

2014 年 3 月 28 日

学位論文の内容の要約

氏 名	西崎 雄三
学位の種類	博士（工学）
学府又は研究科・専攻	工学府 生命工学専攻
指導を受けた大学	東京農工大学
学位論文題目	Contribution of acyl-glucose to anthocyanin modification in vacuole (アントシアニンの液胞内修飾におけるアシルグルコースの寄与)

【論文の内容の要約】

アントシアニンは、糖や有機酸が結合することで安定化し、液胞内において橙色、赤色、紫色から青色まで、様々な色調を発色する植物色素である。アントシアニンの配糖化は、UDP-糖を糖供与体とする glycosyltransferase (GT)、アシル化はアシル-CoA をアシル基供与体とする acyltransferase (AT) によって触媒されることが数多くの植物種から報告されており、これらの反応の場は細胞質であることが明らかにされている。しかし、いくつかの植物種において、アシルグルコースをアシル基供与体とする液胞局在型の AT が報告されてきている。一方、当研究室では、カーネーションにおけるアントシアニン 5 位とデルフィニウムにおけるアントシアニン 7 位の配糖化がアシルグルコースを糖供与体とする液胞局在型の acyl-glucose dependent anthocyanin 5/7 glucosyltransferase (AA5/7GT) によって触媒されることを見出した。しかしながら、この報告の新しい AA5GT、AA7GT は生化学的にアシルグルコースを糖供与体としてアントシアニンにグルコースを転移させることが示されていたが、遺伝学的な証明は成されていない。そこで 5 位が配糖化されていないアントシアニンを蓄積するカーネーション品種を見だし、AA5GT 遺伝子がレトロトランスポゾンの挿入により、遺伝子破壊されていることを明らかにし、カーネーションにおいて AA5GT が生体内でアントシアニンの配糖化酵素として機能していることを遺伝学的に証明した。このように近年、液胞型の AT と GT が報告されており、両修飾酵素は共にアシルグルコースを供与体とするにも関わらず、現在までの報告は、どちらか 1 つの酵素反応に着目したものであった。

デルフィニウムは最も青い花の 1 つとして人気があり、この青い花色は、デルフィニウムの萼片組織において、アントシアニン 7 位が AA7GT によってグルコースが修飾された後、そのグルコースに対してさらに芳香族有機酸である *p*-hydroxybenzoic acid (pHBA) とグルコースが交互に複数結合したポリアシル化アントシアニンを合成することで発色している。デルフィニウムにおいて、AA7GT が液胞局在型の GT であることを考えると、その後の pHBA とグルコースの修飾反応も液胞局在型の AT と GT が交互に触媒するものと

考えられた。そこで、本研究では未だ明らかとなっていないデルフィニウムにおける AA7GT 反応後のアントシアニンポリアシル化機構を明らかにするとともに、ポリアシル基の合成に関わる液胞型 AT と GT の関連性について明らかにした。

大腸菌により産生した組換え AA7GT 酵素を用いて合成したアントシアニン 7 位配糖体を受容体、アシルグルコースである *p*-hydroxybenzoyl-glucose (pHBG) を供与体、そして青色デルフィニウムの萼片から調製した酵素液を用いて酵素反応をおこなったところ、反応時間に依存して、まず 7 位に結合したグルコースに pHBA が結合し、次にその pHBA に 2 つ目のグルコースが結合し、そして、この 2 つ目のグルコースに対してさらに 2 つ目の pHBA が結合する計 3 つのアシルグルコース (pHBG) 依存的な新たな反応を検出することに成功した。先に報告された AA7GT を含めて計 4 つのこれらの反応には、pHBG が必要不可欠であり、pHBG が液胞型 GT と AT の共通の供与体として機能し、一物二役を果たす鍵化合物であることが示された。さらに今回見出した 3 つの反応を触媒する各々の液胞局在型酵素遺伝子 cDNA を縮重 PCR 法により単離同定することに成功した。

さまざまなデルフィニウム品種のアントシアニンを解析した結果、7 位が何の修飾もなされていない delphinidin 3-rutinoside (Dp3R) を蓄積する品種を 5 品種見出した。その内の 1 品種は AA7GT が機能しておらず、その結果、アントシアニンの 7 位が修飾されないことを明らかにした。残りの 4 品種については、AA7GT は正常に機能しているが、アントシアニン 7 位ポリアシル基の供与体である pHBG が蓄積していなかった。そこで正常型のデルフィニウム品種から、pHBA を受容体として pHBG を合成する細胞質型 UDP-グルコース依存型配糖化酵素遺伝子 cDNA をクローニングして組換え酵素における酵素活性から生化学的に同定し、その酵素遺伝子の発現が、上記 4 品種において正常型のデルフィニウム品種に対して消失もしくは著しく低下したために、糖供与体である pHBG の合成がなされず、アントシアニンの 7 位が修飾されないことを明らかにした。

以上、デルフィニウムにおいて花色の青色化に寄与するポリアシル化アントシアニンの生合成過程では、まず細胞質内で Dp3R と pHBG が合成され、液胞へと運ばれる。そして次は、Dp3R を受容体、pHBG をアシル基 (pHBA) および糖 (グルコース) 供与体として、液胞型の AT と GT が一分子ずつポリアシル基を合成していくことを明らかにした。また 1 種類のアシルグルコースが、2 種類の修飾酵素の共通の供与体として機能することは初めての報告であり、pHBG は “Zwitter Donor” であるという新しい概念を提案した。