

研究終了報告書

「フラボノイド生合成の細胞内動態を探る」

研究期間：2021 年 10 月～2024 年 3 月

研究者：和氣 駿之

1. 研究のねらい

細胞内で生じる代謝は、“連続的な代謝酵素の複合体(メタボロン)”の形成により時空間的に制御されていることが提唱されている。代謝系を構成する個々の酵素は細胞内に一様に拡散しているわけではなく、代謝は細胞内の微小空間に区画化され、これによって、代謝中間体の濃縮や、連続する二つの酵素間での直接的な基質の受け渡し(基質チャネリング)が可能となると想定されている。これにより、代謝酵素の活性化や代謝の連続反応が効率的に進行すると考えられる。植物二次代謝産物であるフラボノイド生合成においても、植物細胞内では代謝中間体はほとんど蓄積しないことから、その生合成はメタボロン形成により高効率化されていると推定されている。これまでに、いくつかの植物種においてアントシアニンやイソフラボン生合成に関与するメタボロンが解析されており、小胞体膜に局在するシトクロム P450 を中心としたメタボロン形成の存在が示唆されている。しかしながら、こうしたメタボロン形成に関わるタンパク質間相互作用は非常に弱く、酵素群の集合・解離の制御機構やタンパク質間相互作用による個々の酵素の活性への影響など、メタボロンの全貌や具体的な機能に関してはほとんど明らかになっていない。本研究では、これまでに明らかにされたフラボノイドメタボロンの特徴から、フラボノイドメタボロンに重要な機能として(テーマ A)タンパク質間相互作用を介した代謝酵素の特異性制御、(テーマ B)基質チャネリングによる代謝分岐の効率化、を想定した。これまでに試験管内で明らかにされた生合成酵素の特性だけでは説明がつかない代謝的事象に着目し、メタボロン形成の観点からこれを解明することで、フラボノイド生合成におけるメタボロン構成タンパク質の機能の重要性を明示できると考えた。具体的に、テーマ A では、植物色素として有名なアントシアニンの生合成経路の中で、生成物特異性が非常に低く、代謝酵素としての酵素活性に疑問が生じるアントシアニン合成酵素(ANS)に着目し、テーマ B では、ユニークな代謝分岐点を触媒するカルコン還元酵素(CHR)に着目した。それぞれの酵素や生成物の特性を考慮したスクリーニングにより、ANS の活性矯正や CHR の基質チャネリングに影響を及ぼす未知のメタボロン構成タンパク質を同定できると考えた。

2. 研究成果

(1)概要

テーマ A では、アントシアニン生合成の鍵酵素であるアントシアニン合成酵素(ANS)に着目し、ANS の生成物特異性を矯正するタンパク質の同定を試みた。まず、ANS との相互作用タンパク質の探索として、(A1)クロスリンカー試薬と共役させた共免疫沈降およびプルダウンアッセイ、(A2)近位依存性標識法による探索を行った。次に、ANS の活性矯正タンパク質を直接スクリーニングする手法として、酵母に既知のアントシアニン生合成酵素群をすべて導入したA株を作製して(A3)活性スクリーニングを試みた。2022 年の 8 月に(A3)と似た研究戦略(酵母によるアントシアニン生産の効率化を目指した研究)により、グルタチオン S-トランスフェラー

ゼ(GST)の追加導入によりアントシアニン生産量が大きく増強されることが報告された(Xu S. *et al.*, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2022)。そこで、キンギョソウおよびダイズの GST をクローニングし、大腸菌組換え酵素を調製して ANS との共反応を行った。その結果、ANS と GST を一緒に作用させることで効率的にアントシアニンが生成することが示され、アントシアニン生合成において GST は代謝酵素として重要な役割を果たすことが強く示唆された。

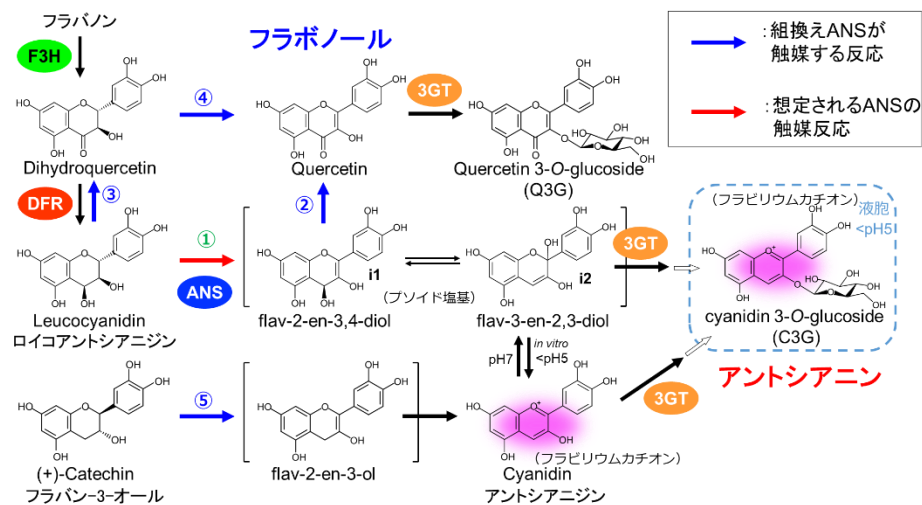
テーマ B では、カルコン合成酵素(ChS)とカルコン還元酵素(CHR)間の基質チャネリングに寄与するタンパク質の同定を試みた。CHR との相互作用タンパク質を(B1)クロスリンク質量分析および(B2)酵母ツーハイブリッド(Y2H)により探索した。また、(B3)活性スクリーニング系の構築のため、テーマ A と同様の手法によりイソフラボン生産株(I 株)およびフラバノン生産株(F 株)を作製した。I 株および F 株ともに想定したフラボノイドの生産に成功した。

ACT-X 研究領域内での紹介により生物工学会誌のバイオメディア[2]および特集若手研究者が拓くこれからの生物工学[3]での執筆の機会を得た(□内の番号は 5.主要な研究成果リストの番号と対応)。

(2) 詳細

テーマ A 「アントシアニン合成酵素(ANS)の特異性あいまいさの矯正機構」

アントシアニン生合成の鍵酵素であるアントシアニン合成酵素(ANS)に着目した。ANS はロイコアントシアニジンの 2,3 位の脱水素反応を触媒し中間体 1 (i1, Flav-2-en-3,4-diol) の生成を触媒すると考えられている(図 1、赤矢印)。i1 は中性条件で安定なプソイド塩基型(i2)へと異性化し、i2 は酸性条件下でフラビリウムイオンとなりアントシアニンが生成する。細胞内では、引き続きアントシアニン 3-糖転移酵素(3GT)が細胞質中で i2 に作用した後、液胞に移行し、液胞の酸性環境下でフラビリウムイオン(有色のアントシアニン)となると考えられている(図 1)。しかし、*in vitro*における酵素機能解析では、ANS はロイコアントシアニンからアントシアニジンを生成する活性(図 1、赤矢印、反応①)は低く、フラボノールを合成する活性(図 1、反応②～④)が高い。実際に、大腸菌や酵母に図 1 に示す酵素群を導入した代謝学的な試みにおいても、アントシアニンではなくフラボノールが多量に蓄積することが報告されている



(Yan ら、2005)。したがって、植物細胞内にはこうした ANS のあいまいな活性を制御してアント

シアニンを効率よく生成する何らかの因子が存在すると考えられ、本研究では ANS の相互作用タンパク質(メタボロン構成タンパク質)が活性を矯正すると考えた。テーマ A では、下記の A1~A4 の実験を行い、候補タンパク質の探索と機能解析を行った。

(A1) クロスリンキング質量分析 キンギョソウ花卉を実験材料として、クロスリンカー試薬と共役させた共免疫沈降およびプルダウンアッセイを行った。共免疫沈降では、まず、赤色キンギョソウ花卉を1 cm 角に切断し、膜透過性クロスリンカー試薬を浸潤させ室温で1 h 反応させた。その後、粗酵素溶液を調製し、Anti-AmANS 抗体を用いた免疫沈降を行った。ウェスタンブロットにより ANS の存在を確認し、LC-MSMS により各画分を解析した。架橋ペプチドを検出することはできなかったが、複数の相互作用候補タンパク質を得ることができた。次に、プルダウンアッセイを行った。大腸菌組換え AmANS を赤色キンギョソウ花卉由来粗酵素溶液に添加し、クロスリンカー試薬を反応させ Ni-NTA beads により精製した。SDS-PAGE により展開後、架橋タンパク質と想定されるバンドを切り出し LC-MSMS により解析した。AmANS とともにいくつかのシャペロンタンパク質やキナーゼ様タンパク質を候補タンパク質として同定した。

(A2) 近位依存性標識法 ビオチンリガーゼを用いた相互作用タンパク質の探索を行うため、ベンサミアナタバコの葉を用いた一過的発現系を構築した。ビオチンリガーゼは、半径 10 nm 以内に存在するリジン残基をビオチン化する酵素である。ビオチンリガーゼを目的酵素に融合させて発現させ、ビオチンを添加した後、ビオチン化タンパク質を検出することで目的酵素との相互作用タンパク質を同定する。アグロインフィルトレーションによりアントシアニン蓄積を誘導する MYB 転写因子およびビオチンリガーゼを融合させた AmANS を一過的に過剰発現させた。これにより、ベンサミアナタバコの葉にアントシアニン蓄積を誘導することに成功し、ビオチンリガーゼ融合型 AmANS の発現も確認した。今後、ベンサミアナタバコの生育条件やアグロバクテリウムの感染条件を最適化することで、アントシアニン生合成関連タンパク質間の相互作用を網羅的に解析することが可能である。

(A3) 活性スクリーニング 酵母に既知のアントシアニン生合成酵素群(キンギョソウ由来)をすべて導入したA株を作製した。A 株は ANS の特異性あいまいさによりアントシアニンではなくフラボノール配糖体を蓄積する予定であったが、ANS とその一つ前の DFR が酵母内で発現しなかった。コドン最適化により ANS の発現が確認できたものの、DFR の発現は改善しなかった。そうした中で、2022 年の 8 月に酵母を用いたアントシアニン生産の研究において、グルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)の追加導入によりフラボノール生産が抑えられ、アントシアニン生産量が増強されることが報告された(Xu S. *et al.*, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2022)。この報告から、GST が ANS の生成物をフラボノールからアントシアニンへと変化させると考えられた。

(A4) 候補タンパク質の機能解析 そこで、キンギョソウおよびダイズから GST をクローニングし、大腸菌組換え酵素を調製して ANS との共反応を行った。その結果、ANS と GST を一緒に作用させることで、これまで想定されていた ANS 反応(図 1 の反応①、Leucocyanidin→Cyanidin)を触媒可能であることを明らかにした。2023 年 8 月には、この反応における GST の触媒機構が報告され(Eichenberger M. *et al.*, *Nat. Catal.* 2023)、GST は ANS の反応中間体とされてきた Flavan-3,3,4-triol の適切な位置の脱水反応を触媒することで Cyanidin と平衡状態にある *il* の生成を触媒することが明らかにされた。

テーマB「デオキシカルコンの生合成メカニズム」

デオキシカルコンは、有用化合物であるデオキシフラボノイドの前駆体であり、その生合成の鍵酵素はカルコン還元酵素 (CHR) である。CHR はカルコン (THC) に直接作用するわけではなく、カルコン合成酵素 (CHS) 反応により瞬間的に生じる中間体 1 に作用すると想定されている (Bomati ら、2005) (図 2)。1 は水溶液中できわめて不安定・短寿命で、容易に芳香族化されて THC を与える。このため、低濃度の CHS と CHR を用いた試験管内反応では、CHR の作用を受けることのできる 1 の割合は 15% 程度である。しかし、ダイズやアシタバの根では、デオキシカルコン誘導体がフラボノイド総量に対して高比率で蓄積している。

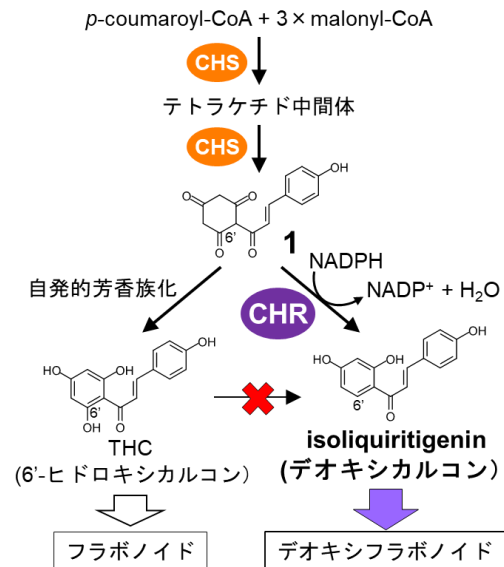


図2 デオキシカルコンの推定生合成

ここから、CHR と CHS の両酵素間で 1 の直接的かつ迅速な基質チャネリング機構の存在が示唆されるが、その機構は不明である。本研究では、メタボロン構成タンパク質が CHS と CHR 間の基質チャネリングに重要な役割果たすと考え、以下 B1～B3 の実験を行った。

(B1) クロスリンキング質量分析. CHR との未知の相互作用タンパク質を探索するため、ダイズ懸濁培養細胞にクロスリンカー試薬を作用させ、架橋タンパク質の同定を試みた。培養細胞に Yeast Extract (YE) を添加することでエリクター処理を行い、病原菌感染応答によるイソフラボノイド生合成を誘導し WB により CHS および CHR の発現誘導を確認した。大腸菌組換え CHIL (CHS との相互作用タンパク質) に光反応性クロスリンカー試薬を結合させ、YE 処理を行った培養細胞粗酵素溶液と混合して UV 照射による架橋反応を行った。トリプシン消化後、LC-MSMS 解析を行い複数の候補タンパク質を得た。

(B2) 酵母ツーハイブリッド (Y2H) によるスクリーニング. CHR との相互作用タンパク質を同定するため、GAL4 システムを用いた Y2H によるスクリーニングを行った。酵母 Y2HGold 株 (*MATα*) に CHR を発現させ、酵母株 (*MATα*) にダイズ実生から調製した発現ライブラリーを導入した。それぞれの株を接合させ、スクリーニング培地にて生育するコロニーを複数得た。その後、シーケンシングを行い、転写因子を除く 8 つの候補タンパク質を同定した。

(B3) 活性スクリーニング. CHR はマメ科植物のみ同定されており、デオキシカルコンを蓄積する一部のキク科植物やセリ科のアシタバの CHR は未同定であった。そこで、新規 CHR 同定のため、以下のアプローチを行った。まず、A3 と同様にカルコン (THC) を生産する酵母株 (C 株)、フラバノン生産株 (F 株)、イソフラボン生産株 (I 株) を作製した。この株に cDNA 発現ライブラリーを導入することで、F 株を用いた場合は黄色のコロニー、I 株を用いた場合にはデオキシイソフラボンに由来する青色蛍光を発するコロニーを探索することで、新規 CHR 遺伝子を同定できると考えた。まず、C 株を用いてフラボノイド生産の培養条件の検討を行ったところ、培地中のグルコース濃度を下げることでカルコン生産量を 4 倍程度増強できた。また、F 株にダイズの CHR を導入するとデオキシカルコンで Isoliquiritigenin 由来の黄色のコロニーが形成され、ニトロセルロース膜上で酵母を生育させることで黄色発色を明瞭に観察できることが分かった。今

後、cDNA 発現ライブラリーを導入することで、新規 CHR を同定するプラットフォームとして利用可能となるものと考えられる。

3. 今後の展開

テーマ B では、構築した CHR 同定のためのプラットフォームを利用して、未同定のアシタバ CHR やキク科 CHR の同定を行いダイズ CHR との機能比較を行うことでデオキシカルコン生合成メカニズムをより深く理解できると考える。テーマ A においては、GST と ANS が一緒に作用することでアントシアニン生成活性が検出され、研究当初の ANS の生成物特異性あいまに関する疑問はほとんど解消された。しかし、ANS は上流基質 (Dihydroflavonol) に対しても高い活性を有することから、どのように生合成酵素の作用順が制御されているのか、なぜキンギョソウ花弁ではフラボノールが蓄積しないのか、新たな疑問も生じた。また、GST は ANS から生じる不安定な基質に作用し、GST の生成物もまた中性 pH では不安定である。したがって、ANS/GST/3GT 間で基質チャネリングが生じていると考えられ、これら酵素間の相互作用解析や相互作用界面の決定、複合体形成機構の解析などが今後求められる。また、植物が本来有するアントシアニン高蓄積メカニズムを明らかにするためには、細胞質領域での生合成だけでなく最終蓄積箇所である液胞への輸送機構も明らかにする必要がある。これら解析により、細胞内のアントシアニン代謝動態の全貌を明らかにすることができれば、より商品価値の高い花き植物の育種やアントシアニンを生産するためのより高度な代謝工学への発展が期待される。メタボロンの概念が提唱されて 40 年近くになるが、未だにその全貌が明らかにされた例はない。メタボロンを構成するタンパク質間相互作用が非常に弱く、複合体として単離できないこと、また、タンパク質間相互作用解析ではもっぱら 1 対 1 の分子間解析に限定され、多:多の解析手法が存在しないことなどがメタボロン研究の大きな障害となっている。現状、メタボロン解析には Cryo-EM やクロスリンキング質量分析など複数の解析手法を組み合わせることで全体像を解析していく必要がある。

4. 自己評価

【研究目的の達成状況】

本研究課題は植物特化代謝産物であるフラボノイドに着目し、報告されている個々の酵素機能からは説明がつかない代謝事象をメタボロン形成の観点から明らかにすることを目指したものである。研究戦略として、初めに、未同定のメタボロン構成タンパク質をスクリーニングすることを計画した。当初の計画よりも多くの時間を費やしてしまったが、テーマ A、B とともに複数の候補タンパク質を選抜することに成功した。また、テーマ A に関しては、Xu らにより有力な候補タンパク質が報告され、全く想定していなかった GST が候補タンパク質として強く示唆された。組換え酵素を用いた活性測定により、GST がアントシアニン生合成経路に重要な代謝酵素として機能することを明らかにすることができ、当初の研究目的を達成することができた。したがって、テーマ A の達成度は高いと考える。

【研究の進め方】

研究実施体制として、研究代表者が主体となって研究を遂行した。実験の一部は大学院生と一緒に実施した。テーマ A は大学院生 2 名の研究テーマの一部として実施し、それぞれ A1 お

よび A3 の内容を一緒に行ってきた。テーマ B では B3 の内容を大学院生一人と一緒にいった。研究費執行は当初の計画通り執行した。

【研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果】

メタボロンの機能の解明は、生命現象の理解を深めるだけでなく、有用物質生産のための基盤技術として利用されることが期待される。実際に、ACT-X 研究領域内でもメタボロンの代謝メカニズムを取り入れた研究が行われている。メタボロンの実際の機能、もしくは、メタボロンの存在が強く示唆される代謝事象を明らかにしようとする研究は、メタボロン全貌解明がなされなくとも、未だ不明な点が多い細胞内代謝に関わる新規事象を明らかにすることにつながると考える。テーマ A による研究成果は、既知とされてきたアントシアニン生合成経路の常識を一新するものであり、アントシアニン生合成において、従来の知見では説明しきれなかった代謝中間体の挙動や酵素複合体の機能・役割について新しい視点を与えるものである。本研究成果は、メタボロンの役割をより詳細に理解する足掛かりとなるだけでなく、アントシアニンに関わる代謝工学や花き研究に大きな影響を及ぼすと考えられる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 0件

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【シンポジウム発表】

- [1] 和氣駿之. タンパク質間相互作用を介したフラボノイド生合成酵素の活性調節機構. 第 40 回日本植物バイオテクノロジー学会(千葉)大会. 2023 年 9 月 13 日

【著作物】

- [2] 和氣駿之. フラボノイド生合成における縁の下の力持ち. 生物工学会誌. 2022, 100(5), 254.
- [3] 和氣駿之. フラボノイド生合成を制御するメタボロン. 生物工学会誌. 2023, 101(9), 493-496.