

氏名・(本籍)	井上 慎太郎 (徳島県)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	甲第理116号
学位授与の日付	令和3年3月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(課程博士)
学位論文題目	タデ科植物アイのインジカン生合成経路の解明
論文審査委員	主査 教授 南 善子 副査 教授 池田 正五 准教授 濱田 隆宏 教授 安藤 秀哉 准教授 中井 正人 (大阪大学蛋白質研究所)

論文内容の要旨

申請者氏名 井上 慎太郎

論文題目

タデ科植物アイのインジカン生合成経路の解明

植物由来の代謝産物は我々の生活の様々な場面で利用されている。タデ科植物アイ *Polygonum tinctorium* (以下、タデアイ) から生産される Indigo もまた、古代から藍染に用いられてきた。Indigo は植物細胞内に Indican (Indoxyl β -D-glucoside) と呼ばれる二次代謝産物として蓄積されている。細胞内で Indican は液胞に、その分解酵素 (β -glucosidase) は葉緑体に分かれて局在しており、両者が交わることはない。しかし何らかの原因で細胞が損傷すると、Indican は分解酵素により Indoxyl と Glucose に分解される (図 1)。Indoxyl は不安定であるため、空気酸化され、自発的に Indigo を生じる。これが藍染の青色染料である。

二次代謝産物は植物の生存に必須ではないものの、特定の環境に応答するために生合成されるものが多い。しかしながら、タデアイ

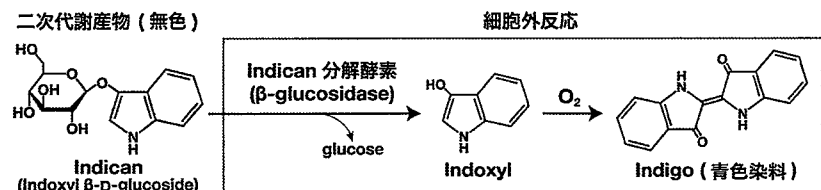


図 1. 染料 Indigo の生成機構

イにおいて Indican の生理的意義は不明であり、その生合成経路も解明されていなかった。本研究では、Indican 生合成経路に関わる一連の酵素を同定し、細胞内でそれらがどのように関連し機能するのかを探った。

1) Indican 合成酵素 *PtIGS* の同定と

組織および細胞内局在の解析

これまでに、Indican は UDP-glucosyltransferase (UGT) の働きで生合成されることが報告されていた。本研究では、タデアイの葉から Indican 合成活性を持つ分画を部分精製し、PMF¹ 解析を行った。結果を Transcriptome 解析データと合わせることで、Family72B の UGT を検出した。この遺伝子の cDNA クローニングを行い、大腸菌内で発現させた組換えタンパク質が Indican 合成活性を示したため、Indican 合成酵素 *PtIGS*² と名付けた。

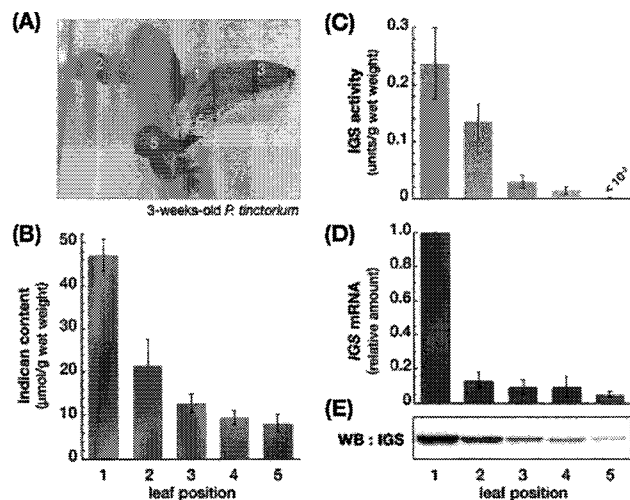


図 2. 若葉特異的な *PtIGS* の発現

(A) タデアイの写真。各葉の位置における (B) Indican 含量、(C) Indican 合成活性、(D) *PtIGS* mRNA 発現量、(E) *PtIGS* タンパク質の発現量

植物体において、Indican は新芽で最も豊富に存在する。同様に、*PtIGS* タンパク質とその mRNA も新芽で最も高い発現が見られた (図 2)。

続いて、Indican 生合成経路および産物輸送経路を明らかにするため、*PtIGS* の細胞内局在を検討した。当初、*PtIGS* は一次構造から cytosol (細胞質基質) の可溶性タンパク質であると予想した。しかし、密度勾配超遠心による細胞分画において、*PtIGS* の一部が ER (小胞体) 膜と会合することがわかった。そのため、*PtIGS* が ER 膜上のタンパク質と結合している可能性が考えられた。

PtIGS の基質 Indoxyl の前駆体としては葉緑体由来の Indole が予想される。Indoxyl の生成には monooxygenase が働くと考えられるが、産物は非常に不安定であり、もし酸化されると細胞内で容易に Indigo (不溶性) を生成してしまう (図 3)。これを防ぐためには、*PtIGS* と monooxygenase は物理的に近い距離で基質の受け渡しをする必要があると予想した。

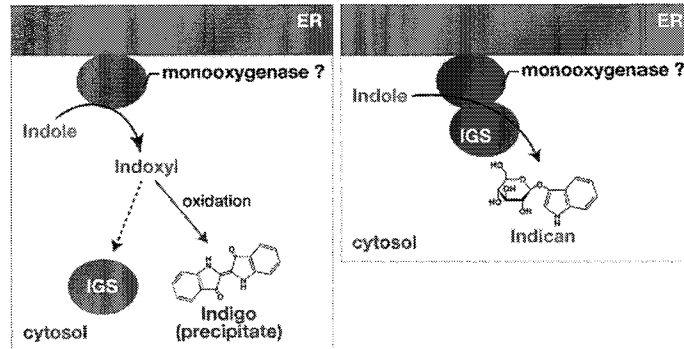


図 3. *PtIGS* と monooxygenase の相互作用の可能性
ER 膜には Cytochrome P450 (CYP) のような monooxygenase の存在が一般的に知られている。

2) Indican 生合成に関わるタンパク質の探索

monooxygenase が ER 膜に局在する可能性を考え、microsome (膜小胞) 分画を用いて *PtIGS* の共免疫沈降と Pulldown assay を行った。結果、15 の *PtCYP* と 1 つの Flavin-containing monooxygenase (*PtFMO*) が検出されたので、これらをクローニングした。続いて、Indican 生合成に関わるものを絞り込むことを試みた。*PtIGS* mRNA が新芽で特異的に発現する傾向が見られたため、Indican 生合成に関与する他のタンパク質も同様の傾向を持つと仮説した。再度 Transcriptome 解析を行い、新芽 (第 1 葉) と成熟した葉 (第 2 葉) での mRNA 発現量を比較したところ、候補は 3 つの *PtCYP* と *PtFMO* に絞られた。

PtIGS のもう一方の基質は UDP-glucose である。免疫沈降実験では、*PtFMO* の他に数種の Sucrose synthase (SUS) が検出された。SUS は UDP-glucose 合成酵素としても知られており、Indican 生合成との関連が考えられた。このうち、特に 1 つの SUS が *PtIGS* との強い相互作用を示し、第 2 葉で mRNA 発現量が減少したため、cDNA クローニングを行い、*PtSUS* と名付けた。

3) Indole monooxygenase *PtFMO* と

UDP-glucose 合成酵素 *PtSUS* の同定

候補となる monooxygenase を大腸菌内で発現させ、Indole から Indoxyl 生成し、続いて自発的な Indigo 形成が起こるかどうかを調べた。結果、*PtFMO* を発現させた大腸菌のみが Indigo を生成した (図 4)。この活性は、試験管内で組換え *PtFMO* に Indole と NADPH を加えることによっても再確認した。

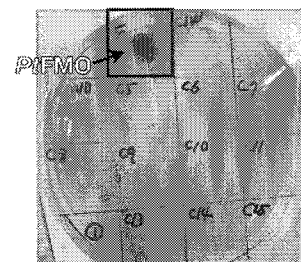


図 4. Indole monooxygenase のスクリーニング

さらに、*PtFMO* と *PtIGS* を大腸菌内で共発現させた結果、Indican の生成が見られたため、

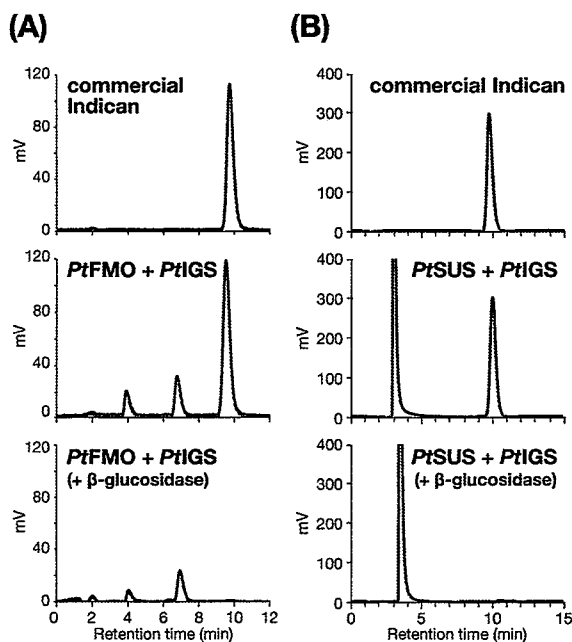


図5. 共役反応による Indican 合成
共役反応で合成された Indican を分析した
(A) *PtFMO* と *PtIGS* の共発現 (大腸菌内)
(B) *PtSUS* と *PtIGS* の *in vitro* 共役反応

PtFMO は Indole monooxygenase としての活性を持ち、*PtIGS* に Indoxyl を供給できることが明らかとなった (図 5(A))。

続いて、*PtSUS* の働きについて検討した。試験管内で、基質 (Sucrose, UDP, Indoxyl) に組換え *PtSUS* と *PtIGS* を加え共役反応を行ったところ、Indican が合成されることが明らかになった (図 6)。これらの結果から、*PtFMO* と *PtSUS* が働く基質供給経路を図 6 のように推定した。

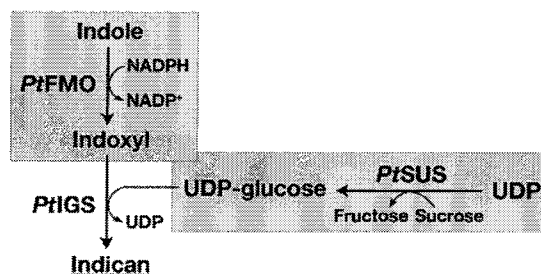


図6. 推定される *PtIGS* への基質供給経路

4) Indican 生合成に関わるタンパク質の細胞内での動態

上で述べたように、*PtIGS* の基質 Indoxyl は不安定であり、合成後はすぐに Indican へ変換される必要がある。さらに、Indican 合成には UDP-glucose も必要であることから、細胞内では *PtIGS*, *PtFMO*, *PtSUS* の3者が密接に関わっていると考えられた。再度、細胞分画を行い、Indican 生合成に関わるタンパク質の局在を調べたところ、*PtIGS* と *PtSUS* の大半は cytosol に局在し、ごく一部が microsome から検出された (図 7)。一方、*PtFMO* は microsome からのみ検出され、高濃度の塩やアルカリ条件下でも遊離が見られず、膜タンパク質の様な挙動を示した。また、microsome を Proteinase K で処理すると、この3つのタンパク質は容易に分解を受けることから、膜の cytosol 側に局在していることは明らかである。

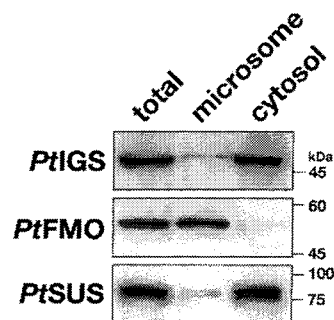


図7. Indican 生合成に関わるタンパク質の細胞内局在

共焦点顕微鏡を用いた観察では、*PtFMO* が ER 由来の膜小胞に局在することが明らかとなった。さらに、その小胞上では *PtIGS* や *PtSUS* との共局在も観察され、Indican 生合成を行う代謝複合体 (メタボロン) の形成も期待される。

興味深いことに、この小胞が葉緑体に付着している様子も無傷葉緑体の免疫染色により観察された (図 8)。さらに、葉緑体膜分画の Immunoblotting では、*PtFMO*, *PtIGS*, *PtSUS* が検出されている。この結果から、*PtFMO* が基質 Indole を葉緑体と小胞の接触部位から受け取り、小胞上で Indican 合成を行っている可能性も考えられた。

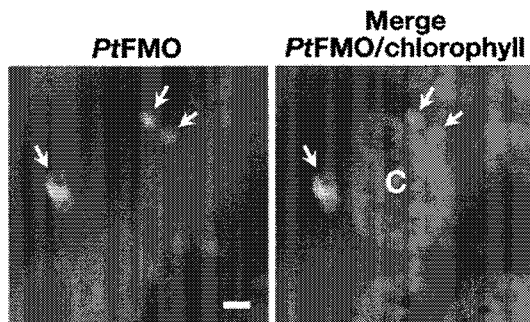


図 8. 葉緑体に局在する *PtFMO* の免疫染色
無傷葉緑体を *PtFMO* 抗体で免疫染色し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。chlorophyll は葉緑体(C) の自家蛍光。矢印は *PtFMO* を含む小胞を示す。bar=1 μm。

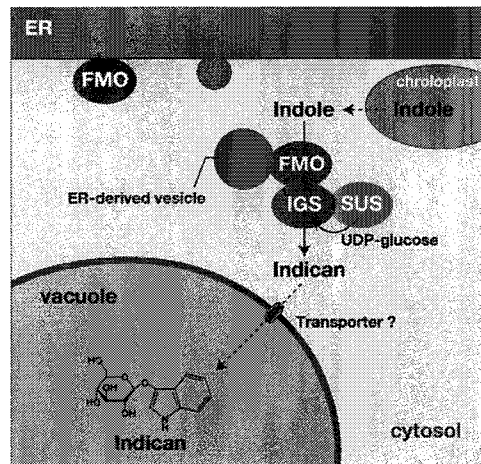


図 9. Indican 生合成に関わるタンパク質の細胞内での予想図

モデル植物であるタバコ *Nicotiana benthamiana* の葉に *PtFMO* と *PtIGS* を一過性発現させてみた結果、細胞内で Indican の生合成が確認された。さらに、タバコ細胞内で *PtFMO* は ER に局在するが、*PtIGS* を共発現させると、タデアイの細胞内で観察されるような小胞を形成するようになる。この結果は、*PtFMO* が形成する小胞と Indican 生合成に何らかの関わりがあることを示していた。

本研究データをもとに、今後、タデアイのゲノム編集研究などにより、代謝複合体の詳細や小胞の細胞内での動きが明らかになることが期待される。

¹ Peptide mass fingerprinting

² *Polygonum tinctorium* indoxyl β-D-glucoside synthase

発表論文：

学術論文 (査読有り)

- [1] **S. Inoue**, R. Morita, Y. Minami: An Indigo-producing plant, *Polygonum tinctorium*, possesses a flavin-containing monooxygenase capable of oxidizing Indole. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **534** (2021) 199-205
- [2] **S. Inoue**, R. Morita, K. Kuwata, K. Ishii, Y. Minami: Detection of candidate proteins in the Indican biosynthetic pathway of *Persicaria tinctoria* (*Polygonum tinctorium*) using protein-protein interactions and transcriptome analyses. *Phytochemistry* **179** (2020) 112507
- [3] **S. Inoue**, R. Morita, K. Kuwata, T. Kunieda, H. Ueda, I. Hara-Nishimura, Y. Minami: Tissue-specific and intracellular localization of Indican synthase from *Polygonum tinctorium*. *Plant Physiology and Biochemistry* **132** (2018) 138-144
- [4] **S. Inoue**, T. Moriya, R. Morita, K. Kuwata, S.T. Thul, B.K. Sarangi, Y. Minami: Characterization of UDP-glucosyltransferase from *Indigofera tinctoria*. *Plant Physiology and Biochemistry* **121** (2017) 226-233

プロシーディング (査読有り)

S. Inoue, R. Morita, Y. Minami : Role of Sucrose Synthase in the Metabolism of Indican. *The FASEB Journal* **34** (2020) <https://doi.org/10.1096/fasebj.2020.34.s1.09098>

学会発表

国内 7 件, 国外 2 件

審査結果の要旨

本論文は、タデ科植物アイが持つ独自の二次代謝産物インジカンの生合成経路について解析した研究をまとめたものである。様々な実験手法を用い、生合成経路のいくつかのタンパク質を見つけ、代謝複合体という形にまで研究を進めた内容となっている。論文は4部構成で、まとめられている。

第1部では、インジカン生合成酵素(PtIGS)の部分精製し、同定した。また、細胞内局在を調べた。PtIGSが触媒する反応は2000年に明らかになっていたが、単離精製が困難であったことから、それ以上の情報は得られていなかった。本研究は、トランスクリプトーム解析が一般的となったことにより進展させることができた。解析で得られた部分配列と精製産物のPMF解析を組み合わせ、PtIGSの全長cDNAを得ることに成功した。この研究は、困難であった生合成経路解明への突破口となった。

第2部では、葉の新芽と第2葉でのmRNA発現の差をトランスクリプトーム解析で調べ、タンパク質間相互作用解析と照らし合わせた。第1部で、一部のPtIGSが膜局在であることが明らかになり、なんらかの膜タンパク質と複合体を形成していることが予測された。そこで、Pull down assayと共免疫沈降を用いて、網羅的に探索を行い、可能性のあるタンパク質の情報を得た。

第3部では、絞り込んだタンパク質のうち、PtIGSに基質を供給するモノオキシゲナーゼPtFMOとUDP-glucose合成酵素PtSUSの同定を行った。大腸菌およびタバコを用いた発現系により、PtFMOがインドキシルを生成し、かつPtIGSと密接に関わることを証明した。さらにPtSUSとPtIGSをin vitroで反応させ、UDP-glucoseの受け渡しが可能であることを証明した。また、他の数種のタンパク質についても相互作用の可能性を明らかにした。

第4部では、以上の結果で得られた数種のタンパク質による複合体形成の可能性を、相互作用解析および共焦点顕微鏡を用いて示した。少なくともPtIGS, PtFMO, PtSUSの3者が共局在する結果を得ることができた。また、これらが小胞体由来の小胞に結合していること、この小胞は葉緑体とも結合することが明らかとなった。さらに、これらの小胞が微小管により輸送される可能性も得られた。

得られた成果は、独創的かつ学術的に価値のある知見を含んでおり、同分野のさらなる発展が期待できるものとなっている。また、第1部から3部までの内容はすでに国際学会で発表、かつ査読制度のある学術雑誌に3通の論文として掲載済みである。

審査の結果、本論文は博士論文に値する内容を十分に備えており、論文提出者井上慎太郎は博士(理学)の学位を受ける資格を有するものと認める。