

# タデ科植物アイの Transketolase の cDNA クローニング と mRNA 発現解析

南 善子・藤田 圭亮・松原 央

岡山理科大学理学部生物化学科

(2004年9月28日受付、2004年11月5日受理)

## 1. 緒言

タデ科の一年草タデアイ (*Polygonum tinctorium*) は、藍染の原材料である。藍染は、最も古くから世界中で使われてきた染色法であり、その色素はアイの葉から抽出される青色の indigo (2-(1,3-dihydro-3-oxo-2H-2-ylidene)-1,2-dihydro-3H-indol-3-one) である。アイの細胞内では、この indigo は無色の配糖体 indican (indoxyl- $\beta$ -glucoside) として存在する。indican は、葉をすり潰すことにより細胞外に出され、同時に葉から遊離する特異的な酵素  $\beta$ -glucosidase の働きにより、indoxyl と  $\beta$ -D-glucose に分解される。続いて、空気酸化により、indoxyl が自発的に重合し、青色色素である indigo を形成する (図1)。indican は、葉に多量に含まれる二次代謝産物であるが、その代謝経路や存在意義はわずかに研究されているに過ぎない<sup>(1)~(6)</sup>。これまでに、我々は indican が indoxyl と UDP-glucose から細胞内で合成されることを報告した<sup>(5)</sup>。さらに、indoxyl は芳香族アミノ酸の合成経路であるシキミ酸経路を経て合成されると考えられる。図1に示すように、このシキミ酸経路は erythrose 4-phosphate により、一次代謝のペントースリン酸経路と繋がっている。erythrose 4-phosphate の生成を触媒する transketolase は、グルコース6リン酸代謝のキーエンザイムであり、transaldolase と共に2つの重要な代謝経路 (ペントースリン酸経路と解糖系) を可逆的にリンクさせている。また、植物においては、カルビン回路すなわち還元的ペントースリン酸経路の酵素としても働いている。この酵素は二次代謝経路との関わりが深く、

前述したように、その中間産物の erythrose 4-phosphate は芳香族アミノ酸の生合成につながる。さらに、もう1つの産物である ribose 5-phosphate は、ヌクレオチド生合成の前駆体となる。また、最近では、transketolase のストレス応答への関与がシソ科植物 *Craterostigma plantagineum* で報告されている。この植物では、脱水状態になると3種の transketolase アイソザイムのうち2種類が特異的に発現し、octulose 代謝の調節を行っている可能性が示唆されている<sup>(7)</sup>。本研究では、transketolase に着目し、一次代謝経路と indican 合成の二次代謝経路との関連について検討した。

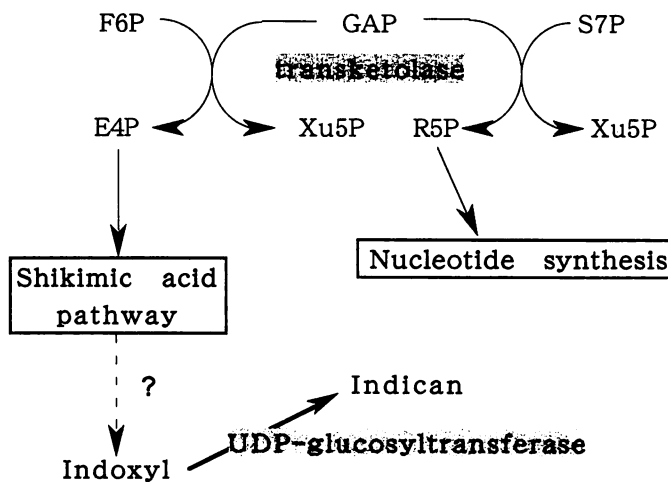


図1 indican 合成経路と一次代謝経路の関係

F6P, fructose 6-phosphate; E4P, erythrose 4-phosphate;  
GAP, glyceraldehyde 3-phosphate; R5P, ribose 5-phosphate;  
Xu5P, xylulose 5-phosphate; S7P, sedoheptulose 7-phosphate

## 2. 方法

### 植物材料

アイは、4月から10月の間、岡山理科大学キャンパス内で栽培し使用した。この期間、随時、新鮮な葉を刈り取り、実験に用いた。

### 活性測定とタンパク質定量

100mM Tris-HCl (pH7.5), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM thiamine pyrophosphate, 0.2mM NADH, 1mM F6P (fructose-6-phosphate), 酵素混合液 (Glycerin-3-phosphate dehydrogenase と Triosephosphate isomerase を含む), および測定試料が入った混合液を全量 990 μl になるように調製し, 10 μl の 20mM erythrose 4-phosphate を加え, 室温で反応を開始した。340nm の吸光度の継時変化を分光光度計 (U-2000, 日立) で測定し, 活性値を求めた。1unit の活性は, 1分間に 1 μmol の NADH を消費する本酵素量と定義した。

タンパク質定量は, Advanced Protein Assay Reagent (cytoskeleton) を用い, 付属のマニュアルに従い定量を行なった。

### cDNA ライブラリーのスクリーニング

以前に作成したアイの葉の cDNA library から, 1 プレート 50,000pfu になるようにファージを成長させ, その DNA を Hybond C<sup>+</sup>膜に転写した。膜上の DNA は, 1次抗体として 1/1500 希釈した抗 transketolase 抗体, 2次抗体として 1/7500 希釈の Goat Anti-Rabbit IgG (Fc), AP Conjugate (Promega) を用いて検出した。発色には NBT/BCIP 溶液 (nitro blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indoxylphosphate) を用いた。さらに, 二次スクリーニング, 三次スクリーニングまで行い, ポジティブクローンを選択した。得られた cDNA の塩基配列は, DNA Sequencing Kit (Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction, PE Applied Biosystems) で PCR を行なった後, ABI PRISM<sup>™</sup>310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems) で解析した。

### Transketolase cDNA の大腸菌内での発現とタンパク質の精製

PCR により増幅させた transketolase の全長塩基配列を, PinPoint<sup>™</sup> Xa-1 T-Vector (以下 PPV, Promega) に TA クローニングで導入し, 大腸菌 JM109 を形質転換した (PPV-tk/JM109)。PPV-tk/JM109 は, 2 μM biotin と 100 μg/ml の ampicillin を含む 50ml の LB broth 中で培養し, IPTG で発現誘導を行なった。菌体を超音波破碎機 (COSMO BIO) により破壊し, 遠心後, 粗抽出液を得た。発現タンパク質は, Softlink<sup>™</sup>Soft Release Avidin Resin (Promega) カラムで精製した。

### Transketolase の発現解析

Quick Prep Micro mRNA purification kit (Amersham) を用い単離した mRNA から, T-Primed First-Strand kit (Amersham) で cDNA 合成を行なった。この cDNA を鋳型とし, transketolase cDNA の内部配列で作成したプライマー (CGAGACAATCGGAATTGAAGTCAC, CTGAAGGAGCTGCTCTCGAAG) を用いて, Smart Cycler System (Takara) でリアルタイム PCR を行なった。

## 3. 結果および考察

### Transketolase cDNA の塩基配列とアミノ酸配列

アイの葉の cDNA library を transketolase 抗体でスクリーニングしたところ, 約  $1 \times 10^6$  個のプラークから, 37 個のポジティブクローンが得られた。そのうち, ほぼ完全長と思われるクローンの解析を行った。結果, transketolase cDNA は, 1,860 bp のタンパク質コード領域とそれに続く 3'末端非翻訳領域 79 bp, poly A tail 45 bp からなり, その全長は 2,110 bp であった (図 2)。この cDNA は 620 個のアミノ酸をコードしており, うち, 疎水性アミノ酸は 325 個, 中性アミノ酸は 117 個, 親水性アミノ酸は 178 個であり, 疎水性アミノ酸の占める割合が比較的多いことが疎水性プロットの結果 (図 3) から確認された。また, アミノ酸配列から分子量を計算したところ, 67,450 であった。アイ transketolase のアミノ酸配列を他の生物由来の transketolase のものと比較した (図 4)。ハウレンソウのクロロプラスト局在の transketolase とよく似ており, その相同性は 88% であった。しかし, 同じ高等植物でも, 緒言で述べた *Craterostigma plantagineum* の乾燥ストレスにより

誘導される tkt 10 や tkt 7 との相同性はわずかに低く、約 77% 程度であった。このことから、今回得られた transketolase cDNA は、ストレス誘導性のものではないと推測される。バクテリアや真菌類、動物の transketolase との相同性は低く 20-50% ほどであったが、糖基質や補酵素である thiamine diphosphate と相互作用する残基は、種を問わず高く保存されていた。また、他の生物由来の配列と比較すると、N 末端領域が短くシグナル配列も見られなかった。今回単離したアイ transketolase cDNA が、完全長ではない可能性もあり、クロロプラストか細胞質のどちらに局在するのかは、現時点では明らかになっていない。なお、今回得られた他の 36 個ポジティブクローンには、長い N 末端領域を有するものは確認されなかった。

```

1 TGTACGACGAGGTCATGAGGTATAACCCAAAAACCCCTTCTGGTTCAACCCGACCGCTTTGTCTCTCCGCGGCCATGGCTGTATGCTCCAGTACGCCCTCTT 108
      M R Y N P K N P F W F N R D R F V L S A G H G C M L Q Y A L L
109 CACCTCGTGGCTATGACAGTGTCAAGGAGGAAGATCTTAAGCAGTTCAGGCAATGGGGAAGCAAGCTCCCGGTCACCCCGAGAATTCGAGACAATCGGAATTGAA 216
      H L A G Y D S V K E E D L K Q F R Q W G S K T P G H P E N F E T I G I E
217 GTCACCACTGGACCCCTTGCCCAAGGTATTGCCAATGCGGTTGGTTGGCCCTCGCCGAGAGCACTTGGCGGCGAGATTCAACAAGCCGACAGCGAGATCGTAGAC 324
      V T T G P L G Q G I A N A V G L A L A E K H L A A R F N K P D S E I V D
325 CACTACACGTATGTAATCTTGGAGATGGTTCGCAAAATGGAGGTAATTGCAAAATGAGGCTTGTCTACTTGTGACACTGGGGCTTGGAAAATCATTGCTTCTTAC 432
      H Y T Y V I L G D G C Q M E G I A N E A C S L A G H W G L G K L I A F Y
433 GACGATAACCCATATCCATCGATGGAGACACTGAGATTGCGTTTACTGAGAGCGTTGACAAGCGTTTGGAGCGTTGGGGTGGCATGTTATCTGGGTCAAGAAATGGA 540
      D D N H I S I D G D T E I A F T E S V D K R F E A L G W H V I W V K N G
541 AACACCGGTTATGATGAGATCCGGGCTGCCATTGAGGAAGCCAAAGAAAGTTAAAGATAAGCCAACTATGATCAAGTGCACCGACTATCCGGCTTGGCTCACCCAAC 648
      N T G Y D E I R A A I E E A K K V K D K P T M I K V T T T I G F G S P N
649 AAGTCGAATCTTACAGTGTTCACGGGCTGCACTGGGAGCCAAAGAGGTGGAGGCGACGAGGAAGAACTCCGGTTGGCCATATGAGCCTTCCATGTCCCAAGAA 756
      K S N S Y S V H G A A L G A K E V E A T R K N L G W P Y E P F H V P E E
757 GTCGAAAAGCATTGGAGTCCGATGCTCCCTGAAGGAGTGTCTCGAAGCCGAGTGGAAATGCCAAGTTTGGCGAATACAAGAGCAAGTACCAGCAAGAGCCGAG 864
      V E K H W S R H V P E G A A L E A E W N A K F A E Y K S K Y P T E A A E
865 TTGAAGAGTATCATAGAGGGCGAATTCCTGCGGTTGGGAGAAGCACTTCTACTTACACCCCGAAGCCCGGATGCGACACGAAAACCTGTACAGACATGC 972
      V K S I I E G E F P A G W E K A L P T Y T P E S P G D A T R N L S Q T C
973 CTAATGCCCCTTGCGCCAGTCTGCCAGGCTGCTCGGAGGTAGTGCAGATCTTGTCTTCCAAACATGACGCTATTGAAGTCGTCGGAGACTCCAAAAGGACACT 1080
      L N A L A P V V P G L L G G S A D L A S S N M T L L K S F G D F Q K D T
1081 CCCGAGGAACGTAATGTCGGATTCGGTTCGAGAGAACCGGAATGGTGCCATCTGCAACGGCATTGCTCTCCACAGCCCGGATTCGTCCTCCCTACTGTGCCATTC 1188
      P E E R N V R F G V R E H G M G A I C N G I A L H S P G F V P Y C A T F
1189 TTCGCTTCCAGGACTACATGAGAGGCGCAATAAGGATATCCGCCCTTTCCTTGGCAAGGTCATCTATGTCATGACTCAGCCTCCATCGGCTCAGGAGGATGGA 1296
      F V F T D Y M R G A I R I S A L S L A R V I Y V M T H D S I G L G E D G
1297 CCGACCCACCGCCATCGAGCACCTGGCTAGCTTCAGGGCGATGCCAACATCTTGTATGATGCGCCAGCCGATGGGAACGAGACAGCTGGTTTCATATAGAGTTGCT 1404
      P T H Q P I E H L A S F R A M P N I L M M R P A D G N E T A G S Y R V A
1405 GTCCTCAAGAAAGCAGACGCGCTCCATCCTTGTCTCTCGCGGAAAAGCTCCCAACCTCCAGGAACATCCATTGAAGTGTGAGAGAGGAGGCTACACTATCACC 1512
      V L K K Q T P S I L A L S R Q K L P N L P G T S I E G V E K G G Y T I T
1513 GACAACTCTACAGGAAACAGCCGATGTGATCTCTCGAAGCAGGATCAGAGCTGAGATAGCAGCCAAAGCCGAGATGAGCTTAGGAAAGCCGGTAAGCCGGTG 1620
      D N S T G N K P D V I L I G T G S E L E I A A K A G D E L R K A G K A V
1621 AGGGTGGTGCATTTGTGTGCTGGGAGCTGTTGAGGAGCAGTCTGATGACTACAAGGAGTGTCTTCCAGCTGCAGTGACAGCCAGGTTAGTATTGAGGCTGGA 1728
      R V V S F V C W E L F E E Q S D E Y K E S V L P A A V T A R V S I E A G
1729 TCGACCTTCGGGTGGGAAAAGATCGTCGGATCCAAGGGGAAGGCCATCGGGATTGACCGGTTGGAGCGAGTGACCCGGTGGGAGGATATACAAGGATATGGGATC 1836
      S T F G W E K I V G S K G K A I G I D R F G A G R I Y K E Y G I T V E A
1837 ACAGTGGAGCCGCTATTGAAGCTCAAAATCTGTTTCTTAAGACTTATTTCTTCTTGGTTGCTTATTTTTCCTTTGACATAATCTGCTAAGAAATGTGT 1944
      V I E A A S A P A N S V S *
1945 GAGATTGAGTTGATGTTTGAAGCTCTGAAGGAAAAACACTTGGTATGATATGGAAGAAATAATCTTTGAGGAAAAAAGAAAAAAGAAAAA 2052
2053 AAAAAAAAAAAAAA 2066
    
```

図2 アイ transketolase の cDNA 配列と推定されるアミノ酸配列

アイ transketolase のヌクレオチド配列は、DBJ, EMBL, GenBank international nucleotide sequence databases に登録済 (アクセッション No. AB066206)。

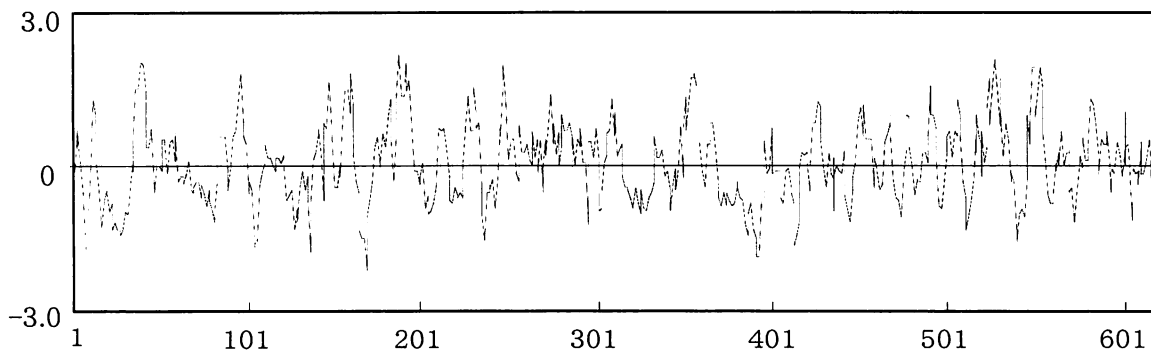


図3 アイ transketolase の疎水性プロット

Hopp&Woods 法による

(1)	-----	
(2)	MAASSSLSTLSHHQTLLSHPKTHLPTTPASSLLVPTTSSKVNGLKSTSSSRRLRVGSASAVVRAAVEALEST	75
(3)	-----MAKTPSPSPA	12
(4)	-----MT	2
(1)	-----MRYNPKNPFWFNDRFVLSAGGCMQLQYA	29
(2)	DIDQLVEKSVNTIRFLAIDAVEKANSNGHPLGMPGAPMGHIL...I.....Y.....	150
(3)	AAAELVVKSVNTIRFLAIDAVENVKSGHPGMPGAPMGHVL...F.KF.....Y.....A..L.G	87
(4)	QFTDIDKLAIVSTIRILAVDTVSKANSNGHPGAPLGRSPAHLV-L.G.SNAHE.NQ.KTGSTEIDLSCLTWTTRS.CCI	76
(1)	LLHLGAYDSVKEEDLKQFRQWGSKTPGHPENFETIGIEVTTCPILGQIANAVGLALAEKHLAARFNKP-DSEIVD	103
(2)	.....L.....T.....RI.....P.V.....-A....	224
(3)	.....V.....GL.....A.....P.V.....VGS.....G..Y...-F.M..	161
(4)	Y...T...-LSI.....L.R.....LP.V.....S...M.M.QAN.DMPLTTSRAFTLS.	149
(1)	HYTYVILGDGCOMBEGIANEACSLAGHWGLGKLIAFYDDNHSIDGDTEIAFTESVDKRFELGWHVIWVKNNGTG	178
(2)	.....Q.....A.....L.....	299
(3)	...M.....S...S...A.....L.....T.....DL...D.G.....LT.A...D.	236
(4)	N...F...LQ...SS...S...LK..N...I...K.T...A.S.S.D.D.A..Y..Y..E.LY.E...ED	224
(1)	YDEIRAAIEEAKVKDKPTMIKVTTTIGFGSPNKSNSYSVHGAAALGAKEVEATRKNLW-PYEPFHVPPEVEKHW	252
(2)	.....K...T.T...L.....S...S.....Q...-.....K... 373	
(3)	.....E..KV..S.T...L...A.....A.T.G...N...P..A...Q...-...T...DD.K... 310	
(4)	LAG.AK..RQR.LS....FDQNDHNNH-WLRFLR.G.H...P.K.DD.KQLKSKF.FN.DKS.V..Q..YD.Y	298
(1)	SRHV-PEGAALAEWNAKFAEYKSKYPTAAELKSIIEGEFPAGWEKALPTYTPESPGDATFNLSQTCLNALAPV	326
(2)	...T-...S.....T.....EK...ED.T.F...TT.....T.....Q.....K. 447	
(3)	...I-S...E..SA.....EK...K.....T..L.L.....NP..T..HQN...V.A. 384	
(4)	QKTILKP.VEANNK..KL.S..QK.F.ELG...ARRLS.QL..N..SK....AKDSAV..K..E.V.EDVYNO	373
(1)	VPGLLGSADL---ASSNMILLKSFQDFQKDTPE----ERNVRFVREHGMGATCNGIALHSPGFVPCATF	391
(2)	I.....M...RRTHRK---KETF.....C..... 512	
(3)	L...I.....TA...AF...S...E..T---G..LK..A.....V.....L..FS..Y 499	
(4)	L.E.I.....VLPILTP..L.RW.EALS..PPSSGSGNYSY.YI.Y.I..A...M...SAFGANYK..GG.. 448	
(1)	FVFTDMRGAIRISALSARVIYVMTHDSIGLGEDGPTHQPIEHLASFRAMPNIMMRPADGNETAGSYRVAVLK	466
(2)	.....M.....E.G.....A.SK.P.....L.....K...EN 587	
(3)	.....A...A...K...V..I.....V.....VL.....A.K...EN 524	
(4)	LN.VS.AA..V.L...GHP..W.A...V...T..H..SL...QVW.....VSAA.KNSLES 523	
(1)	KQTPSILALSROKL-PNLPGTSIEGVEKGGYTITDNST-GNKPDVILIGTGSELEIAAKAGDELKAGKAVRVVS	539
(2)	RK.....K.-...S-.....E.....E..... 660	
(3)	AGR...S.....Q.....V...GR...V.S...KD.E..E..M.....R..E...E..K.... 598	
(4)	.H....I...PD.TCH.WKVAL..SAS...VLQ.VAN----.I..VA...VSLSVE.AKT.AAKNIKA... 594	
(1)	FVCWELFEEQSDSEYKESVLPAAVTARVSIAGSTFGWEKIVGSKGKAIGIDRFASAPAGRIYKEYGITVEAVIE	614
(2)	..S.....K.....SD.....H.....K.....K..Q.....V. 735	
(3)	L.S...G...K...M...SE.....V.....RF..L..R.V.....S.E.L..F.....VA 673	
(4)	LPDFFT.DK.PL..RL....DN.PI-M.V.VLA.TC.G.Y---AHQSF.....PVRHQSSSSVSPQKVLK 665	
(1)	AANSVS----- 620	
(2)	..K..C----- 741	
(3)	..KELC----- 679	
(4)	ELKRPLHSIRVTS 677	

図4 アイ transketolase のアミノ酸配列と他の生物由来のものとの比較

(1) アイ (*Polygonum tinctorium*) ; (2) ホウレンソウ (*Spinacia oleracea* (chloroplast 局在))<sup>(8)</sup>; (3) シソ科植物 (*Craterostigma plantagineum*)<sup>(7)</sup>; (4) 酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)<sup>(9)</sup>

糖基質と相互作用する残基は□で囲んだ。文字の反転は、thiamine diphosphate と相互作用する残基を示す。点 (・) は、アイのものとの共通のアミノ酸を、ハイフン (-) は、アミノ酸の欠失を示す。

アイ transketolase cDNA の大腸菌内での過剰発現

得られた transketolase cDNA 配列のほぼ全領域 (1bp~2066bp までの内部配列に、45 bp の pCR2.1 ベクター領域を含む) を発現ベクターに導入し、大腸菌 JM109 内で発現させた。この発現系では、発現タンパク質はビオチン化されるため、アビジンのアフィニティーカラムで精製し、活性測定を行った。transketolase を発現させた大腸菌の抽出液では、コントロールと比較して約 4 倍の活性を示した (表 1)。

表 1 大腸菌内での transketolase 発現

	Activity (units/mg protein)
PPV-tk/JM109	0.462
PPV/JM109	0.139

PPV-tk : transketolase cDNA 配列を含む  
PPV : 発現ベクターのみ

アイの transketolase 組織別分布

植物内での本酵素の動向を調べるため、様々な組織の活性を比較、検討した。本酵素の活性は、葉において特に高い値を示したが、他の組織での活性は低かった (表 2)。また、アイ各組織 0.1g (生体重量) から、約 1 μg の mRNA を精製し、逆転写反応によって cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型として、リアルタイム RT-PCR により mRNA 発現量を検証した。結果、葉以外の組織では、活性同様、mRNA 含量は非常に低かった。

表 2 組織別での transketolase 活性

	根	茎	花	種子	葉
Activity (units/g tissue)	1.5	1.4	2.7	1.2	17.8
mRNA の発現量*	0.054	< 0.001	検出不能	0.003	1

\* mRNA の発現量は第 1 葉の値を 1 としたときの相対値で示した

アイの植物体の葉を上から順に第 1 葉 第 2 葉と名付け、各々の葉の transketolase 活性を測定した。結果、transketolase の活性は、葉の若い時期に高く、一度低下した後、再び活性が高くなるというパターンが見られた (図 5A)。比較のため、タバコの葉の transketolase 活性を測定した。タバコでも同様のパターンを示したことから、植物に一般的に見られる現象と考えられる。

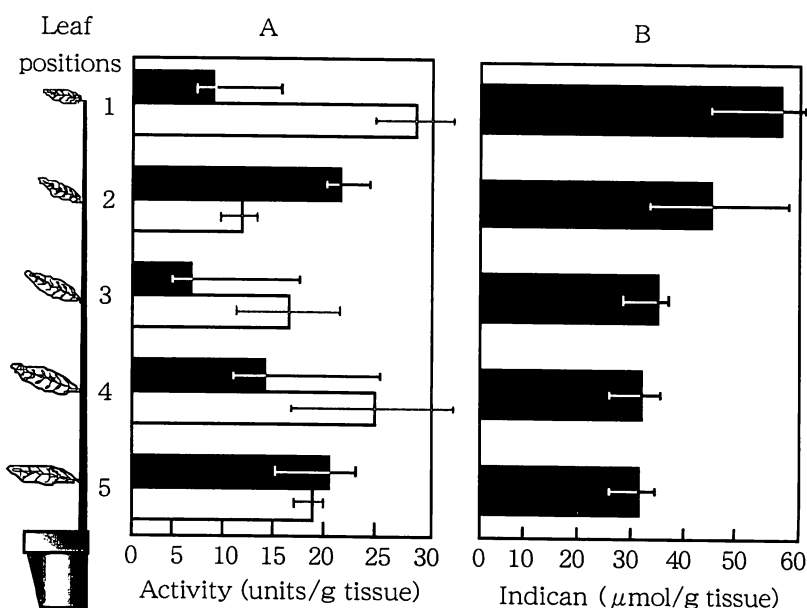


図 5 葉の順位別 transketolase 活性と indican 含量

A : transketolase 活性の変動 アイ■およびタバコ□の葉を用い測定を行った  
B : 同様の条件における indican 含量の変動

これに対し、図 5B に見られるように、indican 含量は第 1, 2 葉で最も高く、その後は増加せず一定となる。このように、indican の合成は主に若い葉で行われ、その後はストップしているのではないかと考えられる。このことから transketolase 活性の第 4, 5 葉での上昇は、indican 合成には関与していないと推測できる。むしろ、第 1, 2 葉の間で活性が著しく上昇しており、transketolase がシキミ酸経路へ基質の供給を盛んに行っている可能

表 3 葉の順位別でみた mRNA の発現量

Leaf positions	mRNA 相対値
1	1
2	2080
3	4
4	0.1
5	< 0.1

第 1 葉の値を 1 としたときの相対値で示した

性が考えられる。さらに、リアルタイム PCR の結果から、第 2 葉において非常に高い mRNA 発現が明らかになった (表 3)。しかし、第 4, 5 葉では転写レベルが低く、それ以前の若い葉の時点で合成された transketolase が徐々に蓄積した結果、第 4, 5 葉で活性が上昇した可能性も考えられる。あるいは、若い葉で合成されていた transketolase とは異なるアイソザイムの出現も考えられる。

次に、種子から発芽後、第 2 葉までの成長時期の transketolase 活性の変動を調べた。予想された

ように、種子から発芽すると同時に活性が急激に増加し、その後、植物体の成長とともに上昇した (図 6)。これに対し、indican 含量は、本葉が確認されてから増加を開始している。すなわち、indican 蓄積に先立って、transketolase が発現されていることが確認された。

#### 4. 結論

アイ transketolase の cDNA クローニングを行った。得られた cDNA は、620 個のアミノ酸からなる分子量 67,450 のタンパク質をコードしていた。このアミノ酸配列は、植物の典型的な transketolase と高い相同性を示し、糖基質や補酵素である Thiamine diphosphate と相互作用する残基が高く保存されていた。

アイにおける transketolase 活性は、予想されたように、発芽後の成長とともに上昇する傾向にあった。組織別では葉にのみ特に高い値を示し、その他の組織ではその活性は低く抑えられていた。または、mRNA レベルでも同様の結果が得られた。葉の順位別に活性を測定すると、第 1 葉から第 2 葉にかけて特に著しい上昇が見られた。この時期の mRNA 発現量も同様のパターンを示したことから、転写レベルで調節されている可能性が考えられる。第 3 葉で活性が低下したのち第 4, 5 葉で再び上昇していくが、この時期は mRNA の発現量が低く抑えられていることから、この活性の増加は合成された transketolase の蓄積に起因するものかもしれない。これらの transketolase の動向は、indican の蓄積量とよく似ていた。しかし、indican の蓄積は、第 3 葉以降増加しないことから、第 4, 5 葉での transketolase 活性の上昇は indican 合成と関係していないかもしれない。むしろ第 1, 2 葉の若い葉においてシキミ酸経路への基質の供給が活発におこなわれている可能性が考えられる。

今後は、本酵素の細胞内局在、転写調節の有無などといった研究により、一次代謝経路と indican 合成経路との関係を明らかにしていくことが課題であると考えている。

#### 参考文献

- (1) A. Bayer. *Ber.* 11, 1296 (1878)
- (2) Y. Minami, T. Kanafuji and K. Miura. *Bioci.Biotech.Biochem.* 60, 147-149 (1996)
- (3) Y. Minami, H. Takao, T.Kanafuji, K. Miura, M. Kondo, I. Hara-Nishimura, and H. Matsubara. *Plant Cell Physiol.* 38, 1069-1074 (1997)

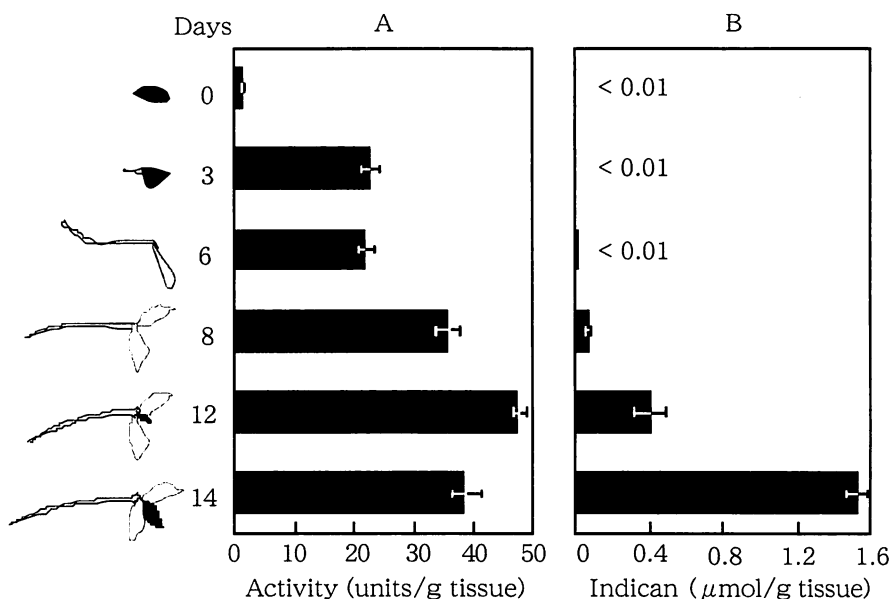


図 6 発芽時の transketolase 活性と indican 含量

A: transketolase 活性の変動 B: 同様の条件における indican 含量の変動

- (4) Y. Minami, Y. Shigeta, U. Tokumoto, Y. Tanaka, K. Yonekura-Sakakibara, H. Oh-oka and H. Matsubara. *Plant Sci.* 142, 219-226 (1999)
- (5) Y. Minami, O. Nishimura, I. Hara-Nishimura, M. Nishimura and H. Matsubara. *Plant Cell Physiol.* 4, 218-225 (2000)
- (6) Y. Minami, Recent Res. *Devel. Plant Biol.* 1, 155-162 (2001)
- (7) G. Bernacchia, G. Schwall, F. Lottspeich, F. Salamini, and D. Bertels. *EMBO J.* 14, 610-618 (1995)
- (8) A. Flechner, U. Dressen, P. Westhoff, K. Henze, C. Schnarrenberger and W. Martin. *Plant Mol. Biol.* 32, 475-484 (1996)
- (9) M. Sundstrom, Y. Lindqvist, G. Schneider, U. Hellman and H. Ronne. *J. Biol. Chem.* 268, 24346-24352 (1993)

## cDNA cloning and mRNA expression of transketolase in *Polygonum tinctorium*

Yoshiko MINAMI, Keisuke FUJITA and Hiroshi MATSUBARA

*Department of Biochemistry, Faculty of Science,*

*Okayama University of Science*

*Ridai-cho 1-1, Okayama 700-0005, Japan*

(Received September 28, 2004; accepted November 5, 2004)

Leaves of *Polygonum tinctorium* accumulate a large amount of indican, the precursor of indigo blue. Indican is a secondary metabolite which is synthesized from indoxyl and UDP-glucose *in vivo*. A shikimic pathway in which indoxyl is produced as an intermetabolite is also linked with a pentose phosphate pathway through erythrose 4-phosphate which is produced by the catalysis of transketolase. In this study, the nucleotide sequence of transketolase cDNA was determined. Transketolase activity in various tissues was measured, and then the amount of mRNA was quantified by a real time RT-PCR. On the base of these data, we discussed the relation between pentose phosphate pathway and indican metabolism.