

タデ科植物アイのインジカン生合成経路の解明

2021

岡山理科大学大学院

理学研究科

材質理学専攻

井上 慎太郎

目次

	頁
Indican 生合成経路について	1
第 1 章 Indican 合成酵素 <i>PtIGS</i> の同定と組織および細胞内局在の解析	5
第 2 章 タンパク質間相互作用と Transcriptome 解析に基づいた Indican 生合成関連タンパク質の探索	23
第 3 章 Indole monooxygenase <i>PtFMO</i> と UDP-glucose 合成酵素 <i>PtSUS</i> の同定	45
第 4 章 Indican 生合成に関わるタンパク質の細胞内動態	71
総括	95
謝辞	97
業績	98

略号

ABC transporter	ATP-binding cassette transporter
AS	Anthranilate synthase
BFA	Brefeldin A
BiP	Binding protein
BS ³	Bis(sulfosuccinimidyl) suberate
CYP	Cytochrome P450
Cyt.b5	Cytochrome b5
DEG	Differentially expressed gene
DIC	Differential interference contrast
DSS	Disuccinimidyl suberate
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EGS	Ethylene glycol bis(succinimidyl succinate)
G6PDH	Glucose 6-phosphate dehydrogenase
GST	Glutathione S-transferase
IGPase	Indole 3-glycerol phosphate synthase
Indican	Indoxyl β -D-glucoside
Indigo	2-(1,3-dihydro-3-oxo-2H-indazol-2-yliden)-1,2-dihydro-3H-indol-3-on
INS	Indole synthase
<i>I</i> tUGT	<i>Indigofera tinctoria</i> UDP-glucosyltransferase
Lat B	Latrunculin B
mRFP	Monomeric red fluorescent protein
PIP	Plasma membrane intrinsic protein
PSM	Peptide spectrum matches
PSPG	Plant secondary product glycosyltransferase
<i>Pt</i> BGL	<i>Polygonum tinctorium</i> β -glucosidase
<i>Pt</i> CPR	<i>Polygonum tinctorium</i> cytochrome P450 reductase
<i>Pt</i> FMO	<i>Polygonum tinctorium</i> flavin-containing monooxygenase
<i>Pt</i> GAPDH	<i>Polygonum tinctorium</i> glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
<i>Pt</i> IGS	<i>Polygonum tinctorium</i> indoxyl β -D-glucoside synthase
<i>Pt</i> SUS	<i>Polygonum tinctorium</i> sucrose synthase
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
TSA	Tryptophan synthase α
TSB	Tryptophan synthase β
UGPase	UDP-glucose pyrophosphorylase
UGT	UDP-glucosyltransferase

Indican 生合成経路について

タデ科植物アイ *Polygonum tinctorium* (以下、タデアイ) は藍染の主染料 Indigo の生産に用いられる植物であり (図 1)、葉の液胞内には多量の Indican (Indoxyl β -D-glucoside) が前駆体として蓄えられている。一方で、Indican の分解酵素 (β -glucosidase) は葉緑体に局在することがわかっている (Minami et al., 1997)。細胞が虫などの攻撃により物理的なダメージを受けると、両者が交わり、Indican は Indoxyl と β -D-glucose へと分解される (図 2)。続いて、Indoxyl は酸素に対して不安定であるため、酸化され容易に Indigo を形成する。このように、Indigo は植物が傷つき、危険にさらされた時のみ形成されることから、前駆体である Indican は忌避物質として蓄えられていると推測される。実際、植物にとって最も重要な新芽には、成熟した葉に比べ、Indican が豊富に存在することが報告されている (Minami et al., 2000)。



図 1. タデアイと藍染

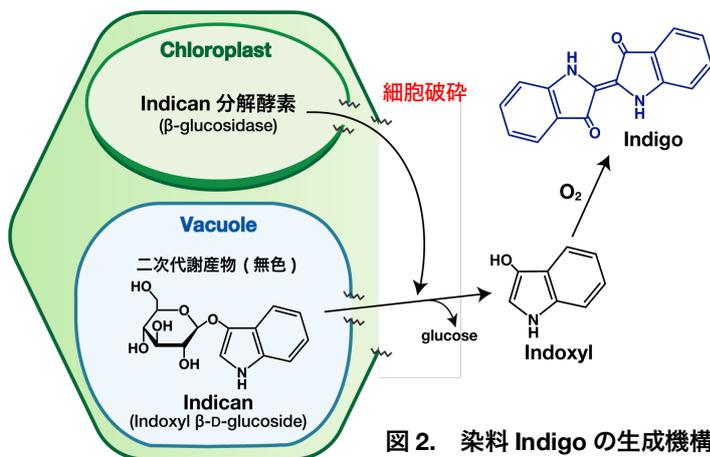


図 2. 染料 Indigo の生成機構

一方、図 3 で示すように、細胞内で Indican は、Indoxyl と UDP-glucose から Indican 合成酵素 (UDP-glucosyltransferase (UGT) の一種) の働きで生合成されることが報告されている (Minami et al., 2000)。UGT は数多くの二次代謝産物の合成に関わり、植物では多くのアイソザイムの存在が知られている (Caputi et al., 2012)。Indican 合成酵素の基質である Indoxyl は、Indole (葉緑体の一次代謝由来) が monooxygenase による水酸化を受けることにより生成されると予想される。しかし、この反応に関わる monooxygenase はこれまで同定されていない。他の植物の二次代謝では、ER 膜に局在する monooxygenase の一種 Cytochrome P450 (CYP) の関与が報告されている (Chapple, 1998; Ralston and Yu, 2006)。

Indole 合成酵素としては、葉緑体に Tryptophan 合成酵素 α subunit (TSA) が存在する。最近、Indican の生合成に関わる可能性がある cytosol 局在の Indole 合成酵素 (INS) も新たに報告された (Jin et al., 2016)。最終産物である Indican は液胞に蓄積されるが、Indican 合成酵素は酸性側の pH では活性がかなり低い (Minami et al., 2000)。このことから、液胞以外の区画で生合成が行われた後、未解明の輸送機構により液胞内腔に輸送されると考えられる。

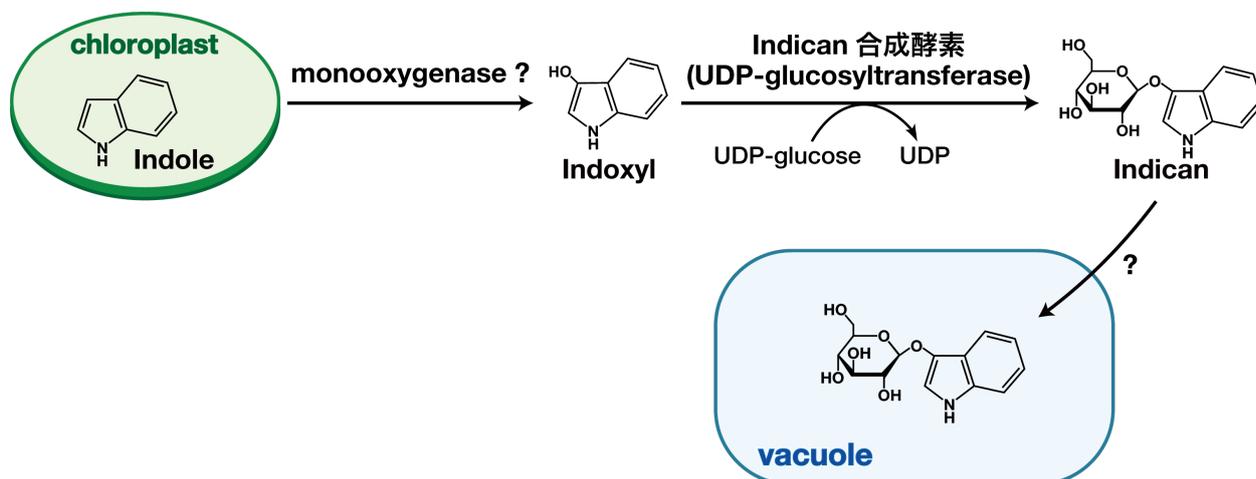


図3. 予想される Indican 生合成経路

Indigo は 1900 年代に化学合成法が確立された。それ以降、Indigo は安価になり、藍染もより一般的になったが、一方で、化学合成では多量の有機廃液が排出されるなど、環境面への悪影響が問題となっている (Fabara and Fraaije, 2020)。そのため、近年、Indigo や Indican を生産するためにモデル植物や微生物を用い、有害物質を用いない方法が考案されてきている。本研究の Indican 生合成経路の解明により、これら産業への応用も期待される。本論文では、第 1 章で Indican 合成酵素 *PtIGS* (*P. tinctorum* Indoxyl β -D-glucoside synthase) の同定と組織および細胞内局在について述べる。続いて、2 章および 3 章では Indican 生合成に関わる Indole monooxygenase および UDP-glucose 合成酵素と *PtIGS* とのタンパク質間相互作用に着目し、解析した結果を示した。

さらに、近年、メタボロンと呼ばれる代謝複合体が多く報告されており、メタボロン形成は代謝の効率を上昇させると言われている (Zhang and Fernie, 2020)。Indican 合成には基質として Indoxyl と UDP-glucose が必要であること、そして、Indoxyl が不安定であること、また液胞内腔へ産物が輸送される必要があることから、関連するタンパク質が密接に関わる可能性が考えられた。本論文の 3 章、4 章では Indican 生合成経路に関わるタンパク質の関わりを、生化学的、細胞生物学的に解析した結果を記載した。

参考文献

- A.N. Fabara, M.W. Fraaije, 2020. An overview of microbial indigo-forming enzymes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 925e933.
- Caputi, L., Malnoy, M., Goremykin, V., Nikiforova, S., Martens, S., 2012. A genome-wide phylogenetic reconstruction of family 1 UDP-glycosyltransferases revealed the expansion of the family during the adaptation of plants to life on land. *Plant J.* 69, 1030–1042.
- Chapple, C., 1998. Molecular genetics analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol Biol.* 49, 311–343.
- Inoue, S., Moriya, T., Morita, R., Kuwata, K., Thul, S.T., Sarangi, B.K., Minami, Y., 2017. Characterization of UDP-glucosyltransferase from *Indigofera tinctoria*. *Plant Physiol. Biochem.* 121, 226–233.
- Jin, Z., Kim, J.-H., Park, S.U., Kim, S.-U., 2016. Cloning and characterization of indole synthase (INS) and a putative tryptophan synthase α -subunit (TSA) genes from *Polygonum tinctorium*. *Plant Cell Rep.* 54, 340–344.
- Minami Y, Takao H, Kanafuji T, Miura K, Kondo M, Hara-Nishimura I, Nishimura M, Matsubara H., 1997. β -Glucosidase in the indigo plant: intracellular localization and tissue specific expression in leaves. *Plant Cell Physiol.* 38(9):1069-74.
- Minami, Y., Nishimura, O., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., Matsubara, H., 2000. Tissue and intracellular localization of indican and the purification and characterization of indican synthase from indigo plants. *Plant Cell Physiol.* 41(2), 218–225.
- Minami, Y., Sarangi, B.K., Thul, S.T., 2015. Transcriptome analysis for identification of indigo biosynthesis pathway genes in *Polygonum tinctorium*. *Biologia* 70, 1026–1032.
- Ralston, L., Yu, O., 2006. Metabolons involving plant cytochrome P450s. *Phytochemistry Rev.* 5 (2), 459–472.
- Zhang and Fernie, 2020. Metabolons, Enzyme–Enzyme Assemblies that Mediate Substrate Channeling, and Their Roles in Plant Metabolism, *Plant Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100081>

第 1 章

Indican 合成酵素 *PtIGS* の同定と組織および細胞内局在の解析

要旨

タデアイ *Polygonum tinctorium* は青色染料として用いられる Indigo の前駆体として二次代謝産物 Indican (Indoxyl β -D-glucoside) を生合成する。Indican は Indican 合成酵素 (UDP-glucosyltransferase (UGT) の一種) により生合成される。本研究では Indican 合成酵素をタデアイの葉から精製し、精製産物の PMF 解析を行った。その結果、72B family の UGT と一致するペプチド断片が検出された。その遺伝子を *Ptlgs* (*P. tinctorium* Indoxyl β -D-glucoside synthase gene) と名付け、Rapid amplification of the cDNA ends (RACE) 法により cDNA 全長を獲得した。cDNA から推定される *PtlGS* の一次構造は、*Indigofera tinctoria* 由来の Indican 合成酵素 *ItUGT1*, *ItUGT2* と高い相同性を示した。タデアイ植物体において、*PtlGS* タンパク質と mRNA の発現は葉でのみ見られ、他の組織では検出されなかった。特に、*PtlGS* mRNA は第 1 葉 (新芽) で発現量が最も高く、葉が古くなると急激に減少した。これらの傾向は Indican 含量および Indican 合成活性と一致し、*PtlGS* は植物細胞内で Indican 合成酵素として働くと考えられた。

PtlGS の細胞内局在を、葉の抽出液から調整した cytosol 分画と microsome 分画を用いて調べた結果、*PtlGS* はどちらの分画からも検出された。さらに、*PtlGS* は microsome と強く会合しており、界面活性剤や Urea で処理した場合でのみ遊離が見られた。加えて、Sucrose 密度勾配遠心により、*PtlGS* と ER 膜の会合が確認できた。これらの結果は、*PtlGS* が何らかの ER 膜タンパク質と会合している可能性を示唆していた。

緒言

第 1 章では、Indican 合成酵素の植物体における組織別発現と細胞内局在を解析した。UDP-glucosyltransferase (UGT) は、基質として UDP-glucose を用い、様々な低分子への Glucose 付加反応を触媒する酵素である。グリコシル化は多くの二次代謝における重要な反応であり、植物においても UGT は多様な二次代謝で働くことが広く知られている (Tiwari et al., 2016; Bowles et al., 2005; Gachon et al., 2005)。Vogt らは、植物の天然産物の合成には、複数の Family にまたがる Glycosyltransferase が関与すると報告している (Vogt and Jones, 2000)。また Gachon らは、特異的な Glucosyltransferase が様々な働きをもつ二次代謝産物と述べている (Gachon et al., 2005)。例えば、Flavonoid 生合成経路においては、Flavonoid 3-O-glucosyltransferase が働き Anthocyanidin から Anthocyanin が生合成されることが知られている (Tanaka et al., 2008)。

タデアイでは、Indican 合成酵素として機能する UGT の存在が報告されている (Minami et al., 2000)。本酵素は Indoxyl に Glucose を付加することにより、Indican を合成する活性を持つ。しかしながら、タデアイのゲノム情報が得られていないこと、Indican 合成酵素の N 末端配列の解析が困難であることなどが原因で、Indican 合成酵素の cDNA はクローニングされていなかった。植物は一般的にいくつかの Family に分類される多くの UGT アイソザイムを持つことも (Caputi et al., 2012)、Indican 合成酵素の同定を妨げてきた要因である。最近、タデアイの葉の Transcriptome 解析が行われたことにより (Sarangi et al., 2015)、少なくとも 50 の UGT 遺伝子が発現している可能性と、それらの配列情報が得られた (Minami et al., 2015)。

以前、私は別種の Indigo 生産植物であるマメ科タイワンコマツナギ *Indigofera tinctoria* の Indican 合成酵素を、活性を追いながら部分精製した。続いて、Peptide mass fingerprinting (PMF) 解析により Indican 合成活性を持つ UGT (*ItUGT1*, *ItUGT2*) を同定した (Inoue et al., 2017)。タデアイでも同様の手法を用いて、Indican 合成酵素を部分精製し、PMF 解析を行った。その結果をもとに Indican 合成酵素遺伝子 *Ptlgs* (*P. tinctorium* Indoxyl β -D-glucoside synthase gene) の全長 cDNA を Rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法により獲得した。さらには、組換えタンパク質を抗原として特異的抗体を作製し、Indican 合成酵素の組織および細胞内局在の実験を進めた。

方法

1-1. 植物材料

タデアイ *Polygonum tinctorium* は 24 °C に保たれたチャンバー内で生育させた。細胞分画、組織別の Indican 含量、Indican 合成活性、PtIGS 発現量の分析には 3-weeks-old の植物を用いた。カルスは $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Naphthyl acetic acid と $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 6-Benzyladenine を含む Murashige-Skoog 培地で 24 °C で培養した。

1-2. Indican 合成活性の測定

以下の操作を窒素置換したグローブボックス内で行った。

Indoxyl の作製

20 mM Indoxyl Phosphate (Sigma Aldrich, Missouri, USA), 10 mM Citrate-phosphate buffer (pH 5.0), 0.1 M Dithiothreitol (DTT), 10 mM Sodium ascorbate を含む 5 mL の溶液に、26 unit に相当する Acid phosphatase (Sigma Aldrich) 粉末を加え、溶解した。溶液を 37 °C で 4 時間インキュベートした後、遮光チューブに分注し、液体窒素中で保存した。

Indican 合成反応

Indican 合成活性の測定は Minami et al., (2000) の方法に基づいて行った。反応溶液 (0.1 M 2-(N-Cyclohexylamino) ethanesulfonic acid (Ches) -NaOH buffer (pH 10.0), 0.1 M DTT, 10 mM Ascorbic acid, 2 mM Indoxyl, 2 mM UDP-glucose) にサンプルを加え、全量を 0.1 mL とし、37 °C で 10 分間反応させた。酵素反応は 70 μL の 40 % (w/v) TCA を添加することにより停止させた。溶液は NaOH で中和した後、最大回転で 5 分間遠心し、その上清を Indican 定量に用いた。

1-3. 植物組織からの Indican 抽出

Indican 抽出は Minami et al., (2000) の方法に基づいて行った。0.1 g の組織に Solvent1 (Methanol : Chloroform : Water = 12 : 5 : 3 (v/v)) を 0.5 mL 加え、乳鉢と乳棒ですり潰した。抽出液は 20,000 $\times g$ で 5 分間遠心し、上清を回収した。沈殿には、再度、0.5 mL の Solvent1 を加え、抽出を繰り返した。集めた上清 (約 1 mL) には、Chloroform 0.35 mL と脱イオン水 0.5 mL を加え、ボルテックスした後、20,000 $\times g$ で 5 分間遠心した。水層を回収し、残留した有機溶媒を遠心濃縮機で揮発させた後、Indican を定量した。

1-4. Indican 定量

酵素反応産物あるいは組織抽出液中の Indican は Minami et al., (2000) の方法に基づいて行った。C₁₈ カラム (YMC-Triart C₁₈; 150 \times 4.6 mm, YMC Co. Ltd., Kyoto, Japan) を HPLC システムに繋ぎ、10 mM 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid (Mes)-NaOH (pH 5.5) を含む 20 % (v/v) Methanol で平衡化した。続いて、10 μL のサンプル溶液をインジェクションし、溶出されてくる Indican を蛍光光度計 (L-7480, Hitachi, Tokyo, Japan) で検出した (Emission 400 nm, Excitation 290 nm)。

1-5. *PtIGS* の部分精製

全ての操作を4 °Cで行った。54 gのタデアイの葉に540 mLの氷冷したBuffer A (50 mM Potassium phosphate (pH 7.0), 5 mM β -Mercaptoethanol, 2 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and 0.1 mg.mL⁻¹ Pefabloc® SC (Sigma-Aldrich)) を加え、金属ホモジナイザー (model AM-11, Nihon Seiki, Niigata, Japan) で破碎した。抽出液はガーゼでろ過した後、49,000 $\times g$ で30分間遠心した。その上清を5 LのBuffer B (20mM Potassium phosphate (pH 7.0), 2 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM EDTA) に対して2回、続いて、5 LのBuffer C (20mM Potassium phosphate (pH 7.5), 2 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM EDTA) に対して1回透析した。次に、49,000 $\times g$ で30分間遠心し、上清にPolyethyleneglycol (PEG) solution (50 % (w/v) PEG6000, 20 mM Potassium phosphate (pH 7.5)) をPEGの終濃度が30 % (w/v) になるように攪拌しつつ加えた。さらに20分間攪拌し、30分間静置した後、18,000 $\times g$ で1時間遠心した。上清にBuffer Cで平衡化した10 mLのDEAE-Toyopearl 650M (Tosho bioscience, Tokyo, Japan) を加え、一晩ゆっくりと振とうした。2,000 $\times g$ で5分間遠心し、沈殿した樹脂を50 mLのBuffer Cで懸濁した。再度、遠心を行い、沈殿を50 mLのBuffer Cで懸濁し、grass column (1.7 \times 4.4 cm) に充填した。10倍容量のBuffer Cで洗浄後、12倍容量の0 – 50 mM KClの直線濃度勾配により*PtIGS*を溶出した。活性分画を回収し、2 LのBuffer D (20mM Potassium phosphate (pH 7.8), 2 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM EDTA) に対して2回透析した。次に、Buffer Dで平衡化したSource 15Q (Cytiva; Tokyo, Japan) column (0.4 \times 0.8 cm) に吸着させた。10倍容量のBuffer Dで洗浄後、10倍容量の0 – 50 mM KClの直線濃度勾配により*PtIGS*を溶出した。活性分画を限外ろ過 (NMWL 30,000; Amicon Ultra; Merck Millipore, Massachusetts, USA) で約0.5 mLまで濃縮し、Buffer E (20mM Potassium phosphate (pH 7.8), 150 mM KCl, 2 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM EDTA) で平衡化したHiLoad 16/600 Superdex 200pg column (1.6 \times 60 cm; Cytiva) で分離した。

1-6. タンパク質の同定 (PMF 解析)

Superdex 200pg column chromatography で得られた活性分画を、限外ろ過 (NMWL 30,000; Amicon Ultra) で濃縮した。濃縮酵素溶液 (1 unit 相当) に、5 \times SDS-PAGE sample buffer (50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 50 % (v/v) Glycerol) を加え、95 °Cで5分間ヒートした。続いて、サンプルに含まれるタンパク質を12.5% polyacrylamide gel を用いてSDS-PAGEにより分離した。CBB染色で検出されたタンパク質のバンドを切り出し、脱イオン水と0.1 M NH₄HCO₃で洗浄した後、Acetonitrileに5分間浸した。溶液を除き、減圧したデンキーター内でゲルを乾燥させた。ゲルはTrypsin溶液 (4.5 μ g. mL⁻¹ Trypsin, 40 mM NH₄HCO₃, 10 % (v/v) Acetonitrile) に浸し、37 °Cで一晩インキュベートした。続いて、抽出されたペプチド断片を含む溶液 (1 μ L) と、1 μ Lのマトリックス溶液 (0.2 mg. mL⁻¹ α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid, 90 % (v/v) Acetonitrile, 0.1% (v/v) Trifluoroacetic acid) を混合し、アンカーチップ (MTP AnchorChip 384 T F; Bruker Daltonics, Massachusetts, USA) に載せた。質量分析はマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析装置 (Autoflex Speed instrument; Bruker Daltonics) により行った。ペプチド質量値と Transcriptome 解

析データ(GenBank, accession SRX692542; Sarangi et al., 2015; Minami et al., 2015) に基づいて、Mascot server を用いてタンパク質を同定した。

1-7. Total RNA からの First-strand cDNA の合成

Rapid amplification of cDNA ends-polymerase chain reaction (RACE-PCR) に用いるテンプレート cDNA (First-strand cDNA) を、SMARTer RACE 5'/3' kits (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を使用し、説明書に従って合成した。

RNA 精製には新鮮な組織（葉，茎，根，花，カルス）を用いた。保存の必要がある場合は RNeasy Lysis Solution (Qiagen, Hilden, Germany) に浸し、4 °C に置いたものを1ヶ月以内に使用した。組織 (0.1 g) を液体窒素で凍結し、乳鉢と乳棒で粉末になるまで擦り潰し、0.35 mL の PureLink® Plant RNA Reagent (Thermo Fisher Scientific) を直ちに加え、ボルテックスで混ぜた。室温で5分間インキュベートした後、15,000 ×g で2分間、室温で遠心した。上清に0.1 mL の5 M NaCl、0.3 mL の Chloroform を加え、混合した後、15,000 ×g で10分間、4 °C で遠心した。遠心後、上層を新しいチューブに移し、等量の Isopropanol を加え、室温で10分間インキュベートした。15,000 ×g で10分間、4 °C で遠心し、RNA を沈殿させた。沈殿は1 mL の cold-75 % (v/v) Ethanol で洗浄した。風乾後、RNA を0.1 mL の RNase-free water で溶解し、RNeasy plant mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて、使用説明書に従って更に精製した。

1-8. *PtIGS* の cDNA クローニング

RACE-PCRによる全長 cDNA のクローニングを行うため、Transcriptome 解析由来の *PtIGS* 遺伝子の断片 Unigene37850 配列から Gene specific primer (GSP) (for 5'-RACE; 5'-GATTACGCCAAGCTTAGCTGCCCCCTTCTCGCACGAACCG-3', for 3'-RACE; 5'-GATTACGCCAAGCTTTGGGCCA CCTCATCCCTCTCGCCGA-3') を合成した (Integrated DNA technologies, Iowa, USA)。GSP と SMARTer RACE 5'/3' kit 付属の Universal primer mix を用いて RACE-PCR を行った。PCR 条件は (94°C-30 sec; 72°C-3 min; 94°C-30 sec; 70°C-30 sec; 72°C-3 min; "94°C-30 sec, 68°C-30 sec, 72°C-3 min"×35 cycles) とした。PCR 断片は Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Wisconsin, USA) で精製した後、In-Fusion HD Cloning Kits (Takara Bio Inc.) を用いて pRACE vector へ挿入した。反応後の溶液で、大腸菌 Stellar コンピテントセルを形質転換し、50 μg.ml⁻¹ Ampicillin を含む Luria-Bertani (LB) 培地上で選別した。

1-9. 組換え His-*PtIGS* の大腸菌内発現系の構築

PtIGS の 5'断片の増幅には、pRACE-5'*PtIGS* をテンプレートとし、primer には forward; 5'-ACGACGACAAGCATAGGATGGAATCCCCCGCCGCC-3', reverse; 5'-CTC ACATGACACCGTCTCATC AAGCTTCTCGAGG-3'を用いて PCR で増幅した。また、3'断片の増幅にはテンプレートとして pRACE-3'*PtIGS* を、primer には forward; 5'-ACGACGACAAGCATAGGATGGAATCCCCCGCCGCC-3', reverse

e; 5'- CTC ACATGACACCGTCTCATCAAGCTTCTCGAGG-3'を用いた。PCR 産物から Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System で精製した 5' と 3'断片を、制限酵素 *Nde* I で切断した pET19b vector に In-Fusion HD Cloning Kits を用いて挿入した。続いて、大腸菌 BL21star(DE3) を形質転換し、50 µg.ml⁻¹ Ampicillin を含む LB 培地上で選別した。

1-10. 組換え His-PtlGS の精製

大腸菌 pET19b-PtlGS/BL21star(DE3) を 50 µg.ml⁻¹ Ampicillin 含む LB 液体培地で OD₆₀₀ が 0.6 前後になるまで培養した。続いて、Isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG) を終濃度 0.1 mM になるように加え、28 °C で 20 時間、発現誘導を行った。誘導後、回収した大腸菌を 0.1 mg. mL⁻¹ Pefabloc® SC と 0.2 mg.mL⁻¹ Lysozyme を含む Talon buffer (50 mM Sodium phosphate buffer (pH 7.0), 300 mM NaCl) で懸濁し、氷上で 30 分間インキュベートした。超音波破碎を行った後、48,000 ×g で 30 分間、4 °C で遠心した。上清を TALON® metal affinity resin (Takara Bio Inc.) column (1.0 × 2.2 cm) に吸着させた。10 mM Imidazole を含む Talon buffer で洗浄した後、150 mM Imidazole を含む Talon buffer で組換え His-PtlGS を溶出した。

1-11. PtlGS 抗体の作製

精製した His-PtlGS をウサギに免疫し、ポリクローナル抗体を作製した (Cosmo Bio Co. Ltd., Tokyo, Japan へ受託)。抗血清から Immunoglobulin (IgG) を硫酸分画と Protein G column chromatography により精製した。精製抗体は Phosphate-buffered saline (PBS) (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM NaH₂PO₄, 2 mM K₂HPO₄ (pH 7.4)) に対して透析した後、-80 °C で保存した。

1-12. 組換え His-PtlGS の Indican 合成活性の測定

基本的に方法 1-2 (Indican 合成活性の測定) に従って活性測定を行った。組換え His-PtlGS は buffer (50 mM Sodium phosphate (pH 7.0), 150 mM KCl, 1 mM EDTA, 2 mM β-Mercaptoethanol) に透析してから用いた。窒素置換したグローブボックス内で 0.4 µg の組換え His-PtlGS を含む酵素反応液を調整し、37 °C で 5 分間インキュベートした。PtlGS の至適温度は 37 °C から 50 °C の範囲で測定した。また、熱安定性の測定では、0.1 M Sodium phosphate (pH 7.0) で希釈した 0.01 mg.mL⁻¹ の組換え His-PtlGS を 15 分間熱処理した後、冷却し、酵素反応に用いた。至適 pH の測定においては、各 Buffer [Citrate phosphate (pH 4.0 - 7.0), Hepes-NaOH (pH 7.0 - 8.0), *N,N*-Bis(2-hydroxyethyl)glycine (Bicine)-NaOH (pH 8.0 - 9.0), Ches-NaOH (pH 9.0 - 10.0), *N*-Cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid (Caps)-NaOH (pH 10.0 - 11.0)] をそれぞれ 0.1 M の濃度で用いた。

1-13. 植物組織からの粗抽出液の調整

組織 (葉, 茎, 根, 花, カルス) を液体窒素で凍結し、乳鉢と乳棒で粉末になるまで擦り潰した。続いて、10 倍量の Buffer (50 mM Potassium phosphate (pH 7.4), 0.5 mM EDTA, Protease inhibitor cocktail

(EDTA-free; Nakarai tesque) を加え、可溶性タンパク質を抽出した。抽出液は 17,900 ×g で 30 分間、4 °C で遠心し、上清を Indican 合成活性の測定と Immunoblotting に用いた。

1-14. SDS-PAGE/Immunoblotting

SDS-PAGE は Laemmli 法 (Laemmli, 1970) に従って 12.5 % polyacrylamide gel で行った。電気泳動後、セミドライ式ブロットング装置を用いて、面積 1 cm² 当たり 2 mA の定電流でタンパク質を Polyvinylidene fluoride membranes (PVDF) メンブレン (FluoroTrans W Membrane; Pall Corporation, New York, USA) にブロットングした。Blotting buffer は 0.1M Trizma base, 0.192 M Glycine, 5 % (v/v) Methanol を用いた。ブロットング後、メンブレンを 5% (w/v) Skimmilk を含む TBS-t (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.05 % (v/v) Tween 20) でブロッキングした後、抗体反応を行った。ブロッキングと抗体反応は室温で 1 時間、あるいは 4 °C で一晩行った。一次抗体として、rabbit anti-*PtIGS* IgG (1:2,000) と rabbit anti-binding protein (BiP) antisera (1:10,000, Hatano et al., 1997) を用いた。二次抗体は horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG antibody (1:50,000) (Abcam, Cambridge, UK) を用いた。抗体は Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution (Toyobo, Osaka, Japan) で希釈したものを用いた。抗体反応後、メンブレンは TBS-t で 5 分間の洗浄を 3 回以上行った。続いて、メンブレンに EzWestLumi plus (ATTO Corporation, Tokyo, Japan) を数秒間馴染ませた後 (ミニゲル 1 枚当たり約 1 mL)、化学発光を ImageQuant LAS 4000 mini (Cytiva) で検出した。データは TIFF 形式 (8 bit) で保存し、シグナルは Image Studio™ Lite Quantification Software (LI-COR Biosciences, Nebraska, USA) を用いて定量した。

1-15. mRNA 発現量の定量 (real-time qPCR)

方法 1-7. に従って精製した Total RNA から、SuperScript™ IV VIL0™ Master Mix with ezDNase™ Enzyme (Thermo Fisher Scientific) を用いて、使用説明書に従って cDNA を合成した。合成した cDNA は分注して -80 °C で保存した。80 ng の cDNA、0.3 μM の Primer set、1× PowerUp SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を含む全量 20 μL の反応液を調整した。*PtIGS* の増幅には *PtIGS*-qF (5'-AGACGGTGTCATGTGAGTTTGC-3') と *PtIGS*-qR (5'-CGTCGTTCTTCCTATCCTGAA-3') を Primer として用いた。また、*Actin* の増幅には *PtActin*-qF (5'-CACTGTCCCCATTTACGAAGGT-3') と *PtActin*-qR (5'-AGCAAGGTCCAGACGAAGGA-3') を用いた。real-time qPCR は StepOne Real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific) を用いて、50 °C-2 min, 95 °C-2 min、続いて、40 cycle の "95 °C-15 sec, 58.5 °C-15 sec, 72 °C-1 min" の反応を行った。PCR の特異性はメルトカーブ (95 °C-15 sec, 60 °C-1 min, +Δ0.3 °C-15 sec, 95 °C-15 sec) で確認した。第 1 葉に対する他の組織の mRNA 発現量は、既知濃度のテンプレートプラスミド (pET19b-*PtIGS* と pCR2.1-*PtActin*) を増幅して得られた検量線を用いて相対定量した。

1-16. 細胞分画

3-weeks-old のタデアイの若葉 (1.68 g) に 5.6 mL の Isotonic buffer (20 mM Hepes-KOH (pH 7.5), 0.3 M Sucrose, 5 mM EDTA, 5 mM Ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), 5 mM MgCl₂, 1/100 Protease inhibitor cocktail (for plant cell and tissue extracts, DMSO solution; Sigma-Aldrich)) を加え、氷上で乳鉢と乳棒を用いてすり潰した。ホモジネートは Miracloth (Merck Millipore) で濾過した後、10,000 ×g で 20 分間、4 °C で遠心した。上清 (total) を 100,000 ×g で 1 時間、4 °C で超遠心し、上清 (cytosol) と沈殿 (microsome) に分画した。microsome には元と同じ体積の Isotonic buffer を加え、ガラスホモジナイザーで懸濁した。

1-17. microsome 分画の可溶化

方法 1-16. に従って調整した microsome を元の体積の 0.25 倍量の Isotonic buffer で懸濁した。懸濁液 (0.1 mL) に、各種試薬 (1.33 M NaCl, 0.133 M Na₂CO₃, 1.33 % (v/v) Triton X-100 あるいは 1.33 % (w/v) SDS) を含む Isotonic buffer (0.3 mL) を加え、氷上で 1 時間インキュベートした。再度、100,000 ×g で 1 時間、4 °C で超遠心し、上清と沈殿に分画した。沈殿は 0.4 mL の同 Buffer を加え、ガラスホモジナイザーで懸濁した。

1-18. Sucrose 密度勾配遠心

3-weeks-old のタデアイの若葉 (1.0 g) に 1.5 mL の Isotonic buffer (without EDTA or MgCl₂) を加え、氷上で乳鉢と乳棒を用いてすり潰した。ホモジネートはミラクロスで濾過した後、10,000 ×g で 20 分間、4 °C で遠心した。上清 (0.2 mL) を 15 - 60 % (w/v) Sucrose 密度勾配溶液 (20 mM Hepes-KOH (pH 7.5), 5 mM EGTA と 5 mM EDTA あるいは 5 mM MgCl₂ を含む) に重層し、78,300 ×g (SRP40T roter; Hitachi) で 4.5 時間、4 °C で遠心した。遠心後、溶液を上から順に 0.54 mL ずつペリスタポンプを用いて回収した。cytosol 分画のマーカーとして Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) 活性を以下の方法で測定した。20 mM Potassium phosphate (pH 7.5), 1 mM NADP⁺, 1 mM Glucose-6-phosphate, 0.15 mL のサンプルを含む全量 1 mL の反応液を調整し、37 °C で 30 分間反応させた。反応後、340 nm の吸光度を測定し、未反応 (0 分) と比較した時の吸光度変化から NADPH 生成量を求めた。1 unit の G6PDH 活性は 1 分間に 1 μmol の NADPH を生成する酵素量として定義した。NADPH の分子吸光係数 6.6 L.mmol⁻¹.cm⁻¹ を活性値の計算に用いた。

1-19. タンパク質濃度の定量

Bradford 法 (Bradford, 1976) に従ってタンパク質濃度を定量した。

結果

*Pt*IGS の部分精製

Indican 合成酵素 *Pt*IGS の遺伝子を特定するために、タデアイの葉から *Pt*IGS 活性を追いながら部分精製を行った。*Pt*IGS の精製は以前の方法 (Minami et al., 2000) を参考にした。葉の抽出液の PEG 分画を行い、その 30 % PEG の上清から陰イオン交換カラムクロマトグラフィー (DEAE-Toyopearl および Source15Q) を用いて *Pt*IGS を粗精製した。また、精製の最終ステップではゲルろ過カラムクロマトグラフィー (Superdex 200pg) を用いた (表 1)。Superdex 200pg カラムクロマトグラフィーの溶出分画 81-86 mL に、*Pt*IGS 活性と一致する約 55 kDa のバンドが見られた (図 4)。そこで、バンドに含まれるタンパク質を同定するため、活性分画を濃縮し、1 unit に相当する *Pt*IGS を含むサンプル全量を SDS-PAGE で分離した。CBB 染色で検出された約 55 kDa のバンドを切り出し、PMF 解析を行った。得られた質量分析データと Transcriptome 解析データを照らし合わせた結果、バンドのタンパク質は遺伝子 Unigene37850 がコードするタンパク質であることが判明した。

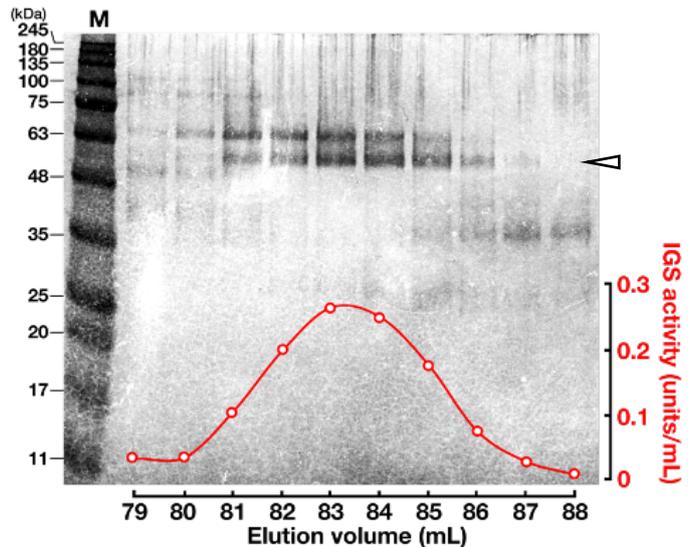


図 4. *Pt*IGS の精製

(Superdex 200pg column chromatography)

陰イオンカラムクロマトグラフィーで粗精製した *Pt*IGS を、さらにゲルろ過カラムクロマトグラフィー (Superdex 200pg) で分離した。図下部にはゲルろ過カラムクロマトグラフィーの溶出体積を示した。SDS-PAGE 後のゲルは EzStain Reverse (ATTO corporation) を用いて染色した。矢印は *Pt*IGS 活性と一致するバンドを示す。M; Marker (WIDE-VIEW™ Prestained Protein Size Marker III) を使用した)

表 1. *Pt*IGS の精製のまとめ

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units.mg ⁻¹)	Yield (%) ^a	Fold purification ^a
Leaf crude extract	289.2	17.1	0.1	100	1
PEG precipitation	222.3	22.1	0.1	129	2
DEAE-Toyopearl 650M	3.7	7.5	2.0	44	34
Source 15Q	0.7	2.5	3.5	15	60
Superdex200pg	n.d.	1.0	n.d.	6	n.d.

タデアイの葉 54 g から精製を行った。

^a Leaf crude extract に対する値
n.d.; not determined.

PtIGS cDNA のクローニング

Transcriptome 解析データ由来の遺伝子 Unigene37850 の配列は断片的であったため、cDNA を RACE 法により増幅した。結果、1,602 bp の全長配列が得られ、この遺伝子を *P. tinctorium* Indoxyl β -D-glucoside synthase gene (*PtIgs*) (DDBJ accession no. LC334048) と名付けた。そのうち 1,431 bp が open reading frame (ORF) であり、コードされる *PtIgs* は 477 アミノ酸、分子量 51,911, 等電点 5.39 のタンパク質であると推定された (図 5)。この分子量は、以前報告された Indican 合成酵素 (Minami et al., 2000) のものと一致した。さらに、ドメイン構造を検索したところ、UDP-glucosyltransferase domain (275-402 amino acids) (CL0113; Pfam) と Plant secondary product glycosyltransferase (PSPG) box (352-395 amino acids) の存在が確認された (図 5, 図 6)。

1	MESPAAPPTTAPPHVIIMPSAGMGHLIPLAEFAKRLPRFTTFVAVPTSGPPSSSRDF	60
61	LSSLPASIDTSFLPEVDLSDAPSDAQIETLSMLMVVRSLSLRDLIASYSASGRRVAALV	120
121	VDLFATDAIDVALELGI RPFIFFPSTAMTLSFFLHLEKLDETVSCFEAELSDPVQIPGCI	180
181	PVHGKDLIDPVQDRKNDAYKLLHHSKRYKLAEGVIVNSFEGLEGGPIRELLHPEPGKPR	240
241	VYPVGPLIQAGSCEKGAARPECLKWLDQQPRGSVLFVNFSGGVLSTEQQNELAGVLAH	300
301	SQQRFLWVVRPPNDGIANATYFSVDGEIDPLKLLPEGFLEQTAGRGLVLPWAPQIDVLS	360
361	HESTGGFLTHCGWNSTLESVFHGVPLITWPLYAEQKMNAMVLTGLRVGLRPSVGKDGII	420
421	RGDEIARVIGELMEGEEGKRIRSKMQELKRAASAVLSKDGSSSTRALEEVAKIWESKV	477

図 5. *PtIgs* の一次構造

黄色の 275 から 402 アミノ酸は UDP-glucosyltransferase domain (CL0113; Pfam), 赤字の 352 から 395 アミノ酸は Plant secondary product glycosyltransferase box を示す。

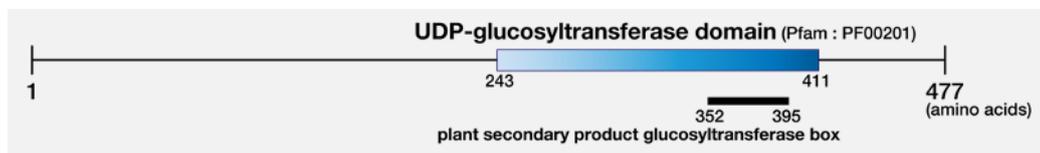


図 6. *PtIgs* のドメイン構造

PtIgs の生化学的性質

組換え His-*PtIgs* を大腸菌内で発現させ、アフィニティーカラム (Talon metal affinity resin column) を用いて精製した。精製産物は SDS-PAGE で約 55 kDa にバンドが見られ、cDNA 配列から推測される質量と一致した (図 7)。組換え His-*PtIgs* の Indican 合成活性を測定した結果、 V_{max} は $21.6 \text{ units} \cdot \text{mg}^{-1}$ 、UDP-glucose に対する K_m は 0.74 mM を示した (表 2)。また、至適温度は $45 \text{ }^\circ\text{C}$ 、至適 pH は 10.0 を示した。

図 7. 組換え His-*PtIgs* の SDS-PAGE

$0.5 \mu\text{g}$ の His-*PtIgs* を SDS-PAGE (12.5 % polyacrylamide gel) にアプライし、CBB 染色で検出した。Marker は ExcelBand 3-color Regular Range Protein Marker (PM2500; SMOBIO Technology, Inc., Hsinchu City, Taiwan) を使用した。

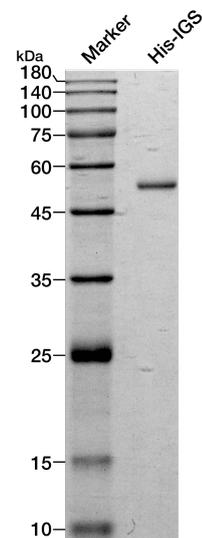


表 2. 組換え *PtIGS* の生化学的性質

	K_m for UDP-glucose (mM)	V_{max} (units.mg ⁻¹)	Optimum temperature (°C)	Optimum pH
Recombinant His- <i>PtIGS</i>	0.74±0.05	21.6±0.6	45	10.0
Indican synthase ^a	0.13	20.4	45	10.0
Recombinant <i>ItUGT1</i> ^b	0.68±0.04	107.5±3.7	37	10.0

^a Minami et al., 2000

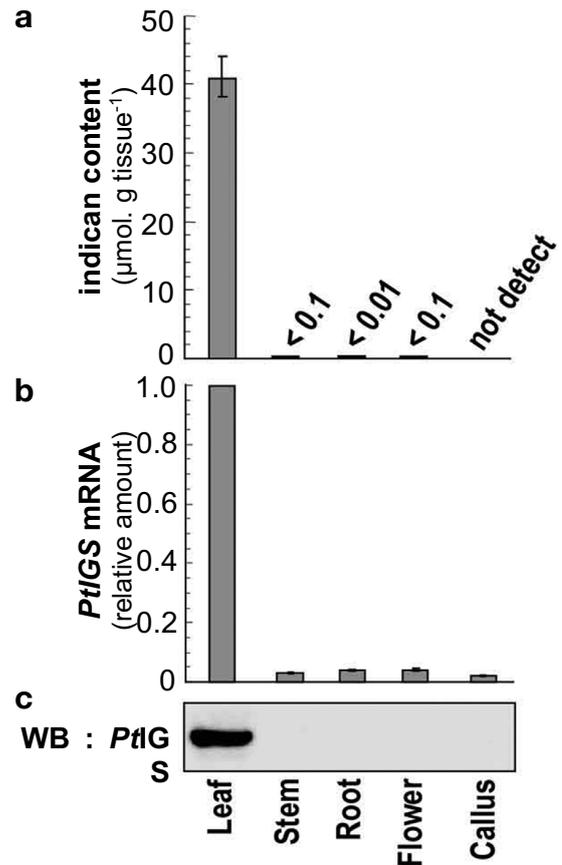
^b Inoue et al., 2017

PtIGS の組織特異的な発現

タデアイ (3-weeks-old) の各組織に含まれる Indican を定量したところ、葉で約 40 $\mu\text{mol.g tissue}^{-1}$ (生重量当たり) 含まれていた (図 8 (a))。一方、茎と花では Indican 含量は 0.1 $\mu\text{mol.g tissue}^{-1}$ 以下、また、根では 0.1 $\mu\text{mol.g tissue}^{-1}$ 以下であった。カルスでは検出限界以下であった。さらに、同組織での *PtIGS* タンパク質および mRNA の発現パターンを調べた。*PtIGS* 抗体を用いて Immunoblotting を行ったところ、*PtIGS* タンパク質は葉でのみ発現が確認できた (図 8 (c))。また、*PtIGS* mRNA も同様に葉でのみ発現が確認された (図 8 (b))。

図 8. *PtIGS* の葉の組織特異的な発現

(a) 組織 1 g (生重量) 当たりの Indican 含量。(b) 組織別の *PtIGS* mRNA の相対的な発現量。actin をリファレンス遺伝子として qPCR ($\Delta\Delta C_t$ 法) により定量した。Error bar は標準誤差を示す。tukey's test により $P < 0.001$ (leaf, stem; leaf, root; leaf, flower; leaf, callus) を確認した。(c) Immunoblotting による各組織での *PtIGS* 発現の解析。生重量 0.2 mg 相当のサンプルを SDS-PAGE に用いた。全ての実験は 3 回以上繰り返し行った。



PtIGS の若葉特異的な発現

3-weeks-old の幼植物体を用いて、各葉の Indican 含量を調べたところ、これまでの報告 (Minami et al., 2000) と同様に新芽で Indican が最も多く蓄積されていた (図 9 (a, b))。そこで、葉の位置による *PtIGS* の発現量を比較した。*PtIGS* 抗体を用いた Immunoblotting の結果、*PtIGS* の発現も新芽で最も多く、Indican 含量に比例していた (図 9 (e))。これは、Indican 合成活性と同じ傾向であった (図 9 (c))。同様に、*PtIGS* mRNA も新芽で最も発現が見られたが、成熟した葉 (第 2 葉以降) ではその発現量は激減していた (図 9 (d))。

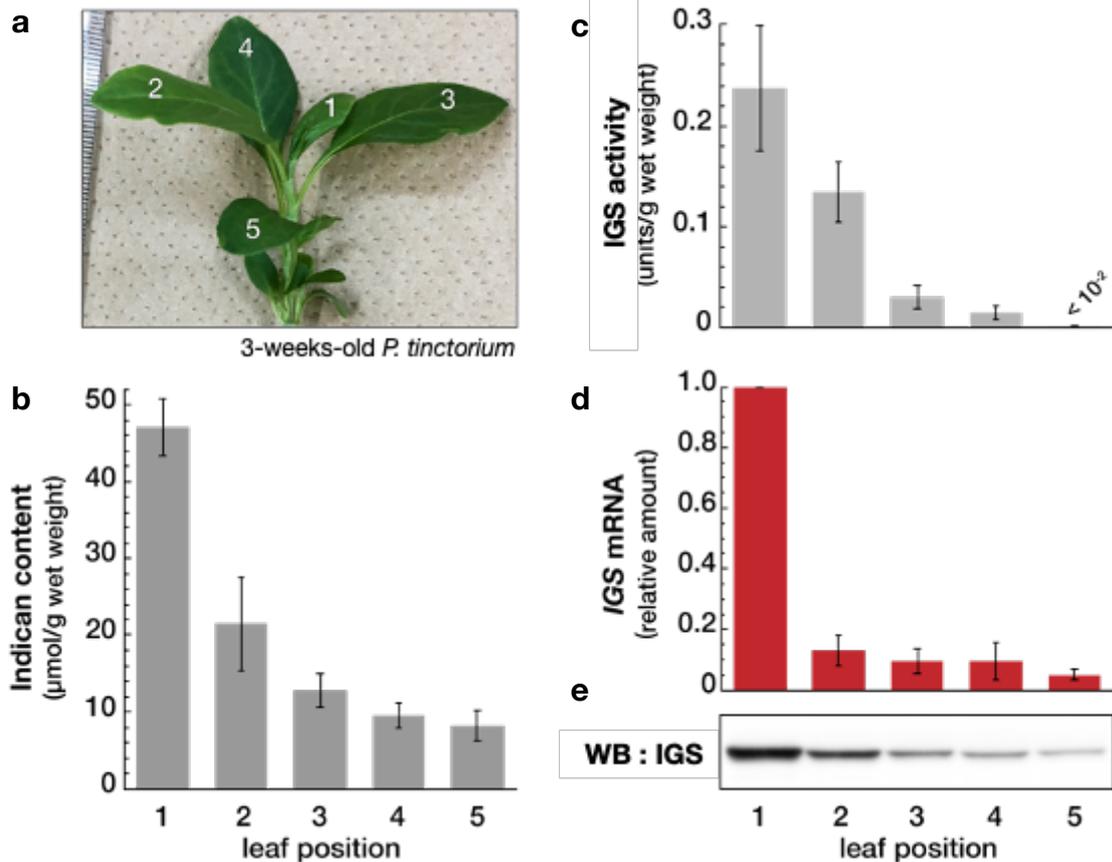


図9. 若葉特異的な *PtIGS* の発現

(a) 3-weeks-old の植物体を用いた。(b) 組織 1 g (生重量) 当たりの Indican 含量。tukey's test により $P=0.003$ (1st vs 2nd) および $P<0.001$ (1st vs 3rd; 1st vs 4th; 1st vs 5th) を確認した。(c) 各葉の生重量当たりの Indican 合成活性。粗抽出液を用いた。(d) 各葉の *PtIGS* mRNA の相対的な発現量。*Actin* をリファレンス遺伝子として qPCR ($\Delta\Delta Ct$ 法) により定量した。Error bar は標準誤差を示す。tukey's test により $P=0.003$ (1st vs 2nd), $P<0.002$ (1st vs 3rd; 1st vs 4th) および $P<0.001$ (1st vs 5th) を確認した。(e) Immunoblotting による各葉での *PtIGS* 発現の解析。生重量 0.15 mg 相当のサンプルを SDS-PAGE に用いた。全ての実験は 3 回以上繰り返し行った。

PtIGS の細胞内局在

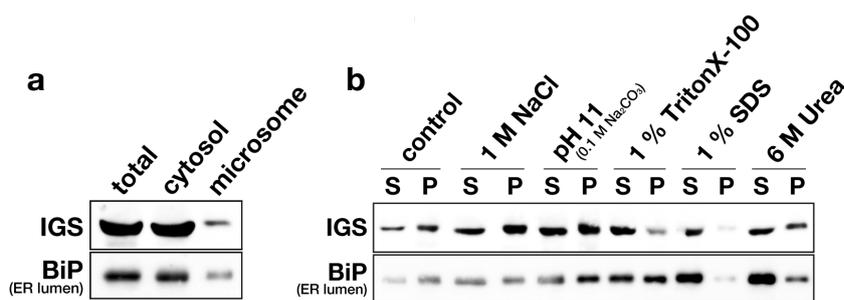
Indican が生合成される細胞内区画を明らかにする為に、*PtIGS* の細胞内局在を調べた。葉の粗抽出液を超速心し、cytosol 分画と microsome 分画に分離した。microsome 分画には様々なオルガネラ由来の膜が含まれるが、本実験では ER 内腔に局在する可溶性タンパク質 Binding protein (BiP) をコントロールとして検出した。各分画の Immunoblotting の結果、BiP のバンドの検出パターンから、細胞分画が正確に行われていることを確認した。cytosol 分画に検出された BiP は ER の破砕により溶液中に放出されてしまったものと考えられた。*PtIGS* のほとんどが cytosol 分画に検出されるが、一部が microsome 分画からも検出された (図 10 (a))。

また、*PtIGS* と膜の会合状態をさらに詳しく調べるために、microsome を様々な試薬で処理し、*PtIGS* の挙動を確かめた。結果、図 10 (b) で示したように、*PtIGS* は高濃度の NaCl や塩基性条件で遊離せず、界面活性剤や Urea で遊離した。

図 10. *PtIGS* の microsome 局在

細胞の各分画に含まれる *PtIGS* と BiP (ER 内腔タンパク質) を Immunoblotting で検出した。(a) 葉の抽出液を 10,000 ×g で遠心し、上清を total 分画とした。さらに、total 分画を 100,000 ×g で超遠心し、上清 (cytosol 分画) と沈殿 (microsome 分画) に分離した。microsome 分画は cytosol 分画と

等量の Buffer に懸濁し、SDS-PAGE には同じ体積を用いた。(b) microsome をレーン上に示した試薬を含む Buffer でインキュベートした後、再度、100,000 ×g で超遠心を行い、上清 (S) と沈殿 (P) に分画した。沈殿は上清と等量の Buffer に懸濁し、SDS-PAGE には同じ体積を用いた。



一部の *PtIGS* は ER に局在する

PtIGS が ER 膜上で密接に接触している可能性を確かめるために、葉の粗抽出液を Sucrose 密度勾配遠心により分離し、*PtIGS* の局在をさらに詳しく検討した。本実験は Mg^{2+} 有無の条件下で行い、Ribosome の会合の違いをもとに ER 膜の動向を確認した。密度勾配遠心で得た分画の Sucrose 濃度を測定し、実験間で濃度の差がないことを確認した (図 11 (c))。 Mg^{2+} 存在下で *PtIGS* と BiP の挙動を確認すると、両者の傾向は一致した (図 11 (a, b))。また、 Mg^{2+} 非存在下で BiP のピークは低

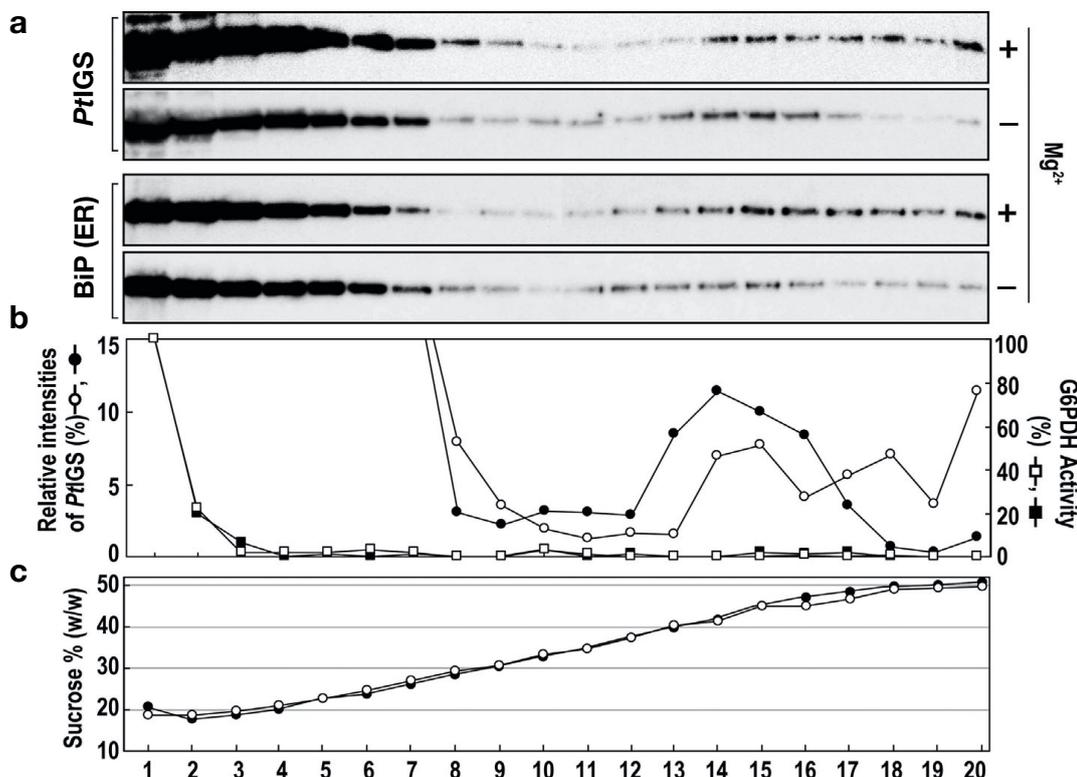


図 11 葉の抽出液の Sucrose 密度勾配遠心

葉の抽出液を 10,000 ×g で遠心し、上清を Sucrose 密度勾配遠心で分離した。(a) Mg^{2+} 有無における *PtIGS* と BiP (ER 内腔タンパク質) の挙動。(b) (a) の Fraction 1 の *PtIGS* のバンドの強度を 100 % として相対定量し、15 % 以下の値のみ示した。G6PDH 活性は Fraction 1 の活性を 100 % として相対定量した。(c) 屈折計により求めた Sucrose 濃度。(b), (c) において、"□" は $+Mg^{2+}$ を、"●" は $-Mg^{2+}$ を示す。

密度側にシフトした。この時、同時に *PtIGS* のピークも同様にシフトした。また、cytosol 分画のタンパク質の指標として G6PDH 活性を測定したが、分画 1, 2 以外ではほとんど活性は見られなかった (図 11 (b))。

考察

本研究では *PtIGS* の部分精製産物の PMF 解析を行い、Transcriptome 解析データから *PtIGS* 遺伝子 Unigene37850 を特定した。Indican 合成酵素は UGT 活性を持つことが報告されていたが (Minami et al., 2000)、*PtIGS* の一次構造には UGT domain が含まれることが確認された (図 5, 図 6)。他の植物の UGT のアミノ酸配列と比較し系統樹を作成したところ、*PtIGS* は UGT72B family に分類されることがわかった (図 12)。また、*PtIGS* のアミノ酸配列は、同 2018 年に Hsu らが報告したタデアイの Indican 合成酵素 (*PtUGT1*, *PtUGT2*) とほぼ一致した (Hsu et al., 2018)。彼らの配列とは、2 残基の違いが見られ、タデアイのゲノム中にはいくつかの IGS 遺伝子の重複がある、あるいは、タデアイが栽培植物であるため掛け合わせによる植物株の僅かな違いがあると考えられる。また、*PtIGS* のアミノ酸配列は先にクローニングした、別種のアイ植物である *Indigofera tinctoria* (マメ科 タイワンコマツナギ) の Indican 合成酵素の *ItUGT1* (Inoue et al., 2017) と 57 % の相同性を示した。*ItUGT1* もまた UGT72B family に分類される。また、*PtIGS* の一次構造には PSPG box という植物で二次代謝に働く UGT が持つ配列も確認された。これらの結果から、*PtIGS* が Indican 生合成経路で働く可能性が示された。

組換え *PtIGS* の V_{max} や UDP-glucose に対する K_m 、さらに、至適温度や至適 pH などの生化学的特徴は、タデアイの葉から精製された Indican 合成酵素の以前のデータ (Minami et al., 2000) や *ItUGT1* (Inoue et al., 2017) と同様の生化学的性質を示した。そのため、今回得られた *PtIGS* 遺伝子は Indican 合成酵素をコードすると考えられた。

PtIGS が植物細胞内で Indican 生合成反応を担うかを検討するため、植物体での発現パターン

を調べた。その結果、*PtIGS* タンパク質と mRNA の発現パターンは Indican 含量と Indican 合成活性と比例したため (図 8, 図 9)、植物細胞内で Indican 生合成に関わっている可能性が高いと考えられた。さらに、*PtIGS* mRNA は成熟した葉 (第 2 葉以降) では発現量が激減しているため、発現調節を受けていると考えられる。

cDNA から推定される *PtIGS* の一次構造にはシグナル配列や膜貫通領域は見られないため、*PtIGS* は cytosol の可溶性タンパク質であると考えられる。しかし、実際の細胞分画では一部の *PtIGS*

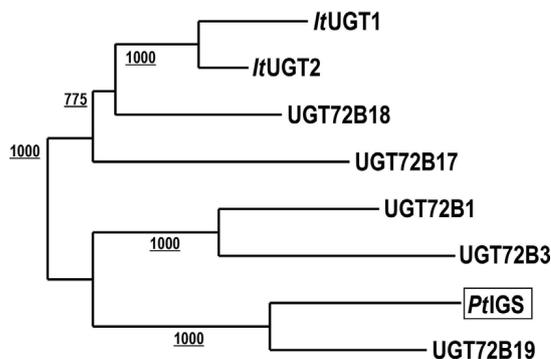


図 12. *PtIGS* と他の植物の UGT の比較
Neighbor-joining 法で系統樹を作製した。
下線はブートストラップ値を示す。

が microsome 分画に検出された。この場合、microsome と *Pt*IGS の会合は強く、*Pt*IGS は高濃度の塩や pH 変化では遊離しなかった。これらの結果より、*Pt*IGS は microsome 分画に存在する何らかの膜成分と会合している可能性がある。

*Pt*IGS の詳しい局在を Sucrose 密度勾配遠心で分析した。Buffer に Mg^{2+} を含む時、細胞内と同様に ER 膜にリボソームが会合しているが、EDTA の添加により Mg^{2+} がなくなると ER 膜からリボソームが遊離し、ER のみ特異的に密度が変化することが知られている (Ueda et al., 2010)。本実験では ER タンパク質である BIP のパターンと同様に、*Pt*IGS も Mg^{2+} の有無による密度シフトを生じた (図 11)。そのため、*Pt*IGS は一部、ER 膜に局在すると考えられた。

*Pt*IGS は基質として Indoxyl と UDP-glucose を用いる。そのうち、Indoxyl は一次代謝由来の Indole が monooxygenase による水酸化を受けて生じると予想される。Indole monooxygenase は同定されていないが、その候補としては二次代謝で働く例が数多く報告されている CYP も考えられる (これらの実験は、後に行ったので、第 3 章で詳細に述べる)。CYP は ER 膜結合型のタンパク質であり、いくつかの二次代謝 (Lignin, Dhurrin, Flavonol, Isoflavonoid, Camalexin の合成など) では CYP を拠点として形成される代謝複合体 (メタボロン) が示唆されている (Ralston and Yu, 2006; Jørgensen et al., 2005; Bassard et al., 2017)。メタボロンは CYP に対して UGT のような可溶性の代謝関連酵素が会合することで形成されると考えられている。メタボロンが生成されると酵素間の基質の受け渡しの効率を高めることが可能であると考えられる (Zhang and Fernie, 2020)。Indican の生合成においても、中間代謝物 Indoxyl は酸化に対して非常に不安定である。酸化されると生じる Indigo (沈殿物) は細胞にとって有害であり、細胞内での形成は避けなければならない。実際にはタデアイの細胞内では Indigo の沈殿は見られないことから、Indoxyl は酸化されることなく *Pt*IGS へ受け渡されていると考えられる。

その為、*Pt*IGS は効率よく基質 Indoxyl を受け取る為に、monooxygenase と相互作用する可能性が考えられる (図 13)。さらに、他の関連タンパク質も含む、Indican 生合成に関わるメタボロンを形成しているかもしれないと予想している。

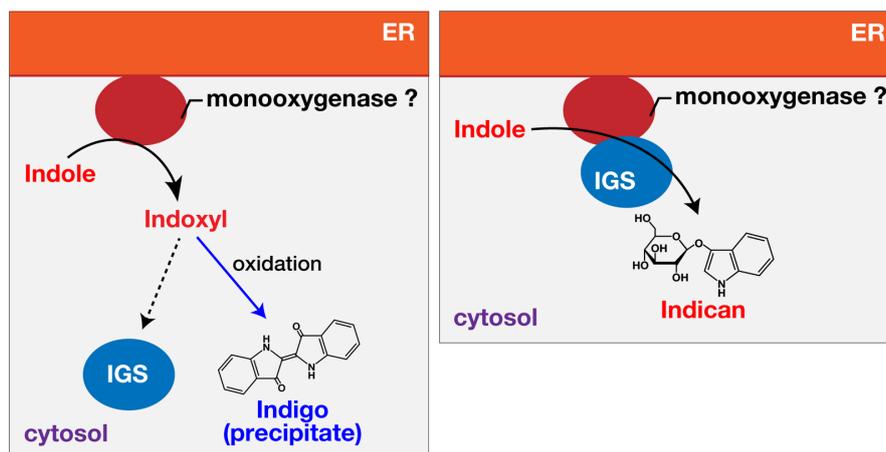


図 13. *Pt*IGS と monooxygenase の相互作用の可能性

参考文献

- Bassard, J.-E., Møller, B.L., Laursen, T., 2017. Assembly of dynamic P450-Mediated metabolons—order versus chaos. *Curr. Mol. Bio. Rep.* 3, 37–51.
- Bowles, D., Isayenkova, J., Lim, E.-K., Poppenberger, B., 2005. Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 254–263.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Caputi, L., Malnoy, M., Goremykin, V., Nikiforova, S., Martens, S., 2012. A genome-wide phylogenetic reconstruction of family 1 UDP-glycosyltransferases revealed the expansion of the family during the adaptation of plants to life on land. *Plant J.* 69, 1030–1042.
- Chapple, C., 1998. Molecular genetics analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 49, 311–343.
- Gachon, C.M.M., Langlois-Meurinne, M., Saindrenan, P., 2005. Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends Plant Sci.* 10, 542–549.
- Hatano, K., Shimada, T., Hiraiwa, N., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I., 1997. A rapid increase in the level of binding protein (BiP) is accompanied by synthesis and degradation of storage proteins in pumpkin cotyledons. *Plant Cell Physiol.* 38, 344–351.
- Inoue, S., Moriya, T., Morita, R., Kuwata, K., Thul, S.T., Sarangi, B.K., Minami, Y., 2017. Characterization of UDP-glucosyltransferase from *Indigofera tinctoria*. *Plant Physiol. Biochem.* 121, 226–233.
- Jin, Z., Kim, J.-H., Park, S.U., Kim, S.-U., 2016. Cloning and characterization of indole synthase (INS) and a putative tryptophan synthase α -subunit (TSA) genes from *Polygonum tinctorium*. *Plant Cell Rep.* 54, 340–344.
- Jørgensen, K., Rasmussen, A.V., Mornat, M., Nielsen, A.H., Bjarnholt, N., Zagrobelny, M., Bak, S., Møller, B.L., 2005. Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 280–291.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259), 680–685.
- Minami Y, Takao H, Kanafuji T, Miura K, Kondo M, Hara-Nishimura I, Nishimura M, Matsubara H., 1997. β -Glucosidase in the indigo plant: intracellular localization and tissue specific expression in leaves. *Plant Cell Physiol.* 38(9):1069-74.
- Minami, Y., Nishimura, O., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., Matsubara, H., 2000. Tissue and intracellular localization of indican and the purification and characterization of indican synthase from indigo plants. *Plant Cell Physiol.* 41(2), 218–225.
- Minami, Y., Sarangi, B.K., Thul, S.T., 2015. Transcriptome analysis for identification of indigo biosynthesis pathway genes in *Polygonum tinctorium*. *Biologia* 70, 1026–1032.
- Ralston, L., Yu, O., 2006. Metabolons involving plant cytochrome P450s. *Phytochemistry Rev.* 5 (2), 459–472.
- Sarangi, B.K., Minami, Y., Thul, S.T., 2015. RNA-seq analysis for indigo biosynthesis pathway genes in *Indigofera tinctoria* and *Polygonum tinctorium*. *Genomics Data* 6, 212–213.
- Tanaka, Y., Sasaki, N., and Ohmiya, A., 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J.* 54, 733–749.
- Tiwari, P., Sangwan, R.S., Sangwan, N.S., 2016. Plant secondary metabolism linked glycosyltransferases: an update on expanding knowledge and scopes. *Biotechnol. Adv.* 34, 714–739.
- Ueda, H., Yokota, E., Kutuna, N., Shimada, T., Tamura, K., Shimmen, T., Hasezawa, S., Dolja, V.V., Hara-Nishimura, I., 2010. Myosin-dependent endoplasmic reticulum motility and F-actin organization in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 6894–6899.
- Zhang and Fernie, 2020. Metabolons, Enzyme–Enzyme Assemblies that Mediate Substrate Channeling, and Their Roles in Plant Metabolism, *Plant Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100081>
- Vogt, T., Jones, P., 2000. Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *Trends Plant Sci.* 5, 380–386.

第 2 章

タンパク質間相互作用と Transcriptome 解析に基づいた Indican 生合成関連タンパク質の探索

要旨

タデアイの葉の細胞内では、Indican が *Pt*IGS の触媒により生合成される。第 1 章で述べたように、*Pt*IGS は cytosol に局在し、Indoxyl と UDP-glucose を基質として Indican を生合成し、最終的に Indican は液胞内へ蓄積される。また、*Pt*IGS は ER 膜にも局在することが明らかとなった (Inoue et al., 2018)。そのため、ER 膜上では Indican 生合成に関わる幾つかのタンパク質を含む複合体が形成される可能性がある。本研究では複合体形成に関わるタンパク質の候補を、*Pt*IGS のタンパク質間相互作用の解析と遺伝子発現量の解析の 2 つの観点から探索した。初めに、共免疫沈降と Pull-down assay により *Pt*IGS と相互作用するタンパク質を cytosol 分画および microsomal 分画から MS/MS 解析により同定した。次に、タデアイの第 1 葉 (新芽) と第 2 葉 (成熟した葉) の遺伝子発現を Transcriptome 解析により網羅的に分析し、第 1 葉特異的に発現する遺伝子を調べた。相互作用解析と Transcriptome 解析の 2 つのデータを照合したところ、Sucrose synthase (UDP-glucose 合成酵素) や monooxygenase (Cytochrome P450 と Flavin-containing monooxygenase) が Indican 生合成に関わる可能性を示した。また、Heat shock protein、細胞骨格タンパク質などが *Pt*IGS と関わる可能性が示唆された。これらの結果より、本章では *Pt*IGS が代謝複合体 (メタボロン) を構成している可能性を考察した。

緒言

第1章において Indican 合成酵素 *PtIGS* の cDNA クローニングを行い、組換え *PtIGS* に Indican 合成活性があることを述べた。Indican は葉に存在するが、細胞内のどこで生合成が行われているかは調べられていなかった。そこで、*PtIGS* の細胞内局在を細胞分画により調べたところ、*PtIGS* は大半が cytosol に局在するが、一部は ER 膜と会合している可能性が明らかとなった。しかし、*PtIGS* の一次構造には、シグナル配列や膜貫通領域は見られなかった。このことから、*PtIGS* は ER 膜上の何らかのタンパク質と会合している可能性が示唆された (Inoue et al., 2018)。

PtIGS は Indoxyl を基質として用いる。Indoxyl は葉緑体の一次代謝由来の Indole が monooxygenase による水酸化を受けることにより生成されると考えられる。しかし、Indoxyl は不安定であり、すぐに次の反応 (Indican 合成) に用いられる必要がある。また Indoxyl が酸化されると Indigo となるが、沈殿物であるため細胞内で生じてしまうと害になる。実際には植物細胞内で Indigo は形成されない。そのため、*PtIGS* は何らかの monooxygenase と相互作用し、生成された Indoxyl を効率よく受け取っていると思われる。植物の二次代謝では ER 局在の CYP が関与する例も多く報告されているため、CYP が Indole を水酸化している可能性も考えられる。

また、Indole は葉緑体内で Tryptophan 合成酵素 α subunit (TSA) の働きで Indole 3-glycerol phosphate から合成されると考えられる。しかし、通常、葉緑体では Tryptophan 合成のために、TSA は Tryptophan 合成酵素 β subunit (TSB) と四量体を形成している (Hilario et al., 2015)。その TSA-TSB 複合体はトンネル構造を形成し、TSA が生成した Indole はそのまま TSB に受け渡されるため、通常、cytosol に Indole が出ることはないと思われる。Jin らは、タデアイにおいて cytosol 型の Indole 合成酵素 (INS; Indole synthase) の存在を報告しており、cytosol で Indole が合成されている可能性もある (Jin et al., 2016)。

本章では *PtIGS* の相互作用解析に基づいて Indican 生合成関連タンパク質を cytosol 分画および microsome 分画のそれぞれから探索した。また、相互作用タンパク質が Indican 生合成に関わる可能性を mRNA の発現パターンから検討した。ここでは、第1章で述べた *PtIGS* mRNA が新芽で特異的に発現するという傾向に基づいて、他の関連タンパク質の mRNA も同様に新芽特異的に発現するのではないかと仮定した。これらの相互作用解析データと mRNA 発現解析データを比較し、Indican 生合成関連タンパク質のいくつかを特定した。

方法

2-1. 植物材料

タデアイ *Polygonum tinctorium* は 24 °C に保たれたチャンバー内で蛍光灯下 (16 h-light, 8 h-dark) で生育させた。実験には 3-weeks-old の植物を用いた。

2-2. cytosol 分画および microsome 分画の調整

新芽に 5 倍量の Isotonic buffer (20 mM Hepes-KOH (pH 7.5), 0.3 M Sucrose, 5 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1/100 Protease inhibitor cocktail (EDTA-free; Nakarai tesque)) を加え、金属ホモジナイザー (model AM-11) で破碎した。ホモジネートを Miracloth (Merck Millipore) でろ過し、10,000 ×g で 20 分間、4 °C で遠心した。その上清をさらに 100,000 ×g で 1 時間、4 °C で遠心し、上清 (cytosol) と沈殿 (microsome) に分画した。microsome には cytosol と等量の Isotonic buffer を加え、ガラスホモジナイザーで再懸濁した。

2-3. プロトプラストの作製

約 0.5 mm 幅に刻んだ葉 (0.5 g) を 20 ml の酵素溶液 (2 % (w/w) Cellulase Onozuka-RS (Yakult, Tokyo, Japan), 0.02 % (w/w) Pectorylase Y-23 (Kyowa Chemical, Kyoto, Japan), 1 % (w/w) Sodium dextran (nuclease and protease tested; Nakarai tesque), 0.6 M Mannitol を含む 10 mM Mes-KOH (pH 5.5)) に浸した。減圧し、葉に溶液を浸透させた後、ゆっくりと揺らしながら 28 °C で 3 時間インキュベートした。続いて、Miracloth を通し、残渣をさらに 20 mL の Wash solution (0.6 M Mannitol, 10 mM EDTA 含む 10 mM Hepes-KOH (pH 7.8)) で洗浄した。プロトプラストは 100 ×g, 7 分間の遠心で沈殿させた後、沈殿を 10 mL の Wash solution で懸濁した。再度、100 ×g で 3 分間遠心し、プロトプラストを回収した。Wash solution での洗浄を 2 回繰り返した後、沈殿したプロトプラストは 0.4 mL の Wash solution に懸濁し、実験に用いた。実験に用いる前に、Wash solution で適度に希釈した懸濁液 1 μL 中に含まれる無傷プロトプラストを顕微鏡で数えた。測定は 8 回以上繰り返した。

2-4. SDS-PAGE/Immunoblotting

基本的に方法 1-14. に従って行った。電気泳動後、CBB 染色あるいは銀染色 (Sil-Best Stain One; Nakalai tesque) によりゲルに含まれるタンパク質を検出した。Marker は ExcelBand 3-color Regular Range Protein Marker (PM2500; SMOBIO Technology, Inc., Hsinchu City, Taiwan) を使用した。Immunoblotting では rabbit anti-PtIGS IgG (1:5,000) (Inoue et al., 2018) を一次抗体として、HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody (1:50,000) (Abcam, Cambridge, UK) を二次抗体として TBS-t (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.05 % (v/v) Tween 20) で希釈し用いた。抗体反応後、TBS-t で約 5 分間の洗浄を 3 回以上繰り返した。続いて、メンブレンに EzWestLumi plus (ATTO Corporation,

Tokyo, Japan) を数秒間馴染ませた後、ImageQuant LAS 4000 mini (Cytiva, Tokyo, Japan) で検出した。

2-5. クロスリンク実験

方法 2-2. に従って調整した cytosol 分画および microsomal 分画に、Isotonic buffer で溶解した 5 mM Bis(sulfosuccinimidyl) suberate (BS³) (Thermo fisher scientific) を 0.1-1.0 mM の濃度になるように加えた。室温で 30 分間インキュベートした後、1/20 倍量の 1 M Tris-HCl (pH 7.6) を加え、反応を停止させた。

一方、プロトプラストのクロスリンク実験には Disuccinimidyl suberate (DSS) を用いた。2 % (v/v) Dimethyl sulfoxide を含む Wash solution に溶解した 1.0-4.0 mM DSS (Thermo fisher scientific) を、プロトプラスト懸濁液 (2.4×10^6 cells.mL⁻¹) と等量混合し、室温で 30 分間インキュベートした。反応は 0.1M Tris-HCl (pH 7.6) を含む Wash solution を等量加えることで停止させた。

反応後、組織 0.11 mg および 0.68 mg に相当する cytosol 分画と microsomal 分画、また、 1.0×10^4 cells 相当のプロトプラストを分析に用いた。

2-6. 共免疫沈降

3 mL の anti-PtIGS IgG (1.64 mg.mL^{-1}) を Aminolink plus coupling resin (Thermo Fisher Scientific) に結合させた。方法は使用説明書に従った。cytosol は Buffer A (20 mM Potassium phosphate (pH 7.5), 0.3 M NaCl, 1 mM EDTA) に対して透析した。100,000 $\times g$ で 10 分間超遠心し、Indigo を取り除いた後、上清に終濃度 0.5 % (v/v) になるように Triton X-100 と、0.1 % (w/v) になるように Sodium deoxycholate を加え、サンプルとした。組織 1.8 g に相当するサンプルを 0.2 mL の anti-PtIGS Aminolink plus coupling resin に加え、4 °C で 4 時間インキュベートした。樹脂は 2,000 $\times g$ で 1 分間遠心し、回収した後、0.5 % (v/v) Triton X-100 と 0.1 % (w/v) Sodium deoxycholate を含む Buffer B (20 mM Potassium phosphate (pH 7.5), 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA) で懸濁した。スピンカラムに充填し、同じ buffer で洗浄後、0.8 mL の溶出 Buffer (0.1 M Glycine-HCl (pH 2.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) で溶出を行った。続いて、溶出液に 80 μL の 1 M K₂HPO₄ を加え、中和した。

一方、5.0 g 相当の組織由来の microsomal 分画には、1% (v/v) Triton X-100 と 0.25 % (w/v) Sodium deoxycholate を含む 23.5 mL の Buffer B が加えられた。ガラスホモジナイザーで懸濁し、氷上で 2 時間インキュベート後、100,000 $\times g$ で 1 時間、4 °C で遠心した。上清 8 mL (組織 1.7 g 相当) を 0.2 mL の anti-PtIGS Aminolink plus coupling resin に加え、4 °C で 12 時間インキュベートした。樹脂は 2,000 $\times g$ で 1 分間遠心し、回収した後、0.5 % (v/v) Triton X-100 と 0.25 % (w/v) Sodium deoxycholate を含む Buffer B で懸濁した。スピンカラムに充填し、同 buffer で洗浄後、cytosol 分画と同じ方法で溶出、中和を行った。

溶出液に等量の 20 % (w/v) Trichloro acetic acid (TCA) を加え、含まれるタンパク質を沈殿させた。沈殿を Acetone で洗浄し、風乾後、1× SDS-PAGE sample buffer (10 mM Tris-HCl, (pH 6.8), 2% (w/v) SDS, 1% (v/v) β-Mercaptoethanol, 10% (v/v) Glycerol) で溶解し、SDS-PAGE のサンプルとした。

2-7. タンパク質の同定 (MS/MS 解析)

SDS-PAGE でタンパク質を分離後、ゲルを切り出し、さらに約 0.2 cm² 程度に刻んだ。タンパク質のゲル内消化は Rosenfeld ら (1992) の方法に従って行った。ゲルをチューブに入れ、タンパク質の還元とアルキル化を行った。次に、reaction buffer (50 mM Ammonium bicarbonate (pH 8.0), 0.01 mg.mL⁻¹ Trypsin (Promega Corporation)) 中で 37 °C, 16 時間、消化した。ペプチドは Shishido ら (2017) の方法に従い、Q Exactive hybrid mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) で分析した。MS/MS スペクトルは Proteome Discoverer 2.2.0.388 (Thermo Fisher Scientific) を用いて解析し、ピークリストを作成した。そして、*P. tinctorium* のペプチド配列を対象に、SEQUEST で検索した。パラメータは以下のように設定した [two maximum missing cleavage sites, a mass tolerance of 10 ppm for peptide tolerance, 0.02 Da for MS/MS tolerance, fixed modification of carbamidomethyl (C), and variable modification of oxidation (M)]。ペプチドの同定は、significant Xcorr (high confidence filter) に基づいて行った。ペプチド質量値と Transcriptome 解析データ (GenBank, accession SRX692542; Sarangi et al., 2015; Minami et al., 2015) に基づいて、Mascot server を用いてタンパク質を同定した。

2-8. 組換え GST および GST-PtIGS の発現と精製

pET19b-PtIGS から PtIGS コード領域を PCR で増幅した。プライマーには、forward primer (5'-GTGGATCCCCGAATTTGGAATCCCCCGCCGCC-3') と reverse primer (5'-GTGACCCGGGAATTTTAAACCTTGCTTTCCCAAAT-3') を用いた。増幅断片は pGEX4T-3 の EcoRI site に In-Fusion cloning Kit (Takara bio inc.) を用いて挿入した。続いて、pGEX4T-3 (GST の発現用) あるいは pGEX4T-3-PtIGS (GST-PtIGS 発現用) で形質転換した大腸菌 BL21star(DE3) を 50 µg.mL⁻¹ Ampicillin を含む LB 培地で培養した。培養液の OD₆₀₀ が 0.6 に達したタイミングで IPTG を終濃度 0.5 mM になるように加え、28 °C で 8 時間発現誘導を行った。集菌した大腸菌は 1 mM PMSF と 0.2 mg.mL⁻¹ Lysozyme を含む Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 300 mM NaCl, 1 mM EDTA) に懸濁した。超音波破碎を行った後、48,000 ×g で 30 分間、4 °C で遠心した。その上清を Glutathione sepharose 4B (Cytiva) column (1.5 × 2.5 cm) に吸着させた。Buffer で洗浄後、溶出 Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Reduced glutathione) で溶出した。精製タンパク質は Buffer B に対して透析した後、実験に用いた。

2-9. Pulldown assay

1 mL の GST あるいは GST-*PtIGS* ($6.4 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ in Buffer B containing 0.05 % (v/v) Triton X-100) を 50 μL の Glutathione sepharose 4B に加え、4 °C で 4 時間以上インキュベートした。cytosol 分画は Buffer C (20 mM Potassium phosphate (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) に対して透析後、100,000 $\times g$ で 10 分間超遠心し、Indigo を取り除いてから用いた。次に、GST-tag タンパク質を結合させた樹脂に、0.05 % (v/v) Triton X-100 を添加した cytosol 分画 (0.82 mg のタンパク質を含む) を加え、4 °C で 16 時間以上インキュベートした。0.05 % (v/v) Triton X-100 を含む Buffer C で洗浄した後、樹脂に 50 μL の 2 \times SDS-PAGE sample buffer (20 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% (w/v) SDS, 1% (v/v) β -Mercaptoethanol, 10 % (v/v) Glycerol) を加え、結合したタンパク質を溶出した。

一方、microsome 分画の場合、共免疫沈降と同じ方法で可溶化し、0.82 mg のタンパク質を含むサンプルを加え、cytosol 分画と同じ方法で処理した。SDS-PAGE には 40 μL のサンプルを用いた。

2-10. タンパク質濃度の定量

Bradford Ultra (Expedion Ltd., CA, USA) を用いて定量を行った。

2-11. RNA 精製

3-weeks-old の植物の若葉を RNA Later RNAlater[®] Stabilization Solution に浸し、使用するまで 4 °C で保存した。RNA 精製には RNeasy plant mini kit (Qiagen) を用いた。約 0.1 g の組織に 0.35 mL の Buffer RLT (1% (v/v) β -Mercaptoethanol を含む) を加え、BioMasher IV (Nippi, Tokyo, Japan) でホモジナイズし、RNA を含む抽出液を得た。RNA 精製は kit の使用説明書に従って行った。

2-12. qPCR 解析

Superscript IV VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて、kit 添付の方法に従って精製 RNA から cDNA を合成した。qPCR は 40 ng の cDNA、primer (表 3 に示した)、PowerUp SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を含む全量 10 μL の反応液を調整し、StepOne Real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。反応は 50 °C-2min, 95 °C-2min, 40 cycle の "95 °C-15sec, 60 °C-1min" で行った。PCR 産物のメルトカーブは (95 °C-15 sec, 60 °C-1 min, + $\Delta 0.3$ °C-15 sec, 95 °C-15 sec) で分析した。mRNA 発現量は *Actin* をリファレンス遺伝子として $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法により求めた。

表 3. qPCR に用いた Primer

Reaction	Protein names		Sequence (5' to 3')
Indican degradation and synthesis	<i>Pt</i> BGL	forward	AGGAGGAGGTGGTGACCAACT
		reverse	CTGCCCGGCTGGAAACT
	<i>Pt</i> IGS	forward	AGACGGTGTTCATGTGAGTTTGC
		reverse	CGTCGTTCTTCTATCCTGAA
Indole synthesis	TSA(1)	forward	GGTTTCCCTCAAATCAACTTGCT
		reverse	GGAGTGGTGAGAAATTGCTTGTC
	TSA(2)	forward	CAAGCATCGTCCCTCTCAATC
		reverse	TTGAATCAGGGAATCGATCGA
	TSB(1)	forward	AAGACGGTCATGGAATCTTTGTC
		reverse	TGCTACCAAGGTCATCGTGAAC
	TSB(2)	forward	CGCTTGGCCAGCATCAC
		reverse	CATGGCGGTGCACACAA
	IGPase	forward	CGTTCATCATGCACCTCTACCA
		reverse	TGCTCGAGGTCTGCAGGTTA
	AS	forward	GCGACTGGTCGACTAGGTAAGG
		reverse	CCCTGCTTTTCGCTCTATCAA
Indole oxidation	CYP51G	forward	AATACGATCCAGGGAGATTTGC
		reverse	AACGCCCTGCTGCTTTA
	CYP71A (1)	forward	GGAGGTTGCCGATGATTGG
		reverse	CCTGCAAACAGAACCTTCCA
	CYP71A (2)	forward	AACGCCACGGTGACATCAT
		reverse	GACTACCAGCACCGGATTGG
	CYP76F	forward	GAGGCCGGGAGGATGAAC
		reverse	TGCGGATCGACGATTTTGA
	CYP76M	forward	TTCCGCGGCTACATCGTT
		reverse	CGCCATGCGTTGATCA
	CYP77A	forward	CCCTACAGCCGCCTCCTT
		reverse	GGCCTTCGATCTTGGTATCG
	CYP81	forward	TTCAGGAGGAGGGACATTGC
		reverse	TGACGGCAGGTACCGATACC
	CYP86A	forward	CGAACACCAGCCAGAAGA
		reverse	CTGGACGGGACACGTCATC
FMO	forward	GAAACCGCAAACCTGGAACAAG	
	reverse	TGCATGATCTTCGGTAGTGCTT	
CPR	forward	CCTGCTTCCGATCGCTCAT	
	reverse	ACTTACTTGAGCCCACTGCCTAA	
Cyt.b5	forward	GGCCCAAAAACCCTTCTG	
	reverse	CCCTGGTGGTGATGCTATCTTC	
UDP-glucose synthesis	SUS(1)	forward	CAGGAAGCGATCGTTCTTCAG
		reverse	CCTTGGTGTTACCTTGATGTACT
	SUS(2)	forward	TGGCTCGGATCTACCAAGTGA
		reverse	AGACGGTTGTCTTCAGCTGTGA
	UGPase	forward	AGGGTGGCACACTGATTTCC
	reverse	TCATCCGGGACTTGTGCAAT	
Transport	Hexose transporter	forward	GCATTCTTGCGGGCACTGATA
		reverse	CCTCCACCATAAGGGATTTCC
	ABC B(1)	forward	CCGTGGATTACAGCATTTTTC
		reverse	GGAGACAGAGTGAACAGAATGCA
	ABC E	forward	CTGACCGATGTAAGCCAAAGAA
		reverse	CATTACAACTGGGCAGCCTTTT
	ABC B(2)	forward	GCTTATGTTGCTACCGGTCTCA
		reverse	TCGCCAGCTTTGACATAGGATT
ABC G	forward	ACAGAGAAAAGAGCTGCAGGAATG	
	reverse	GTGACCTGGGCAAATGCAA	
Reference gene	Actin	forward	TGTGCTTGACTCTGGTGATGGT
		reverse	GCAAGGTCCAGACGAAGGATAG

結果

タンパク質間相互作用の解析

一次構造からは cytosol の可溶性タンパク質と予想される *PtIGS* であるが、実際の細胞分画では一部、ER 膜局在を示した (Inoue et al., 2018)。このことから、ER 膜局在の monooxygenase と相互作用する可能性が予想された。本章ではクロスリンク実験、共免疫沈降、pull-down assay により、*PtIGS* の相互作用を網羅的に調べた。

クロスリンク実験

PtIGS と他のタンパク質の安定な複合体以外に一過性相互作用の存在も検出するために、クロスリンカーを用いた実験を行った。まず、クロスリンカー-BS³ を用いて、葉から調製した cytosol 分画および microsomal 分画に含まれるタンパク質を *in vitro* で架橋し、Immunoblotting で *PtIGS* を検出した。結果、モノマーよりも大きな 180 kDa 以上にシグナルが検出された (図 14 (a, b))。

また、*PtIGS* の細胞内での状態を調べるため、プロトプラストを膜透過性クロスリンカー-DSS で処理した。*in vitro* での結果と同様に、*PtIGS* は 180 kDa 以上の大きさのものが検出された (図 14 (c))。

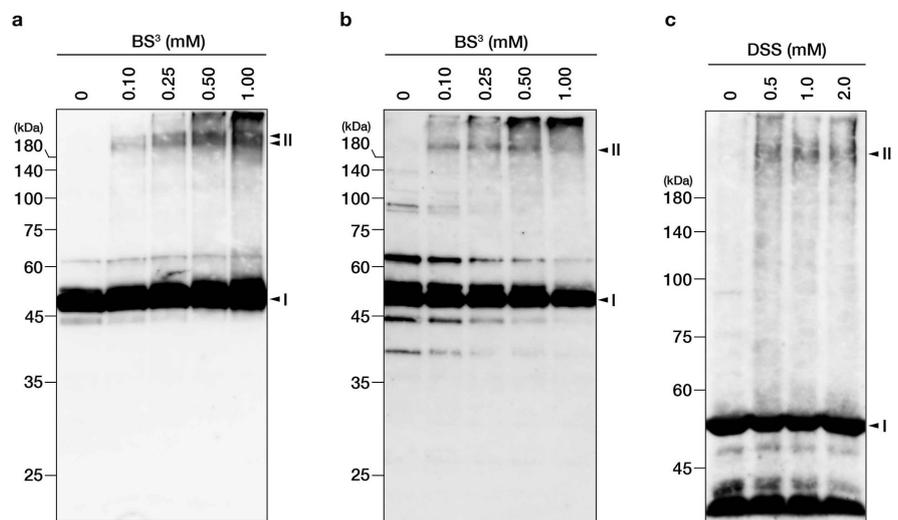


図 14. *in vitro*, *in vivo* におけるクロスリンク実験

cytosol 分画 (a), microsomal 分画 (b), protoplast (c) をそれぞれ BS³ あるいは DSS で処理した。処理後のサンプルを 10 % (a, b) あるいは 7.5 % polyacrylamide gel (c) を用いて SDS-PAGE を行い、*PtIGS* 抗体を用い Immunoblotting で検出した。"I" は *PtIGS* モノマーを、"II" は多量体を示す。

共免疫沈降

実際に *PtIGS* と相互作用するタンパク質を捉えることを試みた。cytosol 分画あるいは microsomal 分画に *PtIGS* 抗体を結合させた AminoLink Plus Coupling Resin を加え、*PtIGS* の共免疫沈降を行った。まず、免疫沈降産物に含まれる *PtIGS* を Immunoblotting で確認した (図 15, + lane)。一方、*PtIGS* 抗体を加えなかったコントロール実験のサンプルでは、*PtIGS* は検出されず (図 15, - lane)、免疫沈降が *PtIGS* に対して特異的であることを確認した。銀染色により、免疫沈降産物に含まれるタンパク質を調べたところ、*PtIGS* 以外に複数のバンドが検出された (図 15)。

図 15. 共免疫沈降によるタンパク質間相互作用の解析

cytosol 分画 (a) あるいは microsome 分画 (b) から, *PtlGS* 抗体結合 AminoLink Plus Coupling Resin を用いて共免疫沈降した。溶出液に含まれるタンパク質を 12.5 % (a) あるいは 10 % polyacrylamide gel (b) を用いて SDS-PAGE を行った。銀染色では、0.21 g (a), 0.06 g (b) の組織に相当するサンプルを SDS-PAGE に用いた。Immunoblotting では、0.04 g (a), 0.06 g (b) の組織に相当するサンプルを SDS-PAGE に用いた。Immunoblotting は *PtlGS* 抗体を用いて行った。ゲル断片 ((a) C1-C6, (b) M1-M10) を切り出し、MS/MS 解析に用いた。レーン上の "+", "-" は、免疫沈降における *PtlGS* 抗体の有無を示す。

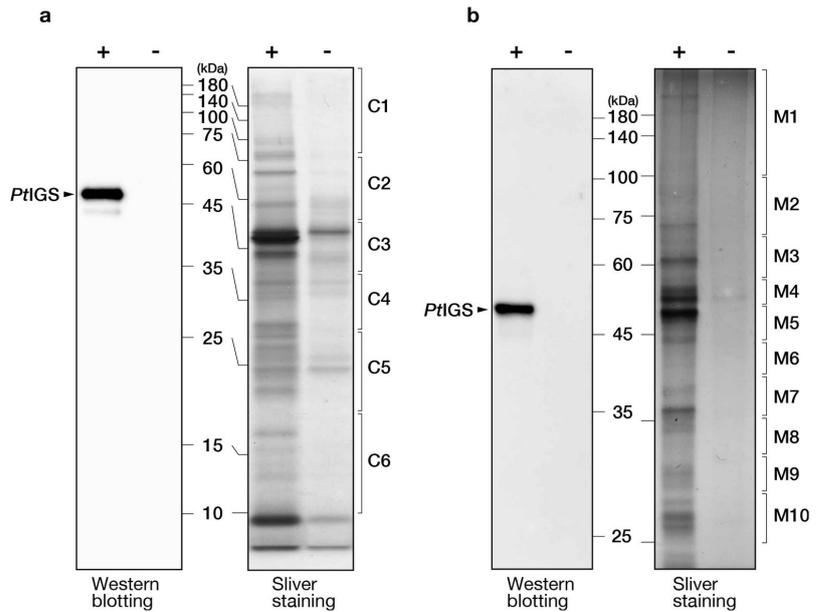


表 4. 共免疫沈降で検出された主なタンパク質

cytosol	predicted proteins	PSMs ^a	unique peptides	coverage (%)
C2	Sucrose synthase	159	21	54
	Heat shock 70 protein	154	24	58
C3	β -Glucosidase	144	18	48
	Actin	110	7	66
C4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	137	6	74
microsome	predicted proteins	PSMs	unique peptides	coverage (%)
M2	Binding protein (ER protein)	176	27	56
	DNA replication licensing factor MCM3-like protein	171	38	68
M3	T-complex protein 1 subunit zeta 1	187	27	67
	Cell elongation protein Ghfe I	154	23	48
M4	ATPase subunit 1	267	23	62
	ATPase CF1 α subunit	221	18	48
M5	Tubulin β -2	209	9	71
	α -Tubulin	183	1	62
M6	Elongation factor 1 α	324	7	46
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	253	5	77
M7	60S ribosomal protein L5	287	12	61
	Polygalacturonase-inhibiting protein	267	16	53
M8	60S ribosomal protein L5	287	12	61
	Polygalacturonase-inhibiting protein	267	16	53
M9	60S ribosomal protein L7-2	336	6	71
	unknown	287	12	61
M10	60S ribosomal protein L7-2	336	6	71
	unknown	326	0	71

^a peptide spectrum matches

C2-C4 および M4-M8 は図 15 の切り出し領域と一致する。解析したすべてのゲル断片において *PtlGS* の PSM が最も高かった (データは示していない)。表には PSM が 100 以上のタンパク質のみ記載した。C1, C5, C6, M1 では *PtlGS* 以外のタンパク質は 100 以上の PSM で検出されなかった。

*Pt*IGS と共沈したタンパク質を同定するため、銀染色したゲルを切り分け (C1-C6; M1-M10) MS/MS 解析を行った。検出された主なタンパク質 (*Pt*IGS を除く) を表 4 にまとめた。cytosol 分画からは Sucrose synthase (SUS), Heat shock protein, β -Glucosidase, β -Actin, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) が高い peptide spectrum matches (PSM) 値で検出された。また、microsome 分画から、Binding protein (ER protein), T-complex protein 1 zeta, ATPase subunit 1, Tubulin, Elongation factor, GAPDH, Ribosomal protein が主に検出された。また、表にまとめたように CYP や Flavin-containing monooxygenase (FMO) のような monooxygenase 活性を持つタンパク質が microsome 分画から検出された。

Pulldown assay

*Pt*IGS のタンパク質間相互作用情報をさらに詳しく集めるために、組換え GST-*Pt*IGS を用いた Pulldown assay を行った。Glutathione Sepharose 4B に結合させた GST-*Pt*IGS を cytosol 分画あるいは microsome 分画に

加え、*Pt*IGS と相互作用するものを精製した。cytosol 分画を用いた実験の結果、5 つのバンド (C1-C5, 図 16 (a)) が CBB 染色で検出された。一方でこれらのタンパク質は、GST を用いたコントロール実験および、Pulldown assay に用いた精製 GST-*Pt*IGS からは検出されなかった。これらのバンドを切り出し、MS/MS 解析を行ったところ、SUS (C3), Catalase (C4), Biotin carboxylase (C5) が主に検出された (表 5)。バンド C1 と C2 からは有意なタンパク質 (PSM > 50) は検出されなかった。

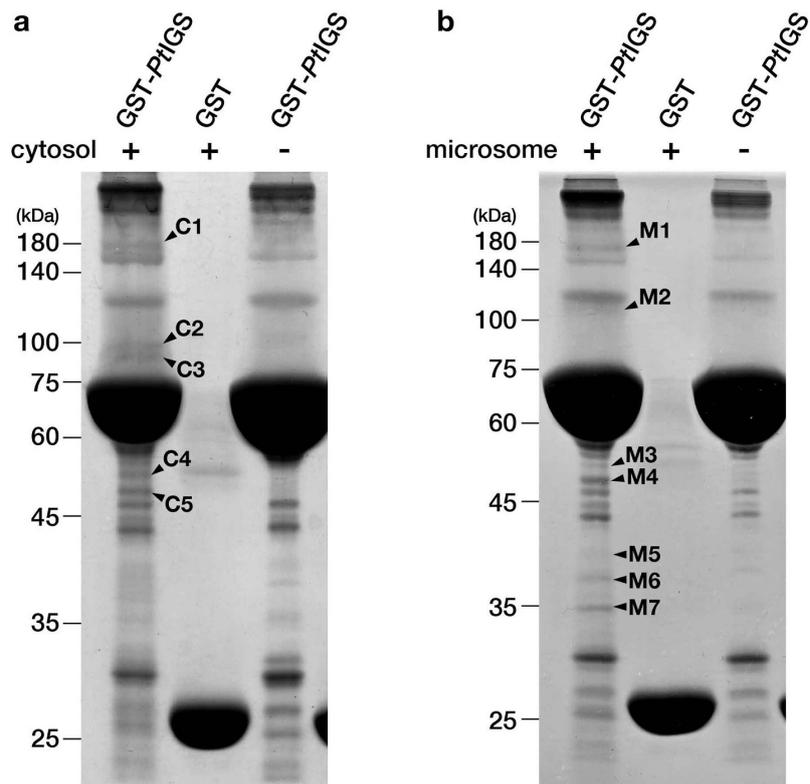


図 16. Pulldown assay によるタンパク質間相互作用の解析
 cytosol 分画 (a) あるいは microsome 分画 (b) から、組換え GST-*Pt*IGS 結合 Glutathione sepharose 4B を用いて *Pt*IGS と相互作用するタンパク質を精製した。40 μ L のサンプルを 10 % polyacrylamide gel にアプライし、SDS-PAGE 後、CBB 染色で検出した。“-”で示したサンプルは GST-*Pt*IGS を Buffer のみでインキュベートした。バンド C1-C5 (a), M1-M7 (b) を切り出し MS/MS 解析に用いた。

一方、microsome 分画を用いた結果、7つのバンド (M1-M7, 図 16 (b)) が検出された。これらのバンドを解析したところ、Tubulin (M3, M4), CYP77A2 (M3), Elongation factor 1- α (M4), GAPDH (M5, M6), Guanine nucleotide-binding protein subunit β -like (M7) が主に検出された (表 5)。バンド M1, M2, M8, M9, M10 からは有意なタンパク質 (PSM > 50) は検出されなかった。

表 5. Pulldown assay で検出された主なタンパク質

cytosol	Predicted proteins	PSMs ^a	unique peptides	coverage (%)
C3	Sucrose synthase	141	21	58
C4	Catalase	83	17	51
	Glucosyltransferase	73	18	34
	2-Phospho-D-glycerate hydrolase	61	2	60
C5	Biotin carboxylase	98	24	61
microsome	Predicted proteins	PSMs	unique peptides	coverage (%)
M3	Tubulin β -2 chain	153	11	73
	Tubulin β -4 chain	99	0	43
	unknown	82	5	70
	Cytochrome P450 77A2	75	23	56
M4	Elongation factor 1- α	263	8	62
	α -Tubulin	96	1	68
M5	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	189	5	77
	Ribosomal protein	125	4	57
	Glycolate oxidase	84	16	73
	Outer envelope pore protein 37	84	22	77
M6	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	142	6	76
M7	Guanin nucleotide-binding protein subunit β -like	428	2	86
	Reticulata-related 4	68	18	64

^a peptide spectrum matches

C3-C5 および M3-M7 は図 16 の切り出し領域と一致する。解析したすべてのゲル断片において *PtiGS* の PSM が最も高かった (データは示していない)。表には PSM が 50 以上のタンパク質のみ記載した。C1, C2, M1, M2 では *PtiGS* 以外のタンパク質は 100 以上の PSM で検出されなかった。

第 1 葉および第 2 葉の Transcriptome 解析

第 1 章では、*PtiGS* mRNA が植物体の若葉 (1 葉) で特異的に発現し、成熟した葉 (2 葉以降) では 1/10 程度に急激に低下することを報告した (Inoue et al., 2018)。Indican 生合成に関わるタンパク質の遺伝子が *PtiGS* のものと同じパターンの調節を受けている可能性を仮説し、遺伝子発現量の変化から相互作用タンパク質の検索を行った。

Transcriptome 解析により、第 1 葉および第 2 葉での遺伝子発現を網羅的に解析した。第 1 葉で 4.6 Gb、第 2 葉で 4.58 Gb のリード数が得られ、これらの sequencing データは DDBJ に登録した (accession number, DRA009413)。このデータを元に *de novo* アッセムブリを行い、全長 85,897,673 bp からなる、合計 86,754 の Unigene の情報を得た。Unigene は第 1 葉から 58,987、第 2 葉から 55,822 の配列がそれぞれ得られた (表 6)。各配列は数種のデータベース (NR, NT, SwissProt,

KOG, KEGG, GO, InterPro) を用いてアノテーションした。KOG (EuKaryotic Orthologous Groups) データベースを用いた解析では、1,357 の遺伝子が二次代謝に関連するカテゴリー (specialized metabolite biosynthesis, transport, and catabolism) に分類された (図 17)。

	1st leaf	2nd leaf
Total clean reads (Mb)	45.98	45.83
Clean reads Q20 (%)	98.18	98.37
Total clean bases (Gb)	4.60	4.58
	1st leaf	2nd leaf
Total number of transcripts	86,022	80,303
N50	1,387	1,272
GC (%)	45.11	45.07
	1st leaf	2nd leaf
Total number of unigenes	58,987	55,822
N50	1,511	1,391
GC (%)	45.16	45.10

表 6. Transcriptome 解析で得られたリード数および *de novo* アセンブリで得られた遺伝子数

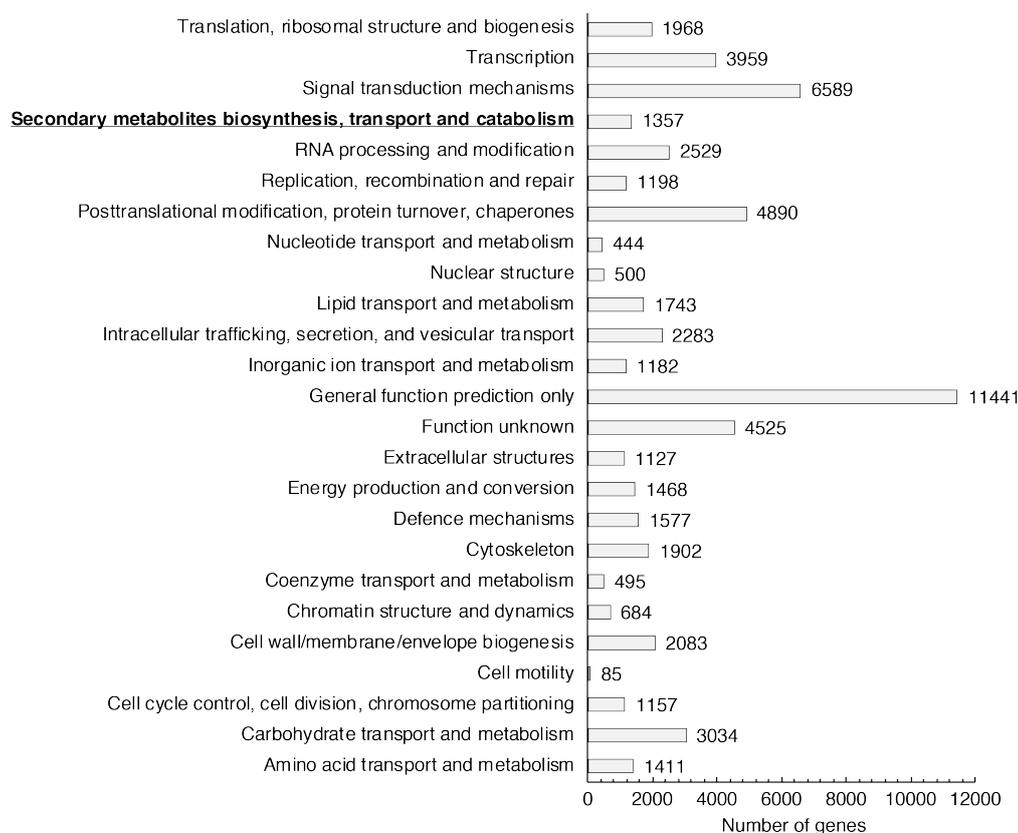


図 17. KOG データベースによる遺伝子の機能別分類

相互作用タンパク質の mRNA 発現量の解析

Transcriptome 解析データから、第 1 葉および第 2 葉間で発現量に差異がある遺伝子 (differential expression gene; DEG) を PossionDis method を用いて分析した。この際、第 1 葉を 1 とした時、第 2 葉での発現量が 2 倍以上に上昇したものを up-regulation、反対に 1/2 倍以下のものを down-regulation と定義した。本解析では、第 2 葉において 3,472 遺伝子が up-regulation、9,241 遺伝子が down-regulation の傾向にあることが明らかになった。さらに、二次代謝に関連するカテゴ

リー (specialized metabolite biosynthesis, transport, and catabolism) に分類された 1,357 の遺伝子のうち、336 遺伝子が up-regulation、692 遺伝子が down-regulation の傾向を示した。

表 7 に Indican 生合成との関連が考えられる Indole, Indoxyl および UDP-glucose 生合成経路で働くタンパク質の DEG をまとめた。葉緑体内での Indole 生合成経路で働く TSA のうち、2 つの遺伝子に第 2 葉での down-regulation の傾向が見られた。また、同じく葉緑体のシキミ酸経路のうち、Anthranilate synthase (AS) が第 2 葉で down-regulation する傾向を示した。また、Indole monooxygenase として機能する可能性がある CYP のうち 30 種、および CYP 以外の 21 種の monooxygenase も down-regulation の傾向を示した。

相互作用解析で検出された SUS 遺伝子は、同じ働きをする UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) と共に第 2 葉で down-regulation の傾向を示すことを確認した。

表 7. Indican 生合成に関与が予想される遺伝子の Transcriptome 解析における DEG

	Down ^a	Up ^a	total
Indole biosynthesis			
TSA	2	0	7
TSB	7	0	12
Other enzymes of shikimate pathway ^b	9	1	18
Indole hydroxylation			
CYP	30	56	331
Other monooxygenase	21	8	29
Cyt.b5	1	0	2
CPR	0	0	14
UDP-glucose biosynthesis			
SUS	9	4	19
UGPase	7	2	54
Indican transport ^c			
ABC transporter	40	0	47
Other transporter	23	8	101

^a FDR が 0.01 以上の遺伝子のみ down (down-regulation) と up (up-regulation) を示した

^b IGPase, AS, anthranilate phosphoribosyl transferase, phosphoribosyl anthranilate isomerase を含む

^c H⁺-ATPase と ion channel を除いた

相互作用タンパク質の mRNA 発現量の qPCR 解析

PtIGS と相互作用を示したタンパク質の遺伝子を対象に qPCR を行い、第 2 葉での遺伝子発現量の変動を確認した。*PtIGS* と *PtBGL* について解析を行ったところ、以前の報告と同様、減少の傾向が見られた。また、qPCR 解析での定量値は Transcriptome 解析の結果とほぼ一致した (図 18 (a))。

PtIGS との相互作用解析において全く検出されなかった TSA, TSB, AS, Indole-3-glycerol phosphate synthase (IGPase) についても調べた。その結果、解析した全ての遺伝子が第 2 葉で発現量の減少傾向を示した (図 18 (b))。

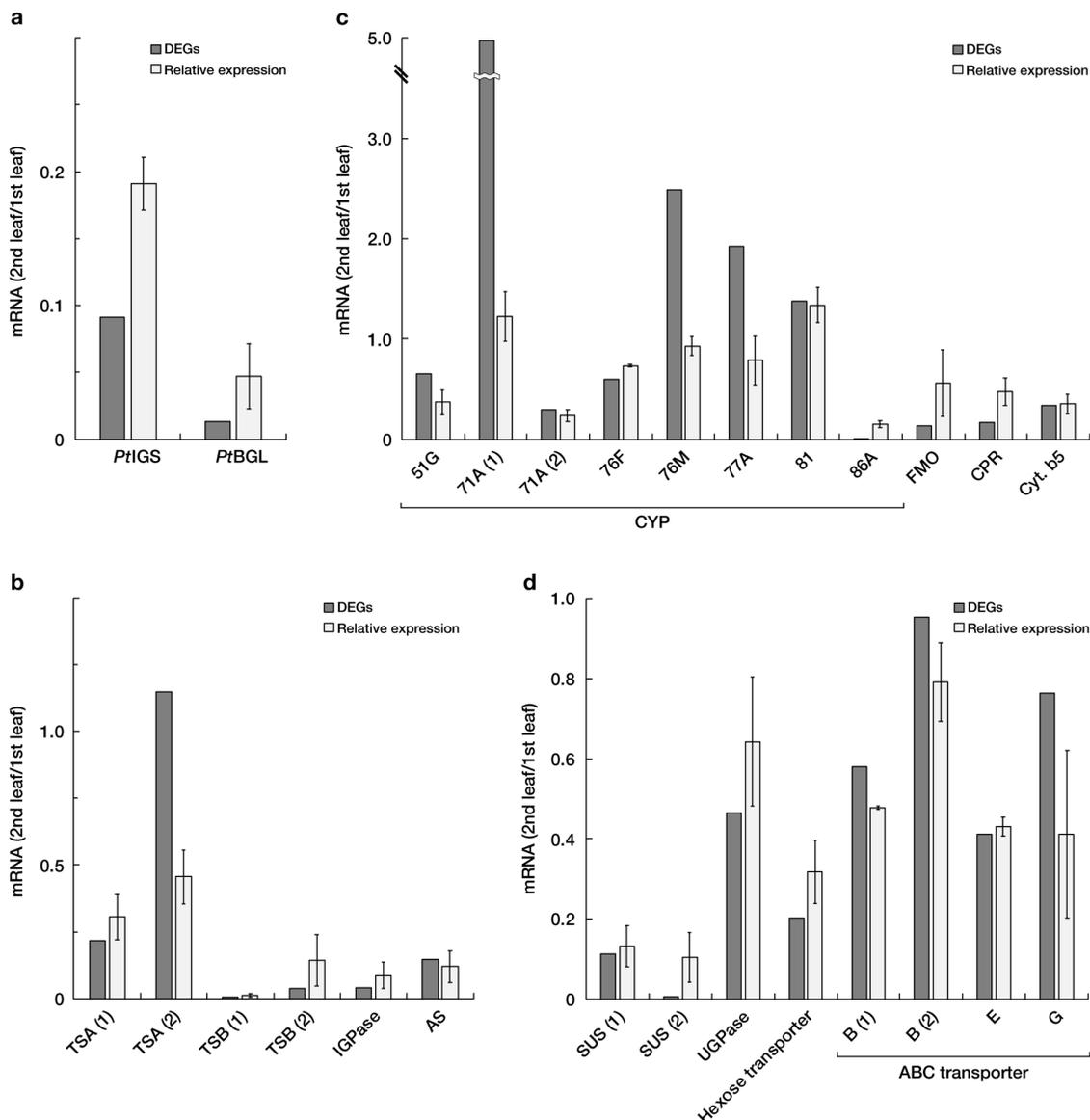


図 18. qPCR による Indican 合成候補遺伝子の発現解析

Indican 合成酵素 *PtIGS* と分解酵素 *PtBGL* (a), Tryptophan 合成酵素およびシキミ酸経路のタンパク質 (b), Monooxygenase 関連タンパク質 (c) および UDP-glucose 合成酵素と Transporter (d) の遺伝子発現量を qPCR により解析した。縦軸は第 1 葉に対する第 2 葉での相対的な発現量を示す。error bar は標準誤差を示す。全ての実験は 3 回以上行った。

共免疫沈降と Pulldown assay において microsome 分画から検出された Indole 水酸化に関わる遺伝子の発現量を調べた。表 8 および図 18 (c) で示すように、相互作用が検出されていた CYP および他の monooxygenase のうち、CYP51G, CYP71A(2), CYP86A, FMO の発現量が第 2 葉で減少した。他にも、CYP の還元に関わるとされる Cytochrome P450 reductase (CPR) や Cytochrome b5 (cyt.b5) の発現量も分析したところ、両者とも第 2 葉で減少が見られた。しかし、本相互作用実験では CPR と *PtIGS* の相互作用は検出なかった。これらの遺伝子発現量の qPCR での定量値は、CYP71A(1), CYP76M, CYP77A を除いて DEG とほとんど一致していた。

表 8. 相互作用解析データと遺伝子発現量解析データのまとめ (monooxygenase 関連遺伝子)

Candidate proteins	DEGs (Fold change)	Relative expression (\pm SE ^a)	PSMs ^b (co-IP)	PSMs (pull-down)
CYP51G	0.655	0.37 (\pm 0.12) ^d	n.d. ^e	28
CYP71A (1)	4.982	1.22 (\pm 0.25)	6	3
CYP71A (2)	0.293	0.24 (\pm 0.06) ^c	1	1
CYP76M	2.485	0.92 (\pm 0.09) ^c	4	7
CYP76F	0.598	0.73 (\pm 0.01)	n.d.	26
CYP77A	1.926	0.79 (\pm 0.24)	1	75
CYP81	1.374	1.34 (\pm 0.18)	11	8
CYP86A	0.003	0.15 (\pm 0.04) ^d	1	n.d.
FMO	0.137	0.56 (\pm 0.33)	3	33
CPR	0.172	0.47 (\pm 0.13) ^d	n.d.	n.d.
Cyt.b5	0.337	0.35 (\pm 0.10) ^d	1	n.d.

相互作用が検出されたタンパク質の遺伝子発現量を第 1 葉に対する第 2 葉での相対値で示した。

^a standard error; ^b peptide spectrum matches; ^c P<0.001 (1st vs 2nd, tukey's test); ^d P<0.05 (1st vs 2nd, tukey's test); ^e not detected

cytosol 分画からの共免疫沈降と pull-down assay で検出された 2 つの SUS の遺伝子は発現量の減少が見られた (表 9, 図 18 (d))。特に片方の SUS(1) は SUS (2) と比較して、共免疫沈降と pull-down assay で非常に高い PSM で検出されていた (表 9)。また、UGPase は SUS(1) や SUS(2) ほどの著しい発現量の減少を示さなかった (表 9, 図 18 (d))。

Indican の液胞内輸送を予想し、各種 Transporter にも注目した。共免疫沈降と Pull-down assay で検出された 20 の ABC transporter と Hexose transporter のうち、いくつかの遺伝子が第 2 葉で減少傾向を示した (表 9, 図 18 (d))。

表 9. 相互作用解析データと遺伝子発現量解析データのまとめ (UDP-glucose 合成酵素遺伝子と Transporter 遺伝子)

Candidate proteins	DEGs (Fold change)	Relative expression (\pm SE ^a)	PSMs ^b (co-IP)	PSMs (Pull-down)
SUS (1)	0.114	0.13 (\pm 0.05) ^c	159	141
SUS (2)	0.006	0.10 (\pm 0.06) ^c	2	4
UGPase	0.465	0.64 (\pm 0.16)	37	49
Hexose transporter	0.202	0.32 (\pm 0.08) ^c	2	14
ABC transporter B (1)	0.580	0.48 (\pm 0.004) ^c	7	2
ABC transporter B (2)	0.953	0.79 (\pm 0.17)	1	3
ABC transporter E	0.412	0.43 (\pm 0.02) ^c	5	2
ABC transporter G	0.764	0.41 (\pm 0.21)	1	1

相互作用が検出されたタンパク質の遺伝子発現量を第 1 葉に対する第 2 葉での相対値で示した。

^a standard error; ^b peptide spectrum matches; ^c P<0.001 (1st vs 2nd, tukey's test)

考察

本章では Indican 生合成に関与するタンパク質を特定するために 2 つの異なる手法を用いた。*PtIGS* は ER 膜上のタンパク質と会合する可能性が示唆されていたため (Inoue et al., 2018)、*PtIGS* の相互作用を解析した。2 つ目として、Transcriptome 解析により第 1 葉と第 2 葉の遺伝子発現量を解析した。第 1 章の報告と同様に、ここでも *PtIGS* mRNA の発現は第 1 葉特異的であり、第 2 葉で大きく減少していることがわかった (図 18 (a))。Flavonoid 生合成経路では、その経路で働く遺伝子の多くが同様の発現量を示すことも報告されている (Tan et al., 2013)。Indican 生合成においても、*PtIGS* 以外の他の遺伝子が同様の調節を受けている可能性を推測した。

ER 膜に存在する CYP は、様々な植物の二次代謝の生合成に関わると報告されている (Tan et al., 2013; Xu et al., 2015)。CYP も含め Indican 生合成で働く monooxygenase を *PtIGS* のタンパク質間相互作用に焦点を当てて探索した。まず、クロスリンカーを用いた実験では、*PtIGS* が大きな複合体を形成する可能性が示唆された (図 14)。共免疫沈降と pulldown assay では、様々な機能をもつタンパク質 (シャペロン, リボソームタンパク質, 解糖系酵素, 細胞骨格タンパク質, シグナル伝達に関わるタンパク質, ER 膜タンパク質, Transporter など) が *PtIGS* と共に検出された。さらに相互作用実験では、いくつかの CYP が *PtIGS* と相互作用する可能性が得られた。特に、71A family に属する 2 種の CYP も検出された。CYP71 family のタンパク質は植物の二次代謝への関与がよく知られている (Bak et al., 2011; Bassard et al., 2012.; Bassard et al., 2017; Frey et al., 2009; Nelson and Werck-Reichhart, 2011; Nielsen and Møller, 2005; Schuegger et al., 2006; Schuler, 2005; Xu et al., 2015)。トウモロコシ *Zea mays* においては、CYP71C4 と CYP71C2 は Benzoxazinoid 生合成経路で働く BX2, BX3 として同定されており (Frey et al., 2009)、Indole と Indole-2-one の水酸化を触媒することが知られている。従って、71 family の CYP は Indican 生合成で Indole monooxygenase として働く可能性が考えられた。また、ステロール生合成に関与する CYP51、テルペンインドールアルカロイドの生合成に関与する CYP76、脂肪酸代謝に関与する CYP77 や CYP86、グルコシノレート生合成に関与する CYP81、フェノールアミド生合成に関与する CYP76 なども検出された。Transcriptome 解析では、1 つの CYP71A 遺伝子が第 2 葉での発現量の減少を示した。また、CYP とは異なる monooxygenase である FMO 遺伝子の発現量も第 2 葉で減少した。これらの結果より、CYP71A と FMO が Indican 生合成における Indole monooxygenase の有力な候補として考えられる。

PtIGS のもう一方の基質は UDP-glucose であり、植物細胞においては、SUS や UGPase がその生合成の役割を担っていることが知られている (Kleczkowski et al., 2010)。*PtIGS* との相互作用実験では、それらの酵素も検出されていた。Transcriptome 解析では、2 つの SUS 遺伝子が第 2 葉で発現量の減少を示した。また、UGPase も幾分減少する傾向を示した。そこで、SUS あるいは UGPase が *PtIGS* への UDP-glucose 供給に働いている可能性を推測している (図 19)。

対照的に、TSA との相互作用は全く検出されなかった。しかし、その遺伝子発現量は第 2 葉で減少を示しており、Indican 生合成に影響している可能性もある。もし、葉緑体から cytosol へ Indole

が供給されるならば、TSA と *PtIGS* はそれぞれ別の細胞内局在であるため相互作用は起こり得ない。あるいは、Jin らが報告した cytosol の INS (Jin et al., 2016) が Indole を供給するのであれば、cytosol で生成された Indole は ER 膜に入ったのちに、monooxygenase に供給されると考えられる。しかし、この場合、cytosol 局在の *PtIGS* とは少なからず相互作用するのではないだろうか。トウモロコシ *Zea mays* では、葉緑体で生成された Indole が cytosol での二次代謝産物 DIMBOA の生合成に利用される。しかし、どのようなメカニズムで葉緑体から cytosol へ Indole が供給されるのかは明らかとなっていない。Indican 生合成における Indole 供給経路を理解するためにはさらに研究が必要とされる。

Indican は生合成されると液胞に蓄えられるため、何らかの産物輸送機構の存在が考えられる。相互作用解析では ABC transporter や糖輸送に関係するいくつかの Transporter が検出された。植物の二次代謝産物の輸送には様々な種類の Transporter が関わるということが報告されており、ABC transporter が関わる例も多い (Francisco et al., 2018)。例えば、*A. thaliana*, *Z. mays*, *Vitis vinifera* における液胞内への Anthocyanin の輸送には ABCC transporter (ABC subfamily の一種) が働くことが報告されている (Goodman et al. 2004; Buer et al. 2007; Francisco et al., 2013)。*PtIGS* が相互作用を示した Transporter のうち、5 つの ABC transporter と 1 つの Hexose transporter が第 2 葉での遺伝子発現量の減少傾向を示しており、これらが Indican の輸送に関わる可能性も考えられる。

さらに、ヒートショックタンパク質、細胞骨格タンパク質、シグナル伝達タンパク質など、Indican 生合成との直接の関係が予想できないタンパク質と *PtIGS* の相互作用が検出された。そのため、*PtIGS* は Indole monooxygenase や UDP-glucose 合成酵素 (SUS あるいは UGPase) などの Indican 生合成に直接関与するタンパク質に加えて、多様なタンパク質と会合し、ER 膜上で巨大な複合体を形成している可能性がある。近年では、メタボロンと呼ばれる代謝複合体の存在が様々な代謝経路で提唱されている (Zhang and Fernie et al., 2020; Bassard et al., 2012, Bassard et al., 2017; Gou et al., 2018; Laursen et al., 2016; Nakayama et al., 2019; Ralston and Yu, 2006; Wang and Zhao, 2018)。そのため、私は Indican 生合成においてもメタボロンが形成される可能性を考えている。植物の二次代謝におけるメタボロンでは、その多くが ER 膜局在の CYP が拠点となり形成されると考えられる (Gou et al., 2018)。Indican 生合成では ER 膜上の monooxygenase が Indole を水酸化すると考えられるが、生成物である Indoxyl は酸素に対して不安定である。酸化されると容易に Indigo (沈殿物) となり、細胞自身にとって有害となる。そのため、細胞内では monooxygenase へ分子酸素を供給しつつ、同時に、Indoxyl (生成物) を酸化から保護しなければならない。つまり、Indoxyl は *PtIGS* へと素早く受け渡され、Indican 合成にすぐに用いられる必要がある。*PtIGS* と Indole monooxygenase が非常に密接に相互作用している可能性が考えられるため、両者の関係性は今後重要な研究課題となるだろう。例えば、Tryptophan 合成酵素 $\alpha\beta$ 複合体の様に、それらは基質を拡散させないトンネル構造を形成しているかもしれない。Lignin 生合成経路における CYP の様に Indican 生合成経路でも ER 膜上の monooxygenase が、*PtIGS* や SUS のような可溶性タンパク質が会合するための足場となっているかもしれない。もし本当にメタボロンが存在するのであれば、どのような

タンパク質がどのようにメタボロンを形成するのかなど、多くの疑問が残されており、それらの解決のためにはさらなる研究の進展が必要である。

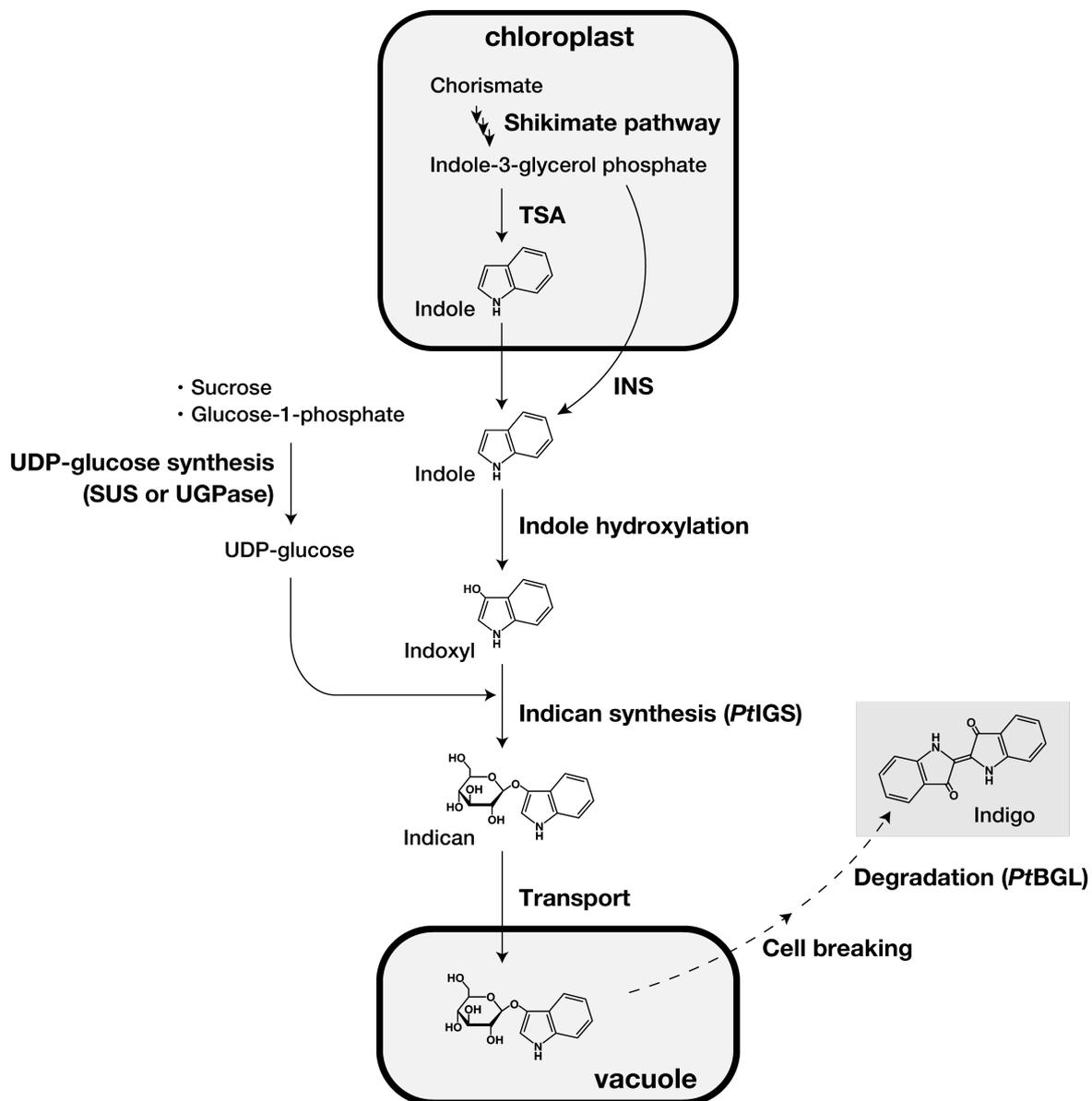


図 19. 相互作用解析と Transcriptome 解析で検出されたタンパク質の Indican 生合成における機能予測

参考文献

- Bak, S., Beisson, F., Bishop, G., Hamberger, B., Hofer, R., Paquette, S., Werck-Reichhart, D., 2011. Cytochrome P450. *Arabidopsis Book* 9, e0144.
- Bassard, J.-E., Møller, B.L., Laursen, T., 2017. Assembly of dynamic P450-mediated metabolons-order versus chaos. *Curr. Mol. Bio. Rep.* 3, 37–51.
- Bassard, J.E., Richert, L., Geerinck, J., Renault, H., Duval, F., Ullmann, P., Schmitt, M., Meyer, E., Mutterer, J., Boerjan, W., Jaeger, G.D., Mely, Y., Goossens, A., Werck-Reichhart, D., 2012. Protein-protein and protein-membrane associations in the lignin pathway. *Plant Cell* 24 (11), 4465–4482.
- Buer, C.S., Muday, G.K. and Djordjevic, M.A. 2007. Flavonoids are differentially taken up and transported. *Plant Physiol.* 145: 478–490.
- de Brito Francisco R, Martinoia E. 2018. The Vacuolar Transportome of Plant Specialized Metabolites. *Plant Cell Physiol.* 59(7):1326-1336.
- Francisco, R. M., Regalado, A., Ageorges, A., Burla, B. J., Bassin, B., Eisenach, C., Zarrouk, O., Vialet, S., Marlin, T., Chaves, M. M., Martinoia, E., & Nagy, R. (2013). ABCC1, an ATP binding cassette protein from grape berry, transports anthocyanidin 3-O-Glucosides. *The Plant cell* 25(5), 1840–1854.
- Frey, M., Schullehner, K., Dick, R., Fiesselmann, A., Gierl, A., 2009. Benzoxazinoid biosynthesis, a model for evolution of secondary metabolic pathways in plants. *Phytochemistry* 70 (15–16), 1645–1651.
- Goodman, C.D., Casati, P. and Walbot, V. 2004. A multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays*. *Plant Cell* 16: 1812–1826.
- Gou, M., Ran, X., Martin, D.W., Liu, C.-J., 2018. The scaffold proteins of lignin biosynthetic cytochrome P450 enzymes. *Nature Plants* 4 (5), 299–310.
- Hilario, E., Caulkins, B.G., Huang, Y.M.M., You, W., Chang, C.E.A., Mueller, L.J., Dunn, M.F., Fan, L., 2016. Visualizing the tunnel in tryptophan synthase with crystallography: insights into a selective filter for accommodating indole and rejecting water. *Biochem. Biophys. Acta* 1864 (3), 268–279.
- Inoue, S., Morita, R., Kuwata, K., Kunieda, T., Ueda, H., Hara-Nishimura, I., Minami, Y., 2018. Tissue-specific and intracellular localization of indican synthase from *Polygonum tinctorium*. *Plant Physiol. Biochem.* 132, 138–144.
- Jin, Z., Kim, J.-H., Park, S.U., Kim, S.-U., 2016. Cloning and characterization of indole synthase (INS) and a putative tryptophan synthase α -subunit (TSA) genes from *Polygonum tinctorium*. *Plant Cell Rep.* 54, 340–344.
- Kleczkowski, L.A., Kunz, S., Wilczynska, M., 2010. Mechanisms of UDP-glucose synthesis in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 29 (4), 191–203.
- Laursen, T., Borch, J., Knudsen, C., Bavishi, K., Torta, F., Martens, H.J., Silvestro, D., Hatzakis, N.S., Motawia, M.S., Hamberger, B., Møller, B.L., Bassard, J.E., 2016. Characterization of a dynamic metabolon producing the defense compound dhurrin in sorghum. *Science* 354 (6314), 890–893.
- Minami, Y., Kanafuji, T., Miura, K., 1996. Purification and characterization of a β -glucosidase from *Polygonum tinctorium*, which catalyzes preferentially the hydrolysis of indican. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60, 147–149.
- Nakayama, T., Takahashi, S., Waki, T., 2019. Formation of flavonoid metabolons: functional significance of protein-protein interactions and impact on flavonoid chemodiversity. *Front. Plant Sci.* 10, 821.
- Nelson, D., Werck-Reichhart, D., 2011. A P450-centric view of plant evolution. *Plant J.* 66 (1), 194–211.
- Nielsen, K.A., Møller, B.L., 2005. Cytochrome P450s in plants. In: Montellano, P.R., Ortiz, de (Eds.), *Cytochrome P450, fourth ed.* Springer international Publishing, Switzerland, pp. 553–582.
- Ralston, L., Yu, O., 2006. Metabolons involving plant cytochrome P450s. *Phytochemistry Rev.* 5 (2), 459–472.
- Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J.C., Ferrara, P., 1992. In-gel digestion of proteins for internal sequence-analysis after 1-dimensional or 2-dimensional gel-electrophoresis. *Anal. Biochem.* 203 (1), 173–179.

- Schuhegger, R., Nafisi, M., Mansourova, M., Petersen, B. L., Olsen, C. E., Svatos, A., Halkier, B. A., & Glawischnig, E. 2006. CYP71B15 (PAD3) catalyzes the final step in camalexin biosynthesis. *Plant physiology*, 141(4), 1248–1254.
- Shishido, Y., Tomoike, F., Kimura, Y., Kuwata, K., Yano, T., Fukui, K., Fujikawa, H., Sekido, Y., Murakami-Tonami, Y., Kameda, T., Shuto, S., Abe, H., 2017. A covalent G-site inhibitor for glutathione S-transferase Pi (GSTP1-1). *Chem. Commun.* 53 (81), 11138–11141.
- Tan, J., Tu, L., Deng, F., Hu, H., Nie, Y., Zhang, X., 2013. A genetic and metabolic analysis revealed that cotton fiber cell development was retarded by flavonoid naringenin. *Plant Physiol.* 162 (1), 86–95.
- Wang, B., Zhao, Q., 2018. Membrane-bound metabolons. *Nature Plants* 4 (5), 245–246.
- Xu, J., Wang, X.Y., Guo, W.Z., 2015. The cytochrome P450 superfamily: key players in plant development and defense. *J. Integrative Agriculture* 14 (9), 1673–1686.
- Zhang and Fernie, 2020. Metabolons, Enzyme–Enzyme Assemblies that Mediate Substrate Channeling, and Their Roles in Plant Metabolism, *Plant Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100081>

第 3 章

Indole monooxygenase *PtFMO* と UDP-glucose 合成酵素 *PtSUS* の同定

要旨

タデアイは藍染の染料 Indigo の生産に用いられる植物であり、その細胞は多量の Indican を蓄積している。タデアイの細胞内で、Indican は基質として Indoxyl を用いる Indican 合成酵素 *PtIGS* の働きにより合成される。本章では Indoxyl 生成活性をもつ Flavin-containing monooxygenase (FMO) の cDNA をタデアイからクローニングした。組換え *PtFMO* を大腸菌内で発現させ、菌体内で Indigo 生産を確認した。さらに、組換え *PtFMO* を含む大腸菌の膜分画に Indole と NADPH を添加することによっても Indigo の生成を確認した。また、大腸菌内で、組換え *PtFMO* と組換え *PtIGS* を共発現させたところ、Indican が合成されたことから、*PtFMO* と *PtIGS* の間で Indoxyl の受け渡しが上手く行われていることが明らかとなった。さらに、植物体において、*PtFMO* は *PtIGS* と同様に第 1 葉 (新芽) で最も発現が見られた。これらの結果より、*PtFMO* は Indole monooxygenase 活性を持ち、Indican 生合成に関わる可能性が示唆された。

また、*PtIGS* は Indican 合成に UDP-glucose も要求する。前章の *PtIGS* の相互作用解析では、UDP-glucose 合成酵素として知られている Sucrose synthase (SUS) との強い結合が検出された。本章では、この SUS の cDNA クローニングを行い、各種解析を行った。組換え *PtSUS* および *PtSUS* 抗体を用いて、*PtSUS* と *PtIGS* の結合を再確認した。さらに、*in vitro* で *PtSUS* と *PtIGS* の反応を共役させると Indican が生成することを確かめた。植物体における、*PtSUS* タンパク質と mRNA の発現も第 1 葉で非常に高く、Indican の生合成に関わる可能性が考えられた。

緒言

Indican 生合成経路には Indican 合成酵素を中心にいくつかの酵素が関与すると考えられる。第 1 章では、Indican 合成酵素をコードする遺伝子 *igs* (Indoxyl β -D-glucoside gene) を特定した (Inoue et al., 2018)。さらに、細胞分画により、*PtIGS* が一部、ER 膜と会合することを示した。

PtIGS の基質である Indoxyl は一次代謝由来の Indole の水酸化によって生成され则认为られる。Indoxyl の生成には、monooxygenase が関与すると推測される。一般的に、植物は多種類の cytochrome P450 (CYP) や Flavin-containing monooxygenase (FMO) などの monooxygenase を持っていることが知られている。CYP は ER 膜タンパク質であり、いくつかの植物の二次代謝ではその関与が報告されている (Chapple et al., 1998; Ralston and Yu, 2006)。第 2 章で述べた様に、私の研究においても、非常に多くの CYP と FMO が Transcriptome 解析により検出されている (Inoue et al., 2020)。

Indoxyl を生成する酵素に関しても、様々な生物種由来の CYP あるいは FMO が報告されている。これらの酵素を利用してバクテリアやモデル植物での Indigo 生産が試みられてきた。その理由は、安価な化学合成 Indigo はその生産過程で多量の有害な廃液を出すため、環境面を見直すためである。例えば、トウモロコシ *Zea mays* 由来の Indole synthase と human 由来 CYP2A6 をタバコ培養細胞に発現させることで、ハロゲン化した Indican の生成が報告された (Warzecha et al., 2007; Fräbel et al., 2018)。Kim らは、大腸菌に *Streptomyces cattleya* 由来の CYP102A を発現させることで Indigo が生成することを報告した (Kim et al., 2017)。Choi らは、*Methylophaga sp.* 由来の FMO が Indole を基質とする Indigo 生成に効率的であることを報告した (Choi et al., 2003)。他にも、*Nitrincola lacisaponesis* (Lončar et al., 2019), *Corynebacterium glutamicum* (Ameria et al., 2015), *Mesorhizobium loti* や *Sphingomonas wittichi* (Singh et al., 2010) などの微生物由来の FMO が Indigo 生成能を持つことが報告されてきた。さらに、2018 年に Hsu らは、*Methylophaga sp.* 由来の FMO とタデアイ由来の Indican 合成酵素 (*P. tinctorium* UDP-glucosyltransferase 1) 共発現させることにより、大腸菌内で効率的に Indican が合成されることを報告した (Hsu et al., 2018)。

しかしながら、肝心のタデアイ、あるいは Indigo 生産植物において、Indoxyl を生成する monooxygenase についての報告はなかった。Indoxyl は酸化に対して不安定な物質であるため、細胞内 monooxygenase により合成された後、すぐに *PtIGS* へ渡され、Indican に変換される必要がある。その効率的な反応のために、*PtIGS* は Indole monooxygenase と相互作用しているのではないかと推測した。第 2 章で報告したように、共免疫沈降と pulldown assay により *PtIGS* の相互作用タンパク質を解析したところ、1 種類の FMO との結合が検出された (Inoue et al., 2020)。

FMO は多くの生物に存在し、様々な低分子の水酸化活性を持つ酵素である。その活性には FAD や NADPH を要求する (Cashman and Zhang, 2006; Schlaich, 2007)。動物では、FMO は主に低分子の解毒に働く (Cashman and Zhang, 2006)、その一方で、植物ではどのような働きをもつのかは詳しく解明されていない。植物は他の生物より多くの FMO 遺伝子をもつことが知られている。例えば、

Arabidopsis thaliana では 29 種の FMO 遺伝子が存在する (Schlauch, 2007)。第 2 章でも述べたように、タデアイの葉からも 29 種が検出された (Inoue et al., 2020)。

本研究では、その 29 種類の FMO のうち、相互作用が見られた 1 種類について cDNA をクローニングし、組換え *PtFMO* の Indole monooxygenase 活性を確認した。さらに、*PtFMO* が Indican 生合成経路で働く可能性を検討した。

PtIGS は、Indoxyl の他に UDP-glucose を基質として用いる。植物細胞内で、多様な反応の基質となる UDP-glucose は、Sucrose synthase (SUS) あるいは UDP-glucose pyrophosphorylase の働きで合成される (Leszek et al., 2010)。SUS はその名称とは反対に、Sucrose を分解し、UDP-glucose と fructose を生成する活性を持つ。例えば、SUS はセルロース合成酵素と相互作用し、細胞壁合成に必要とされる UDP-glucose を供給する (Persia et al., 2008)。SUS の UDP-glucose 合成活性は cytosol の pH である中性から弱塩基性で高い (Su and Preiss, 1978; Baroja-Fernández et al., 2012)。一方、逆反応の Sucrose 合成活性は酸性側 pH で高いため、cytosol に局在する SUS の反応は UDP-glucose 合成に傾くと考えられる。

タデアイの Transcriptome 解析では、19 の SUS 遺伝子と 54 の UGPase 遺伝子が検出された (Inoue et al., 2020)。第 2 章でも述べた *PtIGS* の相互作用解析では、1 種類の SUS が *PtIGS* との非常に強い結合を示している。さらに、この SUS の mRNA 発現量は第 1 葉から第 2 葉で急激な減少を示し、Indican 生合成に関わる可能性が高いと予想された。そこで、この SUS を *P. tinctorium* Sucrose synthase (*PtSUS*) と名付け、cDNA クローニングを行った。また、*PtIGS* との関係を生化学的に分析し、Indican 生合成に関わる可能性を検討した。

方法

3-1. 植物材料

タデアイ *Polygonum tinctorium* は 24 °C に保ったチャンバー内で蛍光灯下 (16 h-light, 8 h-dark) で生育させた。実験には 3-weeks-old の植物を用いた。

3-2. RACE 法による cDNA クローニング

基本的に方法 1-7, 1-8 に従い、RACE-PCR によって *PtFMO* と *PtSUS* の cDNA をクローニングした。RACE-PCR で増幅した遺伝子は In-Fusion cloning により pRACE vector に挿入した。

大腸菌内発現のために、*PtFMO* 遺伝子の ORF 領域を pRACE-*PtFMO* をテンプレートに用いて、PCR で増幅した。その断片を、pET19b vector の *Nde* I site に In-Fusion cloning した。*PtSUS* は pGEX4T-3 vector の *Eco*RI site にサブクローニングした。クローニングで用いた Primer は表 10 に示した。

3-3. 抗体作製

guinea pig anti-*PtFMO* antibody

大腸菌 pET19b-*PtFMO*/BL21star(DE3) を 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ampicillin を含む LB 培地で培養した。OD₆₀₀ が 0.6 に到達したタイミングで、IPTG を終濃度 0.5 mM になるように加え、28 °C で 20 時間培養した。集菌後、1.4 g の菌体を 14 mL の PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM NaH₂PO₄, and 2 mM K₂HPO₄ (pH 7.4)) で懸濁した。懸濁液に 0.1 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$ Lysozyme, 1 \times Protease inhibitor cocktail (EDTA-free; Nakarai tesque), 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Pepstatin A (Peptide institute, Inc., Osaka, Japan) を加えた後、超音波破碎した。破碎液は 10,000 $\times g$ で 20 分間、4 °C で遠心した後、沈殿を元の体積と同量の Wash buffer (1 % (v/v) Triton X-100, 1 mM EDTA, 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Pepstatin A を含む PBS) で再懸濁した。懸濁液は 1 時間、氷上でインキュベートした後、再度遠心した。この洗浄の操作を 3 回繰り返した後、沈殿を 1 mL の SDS-PAGE sample buffer (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerol, 0.001 % (w/v) Bromophenol blue, 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol) で溶解し、95 °C で 5 分間処理した。His-*PtFMO* は preparative SDS-PAGE 装置 (Model 491 Prep Cell; Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA) により単離した。精製 His-*PtFMO* をモルモットに免疫し、Polyclonal anti-*PtFMO* 抗体を作製した (Cosmo Bio Co. Ltd. へ受託)。抗体は硫酸分画と Protein A カラムクロマトグラフィーにより精製した。

rabbit anti-*PtSUS* antibody

PtSUS の N 末端 600 アミノ酸を大腸菌内で組換え発現させ、精製したものを *PtSUS* 抗原とした。発現系を構築するために、pET19b-*PtSUS* をテンプレートに、*PtSUS* 遺伝子の 1-1800 nucleotide 領域を PCR で増幅した。PCR primer は表 10 に示した。増幅断片を pET19b vector の *Nde* I site に

In-Fusion cloning により挿入し、pET19b-*PtSUS* (1-1800) を構築した。この発現ベクターで大腸菌 BL21star(DE3) を形質転換した。

続いて、大腸菌 pET19b-*PtSUS* (1-1800)/BL21star(DE3) を $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ampicillin を含む LB 培地で OD_{600} が 0.6 に達するまで培養した。続いて、IPTG を終濃度 0.1 mM になるように加え、室温で一晩、発現誘導した。集菌後、PBS で洗浄してから、菌体重量の 10 倍量の $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Lysozyme と 1 mM PMSF を含む TBSE buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) で懸濁した。超音波破碎を行った後、 $10,000 \times g$ で 20 分間遠心し、沈殿 (不溶性分画) を回収した。次に、沈殿を元と同じ体積の Wash buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 0.5 M Urea, 2 % (v/v) Triton X-100, 1 mM EDTA) に懸濁し、氷上で 30 分間インキュベートした。続いて、 $10,000 \times g$ で 20 分間遠心し沈殿を回収した。Wash buffer に懸濁し、再度遠心する洗浄操作を 2 回繰り返し行い、沈殿物 (封入体) を得た。封入体は Buffer (10 mM Tris-HCl (pH6.8), 4 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerol) に溶解した。サンプル中の不溶性物質を取り除くため、 $20,000 \times g$ で 10 分間遠心し、上清を回収した。終濃度 2 % (v/v) になるように β -Mercaptoethanol と、少量の Bromophenol blue を加え、 95°C で 5 分間処理した。可溶化した封入体 (総タンパク質 34.8 mg) から His-*PtSUS* (1-600 aa) を preparative SDS-PAGE system (Model 491 Prep Cell) により単離した。精製 His-*PtSUS* (1-600 aa) をウサギに免疫し、polyclonal 抗体を作製した (Cosmo Bio Co. Ltd. へ受託)。抗体は硫酸分画と Protein G column chromatography で精製した。

rat anti-*PtIGS* antibody

方法 1-11. に従って精製した His-*PtIGS* をラットに免疫し、polyclonal 抗体を作製した (Cosmo Bio Co. Ltd. へ受託)。抗体は硫酸分画と Protein G column chromatography で精製した。

3-4. 組換え *PtFMO* の発現による大腸菌内での Indigo 生産

pET19b-*PtFMO* を用いて大腸菌 pGro7/BL21(DE3) を形質転換した。pGro7 は Takara bio から購入した。大腸菌は $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ampicillin と $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Chloramphenicol を含む LB 培地で前培養した。続いて、培養液を 0.2 % (v/v) Glycerol を含む発現用培地 ($2.38 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2HPO_4 , $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 , $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4Cl , $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 2 mM MgSO_4 , 0.1 mM CaCl_2 , 1 μM Nicotinic acid, 1 μM Riboflavin, 0.8 mM Tryptophan, 0.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Arabinose, $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ampicillin, $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Chloramphenicol) に植え継ぎ、 28°C で OD_{600} が 0.5 に達するまで培養した。続いて、IPTG を終濃度 0.1 mM になるように加え、 25°C で培養を続けた。適当な時間でサンプリングし、集菌した。沈殿は Indigo 定量に用いるまで -20°C で保存した。

3-5. Indigo 定量

標品 Indigo (FUJIFILM Wako chemical corporation, Osaka, Japan) は Dimethyl sulfoxide (DMSO) に終濃度 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ で溶解した。適当に DMSO で希釈したサンプルの 620 nm の吸光度

をプレートリーダーで測定し、標準曲線を作成した。大腸菌内で生産された Indigo を定量するために、大腸菌の沈殿に DMSO を加え、Indigo を抽出した。不溶性物質は遠心で取り除き、その上清を測定に用いた。

3-6. 組換え *PtFMO* による *in vitro* での Indigo 生成

pET19b-*PtFMO*/pGro7/BL21(DE3) を 0.4 % (w/v) Glucose を含む発現用培地で培養した。OD₆₀₀ が約 0.5 に到達したタイミングで、終濃度 0.1 mM になるように IPTG を加え、24 °C で 20 時間、発現誘導を続けた。集菌後、0.8 g の大腸菌から、方法 3-3. と同様に抽出液を調整した。20,000 ×g で 20 分間、4 °C で遠心し、沈殿 (膜分画) を 10 % (v/v) Glycerol を含む PBS で懸濁した。Indigo 生成反応では、0.5 mL の反応液 (50 mM Hepes-KOH (pH 7.8), 1 mM NADPH, 0-1.0 mM Indole, 71.5 µg protein 相当の membrane fraction) を調整し、30 °C で 2 時間、ゆっくりと攪拌しながらインキュベートした。反応は 10 % (w/v) SDS を 50 µL 加えることで停止させた。溶液は 20,000 ×g で 30 分間遠心し、沈殿した Indigo を方法 3-5. に従って定量した。

3-7. *PtFMO* と *PtIGS* の共発現系の構築と大腸菌内での Indican 合成

pET19b-*PtIGS* vector (Inoue et al., 2018) の His-*PtIGS* コード領域における、開始コドンの-16 nucleotide 配列から終止コドンまでを PCR で増幅した。用いた Primer は表 10 に示した。増幅断片は pET19b-*PtFMO* の *Bam*HI site に In-Fusion cloning により挿入した。続いて、pGro7/BL21(DE3) を pET19b-*PtFMO-PtIGS* で形質転換した。大腸菌の培養と組換えタンパク質の発現は方法 3-4. に従って行った。

3-8. 大腸菌内で合成された Indican の抽出と定量

Indican の分析は基本的に Minami et al., (2000) の方法に従った。0.1 mL の大腸菌培養液を遠心し、沈殿に 0.5 mL の Solvent 1 (Methanol : Chloroform : Water = 12 : 5 : 3 (v/v)) を加えた。Vortex により攪拌後、20,000 ×g で 5 分間遠心し、上清を回収した。次に、0.35 mL の Chloroform と 0.5 mL の脱イオン水を加えた。再度遠心後、水層を回収し、Indican 定量に用いた。Indican は方法 1-4. に従って定量した。

大腸菌内で合成された Indican は組換え β-glucosidase (Indican 分解酵素) で処理した。組換え β-glucosidase は pET19b-G で形質転換した大腸菌 BL21(DE3) を用いて、Minami et al., (1996) の方法に従って発現と精製を行った。1.23 µg の組換え β-glucosidase を 40 µL のサンプル (11.2 pmol の Indican を含む) に加え、37 °C で 20 分間インキュベートした。続いて、サンプル中の Indican を上記の方法に従って抽出後、定量した。

3-9. qPCR 解析

基本的に方法 1-15. 1-16. に従い、3-weeks-old のタデアイの組織（第 1 葉, 第 2 葉, 茎, 根）から Total RNA を精製し、qPCR 解析を行った。qPCR では 10 ng cDNA、0.3 μ M Forward primer と Reverse primer、PowerUp SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を含む全量 10 μ L の反応液を調整した。qPCR では StepOne Real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific) を用いた。第 1 葉に対する mRNA の相対発現量は $\Delta\Delta$ Ct 法により求めた。この際、*Actin* 遺伝子をリファレンスとして用いた。qPCR に用いたプライマーは表 10 に記載した。

3-10. SDS-PAGE/Immunoblotting

基本的に方法 1-14. に従って行った。12.5 % polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE 後、タンパク質を PVDF 膜 (FluoroTrans W Membrane; PALL Corporation) に転写した。一次抗体として、guinea pig polyclonal anti-*Pt*FMO IgG (1:25,000), rabbit polyclonal anti-*Pt*SUS IgG (1:10,000), rabbit polyclonal anti-*Pt*IGS IgG (1:5,000), rat polyclonal anti-*Pt*IGS IgG (1:5,000), mouse monoclonal anti-His-tag antibody (clone OGHis) (1:10,000) (Medical & Biological Laboratories Co., LTD.) あるいは mouse anti-Actin antibody (clone 10-B3) (1:20,000) (Sigma Aldrich) を用いた。二次抗体は HRP-conjugated anti-guinea pig IgG antibody (1:50,000) (Proteintech Group Inc.), HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody (1:50,000) (Abcam, Cambridge, UK), HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1:50,000) (Proteintech Group Inc.) あるいは HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody (1:50,000) (Bio-Rad laboratories Inc.) を用いた。Marker は図 30 を除いて、ExcelBand 3-color Regular Range Protein Marker (PM2500) を使用した。

3-11. 植物組織からのタンパク質の抽出

3-weeks-old のタデアイの組織（第 1 葉, 第 2 葉, 茎, 根）に、1/100 Protease inhibitor cocktail (for plant cell extracts; Sigma Aldrich) を含む SDS-PAGE sample buffer を加え、乳鉢と乳棒でホモジナイズした。抽出液は 20,000 \times g で 20 分間、室温で遠心し、その上清 (2 μ L) を Immunoblotting に用いた。

3-12. 組換え GST-*Pt*SUS の発現と精製

pGEX4T-3-*Pt*SUS を Template に、表 10 で示した Primer を用いて、*Pt*SUS コード領域を PCR で増幅した。In-Fusion cloning により増幅断片を pGEX4T-3 の *Eco* RI site に挿入し、pGEX4T-3-*Pt*SUS を構築した。このベクターで大腸菌 BL21star(DE3) を形質転換した。

大腸菌は 50 μ g.mL⁻¹ Ampicillin を含む LB 培地で前培養したものを、M9 培地 (0.4 % (w/v) Glucose, 2.38 g.L⁻¹ Na₂HPO₄, 3 g.L⁻¹ KH₂PO₄, 1 g.L⁻¹ NH₄Cl, 0.5 g.L⁻¹ NaCl, 2 mM MgSO₄, 50 μ g.mL⁻¹ Ampicillin) に植え継ぎ、OD₆₀₀ が約 0.6 になるまで培養した。続いて、IPTG を終濃度 0.1 mM にな

るように加え、2~4 時間発現誘導した。誘導後、集菌した大腸菌を PBS で洗浄し、タンパク質の精製に用いた。

菌体を 1 mM PMSF, 0.2 mg.ml⁻¹ Lysozyme, 1 mM EDTA を含む PBS に懸濁した。懸濁液は氷上で 30 分間インキュベート後、超音波破碎を行った。48,000 xg で 30 分間遠心し、得られた上清を 1 mM EDTA を含む PBS で平衡化した Glutathione sepharose 4B (Cytiva) column (1.0 × 2.2 cm) に吸着させた。カラムを 10 倍容量の 1 mM EDTA を含む PBS で洗浄した後、10 mM Reduced glutathione, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) で GST-*PtSUS* を溶出した。溶出液は 1 mM EDTA を含む PBS に対して透析した後、実験に用いた。

3-13. 組換え His-*PtSUS* の発現と精製

大腸菌 pET19b-*PtSUS*/BL21star(DE3) を 50 µg.mL⁻¹ Ampicillin を含む LB 培地で OD₆₀₀ が約 0.6 になるまで培養した。続いて、IPTG を終濃度 0.1 mM になるように加え、室温で 2 時間発現誘導した。集菌した大腸菌を PBS で洗浄し、タンパク質の精製に用いた。

大腸菌 (4.8 g) を 20 倍量の 1 mM PMSF, 0.1 mg.ml⁻¹ Lysozyme, 0.5 % (v/v) Triton X-100 を含む Talon buffer (50 mM Sodium phosphate (pH 7.0), 300 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerol) に懸濁した。懸濁液は氷上で 30 分間インキュベート後、超音波破碎した。20,000 xg で 20 分間、4 °C で遠心し得られた上清を、0.5 % (v/v) Triton X-100 を含む Talon buffer で平衡化した Talon metal affinity resin column (1.0 × 2.2 cm) に吸着させた。10 mM Imidazole を含む 10 倍容量の Talon buffer で洗浄した後、10-150 mM Imidazole の直線濃度勾配により His-*PtSUS* を溶出した。His-*PtSUS* は 10 % (v/v) Glycerol を含む PBS に対して透析した後、実験に用いた。

3-14. 組換え His-*PtIGS* の精製

方法 1-10. に従って精製を行った。His-*PtIGS* は 10 % (v/v) Glycerol を含む PBS に対して透析した後、実験に用いた。

3-15. GST-*PtSUS* を用いた pulldown assay

0.5 mL の 0.5 µM GST-*PtSUS* [Binding buffer (1 mM EDTA, 0.1 % (v/v) Triton X-100 を含む PBS) で希釈した] と 25 µL の Glutathione sepharose 4B を混合し、4 °C でゆっくりと攪拌した。2 時間以上インキュベートした後、遠心し、上清を取り除いた。次に、0.5 mL の His-*PtIGS* (0.5 µM に Binding buffer で希釈した) を加え、4 時間以上インキュベートした。樹脂を 0.5 mL の Binding buffer で 4 回洗浄した後、50 µL の 2× SDS-PAGE sample buffer (125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerol, 0.002 % (w/v) Bromophenol blue, 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol) を加えた。樹脂を含む溶液を、そのまま 95 °C で 5 分間ヒートした後、SDS-PAGE に用いた。コントロール実験として同じ濃度の GST を GST-*PtSUS* の代わりに用いた。

3-16. *PtSUS* の共免疫沈降

全ての操作は 4 °C あるいは氷上で進めた。葉に 3 倍量の Buffer A (50 mM Potassium phosphate (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 % (v/v) Glycerol, 1× Protease inhibitor cocktail (EDTA-free; Nakarai tesque), 2 µg.ml⁻¹ Pepstatin A, 0.1 % (w/v) BSA, 0.05 % (v/v) Triton X-100) を加え、乳鉢と乳棒を用いて氷上ですり潰した。ホモジネートは Miracloth でろ過した後、20,000 ×g で 20 分間遠心した。上清は Buffer B (10 mM Potassium phosphate (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 5 % (v/v) Glycerol) に対して透析後、100,000 ×g で 20 分間超遠心を行った。上清を Crude extract とし、Protease inhibitor cocktail (EDTA-free; Nakarai tesque, 終濃度 1×), Pepstatin A (終濃度 2 µg.ml⁻¹) を再度加えた。次に、5 µL の Protein G Mag sepharose (Cytiva) に、10 µg の rabbit anti-*PtSUS* IgG を Dimethyl pimelimidate (Sigma-Aldrich) を用いて製品のクロスリンクプロトコルに従って結合させた。樹脂は Wash buffer (10 mM K-phosphate (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 5 % (v/v) Glycerol, 1× Protease inhibitor cocktail (EDTA-free; Nakarai tesque), 2 µg.ml⁻¹ Pepstatin A, 0.05 % (v/v) Triton X-100) で平衡化した後、1 mL の Crude extract を加え、一晩ゆっくりと攪拌した。続いて、樹脂を 0.5 ml の Wash buffer で 3 回洗浄した後、50 µL の Elution buffer (0.1 M Glycine-HCl (pH 2.9), 2 M Urea) を加え、室温で 2 分間インキュベート後、結合したタンパク質を溶出した。溶出液には 1 µL の 1 M Trizma base と 17 µL の 4× SDS-PAGE sample buffer (250 mM Tris-HCl (pH 6.8), 8 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) Glycerol, 0.004 % (w/v) Bromophenol blue, 20 % (v/v) β-Mercaptoethanol) を加えた。

3-17. *PtSUS* と *PtIGS* の共役反応による Indican 合成

方法 1-2. を改良し、実験を行った。グローブボックスに窒素ガスを充満させた無酸素条件下で 80 µM His-*PtSUS* と 20 µM His-*PtIGS* を基質溶液 (200 mM Sucrose, 2 mM UDP, 2 mM Indoxyl, 1 mM DTT を含む 50 mM HEPES-KOH (pH 7.2)) と混合し、全量を 100 µL とした。30 °C で 30 分間反応させた後、TCA 溶液を加えて停止した。続いて、サンプルを中和した後、方法 1-4. に従って Indican 定量を行った。

3-18. *PtSUS* の *in vitro* クロスリンク実験

無酸素条件下で以下の実験を行った。方法 2-2. に従って粗抽出液を調整した。0.87 g の葉に 4.35 mL の Isotonic buffer を加え、乳鉢と乳棒ですり潰した。Miracloth でろ過したホモジネートを 10,000 ×g で 20 分間、4 °C で遠心し、その上清をサンプルとした。続いて、*in vitro* クロスリンクを方法 2-5. に基づいて行った。96 µL のサンプルに、4 µL のクロスリンカー溶液 (DMSO で溶解した 2.5-100 mM Disuccinimidyl suberate (DSS) (Thermo Fisher Scientific) あるいは Ethylene glycol bis(succinimidyl succinate) (EGS) (ProteoChem, UT, USA)) を加え、室温で 30 分間インキュベート

した。続いて、5 μ L の 1 M Tris-HCl (pH 7.4) を加え、室温で 15 分間インキュベートし、反応を停止させた。最後に、35 μ L の 4 \times SDS-PAGE sample buffer を加えた。

3-19. タンパク質濃度の定量

SDS で溶解した封入体と、抗体濃度の定量には Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた。その他のサンプルの定量には Bradford Ultra (Expedion Ltd.) を用いた。

表 10. 本章の実験に用いた Primer

Cloning of PtFMO	Primer sequence (5' to 3')
Universal Primer A Mix	Component in SMARTer RACE 5'/3' Kit
pRACE-PtFMO5'	GATTACGCCAAGCTTGGAAAGCAAATGCTCAGCCGTCACAGG
Subcloning of PtFMO into pET19b	
pET19b-PtFMO-Fw	ACGACGACAAGCATATGGAGAGGAAGGTTGGGA
pET19b-PtFMO-Rv	GGATCCTCGAGCATACTAGCCAATATAGTCTAATGG
Co-expression of PtFMO and PtlGS	
pET19b-RBS-Fw	GTATGCTCGAGGATCAAGAAGGAGATATACCATGG
pET19b-HisPtlGS-Rv	GTTAGCAGCCGGATCTTAAACCTTGCTTTCCCAAAT
Cloning of PtSUS	
Universal Primer A Mix	Component in SMARTer RACE 5'/3' Kit
PtSUS_race5	GCTGGAAACAAGGACACCGTGGGGCAAAGCTTGGCGTAATC
PtSUS_race3	GATTACGCCAAGCTTGTCTCGCTTGACCCATGTTCCAGCC
Subcloning of PtSUS into pGEX4T-3	
pGEX-PtSUS_fw	GTGGATCCCCGAATTCATGGCGTCAACCGCTC
PtSUS_rv2	CGTCGTCATTCTTCCCCTCATGGGTATTTTGCT
PtSUS_fw2	CATGGGTATTTTGCTCAAGA
pGEX-PtSUS_rv	CCGTTGGCCATTGAGTGAAATCCCGGGTTCGAC
Subcloning of PtSUS into pET19b	
His-PtSUS_fw	ACGACGACAAGCATATGGCGTCAACCGCTCGCT
His-PtSUS_rv	CCGTTGGCCATTGAGTGATATGCTCGAGGATCC
Expression of PtSUS (1-600aa)	
His-PtSUS_fw	ACGACGACGACAAGCATATGGCGTCAACCGCTCGC
pET19b-PtSUS(600aa)_rv	GGATCCTCGAGCATAACGGAGGCGCTTGTCTT
qPCR	
PtFMO-qF	GAAACCGCAAACCTGGAACAAG
PtFMO-qR	TGCATGATCTTCGGTAGTGCTT
PtSUS-qF	CAGGAAGCGATCGTTCTTCAG
PtSUS-qR	CCTTGGTGTTACCTTGATGTACT
PtlGS-qF	AGACGGTGTGATGTGAGTTTGC
PtlGS-qR	CGTCGTTCTTCCTATCCTGAA
PtActin-qF	CACTGTCCCCATTTACGAAGGT
PtActin-qR	AGCAAGGTCCAGACGAAGGA

結果

PtFMO のアミノ酸配列

PtFMO の全長 cDNA を 5'-RACE 法によりクローニングしたところ、516 残基のアミノ酸をコードする 1,548 bp の ORF が得られた (DDBJ accession No. LC585869)。cDNA 配列から、*PtFMO* は約 58.7 kDa、等電点 8.52 をコードすると推測された。*PtFMO* のアミノ酸配列には FAD-binding domain (GAGISG; 9-14 amino acids)、FMO-identifying motif (EDGKVIHSKDY; 178-188 amino acids)、NADPH-binding domain (GFQKSA; 209-214 amino acids) が見られた (図 20)。

PtFMO の Indigo 生成能

PtFMO が Indole から Indoxyl を生成し (図 21 (A))、最終的に Indigo が生成するかを確かめた。*PtFMO* 発現ベクター-pET19b-*PtFMO* と、シャペロン発現ベクター-pGro7 で形質転換した大腸菌を Tryptophan 含有培地で培養した。組換え *PtFMO* の発現誘導に伴い、培養液が青色に変化し、Indigo の生成が認められた (図 21 (B))。培養時間が長くなるにつれて、培養液中の Indigo 量は増加した。発現誘導から 24 時間経過後には、培養液の Indigo 濃度は約 30 mg.L⁻¹ に達した (図 21 (C))。一方、コントロールとして大腸菌 pET19b/pGro7/BL21(DE3) を培養したが、Indigo の生成は見られなかった (図 21 (b))。

大腸菌内で発現させた組換え *PtFMO* は不溶性分画 (膜分画) に検出されたので (図 21 (D))、膜分画を用いて *PtFMO* の Indigo 合成活性を測定した。結果、Indole 濃度が 0.25 mM のとき、*PtFMO* は最大活性 (35 µg.mg.protein⁻¹.h⁻¹) を示した (図 21 (E))。NADPH 非存在下では、活性は検出されなかった。

	FAD binding		
<i>Pt</i> FMO	-----M ERK V G I G A G I S G L A C K H A L S K G F H P V V L E A Q P D I G G V W A N-----	43	
FMO1	-----M A S N Y D K L T S S R V A I I G A G V S G L A A A K N L V H H -----N P T V F E A S D S V G G V W R S C -----	50	
YUCCA1	M E S H P H N K T D Q T Q H I L V H G P I I I G A G P S G L A T S A C L S S R G V P S L I L E R S D S I A S L I K S K-----	60	
FMO_GS-OX1	-----M A P T Q N T I C S K H V A V I G A G A A G L V T A R E L R R E G H T V V V F D R E K Q V G L I N Y S-----	52	
<i>Pt</i> FMO	-----A L E T T R L Q T P K D F Y Q F S D F P W P S S V Q D-----M H P T G E Q-----	77	
FMO1	-----T Y E T T K L Q S A R V D Y E F S D F P W N R R D T -----T F P P Y L E-----	85	
YUCCA1	-----T Y D R L R L H L P K H F C R L P L D F F E Y P K-----Y P S K N E -----	93	
FMO_GS-OX1	S K A D S D P L S L D T T R T I V H T S I Y E S L R T N L P R E C M G F T D F F V P R I H D I S R S S R R Y P S H R E-----	112	
<i>Pt</i> FMO	V M E I I R S Y A D H F G L L K H V R F N T K V L S I S F E G T S D Q E M E A W S H W N G T G E G F A N K G K W I L L L -----	137	
FMO1	I L D Y L E S Y A K H F D L L K F M K F G S K V I E V R F I G -----D G E T P Q M V D L G A G N L L P G K P V E V A V -----	143	
YUCCA1	F L A Y L E S Y A S H F R I A P -----R F N K N V Q N A A Y S -----S S G F I R V K T-----	131	
FMO_GS-OX1	V L A Y L Q D F A R E F K I E M V R F E T V V C V E P V N-----G K I S V S R S -----	150	
	FMO identifying		
<i>Pt</i> FMO	Q D V P T Q S Q V M E F N F V I L G I G K F S D R M R M P E F P A G E G P E V D G -----K V I H S K D Y S E K S Y G D A-----	196	
FMO1	Q I G D S G D I Q W H A F E F V V V C T G K Y G D V P R I P A F P A K K G P E M F G G -----K V M H S M D Y C K L E K E E A-----	202	
YUCCA1	H D N-----T E Y L S K W L I V A T G E N A D-----P Y F E I P G R K K F S G K I V H A S E Y K S G E E -----	179	
FMO_GS-OX1	K N S -----V G F A A H E I F D A V V C S G H F E -----P N V A H I P G I K S W P G -----K Q I H S H N Y R V P G P-----	201	
	NADPH binding		
<i>Pt</i> FMO	R R L V K G K R V V V V G F Q K S A I D I A N E C S S A N G K E -----V P C N L I Y R T P P W N-----I P D F F I W G L P L P -----	253	
FMO1	S T L L S G K V A V I G F K K S A I D I A L E S A L A N Q G E G K A C T M V V R T H W G -----I P H Y V W W G L P F F -----	261	
YUCCA1	-----F R R Q K V L V G C G N S G M E I S L D L V R H N A S P -----H L V V R N T V H V -----L P R E I L G-----	225	
FMO_GS-OX1	-----F N N E V V V V I G N Y A S G A D I S R D I A K V A K E V H I A S R A S E S D I Y Q K L P V P Q N N L V H S E I -----	258	
<i>Pt</i> FMO	Y L Y F N R F S E L L H K P G E G L F L S L A T I L S P L R W L I A K F V E S N I K Y R H L K K Y G L V P E H G F-----	313	
FMO1	L F Y S S R A S Q F L H D R P N Q S F L R T L F C L L F S L L R A V S K F I E S Y V L W K L P L E K Y G L K P N H S F-----	321	
YUCCA1	V S T F G V G M T L L K L P -----L R L V D K F L L M A N L S F G N T D R L G L R R P K T G P L L K N V T G K -----	280	
FMO_GS-OX1	D F A H Q D G S I L F K N G K-----V V Y A D T I V H C T G Y K Y F F E T N G Y I N I N E N R V E P L Y K H F-----	314	
	Function unknown		
<i>Pt</i> FMO	G E A I S S O V L S V L P K G F Y N L E K G S I L L N K A E K R F C K E G I V E G K P K P L E A D V I F A T G F -----	373	
FMO1	E E D Y A S C Q M A I I P E N F F E A D K G M I R F K K S S K W W Y E E G I V F E D G -----T T L E A D V I L A T G Y -----	380	
YUCCA1	S P V L D V G A M S L I R S G M I Q I M E G V K E I T K K G A K F M D G Q E -----K D F D S I I F A T G Y -----	330	
FMO_GS-OX1	L P L A P S L S F I G L P G M A I Q F V M F E I Q S K W A A V L S G R V I L P S Q D K-----M M E D I I E W Y A T-----	370	
<i>Pt</i> FMO	E A D E K L R D I F A S P K F O G H I M G S P H S I L P L Y R Q C H P Q I P Q L A I I G Y S E F A N L Y T S E M R C -----	433	
FMO1	D G K K L K A I V E P E P -----R -----T W L E F P S G V M P L Y R G T I H P L I P N M G F V G Y V G S S S N L H T S E L R S-----	438	
YUCCA1	K S N-----V P T W L Q G D F F T D D G M P K T P F P N G W R G G L Y T V G F T R-----	371	
FMO_GS-OX1	-----L D V L G I P K R H T K L G -----K I S C E Y L N W I A E E C H C S P V E N-----	406	
<i>Pt</i> FMO	R W I V E L D G T F K L P G F K E M E K E T A N W N K F I K G N A P K H Y R R S C I G Q L H I W Y N D Q L C K D M G W-----	493	
FMO1	M W L S R L V D E K F R L P S K E K M L D Q F L K E M E V T R-----N S S R F Y K R H C I S T F S I Q H A D D M C N D M G L -----	497	
YUCCA1	R G L L G T A S D A V K I A G-----E I G D Q W R D E I K G S T -----R N M C S S R F V F T S K S -----	414	
FMO_GS-OX1	W R T Q E V E R G F Q R M V S H P E I Y R D E W D D D L M E E A Y K D F A R K L I S S H P S Y F L E S-----	459	
<i>Pt</i> FMO	N P R R K K G F I S E W F Q P H G L D Y -----I G -----	516	
FMO1	N P W R K S N F L L E A F S P Y G S O D Y R L G Q E E K D M T A -----	530	

図 20. *Pt*FMO のアミノ酸配列

*Pt*FMO には FAD-binding domain (GAGISG; 9-14 amino acids), FMO-identifying motif (EDGKVIHISKDY; 178-188 amino acids), NADPH-binding domain (GFQKSA; 209-214 amino acids) が確認される。*Pt*FMO のアミノ酸配列をシロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* の FMO1 (AT1G19250), YUCCA1 (AT4G32540), FMO GS-OX1 (AT1G65860) と比較した。

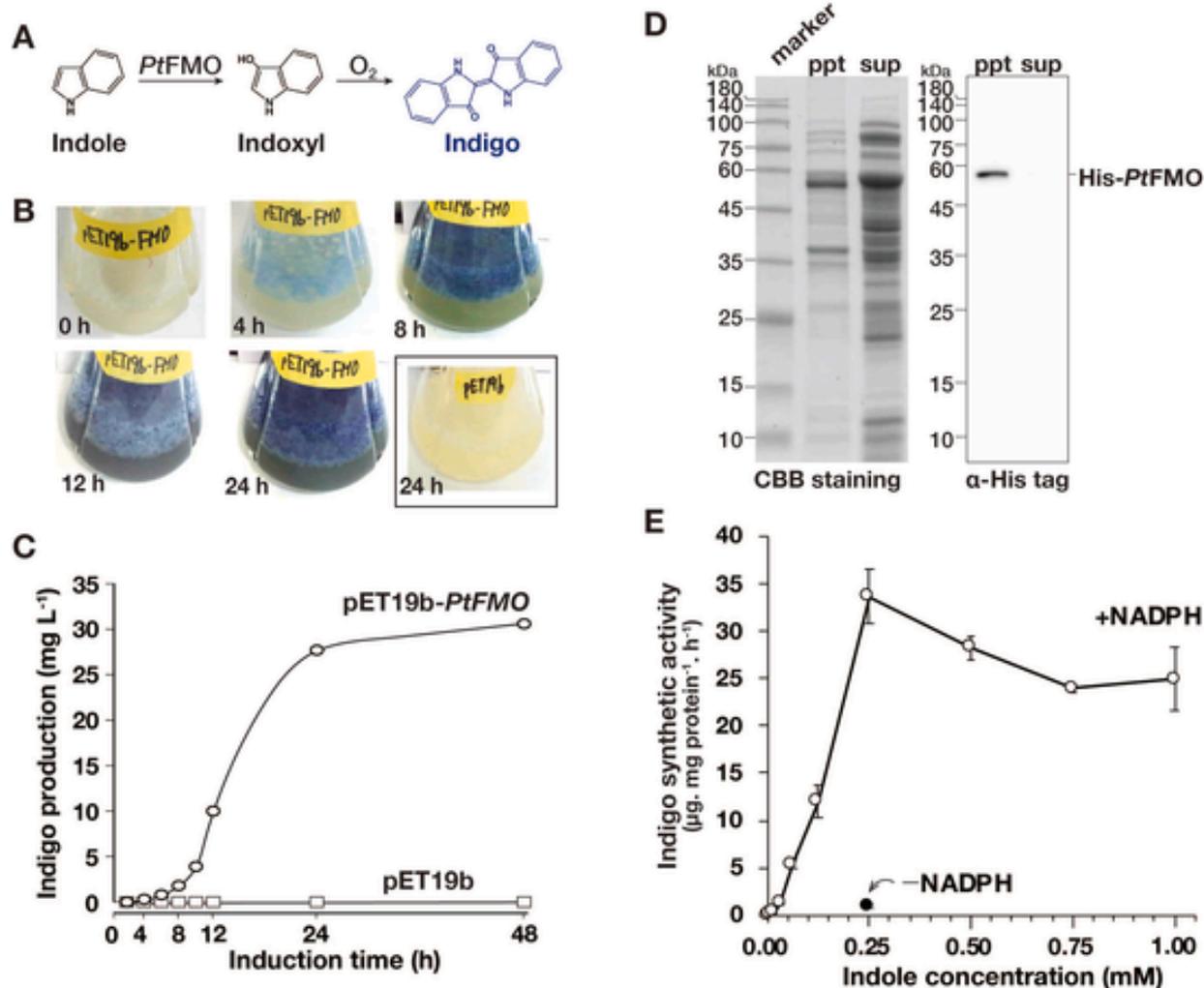


図 21. 組換え *PtFMO* の大腸菌内発現と Indigo 生成

大腸菌 *pET19b-PtFMO/pGro7/BL21(DE3)*, あるいは *pET19b/pGro7/BL21(DE3)* を Indigo 生成に用いた。(A) *PtFMO* による Indigo の反応機構 (B) *PtFMO* 発現誘導後の Indigo の産生。 *pET19b/pGro7/BL21(DE3)* を 24 時間培養したネガティブコントロール実験を四角で囲った。(C) 時間経過に伴う Indigo の生成量。(D) 組換え *PtFMO* を発現させた大腸菌の可溶性分画と膜分画の SDS-PAGE (CBB 染色) と His-tag 抗体を用いた Immunoblotting。発現誘導から 20 時間経過後にサンプリングを行った。SDS-PAGE では TGX Any kD gel (Bio-Rad laboratories Inc.) を用い、細胞 300 μg 相当 (CBB 染色), あるいは 15 μg 相当 (Immunoblotting) のサンプルをアプライした。(E) *pET19b-PtFMO/pGro7/BL21(DE3)* の膜分画を用いた *PtFMO* の Indigo 生成活性の測定。3 回の平均値と標準誤差で示した。

大腸菌内で合成された Indigo、および *in vitro* で合成された Indigo の吸光スペクトルと C₁₈ カラムを用いた HPLC 溶出パターンを分析したところ、標品 Indigo のパターンとの一致が確認できた (図 22 (A, B))。

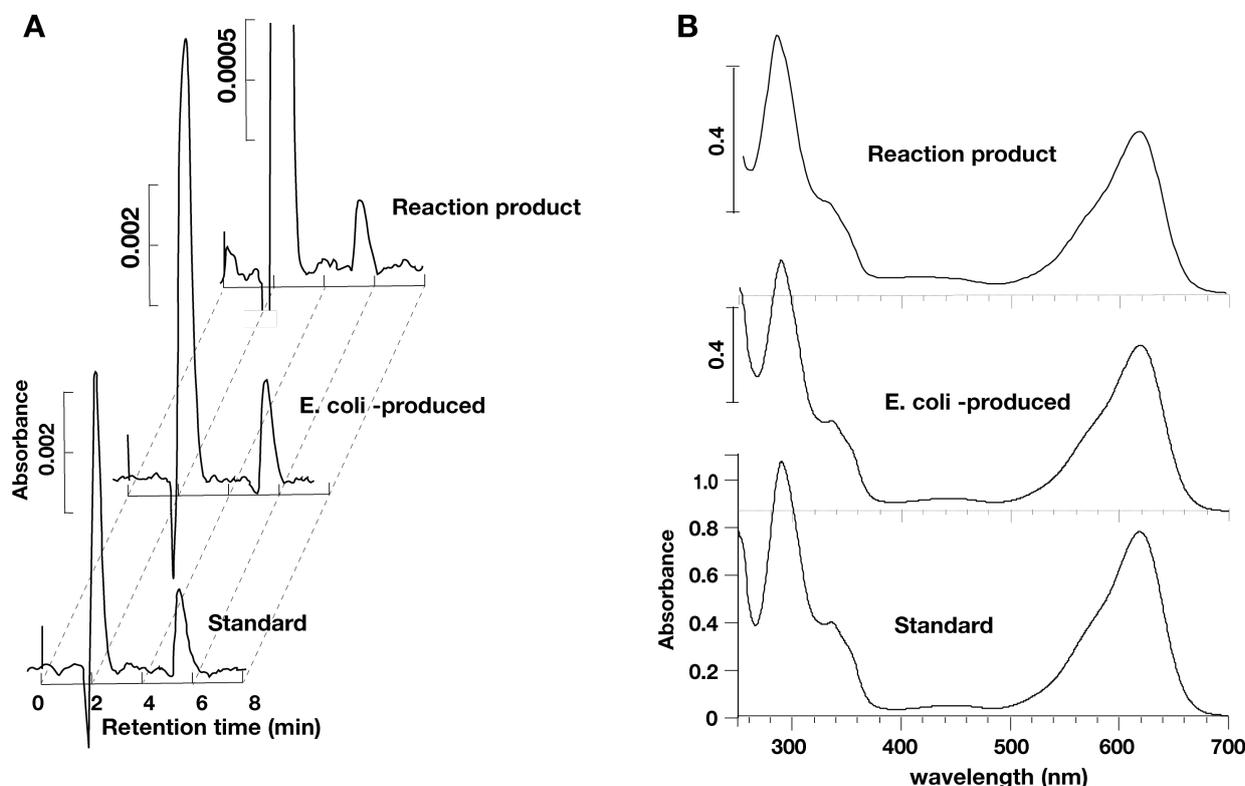


図 22. 大腸菌内および *in vitro* 合成した Indigo の HPLC での溶出パターンと吸光スペクトル
DMSO で溶解したサンプルを測定に用いた。(A) 波長 620 nm における HPLC での溶出パターン。 *in vitro* での反応産物 (0.21 μg Indigo), 大腸菌由来のサンプル (0.29 μg Indigo), 標品 Indican (0.24 μg Indigo) を分析した。(B) Indigo の吸光スペクトル。 *in vitro* での反応産物 (4.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Indigo), 大腸菌由来のサンプル (8.4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Indigo), 標品 Indigo (10.28 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) を分析した。

大腸菌内での Indican 合成

大腸菌内で *PtFMO* と *PtIGS* の共発現が可能なベクター *pET19b-PtFMO-PtIGS* を構築した (図 19 (A))。IPTG の添加により、このベクターで形質転換した大腸菌が *PtFMO* と *PtIGS* を共発現することを Immunoblotting により確認した (図 23 (C))。そこで、共発現による Indican 合成 (図 23 (B)) を確かめた。*PtFMO* 単独で発現させた場合とは異なり (図 21 (B))、共発現系では培養液は青くならなかった (図 23 (E))。培養液中の Indican を C₁₈ カラムで分離し、蛍光検出したところ、*PtFMO* と *PtIGS* を共発現させた場合のみ、Indican のピークが見られた (図 23 (D))。このピークは β -glucosidase (Indican 分解酵素) の添加により消失した。

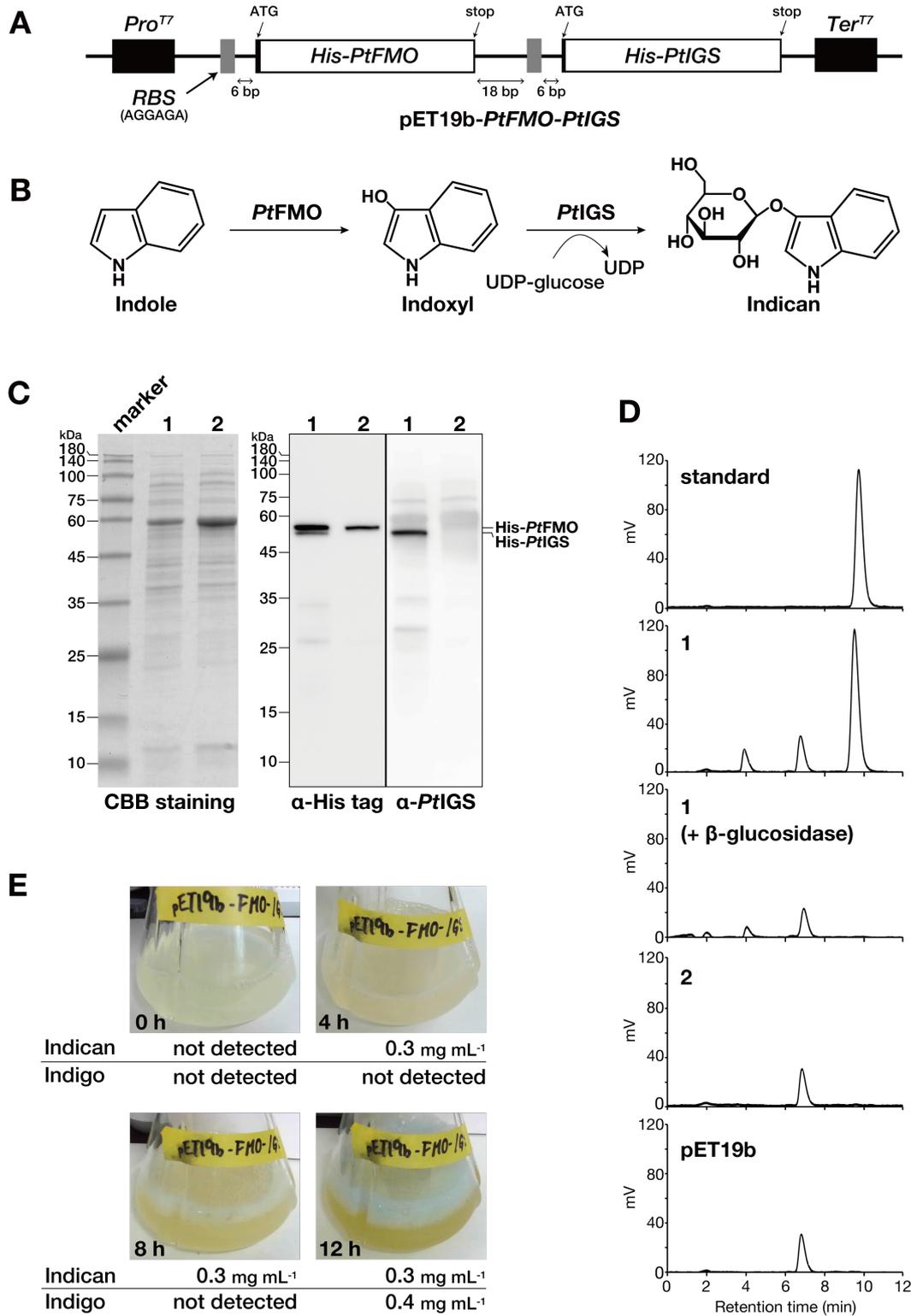


図 23. 大腸菌内での Indican 合成

(A) 組換え *PtFMO* と *PtIGS* の大腸菌内での共発現系. (B) *PtFMO* と *PtIGS* による Indican 合成系. (C) 大腸菌内での *PtFMO* と *PtIGS* の共発現. 発現誘導を 4 時間行った後, 1 mL の培養液 ($OD_{600}=0.45$ 相当) を遠心し, 沈殿を 0.1 mL の SDS-PAGE sample buffer で懸濁した. 5 μ L のサンプルを SDS-PAGE gel (TGX Any kD gel) にアプライした. Lane 1 は pET19b-*PtFMO-PtIGS*/BL21(DE3), Lane 2 は pET19b-*PtFMO*/BL21(DE3)を示す. (D) 大腸菌内で合成された Indican の HPLC における溶出パターン. 1, 2 はそれぞれ (C) のレーンのサンプルと同じ. pET19b は空ベクターのみを発現させた場合のサンプルを示す. Standard は Commercial Indican を示す. (E) 大腸菌 pET19b-*PtFMO-PtIGS*/BL21(DE3)の誘導時間の経過による培地の色, および Indican と Indigo の生成量の変化.

PtFMO の組織特異的な発現パターン

タデアイの各組織 (第 1 葉, 第 2 葉, 茎, 根) における PtFMO の発現量を Immunoblotting と qPCR により分析した。図 24 (A) で示すように、PtFMO mRNA は第 2 葉と比較した時、第 1 葉で約 3 倍の発現が見られた。PtFMO mRNA は茎や根からほとんど検出されなかった。同様に、PtFMO タンパク質も第 1 葉で最も多く発現していることが Immunoblotting により確認できた (図 24 (B))。さらに、葉以外の組織からは検出されなかった。これらの結果は、PtIGS タンパク質と mRNA の発現パターン (図 24 (A, B) と一致していた。

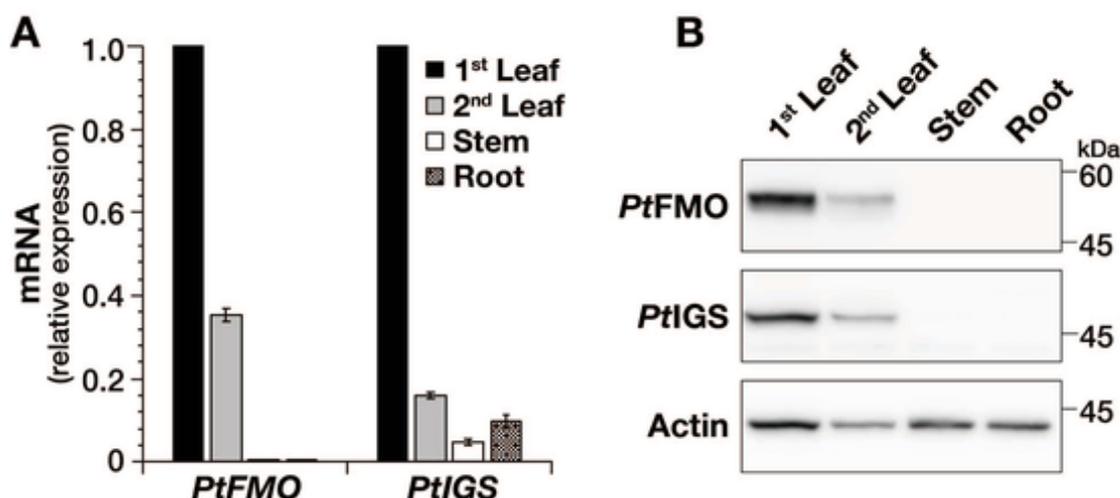


図 24. PtFMO の組織別の発現パターン

(A) 各組織における PtFMO と PtIGS の mRNA 発現量を qPCR により分析した。データは 4 回の平均値と標準誤差で示した。(B) 組織別のタンパク質の発現を PtFMO 抗体, PtIGS 抗体および Actin 抗体を用いた Immunoblotting により分析した。

PtSUS の cDNA クローニングと組換えタンパク質の精製

第 2 章で記述したように、PtIGS の相互作用解析では 1 種類の SUS が強い相互作用を示した。その SUS を *P. tinctorium* Sucrose synthase (PtSUS) と名付け、cDNA クローニングを行った。クローニングした PtSUS cDNA には、806 アミノ酸をコードする 2,421 bp の ORF が含まれていた (図 25)。

抗体作製のために、PtSUS の N 末端 600 アミノ酸 (PtSUS (1-600aa)) を組換え発現させたところ、そのほとんどが不溶性分画に確認された (図 26)。そのため、封入体から精製した組換え PtSUS (1-600aa) を PtSUS 抗体作製の抗原として用いた。

一方で、*in vitro* で各種実験に用いる His-PtSUS, GST-PtSUS を可溶性分画に発現させ、アフィニティカラムクロマトグラフィーにより組換え PtSUS (His-PtSUS と GST-PtSUS) を精製した (図 27)。

1	MASTARLTHVPSLRERLDELTAHRNEFLAFLSKLEGHGKGMLOHHEVIAEFESMADKEK	60
61	HLLGDAFAEVLIRSTQEAIVLQPWVALAVRPRPGVWEYIKVNTKAITVDELTAEEFLRMK	120
121	EELVDGPSNGNFVLELDFEPFNASFPKPTLSKSI GNGVEFLNRHLSAKMFHDKESMRPLL	180
181	EFLKDHYKGMTMLNDKIQSLNTLQAVLRKAEFLSTLPPDTLYAEFEQKFQELGLERG	240
241	WGDNAERVSQMIQLLLLLELPDSCCTLEKFLGRIPMVFNVVILSPHGYFAQDNVLGYPDT	300
301	GGQVVYILDQVRALENEMLLRIKHQGLDIVPRILIVTRLLPDAVGTTCCQRLEQVDGTEH	360
361	SHIIRVPFRSEKGI VRKWI SRFEVWPYLETYTEDVATEITAELOTKPDLIVGNYSDGNIV	420
421	ASLLAHKLGVTQCTIAHALEKTKYPNSDIYWKNFEEKYHFSCQFTADLIAMNHTDFIITS	480
481	TFQEIAGNKDTVGOYESHMAFTLPGLYRVVHGIDVFDPKFNI VSPGADMSIYFPYTEEKK	540
541	RLQSFHPEIEELLFSEVENEHICVLKDKKPIIFSMARLDRVKNMTGLVEWFGKNKRLR	600
601	ELVNLVVVAGDRRKESKDI EEKAEMKKMYELIETYNLNGQFRWISAQMNVRVNGELYRYI	600
661	ADTRGAFVQPAFYEAFLTVVESMTGCLPTFATCHGGPAEIVDVGKSGFHI DPYHGDKAA	720
721	ELLVNFFDECKADPSHWEAISKGLKRIEEKYTQIYSDRLLTL SGVYGFWKYVSKLDRW	780
781	EARRYLEMFYALKYSKLAQSVPLAIE	806

図 25. *PtSUS* の一次構造

黄色の 9 から 554 番目アミノ酸は Sucrose synthase domain (Pfam: PF00862) を、青色の 571 から 729 番目アミノ酸は Glycosyl transferase domain (Pfam: PF13692) を示す。

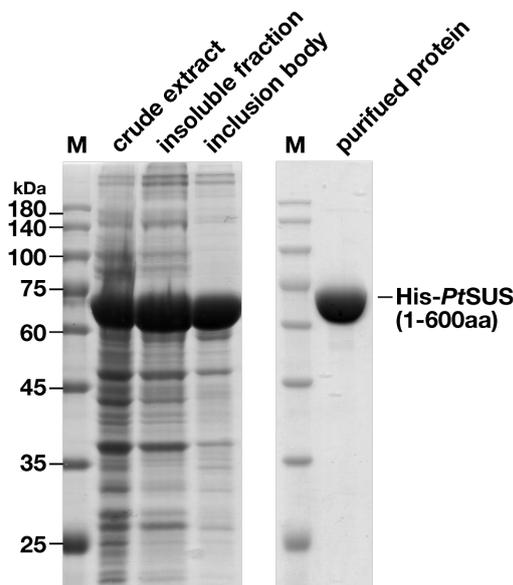


図 26. *PtSUS* 抗体の抗原
大腸菌内で発現させた組換え *PtSUS* (1-600 aa) を prepcell (preparative SDS-PAGE system) で精製した。10 % polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE を行い、CBB 染色で純度を確認した。各 lane に 5 μ g のタンパク質をアプライした。

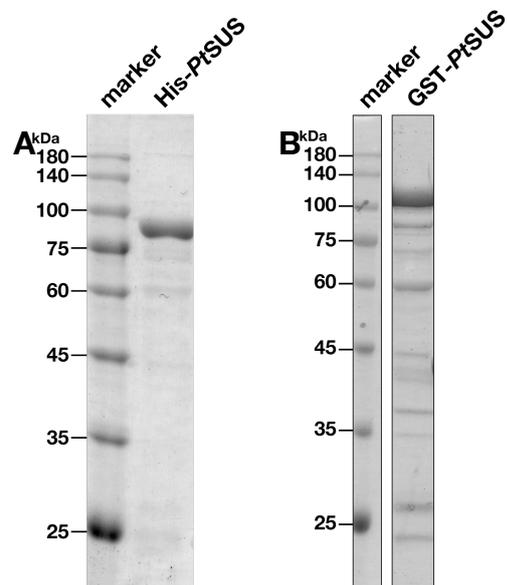


図 27. 可溶性分画からの組換え *PtSUS* の精製
pET19b-*PtSUS*, pGEX4T-3-*PtSUS* で形質転換した大腸菌 BL21star(DE3) の可溶性分画から、His-*PtSUS* (A) と GST-*PtSUS* (B) をそれぞれ精製した。10 % polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE を行い、CBB 染色で純度を確認した。His-*PtSUS* は 1.1 μ g を、GST-*PtSUS* は 2 μ g をアプライした。

PtSUS と *PtIGS* の相互作用

組換え *PtSUS* を用いて *PtIGS* との相互作用を再確認した。図 28 (A) で示すように、GST-*PtSUS* を用いて His-*PtIGS* の pulldown assay を行ったところ、Immunoblotting (anti-*PtIGS*) により *PtIGS* が検出された。一方、GST を用いた場合でも、*PtIGS* はわずかに検出された。

両者の結合をさらに確認するために、*PtSUS* 抗体を用いて葉の抽出液から *PtSUS* を免疫沈降した。免疫沈降産物には、Immunoblotting (anti-*PtSUS*) により *PtSUS* のバンドが確認できた

(図 28 (B))。さらに、*PtIGS* も Immunoblotting (anti-*PtIGS*) により検出された。

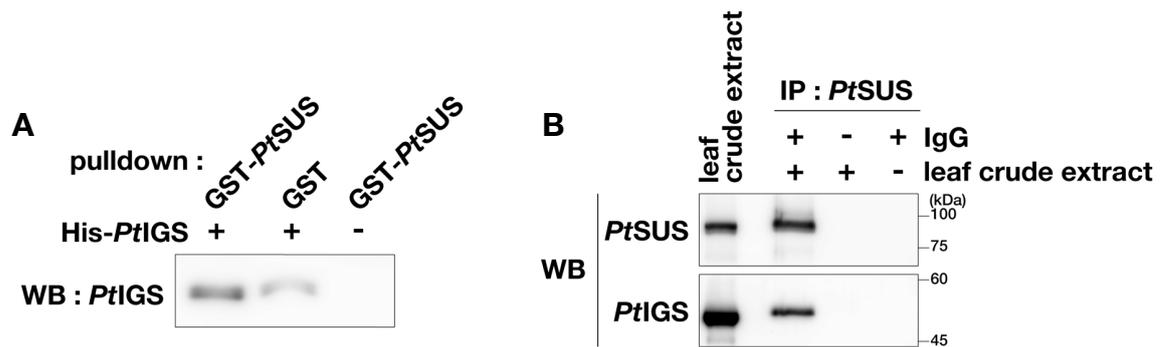


図 28. *PtSUS* と *PtIGS* の相互作用

(A) GST-*PtSUS* あるいは GST を結合させた Glutathione Sepharose 4B を用いて His-*PtIGS* の pull-down assay を行った。SDS で溶出したサンプルを 10 % polyacrylamide gel にアプライし、Immunoblotting (rabbit anti-*PtIGS* 抗体を使用) で *PtIGS* を検出した。SDS-PAGE には 10 % polyacrylamide gel を用いた。(B) *PtSUS* 抗体を用いて、葉の抽出液から *PtSUS* と *PtIGS* を共免疫沈降した。酸性 buffer で溶出したサンプルを 10 % polyacrylamide gel で分離し、Immunoblotting で *PtSUS* と *PtIGS* を検出した。*PtIGS* の検出には rat anti-*PtIGS* 抗体を用いた。SDS-PAGE には、粗抽出液 1 μ L (0.5 % input) と免疫沈降産物 14 μ L をアプライした。

PtSUS と *PtIGS* の共役による *in vitro* での Indican 合成

PtSUS が合成した UDP-glucose が *PtIGS* の Indican 合成の基質として使われるかを確認めた (図 29 (A))。基質溶液 (UDP, Sucrose, Indoxyl を含む) に組換え *PtSUS* と *PtIGS* の両方を混合し、酵素反応を行った。反応溶液を C_{18} カラムで分析したところ、Indican と同じ保持時間でピークを確認した (図 29 (B))。さらに、このピークは Indican 分解酵素 (β -glucosidase) の処理により消失した。*PtIGS* あるいは *PtSUS* 単独を基質溶液に混合した場合には、Indican は生成されなかった。

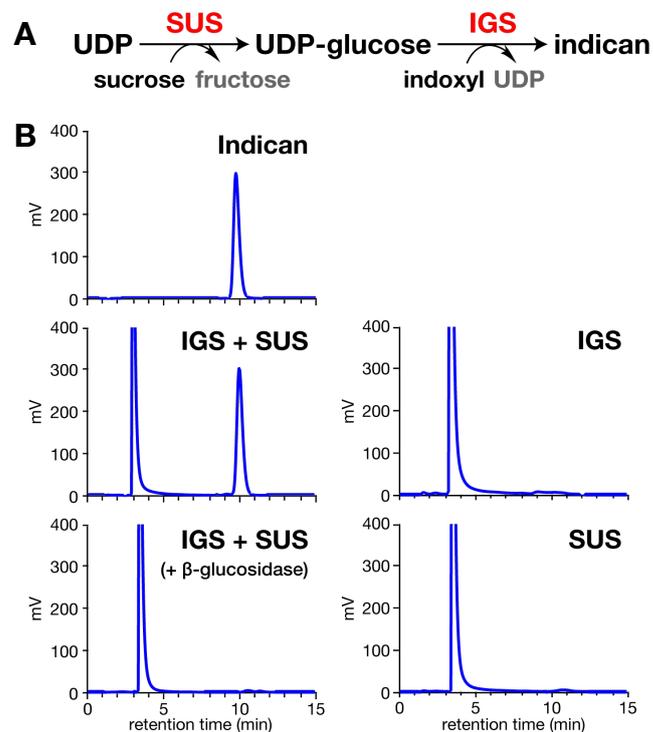


図 29. *PtSUS* と *PtIGS* の共役による Indican 合成

(A) *PtSUS*-*PtIGS* 共役反応による Indican 合成系。組換え His-*PtSUS* と His-*PtIGS* を基質溶液 (UDP, Sucrose, Indoxyl を含む) に混合し反応させた。(B) 酵素反応で生成した Indican の検出。標品 Indican (500 pmol), サンプル (10 μ L) を C_{18} カラムクロマトグラフィーで分離し、蛍光検出した。

PtSUS のクロスリンク実験

葉の粗抽出液の *in vitro* クロスリンクを行い、PtSUS の挙動を Immunoblotting で分析した。DSS クロスリンカーを用いた場合、0.1 mM から 4.0 mM のいずれの濃度においても、約 90 kDa の PtSUS monomer に加えて、約 180 kDa の Dimer と、数本の Multimer あるいは何らかの複合体のバンドが検出された (図 30)。また、EGS クロスリンカーを用いた場合には、0.1 mM から 1.0 mM の範囲で Dimer と数本の Multimer あるいは何らかの複合体のバンドが検出された。さらに EGS 濃度を 2 mM, 4 mM に上げると、複合体のバンドの比率が高くなった。Dimer はいずれも単一バンドで検出されるのに対して、複合体は数本のバンドで検出された。

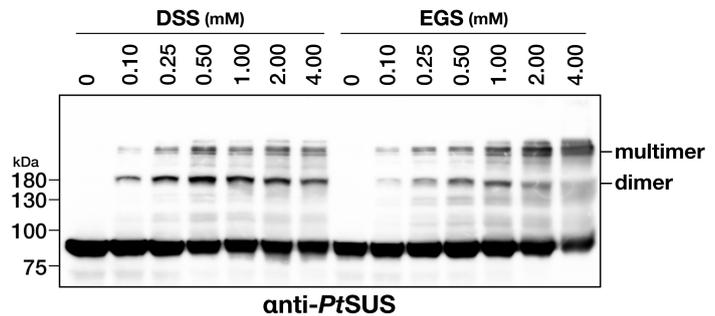


図 30. PtSUS の *in vitro* クロスリンク

葉の粗抽出液に含まれるタンパク質を DSS あるいは EGS で架橋し、PtSUS 抗体で Immunoblotting を行った。15 μ L のサンプルを 10 % polyacrylamide gel にアプライした。Marker には BlueStar Prestained Protein Marker (Nippon genetics, Tokyo, Japan) を用いた。

PtSUS の組織別の発現パターン

タデアイの各組織 (第 1 葉, 第 2 葉, 茎, 根) における PtSUS の発現量を Immunoblotting と qPCR により分析した。図 31 (A) に示すように、PtSUS タンパク質は新芽 (第 1 葉) で多量に発現しており、成熟した葉 (第 2 葉) では減少が見られた (図 31 (A))。PtIGS は葉以外の組織では発現しないが、PtSUS は茎や根などの Indican が存在しない組織でも発現が見られた。qPCR 解析の結果、PtSUS mRNA の発現レベルは PtSUS タンパク質と同様の傾向を示した (図 31 (B))。PtSUS mRNA は第 1 葉から第 2 葉にかけて発現量が 1/10 程度に減少し、その減少は PtIGS mRNA と同程度であった。

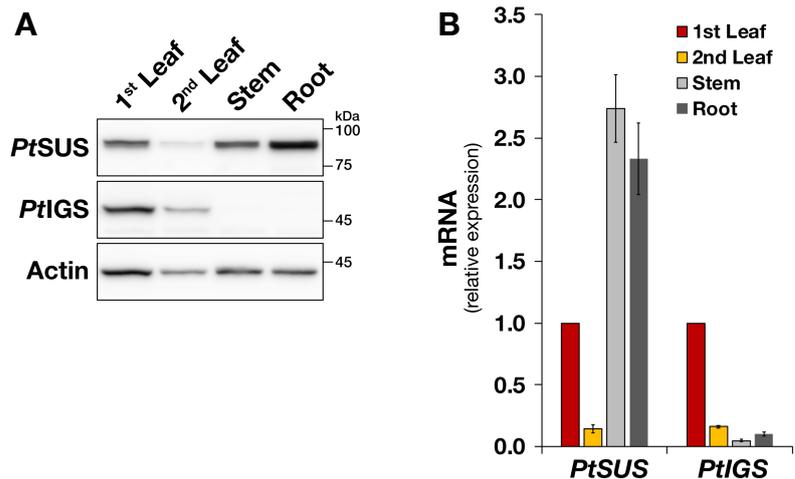


図 31. PtSUS の組織別の発現パターン

(A) 組織別のタンパク質の発現を PtSUS 抗体、PtIGS 抗体および Actin 抗体を用い、Immunoblotting により分析した。(B) 各組織における PtSUS と PtIGS の mRNA 発現量を qPCR により分析した。値は第 1 葉を 1 とした時の相対量で示した。データは 4 回の平均値と標準誤差。Actin と PtIGS は図 24 と同じデータを示した。

考察

Indican 生合成経路では Indoxyl を生成する Indole monooxygenase の存在が予想されてきた。様々な monooxygenase のうち、1 種類の FMO (*Pt*FMO) が *Pt*IGS の相互作用解析で検出されていたため、本研究では、この cDNA を Transcriptome 解析で得られた配列情報を元にクローニングした。

*Pt*FMO のアミノ酸配列は保存性の高い NADPH-binding domain, FAD-binding domain, FMO-identifying domain, FATGY 配列などが含まれていた。さらに、この配列はヨーロッパブドウ *Vitis vinifera* の FMO1 (XP_002278617) と 64 % の相同性を示した。一方、Indigo 生成能が報告されているバクテリアの *Methylophaga sp.* の FMO (AF494423) (Choi et al., 2003) との相同性は 17 % であった。

Schlaich は植物の FMO が 3 つの clade (clade I, II, III) に分類できることを報告している (Schlaich, 2007)。図 32 に、*Pt*FMO とシロイヌナズナ *A. thaliana* およびポプラ *Populus trichocarpa* の FMO を比較した系統樹を示した。*Pt*FMO は clade I に分類され、clade II (S-oxygenating clade) や clade III (YUCCA clade) との関係は遠いと考えられた。clade I の FMO1 (AT1G19250)、clade II の FMO GS-OX1 (AT1G65860)、clade III の YUCCA1 (AT4G32540) と *Pt*FMO の相同性はそれぞれ約 39 %、15 %、19 % であった。

clade I に分類される FMO はほとんどが機能未知であるが、そのうち、*A. thaliana* FMO1 は pipecolic acid

を *N*-hydroxypipecolic acid に転換する *N*-hydroxylation 反応を触媒すると報告されている (Hartmann et al., 2018)。*A. thaliana* において、FMO1 の発現は微生物の感染により誘導され、その活性は植物がもつ免疫反応である systemic acquired resistance を引き起こすために必要と考えられている (Mishina et al., 2006; Koch et al., 2006; Bartsch et al., 2006)。他に、clade I のシダ植物 *Fern* 由来の FOS1 は植物の外敵からの防御に関与する Cyanoglucoside 生合成反応で働くことが報告されている (Thodberg et al., 2020)。このように、clade I の FMO は植物の防御機構に貢献する可能性がある

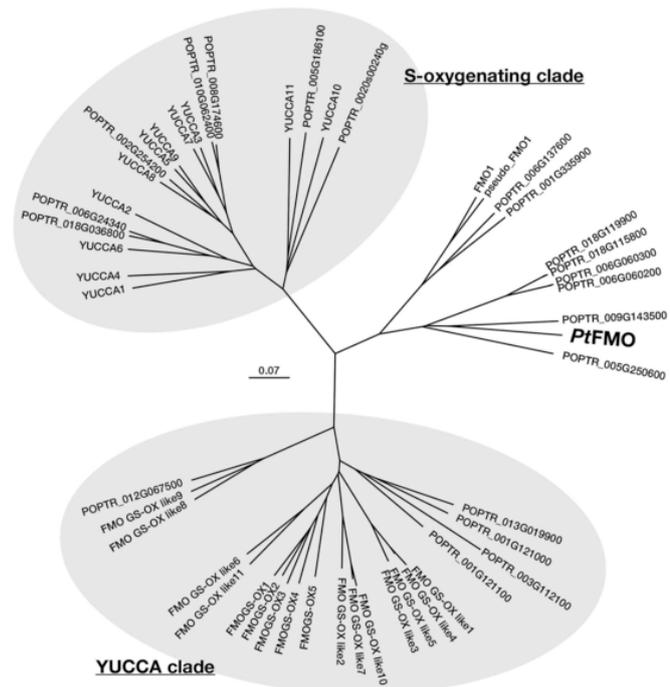


図 32. 植物の FMO の系統樹

シロイヌナズナ *A. thaliana* とポプラ *P. trichocarpa* の FMO を *Pt*FMO と比較した。UniprotKB で “*A. thaliana* FMO” と “*P. trichocarpa* FMO” を検索し、アミノ酸配列を取得した。それらの配列を ClustalW でアライメントし、Neighbor-joining 法で系統樹を作製した。

る。同様に、タデアイが生産する Indican も忌避物質としての役割が示唆されている (Minami et al., 1997; 2000, Inoue et al., 2018)。

PtFMO の一次構造には膜貫通領域やシグナル配列は見られなかった。また、TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) においても、特定のオルガネラでの局在は予想されない。

本研究では、大腸菌内でシャペロン GroEL, GroES と共発現させた *PtFMO* を、Indigo 生成能の評価のために用いた。大腸菌は Tryptophanase を持つため、Tryptophan を Indole へ代謝することが可能である。本研究ではこのシステムを利用し、*PtFMO* の発現により Indigo が生成されることを確認した。さらに、組換え *PtFMO* を用いて、*in vitro* で *PtFMO* が Indole monooxygenase 活性を示すことを明らかにした。

さらに、*PtFMO* が生成した Indoxyl が Indican 合成に利用されるかを確かめるために、組換え *PtFMO* と組換え *PtIGS* の共発現を構築し、大腸菌で発現させた結果、Indican の生成に成功した。*PtFMO* のみ発現させた場合とは異なり、培養液中に Indigo はほとんど生じなかった。このことから、*PtFMO* が生成した Indoxyl を *PtIGS* が酸化される前に受け取ることができたと考えられる。過剰発現系とはいえ、大腸菌細胞内で両タンパクがかなり物理的に近い距離で存在すると予想され、両者の本来の性質を示しているかもしれない。

植物体において、Indican は葉にのみ存在し、他の組織には存在しない。また、*PtIGS* タンパク質と mRNA は特に新芽に多く発現する。今回得られた *PtFMO* タンパク質と mRNA の発現も同様の傾向を示した。そのため、タデアイの Indican 生合成経路には *PtFMO* が関与している可能性が高いと考えられる。

また、*PtIGS* との相互作用が検出された *PtSUS* の機能解析も進めた。SUS は植物における主要な UDP-glucose 合成酵素として知られているため (Leszek et al., 2010)、Indican 生合成経路と関わりを予想した。クローニングにより得られた cDNA から推定される *PtSUS* の一次構造にはシグナル配列や膜貫通領域は見られなかった。そのため、*PtIGS* と同様、*PtSUS* も可溶性の cytosol タンパク質であると考えられた。

組換え *PtSUS* を用いて pull-down assay を行うと、*PtIGS* との弱い相互作用が検出された。一方、葉の抽出液から *PtSUS* を免疫沈降すると、比較的強く *PtIGS* が結合した。第 2 章で示した *PtIGS* の相互作用解析では、他にも様々なタンパク質が検出されていた。そのため、*PtSUS* と *PtIGS* の相互作用には、その他のタンパク質の作用も必要なのかもしれない。このことから、相互作用が複雑に調節されている可能性が示唆された。

PtSUS のクロスリンク実験では Tetramer と Dimer が主に検出され、Tetramer に相当する周辺では、複数のバンドが検出された (図 30)。SUS は多量体の状態で高い UDP-glucose 合成活性を持

つと報告されている (Su and Preiss, 1978)。また、その多量体の形成は Sucrose 濃度に影響を受ける (Duncan and Huber, 2007)。PtSUS のサイズの変化は他のタンパク質との相互作用を反映しているのかもしれない。

PtSUS と PtIGS のカップリング反応を中性の pH で調べた。一般的に、SUS の UDP-glucose 生成活性は中性から弱塩基性の pH で高いと報告されている (Su and Preiss, 1978; Baroja-Fernández et al., 2012)。また、PtIGS の至適 pH は 10.0 であるが、中性付近でも Indican 合成活性を持つ (Minami et al., 2000; Inoue et al., 2018)。したがって、cytosol の中性付近の pH で両者が会合することに無理はないと思われる。Sucrose は植物細胞内で 20 mM から 100 mM 程度の高濃度で存在すると言われており (Gerhard et al. 1987, Winter et al. 1994)、*A.thaliana* の SUS (SUS1, SUS3, SUS4, SUS6) では、Sucrose に対して 30 ~ 100 mM 程度の K_m 値をもつ (Bieniawska et al., 2007)。光合成産物である Sucrose は 1 日の中で細胞内の濃度が大きく変動していると思われる。そのため、PtSUS が生成した UDP-glucose が Indican 生合成に要求されるのであれば、Indican の生合成と細胞内の Sucrose 濃度にも何らかの関係があるかもしれない。

植物体において PtSUS タンパク質と mRNA は第 1 葉で多く発現し、第 2 葉では急激な減少を示していた。しかし、Indican 含量や PtIGS、PtFMO とは異なって、PtSUS は茎や根でも発現が見られた。可能性の一つとして、他の植物で SUS が Cellulose 合成にも関わりが報告されているように (Persia et al., 2008)、PtSUS は茎や根では Indican 生合成以外の働きをしているのかもしれない。

本章における研究により、Indican 生合成における基質供給酵素 PtFMO と PtSUS を同定した。今後、細胞内で PtIGS とどのようなメカニズムで相互作用するのか、また、数多く存在するアイソザイムと比較してどの程度有意に働いているのかを調べる必要がある。さらに、この 3 つのタンパク質を中心とする Indican 生合成に働くメタボロンが形成されているのかについても興味を持たれる。

参考文献

- A. Singh, N. Singh Chauhan, H.V. Thulasiram, V. Taneja, R. Sharma, 2010. Identification of two flavin monooxygenases from an effluent treatment plant sludge metagenomic library, *Bioresour. Technol.* 101, 8481–8484.
- Baroja-Fernández E, Muñoz FJ, Li J, Bahaji A, Almagro G, Montero M, Etxeberria E, Hidalgo M, Sesma MT, Pozueta-Romero J., 2012. Sucrose synthase activity in the *sus1/sus2/sus3/sus4* Arabidopsis mutant is sufficient to support normal cellulose and starch production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(1):321-6.
- Chapple, C., 1998. Molecular genetics analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Mol. Biol.* 49, 311–343.
- Gerhard, R., Stitt, M. and Heldt, H.W. 1987 Subcellular metabolite levels in spinach leaves: regulation of sucrose synthesis during diurnal alterations in photosynthetic partitioning. *Plant Physiol.* 83: 399–403.
- H. Warzecha, A. Frank, M. Peer, E.M.J. Gillam, F.P. Guengerich, M. Unger, 2007. Formation of the indigo precursor indican in genetically engineered tobacco plants and cell cultures, *Plant Biotechnol. J.* 5, 185–191.
- H.-J.Kim,S.Jang,J.Kim,Y.-H.Yang,Y.-G.Kim,B.-G.Kim,K.-Y.Choi, 2017. Biosynthesis of indigo in Escherichia coli expressing self-sufficient CYP102A from Streptomyces cattleya, *Dyes Pigments* 140, 29–35.
- H.S. Choi, J.K. Kim, E.H. Cho, Y.C. Kim, J.I. Kim, S.W. Kim, 2003. A novel flavin-containing monooxygenase from Methylophaga sp. Strain SK1 and its indigo synthesis in Escherichia coli, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306, 930–936.
- Inoue, S., Morita, R., Kuwata, K., Ishii, K., & Minami, Y., 2020. Detection of candidate proteins in the indican biosynthetic pathway of Persicaria tinctoria (Polygonum tinctorium) using protein-protein interactions and transcriptome analyses. *Phytochemistry*, 179, 112507.
- Inoue, S., Morita, R., Kuwata, K., Kunieda, T., Ueda, H., Hara-Nishimura, I., Minami, Y., 2018. Tissue-specific and intracellular localization of indican synthase from Polygonum tinctorium. *Plant Physiol. Biochem.* 132, 138–144.
- J.R. Cashman, J. Zhang, 2006. Human flavin-containing monooxygenases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46, 65–100.
- Jong-Ching Su and Jack Preiss, 1978. Purification and Properties of Sucrose Synthase from Maize Kernels., *Plant Physiol.*, 61,389-393
- Kateri A. Duncan and Steven C. Huber, 2007. Sucrose Synthase Oligomerization and F-actin Association are Regulated by Sucrose Concentration and Phosphorylation. *Plant Cell Physiol.* 48(11): 1612–1623
- Leszek A. Kleczkowski, Sabine Kunz & Malgorzata Wilczynska (2010) Mechanisms of UDP-Glucose Synthesis in Plants, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29:4, 191-203.
- M. Bartsch, E. Gobbato, P. Bednarek, S. Debey, J.L. Schultze, J. Bautor, J.E. Parker, 2006. Salicylic acid-independent ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 signaling in Arabidopsis immunity and cell death is regulated by the monooxygenase FMO1 and the Nudix hydrolase NUDT7, *Plant Cell* 18, 1038–1051.
- M. Koch, S. Vorwerk, C. Masur, G. Sharifi-Sirchi, N. Olivieri, N.L. Schlaich, 2006. A role for a flavin-containing monooxygenase in resistance against microbial pathogens in Arabidopsis, *Plant J.* 47, 629–639.
- M. Hartmann, T. Zeier, F. Bernsdorff, V. Reichel-Deland, D. Kim, M. Hohmann, N. Scholten, S. Schuck, A. Bräutigam, T. Hölzel, C. Ganter, J. Zeier, 2018. Flavin monooxygenase-generated N-Hydroxypipicolinic acid is a critical element of plant systemic immunity, *Cell* 173, 456–469 e16.
- Minami, Y., Kanafuji, T., Miura, K., 1996. Purification and characterization of a β -glucosidase from Polygonum tinctorium, which catalyzes preferentially the hydrolysis of indican. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60, 147–149.
- Minami Y, Takao H, Kanafuji T, Miura K, Kondo M, Hara-Nishimura I, Nishimura M, Matsubara H., 1997. β -Glucosidase in the indigo plant: intracellular localization and tissue specific expression in leaves. *Plant Cell Physiol.* 38(9):1069-74.

- Minami, Y., Nishimura, O., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., Matsubara, H., 2000. Tissue and intracellular localization of indican and the purification and characterization of indican synthase from indigo plants. *Plant Cell Physiol.* 41(2), 218–225.
- N. Lončar, F. Fiorentini, G. Bailleul, S. Savino, E. Romero, A. Mattevi, M.W. Fraaije, 2019. Characterization of a thermostable flavin-containing monooxygenase from *Nitrocola lacisaponensis* (NiFMO), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 1755–1764.
- N.L. Schlaich, 2007. Flavin-containing monooxygenases in plants: looking beyond detox, *Trends Plant Sci.* 12, 412–418.
- Persia D, Cai G, Del Casino C, Faleri C, Willemse MT, Cresti M., 2008. Sucrose synthase is associated with the cell wall of tobacco pollen tubes. *Plant Physiol.* 147(4):1603-18.
- S. Fräbel, B. Wagner, M. Krischke, V. Schmidts, C.M. Thiele, A. Staniek, H. Warzecha, 2018. Engineering of new-to-nature halogenated indigo precursors in plants, *Metab. Eng.* 46, 20–27.
- S. Thodberg, M. Sørensen, M. Bellucci, C. Crocoll, A.K. Bendtsen, D.R. Nelson, M.S. Motawia, B.L. Møller, E.H.J. Neilson, 2020. A flavin-dependent monooxygenase catalyzes the initial step in cyanogenic glycoside synthesis in ferns, *Commun. Biol.* 3, 507.
- S.P.L. Ameria, H.S. Jung, H.S. Kim, S.S. Han, H.S. Kim, J.H. Lee, 2015. Characterization of a flavin-containing monooxygenase from *Corynebacterium glutamicum* and its application to production of indigo and indirubin, *Biotechnol. Lett.* 37, 1637–1644.
- T.E. Mishina, J. Zeier, 2006. The *Arabidopsis* flavin-dependent monooxygenase FMO1 is an essential component of biologically induced systemic acquired resistance, *Plant Physiol.* 141, 1666–1675.

第 4 章

Indican 生合成に関わるタンパク質の細胞内動態

要旨

*Pt*IGS の相互作用解析では、多様なタンパク質との相互作用が検出されたことから、Indican 生合成経路におけるメタボロンの存在も予想された。*Pt*IGS との相互作用が見られたタンパク質を解析した結果、*Pt*IGS に Indoxyl と UDP-glucose をそれぞれ供給することができる *Pt*FMO と *Pt*SUS を同定することができた。Indoxyl は非常に不安定な物質であるため、細胞内で Indican を効率良く生合成するために、各酵素の厳密な連携が必要とされる。そこで、Indican 生合成に関わるタンパク質の細胞内動態に着目した。*Pt*FMO は膜貫通領域を持たないにもかかわらず、非常に強く膜と会合していることが細胞分画により明らかである。そこで、免疫蛍光顕微鏡で関連タンパク質の動向を観察した。*Pt*FMO はタバコの細胞内で ER 由来の小胞上に局在が見られた。その小胞上で、*Pt*FMO が *Pt*IGS や *Pt*SUS と共局在している様子も確認できた。興味深いことに、この小胞は葉緑体にも付着が見られ、*Pt*FMO は Indole を葉緑体との接触部位を介して受け取っている可能性も推測された。さらに、*Pt*FMO と *Pt*IGS をタバコ *Nicotiana benthamiana* の葉に共発現させると Indican が生合成されることから、両者が Indican 生合成に必須の酵素であると考えられた。加えて、タバコ細胞内で *Pt*FMO は ER 局在を示すが、*Pt*IGS の共発現下では ER の他にタバコで見られるような小胞にも局在が見られた。つまり、ER 由来の小胞上で Indican が生合成され、*Pt*FMO は *Pt*IGS や *Pt*SUS を含むメタボロンの Scaffold として機能している可能性が推測された。

緒言

*Pt*IGS の Indican 合成活性には、基質として UDP-glucose と Indoxyl が必要である。前の章で述べたように、*Pt*IGS と相互作用するタンパク質の解析を行い、Indoxyl を生成する *Pt*FMO を特定した (Inoue et al., 2021)。*Pt*FMO は、*Pt*IGS の共免疫沈降と pulldown assay の両方で捉えられたが、この際、microsome で検出された (Inoue et al., 2020)。cDNA から予想される *Pt*FMO の一次構造には、シグナル配列や膜貫通領域は見られないが、組換え *Pt*FMO は大腸菌内で不溶性分画に発現し、尚且つ、その膜分画から *Pt*FMO の Indole monooxygenase 活性は十分検出された (Inoue et al., 2021)。つまり、*Pt*FMO は膜と会合する性質を持つと考えられる。*Pt*IGS は一部が ER に局在するため、これまで ER 膜上には *Pt*IGS と相互作用するタンパク質が存在する可能性が考えられてきた (Inoue et al., 2018)。*Pt*IGS との関係を知るためにも、*Pt*FMO の細胞内局在を明確にすることが必要である。

*Pt*FMO は Indole から Indoxyl を生成する酵素である。Indole は植物において、葉緑体の Tryptophan 合成酵素 α subunit (TSA)、あるいは、cytosol 局在の Indole synthase (INS) により合成される。Jin らはタデアイの INS の機能解析を行い、INS が Indican の生合成に関わる可能性を述べている (Jin et al., 2016)。INS が Indican 生合成に関わるならば、*Pt*IGS と cytosol で相互作用すると考えられた。しかし、*Pt*IGS の相互作用解析では、TSA と INS の相互作用は検出されなかった。一方、もし、TSA が Indican 生合成に関わるのであれば、葉緑体内の Indole を *Pt*FMO はどのように受け取るのだろうか。近年はオルガネラ間相互作用の研究も盛んであり、Tocopherol のような非極性物質が葉緑体膜から ER 膜へオルガネラ間の相互作用部位を介して流動していることも報告されている (Mehrshahi et al., 2013)。Indole も疎水性の高い化合物であるため、葉緑体から他のオルガネラ (例えば ER) への膜接触による移動が可能かもしれない。

Indican の合成には Indoxyl だけでなく、UDP-glucose も基質として必要である。第 3 章では *Pt*SUS が *Pt*IGS と相互作用し、尚且つ *Pt*IGS への UDP-glucose 供給活性を持つことを述べた。しかし、一方の基質である Indoxyl は酸化に対して不安定であり、合成後はすぐに、Indican 合成に利用される必要がある。そのためには、関与するタンパク質同士が細胞内で近接しており、*Pt*IGS が Indoxyl と UDP-glucose を同時に受け取る必要がある。近年、メタボロンと呼ばれる代謝複合体が多くの代謝経路で報告されており、メタボロン形成は代謝の効率を上昇させると言われている (Zhang and Fernie, 2020)。植物では、ER 膜の CYP が拠点となり、メタボロンが形成される例が多く見られる (Zhang and Fernie, 2020; Nakayama et al., 2019; Mucha et al., 2019; Bassard et al., 2012; Ralston and Yu, 2006)。

さらに第 2 章で述べたように、Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) も *Pt*IGS と非常に強い相互作用が検出された。GAPDH は典型的な解糖系の酵素であるが、近年は本来の活性とは異なる多機能性が報告されている。例えば、動物細胞内で、GAPDH は微小管および PKC ι (protein kinase の一種) と相互作用し、出芽小胞上の Rab2GTPase を呼び寄せる働きをする (Tisdale et al., 2009)。結果、GAPDH の周りで形成された PKC ι -Rab2GTPase 複合体が Dynein と結合することか

ら、膜輸送系にも関わると言われている。その他にも、GAPDH は植物細胞内でオートファジーや、免疫応答においても機能も果たす (Henry et al., 2015; Han et al., 2015)。 *P. tinctorium* GAPDH (*Pt*GAPDH) についても解析を行い、*Pt*GAPDH がどのように Indican の生合成に関与するのかを調べることは有意義である。

本章ではこれらのタンパク質の細胞内での動態を、相互作用解析および、細胞分画や共焦点蛍光顕微鏡を用いた共局在解析により調べた。

方法

4-1. 植物材料

タデアイ *Polygonum tinctorium* は 24 °C に保ったチャンバー内で蛍光灯下 (16 h-light, 8 h-dark) で生育させた。実験には 3-weeks-old の植物を用いた。

4-2. RACE 法による cDNA クローニング

基本的に方法 1-7, 1-8 と同様に、*PtGAPDH* と *PtCPR* の cDNA クローニングを行った。PCR primer は表 11 に示した。RACE-PCR で増幅した断片は In-Fusion cloning により pRACE vector に挿入した。構築した pRACE-*PtGAPDH*5' (3') および pRACE-*PtCPR*(5') で、大腸菌 DH5α を形質転換した。

4-3. 抗体作製

rabbit anti-*PtGAPDH* antibody

PtGAPDH の発現系を構築するために、pRACE-*PtGAPDH* を Template として *PtGAPDH* のコード領域を PCR で増幅した。RACE-PCR で増幅した *PtGAPDH* 遺伝子に変異が認められたため、Transcriptome 解析データと一致する領域を得られた各クローンから PCR で増幅した。pRACE-*PtGAPDH*5' を Template として、Primer set (*PtGAPDH*-1) を用いて、1-231 bp の領域を増幅した。また、pRACE-*PtGAPDH*3' を Template として、Primer set (*PtGAPDH*-2 および *PtGAPDH*-3) を用いて、232-583 bp と 584-1014 bp の領域をそれぞれ増幅した。PCR primer は表 11 に示した。増幅した 3 つの断片を pET19b vector の *Nde* I site に In-Fusion cloning により同時に挿入した。構築した pET19b-*PtGAPDH* で大腸菌 BL21star(DE3) を形質転換した。

組換えタンパク質の発現と精製は基本的に方法 3-3. (*PtSUS* 抗体の作製) に従って行った。発現誘導後の大腸菌封入体を調整した。封入体 (大腸菌 0.63 g 由来) を SDS buffer (10 mM Tris-HCl (pH6.8), 4 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerol) で可溶化し、不溶性物質を 20,000 ×g で 20 分間、室温で遠心することで取り除いた後、上清に Bromophenol blue と β-Mercaptoethanol を加えサンプルとした。Preparative SDS-PAGE system (Model 491 Prep Cell) で単離した His-*PtGAPDH* をウサギに免疫し、polyclonal 抗体を作製した (Cosmo Bio Co. Ltd. へ受託)。抗体は硫安分画と Protein G column chromatography で精製した。

rabbit anti-*PtCPR* antibody

PtCPR の発現系を構築するために、pRACE-*PtCPR* から *PtCPR* の 153 から 498 残基をコードする領域を PCR で増幅した。PCR primer は表 11 に示した。増幅断片を pET19b vector の *Nde* I site に In-Fusion cloning により挿入し、pET19b-*PtCPR* (ΔN) を構築し、大腸菌 BL21star(DE3) を形質転換した。

組換えタンパク質の発現と精製は基本的に方法 3-3. (*PtSUS* 抗体の作製) に従って行った。発現誘導後の大腸菌から封入体を調整した。封入体を SDS buffer で可溶化し、不溶性物質を 20,000 ×g

で 20 分間、室温で遠心することで取り除いた後、上清に Bromophenol blue と β -Mercaptoethanol を加えサンプルとした。総タンパク質 20.8 mg から His-PtCPR (Δ N) を Preparative SDS-PAGE system により単離した。精製 His-PtCPR (Δ N) をウサギに免疫し、polyclonal 抗体を作製した (Cosmo Bio Co. Ltd. へ受託)。抗体は硫酸分画と Protein G column chromatography で精製した。

4-4. 細胞分画

窒素置換したグローブボックス内で以下の実験を行った。1 g の葉に 5 mL の Isotonic buffer (50 mM Hepes-KOH (pH 7.5), 0.3 M Sucrose, 5 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 2 mM Sodium ascorbate, 1× Protease inhibitor cocktail (EDTA-free; Nakarai tesque)) を加え、BioMasher II (Nippi) と PowerMasher SP (Nippi) を用いてホモジナイズした。抽出液をミラクロスでろ過し、ろ液を 2,000 ×g で 20 分間遠心した。その上清を 100,000 ×g で 1 時間超遠心し、上清 (cytosol 分画) と沈殿 (microsome 分画) に分離した。Microsome には元と同じ体積の Isotonic buffer を加え、ガラスホモジナイザーで懸濁した。サンプルには 1/3 倍量の 4× SDS-PAGE sample buffer (250 mM Tris-HCl (pH 6.8), 8 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) Glycerol, 0.004 % (w/v) Bromophenol blue, 20 % (v/v) β -Mercaptoethanol) を加えた。

4-5. 大腸菌の可溶性分画からの組換え PtGAPDH の精製

組換え His-PtGAPDH

大腸菌 pET19b-PtGAPDH/BL21star(DE3) を 50 μ g.mL⁻¹ Ampicillin を含む LB 培地で OD₆₀₀ が 0.6 に達するまで培養した。終濃度 0.1 mM になるように IPTG を加え、28 °C で一晩発現誘導を行った後、集菌した。PBS で洗浄後、His-PtIGS の精製 (方法 1-10) と同じ方法で His-PtGAPDH を精製した。

組換え GST-PtGAPDH

GST-PtGAPDH の大腸菌内発現系を構築するため、PtGAPDH コード領域を pET19b-PtGAPDH から PCR により増幅した。PCR primer は表 11 に示した。増幅断片を pGEX4T-3 の EcoRI site に In-Fusion cloning により、発現ベクター-pGEX4T-3-PtGAPDH を構築した。

pGEX4T-3-PtGAPDH で形質転換した大腸菌 BL21star(DE3) を 50 μ g.mL⁻¹ Ampicillin を含む LB 培地で OD₆₀₀ が 0.6 に達するまで培養した。終濃度 0.1 mM になるように IPTG を加え、28 °C で一晩発現誘導を行った後、集菌した。菌体は PBS で洗浄後、GST-PtSUS の精製 (方法 3-12) と同じ方法で GST-PtGAPDH を精製した。

4-6. GST-PtGAPDH を用いた pulldown assay

基本的に方法 3-15. に基づいて行った。0.5 mL の 0.5 μ M GST-PtSUS [Binding buffer (1 mM EDTA, 0.1 % (v/v) Triton X-100 を含む PBS) で希釈した] を、25 μ l の Glutathione sepharose 4B に結合させた。続いて、0.5 mL の 0.5 μ M His-PtIGS (Binding buffer で希釈した) を加え、4 時間以上

インキュベートした。樹脂を 0.5 mL の Binding buffer で 4 回洗浄した後、50 μ L の 2 \times SDS-PAGE sample buffer (125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerol, 0.002 % (w/v) Bromophenol blue, 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol) を加え、タンパク質を溶出した。次に、樹脂を含む溶液をそのまま 95 $^{\circ}$ C で 5 分間ヒートした後、SDS-PAGE に用いた。コントロール実験として同じ濃度の GST を GST-*Pt*GAPDH の代わりに用いた。

4-7. GST-*Pt*SUS を用いた pulldown assay

基本的に方法 3-15. に基づいて行った。GST-*Pt*SUS を結合させた Glutathione sepharose 4B に Binding buffer で希釈した 0.5 μ M His-*Pt*GAPDH を加え、実験を行った。

4-8. *Pt*GAPDH の共免疫沈降

基本的に方法 3-16. に従って実験を行った。1 mL の葉の粗抽出液に *Pt*GAPDH 抗体 (10 μ g) を共有結合させた Protein G Mag Sepharose を加え、一晩ゆっくりと攪拌した。樹脂を洗浄後、50 μ L の Elution buffer (0.1 M Glycine-HCl (pH 2.9), 2 M Urea) を加え、結合したタンパク質を溶出した。溶出液は中和後、4 \times SDS-PAGE sample buffer を終濃度 1 \times になるように加えた。

4-9. microsome の可溶化実験

基本的に方法 1-21. に従って実験を行った。方法 4-4. に従って調整した microsome を、cytosol 分画の半量の Isotonic buffer で再懸濁した。続いて、0.1 mL の microsome 懸濁液に、各種試薬 (2 M NaCl, 0.2 M Na₂CO₃, 2 % (v/v) Triton X-100 あるいは 2 % (w/v) SDS) を含む 0.1 mL の Isotonic buffer を加えた。サンプルは氷上で 1 時間インキュベートした後、100,000 \times g で 1 時間、4 $^{\circ}$ C で超遠心した。遠心後の沈殿は、0.2 mL の Isotonic buffer で再懸濁した。サンプルには 67 μ L の 4 \times SDS-PAGE sample buffer を加えた。

4-10. microsome の Sucrose 密度勾配遠心

基本的に方法 4-4. に従い、グローブボックス内で microsome を調整した。1 g の葉に 5 mL の 0.3 M Sucrose を含む Mg buffer (50 mM Hepes-KOH (pH 7.5), 0.3 M Sucrose, 5 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 2 mM Sodium ascorbate, 1 \times Protease inhibitor cocktail (EDTA-free; Nakarai tesque)) あるいは EDTA buffer (50 mM Hepes-KOH (pH 7.5), 0.3 M Sucrose, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, 2 mM Sodium ascorbate, 1 \times Protease inhibitor cocktail (EDTA-free; Nakarai tesque)) を加え、BioMasher II と PowerMasher SP を用いてホモジナイズした。抽出液をミラクロスでろ過し、ろ液を 2,000 \times g で 20 分間遠心した。その上清を、100,000 \times g で 1 時間超遠心し、沈殿 (microsome 分画) を回収した。Microsome には 1 mL の同じ buffer を加え、ガラスホモジナイザーで懸濁した。

続いて、1 mL の microsome 懸濁液を 29 mL の 15-60 % (w/v) Sucrose 密度勾配 (Mg buffer あるいは EDTA buffer を含む) に重層し、100,000 ×g (SW28 roter; Beckman, California, USA) で 12 時間、4 °C で遠心した。遠心後、上層から順にチューブ内の溶液を回収した。

4-11. microsome の Proteinase K 処理

方法 4-4. に従って調整した microsome (0.5 g の葉由来) を 0.5 mL の Isotonic buffer (Protease inhibitor を含まないもの) で懸濁した。続いて、25 µL のサンプルに等量の 5-500 µg.mL⁻¹ Proteinase K を含む Isotonic buffer を加え、24 °C で 30 分間インキュベートした。Protease inhibitor (100 mM PMSF を 5 µL と 200× Protease inhibitor cocktail (EDTA-free; Nakarai tesque) を 1 µL) を加え、氷上に 5 分間置いた。続いて、4× SDS-PAGE sample buffer を 18 µL 加えた。

4-12. Immunoblotting

基本的に方法 1-14. に従って行った。SDS-PAGE 後、タンパク質を PVDF 膜 (FluoroTrans W Membrane) に転写した。一次抗体として、guinea pig polyclonal anti-*Pt*FMO IgG (1:25,000), rabbit polyclonal anti-*Pt*SUS IgG (1:10,000), rabbit polyclonal anti-*Pt*IGS IgG (1:5,000), rat polyclonal anti-*Pt*IGS IgG (1:5,000), rabbit polyclonal anti-*Pt*GAPDH IgG (1:10,000), mouse anti-Actin antibody (clone 10-B3) (1:20,000), mouse anti-αTubulin antibody (clone 1E4C11) (1:20,000) (Proteintech Group Inc.), rabbit polyclonal anti-Aquaporin PIP antibody (COP-080025) (1:10,000) (Cosmo Bio Co., Ltd.) を用いた。二次抗体は horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-guinea pig IgG antibody (1:50,000) (Proteintech Group Inc.), HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody (1:50,000) (Abcam), HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1:50,000) (Proteintech Group Inc.) あるいは HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody (1:50,000) (Bio-Rad laboratories Inc.) を用いた。Marker は ExcelBand 3-color Regular Range Protein Marker (PM2500) を使用した。

4-13. プロトプラストの免疫染色

プロトプラストの作製

基本的に方法 1-21. に従って行った。3 から 6 weeks-old の若葉を刻み、酵素溶液(1.0 % (w/w) Cellulase Onozuka-RS, 0.03 % (w/w) Pectorylase Y-23, 1.0 % (w/w) Sodium dextran (nuclease and Protease tested; Nakarai tesque), 0.1 % (w/v) BSA, 0.55 M Mannitol を含む 10 mM Mes-KOH (pH 5.5)) に浸した。減圧後、ゆっくりと揺らしながら 28 °C で 1 時間以上インキュベートした。続いて、ミラクロスを通した後、ろ液に含まれるプロトプラストを 100 ×g で 3 分間遠心し、回収した。プロトプラストは Hepes buffer (25 mM Hepes-KOH (pH 7.2), 5 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 0.55 M Mannitol) で洗浄した後、実験に用いた。

細胞骨格処理あるいは細胞内輸送阻害に用いるストック溶液として、Latrunculin B (LatB) (Cayman Chemical Company, Michigan, USA) を終濃度 2 mM になるように DMSO で溶解した。ま

た、Brefeldin A (BFA) (Sigma-Aldrich) を終濃度 $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ になるように DMSO で溶解した。これらの試薬で処理する場合は、プロトプラストを $2 \text{ }\mu\text{M}$ Lat B あるいは $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ BFA を含む Hepes buffer 中、室温で 1 時間インキュベートした。インキュベート後、プロトプラストを Hepes buffer で 1 回洗浄し、実験に用いた。

化学固定

プロトプラスト懸濁液を 1.5 mL チューブに移し、再度、100 g で 1 分間遠心した。沈殿したプロトプラストに 2 % (w/v) Paraformaldehyde (PFA) を含む Hepes buffer を加え、30 分間以上固定した。続いて、遠心で溶液を取り除いた後、プロトプラストを Hepes buffer で再懸濁した。懸濁液を Polyethyleneimine でコートしたカバーガラスに乗せ、5 から 10 分間静置した。溶液を取り除き、カバーガラス上の細胞を 0.2 % (v/v) Triton X-100 (BioXtra; Sigma-Aldrich) を含む PBS で 15 分間透過処理した。カバーガラスを PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM NaH_2PO_4 , 2 mM K_2HPO_4 (pH 7.4)) で 3 回洗浄後、染色操作に進んだ。

Methanol 固定

プロトプラストを Polyethyleneimine でコートしたカバーガラスに付着させた後、 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ に冷やした Methanol に浸した。サンプルは Methanol 中でさらに 20 分間、 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ で静置した。次に、室温で各 5 分間ずつ、PBS:Methanol = 2:8, 4:6, 6:4, 8:2 と順番に溶液を交換した。最後に PBS に置換した後、染色操作に進んだ。

液化プロパン固定

基本的に Hamada et al., (2009) の方法に従って行った。プロトプラストを Polyethyleneimine でコートしたカバーガラスに付着させた後、液化プロパンに数秒浸した。続いて、 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ に冷やした Methanol に移し、 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ で 1 週間以上保存した。次に、Methanol に浸したまま、サンプルを $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ で 12 時間、 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ で 2 時間、室温で 1 時間インキュベートした。その後、4 時間以上かけて PBS に置換し、染色操作に進んだ。

免疫染色

上記のようにプロトプラストを付着させたカバーガラスに一次抗体溶液を乗せ、室温で 1 時間、あるいは $4 \text{ }^\circ\text{C}$ で一晩インキュベートした。次に、PBS で 3 回以上洗浄した後、二次抗体溶液を乗せ、室温で 1 時間インキュベートした。PBS で 3 回以上洗浄後、スライドガラスに載せた。封入には PBS を用いた。

一次抗体として guinea pig polyclonal anti-*Pt*FMO IgG (1:500), rat polyclonal anti-*Pt*IGS (1:500), rabbit polyclonal anti-*Pt*IGS IgG (1:500), rabbit polyclonal anti-*Pt*SUS IgG (1:500), rabbit polyclonal anti-*Pt*GAPDH IgG (1:500) を用いた。二次抗体は Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG (1:1,000) (Molecular probes, Oregon, USA), CF555-conjugated anti-guinea pig IgG (1:1,000) (Sigma-Aldrich), Alexa Fluor 555-conjugated anti-rat IgG (1:1,000) (Abcam) を用いた。抗体は 1 % (w/v) BSA を含む PBS で希釈した。

4-14. 葉緑体の免疫染色

無傷葉緑体を Minami et al., (1997) の方法に基本的に従って調整した。約 16 g のタデアイの葉に Buffer A (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 1 mM Sodium ascorbate, 0.33 M Sorbitol, 1 mM PMSF) を加え、金属ホモジナイザーで破碎した (15,000 rpm, 3 sec ×2)。破碎液は Miracloth と 8 μm Nylon mesh で濾過し、560 ×g で 2 分間遠心した。沈殿を 12 mL の Buffer B (50 mM Hepes-KOH (pH 7.8), 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 1 mM Sodium ascorbate, 0.33 M Sorbitol) に懸濁し、6 mL を Percoll gradient (10, 30, 40, 90 % (v/v) Percoll (Cytiva) を含む Buffer B を各 6 mL 重層したもの) に重層し、6,400 ×g (SW28 swing roter) で 20 分間遠心した。遠心後、無傷葉緑体を含む 40 % - 90 % Percoll の層を集めた。回収した分画には、約 4 倍量の Buffer B を加え、560 ×g で 2 分間遠心し、沈殿を回収した。この洗浄操作は 2 回行った。

免疫染色のため、葉緑体を 2 % (w/v) PFA を含む Buffer B 中で、30 分間固定した。固定後、葉緑体を Polyethyleneimine でコートしたカバーガラスに付着させた。サンプルを PBS で 3 回以上洗浄後、方法 4-13. に従って免疫染色を行った。

4-15. タバコの葉における一過性発現

PtIGS の発現系構築

pET19b-*PtIGS* を Template として、表 11 に記載した Primer を用いて *PtIGS* コード領域を PCR で増幅した。増幅断片を pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kits (Thermo Fisher Scientific) を用いて pENTR/D-TOPO (Thermo Fisher Scientific) へ挿入し、Entry vector pENTR-*PtIGS* を構築した。Entry vector から *PtIGS* コード領域を Binary vector pGWB405 (C 末 Enhanced green fluorescent protein (EGFP) 用) へ、Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いてサブクローニングした。続いて、アグロバクテリウム GV3101 を形質転換した。

PtFMO の発現系構築

pET19b-*PtFMO* を Template として、表 11 に記載した Primer を用いて *PtFMO* コード領域を PCR で増幅した。増幅断片を *Sal* I および *EcoRV* で線状化した pENTR1A (*attL1* と *attL2* 領域の間) に In-Fusion cloning で挿入し、Entry vector pENTR1A-*PtFMO* を構築した。Entry vector から *PtFMO* コード領域を Binary vector [pGWB405 (C 末 EGFP 用), pGWB454 (C 末 Monomeric red fluorescent protein (mRFP) 用)] へ、Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme Mix を用いてサブクローニングした。続いて、アグロバクテリウム GV3101 を形質転換した。

植物細胞内での一過性発現

アグロバクテリウム pGWB405-35S::*PtIGS*-EGFP/GV3101, pGWB454-35S::*PtFMO*-mRFP/GV3101 を 100 μg.mL⁻¹ Spectinomycin を含む LB 培地で 28 °C で一晩培養した。また、mCherry-h 発現ベクター pBIN (ER-rk) (Nelson et al., 2007) で形質転換したアグロバクテリウム EHA105 を 30 μg.mL⁻¹ Kanamycin を含む LB 培地で培養した。培養液 50 μL を 9,300 ×g で 1 分間遠心し、菌体を回収した。菌体は 1 mL の脱イオン水で 3 回洗浄後した。続いて、1 mL の脱イオン水に懸濁したア

グロバクテリウムをタバコ *Nicotiana benthamiana* (2-months-old) の裏表皮に 1 mL シリンジを用いてインフィルトレーションした。4 日後、感染させた部分を切り取り、共焦点蛍光顕微鏡での観察と Indican の分析に用いた。Indican の抽出と検出は方法 1-3. に基づいて行った。

4-16. 共焦点蛍光顕微鏡による観察

共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡 FV3000 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて観察した。対物レンズには 100× シリコン浸レンズ (numerical aperture 1.35; UPLSAPO100XS; Olympus) を用いた。Galvano scanner を用い、設定を Scan Direction : Oneway, ScanSpeed : 10 $\mu\text{sec}.\text{pixel}^{-1}$, Sequential scan mode : Line, Averaging : 1-4 times, 1 Airy unit とした。蛍光検出において、蛍光色素 Alexa Fluor 488 は 500-540 nm (488 nm laser)、CF555 は 570-620 nm (561 nm laser)、Alexa Fluor 594 は 570-670 nm (561 nm laser) の波長でそれぞれ検出した。蛍光タンパク質 EGFP は 500-540 nm (488 nm laser), mRFP は 570-615 nm (561 nm laser), mCherry は 570-620 nm (561 nm laser) で検出した。Chlorophyll の蛍光は 650-710 nm (488 nm laser) で検出した。画像は Olympus oir 形式で保存し、cellSens (Olympus)、ImageJ FIJI または Adobe Photoshop (Adobe systems, California, USA) で加工した。シグナルの定量には ImageJ FIJI の ProtProfile 機能を用い、16 bit 画像から蛍光強度 (gray scale) を算出した。

4-17. タンパク質濃度の定量

SDS で溶解した封入体と、抗体濃度の定量には Pierce™ BCA Protein Assay Kit を用いた。その他のサンプルの定量には Bradford Ultra を用いた。

表 11. 本章の実験で用いた Primer

Cloning of PtCPR	Primer sequence (5' to 3')
Universal Primer A Mix pRACE-PtFMO5'	Component in SMARTer RACE 5'/3' Kit GATTACGCCAAGCTTATGGATCCAACCTCGGTGAAGCTG
Expression of PtCPR (Δ N)	
pET19b-PtCPR (Δ N)-Fw pET19b- PtCPR (Δ N)-Rv	ACGACGACAAGCATACTTTCTTCTTTATGGCTACG GGATCCTCGAGCATAAGTAACATGAATTCCTGAAG
Cloning of PtGAPDH	
Universal Primer A Mix PtGAPDH_race5 PtGAPDH_race3	Component in SMARTer RACE 5'/3' Kit GATTACGCCAAGCTTATGGGAGCATCCTTGCTGGGTGCAG GATTACGCCAAGCTTCGGCCGTTGGTCGCTAGGGTGAT
Subcloning of PtGAPDH into pET19b	
PtGAPDH-1Fw PtGAPDH-1Rv PtGAPDH-2Fw PtGAPDH-2Rv PtGAPDH-3Fw PtGAPDH-3Rv	ACGACGACAAGCATATGGCAAAGATCAAGGTTGG CCTGACTCCGAAGACGGTCACTGCCTTCTCGCC GTCTCGGAGTCAGGAAC CTCTCCAGTCCTTCATTGATGGGCCATCAACGG TGAAGGACTGGAGAGGTG GGATCCTCGAGCATATTACTGGCATTGGAGATGT
Subcloning of PtGAPDH into pGEX4T-3	
pGEX-PtGAPDH-Fw pGEX-PtGAPDH-Rv	GTGGATCCCCGAATTTGGCAAAGATCAAGGTTGG GTCCGACCCGGGAATTTTACTGGCATTGGAGATGT
Subcloning of PtIGS into pENTR/D-TOPO	
PtIGS-pENTR_Fw PtIGS-pENTR_Rv	CACCATGGAATCCCCCGCCGCC AACCTTGCTTTCCCAAATTTTGC
Subcloning of PtFMO into pENTR1A	
PtFMO-pENTR_Fw PtFMO-pENTR_Rv	GGAACCAATTCAGTCGACATGGAGAGGAAGGTTGGGAT AAGCTGGTCTAGATATCCGCCAATATAGTCTAATGGCCCA

結果

*Pt*GAPDH は Indican 生合成に関わるタンパク質と相互作用する

第2章で示したように、*Pt*IGS の相互作用解析において、かなり優位に特定の GAPDH が検出された。そこで、*Pt*GAPDH と名付け、cDNA クローニングを行い、組換え *Pt*GAPDH (図 33) を抗原として、抗体を作製した。

続いて、組換え *Pt*GAPDH を用いて Indican 生合成に関わるタンパク質との相互作用を確かめた。GST-*Pt*GAPDH を結合させた Glutathione sepharose に対する組換え His-*Pt*IGS の結合実験 (pull-down assay) を行ったところ、Immunoblotting (anti-*Pt*IGS) で His-*Pt*IGS が検出された (図 34 (A))。このバンドは、コントロール実験として GST を用いて pull-down assay を行った場合より、わずかに濃く検出された。

また、*Pt*GAPDH と *Pt*SUS の結合も確認した。GST-*Pt*SUS を結合させた Glutathione sepharose 4B を用いて、His-*Pt*GAPDH の pull-down assay を行ったところ、Immunoblotting (anti-*Pt*GAPDH) により検出が認められた (図 34 (B))。なお、GST を用いて pull-down assay を行った場合には、His-*Pt*GAPDH は検出されなかった。

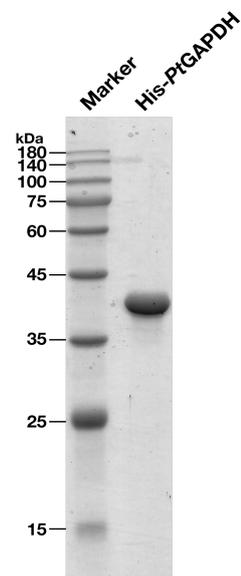


図 33. 抗原として用いた His-*Pt*GAPDH の SDS-PAGE 大腸菌の封入体から精製した。

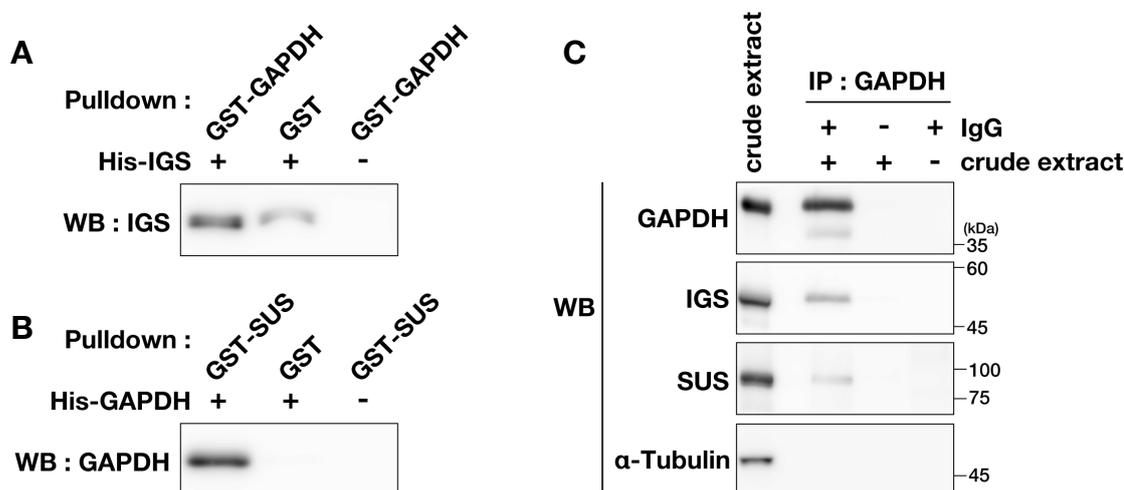


図 34. *Pt*GAPDH と Indican 生合成に関わるタンパク質の相互作用

(A) Pull-down assay. GST-*Pt*GAPDH あるいは GST 結合 Glutathione Sepharose 4B を用いて His-*Pt*IGS の結合を確認した。SDS で溶出したサンプルを 10 % polyacrylamide gel にアプライし、Immunoblotting (rabbit anti-*Pt*IGS 抗体を使用) で *Pt*IGS を検出した。SDS-PAGE には 10 % polyacrylamide gel を用いた。(B) (A) と同じ方法で GST-*Pt*SUS あるいは GST を用いて His-*Pt*GAPDH の pull-down assay を行った。(C) *Pt*GAPDH 抗体を用いた葉の抽出液からの共免疫沈降。酸性 buffer で溶出したサンプルを 10 % polyacrylamide gel で分離した。Immunoblotting では *Pt*GAPDH 抗体、*Pt*SUS 抗体、*Pt*IGS 抗体 (rat)、Tubulin 抗体を用いた。粗抽出液 1 μ L (0.5 % input) と免疫沈降産物 14 μ L を各レーンにアプライした。

さらに、*Pt*GAPDH と細胞内タンパク質との相互作用を共免疫沈降により確かめた。葉の抽出液から *Pt*GAPDH を共免疫沈降したところ、免疫沈降産物には *Pt*IGS と *Pt*SUS の存在が確認された (図 34 (C))。この際、cytosol 分画の豊富なタンパク質の一つである Tubulin は検出されなかった。

Indican 生合成に関わるタンパク質の細胞内局在

*Pt*GAPDH も含め、Indican 生合成に関わるタンパク質の細胞内局在の解析を進めるため、オルガネラのマーカーとなるタンパク質の抗体を準備した。そのうち、ER 膜のマーカーとして *P. tinctorium* cytochrome P450 reductase (*Pt*CPR) 抗体を作製した。N 末端の膜貫通領域を除いた *Pt*CPR (Δ N) を発現させた大腸菌の封入体から精製した組換え *Pt*CPR を抗原として用いた (図 35)。

図 34 で示したように、*Pt*GAPDH は *Pt*IGS だけでなく *Pt*SUS と相互作用が検出された。そのため、*Pt*GAPDH は Indican 生合成に関与している可能性を予想し、*Pt*GAPDH も含めた、Indican 生合成関連のタンパク質の細胞内局在を調べた。

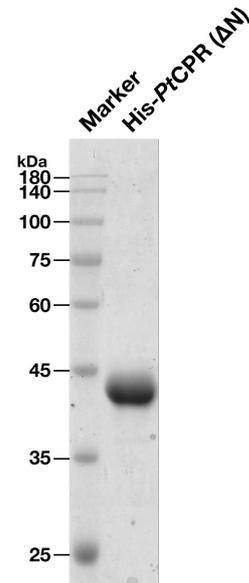


図 35. His-*Pt*CPR(Δ N) の SDS-PAGE

葉から調整した cytosol と microsome に存在するタンパク質を Immunoblotting で検出した。図 36 で示すように、*Pt*CPR (ER 膜局在) や PIP (Plasma membrane intrinsic protein; 原形質膜局在) は microsome に、Actin や Tubulin (cytosol タンパク質) は cytosol に分画された。Actin は一部 microsome にも局在が見られた。*Pt*IGS は以前の報告通り (Inoue et al., 2018)、一部が microsome から検出された。また、*Pt*SUS と *Pt*GAPDH も同様の傾向を示した。しかし、それらの挙動とは異なり、*Pt*FMO は全て microsome に局在が見られた。

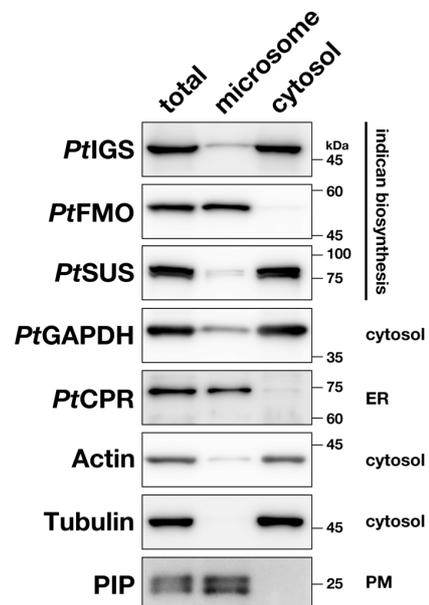


図 36. Indican 生合成関連タンパク質の細胞内局在

葉の粗抽出液を $2,000 \times g$ で 20 分間遠心した。その上清 (total) を $100,000 \times g$ で 1 時間超遠心し、上清 (cytosol) と沈殿 (microsome) に分画した。各分画 $4 \mu\text{L}$ を 12.5 % polyacrylamide gel にアプライし、Immunoblotting で検出した。*Pt*IGS の検出には rabbit 抗体を用いた。図中の右側には Indican 生合成経路との関わり、あるいは予想される局在を示した。PM : plasma membrane

Indican 生合成に関わるタンパク質と microsome 膜の会合

様々な試薬で処理した microsome を再度、上清 (S) と沈殿 (P) に分画し、試薬が各タンパク質と microsome 膜の会合に与える影響を調べた。図 37 で示すように、ER 膜タンパク質である *PtCPR* は界面活性剤以外の処理では遊離しなかった。*Triton X-100* で遊離しないこと以外は、*PtFMO* も同様の挙動を示した。*PtIGS* は以前の報告 (Inoue et al., 2018) とは多少異なり、Buffer での再懸濁 (control) でその多くが遊離した。また、1 M NaCl ではコントロールと比べ、変化は見られなかったが、アルカリや界面活性剤でほとんど全てが遊離した。*PtSUS* と *PtGAPDH* も *PtIGS* と似た挙動を示したが、*Triton X-100* では効率的な遊離は見られなかった。

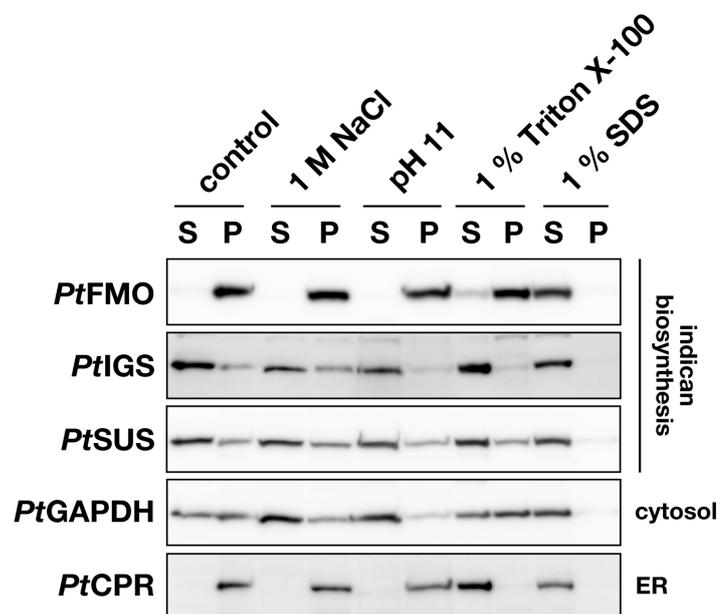


図 37. Indican 生合成に関わるタンパク質と microsome 膜の会合
葉由来の microsome を各試薬で処理し、上清 (S) と沈殿 (P) に分画した。control は Buffer のみで処理したものを示す。サンプルは 20 μ L アプライし、図 31 と同様に検出した。

Indican 生合成に関わるタンパク質の局在を Sucrose 密度勾配遠心によりさらに詳しく調べた (図 38)。microsome を再度 Buffer で懸濁し、Mg 有無の条件で密度勾配遠心を行った。Immunoblotting により各タンパク質の挙動を比較したところ、Mg イオン存在下では、*PtIGS* のピークは *PtCPR* (ER 膜局在) と一致した。この結果は、以前の報告 (Inoue et al., 2018) の通りであった。

一方、Mg 非存在下で、*PtCPR* は大部分が低密度側にシフトしたが、*PtIGS* は高密度側の分画に残った。また、*PtSUS* も *PtIGS* と同様の挙動を示した。*PtGAPDH* はいずれの条件においても *PtIGS* と *PtSUS* との分離パターンとわずかな差が見られ、むしろ、*PtCPR* や Actin とパターンがよく一致した。

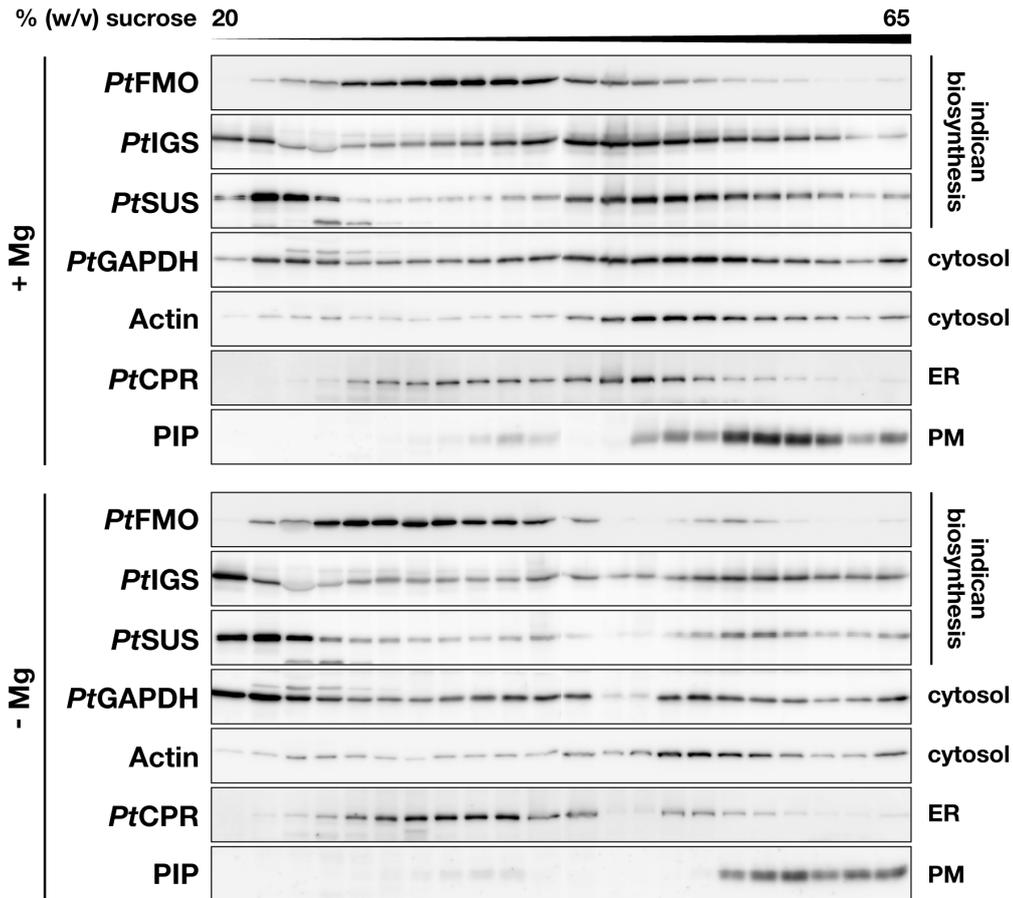


図 38. Indican 生合成関連タンパク質の細胞内局在

microsome 懸濁液を Sucrose gradient に重層し、超遠心後、22 本に分画し、タンパク質を Acetone 沈殿させた。沈殿は SDS-PAGE sample buffer で溶解した。各分画 100 μ L 相当を 12.5 % polyacrylamide gel にアプライし、Immunoblotting により検出した。PtIGS の検出には rabbit 抗体を用いた。

Indican 生合成に関わるタンパク質の膜トポロジーと Protease 感受性

これまでに記述した Indican 生合成に関わるタンパク質は、いずれもその一次構造からは cytosol 局在が推測されるにも関わらず、microsome 分画にも局在が見られる。これらのタンパク質の膜トポロジーと Protease に対する感受性を調べるため、microsome を Proteinase K で処理した後、インタクトに残ったタンパク質を Immunoblotting で検出した。その結果、図 39 で示すように、PtIGS は Proteinase K で最も容易に分解された。PtSUS と PtFMO は PtIGS よりは分解を受けにくい、本実験での最大の Proteinase K 濃度 (250 μ g.mL⁻¹) では明らかな分解が確認できた。しかし、PtGAPDH は Proteinase K により全く分解を受けなかった。

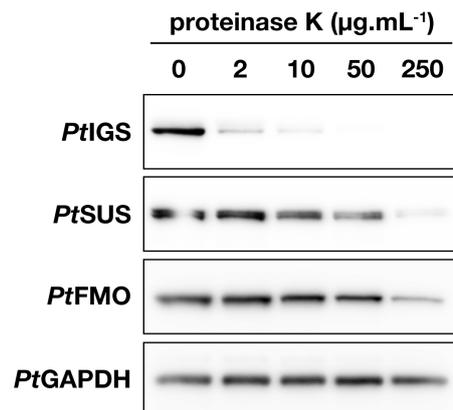


図 39. microsome の Proteinase K 処理
microsome を図中に示した終濃度の Proteinase K で処理した。12.5 % polyacrylamide gel にサンプル 4 μ L をアプライした。PtIGS の検出にはウサギ抗体を用いた。

タバコ *N. benthamiana* の葉で一過性発現させた *PtFMO* の細胞内局在

タバコ *N. benthamiana* の葉にアグロバクテリウムの感染により *PtFMO*-EGFP を一過性発現させ、その局在を共焦点蛍光顕微鏡で観察した。ER マーカーとして mCherry-h (ER 移行シグナルと ER 残留ペプチドを持つ赤色蛍光タンパク質) を共発現させ、局在を比較したところ、*PtFMO* は mCherry-h と同様に ER network および核膜で局在が見られた (図 40 (A, B))。

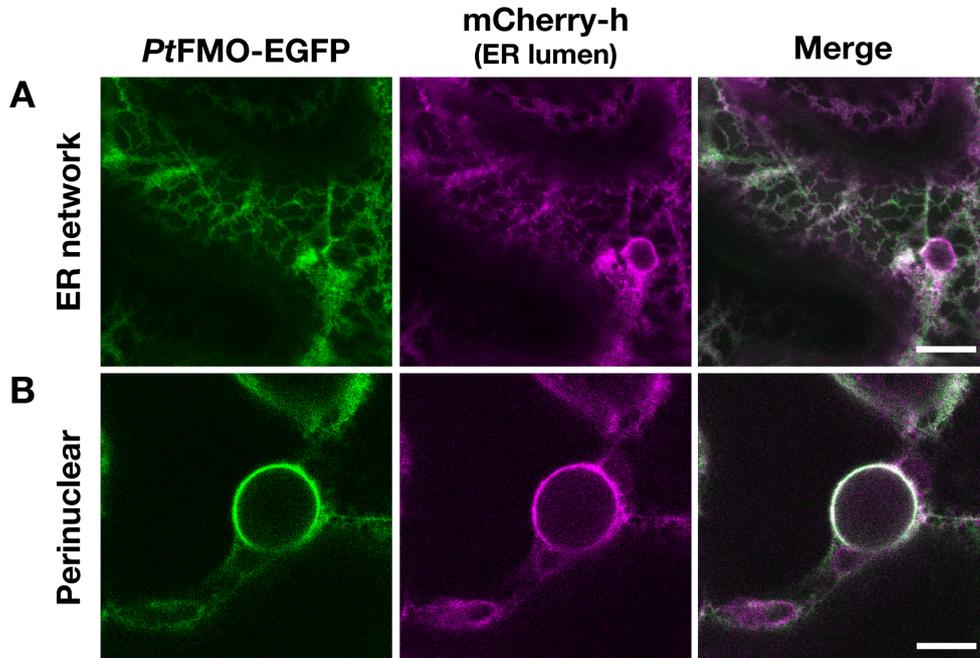


図 40. タバコの葉で一過性発現させた *PtFMO*-EGFP の細胞内局在
アグロバクテリウム pGWB405-35S::*PtFMO*-EGFP/GV3101 および pBIN (ER-rk)/EHA105 を感染させたタバコの葉を共焦点蛍光顕微鏡で観察し、ER network (A) および各膜周辺 (B) を示した。スケールバーは 10 μ m。

タデアイの細胞内で *PtFMO* は小胞状構造に局在する

タデアイ細胞内での *PtFMO* の局在を確かめるため、プロトプラストを *PtFMO* 抗体で免疫染色した。結果、タバコでの一過性発現の場合とは異なり、主に直径 1 μ m 程度の小胞上で局在が観察された (図 41)。

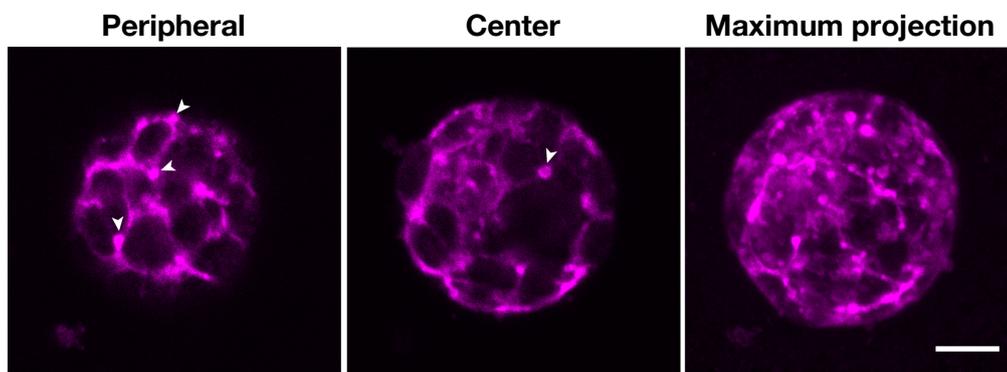


図 41. タデアイの細胞内で *PtFMO* は小胞状構造に局在する
タデアイのプロトプラストを化学固定し、anti-*PtFMO* 抗体で染色した。小胞を矢印で示した。スケールバーは 5 μ m。

タデアイ細胞内での Indican 生合成に関わるタンパク質の共局在

PtFMO が局在する小胞状構造が Indican 生合成に関わる可能性を調べるため、*PtIGS*、*PtSUS* さらに *PtGAPDH* との局在を比較した。図 42 (A) で示すように、*PtFMO* が小胞状構造で局在が観察されるが、*PtIGS* ではその様な構造は見られなかった。しかし、cytosol に見られる *PtIGS* の染色でも cytosol には粒状の濃淡が観察され、図中の矢印で示したように *PtFMO* の局在する小胞上で *PtIGS* が共局在している領域も見られた。また、*PtSUS* も cytosol 局在であるが、細胞を囲むように原形質膜にも存在している可能性が認められた (図 42 (B))。さらに、*PtSUS* も *PtFMO* の点構造上での局在が見られた。*PtGAPDH* も cytosol 局在であったが、*PtFMO* との共局在は観察されなかった (図 42 (C))。

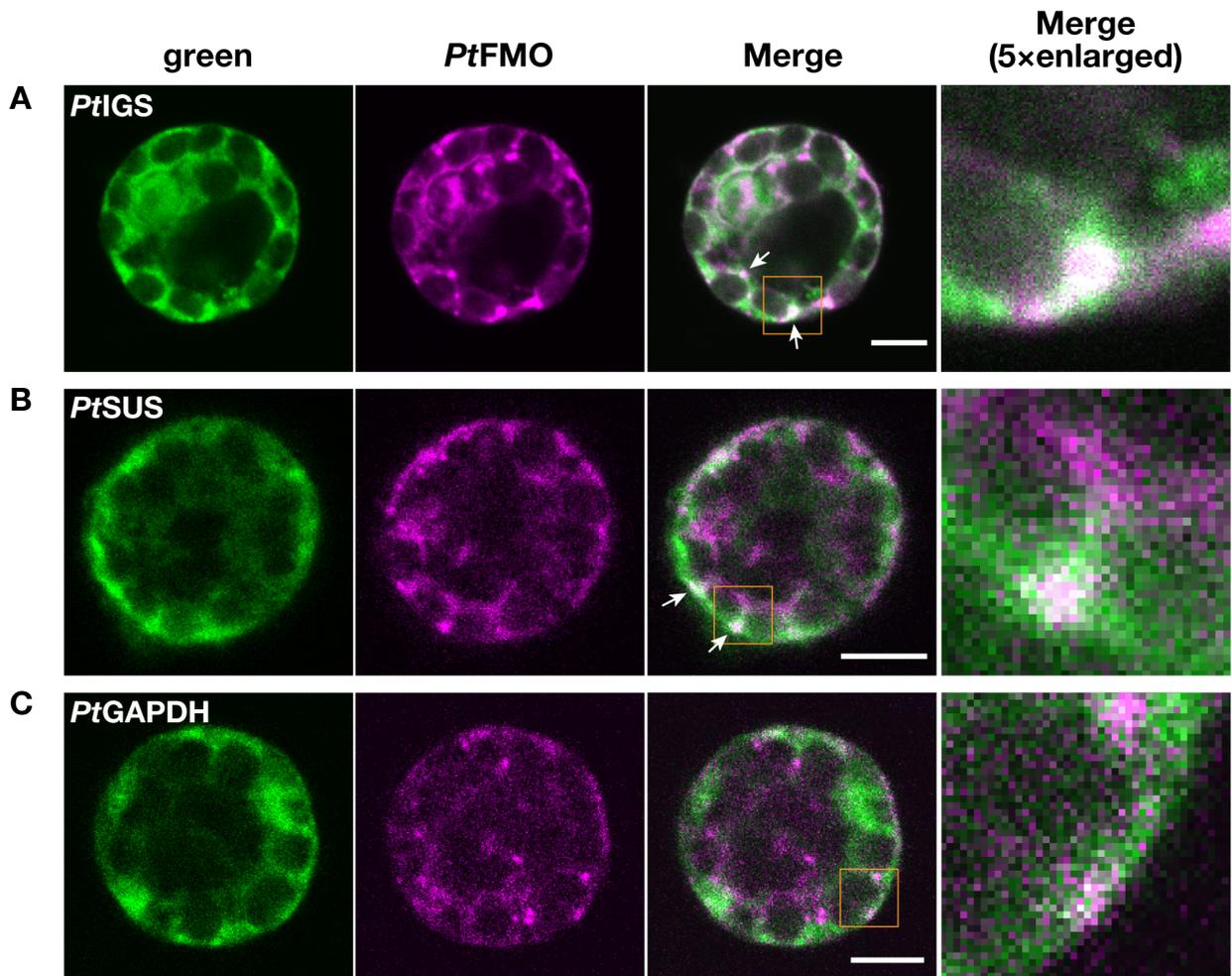


図 42. *PtFMO* と Indican 生合成に関わる他のタンパク質の共局在

タデアイのプロトプラストを guinea pig anti-*PtFMO* 抗体 (red channel) および rabbit anti-*PtIGS* 抗体 (A), rabbit anti-*PtSUS* 抗体 (B), rabbit anti-*PtGAPDH* 抗体 (C) (green channel) を用いて免疫染色した。(A) は化学固定, (B, C) は Methanol 固定を行った。共局在が見られる部位を矢印で示した。スケールバーは 5 μ m。

また、*PtSUS* と *PtIGS* の局在も比較した。cytosol での局在が大部分で一致した (図 43 (A))。さらに、cytosol で両者が粒状の局在を示す領域が見られた (図 43 (A); region 1, region 2)。その領域

のシグナルを定量すると、*PtIGS* と *PtSUS* のパターンが一致していた (図 43 (C, D))。一方、何らかのオルガネラと思われる球状の構造の内腔に *PtSUS* が局在している細胞も見られた (図 43 (B))。この時、*PtIGS* のシグナルを定量しても *PtSUS* とは全く一致しなかった (図 43 (E))。

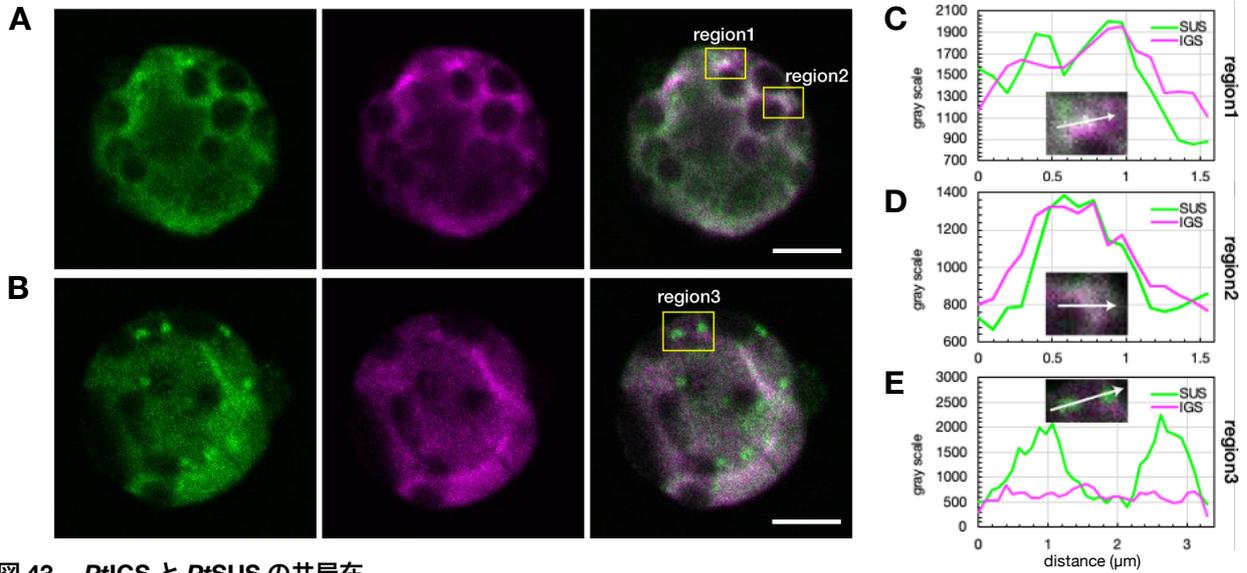


図 43. *PtIGS* と *PtSUS* の共局在

液化プロパン固定したタデアイのプロトプラストを rat anti-*PtIGS* 抗体と rabbit anti-*PtSUS* 抗体で免疫染色した。(A) *PtSUS* が cytosol に局在する細胞。(B) *PtSUS* が cytosol と何らかのオルガネラに局在する細胞。(C)-(E) (A),(B)の図中に示した region 1-3 の *PtIGS* と *PtSUS* のシグナルを定量した。スケールバーは 5 μm 。

図 44. 葉緑体上での *PtFMO* と *PtIGS* の局在

タデアイの葉緑体を guinea pig anti-*PtFMO* 抗体と rabbit anti-*PtIGS* 抗体を用いて免疫染色し、FV3000 の超解像モード (Olympus Super Resolution) で観察した。(A) *PtFMO*。(B) *PtFMO* と chlorophyll の merge。(C) DIC。(D) *PtIGS*。(E) *PtIGS*, *PtFMO* と chlorophyll の merge。(F) (E) の拡大図。DIC 以外の画像は cellSens software でデコンボリューション処理を行った。スケールバーは 1 μm 。DIC; differential interference contrast

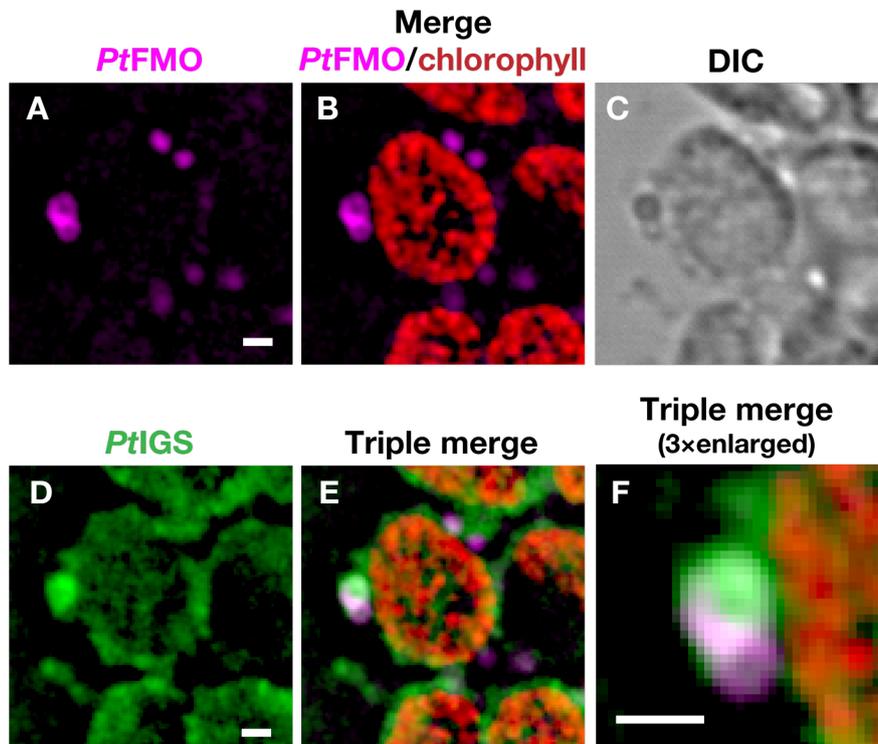


図 41, 図 42 では、*PtFMO* が小胞上に局在すること明らかにしたが、葉緑体を *PtFMO* 抗体で染色すると、小胞が葉緑体膜上に付着していることも観察できた (図 44 (A, B))。その小胞の直径は約 1 μm であり、differential interference contrast (DIC) 画像でもその存在が確認できる大きさであった (図 44 (C))。さらに、葉緑体膜上での *PtIGS* と *PtFMO* の共局在も確認できた (図 44 (D-F))。

タバコの葉での *PtFMO* と *PtIGS* の共発現による Indican 生合成

PtFMO と *PtIGS* をタバコの細胞内で一過性発現させ、Indican が生合成されるかどうかを確かめた。*PtFMO* と *PtIGS* の発現ベクターを含むアグロバクテリウムを、タバコの葉に感染させた (図 45 (A))。その後、組織から Indican を抽出し、抽出液を C_{18} カラムで分析した。結果、*PtFMO* と *PtIGS* の双方を発現させた際に、タバコの葉から Indican のピークが検出された (図 45 (B))。このピークは β -glucosidase (Indican 分解酵素) により完全に分解を受けた。一方、*PtFMO* あるいは *PtIGS* を単独で発現させても、Indican は生合成されなかった。

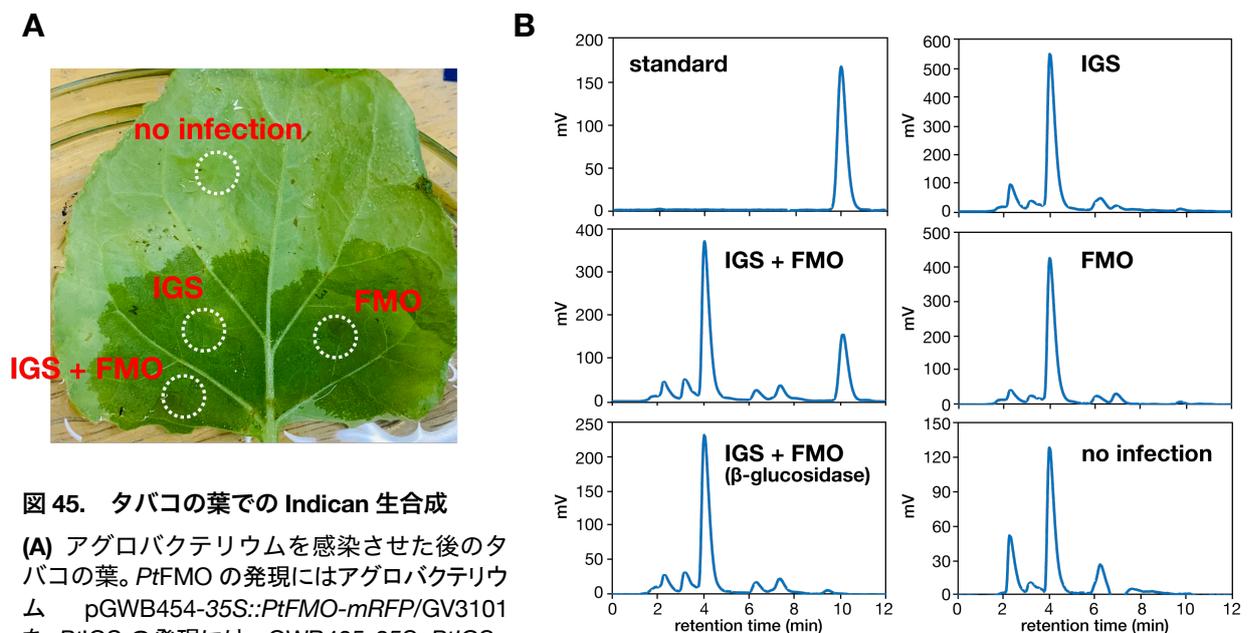


図 45. タバコの葉での Indican 生合成

(A) アグロバクテリウムを感染させた後のタバコの葉。*PtFMO* の発現にはアグロバクテリウム pGWB454-35S::*PtFMO-mRFP/GV3101* を、*PtIGS* の発現には pGWB405-35S::*PtIGS-EGFP/GV3101* を用いた。4 日後、丸で囲んだ部分から Indican を抽出した。(B) (A) の各領域の抽出液の C_{18} カラムクロマトグラフィー。Standard は commercial Indican を示す。

PtFMO と *PtIGS* の共発現は *PtFMO* が局在する小胞の形成を誘導する

図 45 で示したタバコ細胞内で *PtFMO* と *PtIGS* の局在を観察した。*PtFMO* 単独で発現させた場合、*PtFMO* は ER で局在が見られた (図 46 (A))。 *PtIGS* を共発現させると、ER 局在に加えて、*PtFMO* が直径 1~2 μm の小胞上で局在するようになった (図 46 (B))。この際、*PtIGS* は小胞を囲うように cytosol で局在した。

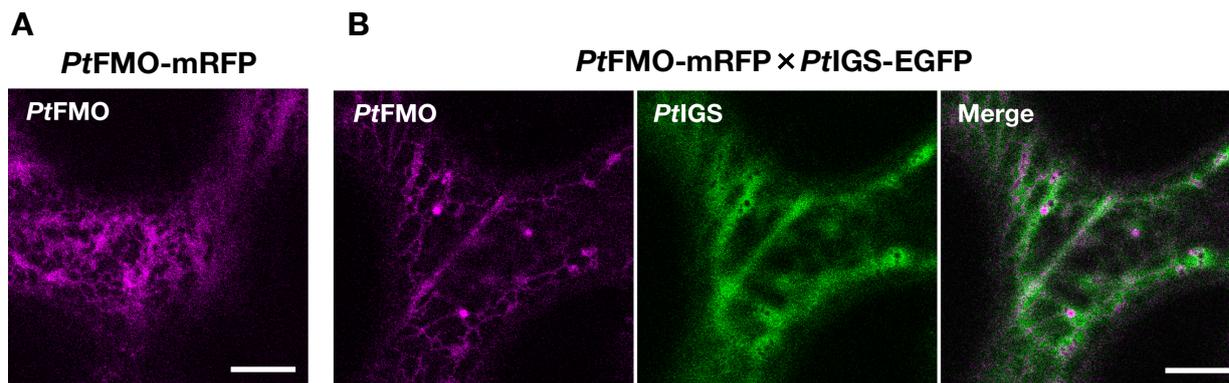


図 46. タバコの葉の細胞内での *PtFMO* と *PtIGS* の共発現
 アグロバクテリウム pGWB454-35S::*PtFMO-mRFP*/GV3101 (A), アグロバクテリウム pGWB454-35S::*PtFMO-mRFP*/GV3101 と pGWB405-35S::*PtIGS-EGFP*/GV3101 (B) を感染させたタバコの葉の細胞。スケールバーは 10 μm 。

Actin フィラメントの破壊は *PtGAPDH* の局在を変化させる

PtFMO が局在する小胞の形成と Actin filament の関係を調べた。Lat B 処理により Actin filament を崩壊させた細胞内の *PtGAPDH* と *PtFMO* を観察したところ、コントロール実験とは異なり、両者が共局在する領域の増加が見られた (図 47)。

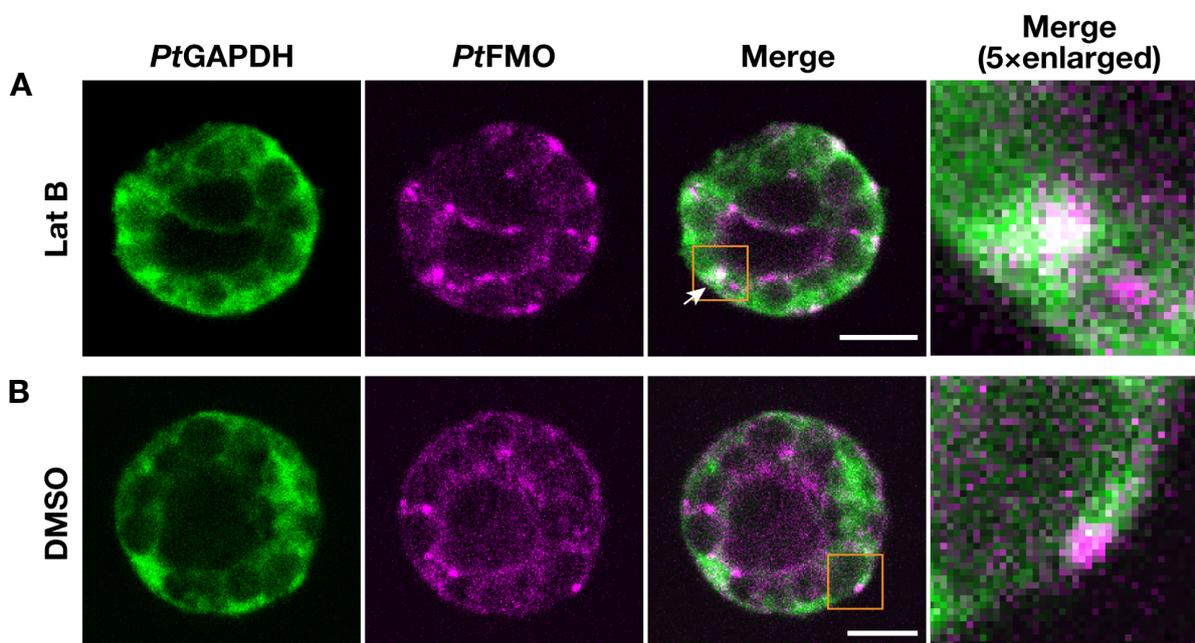


図 47. *PtGAPDH* と *PtFMO* の共局在
 2 μM Lat B (A) あるいは DMSO (B) で処理し、Methanol 固定したプロトプラストを rabbit anti-*PtGAPDH* 抗体と guinea pig anti-*PtFMO* 抗体で免疫染色した。スケールバーは 5 μm 。

考察

本章では Indican の生合成に関わるタンパク質の細胞内動態に着目し、細胞分画と蛍光顕微鏡による解析を進めた。*PtIGS* が部分的に ER に局在することから、ER 膜上に *PtIGS* と相互作用するタンパク質が存在するのではないかと考えてきた。第 2 章で記述したように、*PtIGS* と相互作用を示した microsome 局在の monooxygenase の解析を行い、*PtFMO* が Indole monooxygenase 活性を持つことを明らかにした (Inoue et al., 2021)。本章では、*PtFMO* は高濃度の塩でも遊離しない膜タンパク質のような性質を示した。一方、*PtIGS*、*PtSUS*、*PtGAPDH* は膜表在性タンパク質様の性質を示した。タバコの葉に一過性発現させた *PtFMO* の局在は mCherry-h (ER マーカー) と一致するため、*PtFMO* は基本的に ER に局在する性質があると思われる。タデアイのプロトプラストの免疫染色では、*PtFMO* は核膜周辺 (ER) と小胞に局在が見られた。しかし、Sucrose 密度勾配遠心での挙動は *PtCPR* (ER 膜タンパク質) と完全には一致しなかった。つまり、タデアイの細胞内で、*PtCPR* が ER 局在である一方で、ほとんどは ER から派生した別構造に局在すると考えられる。この小胞の由来を調べるため、BFA で処理したタデアイのプロトプラストを免疫染色した。BFA はゴルジ体の構造を破壊するため、ゴルジ体局在のタンパク質あるいはゴルジ体を経由して輸送されるタンパク質はその局在が変化する。しかし、本実験ではコントロール実験と比較して *PtFMO* の局在に変化は見られなかった (データは示していない)。つまり、この小胞はゴルジ体由来ではなく、ER 膜の特定の領域が出芽し形成されていると考えられる。*PtFMO* は塩、アルカリ、弱い界面活性剤では遊離しないことから、膜タンパク質と結合している様には思えない。FMO family のタンパク質のうち、*A.thaliana* の YUCCA には ER に局在するタイプのものがいくつかある (Kriechbaumer et al., 2012)。そのうち、YUCCA8 を構成している全長 421 のアミノ酸において、226 から 347 の領域が ER 膜に移行する役割を持っていることが報告されている (Krönauer et al., 2019)。データベースによる検索では、*PtFMO* にはシグナル配列や膜貫通領域の存在は予測されないが (Inoue et al., 2021)、YUCCA8 と同様に、疎水性の高い領域が配列の中盤に見られる。

面白いことに、この小胞は葉緑体にも付着している様子が見られた。さらに、無傷葉緑体から得た膜分画には、Immunoblotting により *PtFMO*、*PtIGS*、*PtSUS* の存在が確認できている (データは示していない)。植物細胞内で、cytosol 局在の INS が合成した Indole が、Indican の生合成に利用されるという報告もあるが (Jin et al., 2016)、これまでの研究では *PtIGS* と INS の相互作用は全く検出されていない。そのため、*PtFMO* は葉緑体内で TSA が合成した Indole を受け取っているのではないかと私は予想してきたが、本結果から、よりその可能性が高まったと言える。

一方で、*PtFMO* が葉緑体内腔で生成した Indole をどのように利用するのかは問題である。オルガネラ間相互作用は近年注目されている分野であり、ER と葉緑体が接触していることも報告されている (Mehrshahi et al., 2013)。そのため、*PtFMO* が局在する小胞と葉緑体の接触により、Indole を受け取っている可能性も予想している。細胞内で、*PtFMO* は *PtIGS* や *PtSUS* と共局在するため、この 3 者を含む代謝複合体 (メタボロン) が形成されている可能性は高いと考えている。

共免疫沈降では *PtSUS* と *PtIGS* の相互作用が確認できること、図 43 に見られるように細胞内で両者の局在が良く一致することから、cytosol では比較的通常 *PtIGS-PtSUS* 複合体が存在する可能性がある。しかしながら、細胞分画を行うと両者はそのほとんどが cytosol 分画に検出されるため、*PtFMO* との相互作用は一過性あるいは弱い結合であると考えられる。*Indican* を生合成する際に、*PtIGS-PtSUS* 複合体が *PtFMO* の周りに集合するのかもしれないが、この調節機構の解明は今後の課題である。*PtIGS* の相互作用解析では G タンパク質 (β -subunit) も検出されており (Inoue et al., 2020)、シグナル伝達系も関わる可能性があると考えている。

ゲノム編集はタンパク質の細胞内での本来の働きを調べるための非常に強力なツールであるが、タデアイではその方法は現時点で確立されていない。そのため、特定した *Indican* 生合成に関わるタンパク質が、タデアイの細胞内で実際にどのように働いているのかを調べることは困難であった。そこで、一過性発現系を利用し、モデル植物で *Indican* 生合成に関わるタンパク質の働きを確認できないかと考えた。*Indican* を作らない植物 (本実験ではタバコ) に *PtFMO* と *PtIGS* を発現させ、両者が異なる生物の細胞内で *Indican* の合成に働くかどうかを確かめた。結果、タバコに *PtFMO* と *PtIGS* を共発現させることで *Indican* の生合成が確認できた。一方、それぞれを単独で発現させた場合には *Indican* は検出されない。タバコにも多数の FMO や CYP、UGT のアイソザイムが存在するため、*PtFMO* と *PtIGS* の組み合わせが、*Indican* 生合成に必要なことが明らかとなった。タバコはモデル植物であり、遺伝子操作も容易であるため、このシステムは *Indican* 生合成のより詳しいメカニズムや、産物輸送の仕組みを解明するための一つの手段となるかもしれない。さらに、*PtFMO* と *PtIGS* を共発現させたタバコの細胞内を共焦点蛍光顕微鏡で観察すると単独で発現させた場合と異なり、*PtFMO* が ER に加え小胞にも局在するようになる。つまり、その小胞と *Indican* 生合成には関係があり、*PtIGS* は *PtFMO* の局在に何らかの影響を与えていることがわかる。しかし、*PtIGS* 存在下において、どのようにして *PtFMO* は小胞上に局在するようになるのか。また、*PtFMO* は小胞の外側に存在するが、その内腔には何が含まれているのかなど、多くの疑問が残されている。

PtGAPDH は *PtIGS* だけでなく、*PtSUS* とともに相互作用することが明らかとなった。*PtGAPDH* は、*PtIGS* や *PtSUS* と比べ microsome に比較的多く検出された。microsome に局在する *PtGAPDH* は塩やアルカリなどで容易に遊離するため、*PtIGS* や *PtSUS* と会合することにより膜の細胞質側の表面に付着しているのかもしれない。しかし、*PtIGS*、*PtSUS*、*PtFMO* が Proteinase K で容易に分解されるのに対して、*PtGAPDH* はほとんど分解を受けなかった。*Indican* 生合成に関わるメタボロンが存在するならば、複合体内部でのタンパク質の配位が Protease に対する感受性の差を生み出したのかもしれない。Sucrose 密度勾配遠心では *PtCPR* (ER 膜局在) や Actin と沈降パターンが非常によく一致する。さらに、*PtGAPDH* の局在は *PtFMO* とは異なるが、Lat B 処理により Actin filament を破壊すると部分的に共局在を示すようになる (図 42)。植物細胞内で Actin は ER network の形成 (Hamada et al., 2012; Sparkes et al., 2009) や小胞輸送などに密接に関わるため、Lat B 処理により膜輸送系が機能しなくなる。その結果、ER に停滞する *PtFMO* が増え、*PtGAPDH* と共局在するよう

になったのかもしれない。小胞輸送には、膜出芽および標的膜への融合のために活性型 Rab GTPase も必要である。GAPDHには Rab GTPase の一種である Rab2 との相互作用が報告されている (Tisdale et al., 2009)。そのため、*Pt*GAPDH は ER 膜からの膜輸送系に働くことで、Indican 生合成と関わっている可能性を予想している。

本章では細胞内局在の解析により、タデアイ細胞内では Indican 生合成に関わるタンパク質が集合し、メタボロンが形成されていると思われた (図 48)。関連タンパク質が小胞上で会合し、ER や葉緑体を移動する可能性も得られたため、今後、その小胞の内容物や輸送の目的地なども詳しく調べる必要がある。例えば、タデアイ細胞内で蛍光タンパク質の効率的な発現が可能となれば、膜輸送系の研究もより進展するかもしれない。また *Pt*GAPDH のような Indican 生合成経路における機能未知タンパク質を解析するためには、ゲノム編集技術も今後取り入れるべきであると思われる。

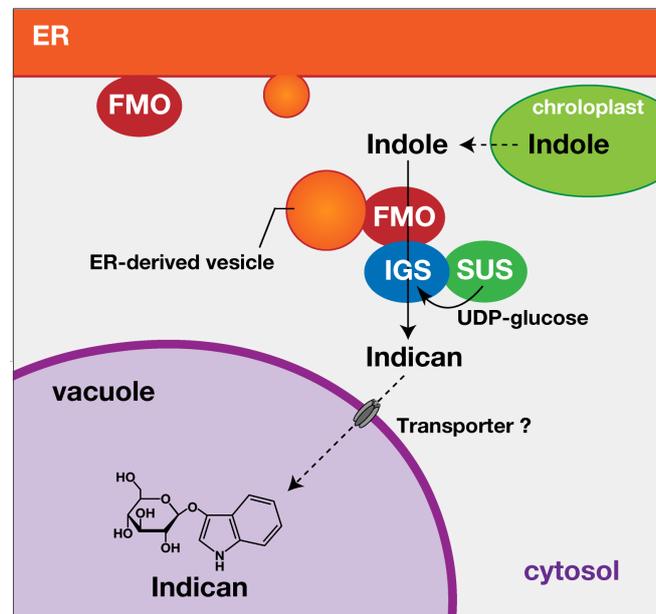


図 48. Indican 生合成に関わるタンパク質の動態の予想図

参考文献

- B.K. Nelson, X. Cai, A. Nebenführ, 2007. A multi-color set of in vivo organelle markers for colocalization studies in Arabidopsis and other plants, *Plant Journal* 51:1126-1136.
- Bassard JE, Richert L, Geerinck J, Renault H, Duval F, Ullmann P, Schmitt M, Meyer E, Mutterer J, Boerjan W, De Jaeger G, Mely Y, Goossens A, Werck-Reichhart D., 2012. Protein-protein and protein-membrane associations in the lignin pathway. *Plant Cell*. 24(11):4465-82.
- Hamada, T., Tominaga, M., Fukaya, T., Nakamura, M., Nakano, A., Watanabe, Y., Hashimoto, T., Baskin, T. I., 2012. RNA processing bodies, peroxisomes, Golgi bodies, mitochondria, and endoplasmic reticulum tubule junctions frequently pause at cortical microtubules. *Plant cell physiology*, 53(4), 699–708.
- Han S, Wang Y, Zheng X, Jia Q, Zhao J, Bai F, Hong Y, Liu Y., 2015. Cytoplasmic Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenases Interact with ATG3 to Negatively Regulate Autophagy and Immunity in Nicotiana benthamiana. *Plant Cell*. 2015 27(4):1316-31.
- Henry E, Fung N, Liu J, Drakakaki G, Coaker G, 2015. Beyond Glycolysis: GAPDHs Are Multi-functional Enzymes Involved in Regulation of ROS, Autophagy, and Plant Immune Responses. *PLoS Genet*. 11(4): e1005199.
- Inoue, S., Morita, R., & Minami, Y., 2021. An indigo-producing plant, *Polygonum tinctorium*, possesses a flavin-containing monooxygenase capable of oxidizing indole. *Biochemical and biophysical research communications* 534, 199–205.
- Inoue, S., Morita, R., Kuwata, K., Ishii, K., & Minami, Y., 2020. Detection of candidate proteins in the indican biosynthetic pathway of *Persicaria tinctoria* (*Polygonum tinctorium*) using protein-protein interactions and transcriptome analyses. *Phytochemistry* 179, 112507.
- Inoue, S., Morita, R., Kuwata, K., Kunieda, T., Ueda, H., Hara-Nishimura, I., Minami, Y., 2018. Tissue-specific and intracellular localization of indican synthase from *Polygonum tinctorium*. *Plant Physiol. Biochem.* 132, 138–144.
- Jin Z, Kim JH, Park SU, Kim SU., 2016. Cloning and characterization of indole synthase (INS) and a putative tryptophan synthase α -subunit (TSA) genes from *Polygonum tinctorium*. *Plant Cell Rep.* 35(12):2449-2459.
- Kriechbaumer V, Botchway SW, Hawes C., 2016. Localization and interactions between Arabidopsis auxin biosynthetic enzymes in the TAA/YUC-dependent pathway. *J Exp Bot.* 67(14):4195-207.
- Krönauer C, Kilian J, Strauß T, Stahl M, Lahaye T., 2019. Cell Death Triggered by the YUCCA-like Bs3 Protein Coincides with Accumulation of Salicylic Acid and Pipecolic Acid But Not of Indole-3-Acetic Acid. *Plant Physiol.* 180(3):1647-1659.
- Mehrshahi P, Stefano G, Andaloro JM, Brandizzi F, Froehlich JE, DellaPenna D., 2013. Transorganellar complementation redefines the biochemical continuity of endoplasmic reticulum and chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 16;110(29):12126-31.
- Minami Y, Takao H, Kanafuji T, Miura K, Kondo M, Hara-Nishimura I, Nishimura M, Matsubara H., 1997. β -Glucosidase in the indigo plant: intracellular localization and tissue specific expression in leaves. *Plant Cell Physiol.* 38(9):1069-74.
- Minami, Y., Nishimura, O., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., Matsubara, H., 2000. Tissue and intracellular localization of indican and the purification and characterization of indican synthase from indigo plants. *Plant Cell Physiol.* 41(2), 218–225.
- Mucha S, Heinzlmeir S, Kriechbaumer V, Strickland B, Kirchhelle C, Choudhary M, Kowalski N, Eichmann R, Hückelhoven R, Grill E, Kuster B, Glawischig E, 2019. The Formation of a Camalexin Biosynthetic Metabolon. *Plant Cell.* 31(11):2697-2710.
- Nakayama T, Takahashi S and Waki T, 2019. Formation of Flavonoid Metabolons: Functional Significance of Protein-Protein Interactions and Impact on Flavonoid Chemodiversity. *Front. Plant Sci.* 10:821.
- Ralston, L., Yu, O., 2006. Metabolons involving plant cytochrome P450s. *Phytochem Rev* 5, 459.
- Sparkes, I.A., Frigerio, L., Tolley, N. and Hawes, C., 2009 The plant endoplasmic reticulum: a cell-wide web. *Biochem. J.* 423: 145–155.
- Tisdale EJ, Azizi F, Artalejo CR., 2009. Rab2 utilizes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and protein kinase C(ζ) to associate with microtubules and to recruit dynein. *J Biol Chem.* 284(9):5876-5884.
- Ueda, H., Yokota, E., Kutuna, N., Shimada, T., Tamura, K., Shimmen, T., Hasezawa, S., Dolja, V.V., Hara-Nishimura, I., 2010. Myosin-dependent endoplasmic reticulum motility and F-actin organization in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 6894–6899.
- Zhang and Fernie, 2020. Metabolons, Enzyme–Enzyme Assemblies that Mediate Substrate Channeling, and Their Roles in Plant Metabolism, *Plant Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100081>

総括

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調べた。第 1 章では Indican 合成酵素 *PtIGS* を同定した。このタンパク質の植物体での発現パターンが Indican 含量と一致し、Indican 生合成に働いていることが示された。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ところ、一部が ER に局在していることがわかった。そのため、*PtIGS* が ER 膜上の monooxygenase と相互作用する可能性が予想された。*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、Indoxyl の生成には monooxygenase が働くと考えられる。しかし、Indoxyl 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。これを防ぐために、*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。

第 2 章では、*PtIGS* と他のタンパク質との相互作用に着目し、Indican 生合成に関与するタンパク質を探索した。結果、microsome 分画からは *PtFMO* が、cytosol 分画からは *PtSUS* が、*PtIGS* と共に検出された。これらの組織別の mRNA 発現量を解析したところ、*PtIGS* と共に、両者は第 1 葉特異的に発現していたため、Indican 生合成に関わる可能性が示唆された。

次に、*PtFMO* の Indole monooxygenase 活性を大腸菌内発現系を利用して調べたところ、Indigo 生成を確認できた (第 3 章)。この Indigo は、Indoxyl が酸化された結果生じたものであり、*PtIGS* を共発現させた系では、ほとんどが Indican へ変換された。このことは、*PtFMO* と *PtIGS* の間で、Indoxyl をスムーズに受け渡していることを示していた。

PtSUS は UDP-glucose 合成酵素としても知られており、生成物が *PtIGS* の基質となるかどうかを *in vitro* での実験で確認した。結果、両者の活性の共役により Indican が生合成された。これらの結果より、Indican 生合成に必要な基質を供給する *PtFMO* と *PtSUS* の同定に成功した。

第 4 章では Indican 生合成に働くタンパク質が、植物細胞内でどのように振る舞うのかを調べた。Indican 生合成には Indoxyl と UDP-glucose の両方が必要であり、*PtIGS*、*PtFMO*、*PtSUS* の 3 者が密接に関わっている必要があると。植物の二次代謝経路で報告されている代謝複合体 (メタボロン) は、特定の膜タンパク質がその Scaffold としての機能を果たす。本研究で同定した Indican 生合成経路のタンパク質はすべて可溶性であるが、いずれも microsome に存在することが細胞分画により明らかとなっている。その中でも、*PtFMO* は膜タンパク質のような挙動を示すため、メタボロンの Scaffold として働く可能性が考えられる。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。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。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。

また、第 2 章での *PtIGS* の相互作用解析では、*PtGAPDH* もかなり有意に検出されていた。*PtGAPDH* の共免疫沈降を行うと、*PtSUS* と結合することが明らかとなったが、現時点では Indican 生合成において、どのような働きがあるのかはわかっていない。*GAPDH* は膜輸送系との関与も報告されていることから、*PtFMO* が形成する小胞などに関係があるかもしれない。

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、*PtGAPDH* の機能などが明らかになることが期待される。

謝辞

本研究では多くの先生方に多大なるご協力を頂きましたことをお礼申し上げます。特に、学部時代から研究全般のご指導を頂きました、南善子先生、森田理日斗先生には深く感謝致します。

博士論文の審査をして頂いた、池田正五先生、濱田隆宏先生、安藤秀哉先生、中井正人先生 (大阪大学蛋白質研究所) からは多くの助言を頂いたことを感謝致します。濱田隆宏先生には個別のディスカッションや実験の指導もして頂き、ありがとうございました。

甲南大学の西村いくこ先生、上田晴子先生、基礎生物学研究所の真野昌二先生には、本研究の遂行において数々のご協力、ご指導を頂きました。桑田啓子先生 (名古屋大学・WPI-ITbM) には MS/MS 解析で、石井一夫先生 (久留米大学) には Transcriptome 解析でお世話になりました。また、中村元直先生には超遠心機の貸出に、濱田研の武井さんには植物での組換えタンパク質の発現系構築にご協力頂きありがとうございました。

最後に、6年間の研究室のメンバーと、長期に渡り大学生活を支えて頂いた家族に、感謝申し上げます。

業績

論文 (査読あり) 学術論文、プロシーディングなど

(学術論文)

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)

1. **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>

論文 (査読なし) 学術論文、紀要、特許など

なし

学会発表

(国際会議)

1. **S. Inoue**, R. Morita, I. Kazuo, Y. Minami, Differential expression of genes related to indican metabolism in *Polygonum tinctorium* leaves. 27th FAOBMB & MSBMB International Conference (IUBMB special symposia) (Poster presentation) (August/2019, Kuala Lumpur, Malaysia)
2. **S. Inoue**, R. Morita, S. T. Thul, B. K. Sarangi, Y. Minami, cDNA cloning and characterization of UDP-glucosyltransferase from *Indigofera tinctoria*. Experimental Biology 2017 (American Society of Biochemistry and Molecular Biology) (Poster presentation) (April/2017, Chicago, USA)

(国内学会)

1. **井上 慎太郎**, 森田 理日斗, 南 善子, タデ科植物アイ *Polygonum tinctorium* 由来 Flavin-containing monooxygenase のインドキシル生合成能の分析 : 第 62 回日本植物生理学会年会・口頭発表 (2021 年 3 月・オンライン開催, 受理済)
2. **井上 慎太郎**, 森田 理日斗, 南 善子, Indican 代謝における Sucrose synthase の分析 : 第 43 回日本分子生物学会大会・ポスター発表 (2020 年 12 月・オンライン開催)
3. 近藤 宏, 中井 綾, 渡邊 崇人, **井上 慎太郎**, 南 善子, 村井 恒治, 宮脇 克行, 光環境の違いがタデアイ (*Polygonum tinctorium*) の生育とインジカン合成にもたらす影響 : 第 43 回日本分子生物学会大会・ポスター発表 (2020 年 12 月・オンライン開催)
4. **井上 慎太郎**, 廣保 順平, 森田 理日斗, 桑田 啓子, 南 善子, Transcriptome 解析とタンパク質間相互作用解析に基づいた Indican 代謝関連タンパク質の探索 : 第 42 回日本分子生物学会大会・ポスター発表 (2019 年 12 月・博多)
5. **井上 慎太郎**, 森田 理日斗, 石井 一夫, 桑田 啓子, 南 善子, Indican 代謝におけるタンパク質間相互作用の解析 : 第 41 回日本分子生物学会大会・ポスター発表 (2018 年 12 月・横浜)
6. **S. Inoue**, R. Morita, K. Kuwata, S.T. Thul, B.K. Sarangi, Y. Minami, Biochemical analysis of indican synthase from *Polygonum tinctorium* : 2017 年度生命科学系学会合同年次大会・ポスター発表 (ConBio2017) (2017 年 12 月・神戸)
7. **井上 慎太郎**, 守屋 俊希, 森田 理日斗, S.T. Thul, B.K. Sarangi, 南 善子, マメ科タイワンコマツナギ (*Indigofera tinctoria*) のインジカン合成酵素 (UDP-glucosyltransferase) の生化学的分析 : 第 89 回日本生化学会大会・ポスター発表 (2016 年 9 月・仙台)