。

1.2.7 HPLC 分析による PinZ 活性の検出

1.2.7.1 BY-2 から抽出した粗酵素を用いた反応液の調製と分析試料の作製

1. 反応液を作成し、28°Cで 15 時間反応させた。
2. 反応液をワッセルマン試験管に移し、酢酸エチル 1 mL を加えてボルテックスし、4,000×g で 5 分間遠心し、酢酸エチル層をナスフラスコに回収した。
3. 2.をもう一度行った。
4. ロータリーエバポレーターにて 40°Cにて乾固した。
5. 水:メタノール=1:1 500 μL でナスフラスコを洗うようにしてサンプルを回収した。
6. 0.45 μl Millex LH フィルターを通し、サンプル溶液とした。

・反応液組成

Pinoresinol	100 μM
β-NADPH	500 μM
素酵素	100 μg
<hr/>	
50mM Tris-HCl (pH7.4)	500 μL

1.2.7.2 HPLC-DAD 分析による反応液の解析

以下の条件でサンプルを供した。

実験条件

- ・装置 : LaChromElite(HITACHI 製)
- ・カラム : SenshuPak, ODS-1251-SS(4.6×250 nm)(逆相カラム)
- ・カラムオーブン : Room temperature
- ・試料液のアプライ量 : 50 μL
- ・移動相 : 水:メタノール=1:1 (固定)
- ・流量 : 1 mL/min
- ・検出波長 190-400 nm

1.2.7.3 *mpinZ* 組換えシロイヌナズナ粗酵素反応液の調製と分析試料の作成

1. 1.2.7.1 を用いて、粗酵素反応液を調製した。反応終了後、40 mM のアセトシリングンを加え、内部標準とし、酢酸エチルにて有機層を回収した。
2. 1.2.7.2 を用いて、試料を分析した。実験条件は以下の通りである。

実験条件

- ・装置 : LaChromElite(HITACHI 製)

- ・ カラム : SenshuPak, ODS-1251-SS(4.6×250 nm)(逆相カラム)
- ・ カラムオーブン : Room temperature
- ・ 試料液のアプライ量 : 50 μ L
- ・ 移動相 : 水:メタノール=6:4 (固定)
- ・ 流量 : 1 mL/min
- ・ 検出波長 200-400 nm

1.2.8 粗酵素反応液に含まれる分子種の LC-MS による同定

1.2.5 の手法に従い、野生型系統および *pinZ* が導入された BY-2 細胞、野生型系統および *mpinZ* 組換えシロイヌナズナの 6 週齢の茎の粗酵素を回収し、酵素反応液を調製し、ナス型フラスコに回収してエバポレーターで酢酸エチルを揮発させた。

この試料を長岡科学技術大学政井研究室に送付した。送付した試料を、1%ギ酸を含む 25%アセトニトリルに溶解し、孔径 0.2 μm の PTFE フィルター (Millex-LG, Millipore) で濾過した。これを用いて、UPLC-ESI-MS 分析に供した。分析条件は以下の通りである。

1.2.8.1 UPLC-MS による粗酵素反応物に含まれる分子種の同定

1. 1.2.5.3 を用いて粗酵素反応液を調製し、エバポレーターにて酢酸エチルを揮発させた。
2. パラフィルムでナスフラスコに蓋をし、長岡科学技術大学にて分析を行った。
3. 試料は 1%ギ酸「を含む、水:アセトニトリル=75:25 400 μL に溶解し、UPLC-MS 分析に供した。
4. ナスフラスコ内に 400 μL の 25%アセトニトリル溶液を加え、2分ほど vortex して溶解した。
5. 0.2 μm の PTFE フィルター (Millex-LG, Millipore) で濾過した。
6. (No. 4については遠心分離でパラフィルム片を沈殿させた後、上清を濾過した)

分析条件

- ・装置 : ACUQITY UPLC system with PDA and ACUQITY TQ Detector (Waters)
- ・カラム : TSKgel ODS-140HTP column (Tosoh)(逆相カラム)
- ・カラムオーブン : 30°C
- ・移動相 : 水 : アセトニトリル = 75:25 (v:v)
- ・流量 : 0.3 mL/min
- ・イオン検出 : ポジティブイオンモード、ネガティブイオンモード
- ・電圧量 : 3 kV
- ・コーン電圧量 : 10~40 V
- ・コーンガスフローレート : 50 ml/h
- ・ソース温度 : 130°C
- ・ガス化温度 : 350°C
- ・ガスフローレート : 650 ml/h

1.2.9 四重極タンデム UPLC-MS/MS 分析によるリグナンの定量

1.2.3 の手法に従い、野生型系統と *mpinZ* 組換えシロイヌナズナの 2 週齢の個体の全体の組織、4 週齢の根、6 週齢の茎と葉をそれぞれ回収し、液体窒素で試料を凍結した。試料をマルチビーズショッカーにて破碎し 50%メタノールを 1ml 加えて 60°C で 20 分間抽出した。15,000×g、常温で 10 分間遠心分離した。50%メタノールに溶解した 1 mM のビスフェノール A を 40 μL 加えて上清を回収した。試料に再度メタノールを加えて同様の操作を行い、上清を回収した。上清を凍結乾燥機に連結した濃縮遠心機にて常温で濃縮した。これに 50 mM の酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)を 200 μl 加え、37°C で 2 時間静置した。グルコシダーゼ処理により配糖体を加水分解した試料においては、50 mM の酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)に 20 U の β-グルコシダーゼを加えて 37°C で 2 時間静置した。酵素反応の停止と酵素除去のため、静置した試料に対してアセトンを 400 μl 加えて良く攪拌し、-80°C で 1 時間静置した。この試料に対し、15,000×g、常温で 10 分間遠心分離し、上清を回収した。回収した上清から再度濃縮遠心機を用いて溶媒を完全に除去した。これを大阪府立大学 中坪研究室に送付した。送付した試料を 50%メタノールに溶解し、孔径 0.45 μm のシリンジフィルターにて濾過し、UPLC-ESI-MS/MS に供した。分析条件は下記の通りである。

1.2.9.1 四重極タンデム UPLC-MS/MS 分析によるリグナンの定量

1. 1.2.2.7 を用いて野生型系統と *PinZ* 系統 8 の 2 週齢の全体個体、4 週齢の個体の根、8 週齢の個体の茎を系統毎にそれぞれ 2 mL スクリューキャップ型のマイクロチューブに回収し、液体窒素に入れて試料を凍結した。
2. 2 mL スクリューキャップ型のマイクロチューブに試料破碎用のステンレスビーズを入れ、マルチビーズショッカーにて、2,000 rpm で 30 秒間破碎した。
3. チューブをタッピングし、摩擦熱を取り除いた後、破碎を 4 回繰り返した。
4. チューブを注意深く開け、1 mL の 50 %MeOH を加えて 60°C で 20 分間振盪した。
5. 浸透した後、常温、15,000 rpm、5 分間遠心し、上清 800 μL を別の 2 mL マイクロチューブに回収した。
6. 1 mM のビスフェノール A を 40 mL 含む、1 mL の 50 %MeOH を加えて 60°C で 20 分間振盪した。
7. 浸透した後、常温、15,000 rpm、5 分間遠心分離し、上清 800 μL を別の 2 mL マイクロチューブに回収した。
8. 上清を凍結乾燥機に連結した濃縮遠心機に取り付け、2,000 rpm で遠心分離し、溶媒を揮発させ、試料を濃縮した。
9. 濃縮した試料に対し、50 mM の酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)200 μL を加えて、37°C で 2 時間静置した。この内、β-グルコシダーゼ処理を行うものに対しては、20 U の β-グルコシダーゼを加えた。

10. 反応液に 800 μL のアセトンを加えて良く混合し、 -80°C で 1 H 保存した。
11. 常温、15,000 rpm、5 分間遠心分離し、上清 900 μL を別の 2 mL マイクロチューブに回収して、 β -グルコシダーゼを除去した。
12. 試料を上清を凍結乾燥機に連結した濃縮遠心機に取り付け、2,000 rpm で遠心しながら、溶媒を完全に揮発させ、試料を濃縮した。
13. 試料を大阪市立大学に送り、50%MeOH を加えて溶解し、0.22 μm のシリンジフィルターを通過させて四重極タンデム UPLC-MS/MS 分析に供した。

分析条件

- ・ 装置 : UPLC-tandem quadrupole mass spectrometer system ACQUITY TQD (Waters, Milford, MA, USA) with operating software MassLynx 4.1 (Waters).
- ・ カラム : The ACQUITY UPLC HSS C18 1.8 μm 2.1 \times 100-mm column (Waters)
- ・ カラムオーブン : 40°C
- ・ 試料液のアプライ量 10 μL
- ・ 流量 0.3 mL/min.
- ・ 移動相 : (A) 水/アセトニトリル/酢酸 (95:5:0.05, v:v:v)
(B) 水/アセトニトリル/酢酸 (5:95:0.05, v:v:v).
- ・ 移動相グラジエント条件 : 0-3 分 : A:B=4:1、3-20 分 : A:B=4:1 \sim A:B=3:2、
20-20.5 分 : A:B=2:3 \sim A:B=1:9、20.5 -21.5 分 : A:B=1:9、21.5-23 分 : A:B=1:9 \sim
A:B=4:1
- ・ ガス種類 : 窒素ガス
- ・ ガス温度 : 150°C
- ・ ガス化温度 350°C
- ・ ガス流量 600 mL/h

1.2.10 野生型系統および *mpinZ* 組換えシロイヌナズナのメタボローム解析

1.2.3 の手法にて、野生型系統および *mpinZ* 組換えシロイヌナズナの 4 週齢の根および 6 週齢の茎と葉をそれぞれ回収し、(凍結乾燥後、理化学研究所 環境資源科学センター 統合メタボロミクス研究グループに送付した。送付した試料は各々終濃度 2.5mM のリドカイン(ポジティブイオンモード)と 10-カンファースルホン酸(ネガティブイオンモード)を加えた 80%メタノールを加え、ジルコニアビーズを加えた超音波破碎機で試料を破碎した。遠心後、上清を回収し、HLB Elutionplate (Waters)で濾過した。濾過した試料を UPLC-TOF-MS に供した。分析条件は以下の通りである。

・分析条件

・装置 : LC-quadrupole time-of-flight (QTOF)-MS (Waters Acquity UPLC system; MS).

・カラム : Acquity bridged ethyl hybrid (BEH) C18, 1.7 μ m, 2.1 mm \times 100 mm (Waters)

・カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

・移動相 : A 層=0.1%ギ酸溶液

B 層=0.1%ギ酸を含むアセトニトリル溶液

・移動相グラジエント条件 : 0-1 分 : A: B=99.5:0.5、1-10 分 : A: B=99.5:0.5 \sim A: B=1:4、10-10.1 分 : A: B=1:4 \sim 0.5:99.5、10.1-12 分 : A: B=0.5:99.5、12-12.1 分 : A: B=0.5:99.5 \sim 99.5:0.5、12.1-15 分 : A: B=99.5:0.5 (v:v)

・流量 : 0-10 分 : 0.3 mL/min、10-10.1 分 : 0.3 mL/min \sim 0.4 mL/min、10.1 分-14.4 分 : 0.4 mL/min、14.4-14.5 分 : 0.4 mL/min \sim 0.3 mL/min

・コーンガス流量 : 50 L/h

・コーン電流量 : 25 V

・ソース温度 120 $^{\circ}$ C

・ガス化温度 : 450 $^{\circ}$ C

・ガス化気体速度 : 800 L/h

・衝突エネルギー : 6 V

・測定質量レンジ : $m/Z=100-1500$

・スキャン速度 : 0.1 s

1.2.11 PinZ の光学異性体に対する基質特異性の解析

1.2.7 の手法に従い、野生型系統と *pinZ* 組換え BL21(DE3)株、野生型系統と *mpinZ* 組換えシロイヌナズナからそれぞれ粗酵素を回収し、1.2.7 の手法に従い粗酵素反応液を作成し、1 ml の酢酸エチルで 3 回抽出してナス型フラスコに回収し、エバポレーターにて溶媒を完全に揮発させた。乾固させた試料をヘキサン：エタノール=3:2 (v:v)200 μ l に溶解し、孔径 0.45 μ m のシリンジフィルターで濾過した。この試料を HPLC 分析に供した。分析条件は下記の通りである。

1.2.11.1 試料液の調製

1. pET-DUET-Km+:*pinZ* で形質転換した BL21(DE3)株、野生型シロイヌナズナ、*pinZ* 組換えシロイヌナズナからそれぞれ、の方法に従い、粗酵素を抽出した。
2. 20 μ g の粗酵素を用いて、5.5.1 の方法に従い、試料を反応させ、エバポレーターにて溶媒を揮発させた。
3. 試料をヘキサン:エタノール=3:2 200 μ L に溶解した。
4. 試料液を 20 μ L シリンジに取り、手動にて順相 HPLC に供した。

1.2.11.2 順相 HPLC の構成

分析条件

- ・装置：LC-2000 (日本分光)
- ・カラム：キラルセル OD-H 4.6mm \times 250mm(ダイセル)
- ・検出器:UV-2075(ダイオードアレイディテクター、日本分光)
- ・流量：1.5 mL/min
- ・カラム温度：Room temperature
- ・移動相：ヘキサン：エタノール=1:1 (v:v)

1.3 結果および考察

1.3.1 コドン使用頻度に基づいて *pinZ* のコドンを変更した *mpinZ* の構築と合成

本研究では植物細胞中で、SYK-6 株が生産する PinZ と同様の機能を有する酵素を生産させることが目的である。他の生物種から単離された酵素遺伝子を別の宿主に導入する際、導入する遺伝子の GC 比を宿主の比に合わせて変更すること、コドンの使用頻度を宿主のものに合わせることは、異生物間で導入した酵素遺伝子を効率よく発現させるために有効な手法である[34]。シロイヌナズナで用いられるコドン使用頻度、GC 比を元に、SYK-6 株由来の *pinZ* を再構成した。再構成する際に、DNA のメチル化の対象となる GC および CNG モチーフを極力減らすように構築することで、サイレンシングされる可能性を減少させた。また、転写効率を上げる目的で、DNA の転写開始点の前にアデニン 4 塩基を連結した。最後に、サブクローニングを容易にする目的で、5'末端に *Bam*H I を、3'末端に *Sac*I の制限酵素サイトを連結した。以上の操作によって合成する *mpinZ* を決定し、DNA 合成機によって合成した(Fig.1-4)。合成された *mpinZ* は pIDTSMART に連結された状態で受領した。制限酵素を用いて *mpinZ* を切り出し、植物発現用ベクター pBF2 に連結した(Fig.1-5)。pBF2 は RB 配列と LB 配列を有し、アグロバクテリウムを介したバイナリーベクター法にて RB-LB 間の T-DNA 領域を植物細胞に導入することが出来る。RB-LB 間には、カナマイシン耐性遺伝子 *NPTII* と、*mpinZ* の上流に 35S プロモーター、下流に *nos* ターミネーターが位置している。*NPTII* は形質転換された細胞をカナマイシンで選抜できるようにするために導入した。プロモーターに 35S プロモーターを用いたのは、遺伝子の強力な発現が必要だったためである。

1.3.2 *mpinZ*組換え BY-2 細胞の作出と PinZ 活性の検出

合成した *mpinZ* が植物細胞内で発現し、PinZ が生産されるかどうか解析するため、*mpinZ* 組換え BY-2 細胞を作出した。BY-2 細胞を用いた理由は、操作が簡便なこと、形質転換が容易であること、細胞質が多く、培養速度が速いため、早期に酵素活性を確認するのに適しているためである。BY-2 細胞を用いて PinZ 活性を測定することで、*mpinZ* が転写・翻訳されていることを確認することとした。BY-2 細胞とエレクトロポレーション法によって pBF2:*mpinZ* を導入したアグロバクテリウム LBA4404 株を共培養し、T-DNA 領域をアグロバクテリウムに組込んだ。感染後、抗生物質 Km 及び Car 含む LS 平板培地に散布し、培養した。BY-2 に T-DNA 領域が導入された場合、抗生物質カナマイシンに対して抵抗性を示し、カルスが大きく成長する。成長した BY-2 細胞を新たな LS 平板培地にて培養し、カルスを培養した。上記の操作により、12 系統の BY-2 細胞を得た (Fig. 1-5)。

作出した BY-2 細胞から粗酵素を抽出し、1.2.7 の手法を用いてピノレジノールと反応させ、HPLC 分析を行った。分析の結果、12 系統の *mpinZ* 組換え BY-2 細胞の内、最も高く活性が検出された系統は系統 3 であった。本実験では、*mpinZ* が植物細胞内で発現し、PinZ が生産されるか解析することが目的のため、最も強く活性が検出された系統 3 を用いて検討した。

野生型系統と *mpinZ* 組換え系統の粗酵素反応液のクロマトグラムを示す (Fig. 1-6)。ピノレジノールの標品のみを HPLC 分析すると、クロマトグラム約 11 分の位置にピークが出現した (Fig. 1-6G)。次に野生型系統の粗酵素反応液を HPLC 分析に供すると、野生型の粗酵素を用いた粗酵素反応液を HPLC に供すると、約 3 分と、約 11 分にピークが現れた。これらの吸収スペクトルを解析すると、それぞれ 3 分の位置のピークは A_{209} と A_{260} に吸収極大を、約 11 分のピークにおいては A_{205} 、 A_{230} 、 A_{280} に吸収極大を有していた (Fig. 1-6A,C,E)。約 11 分のピークはピノレジノールのピークであると推測される。一方、*mpinZ* 組換え系統の粗酵素を用いた粗酵素反応液を HPLC に供すると、約 11 分のピークが大きく減少し、約 7 分にピークが現れることが示された。また BY-2 細胞の系統間に大きく差が見られた (Fig. 1-6B,D,F)。7 分に見られたピークの面積値が最も大きかったのは系統 3 であった。そこで、系統 3 の試料において再度 HPLC を行った結果、上記と同様の結果を得た。この約 7 分のピークの吸収スペクトルを解析すると、 A_{205} 、 A_{230} 、 A_{280} に吸収極大を有していた。

ピノレジノールが PinZ によってラリシレジノールに変換されているとすると、フロフラン環の一方のエーテル結合が還元され、水酸基が生成していると考えられる。逆相カラムを用いて解析すると、水酸基が導入されることにより、クロマトグラム上で溶出時間が速くなると考えられる (Fig. 1-6A,B)。以上から、*mpinZ* 組換え系統の BY-2 細胞の粗酵素反応液においては、ピノレジノールが大きく減少し、野生型系統には見られない分子種を含むピークが生成している可能性が示された。

1.3.3 *mpinZ*組換え BY-2 細胞の LC-MS 分析による分子種の同定

*mpinZ*組換え BY-2 細胞から抽出した粗酵素を用いた反応液を分析すると、野生型系統のそれから得られた粗酵素反応液には見られなかった分子種を含むピークが生成している可能性が示された。そこで、この分子種を特定するために、野生型系統の粗酵素反応液と *mpinZ*系統 3 の粗酵素反応液を作成し、UPLC-ESI-MS 分析を行った。その結果を示す(Fig. 1-7)。

野生型系統の粗酵素反応液を分析したクロマトグラムでは、約 0.71 分と、約 3 分にピークが現れた(Fig.1-7A)。一方、*mpinZ*組換え系統の粗酵素反応液を分析したクロマトグラムでは、約 0.7 分と約 1.8 分にピークが現れた(Fig.1-7B)。*mpinZ*組換え系統において約 1.8 分に溶出されたピークの化合物を特定するため、質量分析を行い、マススペクトルを得た。*mpinZ*組換え系統で得られた約 1.8 分の位置のピークのマススペクトルを見ると、分子量は 359.1 であった(Fig. 1-7C)。この分子量はラリシレジノールの分子量と一致していた。

以上から、UPLC-MS 分析によって、*mpinZ*を導入された BY-2 細胞の粗酵素反応液では、ピノレジノールが大きく減少していること、野生型系統では見られなかったピークはラリシレジノールである可能性が高いことが示唆された。よって、BY-2 細胞内で *mpinZ*が発現し PinZ が生産されている可能性が示唆された。

1.3.4 *mpinZ* をホモ接合で有する組換えシロイヌナズナの作出

1.3.3 の結果により、*mpinZ* が植物細胞内で発現し、*PinZ* が生産されていることが示された。そのため、次の段階として、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて、研究を進めることとした。シロイヌナズナを用いる理由として、シロイヌナズナでは、ピノレジノールレダクターゼの酵素遺伝子が単離されていること、本研究の目的である、リグナンの蓄積量や組成の解析を行う上で、リグナンの定量がなされていること、操作が簡便なこと、全ゲノムが解読されており、TAIR、ATTED-II、e-FP Browser など、遺伝情報を解析する上で豊富に情報が蓄積されていること、二次代謝産物などの解析が行われていることである[10, 34]。

1.2.2 の手法を用いてシロイヌナズナに *pinZ* を導入した。Inplanta より *mpinZ* が導入された種子(T₁)を回収し、カナマイシンを含む 0.8%寒天 MS 固型培地に播種して、抗生物質カナマイシンによる *pinZ* 組換え体の選抜を行った。生存した個体を培養し、種子を回収した(T₂)。回収した種子を再び播種・培養し、再度種子を回収した(T₃)。T₃ 世代の種子を用いて後代検定法を行い、T₂ 世代における *mpinZ* 遺伝子をホモ接合で有する組換えシロイヌナズナの系統を選抜した。これにより、*mpinZ* をホモ接合で有する組換えシロイヌナズナを 8 系統得た。その後、再度後代検定法を行ったところ、*mpinZ* 系統 2 の T₃ 世代において、野生型と比較すると生存するものの、生育障害を起こして枯死する個体が見られたため、除外し、*mpinZ* 系統 1,3,4,5,6,7,8 の 7 系統を回収し、以降の実験に用いることとした。

1.3.5 *mpinZ*組換えシロイヌナズナの半定量的 RT-PCR

作出した *mpinZ*組換えシロイヌナズナの植物細胞内で *mpinZ*が発現しているか、系統間で差があるか調査した。調査には半定量的 RT-PCR を用いた。半定量的 RT-PCR で各系統から全 RNA に含まれる目的の遺伝子の mRNA の発現量を比較した。調査には、各系統の根と茎を用いて行った。その理由は、リグナンの蓄積する部位や蓄積量および組成が植物種によって異なるためである。また、シロイヌナズナの *Atprrr1*と *Atprrr2* について、AtMetExpress でその発現部位と発現量を解析すると、*Atprrr1* は茎で、*Atprrr2* は根でそれぞれ強く発現していることが示されている。そこで、本研究においても、根と茎を分けて回収し、それぞれ由来の RNA に対して半定量的 RT-PCR 解析を行うこととした。

野生型系統と *mpinZ*組換え系統 7 系統のシロイヌナズナの種子を MS 寒天培地に播種し、培養した。2 週齢の各系統の個体を 7 個体ずつ新たな MS 寒天培地に移し、培養した。また、土を入れたプラントポットに 4 週齢の個体を移し、更に 2 週間培養した。4 週齢の根と 6 週齢の茎を系統毎に他の器官などを含まないようにそれぞれ回収し、液体窒素で破碎した。破碎した試料から Trizol 試薬を用いて、全 RNA を回収した。塩化リチウム法を用いて回収した全 RNA を精製した。分光光度計を用いて RNA の純度を測定し、 A_{260}/A_{280} が 2.0~2.5 を示すまで精製した。精製した全 RNA 溶液の濃度を調節し、各系統 1 μ g ずつ用いて一本鎖 cDNA を合成した。合成した cDNA を用いて半定量的 PCR を行った。また、シロイヌナズナ内在性のピノレジノールレダクターゼである *Atprrr1*、*Atprrr2* の発現量を調べるため、それぞれのプライマー、RNA が正確に抽出されているか、抽出された量に大きな差が無いか調べるため、細胞内で恒常的に発現している *Actin2* 遺伝子の発現量を解析した。

PCR の増幅サイクルを 35cycles で行った結果、回収した根と茎の cDNA のそれぞれにおいて、野生型系統では *Atprrr1*、*Atprrr2*、*Actin2* の増幅産物が明確に確認された(Data not shown)。一方、*mpinZ*組換え系統では、*mpinZ*、*Atprrr1*、*Atprrr2*、*Actin2* の全ての遺伝子の増幅産物が明確に確認された。次に、系統間での発現量の差を調べるために、PCR の増幅サイクルを 35 cycles から *mpinZ* と *Actin2* では 22cycles に、*Atprrr1* と *Atprrr2* では 30cycles に減らして PCR を行った(Fig.1-9,10)。その結果、*Atact2* は、根と茎において、全ての系統で増幅が見られ、その増幅産物の量に差が見られなかった。*mpinZ* プライマーを用いた試料では、野生型系統では *mpinZ* の増幅産物は見られず、*mpinZ*組換え系統では各系統間の増幅産物の差が見られた。最も *mpinZ* の発現量が高かったのは *mpinZ* 系統 8 であり、次いで *mpinZ* 系統 3,6,1,4 の順であり発現量の差が見られた。*mpinZ* 系統 5,7 においては、増幅産物を確認することが出来なかった。次に *Atprrr1* と *Atprrr2* の発現量を比較すると、*Atprrr1* では根と茎において、野生型と *pinZ* 組換え系統間で明確な差が見られなかった。しかしながら、根と茎の発現量を比較すると、*Atprrr1* においては、茎の方が根の方より多く増幅産物が見られた。一方 *Atprrr2* に

おいては、根の方が茎の方よりも多くの増幅産物が見られた。これらの結果は、*AtMetExpress* でのシロイヌナズナの根と茎の *Atprrr1, Atprrr2* と概ね一致している。

以上から、*mpinZ* 組換え系統では、*mpinZ* が転写されていることが示唆された。また、シロイヌナズナの内在性のピノレジノールレダクターゼの遺伝子、*AtPrR1* と *AtPrR2* の発現量に野生型と比較しても変化は見られなかった。また、内在性のピノレジノールレダクターゼ遺伝子は、根と茎において、発現量に大きな差が見られることが示唆された。

1.3.6 免疫染色による *mpinZ* 組換えシロイヌナズナからの PinZ の検出

1.3.5 の結果より、*mpinZ* がシロイヌナズナで転写されていることが示唆された。次に、*mpinZ* から PinZ が生産されているか解析するため、1.2.5 および 1.2.6 の手法を用いて免疫染色による PinZ の検出を行った(Fig.1-11)。ポジティブコントロールとして、SYK-6 株由来の *pinZ* を導入された BL21(DE3)株を用いた。また、野生型系統および最も遺伝子が強く発現していた *mpinZ* 組換えシロイヌナズナの系統 8 から粗酵素を回収し、実験を行った。粗酵素液にタンパク質処理液を加えて煮沸し、変性させた。変性させた試料に Dye を加えて、10%ポリアクリルアミドゲルにアプライした。電気泳動でタンパク質を分離した後、ウェスタンブロッティングを行い、タンパク質を PVDF 膜に転写した。PVDF 膜に転写されたタンパク質に対し、ウサギ由来 PinZ 一次抗体を結合させ、次いで西洋ワサビ結合抗ウサギ二次抗体を結合させた。これに対し、ケミカルルミネッセンスキット(ATTO)を用いて抗体が結合した PinZ をルミノール反応にて検出した。その結果、野生型系統の粗酵素からは PinZ は検出されなかった。*mpinZ* 組換えシロイヌナズナから得られた粗酵素からは、系統 8,3,6 から PinZ が検出された。PinZ のシグナルが最も強く検出されたのは系統 8 であった。*pinZ* 系統 1,4,5,7 からは PinZ のシグナルは検出されなかった。

以上から、*pinZ* は植物細胞内で発現し、PinZ を生産していることが示された。

1.3.7 *mpinZ*組換えシロイヌナズナの見た目の表現型の解析

1.3.5、1.3.6の結果より、*mpinZ*組換えシロイヌナズナでは *PinZ* が生産されていることが示唆されたため、最も遺伝子の発現量とタンパク質の生産量の多かった、*mpinZ*組換えシロイヌナズナの系統 8 の 4 週齢の個体と 8 週齢の地上部の観察および茎の切片の観察を行った。これまで、シロイヌナズナの *Atprrr1* の欠損体は、道管の細胞壁が薄くなることが報告されている[35, 36]。Zhao らの報告では、細胞内の炭水化物の減少と、木部繊維組織のリグニンの蓄積量の減少が報告されている。しかしながら、ピノレジノールレダクターゼの強発現や、他の植物のピノレジノールレダクターゼを導入した場合の表現型の変化についての報告はなされていない。そこで、ピノレジノールを強力に変換する *PinZ* を生産させた際に、顕著な変化が見られるか、解析した。結果を示す (Fig. 1-12)。

4 週齢の根および 6 週齢の茎において野生型系統と *mpinZ* 系統で顕著な差は見られなかった (Fig.1-12A~C)。また、6 週齢の茎を凍結ミクロトームにて切断し、横断切片をトルイジンブルー・O にて染色したが、維管束、道管、柔組織、木部組織において、顕著な差は見られなかった (Fig.1-12D, E)。特に、過去の報告において言及されている、木部組織の細胞壁の厚さなどを比較しても、顕著な差は見られなかった。皮質において、野生型系統と比較して、*mpinZ* 組換え系統ではややいろあいに

ら、少なくとも、見た目の表現型や光学顕微鏡での観察下においては *pinZ* の発現量の増加により見た目の表現型に顕著な変化を与えないと考えられる。

しかしながら、今回の実験においては、これまでの報告において行われた、炭水化物やリグニンの蓄積量については言及していない。また、解析ソフト ATTED-II によると、*Atprrr1* は細胞壁の生合成にかかわるセルロースシンターゼ A やモノリグノール生合成経路に位置する PAL4 や 4CL1、4CL2、4CL5 などの酵素の遺伝子発現にかかわる転写因子 MYB43 や、ラッカーゼ 11 や木部細胞の細胞死に係るシステインペプチダーゼの遺伝子が強発現していることが推測されている。これらについてはトランスクリプトーム解析において言及する。

1.3.8 *mpinZ*組換えシロイヌナズナの PinZ 活性の定量

1.3.4の実験結果において、*mpinZ*をホモ接合で有する組換えシロイヌナズナを7系統回収した。これらの系統から粗酵素を抽出し、それぞれの系統が単位時間当たりどれだけの比活性を有しているか調査した。コントロールには野生型系統のシロイヌナズナを用いた。抗生物質を含まないMS寒天培地に野生型系統と*mpinZ*組換えシロイヌナズナの系統8の種子をそれぞれ播種し、4週齢の根と6週齢の茎をそれぞれ回収し、粗酵素を抽出した。野生型系統と*mpinZ*組換え系統から得られた粗酵素10 μ gとピノレジノール、 β -NADPHを10分間、30 $^{\circ}$ Cで反応させた。粗酵素反応液を用いてHPLC分析を行った結果、以下の通りとなった(Fig.1-13)各系統3回実験を行い、平均を算出した。

野生型系統では、根、茎共に検出出来るほどのラリシレジノールを検出出来なかった。一方、*mpinZ*組換えシロイヌナズナにおいては、*mpinZ*組換え系統8,3,6,1,4において、ラリシレジノールの生成を確認することが出来た。*mpinZ*組換え系統5,7においては、クロマトグラム上でピークとして確認できるほどのラリシレジノールは見られなかった。最も比活性の高かった*mpinZ*組換え系統8においては、根では613nmol/mg/min、茎では413nmol/mg/minの比活性が得られた。他系統の比活性においては、以下の通りであった(Table1-2)。

大腸菌に *Atprp1* および *Atprp2* を導入し、His-tag 精製して測定した結果では、AtPrR1の比活性は、35.5nmol/mg/min、AtPrR2の比活性は5.9nmol/mg/minと報告されている[10]。タンパク質の粗精製方法も純度も異なる上、形質転換してPrP活性を強化した訳ではないので単純比較できないが、他の野生型植物のものと比較すると、レンギョウ(*Forsythia intermedia*)から回収した上清を40-60%硫酸アンモニウムで処理し、タンパク質を沈殿させて比活性を測定すると、255nmol/mg/minであった[37]。リグナンの生合成経路に関わる酵素遺伝子を単離し、強発現させることが多く、その結果をRT-PCRで解析およびリグナンの蓄積量の解析により示す研究例が多い。他の野生型植物の粗精製のPrRの比活性と比較することに意義があるかは不明であるが、少なくとも、PinZが植物細胞内で生産され、強力な活性を有していることが示唆された。

1.3.9 シロイヌナズナ粗酵素反応液に含まれる LC-MS による分子種の同定

*mpinZ*組換えシロイヌナズナの粗酵素反応液を解析した結果、PinZ 活性を得ることができた。この PinZ 活性により *in vitro* でラリシレジノールが生成されることを 1.3.8 で確認したが、更に、セコイソラリシレジノールも生成されるかどうか検討するため、UPLC-MS にて解析した。また、PinZ 活性によって、反応時間と粗酵素の投入量を変えることでラリシレジノールの更に下流に位置するセコイソラリシレジノール量に変化するかどうか、検討した。

初めにラセミ体のピノレジノール、ラリシレジノール、セコイソラリシレジノールの標品を解析した結果、それぞれ 3.1 分、1.9 分、1.7 分にピークが見られた(Fig. 1-14A-C)。

次に、野生型系統の粗酵素反応液と、*mpinZ*組換え系統の粗酵素反応液の UPLC-MS 分析を行った。野生型系統においては、ピノレジノールに由来するピークのみを検出した(Fig.1-15A,B)。一方、*mpinZ*組換え系統においては、ピノレジノールに由来するピークは消失し、ラリシレジノールに由来すると考えられるピークを検出した(Fig.1-15 C,D)。このピークについて、ラリシレジノールの分子量である *m/z* 359 を注目して分析した結果、同様の溶出時間にピークが得られた(Fig.1-15E,F)。

次に、上記と同様の容量で粗酵素を 50 μ g 使用し、24 時間反応させた試料を用いて、ラリシレジノールの下流に位置するセコイソラリシレジノールの検出を試みた。反応液を分析した結果、野生型系統においては、根から得られた粗酵素を分析した結果、ピノレジノールとラリシレジノールのピークを検出した(Fig.1-16A~D)。一方で、野生型系統の茎においては、ピノレジノールのピークのみが見られた(Fig.1-16E~H)。次に、*mpinZ*組換え系統の粗酵素反応液を解析した結果、根と茎から得られた酵素を両者においてラリシレジノールのピークのみが検出された(Fig.1-17A~H)。ラセミ体のセコイソラリシレジノールのリテンションタイムに、ピークは見られなかった。

以上から、野生型系統の粗酵素においても、粗酵素を長時間反応させると、ラリシレジノールが生成すること、*mpinZ*組換えシロイヌナズナの粗酵素において、ラリシレジノールは生成されるが、下流のセコイソラリシレジノールは検出出来るほど生成されないことが示された。野生型系統の根と茎に差が見られたのは、*Atprrr1* と *Atprrr2* の発現量を AtMet wxpress にて比較すると根のほうが茎より *Atprrr1* と *Atprrr2* の発現量が高いことが原因ではないかと考えられる。

1.3.10 PinZ の光学異性体に対する基質特異性の解析

mpinZ 組換えシロイヌナズナの粗酵素反応液の分析結果から、ラセミ体のピノレジノールはラリシレジノールへと変換されることが示された。ピノレジノールは不斉炭素原子を 2 つ有し、光学活性を有する。リグナンは植物細胞内で(+)体と(-)体の比率が異なって蓄積している。これはモノマーが 8・8'炭素間で重合する際に、ディリジェントプロテインと呼ばれる、エナンチオ選択的に重合させる酵素が存在していることに起因する[38]。*mpinZ*組換え BY-2 細胞や *mpinZ*組換えシロイヌナズナの PinZ 活性の分析においては、ラセミ体のピノレジノールを用いて分析を進めてきた。上記の結果によると、PinZ はラセミ体のピノレジノールをラリシレジノールへとそれぞれ変換していることが示されている。本実験では PinZ は光学活性のある分子に対して、エナンチオ選択性を有しているのかどうか調査した。

大腸菌で生産した His-tag 精製 PinZ、シロイヌナズナの野生型系統と *mpinZ*組換え系統 8 から回収した粗酵素を、ピノレジノール、 β -NADPH と反応させた。酵素反応液から酢酸エチルを用いて反応生成物を回収した後、キラルカラムを用いて順相 HPLC 分析を行った。

標品のピノレジノールのクロマトグラムでは、約 7 分と約 16 分にそれぞれピークが見られた。過去の文献より、約 7 分のピークは-体のピノレジノール、約 16 分のピークは+体のピノレジノールに一致する[26](Fig.1-18B)。次に、ラリシレジノールを HPLC で分析したところ、約 4 分にピークが見られた(Fig.1-18A)。以上より、本実験で使用したキラルカラムを用いた場合、ラセミ体のピノレジノールを分離することができたが、ラリシレジノールを分離させることは出来なかった。

次に野性型の粗酵素反応液を分析した結果、+体と-体のピノレジノールを検出した(Fig.1-18D)。一方、His-tag 精製 PinZ の反応液を分析した結果、ラリシレジノールを検出した(Fig.1-18C)。また、*mpinZ*組換えシロイヌナズナの系統 8 の粗酵素反応物を分析した結果、His-tag 精製 PinZ と同様の結果を得た(Fig.1-18G)。以上から、*mpinZ*組換えシロイヌナズナの粗酵素では、その比活性と高さについては言及できないが、SYK-6株由来の PinZ と同様の機能を有している酵素が生産されていることが示された。

更に、*mpinZ*組換えシロイヌナズナの粗酵素を用いて、時間経過によるラセミ体のピノレジノールの減少を調査した。1分、3分、5分と酵素を反応させた結果、+体と-体のピノレジノールは両者とも同様に減少していき、ラリシレジノールが生成することが分かった(Fig.1-18E~G)。

以上から、PinZ は+体と-体のピノレジノールの双方をラリシレジノールへと効率よく変換することが示唆された。これまで報告された、植物から精製されたピノレジノールレダクターゼはエナンチオ選択性を持つ[10][24-27]。植物が光学異性体のリグナンを選択的に合成している理由は不明であるが、光学異性体の基質としてそれぞれの基質特異性の異なる酵素が存在するため、外敵ストレスに対して、より抵抗性の高いリグナ

ンを選択的に合成している可能性がある[8]。一方、PinZの場合は、リグナンを資化する目的で変換しているため、エナンチオ選択性がない方が有利であるためではないかと推察する。

1.3.11 *mpinZ*組換えシロイヌナズナに含まれるリグナンの定量

作出した *mpinZ* 組換えシロイヌナズナでは、*mpinZ* が発現し、PinZ が生産され、その粗酵素によりピノレジノールをラリシレジノールへと *in vitro* で変換されることが示された。そこで、代謝系において PinZ の触媒する基質の周辺、下流・上流の分子種および配糖体のリグナンを定量し、植物内における蓄積量や組成の変化を調査した。シロイヌナズナに蓄積するリグナンは岡澤らによって解析されている[34]。シロイヌナズナにおいては、ピノレジノール、ラリシレジノール、セコイソラリシレジノール、アルクチゲニン、エピピノレジノールなどのリグナンが検出されている。また、リグナンは配糖体化酵素によって配糖体として蓄積している分子種が存在する[29]。

野性型系統と *mpinZ* 組換えシロイヌナズナ系統 8 の 2 週齢の個体全体と、4 週齢の根、8 週齢の茎をそれぞれ回収し、マルチビーズショッカーにて試料を破碎した。破碎された試料からリグナンを抽出し、凍結乾燥機に連結した濃縮遠心機にて試料を濃縮した。

配糖体のリグナンのグルコシド結合を切断するため、グルコシダーゼ処理を行う試料においては、 β -グルコシダーゼを 20U 加えて、37°Cにて 2 時間反応させた。反応液からリグナンを再度抽出し、四重極タンデム型 UPLC-MS/MS に供した。

その結果を以下に示す(Table1-3.)。解析の結果、野生型においては、ピノレジノール、ラリシレジノール、ピノレジノールモノグルコシドを検出した。セコイソラリシレジノールは検出されなかった。一方、*mpinZ* 組換え系統においては、ピノレジノール、ピノレジノールモノグルコシド、ラリシレジノール、セコイソラリシレジノールを検出した。量は野生型と比較して、ピノレジノール、ピノレジノールモノグルコシドの蓄積量は大きく減少し、微量のラリシレジノールの増加とセコイソラリシレジノールが検出出来るほど蓄積していることが分かった。以上から、*mpinZ* の導入により、ピノレジノールとピノレジノールモノグルコシドの蓄積量が減少し、セコイソラリシレジノールの蓄積量が増加していることが示唆された。

過去に報告されているリグナンの蓄積量や組成の改変においても、同様にリグナンの蓄積量に変化していた[29~31]。このことから、SYK-6 株由来の PinZ を用いた場合でも、リグナンの組成を改変することができることが示唆された。しかしながら、本研究においては、全体で見た時の蓄積量は大きく変化しなかった。リグナンは植物種や組織によって蓄積量が異なる。蓄積量が異なるということは、その植物種や組織に応じて蓄積できる量が異なる、場所に応じて、蓄積するリグナンの種類が異なると推測される。

1.3.12 *mpinZ*組換えシロイヌナズナのトランスクリプトーム解析

上記の実験によって、植物細胞中で *PinZ* が生産され、活性を有していることが示唆された。そこで、*PinZ* の活性により、関連する他の遺伝子の発現量に変化が表れているか、*mpinZ*組換えシロイヌナズナから全 RNA を抽出し、cDNA を合成し、DNA シーケンサーにてトランスクリプトーム解析を行った。その結果を表に示す。

まず、リグナン生合成やフラボノイドなど既存の二次代謝産物の酵素遺伝子について発現量の変化を解析した(Table 1-4。シロイヌナズナの内在性のピノレジノールレダクターゼや、リグナン生合成経路と同様にモノリグノール生合成経路の中間生成物を出発物質とするフラボノイドやアントシアニンに関与する酵素遺伝子の発現量を解析した。野生型系統と *pinZ*組換え系統を比較した結果、根においては、発現量に顕著な差は見られなかった。一方、茎においては、フラボノイドやイソフラボノイドの生合成経路の最も上流に位置するカルコンシンターゼ (*At5g13930*) やフラボノイド (*At5g42800, At4g37660*)、アントシアニン(*At4g22870*)などを変換する酵素遺伝子の発現量が顕著に減少していることが分かった。

次に、モノリグノール生合成経路に関与する酵素の遺伝子の発現量について調査した。その結果、野生型系統と *pinZ*組換え系統において、根と茎で顕著な差は見られなかった。

更に、*mpinZ*組換え系統の根と茎において、遺伝子の発現量が顕著に増加、または減少している遺伝子をピックアップし、上位 20 遺伝子についてその機能を調査した (Table 1-5~Table 1-8。これらの増加、減少量は、発現量の増減と、発現量の相対的な増減量を基準としてデータを揃えた。

*mpinZ*組換えシロイヌナズナの根において、野生型系統のものと比較して発現量が増加しているものは、その殆どの遺伝子の機能が分かっていないものであった。しかしながら、エチレンや微生物に対して応答する遺伝子やタンパク質のレセプタータンパク質など、外からのストレス応答に関与する酵素の遺伝子も発現量が増加しているものの中にあつた。

次に、根において発現量が減少した遺伝子を見ると、グルコシダーゼとして機能する酵素遺伝子がいくつかピックアップされた。

茎において減少している遺伝子を見るとフラボノイド生合成関連などの外敵ストレスに応答する遺伝子が見られていた。

1.3.13 リグナン生合成経路に関わる他の分子種の組成変化の探索

上記の結果より、*mpinZ*を導入した組換えシロイヌナズナにおいて、**PinZ**が触媒する基質及び代謝系の上流及び下流の分子種の蓄積量や組成が変化していることが示された。そこで、リグナン生合成経路に関わる周辺の他の分子種の蓄積量及び組成に関して、アンターゲッティングメタボローム解析を行った。

野性型系統及び *mpinZ*組換えシロイヌナズナ系統 8 の 6 週齢の茎を回収し、凍結乾燥後、理化学研究所に送付し、解析していただいた。

その結果を以下に示す(Fig. 1-19~Fig.1-22)。代謝産物全体の分布および変化量を比較すると、ポジティブモードおよびネガティブモードにおいて、野生型系統と **PinZ** 組換え系統間で明確な差が見られた(Fig. 1-19,21)。また、顕著な差が見られた分子種を比較すると、*mpinZ*組換えシロイヌナズナ系統ではシナポイルマレート、シナピン酸、マロン酸、フマル酸などが増加していた。また、グルコブラシシンをはじめとするグルコシノレートが減少していた。

1.5 図表

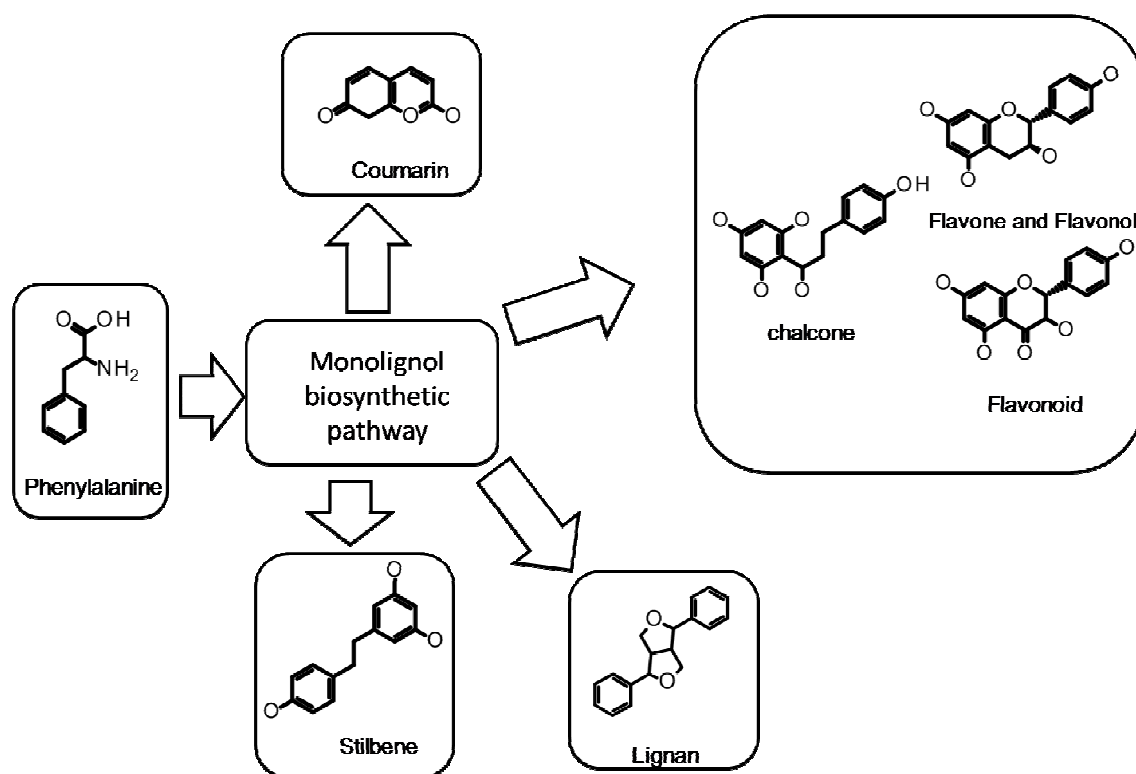


Figure 1-1 Plant extractable molecules derived from phenylalanine *via* monolignol biosynthetic pathway.

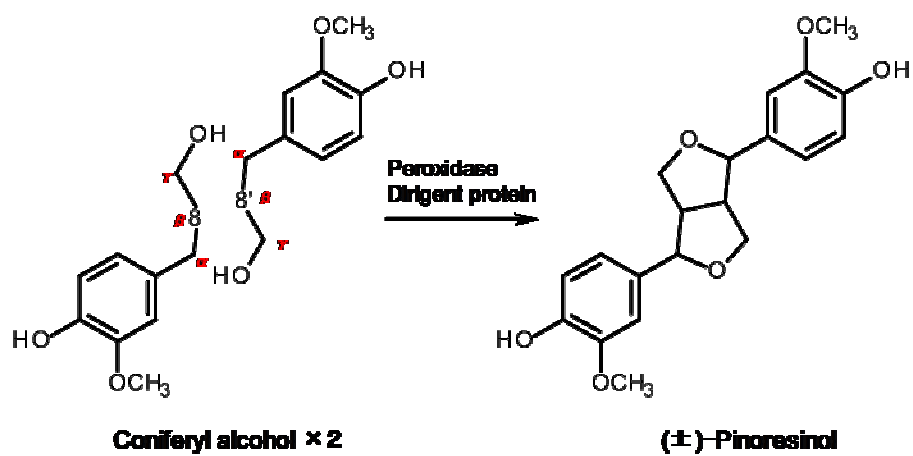


Figure 1-2 Radical coupling of Coniferyl alcohols with peroxidase and dirigent protein.

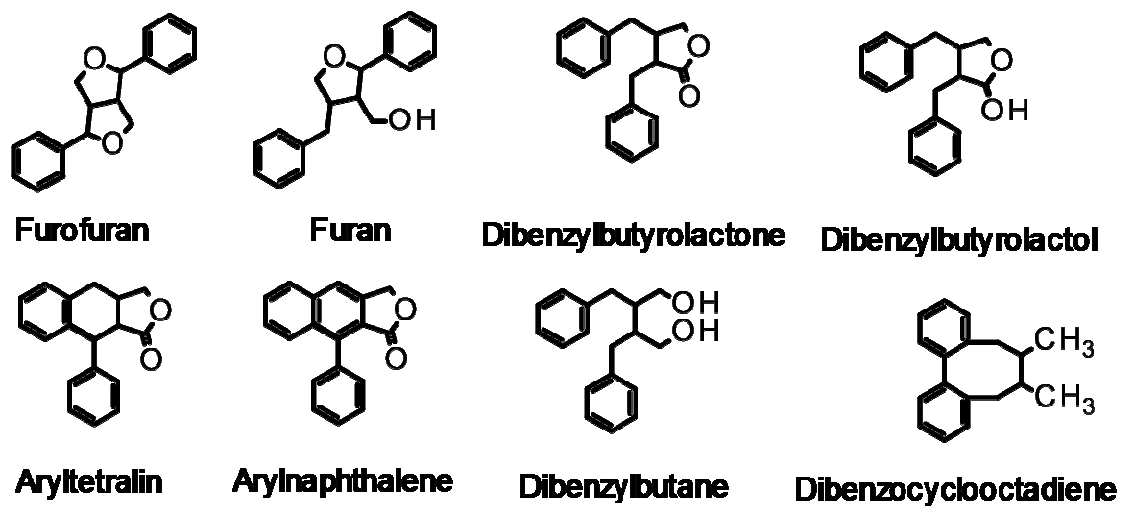


Figure 1-3 Basic skeletons of lignans.

10 20 30 40 50 60
 GGATCCAAAAATGACAAGTCAAGGTCGTATAGTTATCACAGGAGCTTCGGGACAATATGG
 M T S Q G R I V I T G A S G Q Y G
 70 80 90 100 110 120
 AAGGCTTGCTACAGACTTGCTGATCGCACAAAGGGCTGGCAGATAGGCTTATCCTTATCAC
 R L A T D L L I A Q G L A D R L I L I T
 130 140 150 160 170 180
 TAGATCTCCAGCTCGCCTCGCTGATAGAGTTGCGCAGGGTTGTACAGTAAGATATGGAGA
 R S P A R L A D R V A Q G C T V R Y G D
 190 200 210 220 230 240
 CTATGACAAGCCAGAGACGTTGGCTGATGCCGTCAGGGATGCTGAGAAGATGTTGCTAAT
 Y D K P E T L A D A V R D A E K M L L I
 250 260 270 280 290 300
 TTCAGGAACTCGTGTTGGCGCAAGAGTTGTCCAGCACAAAGCCGCAATAAACGCTGCAGC
 S G T R V G A R V V Q H K A A I N A A A
 310 320 330 340 350 360
 TGCAGCCGGCGTCAGACACATCCTTTACACCAGCTTTATAGGCATTGACGATCCAGCAAAA
 A A G V R H I L Y T S F I G I D D P A N
 370 380 390 400 410 420
 TCCCGCAGAAGTACGGCACGATCATATTGAGACAGAACGGCTAATGCGTGCCTCAGGAAT
 P A E V R H D H I E T E R L M R A S G M
 430 440 450 460 470 480
 GGCATGGACAGCGCTGAGGGATGCTCATTATGCAGATGCTATGTTGCTCATGGCAGGTCC
 A W T A L R D A H Y A D A M L L M A G P
 490 500 510 520 530 540
 AGGGATGATGGCCACCGGCCAATGGGTGTCTAATGCCGGTGACGGGAGAGAAGCTATGGT
 G M M A T G Q W V S N A G D G R E A M V
 550 560 570 580 590 600
 TTGGCGAGATGATTGTGTGGCTTGTGCGGTTGCCGTGCTCACCACACCTGGTCATGAGAA
 W R D D C V A C A V A V L T T P G H E N
 610 620 630 640 650 660
 CAAGGTTTACAATATTACTGGGCCTGCTCTTCAGACTTTCGATGAAGTCGCTGCGTTGGT
 K V Y N I T G P A L Q T F D E V A A L V
 670 680 690 700 710 720
 GAGAGAGATAACCGGAAGACCGCTTGAACATGTAAAGGTGGGTGATGAAGGACAATATGC
 R E I T G R P L E H V K V G D E G Q Y A

730 740 750 760 770 780
 TCTCTTTGATGCTATGGGAATTCCTCGTCGTCCTGTAGACGATCAGTACGTTAGGGGAAT
 L F D A M G I P R R P V D D Q Y V R G I
 790 800 810 820 830 840
 TCCTTGGAACTCTGATGACATGGTGACGTTTGGTAGAGCTATTCGAGAAGGTTTCTTAGA
 P W N S D D M V T F G R A I R E G F L E
 850 860 870 880 890 900
 GATCTGCACGGATGATGTTGAGAACTTACTGGTCGCAAAGCGAGATCCGTTTCGACAGAT
 I C T D D V E K L T G R K A R S V R Q M
 910 920 930 940 950 960
 GATTGAAGAGAACAGGGCGATGTTACAAGCTGCAGCTGACAATGCGGCTCAACCGGCATG
 I E E N R A M L Q A A A D N A A Q P A
 970
 AGCTC

Figure 1-4 Nucleotide sequence of *mpinZ* (965bp) and deduced amino acid sequence of PinZ (316 amino acid residues)

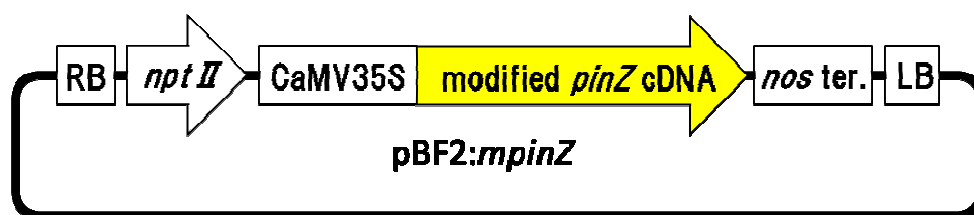


Figure 1-5 Binary vector for plant transformation, pBF2:*mpinZ*



Figure 1-6 *mpinZ* transformed BY-2 calli

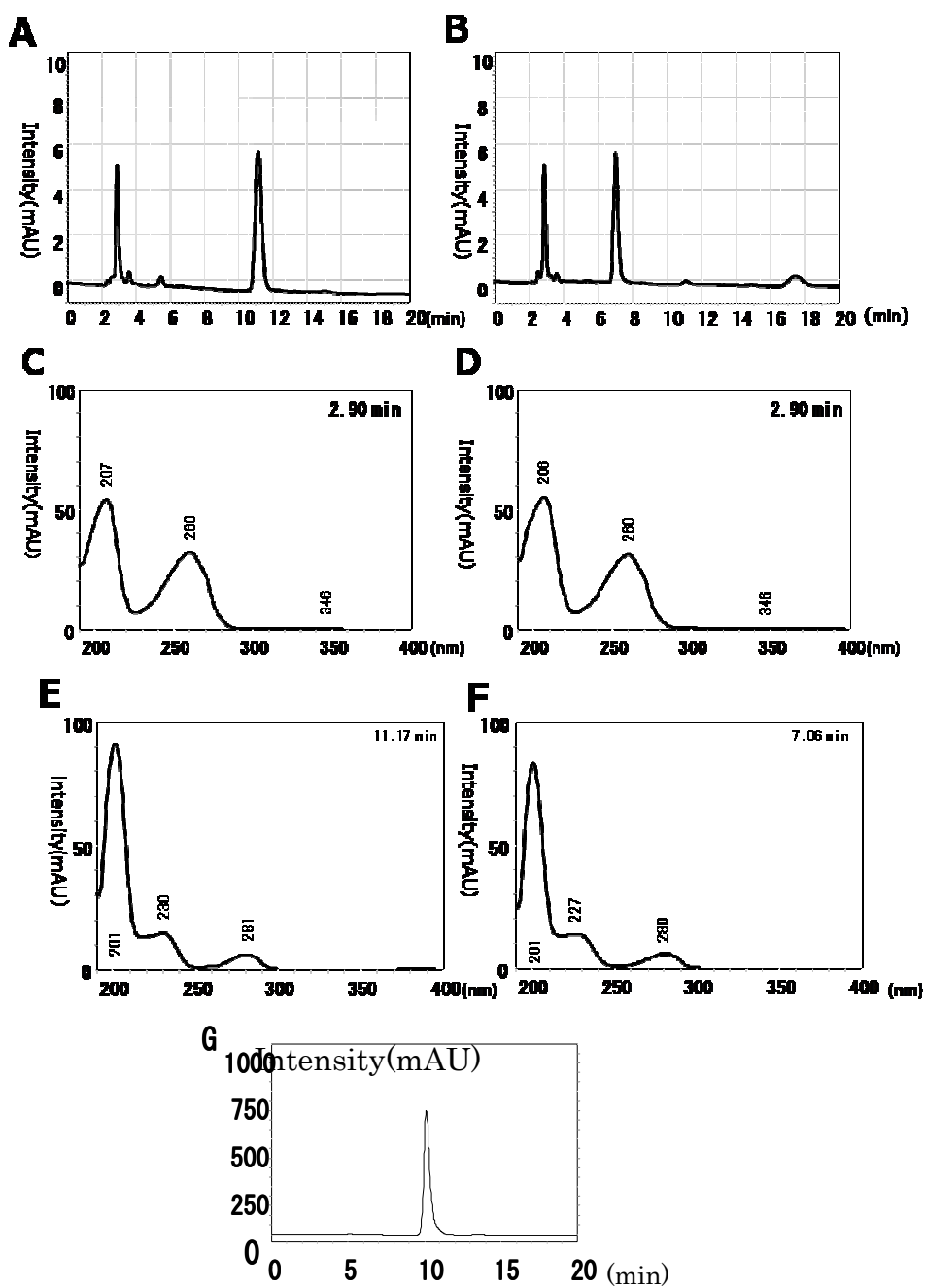


Figure 1-7 Chromatogram of reaction mixture with BY-2 cell and pinoresinol.

(A) Chromatogram of reaction mixture with wild type cells.

(B) Chromatogram of reaction mixture with *mpinZ* transformed cells (transgenic line#3).

(C) Absorption spectrum of the peak at 2.90 min in panel (A).

(D) Absorption spectrum of the peak at in panel (B).

(E) Absorption spectrum of the peak at 11.17 min in panel (A)

(F) Absorption spectrum of the peak at 7.06 min in panel (B)

(G) Chromatogram of racemic pinosresinol

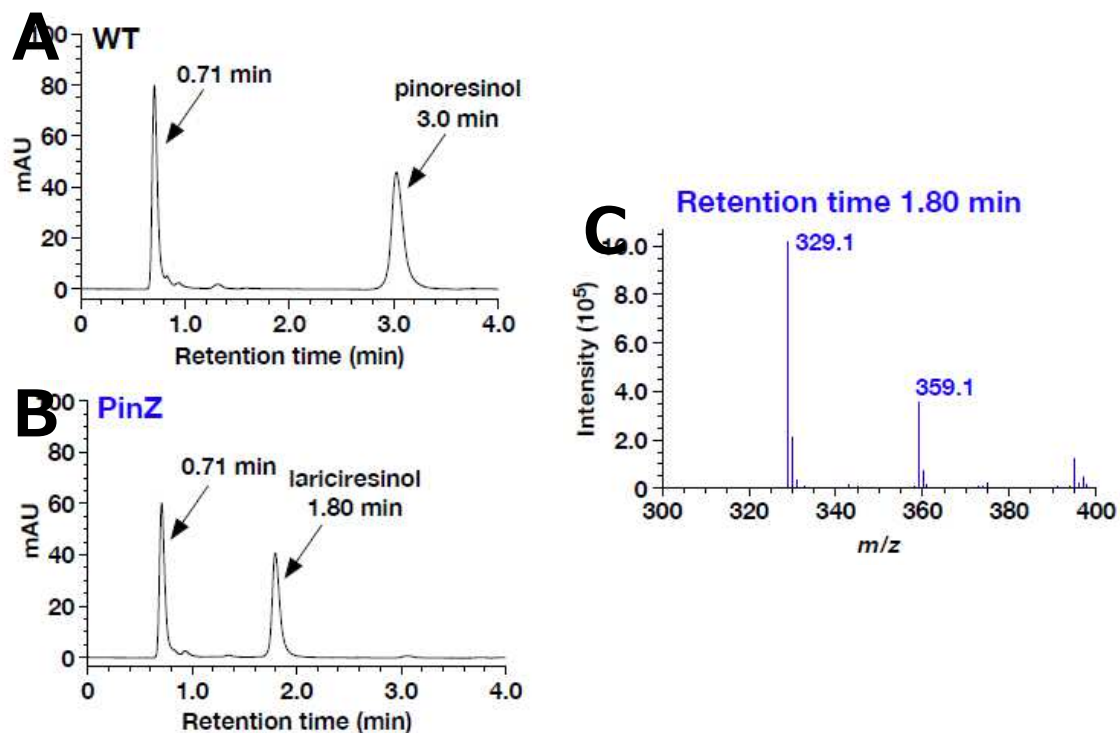


Figure 1-8 Chromatogram of reaction mixture with the crude enzyme and mass spectrometry by UPLC-MS analysis.

A: Chromatogram of the reaction mixture from Wild type.

B: Chromatogram of the reaction mixture from *mpinZ* line 3 transformant.

C: Mass spectrometry of 1.80 min chromatogram peak from Figure B.

Table 1-1 Nucleotide sequence of specific primers of *mpinZ*, *Atpr1*, *Atpr2* and *Atact2* for RT-PCR.

<i>mpinZ</i>	Forward	5'-GCAGCCGGCGTCAGACACAT-3'
	Reverse	5'-TCAAAGAGGCTGGTAACGTAAAG-3'
<i>Atpr1</i>	Forward	5'-GAGTTGGAGAAGACCTATGTTTCAG-3'
	Reverse	5'-CAATGAGCTTCGTATTGCTCC-3'
<i>Atpr2</i>	Forward	5'-TGCCGGTTGAGCCGCATTGT-3'
	Reverse	5'-ACCCACAACGTAAGTGTAAGGAA-3'
<i>AtAct2</i>	Forward	5'-TCACATCCGGATAGAGTTTAGTAGC-3'
	Reverse	5'-GCATCTGAATCTCTCAGCACC-3'

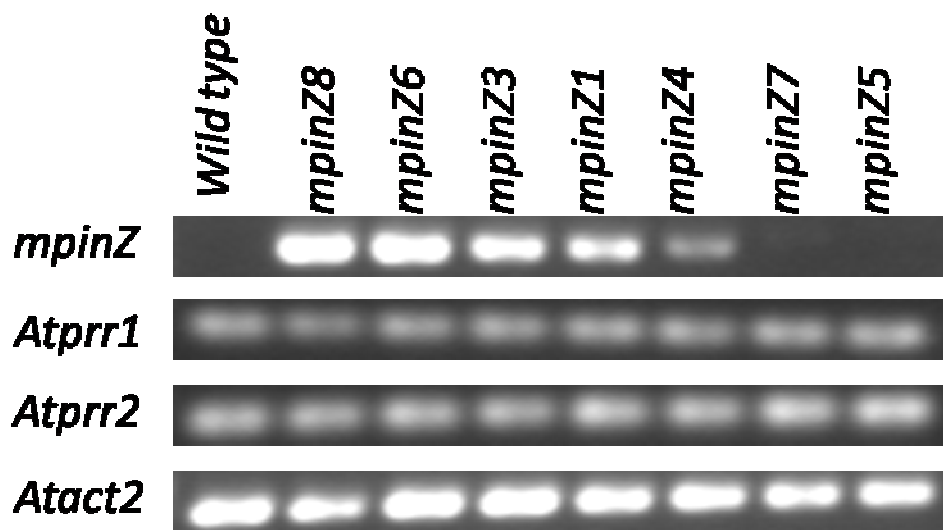


Figure 1-9. Expression analysis of *mpinZ*, *Atpr1*, *Atpr2* and *Atact2* in root tissue in wild-type and transgenic plants.

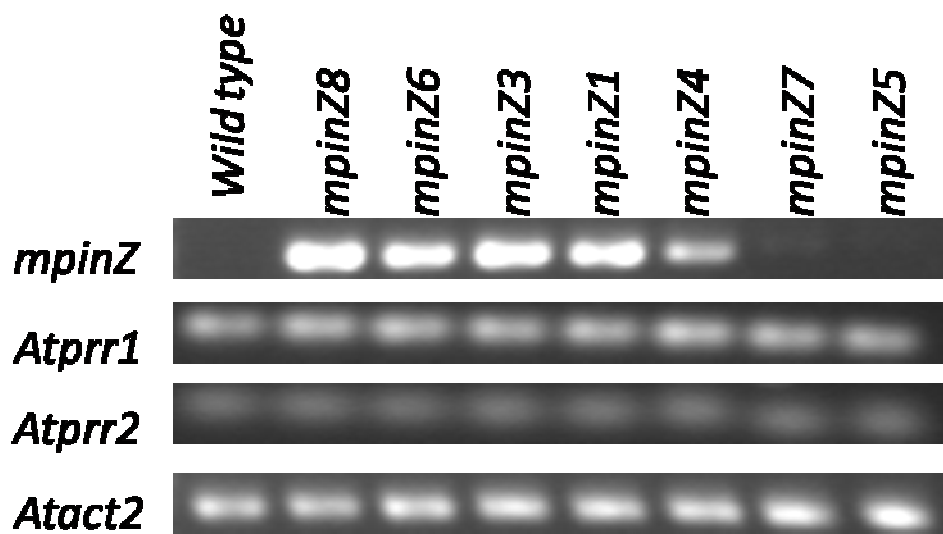


Figure 1-10 Expression analysis of *mpinZ*, *Atpr1*, *Atpr2* and *Atact2* in stem tissue in wild-type and transgenic plants.

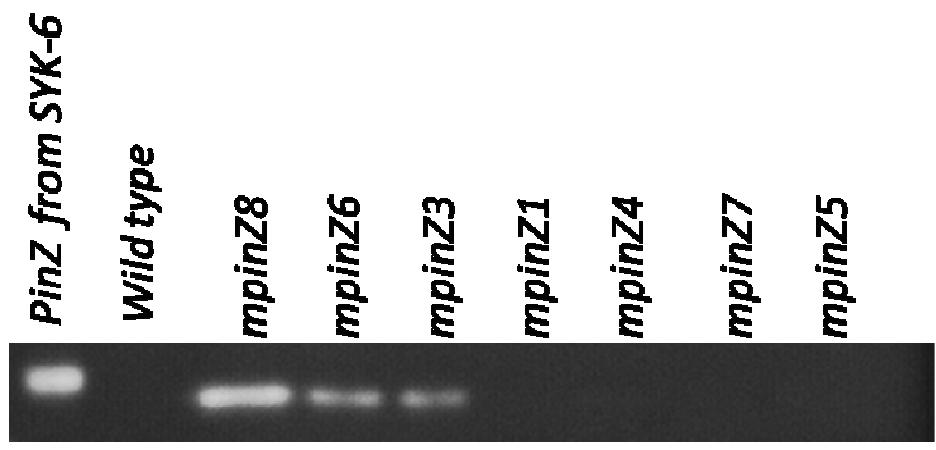


Figure 1-11 Immunological detection of PinZin extracts from wild-type and transgenic plants

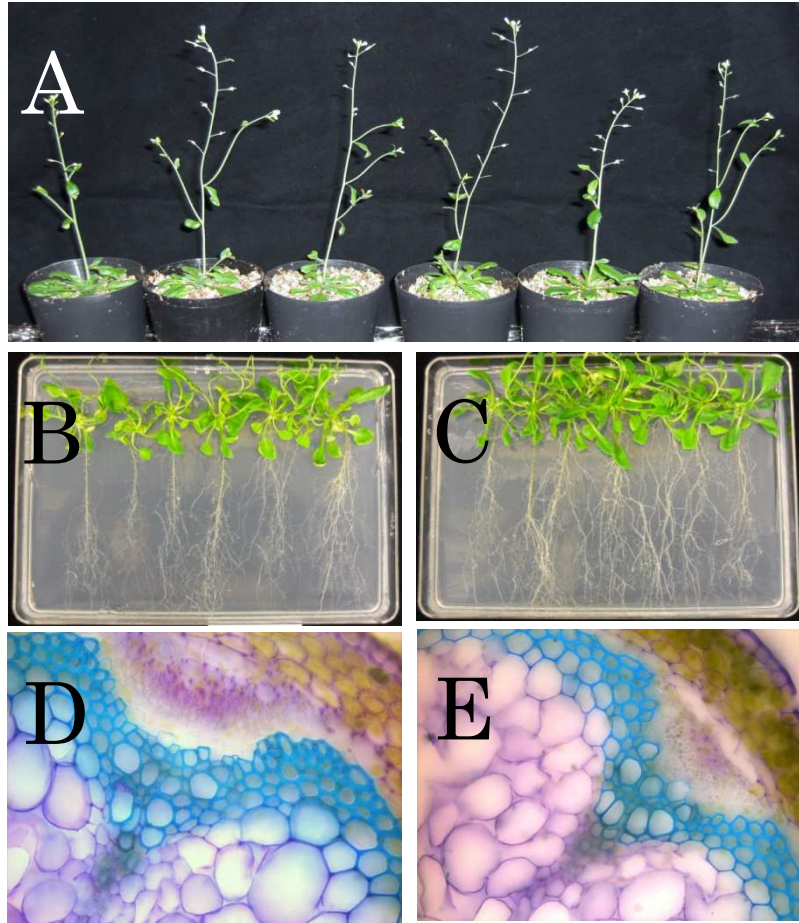


Figure 1-12 Comparison of wild type and *mpinZ* plants

A: Appearance of 8 week-old wild-type plants (three plants of the left side) and *mpinZ* plants (three plants of the right side).

B: Appearance of 4 week-old wild-type plants on MS medium.

C: Appearance of 4 week-old *mpinZ* plants on MS medium.

D: Stem cross-section of the 8 week-old wild-type plant.

E: Stem cross-section of the 8 week-old *mpinZ* plant.

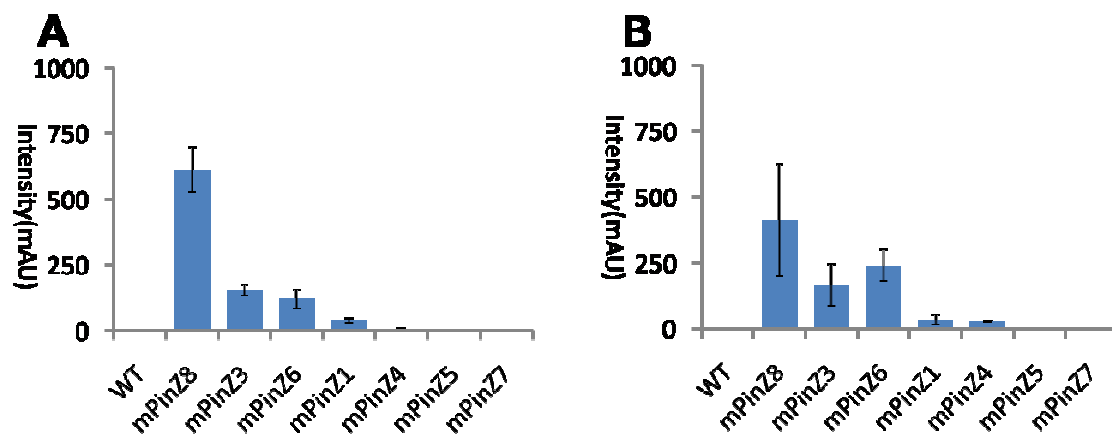


Figure 1-13 PinZ activities of wild-type plant and *mpinZ* transformants

Table 1-2 Amount of PinZ catalytic activities of wild type and *mpinZ* transformants

C

	Root	Stem
WT	N.D.	N.D.
mPinZ8	613.4±86.6	413.6±212.5
mPinZ3	155.2±19.7	166.5±78.6
mPinZ6	120.8±35.8	240.0±60.4
mPinZ1	38.9±10.6	34.1±20.5
mPinZ4	3.8±6.5	26.3±4.0
mPinZ5	N.D.	N.D.
mPinZ7	N.D.	N.D.

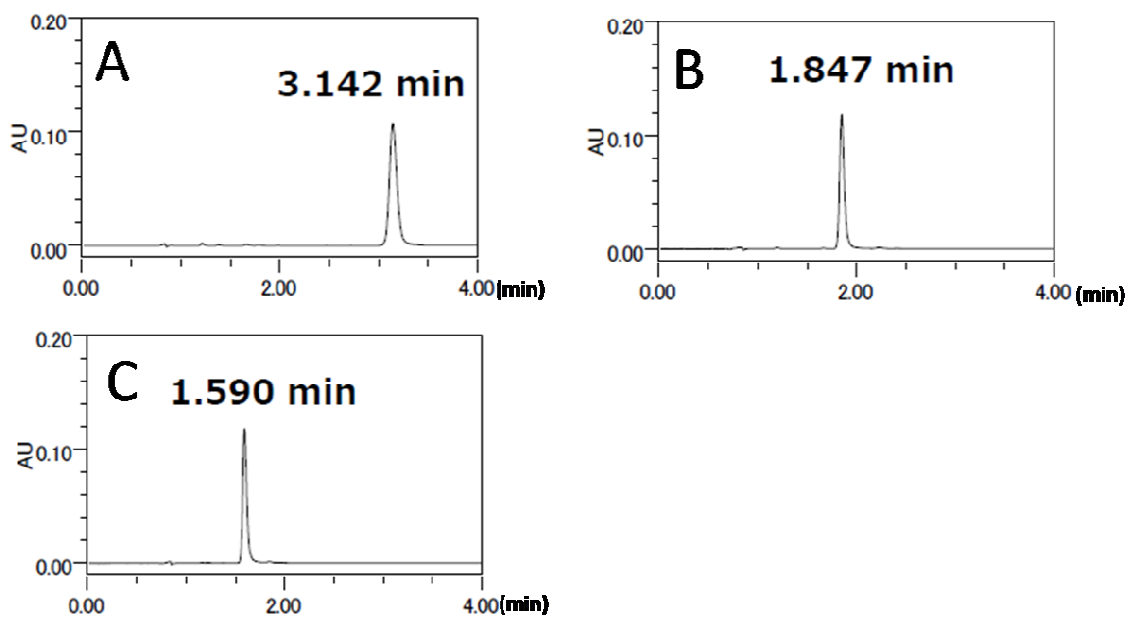


Figure 1-14 Chromatgrams of authentic compounds obtained from HPLC analysis.

A: Pinoresinol

B: Lariciresinol

C: Secoisolariciresinol

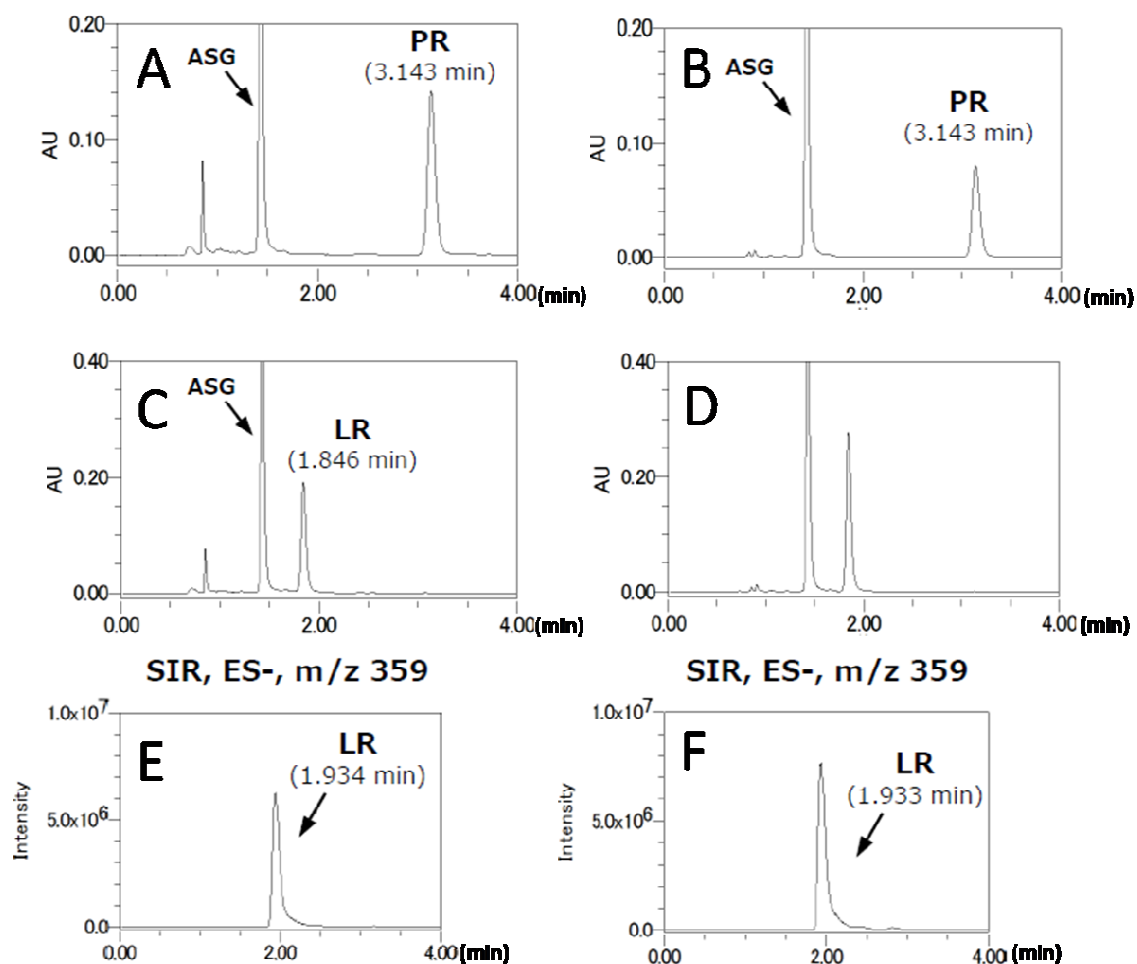


Figure 1-15 Chromatograms of reaction mixtures with extracts from wild-type and transgenic (line 8) plants.

A: Crude enzyme from roots in wild type plant (4 weeks old)

B: Crude enzyme from roots in transgenic plant (line #8, 4 weeks old)

C: Crude enzyme from stems in wild type plant (6 weeks old)

D: Crude enzyme from stems in transgenic plant (line #8, 6 weeks old)

E: Selected mass spectrum at m/z 359 in panel C (PR, pinoresinol)

F: Selected mass spectrum at m/z 359 in panel D (LR, lariciresinol)

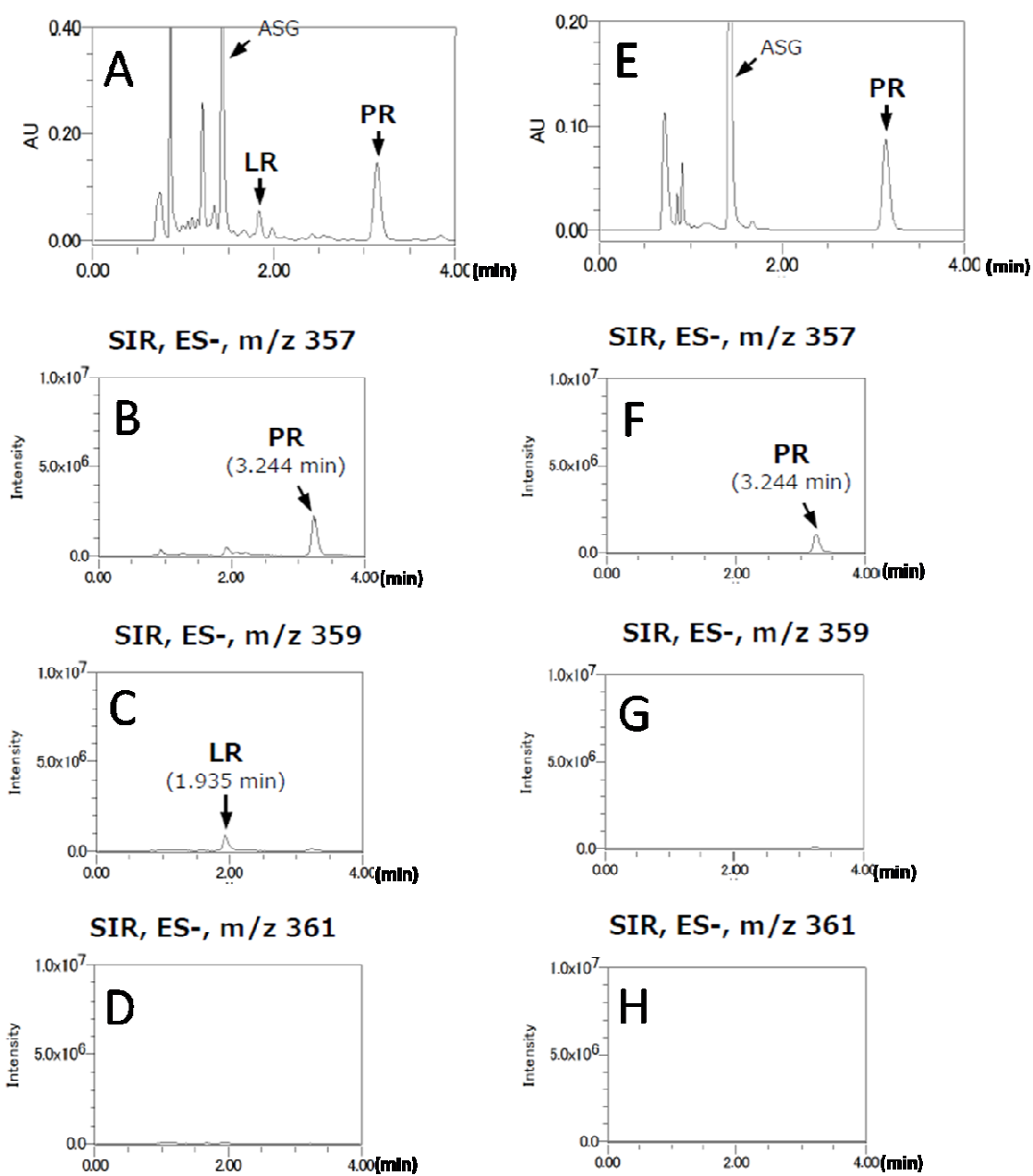


Figure 1-16 Chromatogram of reaction mixture from wild type plant

A: Crude enzyme from wild type 4 week-old root

B: m/z 357 from Figure A (pinoresinol)

C: m/z 359 from Figure A (Lariciresinol)

D: m/z 361 from Figure A (Secoisolariciresinol)

E: Crude enzyme from wild type 6 week-old Stem

F: m/z 357 from figure E (pinoresinol)

G: m/z 359 from figure E (Lariciresinol)

H: m/z 361 from figure E (Secoisolariciresinol)

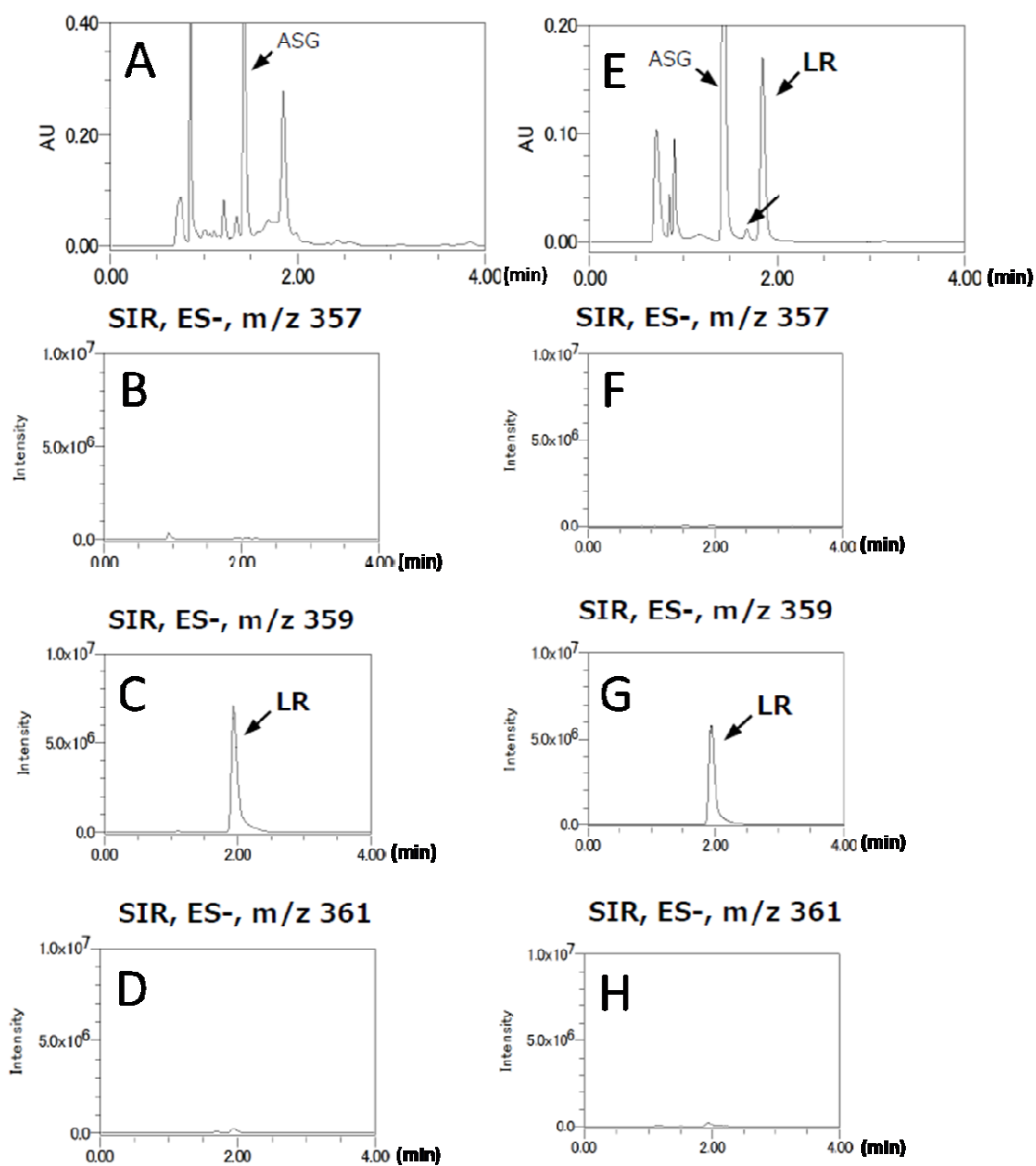


Figure 1-17 Chromatogram of reaction mixture from *mpinZ* line 8 plant

A: Crude enzyme from *mpinZ* 4 week-old root

B: *m/z* 357 from Figure A (pinoresinol)

C: *m/z* 359 from Figure A (Lariciresinol)

D: *m/z* 361 from Figure A (Secoisolariciresinol)

E: Crude enzyme from *mpinZ* 6 week-old Stem

F: *m/z* 357 from Figure E (pinoresinol)

G: *m/z* 359 from Figure E (Lariciresinol)

H: *m/z* 361 from Figure E (Secoisolariciresinol)

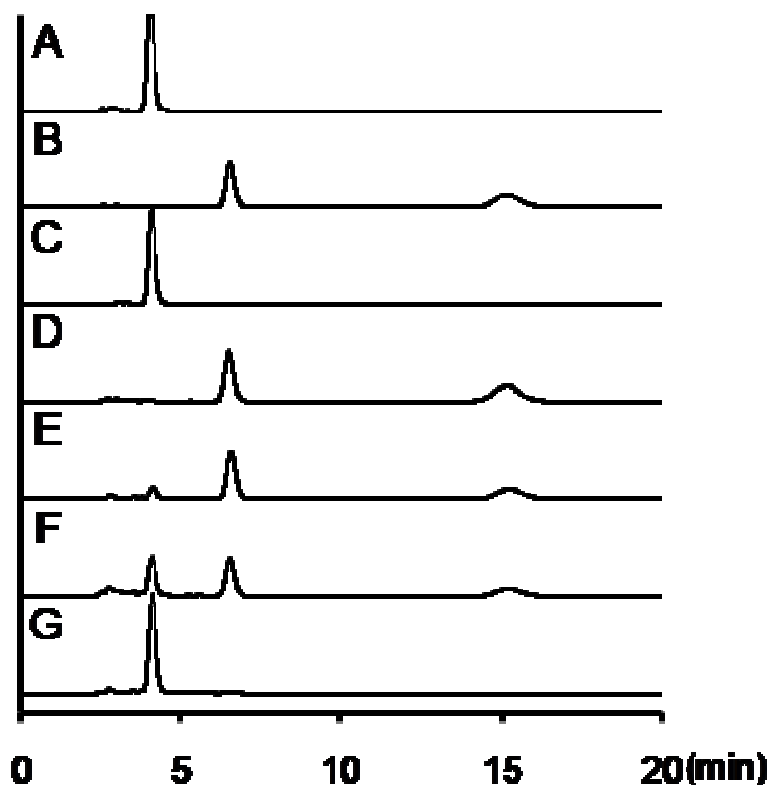


Figure1-18 Chromatgrams of reaction mixtureswith pinoresinol and crude extracts from wild-type and transgenic plants. The mixtures were analyzed using chiral column.

A:Lariciresinol (authentic compound)

B:Pinoresinol (authentic compound)C: Reaction mixture with pinoresinol and recombinant PinZ prepared from *E. coli* (50 μ g). The reaction time was 10min.

D:Reaction mixture with pinoresinol andcrude extracts prepared from wild-type plant (20 μ g)The reaction time was 10min.

E:Reaction mixture with pinoresinol andcrude extracts prepared from *mpinZ*plant (20 μ g).The reaction time was 1min.

F:Reaction mixture with pinoresinol andcrude extracts prepared from *mpinZ*plant (20 μ g).The reaction time was 3 min.

G:Reaction mixture with pinoresinol andcrude extracts prepared from *mpinZ*plant (20 μ g).The reaction time was 10 min.

Table1-3 Lignan composition of lignans in wild-type and transgenic plants

		BGT	Pin-Glc	Pin	Sec	Lar	Epi	Total
Seedling	WT	×	12.09±1.54	0	0	0	0	12.09±1.54
	<i>mpinZ8</i>	×	0	0	0	0	0	0
	WT	○	0	26.69±3.13	0	53.65±3.47	0.6±0.27	80.94±6.36
	<i>mpinZ8</i>	○	0	0	2.89±0.55	58.4±10.96	0	61.28±10.70
Root	WT	×	17.62±0.66	2.26±0.33	0	11.36±4.18	0	31.24±4.28
	<i>mpinZ8</i>	×	3.73±1.10	1.42±0.21	0.72±0.35	25.18±9.06	0	31.05±9.61
	WT	○	0	34.32±3.77	0.17±0.29	294.27±63.40	11.47±3.49	340.23±69.99
	<i>mpinZ8</i>	○	0	4.4±0.24	24.93±0.26	342.5±64.98	0.56±0.20	372.39±87.91
Leaf	WT	×	4.36±0.94	0	0	0	0	4.36±0.49
	<i>mpinZ8</i>	×	0	0	0	0	0	0
	WT	○	0	23.53±0.52	0.79±0.43	30.37±4.40	0.38±0.16	55.06±4.98
	<i>mpinZ8</i>	○	0	0	5.07±2.77	32.27±0.85	0	37.35±6.78
Stem	WT	×	0.05±0.09	0	0	0	0	0.05±0.09
	<i>mpinZ8</i>	×	0	0	0	0.46	0	0.46±0.22
	WT	○	0	3.72±0.85	0	5.86±0.87	0	9.58±1.72
	<i>mpinZ8</i>	○	0	0	0.15±0.25	12.62±2.85	0	12.76±2.60

Values represent the average of 3 biological replications with standard deviation and are expressed as nanograms dry weight (in milligrams) of each sample with (treatment) or without (-) beta-glucosidase treatment (BGT). The total amounts of the 5 detected lignans (Total) are also indicated.

Table1-4 Expression levels of pinoresinol reductase gene, flavonoid biosynthetic pathway related genes and monolignol biosynthetic pathway related genes.

Coding proteins of Blast hit sequences	Root		Stem	
	Wild type	<i>mpinZ</i> line 8	Wild type	<i>mpinZ</i> line 8
Pinoresinol reductase1	1.65	1.61	1.16	1.40
Pinoresinol reductase2	1.95	1.96	0.17	-0.58
Chalcone synthase	2.72	2.69	1.64	-0.06
Dihydroflavonol-4-reductase	1.83	1.59	1.57	0.49
Leucoanthocyanidin dioxygenase	1.43	1.31	1.35	0.26
Flavonoid-3-monooxygenase	1.30	1.25	0.75	0.08
Naringenin-2-oxoglutarate-3-dioxygenase	1.92	1.93	0.26	-0.69
PAL1	2.35	2.33	1.64	1.84
PAL2	2.15	2.11	1.76	1.74
PAL3	-0.47	-0.31	1.92	1.77
PAL4	1.49	1.48	0.87	1.20
C4H	2.54	2.51	1.84	1.96
4CL2	1.68	1.67	1.04	1.07
4CL3	0.95	0.98	-0.32	
4CL4	1.24	1.23	0.80	0.92
F5H	0.24	0.53	0.17	0.22
F5H	1.45	1.52	1.92	1.84
CAD1	1.16	1.26	1.29	1.08
CAD3	0.51	0.40	1.14	0.78
CAD4	2.04	2.07	0.55	0.86
CAD5	1.04	1.04	1.09	1.16
CAD7	-0.71			
CAD8			0.21	0.22

Table1-5 Top 20 contig sequences increase expression level compared of *mpinZ* line 8 and wild type plants in root

Root		Top 20 contig sequences increase expression level compared of <i>mpinZ</i> line 8 and wild type plants
Wild type	<i>mpinZ</i> line 8	
-1.04	2.02	gi 9857881 gb AAG00918.1 AF270470_2 neomycin phosphotransferase [Cloning vector pBIG]
-1.26	1.53	gi 30089002 gb AAP13536.1 avermectin-sensitive chloride channel GluCl alpha/yellow fluorescent protein fusion [synthetic construct]
0.25	2.49	gi 42573541 ref NP_974867.1 probably inactive receptor-like protein kinase [<i>Arabidopsis thaliana</i>] At5g41680
2.07	3.32	gi 347527117 ref YP_004833864.1 putative oxidoreductase [<i>Sphingobium</i> sp. SYK-6]
-1.10	0.02	gi 13449334 ref NP_085516.1 ribosomal protein L2 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
-0.30	0.67	gi 18424884 ref NP_569000.1 elicitor peptide 2 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
-0.60	0.37	gi 15218526 ref NP_177398.1 protein kinase-like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>] At1g72540
-0.65	0.31	gi 79318519 ref NP_001031089.1 uncharacterized protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
-0.20	0.77	gi 3451076 emb CAA20472.1 putative protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
-0.46	0.51	gi 15229405 ref NP_188965.1 ethylene-responsive transcription factor 1B [<i>Arabidopsis thaliana</i>] At3g23240
-0.57	0.40	No hits found
-0.37	0.56	gi 30687312 ref NP_850289.1 copper transporter 4 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
-0.58	0.33	No hits found
-0.27	0.63	No hits found
-0.71	0.18	No hits found
-0.60	0.29	gi 15235397 ref NP_192991.1 uncharacterized protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
-0.66	0.21	gi 3702349 gb AAC62906.1 putative mitogen-activated protein kinase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
-0.72	0.11	gi 9294032 dbj BAB01989.1 unnamed protein product [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
-0.39	0.43	No hits found
-0.73	0.09	No hits found

Table 1-6 Top 20 contig sequences decrease expression level compared with *mpinZ* line 8 plants in root

Root		Top 20 contig sequences decrease expression level compared with <i>mpinZ</i> line 8 plant
Wild type	<i>mpinZ</i> line 8	
2.61	1.03	No hits found
0.37	-0.87	gi 15241485 ref NP_196417.1 glucan endo-1,3-beta-glucosidase-like protein 3 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]At5g08000
0.66	-0.55	gi 186507172 ref NP_001118498.1 <i>N</i> -acetyltransferase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
0.18	-1.01	gi 52354333 gb AAU44487.1 hypothetical protein AT3G50120 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
0.22	-0.92	gi 357519537 ref XP_003630057.1 Glucan 1,3-beta-glucosidase [<i>Medicago truncatula</i>]
0.72	-0.40	gi 15240104 ref NP_201485.1 SAP domain-containing protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
0.16	-0.90	gi 22326918 ref NP_197594.2 Glycosyl hydrolase family protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
0.16	-0.91	No hits found
0.48	-0.55	gi 334183411 ref NP_001185260.1 receptor like protein 9 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
0.02	-1.00	gi 297797595 ref XP_002866682.1 hypothetical protein ARALYDRAFT_358759 [<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>]
0.10	-0.89	No hits found
0.37	-0.62	gi 4572666 gb AAD23881.1 unknown protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
0.15	-0.84	gi 12324680 gb AAG52303.1 AC011020_10 hypothetical protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
0.13	-0.85	No hits found
-0.18	-1.17	gi 15219651 ref NP_176813.1 transcription factor MYB90 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
0.36	-0.58	No hits found
0.31	-0.64	gi 6041854 gb AAF02163.1 AC009853_23 unknown protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
0.31	-0.63	gi 30684141 ref NP_193503.2 SBP (S-ribonuclease binding protein) family protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
-0.24	-1.13	gi 15242428 ref NP_199366.1 uncharacterized protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
0.02	-0.87	gi 18420011 ref NP_568022.1 uncharacterized protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]

Table1-7 Top 20 contig sequences increase expression level compared of *mpinZ* line 8 and wild type plants in stem

Stem		Top 20 contig sequences increase expression level compared of <i>mpinZ</i> line 8 and wild typeplants
Wild type	<i>mpinZ</i> line 8	
-0.49	2.78	gi 347527117 ref YP_004833864.1 putative oxidoreductase [<i>Sphingobium</i> sp. SYK-6]
-0.89	1.65	gi 5881675 dbj BAA84366.1 matK [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
-1.09	1.28	gi 7525042 ref NP_051068.1 acetyl-CoA carboxylase beta subunit [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
-0.30	2.03	gi 297837979 ref XP_002886871.1 predicted protein [<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>]
-0.21	2.10	gi 112253871 ref YP_717127.1 maturase-related protein [<i>Brassica napus</i>]
-0.61	1.65	gi 112253917 ref YP_717171.1 apocytochrome b [<i>Brassica napus</i>]
-0.01	2.11	gi 339516196 gb AEJ82586.1 cytochrome b6 [<i>Ricinus communis</i>]
-0.79	1.32	gi 7525091 ref NP_051115.1 NADH dehydrogenase subunit 7 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
-0.71	1.38	No hits found
-0.02	2.07	gi 112253905 ref YP_717160.1 hypothetical protein BrnapMp063 [<i>Brassica napus</i>]
-0.85	1.18	gi 5881746 dbj BAA84437.1 NADH dehydrogenase ND4 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
0.17	2.18	gi 334185345 ref NP_001189891.1 (S)-2-hydroxy-acid oxidase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
-0.55	1.46	gi 7525076 ref NP_051101.1 Ycf2 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
-0.39	1.60	gi 13449334 ref NP_085516.1 ribosomal protein L2 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
-0.78	1.11	gi 4538901 emb CAB39638.1 RNA-directed DNA polymerase-like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
1.15	3.01	gi 357436159 ref XP_003588355.1 Mitochondrial protein, putative [<i>Medicago truncatula</i>]
-0.80	1.03	gi 147855864 emb CAN78624.1 hypothetical protein VITISV_041103 [<i>Vitis vinifera</i>]
0.08	1.89	gi 112253872 ref YP_717097.1 NADH dehydrogenase subunit 5 [<i>Brassica napus</i>]
2.21	4.02	gi 357488215 ref XP_003614395.1 hypothetical protein MTR_5g051140 [<i>Medicago truncatula</i>]
-0.61	1.18	No hits found

Table 1-8 Top 20 contig sequences decrease expression level compared of *mpinZ* line 8 and wild type plants in stem

Stem		Top 20 contig sequences decrease expression level compared of <i>mpinZ</i> line 8 and wild type plants
Wild type	<i>mpinZ</i> line 8	
1.64	-0.06	gi 15240753 ref NP_196897.1 chalcone synthase [<i>Arabidopsis thaliana</i>] At5g13930
1.14	-0.45	gi 18398719 ref NP_564416.1 uncharacterized protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
1.01	-0.35	gi 15235390 ref NP_192987.1 bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin-like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>] At4g12500
0.67	-0.68	gi 3021274 emb CAA18469.1 serine/threonine kinase-like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
0.61	-0.64	gi 18402593 ref NP_566660.1 TRAF-like family protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]At3g20370
2.75	1.50	gi 15238684 ref NP_197293.1 uncharacterized protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
2.62	1.40	gi 30695554 ref NP_199696.2 tetratricopeptide repeat domain-containing protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]At5g48850
1.71	0.51	gi 42572219 ref NP_974204.1 uncharacterized protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
0.84	-0.34	No hits found
0.34	-0.80	gi 15236116 ref NP_194342.1 ankyrin repeat and BTB/POZ domain-containing protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
0.61	-0.52	No hits found
0.64	-0.49	gi 15220697 ref NP_174313.1 putative inositol transporter 2 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
0.75	-0.36	gi 116830711 gb ABK28313.1 unknown [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
0.79	-0.30	gi 18397376 ref NP_564349.1 protein TIFY 5A [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
0.58	-0.52	gi 334183341 ref NP_001185239.1 S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase domain-containing protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
0.68	-0.41	gi 30682825 ref NP_850063.1 uncharacterized protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
1.35	0.26	gi 15235853 ref NP_194019.1 leucoanthocyanidin dioxygenase [<i>Arabidopsis thaliana</i>] At4g22880
1.57	0.49	gi 15239063 ref NP_199094.1 dihydroflavonol-4-reductase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
0.90	-0.19	gi 18410311 ref NP_565061.1 kunitz trypsin inhibitor 1 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
0.50	-0.58	gi 15237902 ref NP_197803.1 Squalene monooxygenase 1,1 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]At5g24150

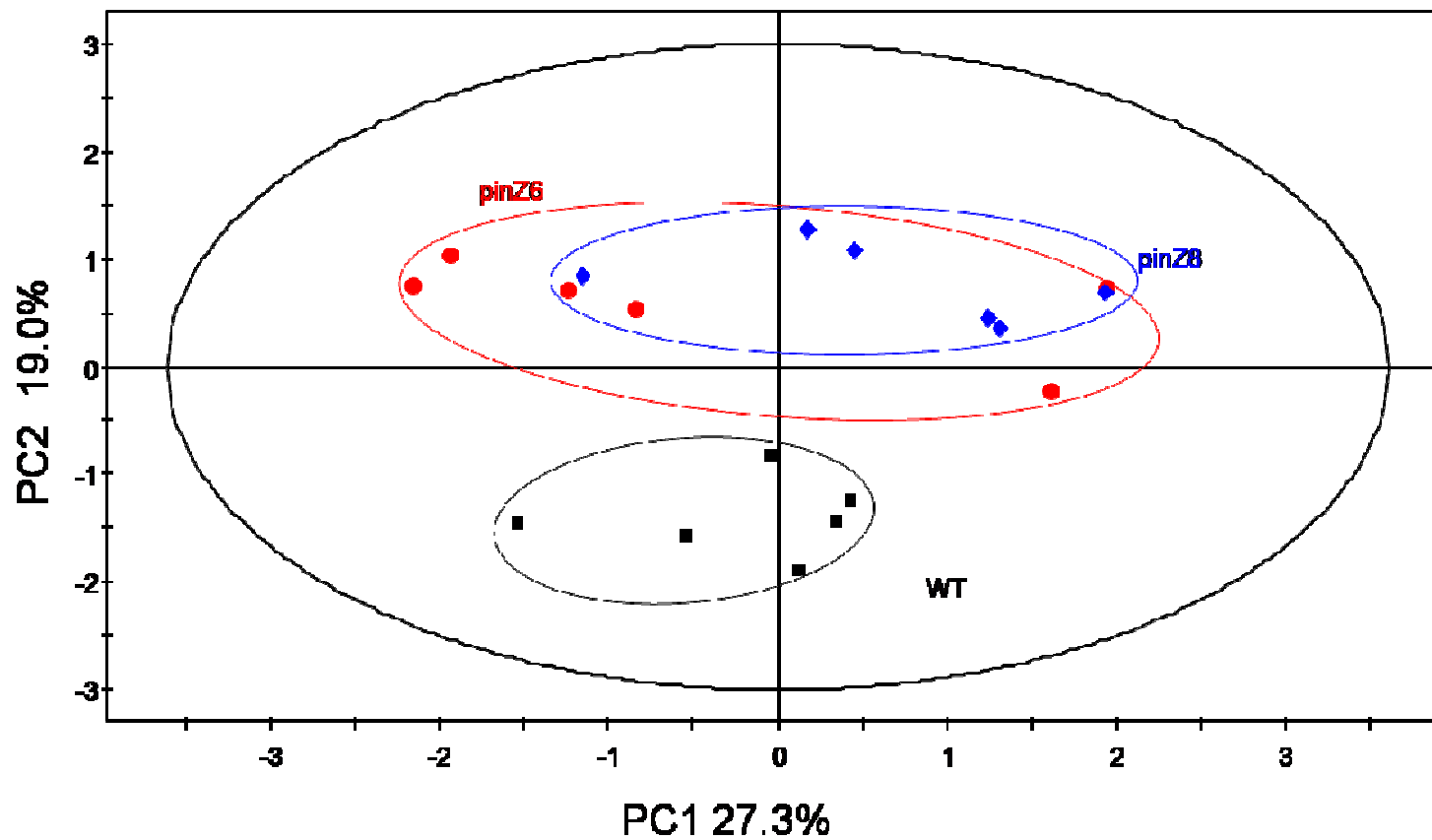


Figure 1-19 principal component analysis of detected metabolite in stem tissues of wild-type plant and two independent transgenic lines, #6 and #8. Methanol soluble metabolites from the plants were analyzed by LC-Q-TOF-MS(Positive ion mode).

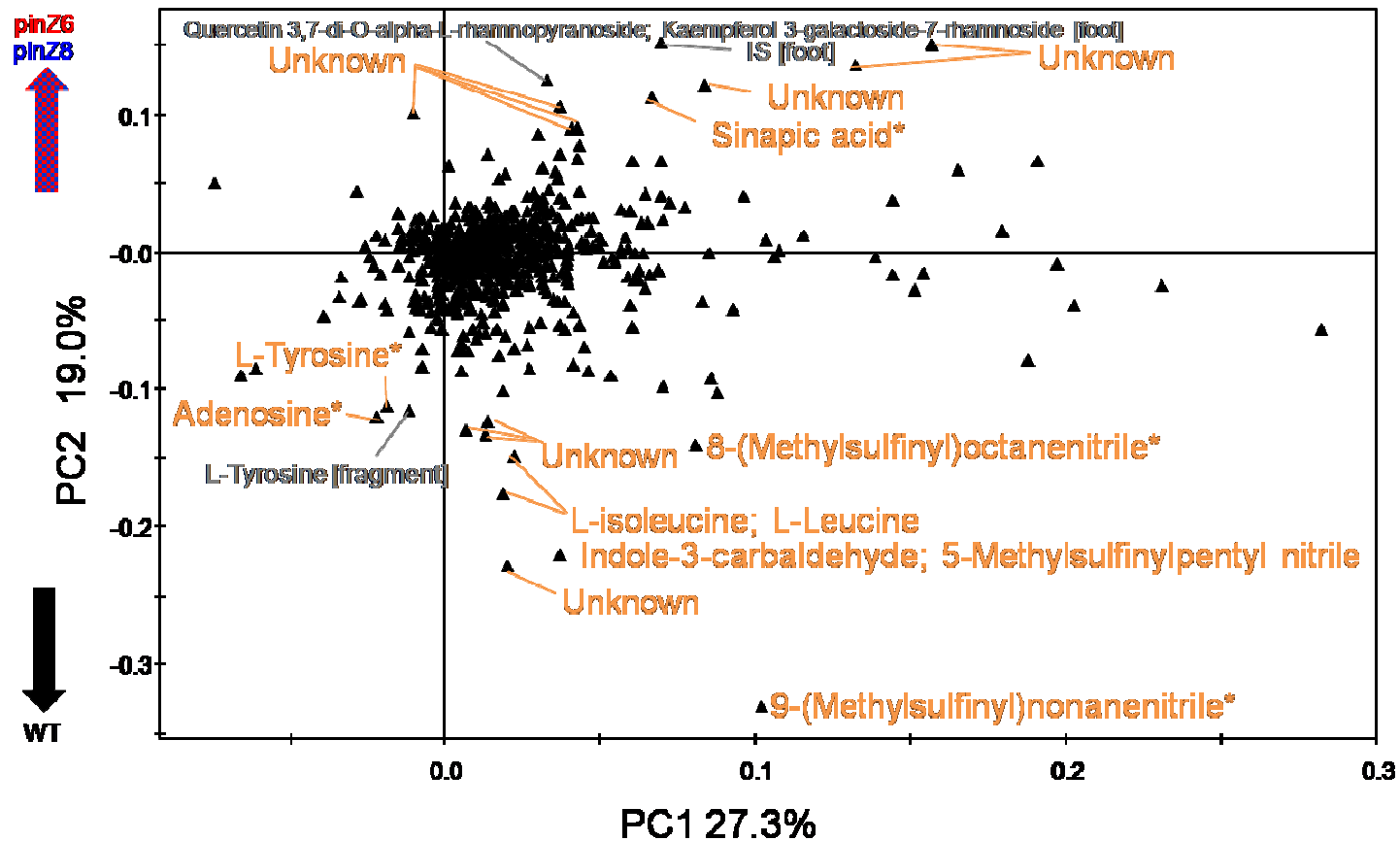


Figure 1-20 principal component analysis of detected metabolite in stem tissues of wild-type plant and two independent transgenic lines, #6 and #8. Methanol soluble metabolites from the plants were analyzed by LC-Q-TOF-MS(Positive ion mode).Each triangle indicates the detected metabolites or their fragments. Names of major metabolites detected with different levels between the wild-type and transgenic plants were indicated in the figure.

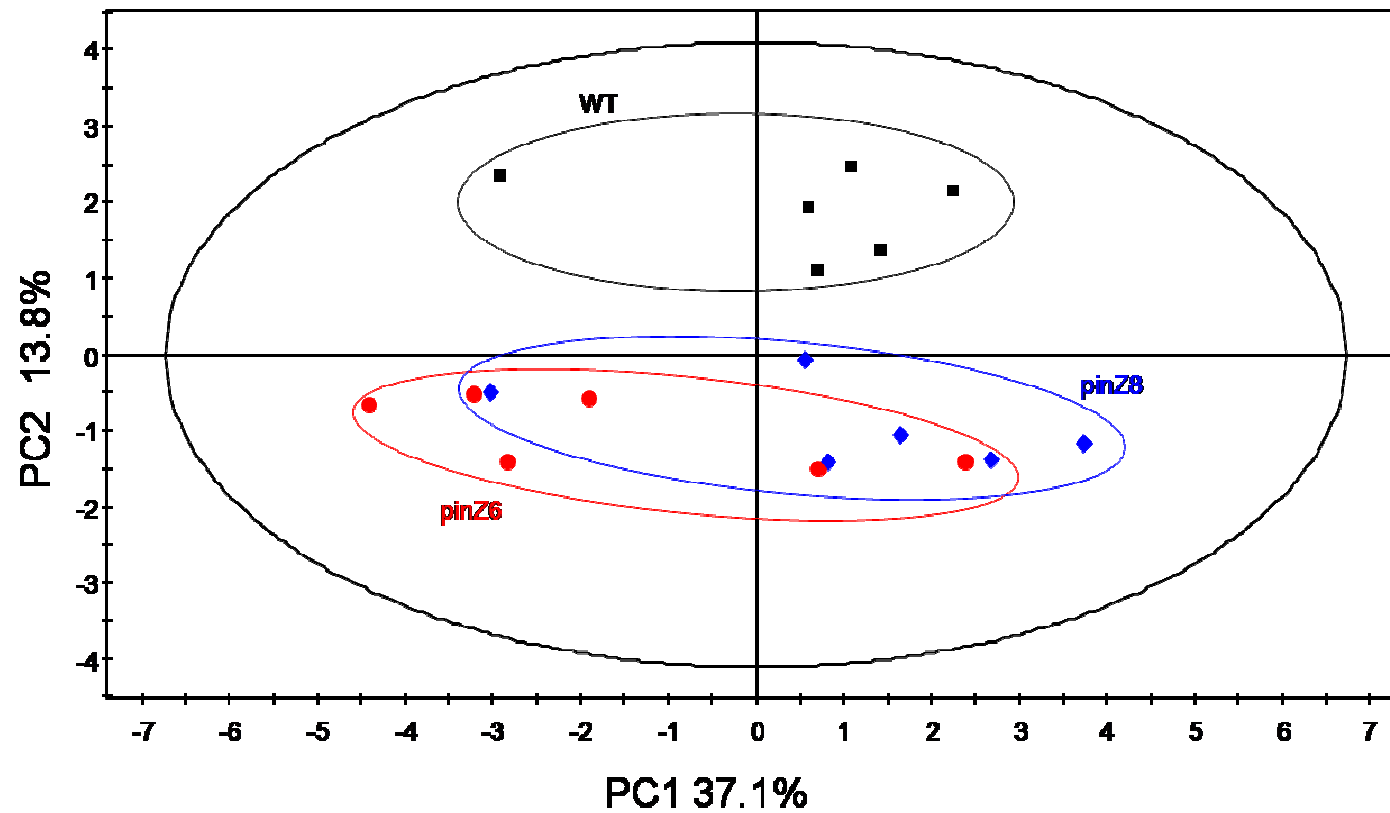


Figure 1-21 Untargeted profiling by LC-Q-TOF-MS negative ion mode in Stem

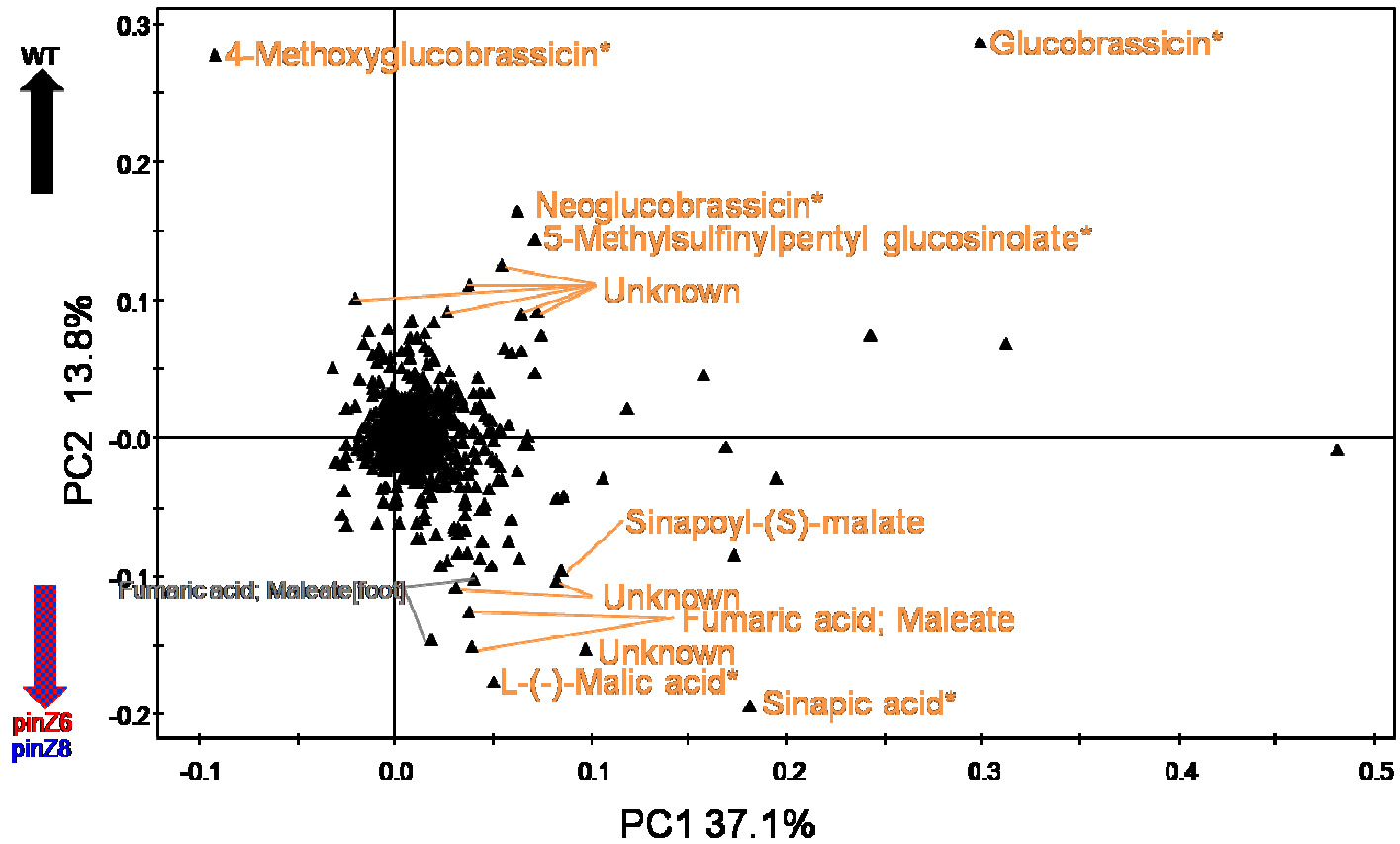


Figure 1-22 Untargeted metabolic profiling by LC-Q-TOF-MS negative ion mode in Stem

結言

本研究において、 α -プロテオバクテリアに属する *Sphingobium sp.* SYK-6 株由来のピノレジノールレダクターゼ **PinZ** を植物細胞内で生産させた。これにより、**PinZ** を生産しているシロイヌナズナに含まれる複数のリグナンの蓄積量を増減させることが可能であった。本研究は、バクテリアの酵素遺伝子を用いて植物のリグナン生合成を改変した最初の事例である。また、トランスクリプトーム解析やメタボローム解析の結果から、**PinZ** の発現がリグナン以外の二次代謝産物の蓄積にも影響することが明らかにされた。本研究では実験材料としてモデル植物として汎用されるシロイヌナズナを用いたが、今後、リグナン生合成が活発な種々の薬用植物や亜麻などの油脂植物で *pinZ* を発現させることにより、産業上の利用価値が高い高リグナン蓄積量を誇る組換え植物の創出が期待される。

・引用文献

- [1]Jing-Ke Weng and Clint Chapple, "The origin and evolution of lignin biosynthesis", *New Phytologist*, **187**: 273–285 (2010)
- [2]木質の形成・第2版 ～バイオマス科学への招待～ 福島和彦・船田良・杉山淳司
高部圭司・梅澤俊明・山本浩之 海青社
- [3]Sidney Gottlieb and Michael J. Pelczer, JR, "Microbiological Aspects of Lignin Degradation", *Bacteriol Rev.*, **15**(2): 55–76(Jun 1951)
- [4]Jing Li, Hongil Yuan, and Jinshui Yang, "Bacteria and lignin degradation", *Front. Biol. China*, **4**(1):29-38 (2009)
- [5]E.Masai, Y. Katayama, and M.Fukuda, "Genetic and Biochemical Investigation on Bacterial Catabolic Pathways for Lignin-Derived Aromatic Compounds.", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**(1): 1-15(2007)
- [6]Y. Fukuhara, N. Kamimura, M. Nakajima, S. Hishiyama, H. Hara, D. Kasai, Y. Tsuji, S. Narita-Yamada, S. Nakamura, Y. Katano, N. Fujita, Y. Katayama, M. Fukuda, S. Kajita, E. Masai, "Discovery of pinorexinol reductase genes in sphingomonads", *Enzyme and Microbial Technology*, **52**: 38–43 (2013)
- [7]S. Suzuki, and T. Umezawa, "Biosynthesis of lignans and norlignans.", *J. Wood Sci.*, **53**: 273-284 (2007)
- [8]Takeshi Deyama and Sansei Nishibe, "Pharmacological Properties of Lignans.", *Lignin and Lignans Advances Chemistry*, **17**: 585-629 (2011)
- [9]Camilo Canel, Rita M Moraes, Franck E Dayan, Daneel Ferreira, "Podophyllotoxins", *Phytochemistry*, **54**(2):115–120 (2000)
- [10] T. Nakatsubo, M. Mizutani, S. Suzuki, T. Hattori and T. Umezawa, "Characterization of *Arabidopsis thaliana* Pinorexinol Reductase a New type of Enzyme Involved in Lignan Biosynthesis.", *J. Bio. Chem.* , **283**(23): 15550-15557(2008)

- [11] Maria A Naoumkina, Qiao Zhao, Lina Gallero-Giraldo, Xinbin Dai, Patrick X Zhao, and Richard A. Dixon, "Genome-wide analysis of phenylpropanoid defence pathways." *Molecular Plant Biotechnology*, **11**(6):829-846 (2010)
- [12] I. E. J. Milder, Ilja C. W. Arts, Betty van de Putte, Dini P. Venema, and Peter C. H. Hollman, "Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol." *British Journal of Nutrition*, **93**: 393-402 (2005)
- [13] Jose L. Penalvo, Herman Adlercreutz, Mariko Uehara, Anna Ristimäki and Shaw Watanabe, "Lignan Content of Selected Foods From Japan." *J. Agric. Food Chem.*, **56**: 401-409 (2008)
- [14] Carlos L. Céspedes, J. Guillermo Avila, Ana M. García, José Becerra, Cristian Flores, Pedro Aqueveque, Magalis Bittner, Maritza Hoeneisen, Miguel Martínez, and Mario Silva, "Antifungal and Antibacterial Activities of *Araucaria araucana* (Mol.) K. Koch Heartwood Lignans." *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, **61** c:35-43 (2006)
- [15] Sedigheh Esmaeilzadeh Bahabadi, Mozafar Sharifi, Mehrdad Behmanesh, Naser Safaie, Jun Murata, Ryoichi Araki, Tohru Yamagaki, Honoo Satake, "Time-course changes in fungal elicitor-induced lignan synthesis and expression of the relevant genes in cell cultures of *Linum album*." *Journal of Plant Physiology*, **169**:487–491 (2012)
- [16] Sullivan Renouard, Cyrielle Corbin, Tatiana Lopez, Josiane Montguillon, Laurent Gutierrez, Frédéric Lamblin, Eric Laine, Christophe Hano, "Abscisic acid regulates pinoresinol–lariciresinol reductase gene expression and secoisolariciresinol accumulation in developing flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds" *Planta*, 235:85–98 (2012)
- [17] Anna-Marja Aura, "Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon", *Phytochem. Rev.*, **7**:407–429 (2008)

- [18]Jose´ L. Pen˜ alvo, Satu-M. Heinonen, Anna-M. Aura, and Herman Adlercreutz,” Dietary Sesamin Is Converted to Enterolactone in Humans.”, *J. Nutr.*, **135**: 1056–1062 (2005)
- [19]Alex Chu, Albena Dinkova, Laurence B. Davin, Diana L. Bedgar, and Norman G. Lewis, “Stereospecificity of (+)-pinoresinol and (+)-lariciresinol reductases from *Forsythia intermedia*.” *The Journal of Biological Chemistry*. 268(36)27026-27033 (1993)
- [20]Subhas Chandra Roy, Kalyan Kumar Rana, and Chandrani Guin, ”Short and Stereoselective Total Synthesis of Furano Lignans (±)-Dihydrosesamin, (±)-Lariciresinol Dimethyl Ether, (±)-Acuminatin Methyl Ether, (±)-Sanshodiol Methyl Ether, (±)-Lariciresinol, (±)-Acuminatin, and (±)-Lariciresinol Monomethyl Ether and Furofuran Lignans (±)-Sesamin, (±)-Eudesmin, (±)-Piperitol Methyl Ether, (±)-Pinoresinol, (±)-Piperitol, and (±)-Pinoresinol Monomethyl Ether by Radical Cyclization of Epoxides Using a Transition-Metal Radical Source”, *J. Org. Chem.*, **67**(10): 3242–3248(2002)
- [21]Qian Wang, Yong Yang, Ying Li, Wei Yu and Zi Jie Hou, “An efficient method for the synthesis of lignans.”, *Tetrahedron*, **62**:6107–6112(2006)
- [22]M. Gordaliza, P.A. Garcı´ a, J.M. Miguel del Corral, M.A. Castro, M.A. Go´mez-Zurita, *Toxicon*, **44**:441–459(2004)
- [23]Jiřı Slanina, Zdeněk Glatz, ”Separation procedures applicable to lignan analysis”, *Journal of Chromatography B*, **812**:215–229 (2004)
- [24]Albena T. Dinkova-Kostova, David R. Gang, Laurence B. Davin, Diana L. Bedgar, Alex Chu and Norman G. Lewis, ”(+)-Pinoresinol/(+)-Lariciresinol Reductase from *Forsythia intermedia* protein purification, cDNA cloning, heterologous expression and comparison to isoflavone reductase.”, *The Journal of Biological Chemistry*, **271**: 29473-29482(1996)
- [25]Gang DR, Kasahara H, Xia ZQ, Vander Mijnsbrugge K, Bauw G, Boerjan W, Van Montagu M, Davin LB, Lewis NG, “Evolution of plant defense mechanisms. Relationship of phenylcoumaran benzylic ether reductase to

pinoresinol–lariciresinol reductase and isoflavone reductase.”, *J. Biol. Chem.*, **274**:7516–7527 (1999)

[26] Masayuki Fujita, David R. Gang, Laurence B. Davin, and Norman G. Lewis, “Recombinant Pinoresinol-Lariciresinol Reductases from Western Red Cedar (*Thuja plicata*) Catalyze Opposite Enantiospecific Conversions” , *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, **274**(2): 618–627 (1999)

[27] Cosima B.I. von Heimendahl, Katrin M. Schäfer, Patrik Eklund, Rainer Sjöholm, Thomas J. Schmidt, Elisabeth Fuss, “Pinoresinol–lariciresinol reductases with different stereospecificity from *Linum album* and *Linum usitatissimum*” , *Phytochemistry*, **66**:1254–1263 (2005)

[28] NCBI による検索[Query:pinoresinol reductase]

[29] Allan K. Ayella , Harold N. Trick and Weiqun Wang, “Enhancing lignan biosynthesis by over-expressing pinoresinol lariciresinol reductase in transgenic wheat” , *Mol. Nutr. Food Res.* , **51**: 1518–1526 (2007)

[30] Anindita Banerjee and Sharmila Chattopadhyay, “Effect of over-expression of *Linum usitatissimum* PINORESINOL LARICIRESINOL REDUCTASE (LuPLR) gene in transgenic *Phyllanthus amarus*” , *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, **103**:315–323 (2010)

[31] Hyun Jung Kim, Eiichiro Ono, Kinuyo Morimoto, Tohru Yamagaki, Atsushi Okazawa, Akio Kobayashi and Honoo Satake, “Metabolic Engineering of Lignan Biosynthesis in *Forsythia* Cell Culture” , *Plant Cell Physiol.*, **50**(12): 2200–2209 (2009)

[32] Timothy DH Bugg, Mark Ahmad, Elizabeth M Hardiman and Rahul Singh, “The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation.” , *Current Opinion in Biotechnology*, **22**:394–400(2011)

[33] Evelina Angov, “Codon usage: Nature’s roadmap to expression and folding of proteins” , *Biotechnology Journal*, **6**: 650–659 (2011)

[34] Atsushi Okazawa, Katsuhito Hori, Ryohei Okumura, Yoshihiro Izumi, Naoki Hata, Takeshi Bamba, Eiichiro Fukusaki, Eiichiro Ono, Honoo Satake, Akio Kobayashi, "Simultaneous quantification of lignans in *Arabidopsis thaliana* by highly sensitive capillary liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry", *Plant Biotechnology*, **28**: 287–293 (2011)

[35] Colin Ruprecht, Marek Mutwil, Friederike Saxe, Michaela Eder, Zoran Nikoloski and Staffan Persson, "Large-scale co-expression approach to dissect secondary cell wall formation across plant species", *Plant Sci.*, article 23 (01 July 2011)

[36] Qiao Zhao, Yining Zeng, Yanbin Yin, Yunqiao Pu, Lisa A. Jackson, Nancy L. Engle, Madhavi Z. Martin, Timothy J. Tschaplinski, Shi-You Ding, Arthur J. Ragauskas, Richard A. Dixon, "Pinorensinol reductase 1 impacts lignin distribution during secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*", *Phytochemistry*, Article in press. (2014)

[37] Dinkova-Kostova AT, Gang DR, Davin LB, Bedgar DL, Chu A, Lewis NG, "(+)-Pinorensinol/(+)-lariciresinol reductase from *Forsythia intermedia*. Protein purification, cDNA cloning, heterologous expression and comparison to isoflavone reductase.", *J. Biol. Chem.*, **271**:29473–29482 (1996)

[38] Laurence B. Davin, Huai-Bin Wang, Anastasia L. Crowell, Diana L. Bedgar, Diane M. Martin, Simo Sarkanen, Norman G. Lewis, "Stereoselective Bimolecular Phenoxy Radical Coupling by an Auxiliary (Dirigent) Protein Without an Active Center", *SCIENCE*, **275**: (1997)

[39] Satake H, Ono E, Murata J, "Recent advances in the metabolic engineering of lignan biosynthesis pathways for the production of transgenic plant-based foods and supplements.", *J. Agric. Food. Chem.*, **61**:11721-11729 (2013)

謝辞

本研究を行うにあたり、御指導、御鞭撻を承りました東京農工大学大学院生物システム応用科学府梶田真也准教授に厚く御礼申し上げます。又、実験を進めるにあたり、粗酵素抽出液の LC-MS 分析を行って頂いた長岡科学技術大学微生物代謝工学研究室政井英司教授、上村直史助教授、ピノレシノールを御提供頂いた、京都大学生存圏研究所梅澤俊明教授、ピノレシノールとラリシレシノールの標品を御提供頂いた森林総合研究所の菱山正二郎主任研究員、リグナンの定量を行って下さいました大阪府立大学 生命科学研究所 岡澤敦司准教授、および大阪大学大学院の楠瀬達也さん、メタボローム解析を行って下さいました理化学研究所 環境資源科学センター 統合メタボロミクス研究グループ 斉藤和季博士、中林亮研究員、森哲哉研究員、リグニンの分子構造の解析を実施して下さいました理化学研究所 環境資源科学センターの菊地淳チームリーダーに御礼申し上げます。又、数々の御助言、御協力を頂いた、東京農工大学大学院生物システム応用科学府梅澤泰史准教授、同井澤-佐藤かな助教、産学官連携研究院の辻幸子さん、研究補助をして下さった上杉幹子さんに深謝致します。最後に、日々の研究生生活を共に過ごし、支えて頂いた、先輩後輩ならびに同輩に感謝の意を表し、謝辞に代えさせていただきます。