



Title	薬用植物カンゾウにおける UDP-グルコースデヒドロゲナーゼアイソフォームの特性評価
Author(s)	松田, 愛結美
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/96028
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士学位論文

薬用植物カンゾウにおける
UDP-グルコース デヒドロゲナーゼ
アイソフォームの特性評価

松田 愛結美

2023年 3月

大阪大学大学院工学研究科

生命先端工学専攻

目次

第 1 章 緒論.....	8
1.1 はじめに.....	8
1.2 マメ科の薬用植物ウラルカンゾウとその代謝物.....	9
● 薬理成分グリチルリチンの産業利用.....	9
● グリチルリチン生合成を触媒する酵素.....	10
● ソヤサポニンの生合成における UDP-GlcA の重要性.....	12
1.3 UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ (UGD).....	15
● 細胞壁構成糖の生合成における UGD タンパク質の重要性.....	15
● これまでに機能解析された UGD.....	17
● UGD アイソフォームごとの役割.....	21
1.4 本研究の目的.....	22
第 2 章 ウラルカンゾウにおける <i>UGD</i> 遺伝子の同定.....	24
2.1 緒言.....	24
2.2 実験方法.....	24
● ウラルカンゾウの推定 <i>UGD</i> 遺伝子の単離.....	24
○ <i>UGD</i> 遺伝子のマイニング.....	24
○ コーディング配列の単離とエントリークロンの作製.....	25
○ <i>GuUGD</i> が位置するゲノムの特定.....	26
● 大腸菌発現系の検討.....	26
○ 大腸菌発現系の構築.....	26
○ 組換えタンパク質の発現誘導.....	29
○ 組換えタンパク質の抽出と発現確認.....	30
○ 組換えタンパク質の精製.....	31
○ <i>in vitro</i> 酵素活性試験.....	31
● <i>GuUGD</i> アイソフォームの解析.....	32

○ 大腸菌発現系の構築.....	32
○ GuUGD1-5, AtUGD2 組換えタンパク質の発現誘導.....	33
○ GuUGD1-5, AtUGD2 組換えタンパク質の精製.....	33
○ GuUGD1-5 組換えタンパク質の反応物の LC-MS 検出.....	35
○ 至適 pH の測定.....	36
○ 活性阻害の確認.....	36
○ 基質特異性の確認.....	37
○ 速度論的パラメータの測定.....	37
● 転写パターンの解析.....	38
2.3 結果.....	38
● ウラルカンゾウの推定 <i>UGD</i> 遺伝子.....	38
○ 推定 <i>UGD</i> 遺伝子のマイニング.....	38
○ 単離した推定 <i>UGD</i> 遺伝子とコードされるアミノ酸の配列.....	42
○ 推定 <i>UGD</i> 遺伝子のゲノム上の位置.....	48
● 大腸菌発現系の検討.....	49
○ 可溶性画分でタンパク質を調製できた発現系.....	49
○ 活性のあるタンパク質を調製できた発現系.....	51
● GuUGD1-5 アイソフォームの解析.....	52
○ GuUGD1-5 組換えタンパク質の発現.....	52
○ GuUGD1-5 組換えタンパク質の反応物の LC-MS 検出.....	53
○ 至適 pH の測定.....	54
○ 活性阻害の確認.....	56
○ 基質特異性の確認.....	58
○ 速度論的パラメータの測定.....	59
● ウラルカンゾウにおける <i>UGD</i> 遺伝子の転写レベル.....	60
2.4 考察.....	61
● ウラルカンゾウの推定 <i>UGD</i> 遺伝子.....	61

● 大腸菌発現系の検討.....	62
● UGD 組換えタンパク質の発現と酵素活性.....	64
● GuUGD タンパク質と既知の UGD タンパク質の特性の比較.....	65
● GuUGD1-4 アイソフォームの比較.....	72
第 3 章 UGD のサポニン生合成への貢献の解析.....	74
3.1 緒言.....	74
3.2 実験方法.....	76
● <i>GuUGD</i> 遺伝子の近くのゲノム情報の取得.....	76
● ウラルカンゾウ組織培養ストロンの薬剤処理.....	76
● RNA の抽出および first-strand cDNA の合成.....	77
● 定量的リアルタイム PCR (qPCR) 分析.....	77
3.3 結果.....	79
● <i>GuUGD</i> 遺伝子の近くの塩基配列に付けられたアノテーション.....	79
● ジャスモン酸メチルに対する転写応答.....	80
● アブシジン酸に対する転写応答.....	82
3.4 考察.....	84
● ウラルカンゾウのゲノム上で <i>UGD</i> 遺伝子の近くに位置する遺伝子.....	84
● 組織培養ストロンにおける <i>GuUGD1-4</i> 遺伝子の転写パターン.....	84
第 4 章 UGD アイソフォームの特性の解析.....	87
4.1 緒言.....	87
● UGD 分子の進化.....	87
● UGD タンパク質のアミノ酸配列と酵素活性.....	88
4.2 実験方法.....	89
● UGD の系統解析.....	89
○ 植物の推定 UGD タンパク質のマイニング.....	89
○ 系統樹の描写.....	90
○ シンテニーの解析.....	90

○ UGD 遺伝子の転写解析.....	90
● GuUGD と同じクレードに属する推定 UGD タンパク質の機能解析.....	92
○ UGD 遺伝子の単離.....	92
○ 大腸菌発現系を用いた MtUGD 組換えタンパク質の発現.....	92
○ UGD 組換えタンパク質の精製.....	93
○ <i>in vitro</i> 酵素活性試験.....	95
● UGD タンパク質のアミノ酸配列と酵素活性.....	95
○ アミノ酸配列のアライメント解析.....	95
○ GuUGD1-5 タンパク質の 3D モデルの構築.....	96
○ アミノ酸変異を加えた UGD 分子の作製.....	96
○ アミノ酸変異を加えた GuUGD2 の <i>in vitro</i> 酵素活性試験.....	97
○ アミノ酸変異を加えた GuUGD2 タンパク質の 3D モデルの解析.....	98
4.3 結果.....	99
● UGD タンパク質の系統解析.....	99
○ 系統樹解析.....	99
○ UGD 遺伝子の転写解析.....	114
● GuUGD と同じクレードに属する推定 UGD タンパク質の機能解析.....	117
○ UGD 遺伝子の単離.....	117
○ UGD 組換えタンパク質の解析.....	118
● UGD タンパク質のアミノ酸配列と酵素活性.....	120
○ アミノ酸配列のアライメント解析.....	120
○ GuUGD1-5 タンパク質の 3D モデルの解析.....	126
○ アミノ酸変異を加えた GuUGD2 組換えタンパク質の酵素活性.....	130
○ アミノ酸変異を加えた GuUGD2 タンパク質の 3D モデルの解析.....	132
4.4 考察.....	136
● UGD タンパク質の系統解析.....	136
● GuUGD と同じクレードに属する推定 UGD タンパク質の機能解析.....	138

● 酵素活性において重要なアミノ酸残基の探索.....	139
● 酵素活性において重要なアミノ酸残基の特定.....	140
第 5 章 酵母発現系を用いたグリチルリチン生産の評価.....	143
5.1 緒言.....	143
5.2 実験方法.....	144
● 酵母発現系の構築.....	144
● UGD 組換えタンパク質の発現誘導.....	145
● グリチルリチンの抽出.....	145
● LC-MS を用いたプロダクトの分析.....	145
5.3 結果.....	146
5.4 考察.....	147
第 6 章 総括.....	150
● 各章の総括.....	150
● 展望.....	151
引用文献.....	160
本報に関する論文.....	174
謝辞.....	175

第 1 章 緒論

1.1 はじめに

カンゾウ（甘草）は古来より漢方薬として用いられてきた薬用植物である。カンゾウ属に特有の薬理成分であるグリチルリチンおよびその誘導体は、薬用歯磨きや化粧品などの有効成分として用いられている。また、グルクロン酸が 2 分子連続して結合した珍しい構造を持つグリチルリチンは、スクロースの 150 倍の甘味を持つと言われ (Kitagawa et al. 1993), 食品添加物としても用いられる。しかし近年、カンゾウの輸入単価の高騰に伴い、カンゾウおよびグリチルリチンの安定供給が求められている。カンゾウの品種改良やグリチルリチン生合成経路の再構築を行うためには、グリチルリチンの生合成を触媒する酵素および酵素をコードしている遺伝子を特定し、性質を理解する必要がある。グリチルリチンの生合成を触媒する酵素の遺伝子の多くがすでに同定されているが、グルクロン酸を供給する経路の酵素については同定されていなかった。一般に、グルクロン酸の糖転移反応はウリジン 5' ニリン酸 - グルクロン酸 (UDP-GlcA) を糖供与体とすると推定されており (Vogt and Jones 2000), UDP-GlcA は UDP-グルコース (UDP-Glc) から UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ (UGD) の触媒作用によって合成される。UDP-GlcA は、グリチルリチン以外にも、マメ科を代表する植物特化代謝物であるソヤサポニンの生合成や (Tsuno et al. 2018), 一次代謝である細胞壁多糖の生合成にも用いられる (Caffall and Mohnen 2009; Ebringerová et al. 2005; Mohnen 2008). 細胞壁多糖の合成経路において、UGD は律速酵素であると推定されており、これまでの UGD の研究は細胞壁合成における機能に着目して行われてきた。近年のゲノム解析の進歩によって、植物では複数の UGD アイソフォームが機能している可能性があることが示唆された。しかし、同一植物で UGD アイソフォームの性質を比較した研究はシロイヌナズナとトウモロコシでしか報告がなく (Kärkönen et al. 2005; Kärkönen and Fry 2006; Klinghammer and Tenhaken 2007), また、これらの研究は細胞壁の生合成に着目した研究であり、植物特化代謝におけるアイソフォームの機能分化については研究されていない。そこで、本研究ではウラルカンゾウにおいて UGD タンパク質をコードする遺伝子を同定し、アイソフォームの特性を解析することで、ウラルカンゾウの品種改良やグリチルリチン生合成経路の再構築に資する基礎的な知見を得ることを目的とした。また、グルクロン酸で修飾された

化合物 (グルクロニド) には生理活性を持つ化合物も多いことから, UGD 研究のさらなる発展と応用に向けて, UGD アイソフォームの分子進化と特性について考察した.

1.2 マメ科の薬用植物ウラルカンゾウとその代謝物

● 薬理成分グリチルリチンの産業利用

マメ科植物のウラルカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis*) の根やストロン (地下茎) は古くから薬や甘味料として用いられてきた. ウラルカンゾウの薬理成分は, 根やストロンに蓄積されるグリチルリチンであることが知られており (Hayashi and Sudo 2009), グリチルリチンには, 抗潰瘍, 抗ウイルス, 肝保護, 抗遺伝毒性などの生理活性があると報告されている (Isbrucker and Burdock 2006). また, カンゾウ (和名では甘草) の名前の由来となっている甘味もグリチルリチンに由来しており, スクロースの 150 倍甘いといわれるその甘味は (Kitagawa et al. 1993), 構造中のグルクロン酸部分に由来すると推定されている (Esaki et al. 1978; Kitagawa 2002). ウラルカンゾウの根やストロンは漢方薬として用いられ, また, 抽出物のグリチルリチンおよびその誘導体は, 薬用歯磨き類の有効成分, 薬用シャンプー及び薬用リンスの有効成分, 薬用石けんの有効成分などとしても用いられる. また甘味料としては, 醤油や味噌などに食品添加物として加えられる.

日本薬局方で定義されている生薬等のカンゾウは, ウラルカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis* Fischer) またはスペインカンゾウ (*Glycyrrhiza glabra* Linné (*Leguminosae*)) の根及びストロンで, 換算した生薬の乾燥物に対してグリチルリチンを 2.0% 以上を含むものとされている (第十八改正日本薬局方). カンゾウは, 日本国内では一般的に 3 年をかけて栽培されるが, グリチルリチン含有量が日本薬局方の定める基準値に満たないことが多いという課題がある. そのため, 日本で消費されるカンゾウの多くは中国などから輸入された野生のカンゾウであるが, 近年は中国国内での需要の高まりもあり, カンゾウの輸入単価は 1996 年には 1 kg あたり 110 円であったのに対して, 2022 年には約 10 倍の 1,031 円にまで高騰している (財務省貿易統計). このため, カンゾウおよびグリチルリチンの安定供給が望まれており, ストロンの組織培養や (Kojoma et al. 2010), エリシター (植物特化代謝物の合成および植物の防御機構を活

性化する分子) を用いた生合成経路の活性化や (Shabani et al. 2009), 異種宿主を用いた生合成経路の再構築等のアプローチが試みられている (Chung et al. 2020).

● グリチルリチン生合成を触媒する酵素

植物が産生する代謝物は、一次代謝物と植物特化代謝物 (二次代謝物) の大きく 2 種類に分けられ、グリチルリチンは植物特化代謝物である。一次代謝物には、ほぼすべての植物種において生合成される生命維持に必要な糖、タンパク質、脂質、核酸等が含まれる。一方で、植物特化代謝物は、特定の植物種のみで特異的に生合成される代謝物である。植物特化代謝物は天然に 100 万種以上存在すると推定されており (Afendi et al. 2012), 植物が環境に適応するため、あるいは、身を守るために機能していると考えられている (Hamberger and Bak 2013). また、植物特化代謝物の中には生理活性を持つものも多く報告されている。植物特化代謝物は、イソプレンを基本構成単位とするテルペノイド、フェノール基を含むフェニルプロパノイド、窒素原子を含む窒素含有化合物の 3 つのグループに分類され (Schmidt et al. 2007; Hamberger and Bak 2013), グリチルリチンはこのうちテルペノイドに分類される。テルペノイドはさらに、基本構成単位であるイソプレン (C_5) の数に応じてモノテルペノイド (C_{10}), セスキテルペノイド (C_{15}), ジテルペノイド (C_{20}), トリテルペノイド (C_{30}), ポリテルペノイド (C_n) に分類される。グリチルリチンは 30 の炭素からなる骨格を持つトリテルペノイドである。グリチルリチンのように糖修飾されたトリテルペノイドはサポニンと呼ばれ、配糖体の糖以外の部分はアグリコンと呼ばれる。トリテルペノイドは構造に基づいてさらに、オレアナン、スクアレン、ラノスタン、ダンマラン、ルパン、ウルサン、ホパン、その他のグループに分類され (Hill and Connolly 2013), グリチルリチンはオレアナンに分類される。

ウラルカンゾウにおいて推定されているグリチルリチンの生合成経路を図 1-1 に示す。トリテルペノイドは鎖状の 2,3-オキシドスクアレンを共通の前駆体としており (Thimmappa et al. 2014), β -アミリン合成酵素 (β -amyrin synthase) である GubAS (Chen et al. 2013) の触媒によって環状の β -アミリンへ変換されたあと、シトクロム P450 モノオキシゲナーゼ (Cytochrome P450 monooxygenase; CYP) の GuCYP88D6 (Seki et al. 2008) の触媒する C-11 位の酸化と, GuCYP72A154 (Seki et al. 2011) の

触媒する C-30 位の酸化反応によってグリチルレチン酸へ変換される。グリチルリチンはグリチルレチン酸の C-3 水酸基に 2 分子のグルクロン酸 (glucuronic acid; GlcA) が結合した構造を持つが、糖転移反応を触媒する酵素の遺伝子は長年同定されていなかった。GlcA で修飾された化合物はグルクロニドとよばれ、糖供与体にはウリジン 5' ニリン酸 (UDP) -GlcA が用いられると推定されている (Vogt and Jones 2000)。2019年に 2 糖目の GlcA を UDP-GlcA からグリチルレチン酸 3-O-モノグルクロニドへ転移する糖転移酵素 GuUGT73P12 (UDP-glycosyltransferase; Nomura et al. 2019) が同定された。その後、2020 年に 1 糖目の GlcA を UDP-GlcA からグリチルレチン酸へ転移するセルロース合成酵素スーパーファミリー派生糖転移酵素 GuCSyGT (cellulose synthase superfamily-derived glycosyltransferase; Chung et al. 2020) の遺伝子が同定された (なお、CSyGT は同じ年にセルロース合成酵素様酵素 GuCsl (cellulose synthase-like enzyme) としても報告されている; Jozwiak et al. 2020)。以上のように、炭素骨格の生合成および修飾に関わる酵素をコードする遺伝子が同定されてきた。一方で、糖供与体の UDP-GlcA の生合成を触媒する酵素である UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ (図 1-2) の遺伝子は、ウラルカンゾウでは同定されていなかった。

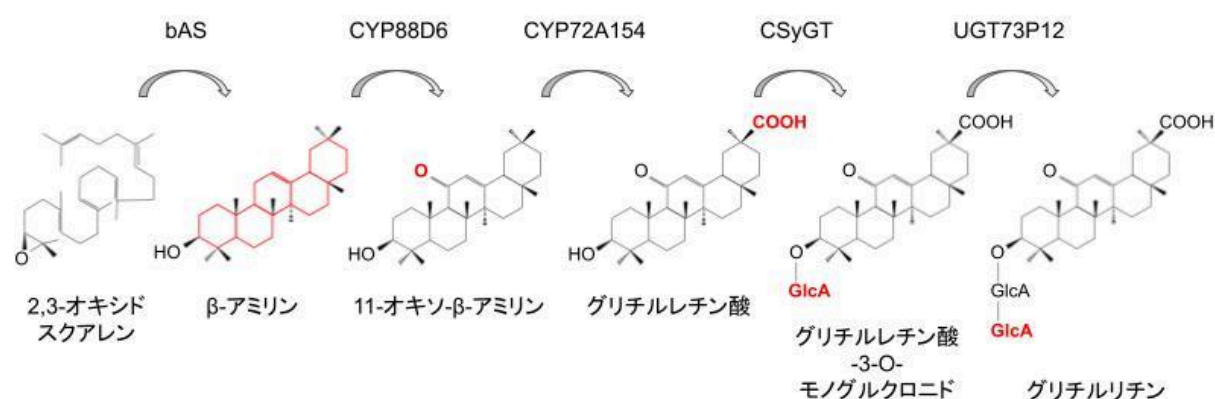


図 1-1 ウラルカンゾウで推定されているグリチルリチンの生合成経路

酵素反応によって変化している構造を赤色で表示する。酵素の略称は次のとおりに記載する。bAS: β -amyrin synthase, CYP88D6: Cytochrome P450 monooxygenase 88D6, CYP72A154: Cytochrome P450 monooxygenase 72A154, CSyGT: cellulose synthase superfamily-derived glycosyltransferase, UGT73P12: UDP-glycosyltransferase 73P12.

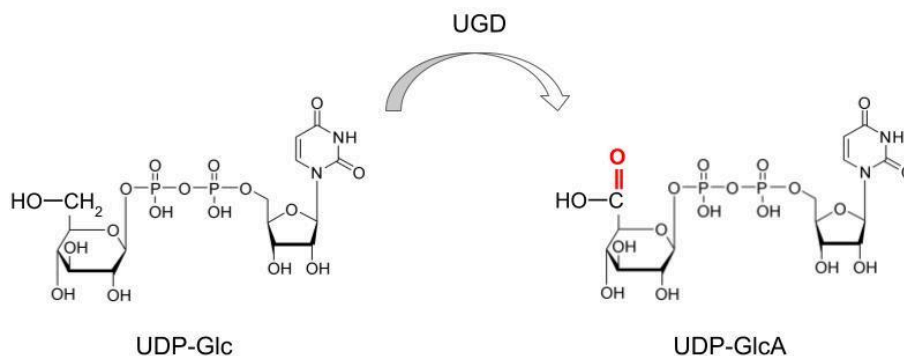


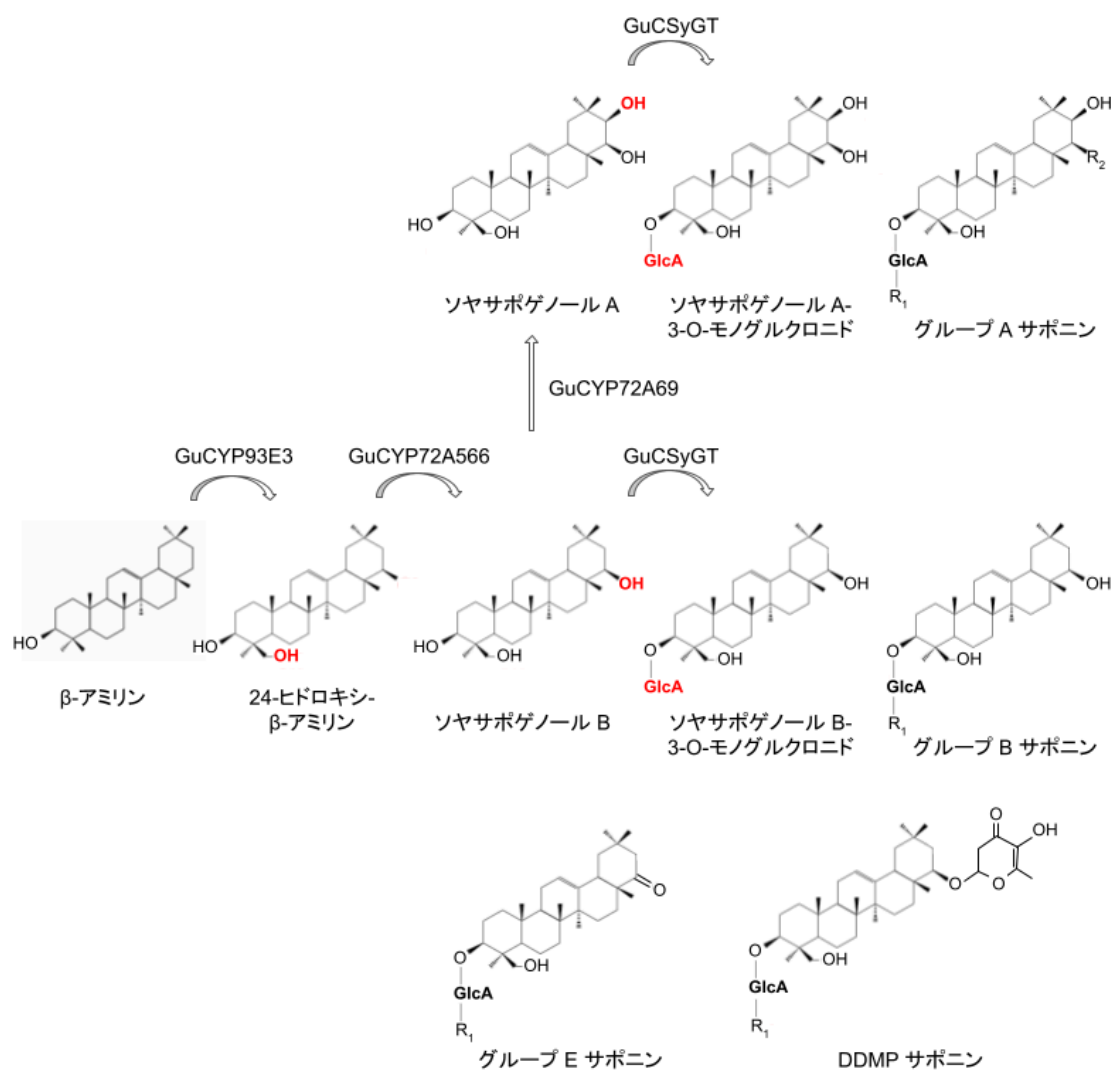
図 1-2 グリチルリチンの糖供与体と推定される UDP-GlcA の生合成

酵素反応によって変化している構造を赤色で表示する. 酵素の略称は次のとおりに記載する. UGD: UDP-glucose dehydrogenase. 代謝物の略称は次のとおりに記載する. UDP-Glc: UDP-glucose, UDP-GlcA: UDP-glucuronic acid.

● ソヤサポニンの生合成における UDP-GlcA の重要性

ソヤサポニン (別名, 大豆サポニンとも呼ばれる) は, 様々なマメ科植物において蓄積される化合物であり (Tsuno et al. 2018), 肝保護や抗肥満など様々な生理活性が報告され, 健康食品などによく用いられる. ソヤサポニンは, グリチルリチンと同じオレアナン型のトリテルペノイドサポニンで, グループ A サポニン, グループ B サポニン, グループ E サポニン, グループ DDMP サポニンの 4 グループからなるトリテルペノイドサポニンの総称である. ソヤサポニンの例とウラルカンゾウにおいて推定されている生合成経路を図 1-3 に示す. β -アミリンは, C-24 位が GuCYP93E3 (Seki et al. 2008) の触媒により酸化されて 24-ヒドロキシ- β -アミリンへ変換されたあと, C-22 β 位が GuCYP72A566 (Tamura et al. 2018) によって酸化されることで, グループ B サポニンのアグリコンであるソヤサポゲノール B へと変換される. グループ A サポニン共通のアグリコンであるソヤサポゲノール A は, ソヤサポゲノール B の C-21 位がさらに GuCYP72A69 の触媒する反応によって酸化された構造を持つ. 一般に, グループ E サポニンは C-21 位に酸素が二重結合した構造を, DDMP サポニンは C-21 位に DDMP (2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one) が結合した構造を持つ. また, ソヤサポニンはどのグループにおいても共通して C-3 位の 1

糖目が GlcA 修飾されているという特徴を持つ (Tsuno et al. 2018). ウラルカンゾウにおける GlcA 転移反応は, グリチルリチンと同じく GuCSyGT (Chung et al. 2020) が触媒すると推定されている. このように, UDP-GlcA はグリチルリチンのみならず, トリテルペノイドサポニンの生合成において重要な糖供与体である.



R ₁	グループA			グループB	グループE	DDMP
	R ₂ : acetyl Xyl-Ara-	R ₂ : acetyl Glc-Ara-	R ₂ : Ara-			
Glc-Gal-	Aa	Ab	A0-αg	Ba	Bd	αg
Rha-Gal-	Au	Ac	A0-βg	Bb	Be	βg
Gal-	Ae	Af	A0-γg	Bb'	Be'	γg
Glc-Ara-	Ax	Ad	A0-αa	Bx	Bf	αa
Rha-Ara-	Ay	Az	A0-βa	Bc	Bg	βa
Ara-	Ag	Ah	A0-γa	Bc'	Bg'	γa

図 1-3 ソヤサポニンの例とウラルカンゾウにおいて推定されている生合成経路

ソヤサポニン生合成経路のうち、ウラルカンゾウで報告されている酵素の触媒する反応を矢印で表示する。また、酵素反応によって変化している構造を赤色で表示する。また、GlcA は太文字で表示している。酵素の略称は次のとおりに記載する。CYP: Cytochrome P450 monooxygenase, CSyGT: cellulose

synthase superfamily-derived glycosyltransferase. 糖の略称はそれぞれ次のとおりに表記する. Ara: Arabinose, Gal: galactose, Glc: glucose, GlcA: glucuronic acid, Rha: rhamnose, Xyl: xylose.

1.3 UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ (UGD)

- 細胞壁構成糖の生合成における UGD タンパク質の重要性

UDP-GlcA は一般に, 1 分子の UDP-グルコース (glucose; Glc) を基質, 2 分子の NAD^+ を補酵素とし, 1 分子の H_2O の消費を伴う, UGD (UDP-glucose dehydrogenase; UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ) の触媒する中間体を放出しない 2 段階の不可逆的な酸化反応によって生合成される (Ge et al. 2004). UDP-GlcA は, グリチルリチンやソヤサポニンのような植物特化代謝物以外にも, 一次代謝物である細胞壁の生合成にも用いられる. 植物の細胞壁には, 一次細胞壁と二次細胞壁がある. 一次細胞壁は, 薄くて柔軟性があり, 細胞分裂の際にすべての植物細胞において合成される細胞壁で, 細胞の成長に合わせて拡大, 伸長する. 二次細胞壁は, 厚くて固く, 成長が止まったあとの一部の細胞 (通水細胞や支持細胞) においてプログラム細胞死にあわせて形成される細胞壁で, 維管束組織や表皮組織などに機械的な強度を与える. 植物種によって割合にばらつきがあるものの, 一次細胞壁は主にセルロース, ヘミセルロース, ペクチンで構成され, 二次細胞壁は, セルロース, ヘミセルロース, リグニンで構成される (Somerville et al. 2004, Caffall and Mohnen 2009). UDP-GlcA はヘミセルロースおよびペクチンを構成する糖の一つである. 図 1-4 に示すように, ヘミセルロースやペクチンは, グルコース (glucose; Glc), ガラクトース (galactose; Gal), ラムノース (rhamnose; Rha), グルクロン酸 (glucuronic acid; GlcA), ガラクツロン酸 (galacturonic acid; GalA), キシロース (xylose; Xyl), アラビノース (arabinose; Ara), アピオース (apiose; Api), マンノース (mannose; Man), フコース (fucose; Fuc) など, 様々な糖から構築される多糖類であり (Caffall and Mohnen 2009; Ebringerová et al. 2005; Mohnen 2008), その糖鎖の伸長反応には, 活性型の糖であるウリジン 5' ニリン酸 (UDP) - 糖やグアノシン 5' ニリン酸 (GDP) - 糖等が用いられる (Caffall and Mohnen 2009; Mohnen 2008). 図 1-5 に示すように, UDP-糖は一般に UDP-Glc を共通の前駆体としている. UDP-Glc は UGD タンパク質の触媒によって UDP-GlcA へ変換され, そこからさらに UDP-Xyl, UDP-Ara, UDP-Api, UDP-GalA へと変換され

ていく (Seifert 2004; Caffall and Mohnen 2009). このため, 多くの UDP-糖の代謝量に UGD タンパク質が関与していることになる. なお, 具体的な細胞壁多糖の構成率の例としては, ダイズ (*Glycine max* L. Merrill) の成熟胚では, 全体の細胞壁多糖の 39% が UDP-GlcA から派生した単糖であると報告されている (Litterer et al. 2006). さらに, UGD タンパク質は多数の糖の生合成に関わるだけでなく, 細胞壁合成における律速酵素でもあると考えられている. これは, 1970–1980 年代に行われた植物抽出液を用いた酵素活性試験において, UGD が糖変換を触媒する一連の酵素群の中で最も低い活性値で検出されたことを根拠としている (Amino et al. 1985; Dalessandro and Northcote 1977). 加えて, UGD タンパク質は生成物である UDP-GlcA や, 代謝経路の下流に位置する UDP-Xyl によってフィードバック阻害を受けることも知られている (Neufeld and Hall 1965). したがって, UGD タンパク質は細胞壁の生合成においても非常に重要な酵素である. このため, これまで植物の UGD タンパク質は細胞壁生合成の観点から機能解析されてきた.

ヘミセルロース

- xylan: 構成 **Xyl**, **GlcA**, **Ara**, **Gal**
- mannan: 構成 **Man**, **Gal**, **Glc**
- β -glucan: 構成 **Glc**
- xyloglucan: 構成 **Xyl**, **Glc**, **Fuc**, **Gal**

ペクチン

- homogalacturonan: 構成 **GalA**
- xylogalacturonan: 構成 **GalA**, **Xyl**
- apiogalacturonan: 構成 **GalA**, **Api**
- rhamnogalacturonan I: 構成 **GalA**, **Rha**, **Gal**, **Ara**, **Fuc**
- rhamnogalacturonan II: 構成 **GalA**, **Rha**, **Fuc**, **Ara**, **Api**, **Gal**, **GlcA**, **Xyl**, **Kdo**, **Dha**, **Ace**

図 1-4 ヘミセルロースとペクチンの種類および構成する糖

UDP-GlcA とその下流に位置する糖を太字で表示する. 糖の略称はそれぞれ次の通りに表記する. Ace: aceric acid, Api: apiose, Ara: Arabinose, Dha: 2-keto-3-deoxy-D-lyxo heptulosaric acid, Fuc: fucose, Gal:

galactose, GalA: galacturonic acid, Glc: glucose, GlcA: glucuronic acid, Kdo: 2-keto-3-deoxy-D-manno octulosonic acid, Man: mannose, Rha: rhamnose, Xyl: xylose.

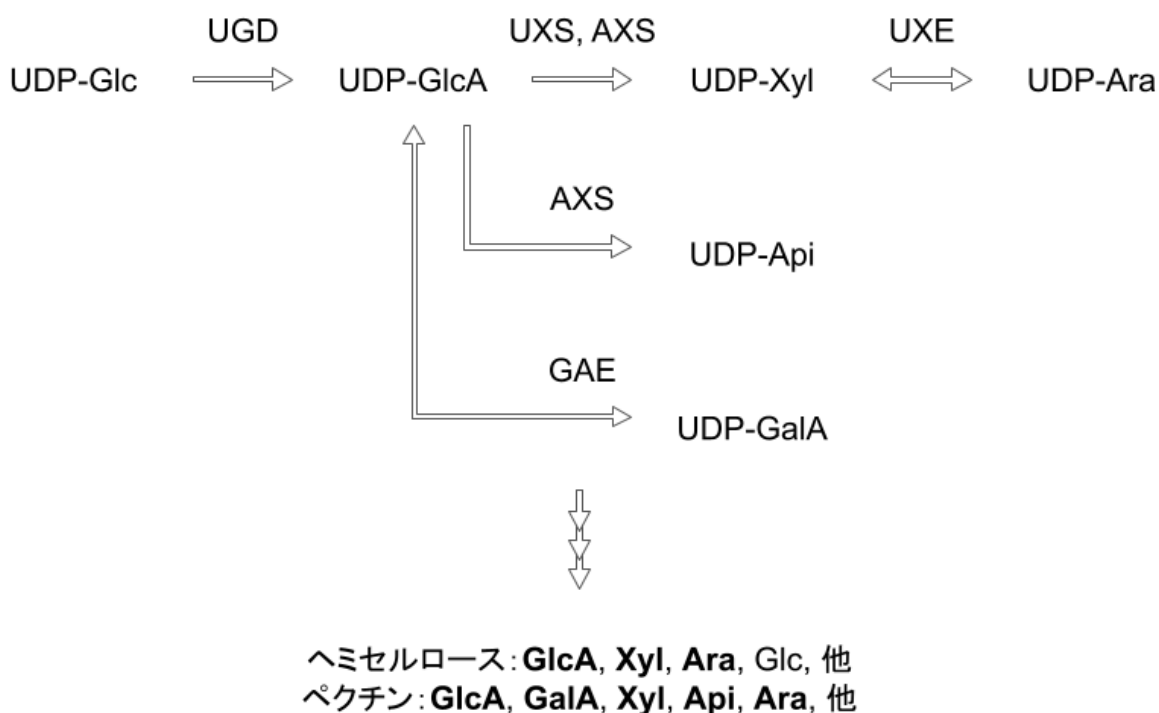


図 1-5 細胞壁多糖の合成に関わるUDP-糖

ヘミセルロースとペクチンを構成する糖のうち、UGD タンパク質が直接あるいは間接的に代謝に関わる糖を太字で表示する。酵素の略称はそれぞれ以下の通りに表記する。AXS: UDP-apiose/UDP-xylose synthase, GAE: UDP-galacturonic acid 4-epimerase, UGD: UDP-glucose dehydrogenase, UGE: UDP-glucose 4-epimerase, UXE: UDP-xylose epimerase, UXS: UDP-xylose synthase. 糖の略称はそれぞれ以下の通りに表記する。Api: apiose, Ara: Arabinose, GalA: galacturonic acid, Glc: glucose, GlcA: glucuronic acid, Xyl: xylose.

● これまでに機能解析された UGD

UGD タンパク質は 1954 年に初めて、ウシの肝臓由来の精製された上清において活性が報告された (Strominger et al. 1954). 単一の UGD タンパク質が精製されたのは、同じくウシの肝臓由来で、1969年である (Zalitis and Feingold 1969). その後、1993 年に初めて、レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) において UGD 遺伝子がク

ローニングされた (Dougherty and van de Rijn 1993). 植物では, 1996 年に初めてダイズの *UGD* 遺伝子がクローニングされている (Tenhaken and Thulke 1996). このほか, これまでに複数の植物種において *UGD* タンパク質あるいは *UGD* 遺伝子が解析されてきた (表1-1). また, 近年はゲノム解析が進み, 植物には複数の *UGD* 遺伝子が存在する可能性が示されている. しかし, *UGD* アイソフォームは互いによく似たサイズとアミノ酸配列を持っているため区別することが難しく, しばらくの間はアイソフォームの確認には至っていなかった (Tenhaken and Thulke 1996, Seitz et al. 2000). 本研究の開始時点でアイソフォームを区別して機能解析されていたのは, トウモロコシ (*Zea mays* L.; Kärkönen et al. 2005; Kärkönen and Fry 2006) と, シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*; Klinghammer and Tenhaken 2007) の研究のみであり, 他の植物種においては活性のある *UGD* アイソフォームを複数持つかについて明らかにされていなかった.

表 1-1 UGD についての報告のある植物種

植物種	研究対象	アイソフォーム	引用文献
エンドウ Pea	苗から精製したタンパク質	区別なし	Strominger and Mapson 1957
テッポウユリ <i>Lilium longiflorum</i>	花粉から精製したタンパク質	区別なし	Davies and Dickinson 1972
インゲンマメ <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	懸濁培養細胞から精製したタンパク質	区別なし	Robertson et al. 1996
ダイズ <i>Glycine max</i> L.	懸濁培養細胞に由来する全 RNA から単離した遺伝子	1 アイソフォーム	Tenhaken and Thulke 1996
コムギ <i>Triticum aestivum</i> L. cv Vulcan	苗から精製したタンパク質	区別なし	Stewart and Copeland 1998
セイヨウアブラナ <i>Brassica napus</i> L. cv Barossa	苗から精製したタンパク質	区別なし	Stewart and Copeland 1998
サトウキビ <i>Saccharum</i> spp. hybrid	茎から精製したタンパク質	区別なし	Turner and Botha 2002

トウモロコシ <i>Zea mays</i> L.	葉から精製したタンパク質	2 アイソフォーム (UDPGDH-A) (UDPGDH-B)	Kärkönen et al. 2005
シロイヌナズナ <i>Arabidopsis thaliana</i>	cDNA ライブラリから単離した遺伝子	1 アイソフォーム (UGD1)	Oka and Jigami 2006
シロイヌナズナ <i>Arabidopsis thaliana</i>	苗に由来する全 RNA から単離した遺伝子	3 アイソフォーム (UGD2) (UGD3) (UGD4)	Klinghammer and Tenhaken 2007
ローズガム <i>Eucalyptus grandis</i>	若木に由来する全 RNA から単離した遺伝子	1 アイソフォーム	Labate et al. 2010

アイソフォームの項目に「区別なし」と記載しているものは、アイソフォームの区別をせずに行われた研究を示す.

● UGD アイソフォームごとの役割

UGD アイソフォームを区別した研究では、UGD のアイソフォームによって異なる性質を持つことが報告されている。例えば、2 つの UGD アイソフォームが報告されているトウモロコシ (*Zea mays* L.) では、*ZmUGD-A* 遺伝子の変異体は野生型と比較して細胞壁多糖中の Xyl と Ara の含有量が低下したが、*ZmUGD-B* 遺伝子の変異体ではそのような変化は見られなかったことから、*ZmUGD-A* が *ZmUGD-B* よりも UDP-GlcA やその下流の UDP-糖の生合成において重要な役割を果たしていると推定されている (Kärkönen et al. 2005)。また、生化学的にも *ZmUGD-A* タンパク質は *ZmUGD-B* タンパク質に比べて高い反応速度 (生体重あたりの V_{max} 値はそれぞれ 900 pkat g^{-1} ($\text{pmol s}^{-1} \text{ g}^{-1}$) と 240 pkat g^{-1}) と UDP-Glc に対する親和性 (K_m 値はそれぞれ $380 \text{ }\mu\text{M}$ と $950 \text{ }\mu\text{M}$) を有していることも報告されている (Kärkönen et al. 2005)。なお、引用元の論文 (Kärkönen et al. 2005) では *ZmUGD-A* は UDPGDH-A (UDP-glucose dehydrogenase) と表記されているが、本論文では UGD と統一して表記した。

4 つの UGD アイソフォームが確認されているシロイヌナズナにおいては、*AtUGD2* が 4 つのアイソフォームの中で最も高い発現レベル (Reboul et al. 2011; Klinghammer and Tenhaken 2007) と UDP-Glc に対する触媒効率 (Klinghammer and Tenhaken 2007) を有することが示されており、また、*AtUGD2* 遺伝子の変異体は野生型と比較してタンパク質グラム当たりの全 UGD 活性が約 30% 低下することが報告されている (Reboul et al. 2011)。一方で、*AtUGD3* 遺伝子の変異体では全 UGD 活性に変化はなかったことから (Reboul et al. 2011)、シロイヌナズナにおいては *AtUGD2* タンパク質が重要な役割を担っていることが推測される。さらに、*AtUGD2* 遺伝子と *AtUGD3* 遺伝子の二重変異体は、細胞壁中の Ara, Xyl, Api の含有量が低下し、*AuUGD2* 遺伝子の一重変異体では見られなかった根やロゼットの矮小が報告されていることから (Reboul et al. 2011)、UGD アイソフォームはそれぞれ異なる生化学的および生理学的特性を有し、複数のアイソフォームが協調的に作用することで、植物体内での機能を発現していると考えられる。以上のように、UGD アイソフォームの細胞壁合成への関与は従来から研究されてきたが、植物特化代謝物の生合成への関与については未解明である。

1.4 本研究の目的

本研究は、ウラルカンゾウの産生するグリチルリチンのより効率的な生産につなげるための基礎となる知見として、ウラルカンゾウの UGD タンパク質をコードする遺伝子の同定を行うことを第一の目的とした。また、植物特化代謝における UGD アイソフォームの貢献度合いの解析、UGD アイソフォームの分子進化の解析、UGD アイソフォームの生化学的な特性が酵母発現系を用いたグリチルリチン生産に与える影響の解析を通して、ウラルカンゾウの品種改良やグリチルリチン生合成経路の再構築に資する基礎的な知見、および、UGD 研究のさらなる発展と応用に向けての知見を得ることを目的とした。これらの目的を達成するために、第 2 章から第 5 章に記す研究を行った。

本研究の第 2 章では、まだ UGD 遺伝子が同定されていなかったウラルカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis*) において、推定 UGD 遺伝子を単離し、タンパク質の機能解析を行った。また、同定したウラルカンゾウの UGD 組換えタンパク質の生化学的特性と UGD 遺伝子の生体における転写レベルを比較することで、ウラルカンゾウの UGD 機能において特に大きな貢献をしている UGD アイソフォームを特定した。

本研究の第 3 章では、グリチルリチン生合成およびソヤサポニン生合成を活性化することが報告されているジャスモン酸メチルおよび UGD 遺伝子の転写が活性化されることが報告されているアブシジン酸をウラルカンゾウの培養ストロンの培地に添加することで、それぞれに対する UGD の遺伝子転写応答を、グリチルリチン生合成あるいはソヤサポニン生合成を触媒する酵素をコードする遺伝子の転写応答と比較し、トリテルペノイドサポニンの生合成における UGD アイソフォームの貢献度合いを考察した。

本研究の第 4 章では、UGD アイソフォームの性質をさらに深く調べるために、UGD の系統樹解析を行った。さらに、複数のオープンデータベースを利用して、クレード間での UGD 遺伝子の転写レベルを比較した。また、ウラルカンゾウの UGD タンパク質と同じクレードに属した植物 UGD タンパク質をコードする遺伝子を新たに同定し、ウラルカンゾウの UGD タンパク質とのアミノ酸配列の比較を通して、

UGD 活性に影響を与える可能性のあるアミノ酸残基を特定した。また、これらの結果から、UGD クレードごとのアイソフォームの特性を考察した。

本研究の第 5 章では、グリチルリチン供給に向けたアプローチの一つである酵母発現系を用いたグリチルリチン生産において、UGD アイソフォームの生化学的特性の違いが影響を与えるかを調べるために、ウラルカンゾウにおいて最も大きい触媒定数を示した GuUGD2 タンパク質と、最も高い基質親和性を示した GuUGD4 タンパク質、および、シロイヌナズナの AtUGD2 タンパク質をコードする遺伝子をグリチルリチン生合成酵素の遺伝子とともに出芽酵母で発現させ、グリチルリチンの生産量を比較した。

第2章 ウラルカンゾウにおける *UGD* 遺伝子の同定

2.1 緒言

ウラルカンゾウではグリチルリチンの生合成を触媒する酵素をコードする遺伝子がすでに同定されているが、*UGD* タンパク質をコードする遺伝子は同定されていなかった。そこで本章ではまず初めに、ウラルカンゾウの *UGD* タンパク質をコードする遺伝子の同定を試みた。一般に、*UGD* タンパク質のアミノ酸配列は、植物、動物、微生物の間で高い同一性を持っている。そこで、すでに機能同定されているシロイヌナズナの *UGD* タンパク質のアミノ酸配列と相同な配列をコードする遺伝子をウラルカンゾウの推定 *UGD* 遺伝子として単離し、機能解析を行った、

2.2 実験方法

- ウラルカンゾウの推定 *UGD* 遺伝子の単離

- *UGD* 遺伝子のマイニング

ウラルカンゾウの推定 *UGD* 遺伝子の Unigene 配列は、モデル植物のシロイヌナズナにおいてすでに機能同定されている *AtUGD1* (GenBank アクセッション番号 AY143922; Oka and Jigami 2006) の遺伝子配列をクエリとして、*G. uralensis* transcriptome data (Ramilowski et al. 2013; <http://ngs-data-archive.psc.riken.jp/Gur/index.pl>) に登録されている 32,840 のタンパク質コーティング配列を対象として、blastx 検索により取得した。

さらに、*AtUGD2-4* (Klinghammer and Tenhaken 2007) の遺伝子配列もクエリとして同トランスクリプトームデータベースで blastx 検索し、他に同一性の高い配列が抽出されないことを確認した。

blastx 検索の結果、部分コーディング配列として検出された Unigene については、共同研究者が rapid amplification of cDNA ends polymerase chain reaction (RACE-PCR) により全長コーディング配列を取得した。この情報をもとに *AtUGD1-4* 遺伝子がコードするタンパク質との同一性を確認した。

○ コーディング配列の単離とエントリークローンの作製

ウラルカンゾウの推定 *UGD* (*GuUGD1-5*) 遺伝子の単離には, 先行研究において構築された, 2011 年 6 月に採取されたウラルカンゾウ 308-19 系統の根に由来する first-strand cDNA ライブラリー (Ramilowski et al. 2013) を使用した. また, プライマー No. 1-10 (表 2-1) と PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (タカラバイオ, 日本滋賀県) を用いて推定 *UGD* 遺伝子を PCR 増幅させたあと, メーカーのプロトコルに従って pENTR™/D-TOPO™ Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, アメリカ合衆国マサチューセッツ州 ウォルサム) に導入して, エントリークローンを作製した. エントリークローンの増幅には *E. coli* HST16CR Competent cells (タカラバイオ) を用いた. なお, 本研究にて単離された塩基配列は, それぞれアクセッション番号 LC528155 (*GuUGD1*), LC528156 (*GuUGD2*), LC528157 (*GuUGD3*), LC528158 (*GuUGD4*), LC528159 (*GuUGD5*) として日本DNAデータバンク (DNA Data Bank of Japan; DDBJ) に登録した.

コントロールとして使用したシロイヌナズナの *AtUGD1* 遺伝子と *AtUGD2* 遺伝子のコーディング配列は, 日本文部科学省のナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) を通じて理化学研究所バイオリソース研究センターから提供された RAFL09-33-I02 cDNA クローンから増幅した.

表 2-1 ウラルカンゾウの推定 *UGD* 遺伝子を単離するために使用したプライマー

No.	配列 (5' to 3')	用途
1	CACCATGGTGAAGATTTGCTGCATTGGA	<i>GuUGD1</i> の単離 (Forward)
2	AGCCACTGCAGGCATGTCCTTGAGCCAA	<i>GuUGD1</i> の単離 (Reverse)
3	CACCATGGTGAAGATTTGCTGCATTGGT	<i>GuUGD2</i> の単離 (Forward)
4	TGCCACAGCTGGCATGTCTTTGAGCCAT	<i>GuUGD2</i> の単離 (Reverse)
5	CACCATGGTGAAGATTTGCTGCATTGGTG	<i>GuUGD3</i> の単離 (Forward)
6	GGCCACAGCTGGCATGTCTTTGAG	<i>GuUGD3</i> の単離 (Reverse)

7	CACCATGATGAAGATTTGTTGCATTGGAGC	<i>GuUGD4</i> の単離 (Forward)
8	GGCCACTACTGCAGGCATGTCCTTGA	<i>GuUGD4</i> の単離 (Reverse)
9	CACCATGGTACTAAAGATCTGTGGAATTG	<i>GuUGD5</i> の単離 (Forward)
10	TGCCTGCTGAGGCATGTTCTTCAGC	<i>GuUGD5</i> の単離 (Reverse)

○ *GuUGD* が位置するゲノムの特定

GuUGD1-5 遺伝子の塩基配列をクエリとして, *G. uralensis* genome database (<http://ngs-data-archive.psc.riken.jp/Gur-genome/index.pl>; Mochida et al. 2017) に対して相同性検索を実施し, 対応する *G. uralensis* gene ID を取得した.

● 大腸菌発現系の検討

○ 大腸菌発現系の構築

大腸菌発現系の検討には, *GuUGD2* 遺伝子と *AtUGD1* 遺伝子を用いて, 4 種類の大腸菌発現ベクター, 2 種類の大腸菌ホスト, 2 種類のシャペロンとの共発現の条件で, 合計 6 種類の組み合わせを試験した (表 2-2).

大腸菌用の発現ベクターは, Gateway 用に改変された pGEX-5x-1 (GE Healthcare Life Sciences, アメリカ合衆国 イリノイ州 シカゴ), Champion™ pET Gateway® Expression Kits with Lumio™ Technology の Gateway® Destination Vector pET161-DEST (Thermo Fisher Scientific), pCold™ I DNA (タカラバイオ), Gateway 用に改変された pCold™ TF DNA (タカラバイオ) の 4 種類を試験した (図 2-1). 大腸菌は One Shot™ BL21 Star™ (DE3) (Thermo Fisher Scientific), Rosetta-gami™ 2(DE3)pLysS (Merck KGaA, ドイツ連邦共和国 ダルムシュタット) の 2 種類を試験した. シャペロンは, *groES-groEL* をコードする Chaperone Plasmid Set の No.2 pGro7 プラスミド (タカラバイオ) と *groES-groEL-tig* をコードする Chaperone Plasmid Set の No.4 pG-Tf2 (タカラバイオ) の 2 種類を試験した (図 2-2).

UGD 遺伝子の発現ベクターへの挿入は, pGEX-5x-1, pET161-DEST, pCold™ TF DNA 発現ベクターについては, Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme mix (Thermo

Fisher Scientific) を用いて行った. pCold™ I DNA については, プライマー No. 11–12 (表 2-3) を用いてエントリークローンから *SacI* と *SaII* 制限酵素サイト付きの *GuUGD2* 遺伝子を増幅させ, *SacI* と *SaII* 制限酵素で処理し, 同じ制限酵素で処理した pCold™ I DNA ベクターへ, In-Fusion® HD Cloning Kit (タカラバイオ) を用いて挿入した.

表 2-2 本研究で使⽤したベクター, 大腸菌, シャペロンの組み合わせ

発現系 No.	ベクター	大腸菌ホスト	シャペロン
1	pGEX-5x-1	One Shot™ BL21 Star™ (DE3)	なし
2	pET161-DEST	One Shot™ BL21 Star™ (DE3)	<i>groES-groEL</i>
3	pCold™ I DNA	Rosetta-gami™ 2(DE3)pLysS	なし
4	pCold™ I DNA	One Shot™ BL21 Star™ (DE3)	<i>groES-groEL-tig</i>
5	pCold™ I DNA	One Shot™ BL21 Star™ (DE3)	<i>groES-groEL</i>
6	pCold™ TF DNA	One Shot™ BL21 Star™ (DE3)	TF

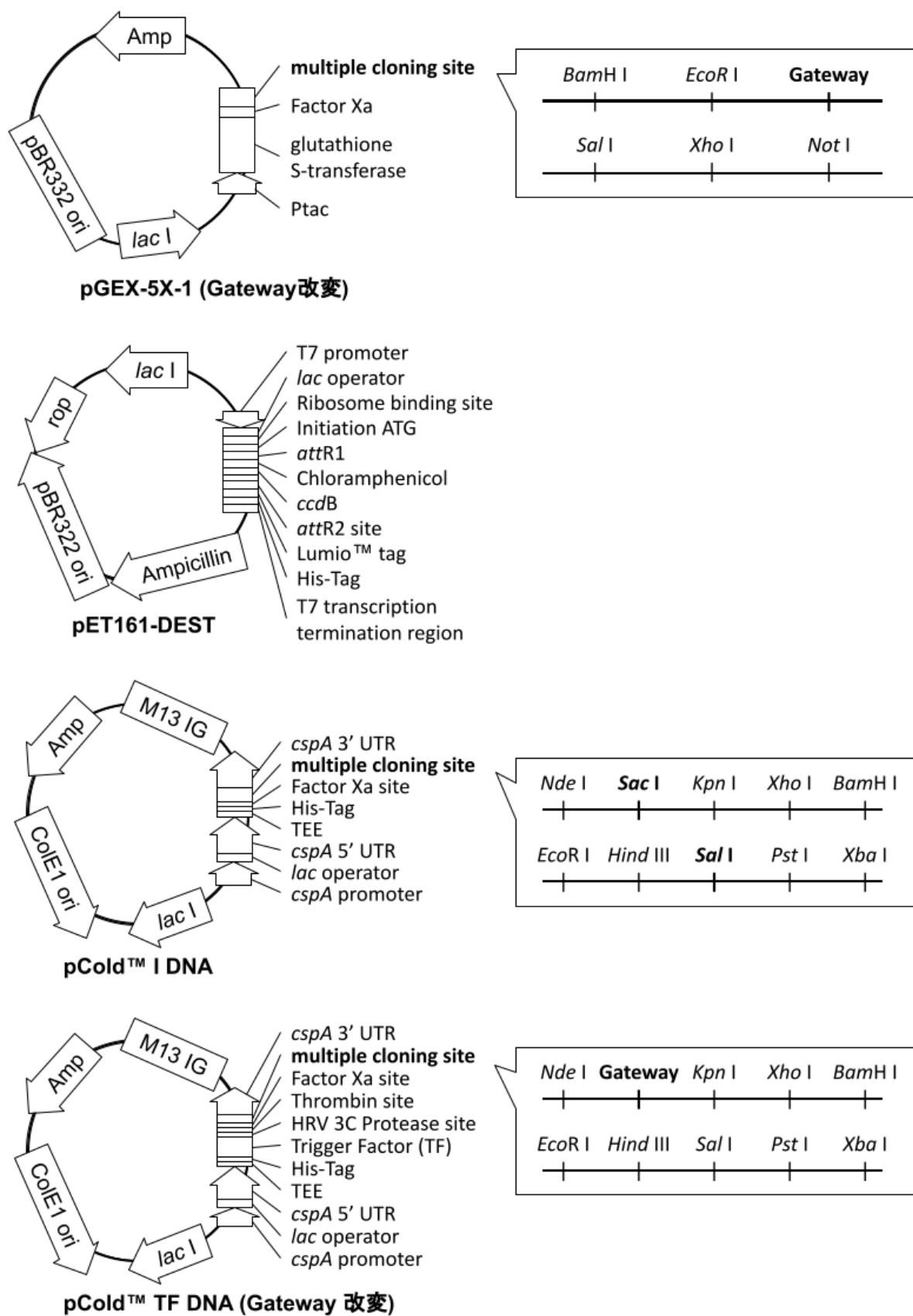


図 2-1 大腸菌発現系の検討で使った発現ベクターのマップ

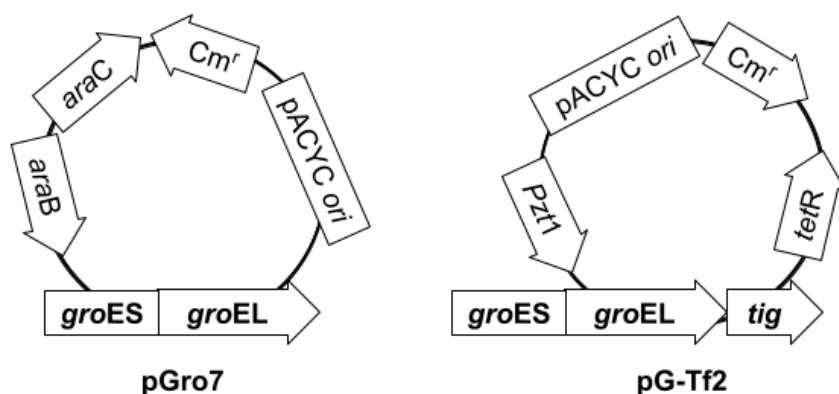


図 2-2 大腸菌発現系の検討で使したシャペロンプラスミドのマップ

表 2-3 *GuUGD2* 遺伝子の In-Fusion クローニングで使したプライマー

No.	配列 (5' to 3')	用途
11	GCACCGAGCTCATGGTGAAGATTTGCTGCAT	<i>GuUGD2</i> In-Fusion (Forward)
12	ACAAAGTCGACTGCCACAGCTGGCATGTCTT	<i>GuUGD2</i> In-Fusion (Reverse)

○ 組換えタンパク質の発現誘導

UGD 組換えタンパク質を回収するために、メーカーのプロトコルに従ってそれぞれの発現系について発現誘導を行った。発現系 No. 1 は終濃度 $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ でアンピシリンを添加した LB 培地にて、 37°C で大腸菌を OD 600 nm 0.6–0.8 になるまで培養し、終濃度 $50\text{--}300 \mu\text{M}$ となるよう isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加したあと、 $20\text{--}25^\circ\text{C}$ にて 1 日培養することでタンパク質の発現を誘導した。発現系 No. 2 は終濃度 $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ でアンピシリンを、終濃度 $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ でクロラムフェニコールを添加した LB 培地にて、大腸菌を OD 600 nm 0.5–0.8 になるまで培養し、終濃度 $500\text{--}1000 \mu\text{M}$ で IPTG を、終濃度 0.5 mg ml^{-1} で L-アラビノースを添加したあと、 23°C にて 1 日培養することでタンパク質の発現を誘導した。発現系 No. 3 は終濃度 $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ でアンピシリンを添加した LB 培地にて、大腸菌を OD 600 nm 0.2–0.8 になるまで培養し、終濃度 $50\text{--}600 \mu\text{M}$ で IPTG を添加したあとに、 15°C に

て 1 日培養することでタンパク質の発現を誘導した. 発現系 No. 4 は終濃度 $100\ \mu\text{g}\ \text{ml}^{-1}$ でアンピシリンを, 終濃度 $20\ \mu\text{g}\ \text{ml}^{-1}$ でクロラムフェニコールを添加した LB 培地にて, 大腸菌を OD 600 nm 0.2–0.8 になるまで培養し, 終濃度 50–600 μM で IPTG を, 終濃度 $1\text{--}5\ \text{ng}\ \text{ml}^{-1}$ でテトラサイクリンを添加したあと, $15\ ^\circ\text{C}$ にて 1 日培養することでタンパク質の発現を誘導した. 発現系 No. 5 は終濃度 $100\ \mu\text{g}\ \text{ml}^{-1}$ でアンピシリンを, 終濃度 $20\ \mu\text{g}\ \text{ml}^{-1}$ でクロラムフェニコールを添加した LB 培地にて, 大腸菌を OD 600 nm 0.2–0.8 になるまで培養し, 終濃度 50–600 μM で IPTG を, 終濃度 $0.5\ \text{mg}\ \text{ml}^{-1}$ で L-アラビノースを添加したあと, $15\ ^\circ\text{C}$ にて 1 日培養することでタンパク質の発現を誘導した. 発現系 No. 6 は終濃度 $100\ \mu\text{g}\ \text{ml}^{-1}$ でアンピシリンを添加した LB 培地にて, 大腸菌を OD 600 nm 0.15–0.4 になるまで培養し, 終濃度 300 μM で IPTG を添加したあとに, $15\ ^\circ\text{C}$ にて 1 日培養することでタンパク質の発現を誘導した. いずれの発現系についても, タンパク質の発現を誘導したあと, 遠心分離により培地を除き, 細胞を凍結保存した.

○ 組換えタンパク質の抽出と発現確認

凍結した細胞 1 g (fresh weight) あたりに, よく冷却した溶解バッファー (10 mM Tris, 50 mM リン酸ナトリウム, 2 mM MgCl_2 , 10% [v/v] グリセロール, 1 mM NAD^+ , 2 mM 2-メルカプトエタノール, $1\times$ cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche, スイス バーゼル); pH 8.0) 10 ml を加えて懸濁した. 終濃度 $200\ \mu\text{g}\ \text{ml}^{-1}$ でリゾチームを, 終濃度 1% [v/v] で Nonidet P-40 を細胞懸濁液に添加し, $4\ ^\circ\text{C}$ にて 30 分間ゆっくり振盪した. さらに終濃度 $2.4\ \text{U}\ \text{ml}^{-1}$ で Benzonase® ヌクレアーゼ (Sigma-Aldrich, アメリカ合衆国 ミズーリ州 セントルイス) を添加し, $4\ ^\circ\text{C}$ にて 15 分間ゆっくり振盪した. これを, 大腸菌のデブリを取り除く前の溶菌液に尿素を加えて懸濁した液 (Lysate), 遠心分離 (10 min, $9500\times g$) によって大腸菌のデブリを取り除いたあとの上清 (Supernatant), 大腸菌のペレットに尿素を加えて懸濁した液 (Pellet) に分けた.

UGD 組換えタンパク質の発現状況は, TGX Stain-Free FastCast Acrylamid Kit, 10% (BIO RAD) (ナカライテスク, 日本 京都府) を用いて sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行い, Coomassie Brilliant

Blue (CBB) 染色したゲル中に UGD 組換えタンパク質に相当するサイズのバンドが見られるか否かで評価した。

○ 組換えタンパク質の精製

組換えタンパク質の精製は、精製バッファー (10 mM Tris, 50 mM リン酸ナトリウム, 300 mM NaCl, and 10% グリセロール; pH 8.0) で平衡化した TALON® Metal Affinity Resin (Clontech Laboratories, アメリカ合衆国 カリフォルニア州 マウンテンビュー) を用いて、batch/gravity-flow 法にて行った。大腸菌デブリを除去した上清に、終濃度 250 mM で NaCl を添加してレジンにアプライした。結合していないタンパク質は、レジンの 10 倍量の精製バッファーでカラムを洗浄して除去した。また、弱く結合しているタンパク質は、終濃度 10 mM でイミダゾールを添加した、レジンの 5 倍量の精製バッファーで溶出させた。UGD 組換えタンパク質は、終濃度 100 mM でイミダゾールを添加した精製バッファーで溶出させた。その後、精製バッファーの残量が 0.5% 以下となるよう、Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices の Amicon® Ultra 100K device (Millipore, アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 バーリントン) を用いた限外濾過により、溶出液を速やかに保存バッファー (20 mM Tris, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 10% [v/v] グリセロール, 0.5 mM NAD^+ ; pH 8.0) に移し替え、約 50 μl に濃縮して $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保存した。UGD 組換えタンパク質の濃度は、SDS-PAGE を行ったゲルを CBB 染色して、同時に泳動した濃度既知の BSA のバンド強度を基準として、UGD 組換えタンパク質に相当するサイズのバンドの強度をもとに算出した。

○ *in vitro* 酵素活性試験

酵素活性は、UGD 触媒作用によって UDP-Glc が UDP-GlcA へ変換されると同時に、補酵素 NAD^+ (波長 340 nm を吸収しない) が NADH (波長 340 nm におけるモル吸光度係数は $6.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) へと変換されることを利用して、波長 340 nm における吸光度の時間依存的な増加を Infinite® 200PRO multimode microplate reader (TECAN Austria GmbH, スイス チューリッヒ州 メンネドルフ) を用いて測定することで評価した。

発現系 No. 5 は, UDP-Glc (Cayman chemical, アメリカ合衆国 ミシガン州 アナーバー) を終濃度 16 μ M, 160 μ M, あるいは 800 μ M, NAD⁺ (オリエンタル酵母, 日本東京都) を終濃度 100 μ M, EDTA を終濃度 1 mM, グリセロールを終濃度 10%, Tris を終濃度 20 mM, pH を 8.7 に調製した全体量 100 μ l の反応液に, 精製した組換えタンパク質を 1 μ g 添加して反応を開始し, 25 $^{\circ}$ C にて反応を測定した. 吸光度は 0 μ M の UDP-Glc を添加した反応液における吸光度で補正した.

発現系 No. 6 は, UDP-Glc を終濃度 250 μ M あるいは 2500 μ M, NAD⁺ を終濃度 500 μ M, EDTA を終濃度 1 mM, グリセロールを終濃度 10%, Tris を終濃度 20 mM, pH を 8.7 に調製した全体量 100 μ l の反応液に, 精製した組換えタンパク質を 10 μ g 添加して反応を開始し, 25 $^{\circ}$ C にて反応を測定した. 吸光度は 0 μ M の UDP-Glc を添加した反応液における吸光度で補正した.

● GuUGD アイソフォームの解析

○ 大腸菌発現系の構築

大腸菌発現系の検討結果を受けて, UGD アイソフォームの解析では発現系 No. 5 (表 2-2) を採用した. *GuUGD1-5* 遺伝子と *AtUGD2* 遺伝子をエントリークローンからプライマー No. 13-21 (表 2-4) を用いて *Sac*I と *Sa*II 制限酵素サイトを付けた形で PCR 増幅させ, *Sac*I と *Sa*II 制限酵素で処理した. その後, 同じく *Sac*I と *Sa*II 制限酵素サイトで切断した pCold™ I DNA (タカラバイオ) へ In-Fusion® HD Cloning Kit (タカラバイオ) を用いて挿入し, pGro7 プラスミド (タカラバイオ) とともに大腸菌 One Shot™ BL21 Star™ (DE3) (Thermo Fisher Scientific) へ導入した.

表 2-4 *GuUGD* 遺伝子の In-Fusion クローニングで使用したプライマー

No.	配列 (5' to 3')	用途
13	AAGGTAGGCATATGGAGCTCATGGTGAAGATTTGCTGCAT	<i>GuUGD1</i> および <i>GuUGD3</i> In -Fusion (Forward)
14	TAGACTGCAGGTCGACAGCCACTGCAGGCATGTC	<i>GuUGD1</i> In -Fusion (Reverse)

15	TAGACTGCAGGTCGACGGCCACAGCTGGCATGTC	<i>GuUGD3</i> In -Fusion (Reverse)
16	AAGGTAGGCATATGGAGCTCATGATGAAGATTTGTTGCATTG	<i>GuUGD4</i> In -Fusion (Forward)
17	TAGACTGCAGGTCGACGGCCACTACTGCAGGCAT	<i>GuUGD4</i> In -Fusion (Reverse)
18	AAGGTAGGCATATGGAGCTCATGGTACTAAAGATCTGTGG	<i>GuUGD5</i> In -Fusion (Forward)
19	TAGACTGCAGGTCGACTGCCTGCTGAGGCATGTT	<i>GuUGD5</i> In -Fusion (Reverse)
20	AAGGTAGGCATATGGAGCTCATGGTGAAGATATGTTGTATTG	<i>AtUGD2</i> In -Fusion (Forward)
21	TAGACTGCAGGTCGACGGCAACGGCAGGCATGTC	<i>AtUGD2</i> In -Fusion (Reverse)

GuUGD2 遺伝子の In-Fusion クローニングで使用したプライマーについては表 2-3 を参照すること。

○ *GuUGD1*–5, *AtUGD2* 組換えタンパク質の発現誘導

終濃度 0.5 mg ml^{-1} で L-アラビノース, $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ でクロラムフェニコール, $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ でアンピシリンを添加した LB 培地にて, 37°C で OD 600 nm 0.4–0.8 になるまで大腸菌を培養した. 培養液を 15°C にて 30 分間冷却したあと, 終濃度 $500 \mu\text{M}$ となるように IPTG を添加してタンパク質の発現を誘導した. 15°C で 1 日培養したあと, 氷上で振盪しながら冷却し, 遠心分離 (4°C , 10 min, $4500 \times g$) によって細胞を回収して, 液体窒素で凍結した.

○ *GuUGD1*–5, *AtUGD2* 組換えタンパク質の精製

凍結した細胞 1 g (fresh weight) あたりに, よく冷却した溶解バッファー (10 mM Tris, 50 mM リン酸ナトリウム, 2 mM MgCl_2 , 10% [v/v] グリセロール, 1 mM NAD^+ , 2 mM 2-メルカプトエタノール, $1 \times \text{cOmplete}^{\text{TM}}$ Protease Inhibitor Cocktail; pH 8.0) 10 ml を加えて懸濁した. 終濃度 $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ でリゾチームを, 終濃度 1% [v/v] で Nonidet P-40 を細胞懸濁液に添加し, 4°C にて 30 分間ゆっくり振盪した. さらに終濃度 2.4 U ml^{-1} で Benzonase® ヌクレアーゼ (Sigma-Aldrich) を添加し, 4°C にて 15 分間ゆっくり振盪した. 大腸菌のデブリを遠心分離 (10 min, $9500 \times g$) によって取り除き, 上清を回収した.

組換えタンパク質の精製は、精製バッファー (10 mM Tris, 50 mM リン酸ナトリウム, 300 mM NaCl, and 10% グリセロール; pH 8.0) で平衡化した TALON® Metal Affinity Resin (Clontech Laboratories) を用いて, batch/gravity-flow 法にて行った. 大腸菌デブリを除去した上清に, 終濃度 250 mM で NaCl を添加してレジンにアプライした. 結合していないタンパク質は, レジンの 10 倍量の精製バッファーでカラムを洗浄して除去した. また, 弱く結合しているタンパク質は, 終濃度 10 mM でイミダゾールを添加したレジンの 5 倍量の精製バッファーで溶出させた. UGD 組換えタンパク質は, 終濃度 100 mM でイミダゾールを添加した精製バッファーで溶出させた. UGD 活性は NaCl によって阻害を受けることが知られているため, 精製バッファーの残量が 0.5% 以下となるよう, Amicon® Ultra 100K device (Millipore) を用いた限外濾過により, 溶出液を速やかに保存バッファー (20 mM Tris, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 10% [v/v] グリセロール, 0.5 mM NAD⁺; pH 8.0) に移し替え, 約 50 μ l に濃縮して -80 °C で保存した.

組換えタンパク質が精製した溶液に含まれているかは, GuUGD1-5 組換えタンパク質と AtUGD2 組換えタンパク質の N 末端に付加された pCold™ I DNA 発現ベクターに由来する His-タグがウェスタンブロッティングによって検出されるかで評価した. Criterion™ TGX Stain-Free™ プレキャストゲル (Bio-Rad Laboratories, アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ハーキュリーズ) に精製した GuUGD1-5 組換えタンパク質溶液をアプライし, 電気泳動装置 Criterion™ セル (Bio-Rad) を用いて SDS-PAGE を行った. その後, セミドライ式ブロッティング装置のトランスブロット Turbo 転写システム (Bio-Rad Laboratories) を用いてブロッティング膜へ転写し, 5% スキムミルクを含む t-TBS (10 mM Tris, 0.9% NaCl, 0.05%(w/v) Tween20; pH 7.4) でブロッキングを行い, 1% スキムミルクを含む t-TBS で 5000 倍希釈した Anti-His-tag mAb-HRP-DirecT (医学生物学研究所, 日本 東京都) を用いて His-タグを標的とする抗体反応を行った. その後, Chemi-Lumi One Super (ナカライテスク) で発光させ, 目的サイズ付近にバンドが見られるかを確認した.

精製した GuUGD1-5 組換えタンパク質の純度は, Criterion™ TGX Stain-Free™ プレキャストゲルに含まれるトリハロ化合物がタンパク質内のトリプトファン残基と結合し, UV光の照射により蛍光することを利用して, UV 照射したゲルに目的サイズ以外のバンドが見られるかで評価した. また, 精製した GuUGD1-5 組換えタンパク

質の濃度は、SDS-PAG を行ったゲルを CBB 染色して、同時に泳動した濃度既知の BSA のバンド強度を基準として、目的サイズのバンドの強度をもとに計算した。

○ GuUGD1-5 組換えタンパク質の反応物の LC-MS 検出

GuUGD1-5 アイソフォームの活性については、LC-MS を用いて反応生成物から標準試料として用いた UDP-GlcA (ナカライテスク) と同じ m/z と保持時間を示すピークが検出されるかで確認した。LC-MS では、終濃度 2 mM の UDP-Glc と 600 μM の NAD^+ を含む 100 μl のアッセイバッファー (20 mM Tris, 1 mM EDTA, 10% [v/v] グリセロール; pH 8.7) に、室温にて保存バッファー (20 mM Tris, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 10% [v/v] グリセロール, 0.5 mM NAD^+ ; pH 8.0) 中で 90 分間インキュベートした GuUGD1-5 組換えタンパク質と AtUGD2 組換えタンパク質をそれぞれ 1 μg ずつ添加して、25 $^{\circ}\text{C}$ で 1 日インキュベートした反応物を分析した。コントロールには、同様の発現誘導および精製処理を行った空ベクターを導入した大腸菌から抽出したタンパク質溶液を、UGD タンパク質溶液と同程度の容量 (10 μl) 用いた。反応生成物は HPLC グレードの水で 10 倍に希釈し、孔径 0.2 μm の GLクロマトディスク水系型式 4A フィルター (ジューエルサイエンス, 日本 東京都) を通したあと、5 μl をタンデム四重極検出器付き ACQUITY™ Ultra-Performance LC システム (Waters, アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ミルフォード) を用いて、75 $^{\circ}\text{C}$ に維持した ACQUITY UPLC BEH Amide カラム (1.7 μm , 2.1 $\times$ 150 mm; Waters) での親水性相互作用クロマトグラフィーにより分析した。移動相は、アセトニトリル/水 (50:50) に 10 mM のトリエチルアミンアセテートを加えたものを使用した。流速は 0.4 ml min^{-1} とした。化合物はマイナスイオンモードのエレクトロスプレーイオン化法でイオン化した。マススペクトルは、100–750 m/z の範囲で記録した。質量分析計の設定は、キャピラリー電圧 +3.5 kV, コーン電圧 45 V, ソース温度 150 $^{\circ}\text{C}$, デソルベーション温度 450 $^{\circ}\text{C}$, コーンガスフロー 50 L h^{-1} , デソルベーションガスフロー 450 L h^{-1} とした。データの取得と解析には、MassLynx (ver.4.1, Waters) を使用した。

○ 至適 pH の測定

至適 pH を測定するために、室温にて保存バッファー (20 mM Tris, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 10% [v/v] グリセロール, 0.5 mM NAD^+ ; pH 8.0) 中で 90 分間インキュベートした 1 μg の GuUGD1-4 組換えタンパク質を, 2500 μM の UDP-Glc, 1000 μM の NAD^+ を含む 100 μl のアッセイバッファー (20 mM Tris, 1 mM EDTA, 10% [v/v] グリセロール) に添加して, pH 4, 6, 8, 10 にて 1 回ずつ波長 340 nm における吸光度の変化をモニタリングし, 反応速度を分析した. より詳細な pH については, 500 μM の UDP-Glc, 1000 μM の NAD^+ 存在下で, 0.5 μg の GuUGD4 組換えタンパク質を用いて, pH を 7.1 から 10.6 の間で小刻みに変化させて 3 回ずつ測定した. なお, pH 9.0–10.6 の範囲では, トリス系のアッセイバッファーの代わりにグリシン系のアッセイバッファー (20 mM glycine, 1 mM EDTA, 10% [v/v] グリセロール) を用いた.

○ 活性阻害の確認

NaCl に対する活性阻害の確認は, 阻害剤を添加していない標準酵素アッセイ (1 μg GuUGD2 組換えタンパク質, 50 μM UDP-Glc, 100 μM NAD^+ , 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 10% [v/v] グリセロール; pH 8.4) の測定開始 10 分間の波長 340 nm の吸光度変化から算出した初速度を 100% として, 250 mM あるいは 1000 mM の NaCl を添加した酵素アッセイでの初速度を比較することで評価した. なお, NaCl は反応開始直前に添加した. 反応はそれぞれの条件で 1 回行った.

フィードバック阻害に対する活性阻害の確認は, 阻害剤を添加していない標準酵素アッセイ (500 μM NAD^+ , 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 10% [v/v] グリセロール; pH 8.7) の測定開始 10 分間の初速度を 1 として, 20 μM あるいは 500 μM の UDP-Xyl (BIOSYNTH CARBOSYNTH, イングランド バークシャー), もしくは, 20 μM あるいは 1250 μM の UDP-GlcA (ナカライテスク) を添加した酵素アッセイの初速度とを比較した. なお, UDP-Glc は速度論的パラメータの解析で算出した各 K_m 値の 2 倍の濃度で用い, 酵素は室温にて 90 分インキュベーションしたあと, 標準酵素アッセイ

での変換速度が $0.01\text{--}0.1\ \mu\text{M s}^{-1}$ の範囲になるように調整して添加した。なお、それぞれの反応は 1 回ずつ行った。

○ 基質特異性の確認

各アイソフォームの基質特異性は、UDP-Glc と NAD^+ をそれぞれ基質および補酵素として含む反応液 ($500\ \mu\text{M}$ UDP-Glc, $500\ \mu\text{M}$ NAD^+ , $20\ \text{mM}$ Tris, $1\ \text{mM}$ EDTA, 10% [v/v] グリセロール; pH 8.7, 総量 $100\ \mu\text{l}$) を標準として、波長 $340\ \text{nm}$ における測定開始 10 分間の吸光度変化をもとに初速度を比較することで評価した。UDP-Glc 以外の糖ヌクレオチドには、UDP-ガラクトース (BIOSYNTH CARBOSYNTH), UDP-N-アセチルグルコサミン (Cayman chemical), TDP-Glc (BIOSYNTH CARBOSYNTH), ADP-Glc (BIOSYNTH CARBOSYNTH), GDP-Glc (BIOSYNTH CARBOSYNTH) をそれぞれ終濃度 $500\ \mu\text{M}$ で使用した。また、 NAD^+ 以外の補酵素として、 NADP^+ (Sigma-Aldrich) を終濃度 $500\ \mu\text{M}$ で使用した。GuUGD1–5 組換えタンパク質は室温にて保存バッファー ($20\ \text{mM}$ Tris, $50\ \text{mM}$ KCl, $0.1\ \text{mM}$ EDTA, 10% [v/v] グリセロール, $0.5\ \text{mM}$ NAD^+ ; pH 8.0) 中で 90 分間インキュベートしたあと、各アイソフォームごとに、UDP-Glc と NAD^+ を用いた標準酵素アッセイでの初速度が $0.01\text{--}0.1\ \mu\text{M s}^{-1}$ の範囲になるように調整して添加した。なお、標準アッセイで初速度を算出できなかった GuUGD5 組換えタンパク質は、GuUGD4 組換えタンパク質と同じ質量になるように添加した (精製した GuUGD5 組換えタンパク質は濃度が低かったため、液量にすると GuUGD4 組換えタンパク質溶液の 20 倍の容量を添加した)。測定はそれぞれ 1 回行った。

○ 速度論的パラメータの測定

速度論的パラメータを決定するために、高濃度の NAD^+ ($1\ \text{mM}$) と様々な濃度の UDP-Glc ($0\text{--}2000\ \mu\text{M}$), または様々な濃度の NAD^+ ($5\text{--}1305\ \mu\text{M}$) と高濃度の UDP-Glc ($2\ \text{mM}$) の条件下で酵素反応を行った。室温にて保存バッファー ($20\ \text{mM}$ Tris, $50\ \text{mM}$ KCl, $0.1\ \text{mM}$ EDTA, 10% [v/v] グリセロール, $0.5\ \text{mM}$ NAD^+ ; pH 8.0) 中で 90 分間インキュベートした $1\ \mu\text{g}$ の GuUGD1–4 組換えタンパク質を $100\ \mu\text{l}$ の

アッセイバッファー (20 mM Tris, 1 mM EDTA, 10% [v/v] グリセロール; pH 8.7) に添加して, 25 °C にて波長 340 nm における吸光度の変化を 5 分間測定して算出した初速度をもとに, Python を用いてガウス・ニュートン法に基づく非線形最小二乗法から速度論的パラメータを算出した. なお, 測定は triplicate で行った.

● 転写パターンの解析

GuUGD1-5 遺伝子に対応する Unigene の転写データは, *G. uralensis* transcriptome data (Ramilowski et al. 2013, <http://ngs-data-archive.psc.riken.jp/Gur/index.pl>) において公開されている fragments per kilobase of exon per million mapped reads (FPKM) を参照した. なおこのデータは, *G. uralensis* の夏に採取された根, 冬に採取された根, および, 夏に採取された葉でのデータである. *GuUGD3* 遺伝子, *GuUGD4* 遺伝子, *GuUGD5* 遺伝子はそれぞれ 2 つの Unigene 配列に対応していたため, FPKM 値を以下のように再計算した: *GuUGD* 遺伝子の転写量 = (データベースで公開されている, FPKM 値に編集する前の Unigene I の生の読み取り値 + Unigene II の生の読み取り値) / (Unigene I の生の読み取り値 / Unigene I の FPKM 値 + Unigene II の生の読み取り値 / Unigene II の FPKM 値).

2.3 結果

● ウラルカンゾウの推定 *UGD* 遺伝子

○ 推定 *UGD* 遺伝子のマイニング

ウラルカンゾウのトランスクリプトームデータベースに収録されている 32,840 のタンパク質コーディング配列のうち, 表 2-5 に示す 8 つの Unigene が *AtUGD1* タンパク質と高い同一性をもつ配列として抽出された. 特に上位 4 つの Unigene はカバー率が 99.8% で, 同一性が 75% 以上と高い値を示した. 5-8 番目の Unigene は, 同一性は 73% 以上と高いものの, 部分配列であったためカバー率は 66.4% 以下に

とどまった. 一方, 9 番目以降の Unigene はカバー率が 17.0% 以下であり, 同一性も 31% 以下と低かったため, 本研究の対象外とした. これら 8 つの Unigene 配列にコードされるタンパク質を解析したところ, UGD タンパク質で報告されている 3 つのモチーフ (NAD⁺ 結合モチーフ, 活性中心, UDP 結合モチーフ) に相当する配列やその一部を有していた (図 2-3).

8 つの配列のうち, 部分配列としてヒットした 4 つの配列 Unigene14817, Unigene6695, Unigene13362, Unigene7645 はそれぞれ, Unigene14817 と Unigene7645 を伸長した配列, および, Unigene6695 と Unigene13362 を伸長した配列が, 同一の遺伝子配列に由来していた. また, Unigene16486 と Unigene16498 のコーディング配列の上流と下流の配列を比較した結果, 同一の遺伝子配列に由来していた. このため本研究では, 5 種類の推定 UGD 遺伝子 (Unigene9220, Unigene9877, Unigene6695 (= Unigene13362), Unigene14817 (= Unigene7645), Unigene16486 (= Unigene16498)) の機能を解析した.

表 2-5 AtUGD1 と高い同一性を持つタンパク質をコードするウラルカンゾウの Unigene

No.	Unigene	スコア	カバー率	同一性
1	Unigene9220	823 bits	99.8% (481/482)	82% (399/481)
2	Unigene9877	783 bits	99.8% (481/482)	79% (384/481)
3	Unigene16486	749 bits	99.8% (481/482)	76% (366/481)
4	Unigene16498	746 bits	99.8% (481/482)	75% (365/481)
5	Unigene14817	535 bits	66.4% (320/482)	80% (258/320)
6	Unigene6695	447 bits	55.8% (269/482)	82% (222/269)
7	Unigene13362	233 bits	31.3% (151/482)	73% (111/151)
8	Unigene7645	204 bits	23.2% (112/482)	86% (97/112)
9	Unigene11353	28.9 bits	9.8% (47/482)	31% (15/47)
10	Unigene3546	28.9 bits	17.0% (82/482)	21% (18/82)

トランスクリプトームデータベースから抽出された配列を AtUGD1 タンパク質に対する同一性の高いものから順に 10 種類示す.

AtUGD1	-----MVKICGIGAGYVGGPTMAVIALKCPSEIEVAVVDIS	35
9220	--LSLSLSLTSLI-IVTRLRFFPPFPSPPEFFFFPSSDLSLFSQPLN-----NKAENR-KKTMVKICGIGAGYVGGPTMAVIALKCPSEIEVAVVDIS	91
9877	-----KKLSPLSPSLSQDQSFITHLSKVY-KSKMVKICGIGAGYVGGPTMAVIALKCPSEIEVAVVDIS	55
16486	F-VFKEVVLILC-FAFSS-QHPHINRPV-----YTLPFIISCIPLL-TLNTEIFTNII-GKMVKICGIGAGYVGGPTMAVIALKCPSEIEVAVVDIS	87
16498	-----QSSKRMPIAHP-----SCTPCS-----SQMPGKMVKICGIGAGYVGGPTMAVIALKCPSEIEVAVVDIS	60
14817	-----TKLSPLSPSLSQ-----RDS-----FITHL-----SKVI-KSKMVKICGIGAGYVGGPTMAVIALKCPSEIEVAVVDIS	1
6695	-----TKLSPLSPSLSQ-----RDS-----FITHL-----SKVI-KSKMVKICGIGAGYVGGPTMAVIALKCPSEIEVAVVDIS	62
13362	-----TKLSPLSPSLSQ-----RDS-----FITHL-----SKVI-KSKMVKICGIGAGYVGGPTMAVIALKCPSEIEVAVVDIS	1
7645	-----IPLSLFPINRKN-----NTSSILLHRRHL-----DKYGHSENKQKMKICGIGAGYVGGPTMAVIALKCPSEIEVAVVDIS	70
NAD⁺ 結合モチーフ		
AtUGD1	EPRIMAWNSDRLPIYEPGLDGVVKCRGKLNLFSTOVEKHVFEDIVFVSNTPTKTGLGAGKAADLTWESAARMIADVSKSKIVVEKSTVPVPTAE	135
9220	SPRIMAWNSDRLPIYEPGLDGVVKCRGKLNLFSTOVEKHVFAEDIVFVSNTPTKTGLGAGKAADLTWESAARMIADVSKSKIVVEKSTVPVPTAE	191
9877	VAVVDISKSRITAWNSDRLPIYEPGLDGVVKCRGKLNLFSTOVEKHVFADIVFVSNTPTKTGLGAGKAADLTWESAARMIADVSKSKIVVEKSTVPVPTAE	155
16486	HSRIMAWNSKRLPIYEPGLEEVVKCCGNLNFSTOVEKHVCEADIVFVSNTPTKTGLGAGKAADLTWESAARMIADVSKSKIVVEKSTVPVPTAE	187
16498	HSRIMAWNSKRLPIYEPGLEEVVKCCGNLNFSTOVEKHVCEADIVFVSNTPTKTGLGAGKAADLTWESAARMIADVSKSKIVVEKSTVPVPTAE	160
14817	-----KSRIMAWNSDRLPIYEPGLDGVVKCRGKLNLFSTOVEKHVFADIVFVSNTPTKTGLGAGKAADLTWESAARMIADVSKSKIVVEKSTVPVPTAE	1
6695	KSRIMAWNSDRLPIYEPGLDGVVKCRGKLNLFSTOVEKHVFADIVFVSNTPTKTGLGAGKAADLTWESAARMIADVSKSKIVVEKSTVPVPTAE	162
13362	-----KSRIMAWNSDRLPIYEPGLDGVVKCRGKLNLFSTOVEKHVFADIVFVSNTPTKTGLGAGKAADLTWESAARMIADVSKSKIVVEKSTVPVPTAE	1
7645	SORIMAWNSEHLPYEPGLEEVVKCRGKLNLFSTOVEKHVFADIVFVSNTPTKTGLGAGKAADLTWESAARMIADVSKSKIVVEKSTVPVPTAE	147
NAD⁺ 結合モチーフ		
AtUGD1	AIERILTHNSKGIKFIILSNPEFLAEGTAIDDLFNPORVLIIGRETPGOKAIAKLDOVYAWVPVEITITNLWSAELSKLAANAFLAQRISSNYMSA	235
9220	AIERILTHNSKGINFIILSNPEFLAEGTAIDDLFNPORVLIIGRETPGOKAIAKLDOVYAWVPVEITITNLWSAELSKLAANAFLAQRISSNYMSA	291
9877	AIERILTHNSKGIKFIILSNPEFLAEGTAIDDLFNPORVLIIGRETPGOKAIAKLDOVYAWVPVEITITNLWSAELSKLAANAFLAQRISSNYMSA	255
16486	AIERILTHNSKGIKFIILSNPEFLAEGTAIDDLFNPORVLIIGRETPGOKAIAKLDOVYAWVPVEITITNLWSAELSKLAANAFLAQRISSNYMSA	287
16498	AIERILTHNSKGIKFIILSNPEFLAEGTAIDDLFNPORVLIIGRETPGOKAIAKLDOVYAWVPVEITITNLWSAELSKLAANAFLAQRISSNYMSA	260
14817	-----AIERILTHNSKGIKFIILSNPEFLAEGTAIDDLFNPORVLIIGRETPGOKAIAKLDOVYAWVPVEITITNLWSAELSKLAANAFLAQRISSNYMSA	75
6695	AIERILTHNSKGIKFIILSNPEFLAEGTAIDDLFNPORVLIIGRETPGOKAIAKLDOVYAWVPVEITITNLWSAELSKLAANAFLAQRISSNYMSA	262
13362	-----AIERILTHNSKGIKFIILSNPEFLAEGTAIDDLFNPORVLIIGRETPGOKAIAKLDOVYAWVPVEITITNLWSAELSKLAANAFLAQRISSNYMSA	1
7645	-----AIERILTHNSKGIKFIILSNPEFLAEGTAIDDLFNPORVLIIGRETPGOKAIAKLDOVYAWVPVEITITNLWSAELSKLAANAFLAQRISSNYMSA	147
NAD⁺ 結合モチーフ		
AtUGD1	LCEATGADVSDVSHSISGTDSTRIGPKFLNASVGGGSCFQKQDILNLYICECNGLEPEANYWKGVIKVNDYQKSRFVNRVSSMFNTVSSKKIAVLGFAFK	335
9220	LCEATGADVSDVSHSISGTDSTRIGPKFLNASVGGGSCFQKQDILNLYICECNGLEPEANYWKGVIKVNDYQKSRFVNRVSSMFNTVSSKKIAVLGFAFK	391
9877	LCEATGADVSDVSHSISGTDSTRIGPKFLNASVGGGSCFQKQDILNLYICECNGLEPEANYWKGVIKVNDYQKSRFVNRVSSMFNTVSSKKIAVLGFAFK	355
16486	LCEATGADVSDVSHSISGTDSTRIGPKFLNASVGGGSCFQKQDILNLYICECNGLEPEANYWKGVIKVNDYQKSRFVNRVSSMFNTVSSKKIAVLGFAFK	387
16498	LCEATGADVSDVSHSISGTDSTRIGPKFLNASVGGGSCFQKQDILNLYICECNGLEPEANYWKGVIKVNDYQKSRFVNRVSSMFNTVSSKKIAVLGFAFK	360
14817	LCEATGADVSDVSHSISGTDSTRIGPKFLNASVGGGSCFQKQDILNLYICECNGLEPEANYWKGVIKVNDYQKSRFVNRVSSMFNTVSSKKIAVLGFAFK	175
6695	LCEATGADVSDVSHSISGTDSTRIGPKFLNASVGGGSCFQKQDILNLYICECNGLEPEANYWKGVIKVNDYQKSRFVNRVSSMFNTVSSKKIAVLGFAFK	296
13362	-----LCEATGADVSDVSHSISGTDSTRIGPKFLNASVGGGSCFQKQDILNLYICECNGLEPEANYWKGVIKVNDYQKSRFVNRVSSMFNTVSSKKIAVLGFAFK	40
7645	-----LCEATGADVSDVSHSISGTDSTRIGPKFLNASVGGGSCFQKQDILNLYICECNGLEPEANYWKGVIKVNDYQKSRFVNRVSSMFNTVSSKKIAVLGFAFK	147
活性中心		
UDP 結合モチーフ		
AtUGD1	KDTGDTRETTPAIDVCKGLGDKAKLSIYDPVNEEDQIRDLGNKFFQWQHPAHLOPTSP-TTEKRVSVVMDAYEAKDAHGVCILTEWDEFKSLDYQRMV	435
9220	KDTGDTRETTPAIDVCKGLGDKAKLSIYDPVNEEDQIRDLGNKFFQWQHPAHLOPTSP-TTEKRVSVVMDAYEAKDAHGVCILTEWDEFKSLDYQRMV	491
9877	KDTGDTRETTPAIDVCKGLGDKAKLSIYDPVNEEDQIRDLGNKFFQWQHPAHLOPTSP-TTEKRVSVVMDAYEAKDAHGVCILTEWDEFKSLDYQRMV	454
16486	KDTGDTRETTPAIDVCKGLGDKAKLSIYDPVNEEDQIRDLGNKFFQWQHPAHLOPTSP-TTEKRVSVVMDAYEAKDAHGVCILTEWDEFKSLDYQRMV	487
16498	KDTGDTRETTPAIDVCKGLGDKAKLSIYDPVNEEDQIRDLGNKFFQWQHPAHLOPTSP-TTEKRVSVVMDAYEAKDAHGVCILTEWDEFKSLDYQRMV	460
14817	KDTGDTRETTPAIDVCKGLGDKAKLSIYDPVNEEDQIRDLGNKFFQWQHPAHLOPTSP-TTEKRVSVVMDAYEAKDAHGVCILTEWDEFKSLDYQRMV	274
6695	-----KDTGDTRETTPAIDVCKGLGDKAKLSIYDPVNEEDQIRDLGNKFFQWQHPAHLOPTSP-TTEKRVSVVMDAYEAKDAHGVCILTEWDEFKSLDYQRMV	296
13362	KDTGDTRETTPAIDVCKGLGDKAKLSIYDPVNEEDQIRDLGNKFFQWQHPAHLOPTSP-TTEKRVSVVMDAYEAKDAHGVCILTEWDEFKSLDYQRMV	139
7645	-----KDTGDTRETTPAIDVCKGLGDKAKLSIYDPVNEEDQIRDLGNKFFQWQHPAHLOPTSP-TTEKRVSVVMDAYEAKDAHGVCILTEWDEFKSLDYQRMV	147
UDP 結合モチーフ		
AtUGD1	DNMQKPAFVFDGRNIVDVKLRIGFIVYSIGKPLDSWLKMPAVA-----SGKKSTNLELLPLGWFNLLVFLRGWPHPDILSYAILIV-IG	481
9220	DNMQKPAFVFDGRNIVDVKLRIGFIVYSIGKPLDSWLKMPAVA-----SGKKSTNLELLPLGWFNLLVFLRGWPHPDILSYAILIV-IG	576
9877	DNMQKPAFVFDGRNIVDVKLRIGFIVYSIGKPLDSWLKMPAVA-----SGKKSTNLELLPLGWFNLLVFLRGWPHPDILSYAILIV-IG	550
16486	DNMQKPAFVFDGRNIVDVKLRIGFIVYSIGKPLDSWLKMPAVA-----SGKKSTNLELLPLGWFNLLVFLRGWPHPDILSYAILIV-IG	571
16498	DNMQKPAFVFDGRNIVDVKLRIGFIVYSIGKPLDSWLKMPAVA-----SGKKSTNLELLPLGWFNLLVFLRGWPHPDILSYAILIV-IG	544
14817	DNMQKPAFVFDGRNIVDVKLRIGFIVYSIGKPLDSWLKMPAVA-----SGKKSTNLELLPLGWFNLLVFLRGWPHPDILSYAILIV-IG	354
6695	DNMQKPAFVFDGRNIVDVKLRIGFIVYSIGKPLDSWLKMPAVA-----SGKKSTNLELLPLGWFNLLVFLRGWPHPDILSYAILIV-IG	296
13362	DNMQKPAFVFDGRNIVDVKLRIGFIVYSIGKPLDSWLKMPAVA-----SGKKSTNLELLPLGWFNLLVFLRGWPHPDILSYAILIV-IG	150
7645	DNMQKPAFVFDGRNIVDVKLRIGFIVYSIGKPLDSWLKMPAVA-----SGKKSTNLELLPLGWFNLLVFLRGWPHPDILSYAILIV-IG	147
UDP 結合モチーフ		
AtUGD1	-----SVAFFYFFFL-CYFYLIRLYCKLELNPWEYCL-PAENPYLLTWFNVING	481
9220	TLLYSLSLRLGCGGTGRLVLFQYSALII-WQKF-NFLKYIWA-Y-LLRNNEGK-KSRVNLGISGGSARIQLS-KQSKLVFLVSSQFFQDFSHYEGVI	624
9877	-----INCCYSVKIKISLI-GYIVGDN-DHYIYMFQ-ERIFILI-ILR----	644
16486	-----INCCYSVKIKISLI-GYIVGDN-DHYIYMFQ-ERIFILI-ILR----	580
16498	-----INCCYSVKIKISLI-GYIVGDN-DHYIYMFQ-ERIFILI-ILR----	610
14817	-----LMA--RQIFFSYLKSQFVLI-----	372
6695	-----LMA--RQIFFSYLKSQFVLI-----	296
13362	-----LMA--RQIFFSYLKSQFVLI-----	150
7645	-----LMA--RQIFFSYLKSQFVLI-----	147
UDP 結合モチーフ		
AtUGD1	-----481	
9220	Y-RNFIQWDIGY-----635	
9877	KFTLIH-----650	
16486	-----610	
16498	-----580	
14817	-----372	
6695	-----296	
13362	-----150	
7645	-----147	

図 2-3 AtUGD1 とウラルカンゾウの Unigene にコードされるアミノ酸配列のアライメント

AtUGD1 アミノ酸配列と Unigene9220, Unigene9877, Unigene16486, Unigene16498, Unigene14817, Unigene6695, Unigene13362, Unigene7645 がコードするアミノ酸配列のアライメントを BioEdit を用いて描写した. アライメントを行った 9 種類の配列のうち 60% 以上の配列で同一のアミノ酸残基を黒色の背景でハイライトしている. また, 相同なアミノ酸残基は灰色の背景でハイライトしている. 配列の下には, GenBank に登録されている UGD タンパク質の NAD^+ 結合モチーフ, UDP 結合モチーフ, 活性中心と対応する部分を示している.

○ 単離した推定 *UGD* 遺伝子とコードされるアミノ酸の配列

UGD 遺伝子のマイニングに使用したデータベースと同じウラルカンゾウの系統を用いて構築された first-strand cDNA ライブラリーから, 推定 *UGD* 遺伝子を単離し, 塩基配列とアミノ酸配列を解析した. それぞれコードするアミノ酸配列と AtUGD1 のアミノ酸配列との同一性が高い順に, *GuUGD1* (Unigene9220 に対応), *GuUGD2* (Unigene9877 に対応), *GuUGD3* (Unigene6695, Unigene13362 に対応), *GuUGD4* (Unigene14817, Unigene7645 に対応), *GuUGD5* (Unigene16486, Unigene16498 に対応) と命名した. *GuUGD1-5* の遺伝子配列とアミノ酸配列を図 2-4 – 図 2-8 に示す. *GuUGD1-5* 遺伝子のコードするタンパク質はいずれも約 53 kDa と推計された (表 2-6). UGD アミノ酸配列は植物間において非常に高い同一性を持つことが知られており, *GuUGD1-5* タンパク質も既知の AtUGD1-4 タンパク質と高い同一性を有していた (表 2-7). *GuUGD* タンパク質の間では, *GuUGD1-4* は互いに高い同一性を有しており, *GuUGD5* は他のアイソフォームとはやや同一性の低いアミノ酸配列であることが示された (表 2-8).

ATGGTGAAGAATTGCTGCATTGGAGCTGGCTATGTTGGTGGTCCAACCATGGCTGTGATTGCCTTGAAGTGTCTTGAAGATTGAAGTAGCC 90
 M V K I C C I G A G Y V G G P T M A V I A L K C P E I E V A
 GTGGTCGATATCTCTTCGCCTCGAATCAATGCCTGGAACAGTGAACACCTGCCTATATATGAAGCAAGCCCTTGTATGTTGGTGAAGGA 180
 V V D I S S P R I N A W N S D H L P I Y E P G L D D V V K E
 TGAAGGGGAAGGAACCTTTTCTTCAGCACTGATGTTGAAGAAATGTTGCTGAAGGCTAAATAAGTCTTTGTCTAGTGAACACCCCTTACA 270
 C R G R N L F F S T D V E K H V A E A N I V F V S V N T P T
 AAGACTCAAGGGTCTTGAAGCTGGCAAGCAAGCCGATCTCATTACTGGGAAGATGCTGCTAGGATGATTGCCGATGTTTCAAAATCCGAC 360
 K T Q G L G A G K A A D L T Y W E S A A R M I A D V S K S D
 AAGATCGTGGTGAAGAAATCGACCGTGGCCGGTTAAACAAGCAAGAGGCAATGAAGAGGATCCCTGACTCACAATAAGAAAGGCAATCAATTT 450
 K I V V E K S T V P V K T A E A I E R I L T H N R K G I N F
 ACAATTCCTGTCTAACCTTGAATTCCTTGTGAAGGATCAAGCTATTCAGACCTGTTCAATCCGGAATCGAGTCCCTCATCGGAAGCCGGGA 540
 T I L S N P E F L A E G T A I Q D L F N P D R V L I G G R E
 ACCCCGGAAGGCCAAAAGGCTATCCAATGCCCTGAAGATGTTTATGCCCATTTGGGTCCTATGAAGAGAAATCCTCTGCACCAATTTGTGG 630
 T P E G Q K A I H A L R D V Y A H W V P M E R I L C T N L W
 TCTGCTGAAGCTCTCGAAGCTTGTCTCCAATGCTTTTCTTGCACAGAGGATCTCTCTGTGAAATGCCATGTCAAGCACTATGTGAAGCAACT 720
 S A E L S K L A A N A F L A Q R I S S V N A M S A L C E A T
 GGTGCTGATGCTCCCAAGGTGTCGCACTCGATCGGCACTGACTCGAAGATGGACCCAAATCTTGAATGCCAGTGTGGTTTGGTGGG 810
 G A D V S Q V S H S I G T D S R I G P K F L N A S V G F G G
 TCTTGTCTCCAGAGGACATACTGAACCTGGTCTATATCTGTGAGTGCATGGCCCTCTTGAAGTGGCCAACTACTGGAAACAGGTCATC 900
 S C F Q K D I L N L V Y I C E C N G L P E V A N Y W K Q V I
 AAGGTGAACGACTACCAAGAAACCCGTTTCGTGAAGCCGGGTGGTTTCTCGATGTTCAACACGGTCTCAGGGAAGAAAATCGCTGTCTT 990
 K V N D Y Q K T R F V N R V V S S M F N T V S G K K I A V L
 GGAATTTGCCTTCAAGAGGACACTGGTGAACACTAGGGAAGACCCCAAGCAATGATGTTGTGAAGGGGCTATTGGGAAGCAAGGCTAAGTT 1080
 G F A F K K D T G D T R E T P A I D V C K G L L G D K A K L
 AGCATATATGATCTTCAGGTTTCTGAAGAGCAAAATTTGAAGGACCTTGCATGAAGAAATTTGATTGGGAATCACCTTCTCATCTTCAA 1170
 S I Y D P Q V S E E Q I L R D L A M K K F D W D H P A H L Q
 CCAACCAAGCCCAACAAATTTCCAACAGCAAGTGTCTGTGGTTTGGGATGCCATGAAGCAATCAAGGATGCACATGGTATCTGCAATTAT 1260
 P T S P T I S N K Q V S V V W D A Y E A I K D A H G I C I M
 ACCGAGTGGGACGAGTTCAAGAAAGCTCGATTAACAGAAAGTCTTCGACAACTGCAAGAGCCCTGCAATTCGTCTCGATGGCCGCAACAT 1350
 T E W D E F K K L D Y Q K V F D N M Q K P A F V F D G R N I
 GTGGATGTTAACAAGCTGAAGGAAATTTGGTTTCAATTGTTATTCATTTGGCAAGCCACTAGACTCTTGGCTCAAGGACATGCCTGCAATG 1440
 V D V N K L R E I G F I V Y S I G K P L D S W L K D M P A V
 GCT 1443
 A

図 2-4 *GuUGDI* (Unigene9220 に対応) の塩基配列とコードされるアミノ酸配列

塩基配列の描写には BioEdit を使用した。上段の四角で囲んだ配列は塩基配列を、下段はアミノ酸配列を示している。配列の右側の数字は塩基数を示す。

ATGGTGAAGA	TTTGTGCA	TTGGTGTG	GGATAT	GTGGGGGG	TCCTACAA	TGGCAG	TTAT	TGCAC	TTAAG	TGCCC	TCCAT	TGAGG	TGGC	90																				
M	V	K	I	C	C	I	G	A	G	Y	V	G	G	P	T	M	A	V	I	A	L	K	C	P	S	I	E	V	A					
GTG	TTGACA	TCTCTAA	TCCGCA	TTACAG	CCGTGGAA	CAGCGACCA	AGCTCCG	ATC	TGAG	CC	TGGCC	TTGAT	GATG	TCG	180																			
V	V	D	I	S	K	S	R	I	T	A	W	N	S	D	Q	L	P	I	Y	E	P	G	L	D	D	V	V	K	Q					
TGCCG	TGGCAG	GAACCT	CTTCTT	CAAG	CACAG	CGTTG	AAAA	CA	TG	CTT	CGAG	GC	TGAC	ATA	G	TTT	TG	CTCT	TG	CAAC	ACCC	CAAC	270											
C	R	G	R	N	L	F	F	S	T	D	V	E	K	H	V	F	E	A	D	I	V	F	V	S	V	N	T	P	T					
AAAA	CTCAG	GGTCTT	GGTGTG	GGGAAA	GACAG	AGATTT	GACAT	ATT	GGGAG	AGCG	AGCTCG	CA	TGAT	CGCC	GAT	TG	CTCAA	AG	TC	TGAC	360													
K	T	Q	G	L	G	A	G	K	A	A	D	L	T	Y	W	E	S	A	A	R	M	I	A	D	V	S	K	S	D					
AAAA	TTGT	GGT	CGA	GAAT	CCACT	TG	CCCT	TG	CAAA	ACC	CGG	AA	CA	TAG	A	GA	AAA	TTCT	CACCC	CA	AT	AG	CA	AGG	AA	TCAA	TTG	450						
K	I	V	V	E	K	S	T	V	P	V	K	T	A	E	A	I	E	K	I	L	T	H	N	S	K	G	I	K	F					
CAG	ATTC	TAT	CAAA	CCAG	AA	TTCC	TTG	CT	GAG	GGAA	CTG	CAAT	CAAG	GA	TC	TTTT	CA	CCCA	GAG	CCGG	TTCT	TA	TTG	AG	GG	CAG	GGAA	540						
Q	I	L	S	N	P	E	F	L	A	E	G	T	A	I	K	D	L	F	N	P	D	R	V	L	I	G	G	R	E					
ACCC	CAG	AGG	CC	TG	AAA	GTG	TTCA	AG	TAT	TGA	GGAT	GT	TTAT	GT	CT	CAAT	TGG	TCC	CT	GAG	GAC	GAAT	ACT	AAC	CAC	AA	AC	TTT	630					
T	P	E	G	L	K	A	V	Q	V	L	K	D	V	Y	A	Q	W	V	P	E	D	R	I	L	T	T	N	L	W					
TCGG	CAG	AGCT	ATCT	AGCT	TTGCT	GCTAAT	GCCTT	CTT	TGG	CCCA	AGG	ATTT	CTT	CT	TG	TCAT	TGG	TCC	CT	GAG	GAC	GAAT	ACT	AAC	CAC	AA	AC	TTT	720					
S	A	E	L	S	K	L	A	A	N	A	F	L	A	Q	R	I	S	S	V	N	A	M	S	A	L	C	E	A	T					
GGGG	CAAC	ATTC	ACAG	GGTT	GCCT	ATTC	TG	TTGG	CAC	TGAC	TCG	AGG	AT	TGG	ACCA	AG	TTCT	TG	AT	TG	TTG	TTT	CGG	TGG	810									
G	A	N	I	Q	Q	V	A	Y	S	V	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	N	A	S	V	G	F	G	G					
TCCT	GTCT	TCC	AG	AGG	AT	CTT	G	AAC	CTG	CT	TAC	CT	TCG	AG	TG	CAAT	TGG	CTT	CC	AG	GG	TGG	CT	GAG	TAC	TG	GA	AA	CAAG	TCAT	900			
S	C	F	Q	K	D	I	L	N	L	V	Y	I	C	E	C	N	G	L	P	E	V	A	E	Y	W	K	Q	V	I					
AA	GAT	CAAC	GACT	AT	CA	GA	AG	AT	CG	ATTC	G	TGA	ACC	CG	TG	TTT	CG	TC	GAT	TG	TC	AA	CAC	GG	TC	CA	AG	CA	GA	AT	TG	CAAT	TC	990
K	I	N	D	Y	Q	K	S	R	F	V	N	R	V	V	S	S	M	F	N	T	V	S	S	K	K	I	A	I	L					
GG	ATTT	GCA	TTCA	AG	AAA	GAT	ACC	GGG	AC	AG	GGG	AG	ACCC	AG	CCAT	TG	AT	TG	TG	CA	AG	GG	CTT	ACT	TG	GA	CA	AA	GCC	AA	CTT	1080		
G	F	A	F	K	K	D	T	G	D	T	R	E	T	P	A	I	D	V	C	K	G	L	L	G	D	K	A	N	L					
AG	CA	TAT	TG	ATCC	CAAG	TAACT	G	AGG	ACCA	AA	TCA	GAG	GGAT	CT	AT	CAAT	TGA	CAAG	TTT	GAT	TGG	AG	CCAT	CCCAT	CCACT	TG	CA	1170						
S	I	Y	D	P	Q	V	T	E	D	Q	I	Q	R	D	L	S	M	N	K	F	D	W	D	H	P	I	H	L	Q					
CCC	CAAG	CCCC	CTCA	ACT	TG	TGA	AG	AA	GTG	AG	TG	GG	TTT	GGG	AT	GCA	TG	AGG	CAAC	AA	GGAT	GC	ACA	TGG	CA	TTT	GCA	TTCT	GAC	1260				
P	T	S	P	S	T	V	K	K	V	S	V	V	W	D	A	Y	E	A	T	K	D	A	H	G	I	C	I	L	T					
GAG	TGG	GAT	GAG	TTCA	AG	CAC	TTG	AT	TAT	CA	GAG	GA	TAT	TG	ACA	ACAT	TG	CAAA	GCC	AG	CA	TTT	G	TTTT	TG	AT	GGA	AG	GA	CA	TTG	1350		
E	W	D	E	F	K	T	L	D	Y	Q	R	I	Y	D	N	M	Q	K	P	A	F	V	F	D	G	R	N	I	V					
GAT	GT	CTG	ACA	AG	TTG	CTG	AG	AT	GGAT	TC	AT	TG	CTAT	TG	CCAT	TG	TA	AG	CCAT	TG	AT	TG	CA	TGG	CT	CA	AA	GAC	AT	GCC	AG	CT	TG	1440
D	A	D	K	L	R	E	I	G	F	I	V	Y	A	I	G	K	P	L	D	A	W	L	K	D	M	P	A	V	A					

図 2-5 GuUGD2 (Unigene9877 に対応) の塩基配列とコードされるアミノ酸配列

塩基配列の描写には BioEdit を使用した。上段の四角で囲んだ配列は塩基配列を、下段はアミノ酸配列を示している。配列の右側の数字は塩基数を示す。



図 2-6 *GuUGD3* (Unigene6695, Unigene13362 に対応) の塩基配列とコードされるアミノ酸配列

塩基配列の描写には BioEdit を使用した。上段の四角で囲んだ配列は塩基配列を、下段はアミノ酸配列を示している。配列の右側の数字は塩基数を示す。

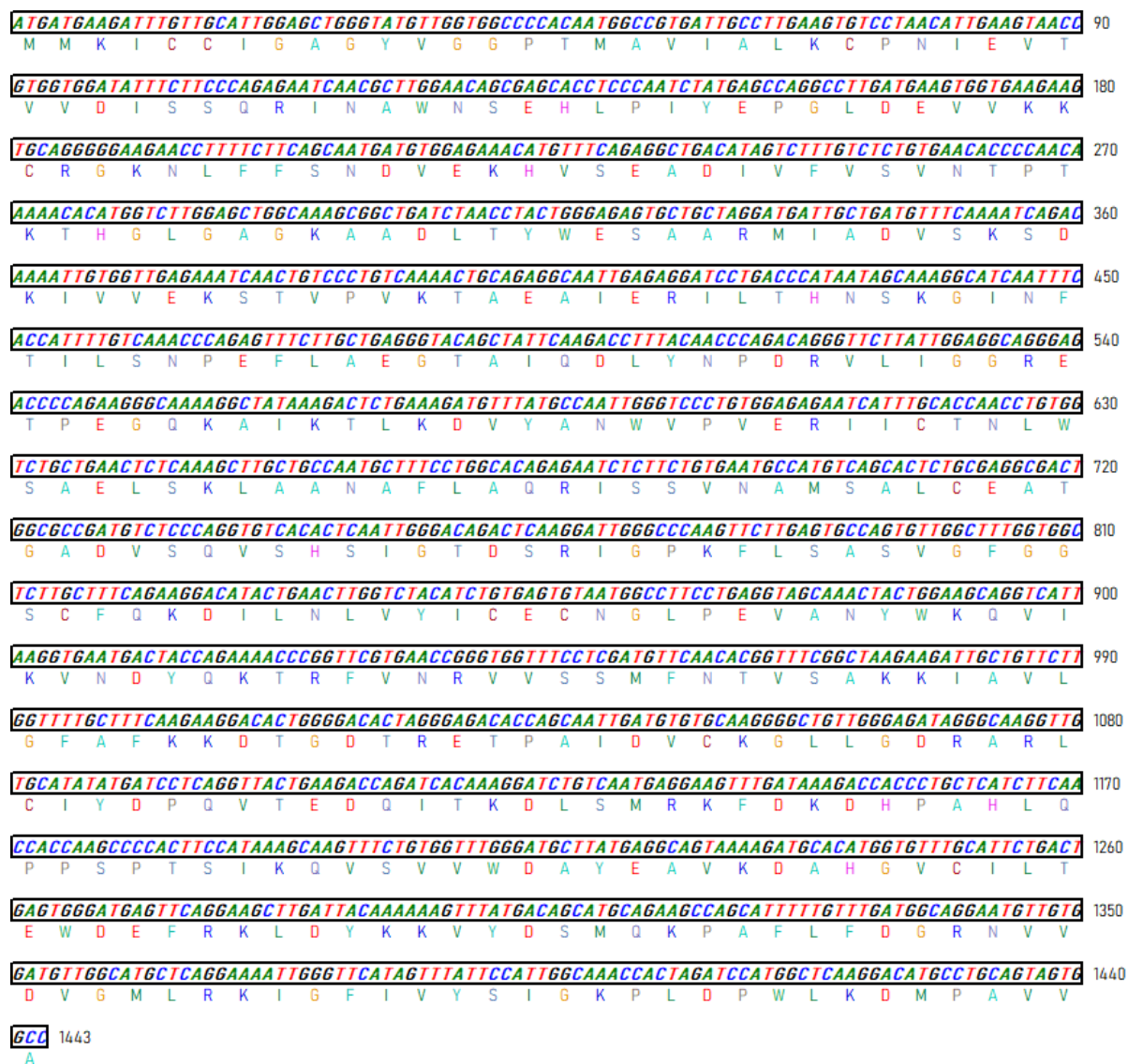


図 2-7 *GuUGD4* (Unigene14817, Unigene7645 に対応) の塩基配列とコードされるアミノ酸配列

塩基配列の描写には BioEdit を使用した。上段の四角で囲んだ配列は塩基配列を、下段はアミノ酸配列を示している。配列の右側の数字は塩基数を示す。

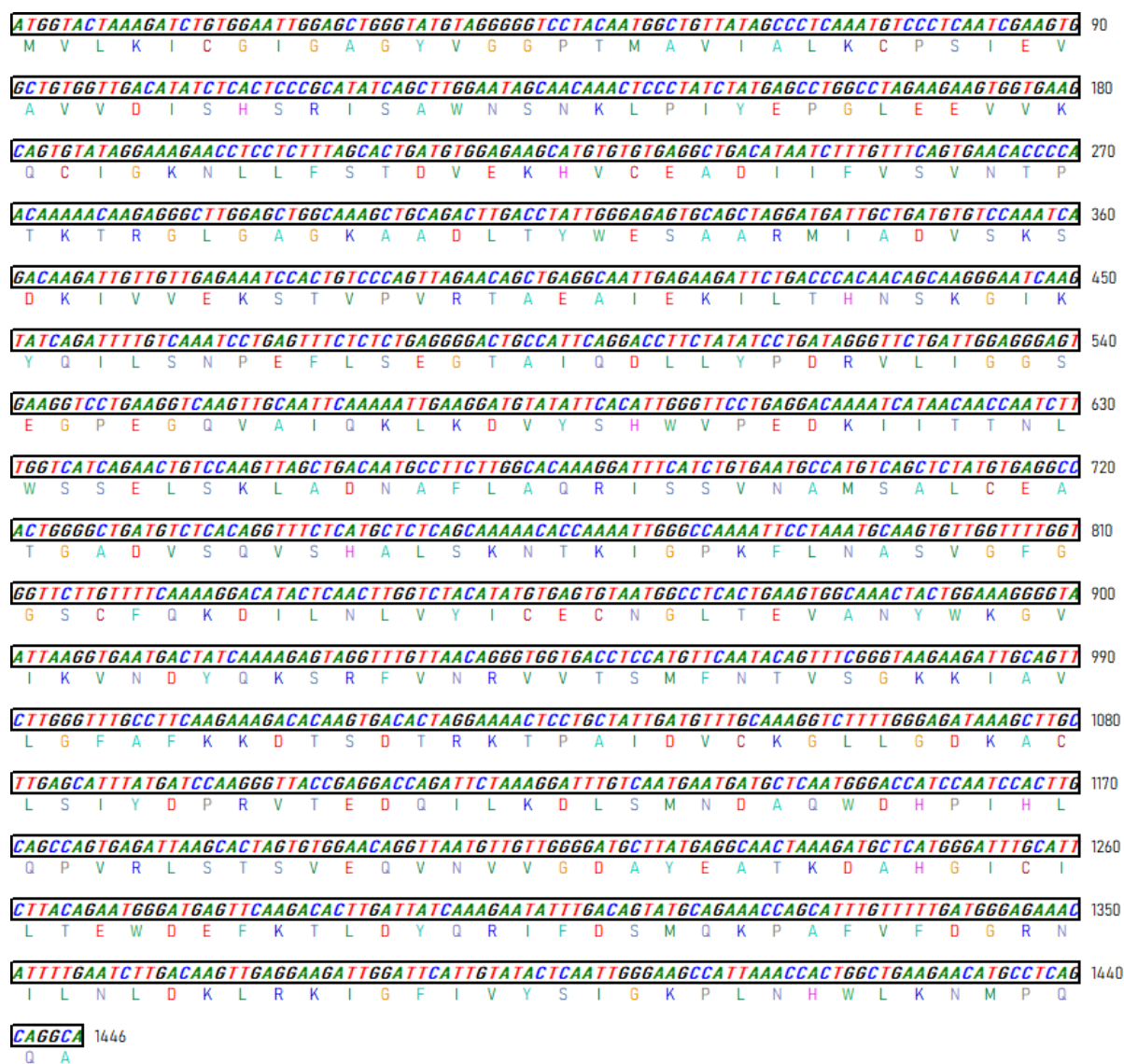


図 2-8 *GuUGD5* (Unigene16486, Unigene16498 に対応) の塩基配列とコードされるアミノ酸配列
 塩基配列の描写には BioEdit を使用した. 上段の四角で囲んだ配列は塩基配列を, 下段はアミノ酸配列を示している. 配列の右側の数字は塩基数を示す.

表 2-6 *GuUGD* 遺伝子の塩基配列の長さ, コードされるアミノ酸配列の長さ と推定分子量

UGD 名	塩基配列の長さ	アミノ酸配列の長さ	推定分子量
<i>GuUGD1</i>	1443	481	53098.03
<i>GuUGD2</i>	1440	480	52987.84

<i>GuUGD3</i>	1440	480	53238.03
<i>GuUGD4</i>	1443	481	53011.09
<i>GuUGD5</i>	1446	482	53041.05

分子量の計算には SIB Swiss Institute of Bioinformatics が提供する Expasy の ProtParam を使用した.

表 2-7 *GuUGD* と *AtUGD* 間のアミノ酸配列同一性

UGD 名	<i>AtUGD1</i>	<i>AtUGD2</i>	<i>AtUGD3</i>	<i>AtUGD4</i>
<i>GuUGD1</i>	86%	88%	88%	86%
<i>GuUGD2</i>	84%	91%	91%	89%
<i>GuUGD3</i>	83%	90%	90%	88%
<i>GuUGD4</i>	83%	85%	85%	84%
<i>GuUGD5</i>	79%	83%	81%	80%

表 2-8 *GuUGD* 間のアミノ酸配列同一性

UGD 名	<i>GuUGD2</i>	<i>GuUGD3</i>	<i>GuUGD4</i>	<i>GuUGD5</i>
<i>GuUGD1</i>	89%	88%	90%	81%
<i>GuUGD2</i>		93%	85%	83%
<i>GuUGD3</i>			86%	83%
<i>GuUGD4</i>				81%

○ 推定 *UGD* 遺伝子のゲノム上の位置

本研究で推定 *UGD* 遺伝子の単離を行ったウラルカンゾウと同じ系統のウラルカンゾウを用いて構築されたゲノムデータベースを参照して, *GuUGD1-5* 遺伝子のゲ

ノム上の位置を確認したところ, *GuUGD1-5* 遺伝子はそれぞれ異なる Scaffold に分散しており, 独立した遺伝子であることが示された (表 2-9).

表 2-9 ウラルカンゾウのゲノムにおける *GuUGD* 遺伝子の位置

遺伝子名	<i>G. uralensis</i> gene ID	Scaffold	ゲノム上の位置
<i>GuUGD1</i>	Glyur005913s00045896	Scaffold05913	5,520–6,965
<i>GuUGD2</i>	Glyur000709s00024175	Scaffold00709	35,236–36,678
<i>GuUGD3</i>	Glyur004265s00037612	Scaffold04265	2,629–4,071
<i>GuUGD4</i>	Glyur000381s00016138	Scaffold00381	113,067–115,518
<i>GuUGD5</i>	Glyur000050s00005721	Scaffold00050	323,439–326,094

● 大腸菌発現系の検討

○ 可溶性画分でタンパク質を調製できた発現系

ウラルカンゾウの推定 *UGD* 遺伝子にコードされるタンパク質が酵素として機能するかを調べるために, いくつかの大腸菌発現系を用いて *UGD* 組換えタンパク質の発現を試みた. 図 2-9 に, 大腸菌発現系 No. 1–6 (表 2-2) を用いて調製した *UGD* 組換えタンパク質の SDS-PAGE の代表的な結果を示す. 発現系 No. 5 と発現系 No. 6 では, 発現誘導をかけていない大腸菌の溶菌液 (N: Not induced) では見られなかった *UGD* 組換えタンパク質の予想される分子量と一致するバンドが, 溶菌液 (L: Lysate) と溶菌液の上清 (S: Supernatant) において確認されたことから (図 2-9 (e), (f)), これらのバンドを *UGD* 組換えタンパク質であると同定した. 一方, 発現系 No. 1 と発現系 No. 4 では, 溶菌液 (L) で観察された *UGD* 組換えタンパク質の予想される分子量と一致するバンドが, 上清 (S) では観察されなかったことから, タンパク質が可溶化していないことが示された (図 2-9 (a), (d)). 発現系 No. 2 では, ペレット (P: Pellet) には誘導をかけていないライン (N) では見られなかったバンドが観察された一方で, このバンドが上清 (S) では見られなかったことから, タンパク質が可溶化し

ていないことが示された (図 2-9 (b)). 発現系 No. 3 では, 溶菌液 (L) においても UGD 組換えタンパク質の予想される分子量と一致するバンドは確認できなかったことから, 発現が誘導されていないことが示された (図 2-9 (c)). なお, IPTG の濃度などの発現誘導条件はそれぞれの発現系についていくつか試験を行ったが, 本研究で検討した範囲ではどの発現誘導条件もほとんど差が見られなかった。

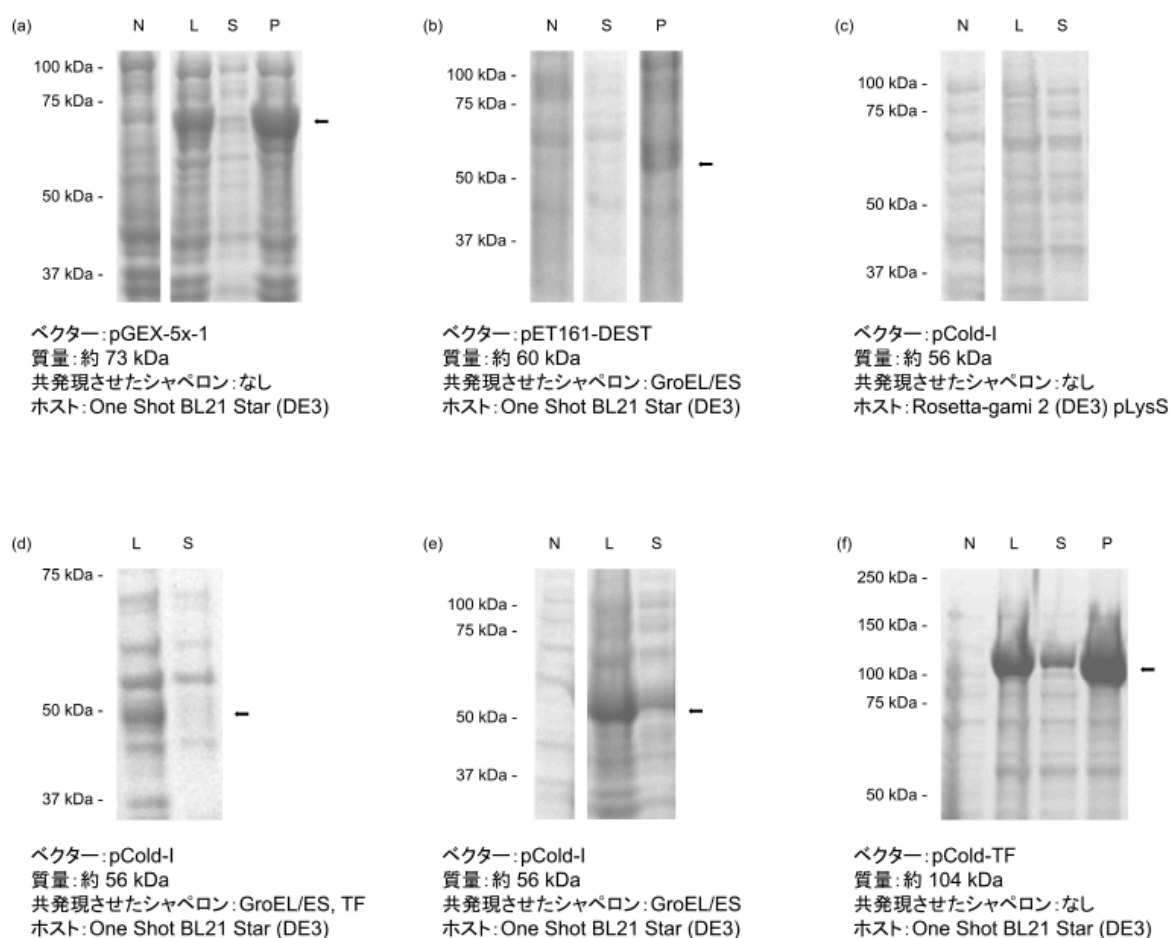


図 2-9 クールド組換えタンパク質の電気泳動

(a) 発現系 No. 1: 大腸菌 One Shot BL21 Star (DE3) で発現させた GST-GuUGD2 組換えタンパク質. (b) 発現系 No. 2: 大腸菌 One Shot BL21 Star (DE3) で GroEL/ES と共発現させた AtUGD1-Lumio-His 組換えタンパク質. (c) 発現系 No. 3: 大腸菌 Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS で発現させた His-GuUGD2 組換えタンパク質. (d) 発現系 No. 4: 大腸菌 One Shot BL21 Star (DE3) で GroEL/ES および TF と共発現させた His-GuUGD2 組換えタンパク質. (e) 発現系 No. 5: 大腸菌 One Shot BL21 Star (DE3) で GroEL/ES と共発現させた His-GuUGD2 組換えタンパク質. (f) 発現系 No. 6: 大腸菌 One Shot BL21 Star (DE3) で発現させた His-TF-GuUGD2 組換えタンパク質. タンパク質

の電気泳動ラインはそれぞれ次のクルードタンパク質を示す. N: Not induced (発現誘導をかけていない大腸菌の溶菌液), L: Lysate (発現誘導をかけた大腸菌の溶菌液), S: Supernatant (発現誘導をかけた大腸菌の溶菌液の上清), P: Pellet (発現誘導をかけた大腸菌の溶菌液のペレット). 組換え UGD タンパク質であると推定されるバンドを矢印で示す.

○ 活性のあるタンパク質を調製できた発現系

UGD 組換えタンパク質の調製に適した系を決定するために、可溶性画分から UGD 組換えタンパク質が回収された発現系 No. 5 と発現系 No. 6 を用いて調製した GuUGD2 組換えタンパク質の酵素活性試験を行った. 発現系 No. 5 を用いて調製した GuUGD2 組換えタンパク質では、時間依存的な線形の吸光度上昇が確認された (図 2-10 (a)). また、グラフの傾きに相当する単位時間当たりの吸光度の増加量は UDP-Glc 濃度依存的に上昇した. 一方で、発現系 No. 6 を用いて調製した GuUGD2 組換えタンパク質では、No. 5 で調整した GuUGD2 組換えタンパク質の 10 倍にあたる $10\text{ }\mu\text{g}$ のタンパク質を用いて反応を行ったにもかかわらず、線形の吸光度上昇は確認できなかった (図 2-10 (b)). 以上の結果をもとに、GuUGD1-5 アイソフォームの解析は発現系 No. 5 を用いて行うこととした.

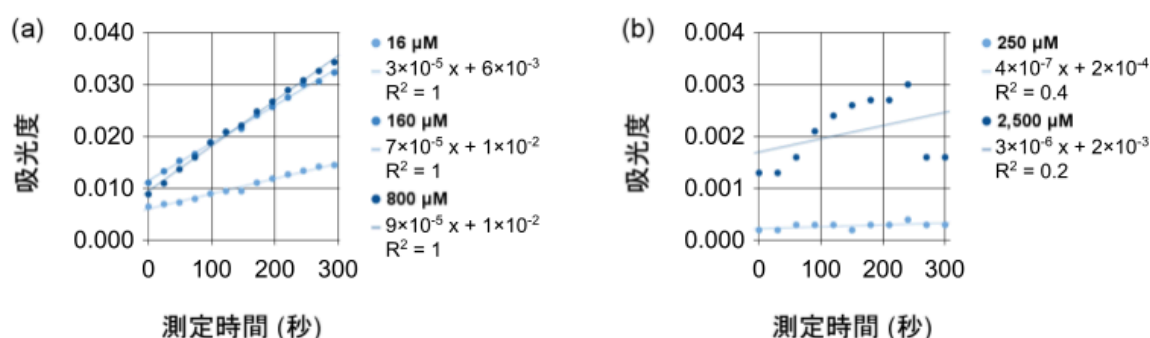


図 2-10 酵素活性の測定

(a) 発現系 No. 5 を用いて調製した GuUGD2 組換えタンパク質の酵素活性. (b) 発現系 No. 6 を用いて調製した GuUGD2 組換えタンパク質の酵素活性.

● GuUGD1-5 アイソフォームの解析

○ GuUGD1-5 組換えタンパク質の発現

GuUGD1-5 組換えタンパク質を得るために、大腸菌発現系 No. 5 を用いて GuUGD1-5 組換えタンパク質を発現させて精製した。本試験では、ポジティブコントロールとして AtUGD2 組換えタンパク質を調製した。また、ネガティブコントロールとして、空のベクターを導入した大腸菌を、UGD 遺伝子を導入した大腸菌と同様に発現誘導処理および精製処理して得たタンパク質溶液 (empty) を作製した。GuUGD1-5 遺伝子あるいは AtUGD2 遺伝子を導入した大腸菌の溶菌液上清 (S: Supernatant) では、ネガティブコントロールである empty の上清と比較して、UGD 組換えタンパク質の予想される分子量と一致する約 50 kDa の明瞭なバンドが確認された (図 2-11)。また、同じバンドが GuUGD1-5 および AtUGD2 の精製した溶出液 (E₁: Elution 1 および E₂: Elution 2) でも確認された一方で、empty の溶出液ではこの位置にバンドは観察されなかった。このバンドが UGD 組換えタンパク質であるかは、融合させた His タグをウェスタンブロッティングによって検出することで確認した。ウェスタンブロッティングには濃縮したタンパク質溶液を用いた。図 2-12 に濃縮したタンパク質溶液の SDS-PAGE とウェスタンブロッティングの結果を示す。GuUGD1-5 組換えタンパク質および AtUGD2 組換えタンパク質を流したレーンにおいて、約 50 kDa のバンドが確認され、empty からはバンドが確認されなかったことから、このバンドを UGD 組換えタンパク質であると同定した。

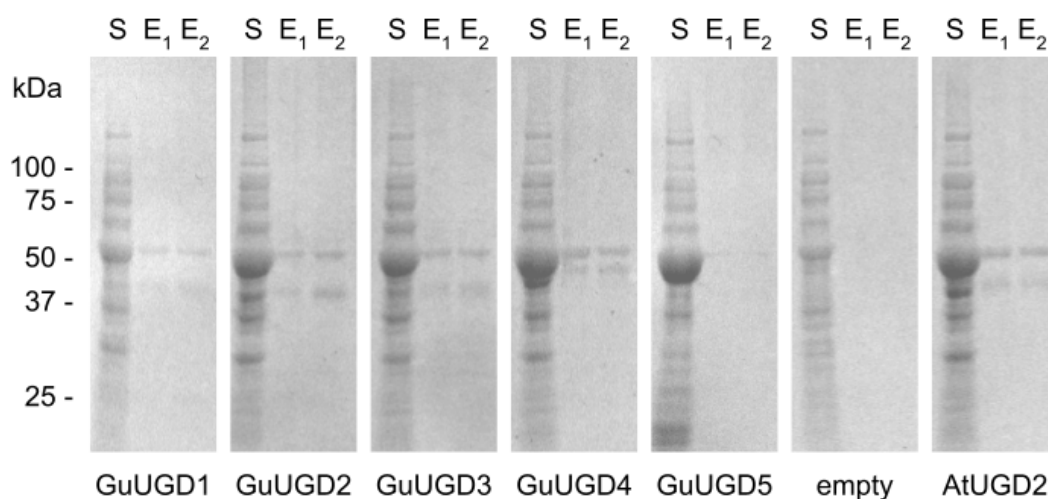


図 2-11 溶菌液の上清と精製後のタンパク質溶液の SDS-PAGE

CBB 染色した SDS-PAGE ゲルを示す. UGD 組換えタンパク質の予想される分子量と一致する約 50 kDa にバンドが検出された. レーン S: Supernatant (発現誘導を行った大腸菌の溶菌液の上清); E₁: Elution 1 (精製工程において 100 mM のイミダゾールを含む精製バッファーで溶出させた 1 つ目のフラクション). E₂: Elution 2 (精製工程において 100 mM のイミダゾールを含む精製バッファーで溶出させた 2 つ目のフラクション).

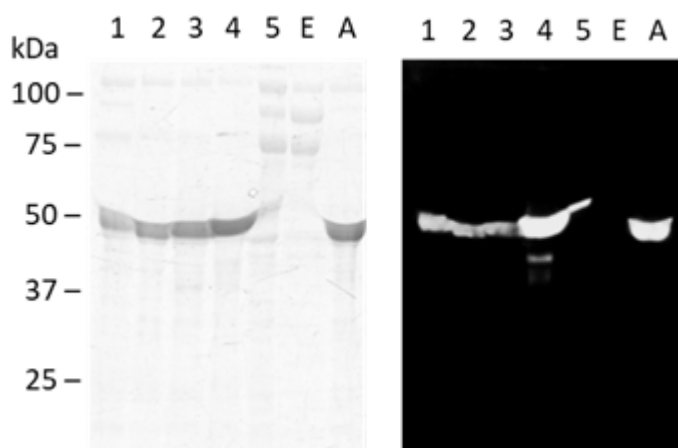


図 2-12 濃縮したタンパク質溶液の SDS-PAGE および ウェスタンブロッティング

左パネルは UV 染色した SDS-PAGE ゲルを示す. 右パネルは同一ゲルから転写したウェスタンブロッティング膜で抗 His 検出した結果を示す. UGD 組換えタンパク質の予想される分子量と一致する約 50 kDa にバンドが検出された. レーン 1-5: 濃縮した GuUGD1-5 組換えタンパク質 (GuUGD1, GuUGD2, GuUGD3, GuUGD4, および GuUGD5 組換えタンパク質溶液は大まかな質量を合わせるためにそれぞれ 10, 10, 7.5, 5, および 15 μ l 添加した); E: 空ベクターを導入した大腸菌を, UGD と同様の条件で培養して, UGD と同じ精製プロセスを通して回収したタンパク質溶液 (10 μ l のタンパク質溶液を添加); A: 精製した AtUGD2 組換えタンパク質 (7.5 μ l のタンパク質溶液を添加).

○ GuUGD1-5 組換えタンパク質の反応物の LC-MS 検出

UGD の酵素活性を評価するために, LC-MS を用いて UGD の反応生成物である UDP-GlcA の検出を試みた. 同じ質量の UGD 組換えタンパク質を用いて酵素反応を行った結果, GuUGD1-4 組換えタンパク質とポジティブコントロールの AtUGD2 組換えタンパク質の反応生成物では UDP-GlcA 標準品と同じ m/z 579.1 と保持時間

0.74 分を示す単一のピークが検出された一方で、ネガティブコントロールである empty では検出されなかったことから (図 2-13), このピークを UDP-GlcA であると同定した. GuUGD5 組換えタンパク質の反応生成物ではこのピークは検出されなかった. また, LC-MS で検出された UDP-GlcA の量は, GuUGD1-4 組換えタンパク質の中では GuUGD2 組換えタンパク質が最も多かった.

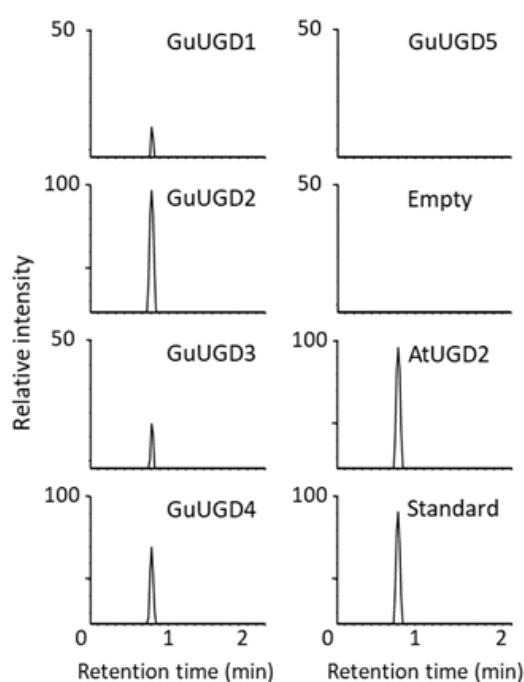


図 2-13 GuUGD 組換えタンパク質を用いた *in vitro* 酵素反応生成物の LC-MS クロマトグラム

LC-MS で検出された m/z 579.1 のピーク. ポジティブコントロールとして用いた AtUGD2 組換えタンパク質の反応物から検出されたピーク強度を 100% とする. Standard は, 標準試薬として用いた UDP-GlcA (ナカライテスク) のピークを示す.

○ 至適 pH の測定

植物 UGD の至適 pH は一般に 8.4–9.0 であることが知られている. 本研究では, GuUGD1–4 組換えタンパク質の pH 依存性を評価した. UGD の触媒する酵素反応では, 340 nm の波長を吸光する NADH が副産物として生成されることが知られている. そこで, この波長の吸光度変化を測定することで, 反応の初速度を求めた. その結

果, pH 4 と pH 6 の条件下では GuUGD1-4 組換えタンパク質の酵素活性は認められなかったが, pH 8 と pH 10 の条件下では吸光度が経時的に増加することが確認された. これは NADH の生成量が経時的に増加したことを示している. 最も大きな吸光度の変化を示した pH 10 の条件下で算出された初速度を基準として, それぞれの pH 条件下における酵素活性を図 2-14 に示す. さらに詳細な至適 pH の検討には, 低濃度の UDP-Glc でも比較的高い活性が確認された GuUGD4 組換えタンパク質を代表として試験した. pH 7.5-10.5 の範囲で酵素反応を行った結果, pH 8.5-9.0 で最も高い活性が確認された (図 2-15). なお, GuUGD5 組換えタンパク質については精製したタンパク質を十分量入手することが困難であったため, pH 依存性の評価は行わなかった.

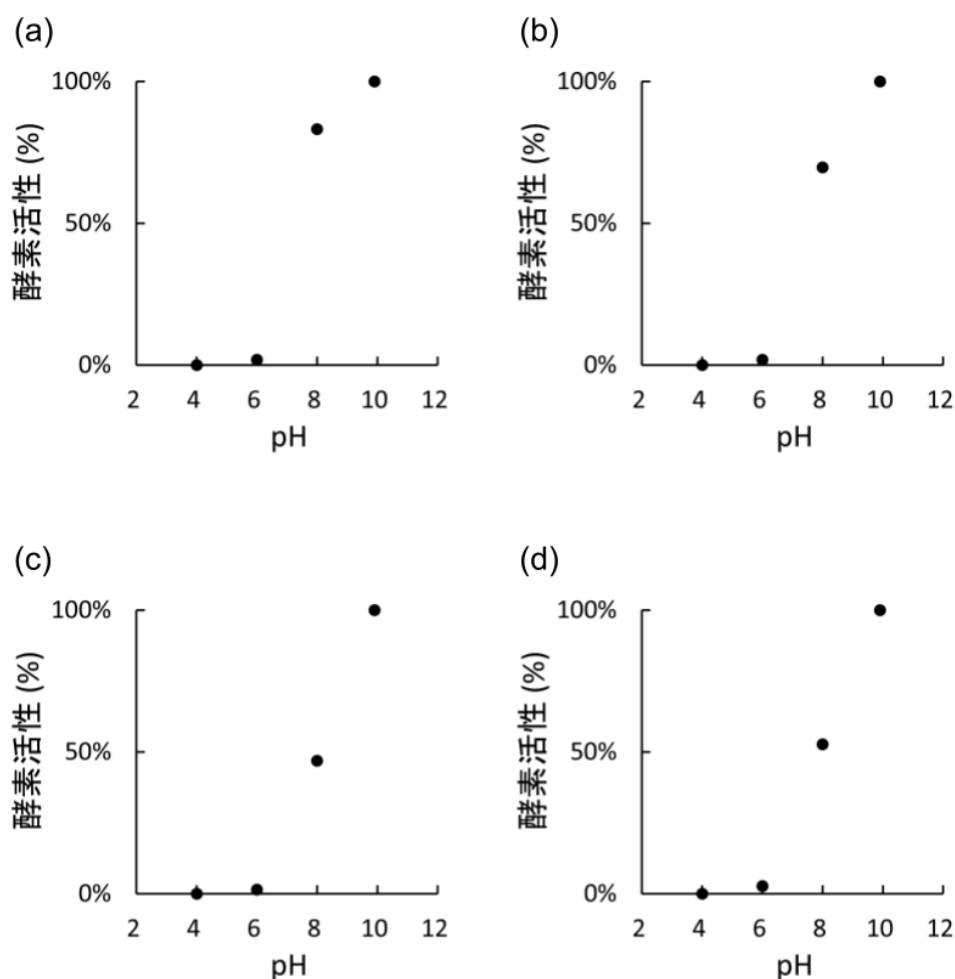


図 2-14 pH 4-10 条件下における GuUGD1-4 組換えタンパク質の酵素活性

(a) は GuUGD1, (b) は GuUGD2, (c) は GuUGD3, (d) は GuUGD4 組換えタンパク質の酵素活性を示す。酵素活性は最も高い初速度を観測した pH 10 における初速度を 100% として、それぞれの pH において観測された初速度から酵素活性のパーセンテージを計算した。測定はそれぞれ 1 回行った。

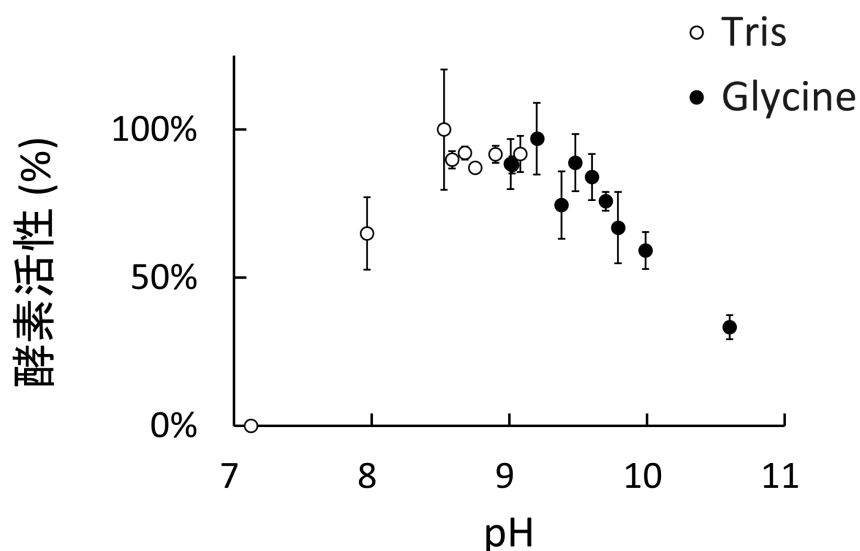


図 2-15 様々な pH 条件下における GuUGD4 組換えタンパク質の酵素活性

酵素活性は最も高い初速度を観測した pH 8.5 における初速度を 100% として、それぞれの pH において観測された初速度から酵素活性のパーセンテージを計算した。エラーバーは SE を示す。それぞれの pH において triplicate で測定した。

○ 活性阻害の確認

UGD の活性は NaCl 存在下において阻害されることが知られている。そこで、LC-MS を用いた反応物の検出において最も大きなピークが検出された GuUGD2 組換えタンパク質を代表として用い、NaCl による反応阻害が見られるか吸光度測定を用いて評価した。図 2-16 に示すように、200 mM の NaCl 存在下で大きな活性の低下が見られ、さらに 1000 mM の NaCl 存在下ではほとんど活性が見られないほどに反応が阻害された。

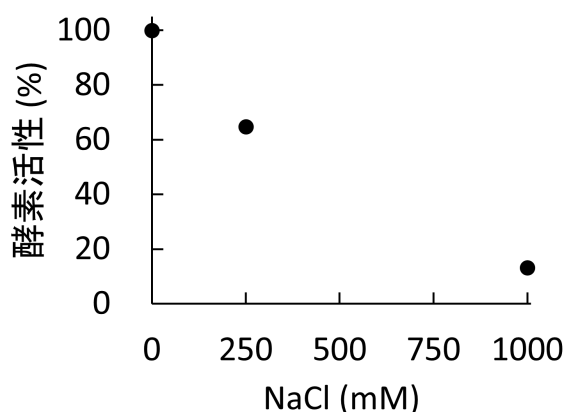


図 2-16 NaClによる GuUGD2 組換えタンパク質の活性阻害

酵素活性は阻害剤なしで行った標準アッセイで観測された初速度を 100% として、それぞれの NaCl 濃度において観測された初速度から酵素活性のパーセンテージを計算した。測定はそれぞれ 1 回行った。

UGD は生産物である UDP-GlcA や、さらに下流の代謝物である UDP-Xyl によってフィードバック阻害を受けることが知られている。GuUGD1-4 組換えタンパク質におけるフィードバック阻害の影響を調べた結果、UDP-Xyl と UDP-GlcA による阻害の影響は UGD アイソフォーム間で異なることが明らかになった。20 μ M の UDP-Xyl の存在下において、GuUGD4 組換えタンパク質の酵素活性は UDP-Xyl 非存在下と比較して約 0.6 倍に低下したが、GuUGD1-3 組換えタンパク質の酵素活性はほとんど変化しなかった (表 2-10)。また、UDP-GlcA による UGD 活性の低下は GuUGD4 組換えタンパク質でのみ観察された。500 μ M の UDP-Xyl の存在下では、GuUGD1-4 組換えタンパク質すべての酵素活性が阻害された。

表 2-10 UDP-Xyl と UDP-GlcA による UGD 活性阻害の影響

阻害剤	それぞれのアイソフォームの酵素活性			
	GuUGD1	GuUGD2	GuUGD3	GuUGD4
阻害剤なし	1.0	1.0	1.0	1.0
UDP-Xyl (20 μ M)	0.8	1.1	0.9	0.6

UDP-Xyl (500 μ M)	0.0	0.0	0.0	0.1
UDP-GlcA (20 μ M)	1.0	1.1	1.1	0.9
UDP-GlcA (1250 μ M)	1.0	1.0	1.1	0.3

それぞれの UGD 組換えタンパク質について、阻害剤を加えていない標準反応での初速度を 1.0 として、阻害剤の添加によって初速度が何倍に変動したかを示す。測定はそれぞれ 1 回行った。

○ 基質特異性の確認

植物の UGD タンパク質の中には、他の糖ヌクレオチドをマイナーな基質として、あるいは、 NADP^+ をマイナーな補酵素として認識し、弱い酵素活性を示すものも報告されている。そこで、基質については、UDP-Glc 以外に UDP-Gal, UDP-N-アセチルグルコサミン, TDP-Glc, ADP-Glc, GDP-Glc を、補酵素については NAD^+ 以外に NADP^+ についても酵素活性を示すか試験した。その結果、GuUGD4 組換えタンパク質のみが UDP-Gal と UDP-N-アセチルグルコサミンに対して、それぞれ UDP-Glc と比較して 15% と 10% の活性を示した (表 2-11)。TDP-Glc, ADP-Glc, GDP-Glc および NADP^+ については、どの GuUGD 組換えタンパク質も活性を示さなかった。

表 2-11 GuUGD アイソフォームの基質特異性

糖ヌクレオチド	UGD アイソフォームの相対的な酵素活性 (%)				
	GuUGD1	GuUGD2	GuUGD3	GuUGD4	GuUGD5
UDP-Glc	100	100	100	100	n.d.
UDP-Gal	n.d.	n.d.	n.d.	15	n.d.
UDP-N-アセチルグルコサミン	n.d.	n.d.	n.d.	10	n.d.

100% は、UDP-Glc を基質、 NAD^+ を補酵素とする標準試験で示された活性に相当する。n.d., not detected. 測定はそれぞれ 1 回行った。

○ 速度論的パラメータの測定

UGD はアイソフォームによって多様な速度論的パラメータを持つことが知られている。ウラルカンゾウの UGD アイソフォームの生化学的な特性を調べるために、活性を検出できた GuUGD1-4 組換えタンパク質について、UDP-Glc と NAD^+ に対する速度論的パラメータを Python を用いてガウス・ニュートン法に基づく非線形最小二乗法により解析した。図 2-17 に示すように、GuUGD1-4 組換えタンパク質のいずれにおいても、基質濃度に対する反応速度のプロットは典型的な Michaelis-Menten 式型の曲線を描き、高い基質濃度域でも阻害が起きていないことを示した。基質である UDP-Glc と、補酵素である NAD^+ に対する親和性および触媒定数は、GuUGD のアイソフォーム間で、大きいものでは 1 桁異なっていた (表 2-12)。UDP-Glc と NAD^+ のいずれに対しても最も高い触媒定数は GuUGD2 組換えタンパクで検出され、他の GuUGD アイソフォームの 2 倍以上の k_{cat} 値を示した。また、GuUGD4 組換えタンパク質は UDP-Glc に対する親和性が最も高く、他の GuUGD アイソフォームの K_m 値の 5 分の 1 以下であった。

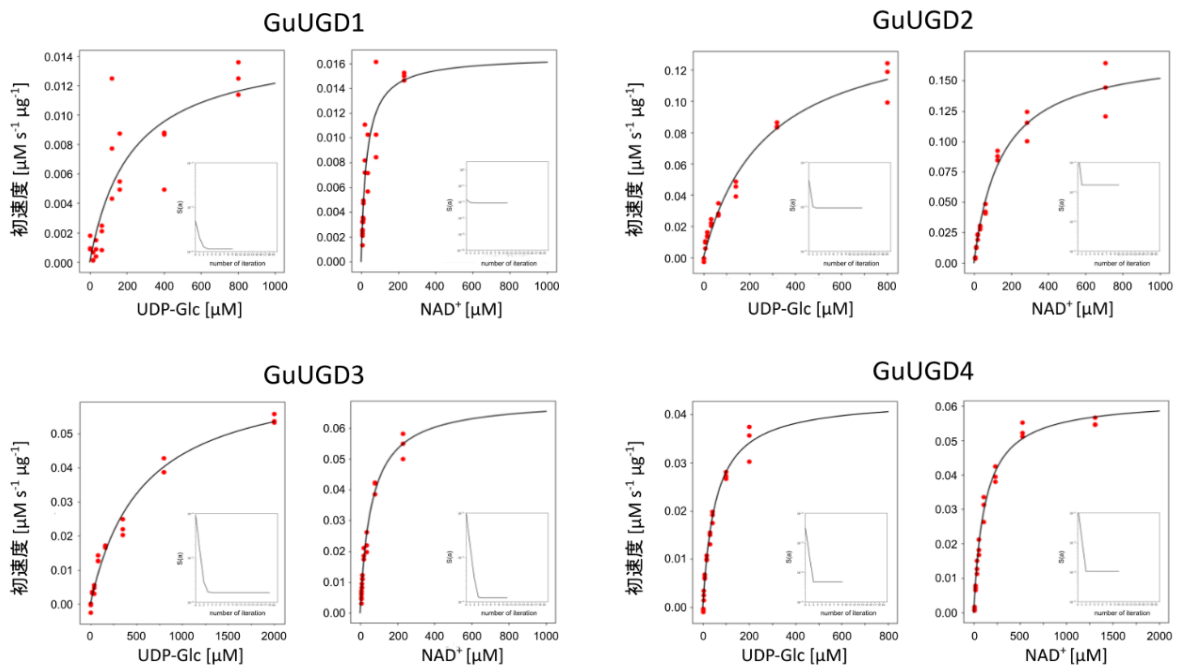


図 2-17 GuUGD1-4 組換えタンパク質の速度論的パラメータの解析

ミカエリスメンテンの式に基づいて、ガウス・ニュートン法でカーブフィッティングを行った結果を示す。なお、各図の右下に示す小さい図はフィッティングパラメータの二乗和と反復回数の関係を示しており、二乗和の値が収束していればフィッティングは成功であることを意味する。いずれのフィッティングにおいても二乗和は収束しており、フィッティングは成功していることを示している。測定は triplicate で行った。

表 2-12 GuUGD1-4 組換えタンパク質の速度論的パラメータ

アイソフォーム	for UDP-Glc			for NAD ⁺		
	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)
GuUGD1	261 $\pm$ 84	0.09 $\pm$ 0.01	0.0003	31 $\pm$ 5	0.10 $\pm$ 0.01	0.0031
GuUGD2	285 $\pm$ 54	0.89 $\pm$ 0.09	0.0031	153 $\pm$ 29	1.01 $\pm$ 0.12	0.0066
GuUGD3	570 $\pm$ 46	0.39 $\pm$ 0.01	0.0007	62 $\pm$ 7	0.40 $\pm$ 0.02	0.0064
GuUGD4	55 $\pm$ 5	0.25 $\pm$ 0.02	0.0045	122 $\pm$ 15	0.36 $\pm$ 0.01	0.0029

数値は triplicate で測定を行った平均の値 $\pm$ SE を示す。

● ウラルカンゾウにおける UGD 遺伝子の転写レベル

オープンデータベースを用いてウラルカンゾウにおける組織、および、季節依存的な UGD 遺伝子の転写パターンを解析した。夏に採取された根 (根・夏), 冬に採取された根 (根・冬), および夏に採取された葉 (葉・夏) のいずれにおいても, *GuUGD2* 遺伝子の転写量が最も多かった (図 2-18)。

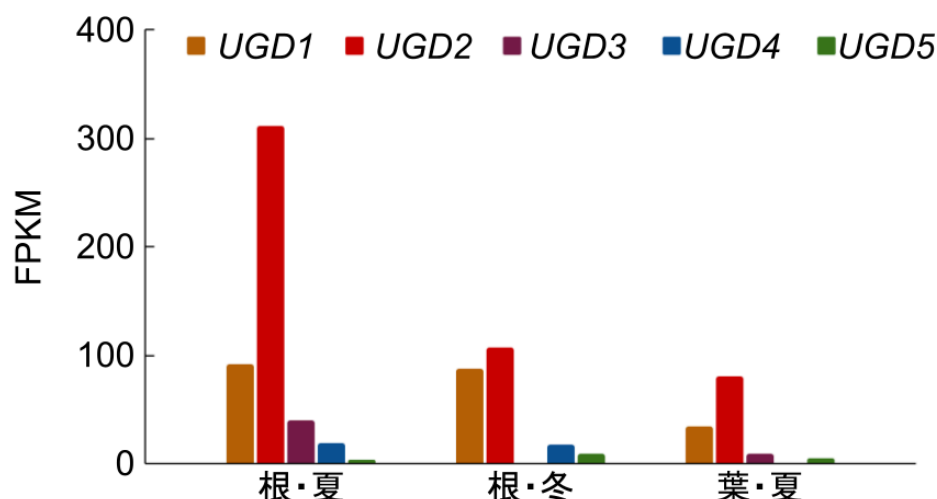


図 2-18 *GuUGD1-5* 遺伝子の転写レベル

ウラルカンゾウのトランスクリプトームデータベースから取得した *UGD* 遺伝子の転写レベルを示す。それぞれのバーは、茶色: *GuUGD1*; 赤色: *GuUGD2*; 紫色: *GuUGD3*; 青色: *GuUGD4*; 緑色: *GuUGD5* 遺伝子の転写レベルを示す。

2.4 考察

本章では、これまで *UGD* 遺伝子が同定されていなかったウラルカンゾウにおいて、組換えタンパク質を用いた実験により、4 つの *UGD* 遺伝子を同定することに成功した。これまでに、複数の *UGD* アイソフォームの組換えタンパク質の解析に成功した例はシロイヌナズナ (Klinghammer and Tenhaken 2007) だけであり、本研究の成果は、これに続く先駆的な研究である。さらに、*GuUGD* アイソフォームの生化学的特性と遺伝子転写パターンから、基質が十分に存在する環境下においては、*GuUGD2* タンパク質がウラルカンゾウの *UGD* 活性において主要な役割を担っていることが示唆された。

● ウラルカンゾウの推定 *UGD* 遺伝子

ウラルカンゾウの *UGD* 遺伝子を同定することを目的に、既知の *AtUGD1* アミノ酸配列との相同性をもとに推定 *UGD* 遺伝子のマイニングを試みた。抽出された上位

4 つの Unigene はカバー率も同一性も高かったことから、*UGD* 遺伝子である可能性が高いと考えられる。また、カバー率の低かった Unigene14817, Unigene6695, Unigene13362, Unigene7645 は部分配列として抽出されており、同一性が高く、コードする配列が *UGD* タンパク質の 3 つの機能的触媒モチーフ (UDP 結合ドメイン, 活性中心, NAD^+ 結合ドメイン) のいずれかに相当することが示唆されたため (図 2-3), 全長配列は *UGD* タンパク質をコードする可能性があると考えられた。データベースから抽出されたこれら 8 つの Unigene は AtUGD1 タンパク質と高い同一性を示したが、その他は短い配列が 31% 以下の同一性を示しただけであった (表 2-5)。UGD タンパク質のアミノ酸配列は生物種を超えて高い同一性を持つことが知られている。例えば、シロイヌナズナの AtUGD1 のアミノ酸配列は、ダイズの UGD と 85%, ヒトの UGD と 58%, 化膿性レンサ球菌の UGD と 22% の同一性を有する。したがって、AtUGD1 のアミノ酸配列と 31% しか同一性がない配列は UGD である可能性が低いと考えられる。以上のことから、本研究ではスコア降順で 8 番目までの Unigene を対象とした。

遺伝子解析の結果、8 つの Unigene は 5 つの遺伝子に由来することが明らかになった。これらの遺伝子は一般的に報告されている UGD タンパク質とほぼ同じサイズであり、シロイヌナズナの AtUGD1-4 タンパク質との同一性も高いことから、UGD 活性を有している可能性が高いと考えられる。また、*GuUGD1-5* 遺伝子は互いに異なる Scaffold に位置していたことから (表 2-9), 独立した遺伝子であり、タンデムな重複により派生した可能性は低いと考えられる。なお、シロイヌナズナでは、酵素活性に必須の NAD^+ 結合部位を含む配列全長の約 3 分の 2 を欠いた偽遺伝子の存在が報告されているが (Klinghammer and Tenhaken 2007), 本研究では、配列の一部が欠損した Unigene が 4 つデータベースから抽出されたものの、いずれも全長は既知の *UGD* 遺伝子の全長と同程度の長さを有しており、このような偽遺伝子は確認されなかった。

● 大腸菌発現系の検討

大腸菌発現系による UGD 組換えタンパク質の発現はあまり容易ではなく、過去の研究で多くの改良が施されてきた。シロイヌナズナの UGD アイソフォームの機能解

析を行った Klinghammer と Tenhaken (2007) は, AtUGD2-4 の組換えタンパク質の発現に成功したが, AtUGD1 の活性は検出できなかった. しかし, AtUGD1 が酵素活性を有することは, 酵母発現系を用いた Oka と Jigami (2006) の研究で示されている. Tenhaken らは, 以前にダイズ UGD の組換えタンパク質のクローニングにも成功しており (Hinterberg et al. 2002), ダイズでは一般的な *E. coli* strain XL-1 (Agilent Technologies, アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンタクララ) を使用して UGD を発現させていたが, シロイヌナズナ UGD ではタンパク質のフォールディングを改善させる *E. coli* strain Origami (Novagen, ドイツ連邦共和国 ヘッセン州 ダルムシュタット) を使用し, さらにシャペロン GroEL/ES を共発現させるといった改良を行っている. また, Labate らは, ローズガム (*E. grandis*) の組換え UGD のクローニングにおいて, 有毒なタンパク質の発現誘導に適した *E. coli* strain BL21-AI (Thermo Fisher Scientific) を使用している (Labate et al. 2010).

本研究では, GuUGD 組換えタンパク質の酵素反応試験を行うために, いくつかの発現系を検討した. pGEX-5x-1 ベクターは可溶性の高い GST が融合したタンパク質を発現させることで, 目的タンパク質を可溶性画分に発現できる可能性が高くなるという特徴がある. pCold™ I DNA ベクターは, 低温で培養することで大腸菌由来のタンパク質の発現を抑えられ, さらに生産効率が良く, 可溶性で発現させやすいという特徴がある. pCold™ TF DNA ベクターは, pCold™ I DNA ベクターの特長にプラスして, 可溶化タグおよびシャペロン機能のある TF を融合させて発現させることで, より高い確率で可溶化タンパク質として発現させることができる. pET161-DEST ベクターは蛍光検出ができる Lumio タグを融合したタンパク質を発現させることができるため, タンパク質の発現を評価しやすいと考えて使用した. 大腸菌のホストについては, Rosetta-gami™ 2(DE3)pLysS 大腸菌はジスルフィド結合の形成を促進してタンパク質の発現を助ける特徴がある. One Shot™ BL21 Star™ (DE3) 大腸菌は pET ベクターから非毒性組換えタンパク質を高レベルで発現させる用途に最適化された大腸菌であるため使用したが, pET ベクターではないその他の発現系にも流用した. また, groES-groEL シャペロンは変性したタンパク質を捕縛して分解したり, 安全にフォールディングさせる機能があるため使用した. 結果として, 可溶性タンパク質として発現できたのは, pCold™ I DNA ベクター, One Shot™ BL21 Star™ (DE3) 大腸菌, groES-groEL シャペロンの組み合わせ (発現系 No. 5) と pCold™ TF DNA ベク

ター, One Shot™ BL21 Star™ (DE3) 大腸菌の組み合わせ (発現系 No. 6) だけであった (図 2-9). また, 発現系 No. 6 で発現させた UGD 組換えタンパク質では酵素活性を検出できなかった (図 2-10). 発現系 No. 6 では 48 kDa の TF が融合していることで, UGD 組換えタンパク質のサイズが本来の UGD タンパク質の 2倍近く大きくなっている. UGD タンパク質はシロイヌナズナではヘキサマーとして働くことが報告されていることから (Oka and Jigami 2006), TF が融合したことで UGD タンパク質の立体構造が変化して活性を示さなかった可能性があるのではないかと考えられる.

なお, 発現系 No. 5 と発現系 No. 6 を用いて発現された GuUGD2 組換えタンパク質の酵素活性試験 (図 2-10) において, 測定 0 秒時の吸光度が 0 でないのは, 反応液にタンパク質を手動で 1 つずつ加え, 装置にセットするという実験手法のため, タンパク質を加えてから装置が測定を開始するまでに時間差が生じ, 測定 0 秒時点ではすでに反応が数秒進行していることが原因であると推測される. また, 図 2-10 (a) で測定時間 0 秒時の吸光度が UDP-Glc 800 μ M の反応液より UDP-Glc 160 μ M の反応液で高いのは, UDP-Glc 濃度の低い反応液から順に酵素を加えたため, UDP-Glc 160 μ M の反応液の方が測定開始までの時間差が大きく, その間に変換された NADH の量も多くなっていることを示していると考えられる.

● UGD 組換えタンパク質の発現と酵素活性

UGD 組換えタンパク質を得るために, 発現系 No. 5 を用いて, *GuUGD1-5* 遺伝子, ポジティブコントロールの *AtUGD2* 遺伝子, ネガティブコントロールの空ベクター (empty) を大腸菌へ導入した. 発現誘導後の上清において, empty と比較して *GuUGD1-5* 組換えタンパク質や *AtUGD2* 組換えタンパク質を流したラインでは約 50 kDa の明瞭なバンドが確認された (図 2-11). このことは, UGD 組換えタンパク質が正常に発現していることを示している. 次に, タンパク質の精製処理を行ったところ, *GuUGD1-4* 組換えタンパク質や *AtUGD2* 組換えタンパク質と比較して, *GuUGD5* 組換えタンパク質の溶出液で見られるバンドは強度が非常に弱くなった (図 2-11). この結果から, *GuUGD5* 組換えタンパク質は精製過程で大きなロスが生じていると考えられる. UGD はシロイヌナズナではヘキサマーとして機能することが

報告されているため (Oka and Jigami 2006), 本研究の濃縮工程ではモノマーは素通りする 100K Nominal Molecular Weight Limit (NMWL) の膜を使用した。濃縮液で UGD 組換えタンパク質のバンドが検出されたことから (図 2-12), UGD 組換えタンパク質が二量体以上のオリゴマーを形成していることが示唆された。

本研究では, GuUGD1-5 組換えタンパク質の UGD 酵素活性を LC-MS 分析により検証した。その結果, GuUGD1-4 組換えタンパク質の反応生成物からは UDP-GlcA のピークが検出されたが, GuUGD5 組換えタンパク質の反応生成物からは UDP-GlcA のピークは検出されなかった (図 2-13)。このことから, GuUGD5 組換えタンパク質は UGD 活性を有していないか, 検出限界以下の非常に低い活性しか有していない, あるいは, 精製過程で変性したか, 大腸菌内在性のタンパク質による阻害が起きたと考えられる。GuUGD5 組換えタンパク質は精製工程で大きなロスを生じ (図 2-11), 他の GuUGD 組換えタンパク質よりも低い純度でしか得られなかった (図 2-12 左)。また, タンパク質の濃度が低かったことから, 酵素反応試験では同じ物質量のタンパク質を添加するために, 他の GuUGD 組換えタンパク質よりも大きな容積で添加せざるを得なかった。そのため, 大腸菌内在のタンパク質が過剰に混入し, UGD 活性を阻害した可能性がある。

● GuUGD タンパク質と既知の UGD タンパク質の特性の比較

いくつかの植物種において UGD タンパク質の生化学的特性が解析されている (表 2-13)。GuUGD タンパク質がこれらの特性を有するかを検証するために, pH 依存性, NaCl による阻害の影響, UDP-GlcA と UDP-Xyl によるフィードバック阻害の影響, 基質特異性, 速度論的パラメータを解析した。

GuUGD1-4 組換えタンパク質は pH 8 と pH 10 の条件下で酵素活性を示した (図 2-14)。さらに, GuUGD4 組換えタンパク質は pH 8.5-9.0 の条件下で最も高い酵素活性を有することが明らかになった (図 2-15)。この結果は, 既知の UGD タンパク質の至適 pH が 8.4-9.0 であること (表 2-13) と一致する。既知の UGD タンパク質の至適 pH が 8.5-9.0 という比較的狭い範囲に収まっており, また, 酵素量に限りがあったため, 本研究では GuUGD1-3 組換えタンパク質の pH 依存性の詳細な解析を行わ

なかったが、今後十分な酵素量が確保できれば、GuUGD4 と組換えタンパク質同様に pH 条件を細かく変化させて triplicate で測定することが望ましい。また、GuUGD5 組換えタンパク質については CL-MS で用いた pH 8.7 の条件下で酵素活性を検出できなかったため、至適 pH の試験は行わなかった。GuUGD5 タンパク質も既知の UGD タンパク質と大きく異なる至適 pH を持つとは考えにくいですが、もし至適 pH が異なるならば、pH 8.7 の試験では活性を検出できなかった可能性もあるため、より低い、もしくは高い pH における酵素活性も確認する必要がある。

GuUGD2 組換えタンパク質を用いて NaCl が UGD 酵素活性に影響を与えるか調べたところ、NaCl 濃度依存的な酵素活性の低下が確認された。250 mM の NaCl 存在下では、NaCl がいない条件と比較して、UGD 酵素活性は約 60% 低下した。(図 2-16)。この結果は、ダイズの UGD タンパク質が 250 mM の NaCl 存在下で約 60% に活性低下を示すことと一致している (Hinterberg et al. 2002)。したがって、GuUGD タンパク質は NaCl 阻害に関しても、他の植物 UGD タンパク質と同様の性質を有していると考えられる。なお、活性の低下が濃度依存的であることと変化量が大きいことから、本試験の結果はある程度確からしいと考えられるが、測定を 1 回しか行っていないため、統計的に有意な変化であることを確認するためには、複数回測定を行う必要がある。また、本研究ではタンパク質の量が限られていたため GuUGD2 組換えタンパク質のみ用いたが、他の GuUGD タンパク質についても同様の実験を行う必要がある。

GuUGD1-4 組換えタンパク質の UDP-GlcA および UDP-Xyl に対するフィードバック阻害の感受性を解析した。表 2-10 に示すように、1250 μ M の UDP-GlcA 存在下では GuUGD4 組換えタンパク質の酵素活性が、阻害剤を添加していない標準反応と比較して 0.3 倍に低下した。また、20 μ M の UDP-Xyl 存在下では GuUGD4 組換えタンパク質の酵素活性は 0.6 倍に低下し、500 mM の UDP-Xyl 存在下では GuUGD1-4 組換えタンパク質の酵素活性はほとんど検出されなかった。これらの結果は、GuUGD1-4 組換えタンパク質の酵素活性が UDP-Xyl によって UDP-GlcA より強く阻害されることと、UDP-Xyl に対する感受性がアイソフォームによって異なることを示している。既知の植物 UGD タンパク質では、UDP-Xyl に対する K_i 値は UDP-GlcA に対する K_i 値より小さいことが報告されており (表 2-13)、GuUGD1-4 組換えタンパク質で見られる性質と一致する。また、シロイヌナズナの AtUGD1-4

組換えタンパク質では UDP-Xyl に対する感受性にアイソフォーム間で差があることも (表 2-13), GuUGD1-4 組換えタンパク質で見られた結果と一致している. これらのことから, GuUGD タンパク質は既知の植物 UGD タンパク質と同様の性質を有していると考えられる. ただし, この試験も測定は 1 回しか行っていないので, 阻害効果が有意なものであるかを確認するためには, 複数回測定を行う必要がある.

GuUGD1-5 組換えタンパクを用いて基質および補酵素に対する特異性を解析した. UDP-Glc に対する酵素活性を 100% とすると, GuUGD4 組換えタンパク質が UDP-Gal と UDP-N-アセチルグルコサミンに対してそれぞれ 15% と 10% の酵素活性を示し, それ以外の GuUGD 組換えタンパク質は酵素活性を示さなかった (表 2-11). UDP-Gal に対しては, テッポウユリの UGD タンパク質が UDP-Glc 比で 26% (Davies and Dickinson 1972), ダイズの UGD タンパク質が 7% (Stewart and Copeland 1998) の酵素活性を示すことが報告されている一方で, シロイヌナズナの AtUGD2-4 組換えタンパク質 (Klinghammer and Tenhaken 2007), 別のグループによって行われたダイズの UGD 組換えタンパク質 (Hinterberg et al. 2002) では, UDP-Gal に対する活性を示さないことが報告されている. また, UDP-N-アセチルグルコサミンに対しては, シロイヌナズナの AtUGD2-4 組換えタンパク質で酵素活性を示さないことが報告されている (Klinghammer and Tenhaken 2007). これらのことは, 基質特異性は植物種や UGD アイソフォームによって異なることを示唆している. 本研究ではこの他にも, テッポウユリ (Davies and Dickinson 1972), ダイズ (Stewart and Copeland 1998), サトウキビ (Turner and Botha 2002) の UGD タンパク質で 2-17% の活性が報告されている TDP-Glc や, シロイヌナズナ (Klinghammer and Tenhaken 2007) の AtUGD2-4 組換えタンパク質で 20-23% の活性が報告されている NADP^+ についても酵素活性試験を行ったが, GuUGD1-5 組換えタンパク質のいずれにおいても活性は検出されなかった. このことから, GuUGD タンパク質は他の既知の UGD タンパク質と同様に, UDP-Glc を基本的な基質, NAD^+ を基本的な補酵素とし, それ以外の糖ヌクレオチドや NADP^+ に対する活性は稀なものであると考えられる. GuUGD5 組換えタンパク質は本研究で試験したいずれの糖ヌクレオチド (UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-N-アセチルグルコサミン, TDP-Glc, ADP-Glc, GDP-Glc) と NADP^+ に対しても酵素活性を示さなかったことから, UGD 以外の酵素活性を有するような進化を遂げている可能性は低いと考えられる.

GuUGD1-4 組換えタンパク質の速度論的パラメータを UDP-Glc と NAD^+ の両方について測定した。補酵素（あるいは基質）濃度が十分に高い場合には、基質である UDP-Glc 濃度を変動させて求めた触媒定数と補酵素である NAD^+ 濃度を変動させて求めた触媒定数は一致すると予想されるが、GuUGD2 組換えタンパク質と GuUGD4 組換えタンパク質では UDP-Glc に対して求めた触媒定数が NAD^+ に対して求めた触媒定数より低かった（表 2-12）。GuUGD2 組換えタンパク質と GuUGD4 組換えタンパク質は、GuUGD1 組換えタンパク質や GuUGD3 組換えタンパク質と比較して NAD^+ に対する K_m 値が高かったことから（表 2-12）、UDP-Glc に対する触媒定数を求めた反応液中の NAD^+ 濃度が GuUGD2 タンパク質と GuUGD4 タンパク質にとっては十分に高くなかった可能性がある。したがって、GuUGD2 組換えタンパク質と GuUGD4 組換えタンパク質は NAD^+ に対する触媒定数（GuUGD2 組換えタンパク質は k_{cat} 値 1.01 s^{-1} 、GuUGD4 組換えタンパク質は k_{cat} 値 0.36 s^{-1} ；表 2-12）を採用する方が適切であると考えられる。一方、GuUGD1 組換えタンパク質と GuUGD3 組換えタンパク質では、UDP-Glc および NAD^+ の両方に対して同程度の触媒定数が得られたので、比較的信頼性の高い値であると考えられるが、 NAD^+ に対する測定域が低濃度に偏っているため（図 2-17）、より正確に算出するためには、より高濃度での測定が必要である。GuUGD1-4 組換えタンパク質の k_{cat} 値は $0.1\text{--}1.0 \text{ s}^{-1}$ の範囲で算出された（表 2-12）。既知の植物 UGD タンパク質では、組換えタンパク質で k_{cat} 値 $1.2\text{--}59.8 \text{ s}^{-1}$ 、植物から精製されたタンパク質で k_{cat} 値 1.9 s^{-1} と報告されていることから（表 2-13）、GuUGD1-4 組換えタンパク質の触媒定数は他の植物よりも低いことが示唆される。また、GuUGD1-4 組換えタンパク質の K_m 値は UDP-Glc に対して $55\text{--}570 \mu\text{M}$ 、 NAD^+ に対して $31\text{--}153 \mu\text{M}$ の範囲で算出された（表 2-12）。既知の植物 UGD タンパク質では、UDP-Glc に対して、組換えタンパク質で K_m 値 $15\text{--}335 \mu\text{M}$ 、植物から精製されたタンパク質で K_m 値 $19\text{--}5500 \mu\text{M}$ と報告されており（表 2-13）、また、 NAD^+ に対して、組換えタンパク質で K_m 値 $42\text{--}70 \mu\text{M}$ 、植物から精製されたタンパク質で K_m 値 $20\text{--}400 \mu\text{M}$ と報告されており（表 2-13）、どちらも GuUGD1-4 組換えタンパク質の性質と一致している。これらのことから、GuUGD1-4 タンパク質は一般的な植物 UGD タンパク質と同程度の基質濃度で機能する一方で、1 分子当たりの反応は緩やかなことが示唆される。

表 2-13 既知の植物 UGD タンパク質の生化学的な特性

植物種	アイソフォーム	タンパク質の由来	至適 pH	基質	補酵素	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)		K_i (μM)	K_i (μM)	引用文献
						for UDP-Glc	for UDP-Glc	for NAD ⁺	for UDP-Xyl	for UDP-GlcA	
シロイヌナズナ <i>Arabidopsis thaliana</i>	UGD1	遺伝子組換え	試験なし	試験なし	試験なし	試験なし	15	試験なし	5	99	Oka and Jigami 2006
	UGD2	遺伝子組換え	試験なし	UDP-Glc	NAD ⁺ NADP ⁺	1.92	123	43	83	試験なし	Klinghammer and Tenhaken 2007
	UGD3	遺伝子組換え	試験なし	UDP-Glc	NAD ⁺ NADP ⁺	2.52	335	42	156	試験なし	Klinghammer and Tenhaken 2007
	UGD4	遺伝子組換え	試験なし	UDP-Glc	NAD ⁺ NADP ⁺	1.17	171	44	220	試験なし	Klinghammer and Tenhaken 2007
セイヨウアブラナ <i>Brassica napus</i> L. cv Barossa	区別なし	植物組織	試験なし	試験なし	試験なし	試験なし	80	110	試験なし	試験なし	Stewart and Copeland 1998
ローズガム <i>Eucalyptus grandis</i>	区別なし	遺伝子組換え	試験なし	試験なし	試験なし	59.8 (※)	61	67	試験なし	試験なし	Labate et al. 2010

植物種	アイソフォーム	タンパク質の由来	至適 pH	基質	補酵素	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)		K_i (μM)	K_i (μM)	引用文献
						for UDP-Glc	for UDP-Glc	for NAD ⁺	for UDP-Xyl	for UDP-GlcA	
ダイズ <i>Glycine max</i> L.	区別なし	植物組織 (nodule)	8.4	UDP-Glc TDP-Glc UDP-Gal UDP-Man	NAD ⁺	試験なし	51	120	試験なし	試験なし	Stewart and Copeland 1998
ダイズ <i>Glycine max</i> L.	区別なし	植物組織 (seeds)	試験なし	試験なし	試験なし	試験なし	110	120	試験なし	試験なし	Stewart and Copeland 1998
ダイズ <i>Glycine max</i> L.	区別なし	遺伝子組換え	8.7	UDP-Glc	NAD ⁺	試験なし	22	70	10	試験なし	Hinterberg et al. 2002
テッポウユリ <i>Lilium longiflorum</i>	区別なし	植物組織	8.4–8.8	UDP-Glc UDP-Gal CDP-Glc TDP-Glc	NAD ⁺	試験なし	300	400	16	400	Davies and Dickinson 1972
エンドウ Pea	区別なし	植物組織	9.0	UDP-Glc類似体	試験なし	試験なし	70	試験なし	試験なし	試験なし	Strominger and Mapson 1957
インゲンマメ <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	区別なし	植物組織	試験なし	試験なし	試験なし	試験なし	5500	20	試験なし	試験なし	Robertson et al. 1996
サトウキビ <i>Saccharum</i> spp. hybrid	区別なし	植物組織	8.4	UDP-Glc CDP-Glc TDP-Glc	NAD ⁺	1.88 (※)	19	72	17	292	Turner and Botha 2002

植物種	アイソフォーム	タンパク質の由来	至適 pH	基質	補酵素	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)		K_i (μM)	K_i (μM)	引用文献
						for UDP-Glc	for UDP-Glc	for NAD ⁺	for UDP-Xyl	for UDP-GlcA	
コムギ <i>Triticum aestivum</i> L. cv Vulcan	区別なし	植物組織	試験なし	試験なし	試験なし	試験なし	110	200	試験なし	試験なし	Stewart and Copeland 1998
トウモロコシ <i>Zea mays</i> L.	UDPGDH-A	植物組織	試験なし	試験なし	試験なし	試験なし	380	試験なし	試験なし	試験なし	Kärkönen et al. 2005
	UDPGDH-B	植物組織	試験なし	試験なし	試験なし	試験なし	950	試験なし	試験なし	試験なし	Kärkönen et al. 2005

(※) ローズガムとサトウキビは報告されている V_{max} の値を k_{cat} に換算して記載する. ローズガムの UGD 組換えタンパク質は 53 kDa, $V_{max} = 67.9 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ と報告されていることから, $k_{cat} = 59.8 \text{ s}^{-1}$ 相当とした. サトウキビはから抽出された UGD タンパク質は 52 kDa, $V_{max} = 2.17 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ と報告されていることから, $k_{cat} = 1.88 \text{ s}^{-1}$ 相当とした.

● GuUGD1-4 アイソフォームの比較

酵素反応試験の結果, GuUGD2 組換えタンパク質は UDP-Glc と NAD^+ のどちらに対しても, 特に大きな触媒効率を示した (表 2-12). その特徴は触媒定数の大きさにて, 他の GuUGD 組換えタンパク質と比較して約 2-10 倍大きい値を示したことから (表 2-12), UDP-Glc や NAD^+ が豊富に存在する環境下では, GuUGD2 タンパク質の酵素活性が特に高いことが示唆された. さらに, トランスクリプトームデータベースから, ウラルカンゾウでは, 組織や季節を問わず *GuUGD2* 遺伝子が最も多く転写されていることが示され, 他の *GuUGD* 遺伝子と比較して 1.2-400 倍の転写レベルに達していた (図 2-18). これらのことから, ウラルカンゾウにおいて UGD 機能を主に担うアイソフォームは GuUGD2 タンパク質であると推測される. ウラルカンゾウにおける UDP-Glc の濃度は未知であるが, 以下の推論に基づいて, UDP-Glc の濃度は $15\ \mu\text{M}$ - $3.5\ \text{mM}$ と考えられる. UDP-Glc はいくつかの植物で 0.007 - $1.6\ \text{nmol mg}^{-1}$ fresh weight の範囲で検出されている (Hayashi and Matsuda 1981; Macrae et al. 1992; Morrell and Rees 1986; Rees et al. 1984; Schlupmann et al. 1994). また, *Nicotiana alata* の花粉管では, UDP-Glc の濃度と量はそれぞれ $3.5\ \text{mM}$ と $1.6\ \text{nmol mg}^{-1}$ と推定されている (Schlupmann et al. 1994). UDP-Glc の量と, UDP-Glc の濃度と量の関係が, すべての細胞で同じであると仮定すると, UDP-Glc の量がそれぞれ $0.007\ \text{nmol mg}^{-1}$ と $1.6\ \text{nmol mg}^{-1}$ の場合, UDP-Glc の濃度はそれぞれ $15\ \mu\text{M}$ と $3.5\ \text{mM}$ と計算できる. GuUGD2 組換えタンパク質の UDP-Glc に対する K_m 値は $285\ \mu\text{M}$ であり (表 2-12), カーブフィッティングの結果から (図 2-17), $3.5\ \text{mM}$ に近い高濃度域では最大速度に近い酵素活性を示すことが予測される.

植物細胞内の UDP-Glc 濃度は環境条件によって変動することが知られており, 例えば, エンドウの根粒では浸水ストレスによって UDP-Glc の濃度がコントロールの 37% に低下したという報告がある (Galvez et al. 2005). UDP-Glc 濃度の低下に対応しては, GuUGD2 タンパク質と同程度の触媒効率 (k_{cat}/K_m) を持つ GuUGD4 タンパク質が重要な役割を果たす可能性が考えられる. GuUGD4 組換えタンパク質は GuUGD1-4 組換えタンパク質の中で最も高い基質親和性を持ち, K_m 値は GuUGD2 組換えタンパク質の約 5 分の 1 であった (表 2-12). 同時に, GuUGD4 組換えタンパク質はフィードバック阻害に対する感受性が最も高いアイソフォームでもあった (表 2-10). このことから, GuUGD4 タンパク質は基質である UDP-Glc が少ない環境

ではよく働く一方で、生成物である UDP-GlcA や UDP-Xyl の濃度が高くなると活性が抑制されると推測される。ウラルカンゾウにおける UDP-Xyl 濃度も未知であるが、ダイズ細胞を用いた研究では、UDP-Xyl 量は UDP-Glc 量の約 50 分の 1 と推定されている (Hayashi and Matsuda 1981)。もしウラルカンゾウでも同様ならば、前述の UDP-Glc の濃度範囲から推測すると、細胞内の UDP-Xyl の濃度は $0.3\text{--}70\ \mu\text{M}$ と見積もることができ、GuUGD4 組換えタンパク質の酵素活性が低下した UDP-Xyl の濃度はこの範囲に含まれる。以上のように、GuUGD1-4 タンパク質の生化学的特性は、細胞内の環境変化に応じて酵素活性が調整されていることを示唆している。このことから、細胞壁多糖の代謝や植物特化代謝へ供給される UDP-GlcA 量は繊細に調節されていると考えられるが、本研究ではウラルカンゾウの生体試料を用いた実験は行っておらず、GuUGD タンパク質の生理学的な役割を解明するには、*GuUGD* 遺伝子をノックアウトした植物を作製し、代謝量、生育、ストレス耐性に及ぼす影響を評価する必要がある。

第3章 UGD のサポニン生合成への貢献の解析

3.1 緒言

第1章で述べた通り,カンゾウにおいて UGD タンパク質は,一次代謝に分類される細胞壁の生合成にも,植物特化代謝に分類されるグリチルリチンやソヤサポニンの生合成にも貢献している. トウモロコシやシロイヌナズナの先行研究においては,細胞壁合成における UGD タンパク質の生理学的な特性がアイソフォームによって異なることが示唆されている. そこで,第2章において機能同定されたウラルカンゾウの4つの遺伝子にコードされる UGD タンパク質も一次代謝および植物特化代謝において,異なる生理学的特性を持つ可能性があるのではないかと考えた.

トリテルペン経路の遺伝子の中には,植物のゲノム上でオペロン様のクラスターを形成していることで共発現しやすくなっている遺伝子や (Field et al. 2011; Field and Osbourn 2008; Kliebenstein and Osbourn 2012; Krokida et al. 2013; Nützmann and Osbourn 2014; Qi et al. 2004), 同一の転写因子によって転写が同時に制御されている遺伝子が報告されている (Tamura et al. 2018). 例えば,イネ科のオーツ麦 (*Avena* spp.) では,トリテルペンのアベナシン A-1 を合成する酵素をコードする遺伝子のうち, β -アミリン合成酵素の遺伝子 (*AsbASI*), シトクロム P450 の遺伝子 (*AsCYP51H10*), セリンカルボキシペプチダーゼ様アシル基転移酵素の遺伝子 (*AsSCPL1*), メチル基転移酵素の遺伝子 (*AsMT1*), 糖転移酵素の遺伝子 (*AsUGT74H5*) がクラスターを形成していることが確認されている (Mugford et al. 2009; Mugford et al. 2013; Owatworakit et al. 2013; Qi et al. 2004; Qi et al. 2006; Thimmappa et al. 2014). また,マメ科のミヤコグサ (*Lotus japonicus*) では 20-ヒドロキシベツリン酸を合成する酵素をコードする遺伝子のうち,オキシドスクアレノシクラゼの遺伝子 (*LjAMY2*), シトクロム P450 の遺伝子 (*LjCYP71D353*) がクラスターを形成しており,根や根粒の発生過程,植物ホルモンや様々な環境ストレスへの応答において,高度に共発現していることが確認されている (Krokida et al. 2013). ウラルカンゾウにおいては,ソヤサポニンの生合成を触媒する β -アミリン合成酵素の遺伝子 (*GubAS*) と 2 つのシトクロム P450 の遺伝子 (*GuCYP93E3* と *GuCYP72A566*) が転写因子 *GubHLH1-3* によって,また,グリチルリチンの合成を触媒する β -アミリン合成酵素の遺伝子 (*GubAS*) とシトクロム P450 の遺伝子

(*GuCYP88D6*) が *GubHLH1-2* によって、同時に転写制御されていることが報告されている (Tamura et al. 2018). そこで第 3 章では、ウラルカンゾウのゲノムにおいて *UGD* 遺伝子がトリテルペノイドサポニン合成経路の遺伝子とクラスターを形成していないかを確認し、さらに転写パターンから植物特化代謝経路が活性化しているときに転写が活性化している *UGD* 遺伝子がないかを観測した.

植物特化代謝物の合成および植物の防御機構を活性化する分子はエリシターと呼ばれ (Rao and Ravishankar 2002), ジャスモン酸メチル, 酵母抽出物, サリチル酸などがある (Shilpa et al. 2010). ウラルカンゾウの組織培養ストロンでは, ソヤサポニンの生合成を触媒する酵素の遺伝子である *GubAS*, *GuCYP93E3*, *GuCYP72A566* の転写, および, グリチルリチンの合成を触媒する酵素の遺伝子 *GubAS*, *GuCYP72A154* の転写がジャスモン酸メチル処理で促進されることが報告されている (Tamura et al. 2018). スペインカンゾウ (*Glycyrrhiza glabra*) の培養細胞を用いた実験では, ジャスモン酸メチルの添加によって *GlcA* 転移酵素を含む関連遺伝子の転写活性化とともに, ソヤサポニン蓄積量の増加が確認されている (Hayashi et al. 2003). また, グリチルリチン蓄積量もジャスモン酸処理で増加することが, スペインカンゾウで報告されている (Shabani et al. 2009). 一方で, *UGD* 遺伝子についてはジャスモン酸メチルに対する転写応答が解析されておらず, ソヤサポニンやグリチルリチンの生合成を触媒する酵素の遺伝子と転写が連動するかはわかっていない. 一方で, *UGD* 遺伝子の転写は, 乾燥ストレス, および, 乾燥ストレス等に応答して合成される植物ホルモンのアブシジン酸に応答して活性化することがポプラ (*Populus tomentosa*) を用いた研究で報告されている (Tian et al. 2014). また, ウラルカンゾウの葉にアブシジン酸をかけるとグリチルリチンの蓄積量が増えたとの報告もある (Qiao et al. 2017). そこで本章では, ウラルカンゾウの組織培養ストロンを用いて, ジャスモン酸メチル処理およびアブシジン酸処理に対する *GuUGD1-4* 遺伝子の転写応答を解析し, 既知のサポニン生合成酵素の遺伝子の転写量の変化と比較することで, 植物特化代謝における生理学的な特性の違いを検出できないか試みた.

3.2 実験方法

● *GuUGD* 遺伝子の近くのゲノム情報の取得

GuUGD1-4 遺伝子の 5' 末端および 3' 末端を起点として、上流と下流それぞれ 30 kb の範囲においてウラルカンゾウのゲノム配列および遺伝子に付与されているアノテーションを *G. uralensis* genome database (<http://ngs-data-archive.psc.riken.jp/Gur-genome/index.pl>; Mochida et al. 2017) から取得した。

● ウラルカンゾウ組織培養ストロンの薬剤処理

ウラルカンゾウのストロンの組織培養には、北海道医療大学系統の *G. uralensis* を用いた。培養方法は Kojoma et al. 2010 に記載されている方法に倣って、6% のスクロースと 0.01 mM の 1-naphthaleneacetic acid (NAA) を添加した Murashige and Skoog (MS) 培地 (Duchefa Biochemie, オランダ ハールレム) にて、26 °C, 90 rpm で培養した。薬剤処理前に、NAAを添加していない (スクロースは基本の培養条件と同じく終濃度 6% となるように添加した) MS 培地で、ストロンを 2 週間培養した。

ジャスモン酸メチルに対する遺伝子転写応答の解析には先行研究 (Tamura et al. 2018) において合成された cDNA を用いた。なお、Tamura et al. 2018 の研究では、北海道医療大学系統の *G. uralensis* のストロンを本研究と同じ方法で組織培養し、終濃度 100 μ M のジャスモン酸メチルまたは 0.1% のエタノール (模擬) で処理したあと、26 °C, 90 rpm にて培養し、0, 3, 6, 12, 48 時間を測定タイムポイントとして、抽出した全 RNA から cDNA を合成している。なお、サンプルは 1 ライン用意されていた。

アブシジン酸による外因性ストレス処理を行うために、アブシジン酸 (BD Biosciences, アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンノゼ) をエタノールで希釈して 10 mM のストック液を作り、終濃度が 100 μ M となるようにストック液 1 ml を培地 100 ml に加えたあと、26 °C, 90 rpm にて 0, 6, 12, 24 時間培養した。それぞれの測定タイムポイントでストロンを培地から取り出して凍結保存した。模擬処理には、アブ

シジン酸ストック液の代わりにエタノール 1ml を 100ml の培地に加えた。サンプルはそれぞれ 3 ラインずつ作製した。

- RNA の抽出および first-strand cDNA の合成

凍結した組織培養ストロンから PureLink™ Plant RNA Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて全 RNA を抽出したあと、リコンビナント DNase I (RNase-free; タカラバイオ) で処理し、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, ドイツ ノルトラインヴェストファーレン州 ヒルデン) を用いてメーカーのプロトコールに従って精製した。2.5 μ g の全 RNA から PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time; タカラバイオ) を用いて 50 μ l の反応系で first-strand cDNA を合成した。

- 定量的リアルタイム PCR (qPCR) 分析

1 $\times$ FastStart Essential DNA Green Master (Roche), 0.5 μ l の cDNA, および Primer3 のウェブサイト (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>; Koressaar and Remm 2007; Untergasser et al. 2012) を用いて設計したプライマー 22-45 (表 3-1) を終濃度 500 nM になるように混合し、PCR グレードの水で反応量を 10 μ l に調整した。PCR 反応およびデータの解析には LightCycler® Nano ver. 1.1.0 (Roche) を用いた。95 °C で 10 分間インキュベーション後、95 °C で 10 秒, 60 °C で 10 秒, 72 °C で 15 秒のインキュベーションを 45 サイクル繰り返した。また、各標的遺伝子の相対的な転写レベルを算出するための参照遺伝子には *β -tubulin* (GenBank accession number LC318135; Seki et al. 2008) を用いた。処理後 0 時間に対する転写量の変化は次の計算式で求めた: 2^{-X} 乗; $X = (\text{遺伝子 A のプライマー増幅効率 (E}_A\text{)})$ で補正した測定タイムポイント T の遺伝子 A の C_q 値 $- \beta$ -*tubulin* 遺伝子のプライマー増幅効率 (E_B) で補正した測定タイムポイント T の *β -tubulin* 遺伝子の C_q 値 $- (\text{遺伝子 A のプライマー増幅効率 (E}_A\text{)})$ で補正した測定タイムポイント 0 時間の遺伝子の C_q 値 $- \beta$ -*tubulin* 遺伝子のプライマー増幅効率 (E_B) で補正した測定タイムポイント 0 時間の *β -tubulin* 遺伝子の C_q 値)。

表 3-1 qRT-PCR で用いたプライマー

No.	配列 (5' to 3')	用途
22	GATTGAGGTAGCCGTGGTCG	<i>GuUGD1</i> (Forward)
23	CTTCCCCTGCACTCCTTCAC	<i>GuUGD1</i> (Reverse)
24	ACTGTCCCTGTCAAAACCGC	<i>GuUGD2</i> (Forward)
25	TTGATTGCAGTTCCTCAGCA	<i>GuUGD2</i> (Reverse)
26	CTGGGGATACAAGGGAGACA	<i>GuUGD3</i> (Forward)
27	AAGCATCCCAAACCACACTC	<i>GuUGD3</i> (Reverse)
28	AGGGGCTGTTGGGAGATAGG	<i>GuUGD4</i> (Forward)
29	GGGGCTTGGTGGTTGAAGAT	<i>GuUGD4</i> (Reverse)
30	TCTTCGCAAACCTGGCAGTGA	<i>GuTubulin</i> (Forward)
31	CGAGATGTGAGTGGGGCAA	<i>GuTubulin</i> (Reverse)
32	GGTGGTTTATCAGCGTGGGA	<i>GubAS</i> (Forward)
33	TGCTCAACTACAATGTCCGCA	<i>GubAS</i> (Reverse)
34	ATGGACGAAAATTGGAGGACGA	<i>GuCYP88D6</i> (Forward)
35	CTGGTTGCTGTACTTTCATGGC	<i>GuCYP88D6</i> (Reverse)
36	ATGGCGACCCTTACAAGCTC	<i>GuCYP72A154</i> (Forward)
37	AGATTTCGTGGTGCAGCATCA	<i>GuCYP72A154</i> (Reverse)
38	CCAAGCACTCTACAACTCTCCA	<i>GuCYP93E3</i> (Forward)
39	GGATTTGCTTAGCCATTTCTGCA	<i>GuCYP93E3</i> (Reverse)
40	CAGGGGAGCCTAGTAACAATGAC	<i>GuCYP72A566</i> (Forward)
41	GCCCTGCCAAGTAAAATAGCTTC	<i>GuCYP72A566</i> (Reverse)
42	GACCCTTGGTTTGCAGTGTT	<i>GuCSyGT</i> (Forward)
43	GATTGCGAACACGCTAGTGA	<i>GuCSyGT</i> (Reverse)
44	GTGGTGCTTACTTGGCTGGA	<i>GuUGT73P12</i> (Forward)
45	GCCAACGACCCAAATGAAATCA	<i>GuUGT73P12</i> (Reverse)

3.3 結果

● *GuUGD* 遺伝子の近くの塩基配列に付けられたアノテーション

ウラルカンゾウのゲノム配列上で *GuUGD1-4* 遺伝子の近辺にトリテルペノイド合成を触媒する酵素の遺伝子と相同な遺伝子であるとのアノテーションがつけられた配列は見られなかった (表 3-2).

表 3-2 ウラルカンゾウゲノム上で *UGD* 遺伝子の近くに位置する配列に付けられたアノテーション

遺伝子名	上流 (5')	下流 (3')
<i>GuUGD1</i>	● Ribosomal protein-like protein	なし
<i>GuUGD2</i>	● reticulocyte-binding protein 2 homolog a-like ● expansin-A23-like ● F-box protein At5g39250-like	● BAG family molecular chaperone regulator 8, chloroplastic-like ● LYR motif-containing protein 4B ● probable galacturonosyltransferase 14-like ● membrane-anchored ubiquitin-fold protein 1-like ● Endoglucanase E1
<i>GuUGD3</i>	なし	● alpha-1,4 glucan phosphorylase L isozyme, chloroplastic/amyloplastic-like
<i>GuUGD4</i>	● Beta-glucosidase	● uncharacterized protein LOC100814395 ● hypothetical protein PHAVU_002G168500g ● NADP-dependent alkenal double bond reductase P2-like isoform X2 ● alpha-1,4 glucan phosphorylase L-2 isozyme, chloroplastic/amyloplastic-like isoform X3

GuUGD1-4 遺伝子の 5' 末端 (上流) あるいは 3' 末端 (下流) からそれぞれ 30 kb の範囲の配列に付けられているアノテーションを示す. *GuUGD1* 遺伝子の下流, および *GuUGD3* 遺伝子の上流 30 kb の範囲では, アノテーションが付与されている遺伝子配列は確認されなかった.

● ジャスモン酸メチルに対する転写応答

GuUGD1-4 遺伝子はいずれも、ジャスモン酸メチル処理に応答して転写量が増加した。特に早い転写応答が見られたのは *GuUGD4* 遺伝子で、ジャスモン酸メチル処理の 3 時間後から 48 時間後に至るまでの全ての測定タイムポイントで模擬処理と比較して有意な転写活性化が確認された。その他の *GuUGD1-3* 遺伝子ではジャスモン酸メチル処理の 6 時間後から有意な転写活性化が確認された。*GuUGD1* 遺伝子は転写応答が比較的遅く、最も強い転写はジャスモン酸メチル処理の 48 時間後の測定タイムポイントにおいて確認された。また、*GuUGD2* 遺伝子は応答の終息が早く、ジャスモン酸メチル処理の 48 時間後の測定タイムポイントでは模擬処理と同程度の転写レベルにまで下がっていた (図 3-1)。

ソヤサポニン生合成酵素遺伝子 (*GubAS*, *GuCYP93E3*, *GuCYP72A566*, *GuCSyGT*) の転写応答は互いに非常によく似ており、ジャスモン酸メチル処理の 3 時間後以降の全ての測定タイムポイントにおいて転写が活性化されており、かつ、処理の 12 時間後の転写レベルは一度低下し、48 時間後には再び転写が活性化されるという独自のパターンを示した (図 3-1)。ジャスモン酸メチル処理の 12 時間後に一度転写が落ち着き、48 時間後に再び活性化されている転写パターンは *GuUGD1* 遺伝子でも確認されているが、*GuUGD1* 遺伝子はジャスモン酸メチル処理の 3 時間後にはまだ転写が活性化されていなかった点で、ソヤサポニン生合成酵素遺伝子の転写パターンとは異なった。

GubAS 遺伝子と *GuCSyGT* 遺伝子以外のグリチルリチン生合成酵素遺伝子 (*GuCYP88D6*, *GuCYP72A154*, *GuUGT73P12*) の転写は互いに異なる転写パターンを示した。*GuCYP88D6* 遺伝子はジャスモン酸メチル処理の 3, 6, 48 時間後には模擬処理と比較して有意に転写が活性化されたが、12 時間後は模擬処理と比較して転写が抑制された。*GuCYP72A154* 遺伝子と *GuUGT73P12* 遺伝子はどちらもジャスモン酸メチル処理の 3, 6, 12, 48 時間後に模擬処理と比較して有意に転写が活性化されたが、転写がもっとも活性化していたタイミングはそれぞれ *GuCYP72A154* 遺伝子が 12 時間後、*GuUGT73P12* 遺伝子が 6 時間後であった (図 3-1)。

図 3-1 *GuUGD1-4* 遺伝子とサポニン生合成遺伝子のジャスモン酸メチル処理に対する転写応答

模擬処理した組織培養ストロンにおける転写レベルは白塗りのバーで示し、ジャスモン酸メチルで処理した組織培養ストロンは黒塗りのバーで示す。処理後 0 時間の相対的な転写レベルを 1 とした。エラーバーは triplicate で測定した値の SD を示す。アスタリスクは、各時点におけるジャスモン酸メチル処理と模擬処理の間の遺伝子転写レベルの有意差を示す。Student's t test, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05。なお、*GubAS* 遺伝子、*GuCYP88D6* 遺伝子、*GuCYP72A154* 遺伝子、*GuCYP93E3* 遺伝子、*GuCYP72A566* 遺伝子のデータは、Oxford University Press の許可を得て Tamura et al. 2018 から転載・修正したものである。

● アブシジン酸に対する転写応答

アブシジン酸処理に応答して *GuUGD1* 遺伝子、*GuUGD2* 遺伝子、*GuUGD4* 遺伝子の転写量が増加した (図 3-2)。特に大きな反応を示したのは *GuUGD4* 遺伝子で、アブシジン酸処理の 12 時間後と 24 時間後に模擬処理と比較して有意に増加した。また、*GuUGD1* 遺伝子はアブシジン酸処理の 12 時間後に、*GuUGD2* 遺伝子はアブシジン酸処理の 24 時間後にのみ、模擬処理と比較して有意な転写の活性化が確認された (図 3-2)。一方で、*GuUGD3* 遺伝子は模擬処理と比較して有意な転写の応答は確認されなかった。

ソヤサポニンあるいはグリチルリチンの生合成を触媒する酵素をコードする遺伝子 (*GubAS*, *GuCYP93E3*, *GuCYP72A566*, *GuCSyGT*, *GuCYP88D6*, *GuCYP72A154*, *GuUGT73P12*) の転写量は、いずれも模擬処理と比較して有意な応答は確認されなかった (図 3-2)。

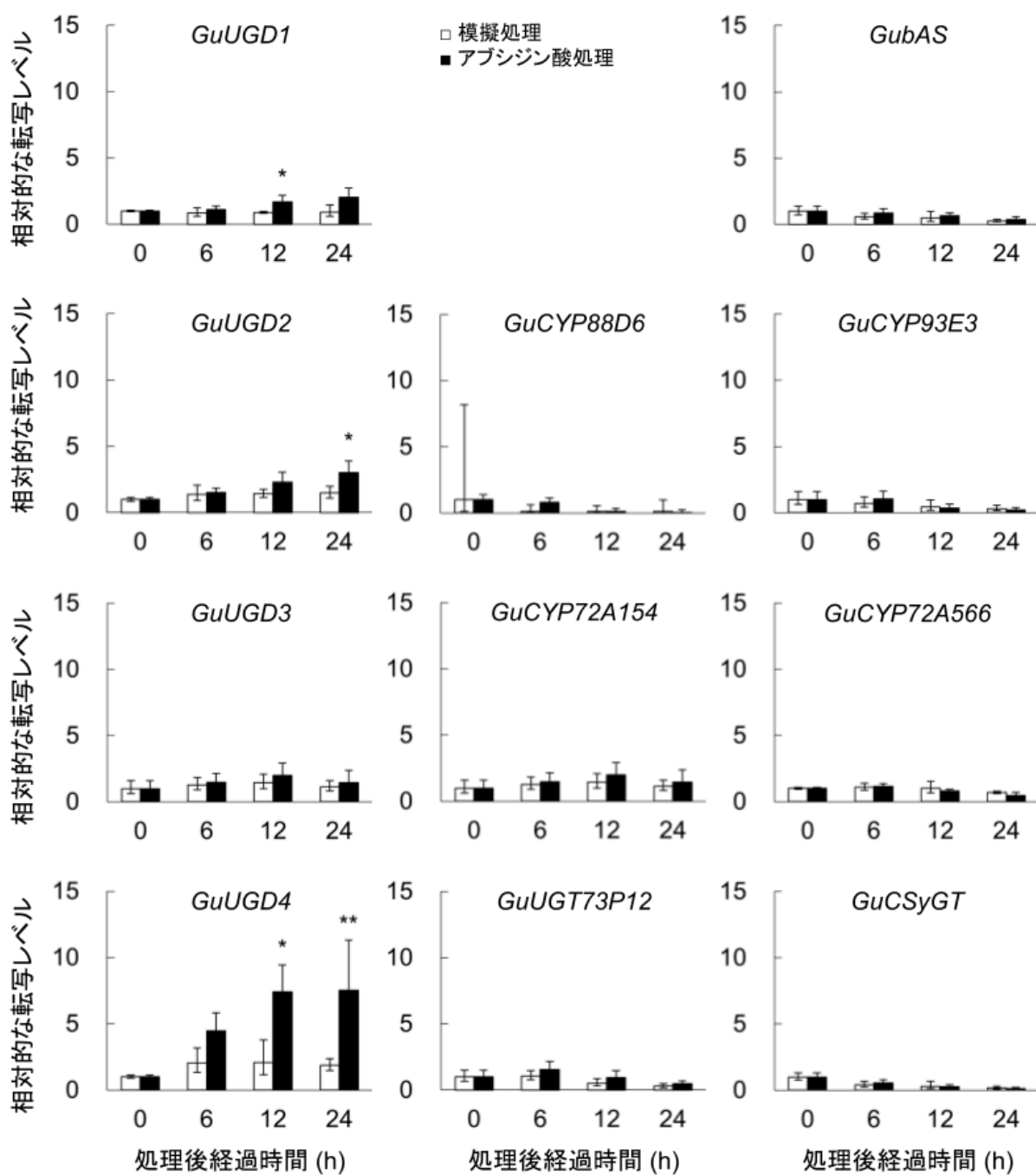


図 3-2 *GuUGD1-4* 遺伝子とサポニン生合成遺伝子のアブシジン酸処理に対する転写応答

模擬処理した組織培養ストロンにおける転写レベルは白塗りのバーで示し、アブシジン酸で処理した組織培養ストロンは黒塗りのバーで示す。アブシジン酸処理後 0 時間の相対的な転写レベルを 1 とした。エラーバーは 3 つのバイオロジカルレプリケートの SD を示す。アスタリスクは、各時点におけるアブシジン酸処理と模擬処理の間の遺伝子転写レベルの有意差を示す。Student's t test, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05.

3.4 考察

- ウラルカンゾウのゲノム上で *UGD* 遺伝子の近くに位置する遺伝子

推定 *UGD* 遺伝子のいずれかがグリチルリチンや他のトリテルペン経路の合成に強くかかわっていないかを推測するための情報の一つとして、ウラルカンゾウのゲノム上において、推定 *UGD* 遺伝子の近くの配列に付与されているアノテーションを調べたが、*GuUGD1-4* 遺伝子の配列付近のゲノム上に、トリテルペノイド合成を触媒する酵素の遺伝子と推定される遺伝子は確認されなかった (表 2-7). このことから、*GuUGD1-4* 遺伝子はいずれも、少なくともクラスターの形では、トリテルペノイド生合成を触媒する酵素の遺伝子とは共発現をしていないと考えられる。

- 組織培養ストロンにおける *GuUGD1-4* 遺伝子の転写パターン

植物特化代謝における *GuUGD1-4* アイソフォームの生理学的な多様性を検証するために、ウラルカンゾウの組織培養ストロンを用いて、ジャスモン酸メチルおよびアブシジン酸に対する転写応答を解析した。その結果、*GuUGD1-4* 遺伝子の転写はジャスモン酸メチルによって活性化されることが示された (図 3-1). これは *UGD* 遺伝子のジャスモン酸メチル応答性が初めて報告されたものである。植物特化代謝物の生合成における糖供与体である UDP-GlcA は、細胞壁多糖の前駆体でもある。それぞれの代謝経路へ分配される UDP-GlcA の量は明らかにされていないが、以下の推測に基づいて、細胞壁多糖の生合成には植物特化代謝物の生合成の約 3–14 倍の UDP-GlcA が使用されていると推計される。ウラルカンゾウの植物特化代謝物グルクロニドの中で特に蓄積量が多いグリチルリチンは、日本薬局方 (第十八改正日本薬局方) の定義では、根及びストロン乾燥物に対して 2.0% 以上の含有を求められる。また先行研究では、ウラルカンゾウの根におけるグリチルリチンの蓄積量は 10–15 mg g⁻¹ (Li et al. 2016), ウラルカンゾウのストロンにおけるグリチルリチンの蓄積量は 36.5 mg g⁻¹ (Kojoma et al. 2010) と報告されている。グリチルリチンのモル質量は 823 g mol⁻¹ であり、その生合成には 2 分子の UDP-GlcA が必要であることから、グリチルリチンの生合成に用いられる UDP-GlcA の量は、根やストロン 1 g⁻¹ あたり約 0.02–0.08 mmol と推計される。一方、細胞壁多糖の生合成に用いられる UDP-GlcA

の量もウラルカンゾウでは未知であるが、ダイズ (*Glycine max* L. Merrill) の成熟胚では約 40 mg g⁻¹ dry weight の UDP-GlcA 由来の単糖が細胞壁中に含まれることが報告されている (Litterer et al. 2006). 単糖は約 150 g mol⁻¹ であることから、細胞壁多糖の生合成に用いられる UDP-GlcA の量は約 0.27 mmol と推計される. この値はグリチルリチンの生合成に用いられる UDP-GlcA の推計値の約 3–14 倍に相当することから、グリチルリチンの生合成に用いられる UDP-GlcA の量は細胞壁多糖と比べて少ないものの、無視できないレベルであると考えられる. したがって、グリチルリチンの生合成が活性化された場合には、UDP-GlcA の供給量も増加する必要があると考えられる. *GuUGD1-4* 遺伝子のジャスモン酸メチルへの転写応答は、グリチルリチンの生合成が活性化された場合に、*UGD* 遺伝子の転写量を増やすことで UDP-GlcA の供給量を増加させていることを示唆している.

ジャスモン酸メチル応答については、先行研究 (Tamura et al. 2018) でソヤサポニン生合成を触媒する環化酵素 *GubAS* 遺伝子と酸化酵素 *GuCYP93E3* 遺伝子, *GuCYP72A566* 遺伝子の転写応答パターンが同一であることが確認されているサンプルを用いた. 本研究で測定した糖転移酵素 *GuCSyGT* 遺伝子の転写応答もこれらの遺伝子と同じパターンを示したことから (図 3-1), ジャスモン酸メチルに対するソヤサポニン合成経路の応答は、糖転移反応に至るまで同じ制御機構によって調整されていることが示唆された. 一方で、グリチルリチン生合成を触媒する酵素 *GubAS* 遺伝子, *GuCYP88D6* 遺伝子, *GuCYP72Aa54* 遺伝子, *GuCSyGT* 遺伝子, *GuUGT73P12* 遺伝子の間で類似した転写パターンは観察されなかった (図 3-1). *GuUGD1-4* 遺伝子のジャスモン酸メチルに対する転写応答のパターンは、いずれもソヤサポニン生合成経路の遺伝子とは異なっていた (図 3-1). また, *GuUGD1-4* 遺伝子の転写活性化のタイミングは GlcA 転移酵素である *GuCSyGT* 遺伝子と *GuUGT73P12* 遺伝子の転写活性化のタイミングがよりも遅かったことから, *GuUGD1-4* タンパク質はソヤサポニンやグリチルリチンの生合成によって消費された UDP-GlcA を充填する役割を果たしている可能性があると考えられる. アブシジン酸処理においては、ソヤサポニンおよびグリチルリチン生合成経路の酵素遺伝子はいずれも転写が活性化されなかったが, *GuUGD1* 遺伝子, *GuUGD2* 遺伝子, *GuUGD4* 遺伝子の転写は模擬処理に比べて有意に活性化されたことから (図 3-2), *GuUGD* 遺伝子の転写はソヤサポニンやグリチルリチン生合成酵素遺伝子の転写とは独立した制御機構によって調節されて

いる可能性が高いと考えられる。以上の結果から、ソヤサポニンやグリチルリチンの生合成に特化した GuUGD アイソフォームは存在しないことが示唆された。根における遺伝子の転写量と (図 2-18), 酵素の触媒効率が (表 2-12) とともに GuUGD1-4 の中で特に高いことが示された GuUGD2 タンパク質が、ソヤサポニンやグリチルリチンの生合成においても、大きく貢献していると推測される。

第 4 章 UGD アイソフォームの特性の解析

4.1 緒言

生物種によって内在する UGD アイソフォームの数は異なる。例えば、ヒトでは *UGD* 遺伝子は 1 種だけ同定されているが (Spicer et al. 1998), 植物では, 近年のゲノム解析により, 複数の *UGD* 遺伝子が存在する可能性が示されている。しかし, 植物 *UGD* 遺伝子の多くは, 相同性に基づいて UGD としての酵素活性をもちうると推定されているだけであり, 実際に UGD 活性を持つタンパク質をコードしているかについては実験的に検証されていない。本研究の第 2 章では, ウラルカンゾウから単離された 5 種類の推定 *UGD* 遺伝子のうち, *GuUGD5* 遺伝子に由来するタンパク質については酵素活性を検出できなかった。しかし, *GuUGD5* 組換えタンパク質は十分な純度と濃度でタンパク質を調製できなかったために活性を検出できなかった可能性も考えられる。そこで本章では, *GuUGD5* が進化的に活性をもたないアイソフォームであるかを調べるために, 植物の UGD アイソフォームの系統解析を行い, UGD 活性を持つ可能性の高い UGD タンパク質のクレードを推定するとともに, 系統の特性や, 酵素活性に影響を与えるアミノ酸残基を特定することを目的とした。

● UGD 分子の進化

進化の過程で発生したイベントについての洞察や, 共通祖先の情報を得るための有力なツールに系統樹がある (Baum et al. 2008)。これまでも植物の UGD タンパク質を用いた系統樹解析はいくつか試みられてきたが, 解析に用いられた植物種が少なかったため, UGD アイソフォームの進化の全体像については十分に解明されていない。例えば, Klinghammer と Tenhaken が 2007 年に行った研究では, シロイヌナズナ (被子植物 真正双子葉類 バラ類 アブラナ科), ダイズ (被子植物 真正双子葉類 バラ類 マメ科), タバコ (*Nicotiana tabacum*; 被子植物 真正双子葉類 キク類 ナス科), ポプラ (*Populus trichocarpa*; 被子植物 真正双子葉類 ヤナギ科), イネ (*Oryza sativa*; 被子植物 単子葉類 イネ科), シナモン (*Cinnamomum osmophloeum*; 被子植物 モクレン類 クスノキ科), テーダマツ (*Pinus taeda*; 裸子植物 マツ科) の合計 7 植物種, 17 分子種の UGD タンパク質を用いて系統樹解析が行われた。この論文では, 解析に使用した UGD タ

ンパク質の多くが植物種ごとに同じ枝に分類されたことから、種の分化のあとに *UGD* 遺伝子の重複が起きたものと考察されているが、詳細については十分には考察されていない (例えば、シロイヌナズナの AtUGD2-4 タンパク質は近縁種であるダイズの GmUGD タンパク質と同じ枝にクラスタリングされた一方で、シロイヌナズナの AtUGD1 タンパク質は遠縁種であるポプラの PtUGD1-2 タンパク質と同じ枝に分類されている。しかしこのことについては特に考察されていない)。このほか、Tian らが 2014 年に行った研究では、シロイヌナズナ、タバコ、ポプラ (*Populus tomentosa*, *Populus trichocarpa*, *Populus tremula*×*tremuloides* の 3 種類)、イネの *UGD* タンパク質を用いて系統樹解析が行われたが、使用された植物種の多くが Klinghammer と Tenhaken の研究と重複しており、得られた結果や考察はほぼ同じで、双子葉類と単子葉類の分岐のあとに *UGD* の遺伝子重複が起こったと考察されている。

そこで本章では、まずオープンデータベースに登録されている植物の推定 *UGD* タンパク質を取得して、大規模な系統樹解析を行った。次に、各クレードの *UGD* アイソフォームをコードする遺伝子が進化的にも近い関係であるかをゲノム配列上でシニ解析を行って評価した。さらに、オープンデータベースを用いて複数の植物種における *UGD* 遺伝子の転写レベルを比較し、*UGD* タンパク質のクレードごとに特徴的な性質が見られないかを調べた。その後、GuUGD1-5 タンパク質と同じクレードに属する *UGD* タンパク質をコードする推定 *UGD* 遺伝子を単離し、コードされる推定 *UGD* タンパク質の酵素活性試験を行うことで、*UGD* 活性を喪失したクレードが存在しないかを検証した。

● *UGD* タンパク質のアミノ酸配列と酵素活性

UGD タンパク質は、UDP 結合ドメイン、活性中心、 NAD^+ 結合ドメインという 3 つの機能的触媒モチーフを持つ。また、いくつかの生物種においては *UGD* タンパク質の結晶構造が解析され、酵素活性に重要なアミノ酸残基が同定されている。例えば、化膿性レンサ球菌の *UGD* タンパク質では、野生型と変異型の結合距離の比較から、リシン残基 (Lys^{204})、システイン残基 (Cys^{260})、アスパラギン酸残基 (Asp^{264}) が酵素活性において重要な役割を果たしていることが示されている (Campbell et al. 2000)。

また、ヒトの UGD タンパク質では、野生型と変異型の UGD タンパク質の比較速度論および結合部位内の残基占有率に基づいて、チロシン残基 (Tyr¹⁴)、グルタミン酸残基 (Glu¹⁶¹, Glu¹⁶⁵) が酵素活性において重要であることが報告されている (Egger et al. 2011). このほかいくつかの残基が SWISS-MODEL において UDP-Glc や NAD⁺ と疎水性相互作用, 水素結合, 塩橋, 水架橋を持つ重要な残基として予測されている. 植物の UGD タンパク質ではアミノ酸残基と酵素活性の関係性については解析されていないが, UGD アイソフォームは植物, 動物, 微生物の間で非常に高い同一性を有していることから, 化膿性レンサ球菌やヒトで明らかにされた構造と活性の関係性が植物の UGD タンパク質でも保存されている可能性が高いと考えられる.

第 2 章で単離された 5 種類のウラルカンゾウの UGD タンパク質は機能的触媒モチーフを保持していたにもかかわらず, GuUGD5 組換えタンパク質だけは UGD 活性を検出できなかった. また, ウラルカンゾウの UGD タンパク質は互いに非常に高い同一性を持つが, GuUGD5 タンパク質は他の GuUGD タンパク質と比較してアミノ酸配列の同一性がやや低かった (第 2 章 表 2-8). そこで, バリエーションが見られるアミノ酸残基が酵素活性に影響を与えるかを調べるために UGD タンパク質の 3D モデルを構築し, 活性部位に位置するアミノ酸残基を特定した. さらに, 活性に影響を与えると考えられるアミノ酸残基に変異を加えて, 酵素活性に変化が現れるか否かを評価した.

4.2 実験方法

● UGD の系統解析

○ 植物の推定 UGD タンパク質のマイニング

系統樹解析には米国国立生物工学情報センター (NCBI) の GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) に登録されている多様な植物のアミノ酸配列を用いた. GenBank からできるだけ偏りなく植物の推定 UGD タンパク質を抽出するために, GuUGD1-5 タンパク質のアミノ酸配列を一つずつクエリとして blastp 検索を行った. なお, 抽出された配列のうち不規則に長い N 末端または C 末端を含む配列は除外した.

○ 系統樹の描写

MEGA X (Kumar et al. 2018) の ClustalW によってアライメントを行った。パラメータは次の通りに設定した。Pairwise Alignment の Gap Opening Penalty は 10.00, Gap Extension Penalty は 0.10, Multiple Alignment の Gap Opening Penalty は 10.00, Gap Extension Penalty は 0.20. Protein Weight Matrix は Gonnet, Residue-specific Penalties は ON, Hydrophilic Penalties は ON, Gap Separation Matrix は 4, End Gap Separation は OFF, Use Negative Matrix は OFF, Delay Divergent Cutoff は 30%, Keep Predefined Gap は OFF. その後, JTT マトリックスベースのモデル (Jones et al. 1992) に基づく最尤法により系統樹を生成した。パラメータは次の通りに設定した。Statistical Method は Maximum Likelihood, Test of Phylogeny は None, Substitutions Type は Amino acid, Model/Method は jones-Taylor-Thornton (JTT) model, Rates among Sites は Uniform Rates, Gaps/Missing Data Treatment は Use all sites, ML Heuristic Method は Nearest-Neighbor-Interchange (NNI), Initial Tree for ML は Make initial tree automatically (Default - NJ/BioNJ), Branch Swap Filter は Weak, Number of Threads は 1.

○ シンテニーの解析

まず、系統樹解析に使用した推定 UGD タンパク質の参照配列として GenBank に登録されている遺伝子 ID を取得した。次に、遺伝子 ID に紐づけられたゲノム配列を GenBank で検索し、推定 UGD 遺伝子の上流および下流 30 kb の範囲で付与されている遺伝子のアノテーション情報を取得した。

○ UGD 遺伝子の転写解析

ウラルカンゾウについては、*G. uralensis* transcriptome data (Ramilowski et al. 2013, <http://ngs-data-archive.psc.riken.jp/Gur/index.pl>) で公開されている *G. uralensis* の夏に採取された根における fragments per kilobase of exon per million

mapped reads (FPKM) の中から, *GuUGD1-5* 遺伝子に対応する Unigene の転写データを参照した. *GuUGD3* 遺伝子, *GuUGD4* 遺伝子, *GuUGD5* 遺伝子はそれぞれ 2 つの Unigene 配列に対応していたため, FPKM 値を以下のように再計算した: *GuUGD* 遺伝子の転写量 = (データベースで公開されている FPKM 値に編集する前の Unigene I の生の読み取り値 + Unigene II の生の読み取り値) / (Unigene I の生の読み取り値 / Unigene I の FPKM 値 + Unigene II の生の読み取り値 / Unigene II の FPKM 値).

タルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*) については, まず推定 UGD タンパク質の参照配列として GenBank に登録されている遺伝子配列を取得した. 次に, 得られた推定 *UGD* 遺伝子配列をクエリとして, Mt Gene Expression Atlas (MtGEA; <https://mtgea.noble.org/v3/>; He et al. 2009) において blastn 検索を行い, 高い同一性を持つ配列の probe set ID を取得した. 最後に, タルウマゴヤシの根から抽出された RNA (Benedito et al. 2008) に由来するマイクロアレイの正規化された転写量データセットの中から, 取得した probe set ID に紐づけられている転写量を参照した.

ダイズ (*Glycine max*) については, まず推定 UGD タンパク質の参照配列として GenBank に登録されている遺伝子配列を取得した. 次に, 得られた推定 *UGD* 遺伝子配列をクエリとして, SoyBase (<https://www.soybase.org/>; Severin et al. 2010) において blastn 検索を行い, 高い同一性を持つ配列の gene model name を取得した. 最後に, ダイズの根から抽出された RNA に由来する reads per kilobase of exon per million mapped sequence reads (RPKM) の中から, 取得した gene model name に紐づけられている転写量を参照した.

ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) については, GenBank から抽出された推定 UGD タンパク質のアミノ酸配列をクエリとして, Lotus Base (<https://lotus.au.dk/>; Mun et al. 2016) に登録されている *Lotus japonicus* MG20 v3.0 Proteins に対して blastp 検索を行い, Transcript ID を取得した. 取得された Transcript ID の数はクエリとした推定 UGD タンパク質より多かったため, GenBank に登録されている推定 UGD タンパク質と最も同一性の高いタンパク質は以外 (Lj0g3v0246929.1, Lj4g3v0679860.1, Lj2g3v1079540.2) は, コードするタンパク質と最も高い同一性を持つ *GuUGD1-5* タンパク質が属するクレードに分類した. 最後に, ミヤコグサの根から抽出された

RNA (Verdier et al. 2013) に由来する GeneChip Array データから、取得した Transcript ID に紐づけられている正規化された転写量を参照した。

- GuUGD と同じクレードに属する推定 UGD タンパク質の機能解析

- *UGD* 遺伝子の単離

タルウマゴヤシの推定 *MtUGD* 遺伝子の単離には、本研究室の先行研究 (Fanani et al. 2019) において、グロースチャンバー内で 24 °Cにて 16 時間明期 / 8 時間暗期の周期で培養された 3-week-old の *Medicago truncatula* accession R108 の根から抽出された RNA に由来する first-strand cDNA を用いた。First-strand cDNA から プライマー 46–51 (表 4-1) と PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (タカラバイオ) を用いて *MtUGD* 遺伝子の全長コーディング配列を PCR 増幅させたあと、メーカーのプロトコルに従って pENTR™/D-TOPO™ Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) に導入して、エントリークローンを作製した。エントリークローンの増幅には *E. coli* HST16CR Competent cells (タカラバイオ) を用いた。

表 4-1 タルウマゴヤシの推定 *UGD* 遺伝子を単離するために使用したプライマー

No.	配列 (5' to 3')	用途
46	CACCATGGTGAAAATTTGTTGCATTGG	<i>MtUGD1</i> の単離 (Forward)
47	TGCCACTGCAGGCATGTC	<i>MtUGD1</i> の単離 (Reverse)
48	CACCATGGTGAAGATTTGTTGCATTGG	<i>MtUGD2</i> の単離 (Forward)
49	AGCCACTGCAGGCATGTCCTTGAGCCAA	<i>MtUGD2</i> の単離 (Reverse)
50	CACCATGGTTAAGAAGATCTGTGGAATTGG	<i>MtUGD3</i> の単離 (Forward)
51	GCAATCCACCCACTGGTCTATTGG	<i>MtUGD3</i> の単離 (Reverse)

- 大腸菌発現系を用いた *MtUGD* 組換えタンパク質の発現

MtUGD 遺伝子の発現には *GuUGD* 遺伝子と同じ大腸菌発現系 No. 5 (表 2-2) を用

いた. まず, *MtUGD1*-3 遺伝子をエントリークローンからプライマー 52-57 (表 4-2) を用いて *SacI* と *SaII* 制限酵素サイトを付けた形で増幅させ, 両制限酵素で切断した. これを In-Fusion® HD Cloning Kit (タカラバイオ) を用いて pCold™ I DNA (タカラバイオ) の *SacI* と *SaII* 制限酵素サイトへ挿入し, *groES-groEL* をコードする pGro7 プラスミド (タカラバイオ) とともに One Shot™ BL21 Star™ (DE3) (Thermo Fisher Scientific) に導入した. 次に, *MtUGD* 遺伝子を導入した大腸菌を終濃度 0.5 mg ml⁻¹ で L-アラビノースを, 終濃度 20 µg ml⁻¹ でクロラムフェニコールを, 終濃度 100 µg ml⁻¹ でアンピシリンを添加した LB 培地 にて, 37 °C で OD 600 nm 0.4-0.8 になるまで培養した. 培養液を 15 °C にて 30 分間冷却したあと, 終濃度 500 µM となるよう IPTG を添加してタンパク質の発現を誘導し, 15 °C で 1 日培養したあと, 氷上で振盪しながら冷却し, 遠心分離 (4 °C, 10 min, 4500 × g) によって細胞を回収後, 液体窒素で凍結した.

表 4-2 *MtUGD* 遺伝子の In-Fusion クローニングで使用したプライマー

No.	配列 (5' to 3')	用途
52	AAGGTAGGCATATGGAGCTCATGGTGAAAATTTGTTGCATTG	<i>MtUGD1</i> (Forward)
53	TAGACTGCAGGTCGACTGCCACTGCAGGCATGTC	<i>MtUGD1</i> (Reverse)
54	AAGGTAGGCATATGGAGCTCATGGTGAAAGATTTGTTGCATTG	<i>MtUGD2</i> (Forward)
55	TAGACTGCAGGTCGACAGCCACTGCAGGCATGTC	<i>MtUGD2</i> (Reverse)
56	AAGGTAGGCATATGGAGCTCATGGTTAAGAAGATCTGTGGAA	<i>MtUGD3</i> (Forward)
57	TAGACTGCAGGTCGACGCAATCCACCCACTGGTC	<i>MtUGD3</i> (Reverse)

○ UGD 組換えタンパク質の精製

タルウマゴヤシの UGD 組換えタンパク質の精製は, ウラルカンゾウの UGD 組換えタンパク質の精製と同じ方法で行った. 凍結した細胞 1 g (fresh weight) あたり冷却した溶解バッファー (10 mM Tris, 50 mM リン酸ナトリウム, 2 mM MgCl₂, 10% [v/v] グリセロール, 1 mM NAD⁺, 2 mM 2-メルカプトエタノール, 1× cOmplete Protease Inhibitor Cocktail; pH 8.0) 10 ml に懸濁した. リゾチームと Nonidet P-40

をそれぞれ終濃度 $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ と 1% [v/v] で細胞懸濁液に添加し、4 °C にて 30 分間ゆっくり振盪した。さらに終濃度 2.4 U ml^{-1} で Benzonase® ヌクレアーゼ (Sigma-Aldrich) を添加し、4 °C にて 15 分間ゆっくり振盪した。大腸菌のデブリを遠心分離 (10 min, $9500 \times g$) によって取り除き、上清に終濃度 250 mM で NaCl を添加したあと、精製バッファー (10 mM Tris, 50 mM リン酸ナトリウム, 300 mM NaCl, and 10% グリセロール; pH 8.0) で平衡化した TALON® Metal Affinity Resin (Clontech Laboratories) にアプライし、batch/gravity-flow 法にて精製した。レジンの 10 倍量の精製バッファーと、終濃度 10 mM でイミダゾールを添加したレジンの 5 倍量の精製バッファーで洗浄した。MtUGD 組換えタンパク質は終濃度 100 mM でイミダゾールを添加した精製バッファーで溶出させ、すぐに Amicon® Ultra 100K device (Millipore) を用いた限外濾過により、保存バッファー (20 mM Tris, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 10% [v/v] グリセロール, 0.5 mM NAD^+ ; pH 8.0) に移し替えて約 50 μl に濃縮し、-80 °C で保存した。

MtUGD 組換えタンパク質が精製されているかは、MtUGD 組換えタンパク質に付加した発現ベクター由来の His-タグが検出されるかで評価した。Criterion™ TGX Stain-Free™ プレキャストゲル (Bio-Rad Laboratories) に精製した MtUGD1-3 組換えタンパク質溶液をアプライし、電気泳動装置 Criterion™ セル (Bio-Rad) を用いて SDS-PAGE を行った。セミドライ式ブロッティング装置のトランスブロット Turbo 転写システム (Bio-Rad Laboratories) を用いてブロッティング膜へ転写し、5% スキムミルクを含む t-TBS (10 mM Tris, 0.9% NaCl, 0.05% (w/v) Tween20; pH 7.4) でブロッキングを行い、1% スキムミルクを含む t-TBS で 5000 倍希釈した Anti-His-tag mAb-HRP-DirecT (医学生物学研究所) を用いて His-タグを標的とする抗体反応を行った。その後、Chemi-Lumi One Super (ナカライテスク) で発光させ、目的サイズ付近にバンドが見られるかを確認した。精製したタンパク質の濃度は、SDS-PAGE を行ったゲルを CBB 染色して、同時に泳動した濃度既知の BSA のバンド強度を基準とし、対応するサイズのバンドの強度をもとに算出した。

○ *in vitro* 酵素活性試験

MtUGD 組換えタンパク質の酵素反応物の検出は, GuUGD 組換えタンパク質の酵素反応物の検出と同じ方法で行った. 室温にて保存バッファー (20 mM Tris, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 10% [v/v] グリセロール, 0.5 mM NAD^+ ; pH 8.0) 中で 90 分間インキュベートした酵素 1 μg を, 2 mM UDP-Glc と 600 μM NAD^+ を含む 100 μl のアッセイバッファー (20 mM Tris, 1 mM EDTA, 10% [v/v] グリセロール) に添加して, 25 $^{\circ}\text{C}$ で 1 日インキュベーションしたあと, 10 倍に希釈し, 孔径 0.2 μm の GL クロマトディスク水系型式 4A フィルター (ジエールサイエンス) を通した. 空ベクターで形質転換した大腸菌から抽出したタンパク質溶液は, UGD タンパク質溶液と同じ容量で使用した.

反応生成物は, タンデム四重極検出器付き ACQUITY™ Ultra-Performance LC システム (Waters) を用いて, 75 $^{\circ}\text{C}$ に維持した ACQUITY UPLC BEH Amide カラム (1.7 μm , 2.1 $\times$ 150 mm) での親水性相互作用クロマトグラフィーにより分析した. 移動相は, アセトニトリル/水 (50:50) に 10 mM のトリエチルアミンアセテートを加えたものを使用した. 流速は 0.4 ml min^{-1} とした. 化合物はマイナスイオンモードのエレクトロスプレーイオン化法でイオン化した. マススペクトルは, 100–750 m/z の範囲で記録した. 質量分析計の設定は, キャピラリー電圧 +3.5 kV, コーン電圧 45 V, ソース温度 150 $^{\circ}\text{C}$, デソルベーション温度 450 $^{\circ}\text{C}$, コーンガスフロー 50 L h^{-1} , デソルベーションガスフロー 450 L h^{-1} とした. データの取得と解析には, MassLynx (ver.4.1) を使用した. 各サンプルは 5 μl 注入し, 標準試料として用いた UDP-GlcA の保持時間と比較してピークを同定した.

● UGD タンパク質のアミノ酸配列と酵素活性

○ アミノ酸配列のアライメント解析

GuUGD タンパク質と MtUGD タンパク質のアミノ酸配列のアライメント, GuUGD タンパク質と機能同定されている植物 UGD タンパク質のアミノ酸配列のアライメント, およびクレード I–V に属する UGD タンパク質のアミノ酸配列のアライメントは, BioEdit の ClustalW を使用して描写した.

○ GuUGD1-5 タンパク質の 3D モデルの構築

GuUGD1-5 タンパク質の 3D モデルは ExPASy (<https://swissmodel.expasy.org/>; Benkert et al. 2011; Bertoni et al. 2017; Bienert et al. 2017; Guex et al. 2009; Waterhouse et al. 2018) の自動化された SWISS-MODEL サーバーを用いて、タンパク質の相同性に基づいて構築した。予測された GuUGD タンパク質の 3D モデルは、RasMol ver. 2.7.5.2 を用いて、ヒト UGD タンパク質の X 線結晶構造 (6c4j; Beattie et al. 2018) との重ね合わせにより解析した。

○ アミノ酸変異を加えた UGD 分子の作製

第 2 章で用いた pCold I DNA に組み込まれた *GuUGD2* 遺伝子クローンを鋳型とし、プライマー No. 58-71 (表 4-3) と PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (タカラバイオ) を用いて、変異の入った DNA 配列を PCR 増幅させた。

表 4-3 *GuUGD2* 遺伝子の変異導入で使したプライマー

No.	配列 (5' to 3')	用途
58	TATTCTCTCGGCACTGACTCGAGGATT	GuUGD2 V251L 変異導入 (Forward)
59	AGTGCCGAGAGAATAGGCAACCTGTTG	GuUGD2 V215L 変異導入 (Reverse)
60	TCTGTTAGCACTGACTCGAGGATTGGA	GuUGD2 G252S 変異導入 (Forward)
61	GTCAGTGCTAACAGAATAGGCAACCTG	GuUGD2 G252S 変異導入 (Reverse)
62	GTTGGCAAAGACTCGAGGATTGGACCC	GuUGD2 T253K 変異導入 (Forward)
63	CGAGTCTTTGCCAACAGAATAGGCAAC	GuUGD2 T253K 変異導入 (Reverse)
64	GGCACTAACTCGAGGATTGGACCCAAG	GuUGD2 D254N 変異導入 (Forward)
65	CCTCGAGTTAGTGCCAACAGAATAGGC	GuUGD2 D254N 変異導入 (Reverse)
66	ACTGACACCAGGATTGGACCCAAGTTC	GuUGD2 S255T 変異導入 (Forward)
67	AATCCTGGTGTTCAGTGCCAACAGAATA	GuUGD2 S255T 変異導入 (Reverse)

68	GACTCGAAAATTGGACCCAAGTTCCTG	GuUGD2 R256K 変異導入 (Forward)
69	TCCAATTTTCGAGTCAGTGCCAACAGA	GuUGD2 R256K 変異導入 (Reverse)
70	CTCAGCAAAAACACCAAAATTGGACCCAAGTTC	GuUGD2 251-256 変異導入 (Forward)
71	GGTGTTTTTGCTGAGAGAATAGGCAACCTGTTG	GuUGD2 251-256 変異導入 (Reverse)

○ アミノ酸変異を加えた GuUGD2 の *in vitro* 酵素活性試験

変異を加えた GuUGD2 組換えタンパク質の発現誘導, 精製, 酵素活性試験の方法は, 第 2 章で記した野生型の GuUGD 組換えタンパク質の発現誘導, 精製, 酵素活性試験と同じ方法で行った. 変異 *GuUGD2* 遺伝子のプラスミドは, pGro7 プラスミド (タカラバイオ)とともに大腸菌 One Shot™ BL21 Star™ (DE3) (Thermo Fisher Scientific) に導入した. 組換えタンパク質を回収するために, 0.5 mg ml⁻¹ L-アラビノース, 20 μg ml⁻¹ クロラムフェニコール, 100 μg ml⁻¹ アンピシリンを添加した LB 培地にて, 37 °C で OD 600 nm 0.4–0.8 になるまで培養した. 培養液を 15 °C にて 30 分間冷却したあと, 終濃度 500 μM となるよう IPTG を添加してタンパク質の発現を誘導した. そのまま 15 °C で 1 日培養したあと, 氷上で振盪しながら冷却し, 遠心分離 (4 °C, 10 min, 4500 × g) によって細胞を回収後, 液体窒素で凍結した.

凍結した細胞 1 g (fresh weight) あたり冷却した溶解バッファー (10 mM Tris, 50 mM リン酸ナトリウム, 2 mM MgCl₂, 10% [v/v] グリセロール, 1 mM NAD⁺, 2 mM 2-メルカプトエタノール, 1× cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail; pH 8.0) 10 ml に懸濁した. リゾチームと Nonidet P-40 をそれぞれ終濃度 200 μg ml⁻¹ と 1% [v/v] で細胞懸濁液に添加し, 4 °C にて 30 分間ゆっくり振盪した. さらに終濃度 2.4 U ml⁻¹ で Benzonase® ヌクレアーゼ (Sigma-Aldrich) を添加し, 4 °C にて 15 分間ゆっくり振盪した. 大腸菌のデブリを遠心分離 (10 min, 9500 × g) によって取り除き, 上清に終濃度 250 mM で NaCl を添加したあと, 精製バッファー (10 mM Tris, 50 mM リン酸ナトリウム, 300 mM NaCl, and 10% グリセロール; pH 8.0) で平衡化した TALON® Metal Affinity Resin (Clontech Laboratories) にアプライし, batch/gravity-flow 法にて精製した. レジンの 10 倍量の精製バッファーと, 終濃度 10 mM でイミダゾールを添加したレジンの 5 倍量の精製バッファーで洗浄したあと, UGD 組換えタンパク質を終濃度 100 mM でイミダゾールを添加した精製バッ

ファーで溶出させた. UGD 活性は NaCl によって阻害を受けることが知られているため, 精製バッファの残量が 0.5% 以下となるよう, すぐに Amicon® Ultra 100K device (Millipore) を用いた限外濾過により, 保存バッファ (20 mM Tris, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 10% [v/v] グリセロール, 0.5 mM NAD^+ ; pH 8.0) に移し替えて濃縮し, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保存した. 組換えタンパク質が精製されているかは, 付加した発現ベクター由来の His-タグが検出されるかで評価した. Criterion™ TGX Stain-Free™ プレキャストゲル (Bio-Rad Laboratories) に精製した GuUGD2 アミノ酸変異タンパク質溶液をアプライし, 電気泳動装置 Criterion™ セル (Bio-Rad) を用いて SDS-PAGE を行った. セミドライ式ブロッティング装置のトランスブロット Turbo 転写システム (Bio-Rad Laboratories) を用いてブロッティング膜へ転写し, 5% スキムミルクを含む t-TBS (10 mM Tris, 0.9% NaCl, 0.05%(w/v) Tween20; pH 7.4) でブロッキングを行い, 1% スキムミルクを含む t-TBS で 5000 倍希釈した Anti-His-tag mAb-HRP-DirecT (医学生物学研究所) を用いて His-タグを標的とする抗体反応を行った. その後, Chemi-Lumi One Super (ナカライテスク) で発光させ, 目的サイズ付近にバンドが見られるかを確認した. 精製したタンパク質の濃度は, SDS-PAGE を行ったゲルを CBB 染色して, 同時に泳動した濃度既知の BSA のバンド強度を基準として, 対応するサイズのバンドの強度をもとに算出した. なお, GuUGD2 アミノ酸変異タンパク質はそれぞれ 3 ロットずつ調製した.

酵素反応は, 室温にて保存バッファ中 (20 mM Tris, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 10% [v/v] グリセロール, 0.5 mM NAD^+ ; pH 8.0) で 90 分間インキュベートした酵素 $0.5\text{ }\mu\text{g}$ を, 2 mM UDP-Glc と $600\text{ }\mu\text{M}$ NAD^+ を含む $100\text{ }\mu\text{l}$ のアッセイバッファ (20 mM Tris, 1 mM EDTA, 10% [v/v] グリセロール) に添加して, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ で行った. 補酵素 NAD^+ から NADH への変換に伴う経時的な波長 340 nm における吸光度変化を Infinite® 200PRO multimode microplate reader (TECAN Austria GmbH) を用いてモニタリングし, 初速度を算出した.

○ アミノ酸変異を加えた GuUGD2 タンパク質の 3D モデルの解析

アミノ酸変異を加えた GuUGD2 タンパク質の 3D モデルは AlphaFold2 (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFo>

ld2.ipynb) を用いて構築した. 予測された 3D モデルは, PyMOL ver. 4.6.0 を用いて ヒト UGD タンパク質の X 線結晶構造 (6c4j; Beattie et al. 2018) との重ね合わせにより解析した.

4.3 結果

- UGD タンパク質の系統解析

- 系統樹解析

植物における *UGD* 遺伝子の進化的背景を明らかにするために, NCBI の GenBank に登録されているタンパク質を対象に, GuUGD 1-5 タンパク質のアミノ酸配列をクエリとして blastp 検索を行った結果, 95 種類 396 分子種の推定 UGD タンパク質が抽出された (表 4-4). この中には, 先行研究において機能解析が行われた UGD タンパク質も機能解析を行われていない推定 UGD タンパク質も含まれていた. これらの植物種のうちのほとんどが 2 つ以上の推定 UGD タンパク質を有していた. これらの推定 UGD タンパク質のアミノ酸配列を用いて構築した系統樹を図 4-1 (a) に示す. 系統樹は共通祖先に当たる根から分岐し, 単子葉類 (monocots; 図 4-1 (a) において緑色の線で示す) と一部の真正双子葉類の UGD タンパク質が最初に分かれた. 真正双子葉類の UGD タンパク質のみで構成される枝は, さらにいくつかの真正双子葉類が分岐したあと, 大きく 3 つの枝 (クレード A-C) に分岐した (図 4-1 (a) において, それぞれのクレードの起点となる節を赤丸で示す). この 3 つの枝はいずれも, マメ科 (Fabaceae; 図 4-1 (a) において赤色の線で示す), マメ科以外のバラ類 (rosids; 図 4-1 (a) において紫色の線で示す), バラ類以外の真正双子葉類 (eudicots; 図 4-1 (a) において青色の線で示す) の UGD タンパク質から構築されていた. GuUGD タンパク質は互いに同じクレードに属してはおらず, クレード A-C という 3 つ大きなクレードに分かれていることが明らかになった. このうち, クレード A とクレード B にはそれぞれ 2 分子種のウラルカンゾウの UGD タンパク質が属しており, クレード C には 1 分子種がクラスタリングされた. さらに, クレード A-C はそれぞれ, マメ科の UGD タンパク質のみで構成される小さい枝 (クレード I-V) を有しており, GuUGD1

タンパク質はクレード I, GuUGD2 タンパク質はクレード III, GuUGD3 タンパク質はクレード IV, GuUGD4 タンパク質はクレード II, GuUGD5 タンパク質は最も遠縁のクレード V に、それぞれ 1 分子種ずつ属していた (図 4-1 (b)–(f)). 次に、系統樹でグループ化された推定 UGD タンパク質同士が、遺伝子の進化的側面から見ても近縁分子種であるかを確認するために、それぞれのクレードにおけるシンテニーを解析した. 系統樹解析に用いた UGD タンパク質のアミノ酸配列と対応する遺伝子を NCBI で検索し、その上流と下流の 30 kb の塩基配列を比較したところ、それぞれのクレードごとに特徴的なパターンが観察された (図 4-1 (b)–(f)).

表 4-4 GenBank から抽出された植物の推定 UGD タンパク質

生物種 タンパク質	和名	分類		
<i>Homo sapiens</i> XP_005262724	ヒト			
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> UGD1	ウラルカンゾウ UGD2	Fabaceae UGD3	UGD4	UGD5
<i>Arachis duranensis</i> XP_015946143	XP_015965363	Fabaceae XP_020994926	XP_015943274	XP_015962704
<i>Arachis ipaensis</i> XP_016194343	ピーナッツ XP_016180844	Fabaceae XP_016190890	XP_016193330	XP_016202894
<i>Cajanus cajan</i> XP_020218809	キマメ XP_020222699	Fabaceae XP_020206708	XP_020221450	XP_020228548
<i>Cicer arietinum</i> XP_004491884	ヒヨコマメ XP_012572519	Fabaceae XP_004505368	XP_004489453	XP_004490146
<i>Galega orientalis</i> ADT91651	ガレガ	Fabaceae		
<i>Glycine max</i> NP_001238410 NP_001304614	ダイズ XP_003552559 XP_003525453	Fabaceae XP_003554799 XP_003549560	XP_003543940	XP_003518763
<i>Glycine soja</i> KHN17279 KHN48813	ツルマメ KHN30001 KHN18342	Fabaceae KHN48728	KHN13571	KHN07144
<i>Lotus japonicus</i> AFK44777	ミヤコグサ XP_057448129	Fabaceae XP_057436073		

生物種	和名	分類		
タンパク質				
<i>Lupinus angustifolius</i>	ルビナス	Fabaceae		
XP_019456316	XP_019442730	XP_019452969	XP_019434827	XP_019456146
XP_019461259	XP_019445907	XP_019424489	XP_019451672	
<i>Medicago truncatula</i>	タルウマゴヤシ	Fabaceae		
XP_003607793	XP_003614035	XP_003621403	XP_013457966	
<i>Phaseolus vulgaris</i>	インゲンマメ	Fabaceae		
XP_007139500	XP_007151298	XP_007153536	XP_007157843	XP_007155252
<i>Trifolium pratense</i>	ムラサキツメクサ	Fabaceae		
PNX71811	PNX72466	PNY08180	PNY08402	PNX73162
<i>Trifolium subterraneum</i>	ジモグリツメクサ	Fabaceae		
GAU19837	GAU50389	GAU47535	GAU29150	GAU24643
<i>Vigna angularis</i>	アズキ	Fabaceae		
XP_017418913	XP_017440277	XP_017436926	XP_017423083	XP_017423383
<i>Vigna radiata</i> var. <i>radiata</i>	リョクトウ	Fabaceae		
XP_014498002	XP_014515112	XP_014492945	XP_014507044	XP_014507045
<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>Lyrata</i>		rosids		
XP_002884300	XP_020876582	XP_020880450	XP_002870795	XP_020870379
<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	rosids		
Q9FZE1 (UGD1)	Q9LIA8 (UGD2)	Q9AUV6 (UGD3)	Q9FM01 (UGD4)	
<i>Capsella rubella</i>	ルベラナズナ	rosids		
XP_006291015	XP_006307380	XP_006283580	XP_006287642	XP_006297399
<i>Cephalotus follicularis</i>	フクロユキノシタ	rosids		
GAV65703				

生物種	和名	分類	
タンパク質			
<i>Citrus clementina</i>	クレメンティン	rosids	
XP_006431272	XP_006438811	XP_006440707	
<i>Citrus sinensis</i>	オレンジ	rosids	
XP_006482729	XP_006483050	XP_006477634	
<i>Corchorus capsularis</i>	コウマ	rosids	
OMO73257	OMO53181	OMO93412	
<i>Corchorus olitorius</i>	シマツナソ	rosids	
OMO85896	OMO71969	OMO84111	
<i>Cucumis melo</i>	メロン	rosids	
XP_008451675	XP_008453254	XP_008445466	
<i>Cucumis sativus</i>	キュウリ	rosids	
XP_004137197	XP_004138189	XP_004144182	
<i>Cucurbita maxima</i>	カボチャ	rosids	
XP_022998264	XP_022980610	XP_022987971	
<i>Cucurbita moschata</i>	ニホンカボチャ	rosids	
XP_022948914	XP_022930585	XP_022921636	
<i>Dimocarpus longan</i>	リュウガン	rosids	
ALS40438			
<i>Durio zibethinus</i>	ドリアン	rosids	
XP_022750713	XP_022774559	XP_022734349	XP_022768968
<i>Eucalyptus grandis</i>	ユーカリ	rosids	
NP_001306900	XP_010037215		
<i>Eutrema salsugineum</i>		rosids	
XP_006395280	XP_006400070	XP_024014612	XP_006415933

生物種	和名	分類		
タンパク質				
<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>Vesca</i>	イチゴ	rosids		
XP_004299318	XP_004297255	XP_004307294		
<i>Gossypium arboreum</i>	ワタ	rosids		
XP_017647415	XP_017642777	XP_017638062	XP_017630688	XP_017637732
XP_017617260				
<i>Gossypium barbadense</i>	ワタ	rosids		
PPD92525	PPD99246	PPR94507	PPD72526	PPD94828
<i>Gossypium hirsutum</i>	ワタ	rosids		
XP_016710409	NP_001313985	XP_016693391	NP_001313666	NP_001314095
NP_001314436	XP_016744279	XP_016733134	XP_016709674	NP_001314417
XP_016674209	XP_016703883	XP_016737086		
<i>Gossypium raimondii</i>	ワタ	rosids		
XP_012437295	XP_012489630	XP_012478748	XP_012438519	XP_012465618
XP_012470496				
<i>Herrania umbratica</i>		rosids		
XP_021297693	XP_021299804	XP_021287243		
<i>Hevea brasiliensis</i>	パラゴムノキ	rosids		
XP_021669633	XP_021678366	XP_021672943	XP_021670747	XP_021640335
XP_021641573				
<i>Jatropha curcas</i>	ナンヨウアブラギリ	rosids		
XP_012084804	XP_012067758	XP_012080355		
<i>Juglans regia</i>	テウチグルミ	rosids		
XP_018816673	XP_018816674	XP_018831898	XP_018818494	XP_018820622
<i>Manihot esculenta</i>	キャッサバ	rosids		
XP_021634636	XP_021615287	XP_021603082	XP_021633444	

生物種	和名	分類		
タンパク質				
<i>Momordica charantia</i>	ツルレイシ	rosids		
XP_022144505	XP_022135564	XP_022132173		
<i>Morus notabilis</i>		rosids		
XP_010109364	XP_010112421	XP_010089612		
<i>Parasponia andersonii</i>		rosids		
PON40777	PON79657	PON68949		
<i>Populus tremula</i> x <i>P.tremuloides</i>		rosids		
AAF04455				
<i>Prunus avium</i>	セイヨウミザクラ	rosids		
XP_021807379	XP_021820619	XP_021805915	XP_021821646	
<i>Prunus mume</i>	ウメ	rosids		
XP_008240040	XP_008221520	XP_008230859	XP_008227320	
<i>Prunus persica</i>	モモ	rosids		
XP_007209975	XP_007225708	XP_007215292	XP_007203126	BAM74189
<i>Punica granatum</i>	ザクロ	rosids		
OWM74795	OWM74789	OWM90384		
<i>Quercus suber</i>	コルクガシ	rosids		
XP_023929780	XP_023878448	XP_023928419		
<i>Ricinus communis</i>	トウゴマ	rosids		
XP_002512099	XP_002512103	XP_002514686	XP_002512104	
<i>Rosa chinensis</i>	バラ	rosids		
XP_024193506	XP_024171026	XP_024190137		
<i>Tarenaya hassleriana</i>	セイヨウフウチョウソウ	rosids		
XP_010528399	XP_010550019	XP_010553973	XP_010551392	XP_010546194

生物種	和名	分類		
タンパク質				
<i>Theobroma cacao</i>	カカオ	rosids		
XP_007032693	XP_007045911	XP_007037510		
<i>Trema orientalis</i>	ウラジロエノキ	rosids		
PON83462	PON52349	PON70341		
<i>Vitis vinifera</i>	ヨーロッパブドウ	rosids		
XP_010661131	XP_002269692	XP_010663285	XP_002284402	
<i>Ziziphus jujuba</i>	ナツメ	rosids		
XP_015879845	XP_015870351	XP_015894977		
<i>Actinidia chinensis</i> var. <i>chinensis</i>	オニマタタビ	eudicots		
PSR87713	PSS30500	PSR88405	PSS07965	PSS07964
<i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>Vulgaris</i>	ビート	eudicots		
XP_010688887	XP_010685225	XP_010678413		
<i>Chenopodium quinoa</i>	キヌア	eudicots		
XP_021770918	XP_021718411	XP_021757037	XP_021733943	XP_021761535
<i>Coffea canephora</i>	ロブスタコーヒーノキ	eudicots		
CDP02294	CDP21525	CDP00416		
<i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i>		eudicots		
XP_024968830	XP_024977777	XP_024975355	XP_024970381	XP_024994697
XP_024972824				
<i>Daucus carota</i> subsp. <i>Sativus</i>	ニンジン	eudicots		
XP_017217594	XP_017243062	XP_017215786	XP_017223536	
<i>Diospyros kaki</i>	カキノキ	eudicots		
ASL69220	ASL69225			

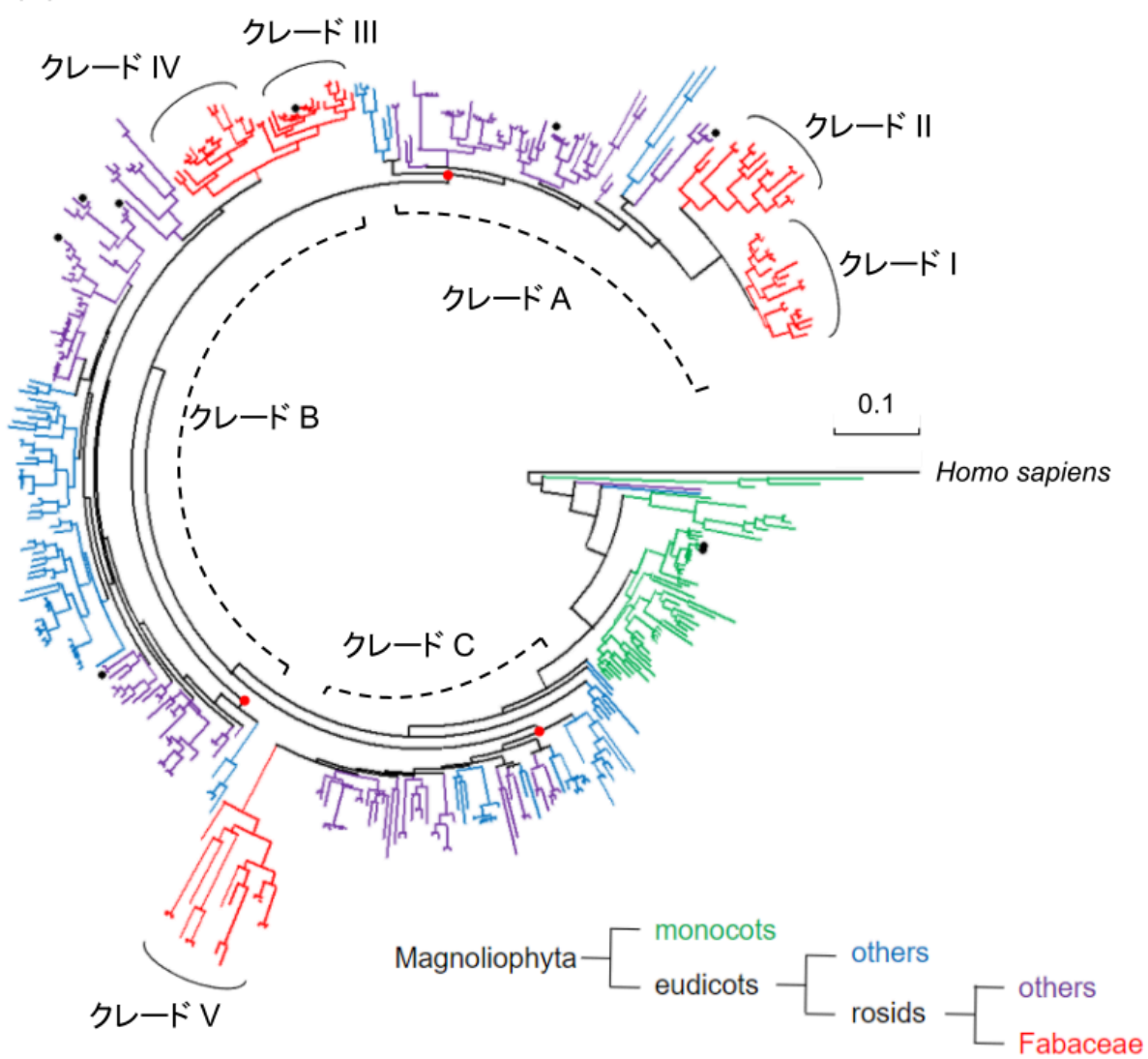
生物種	和名	分類		
タンパク質				
<i>Doroceras hygrometricum</i>		eudicots		
KZV45627	KZV46293			
<i>Erythranthe guttata</i>	セイタカミゾホオズキ	eudicots		
XP_012851472	XP_012840594			
<i>Handroanthus impetiginosus</i>	パウダルコ	eudicots		
PIN01104	PIN17314			
<i>Helianthus annuus</i>	ヒマワリ	eudicots		
XP_022021963	XP_022005397	XP_022011312	XP_022017570	XP_022034201
<i>Ipomoea batatas</i>	サツマイモ	eudicots		
AGP25711	AGP25712	AGP25709	AGP25708	AGP25707
AGP25694	AGP25701	AGP25696	AGP25700	AGP25703
AGP25715	AGP25704			
<i>Ipomoea nil</i>	アサガオ	eudicots		
XP_019167139	XP_019157079	XP_019185687	XP_019195372	
<i>Lactuca sativa</i>	レタス	eudicots		
XP_023737002	XP_023771417	XP_023762094	XP_023753881	XP_023731287
<i>Macleaya cordata</i>	タケニグサ	eudicots		
OVA00768	OVA07909	OVA17317		
<i>Nelumbo nucifera</i>	ハス	eudicots		
XP_010259308	XP_010262604	XP_010258112	XP_010258114	XP_010259320
<i>Nicotiana attenuata</i>	タバコ	eudicots		
XP_019248210	XP_019238756	XP_019264969	XP_019256161	XP_019231716
<i>Nicotiana glauca</i>	タバコ	eudicots		
XP_009794340	XP_009765825	XP_009757595	XP_009800068	

生物種	和名	分類		
タンパク質				
<i>Nicotiana tabacum</i>	タバコ	eudicots		
XP_016452892	XP_016438173	XP_016471105	XP_016446095	XP_016452892
XP_016483723	XP_016459556			
<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	タバコ	eudicots		
XP_009587644	XP_009591859	XP_009596913	XP_009630273	
<i>Olea europaea</i> var. <i>sylvestris</i>	オリーブ	eudicots		
XP_022853008	XP_022853005	XP_022850464	XP_022884147	XP_022843691
<i>Sesamum indicum</i>	ゴマ	eudicots		
XP_011098723	XP_011085732	XP_011072834		
<i>Spinacia oleracea</i>	ホウレンソウ	eudicots		
XP_021856643	XP_021839001	XP_021850259		
<i>Aegilops tauschii</i> subsp. <i>strangulata</i>	タルホコムギ	monocots		
XP_020173165	XP_020186854	XP_020159946	XP_020185041	
<i>Apostasia shenzhenica</i>		monocots		
PKA64942	PKA49751	PKA59593		
<i>Cinnamomum osmophloeum</i>	シナモン	monocots		
AAR84297				
<i>Dendrobium catenatum</i>	キバナノセッコク	monocots		
XP_020702512	XP_020680000			
<i>Dichantherium oligosanthes</i>		monocots		
OEL23381	OEL31970	OEL33740	OEL32556	
<i>Elaeis guineensis</i>	ギニアアブラヤシ	monocots		
XP_010939287	XP_010936333	XP_010923592	XP_010939142	

生物種	和名	分類		
タンパク質				
<i>Musa acuminata subsp. malaccensis</i>	マレーヤマバショウ	monocots		
XP_009394770	XP_009396027	XP_009395634	XP_009394326	XP_009396428
XP_009404122	XP_009380107	XP_009383002	XP_009405957	XP_009393860
<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	イネ	monocots		
XP_015620155	XP_015620482	XP_015631440	XP_015630087	XP_015629261
<i>Panicum hallii</i>		monocots		
XP_025820894	XP_025794074	XP_025796395	XP_025802825	XP_025796546
<i>Phoenix dactylifera</i>	ナツメヤシ	monocots		
XP_008785965	XP_008775633	XP_008805105	XP_008792734	
<i>Setaria italica</i>	アワ	monocots		
XP_004973153	XP_004981706	XP_004985226	XP_004982452	XP_004955331
<i>Sorghum bicolor</i>	モロコシ	monocots		
XP_021320587	XP_002468295	XP_021319319	XP_002461326	
<i>Zea mays</i>	トウモロコシ	monocots		
XP_008672737 (UDPGDH-A)	NP_001149225 (UDPGDH-B)	NP_001151861		

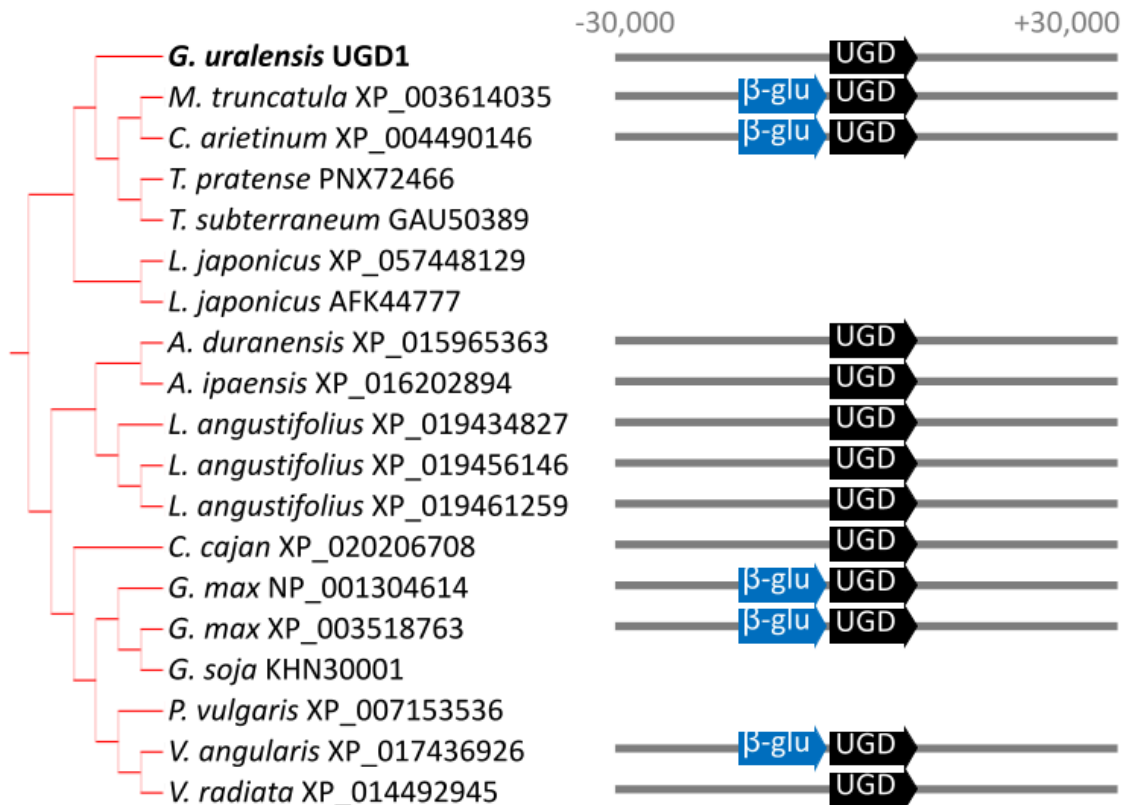
タンパク質は GenBank に登録されているタンパク質 Accession 番号で記載する。なお、複数のアイソフォームが機能同定されている植物種については、それぞれの論文で使用されている UGD タンパク質の名称を () の中に書き添えた。先行研究において機能同定されているタンパク質を青字で示す。

(a)



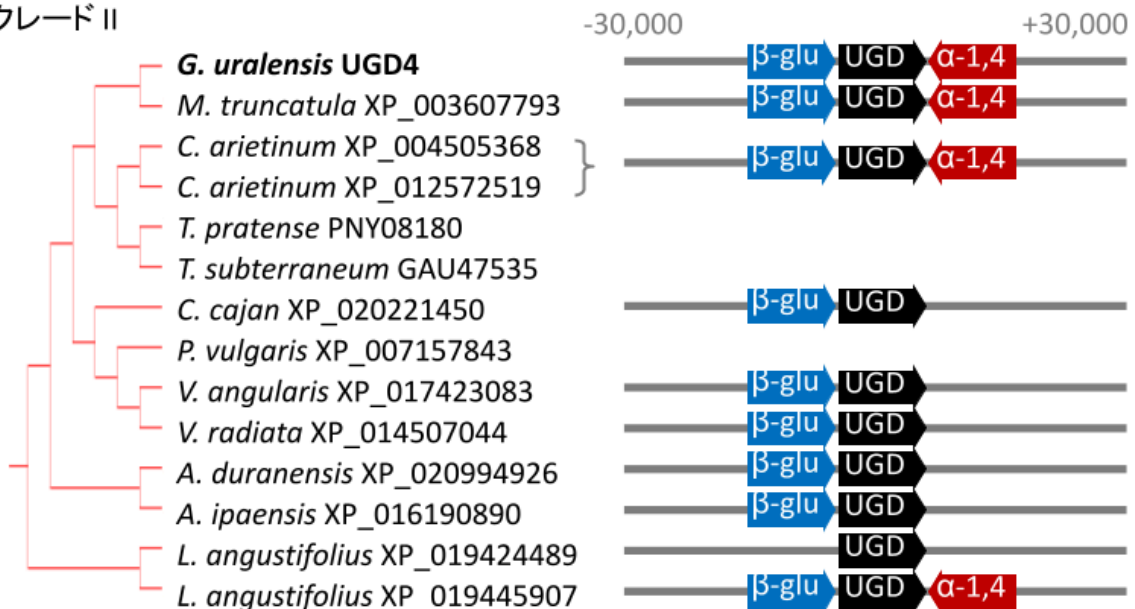
(b)

クレード I



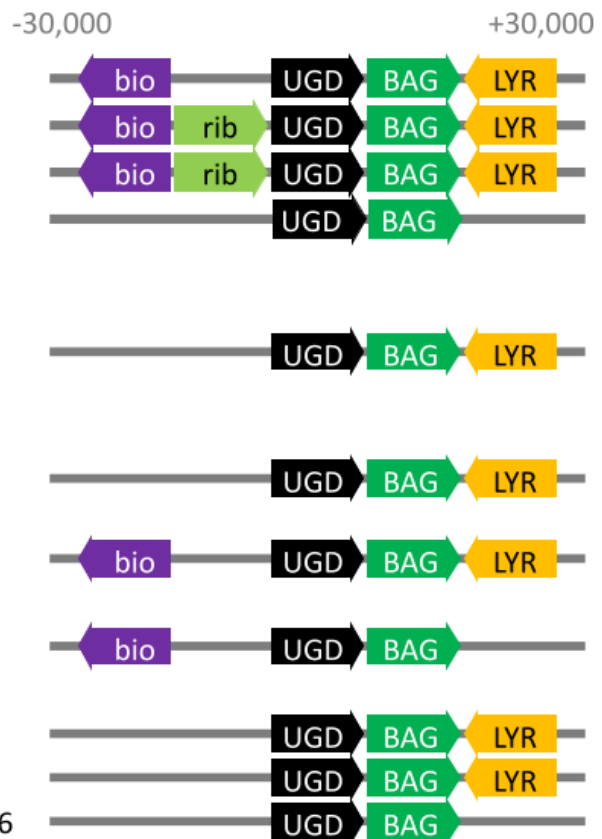
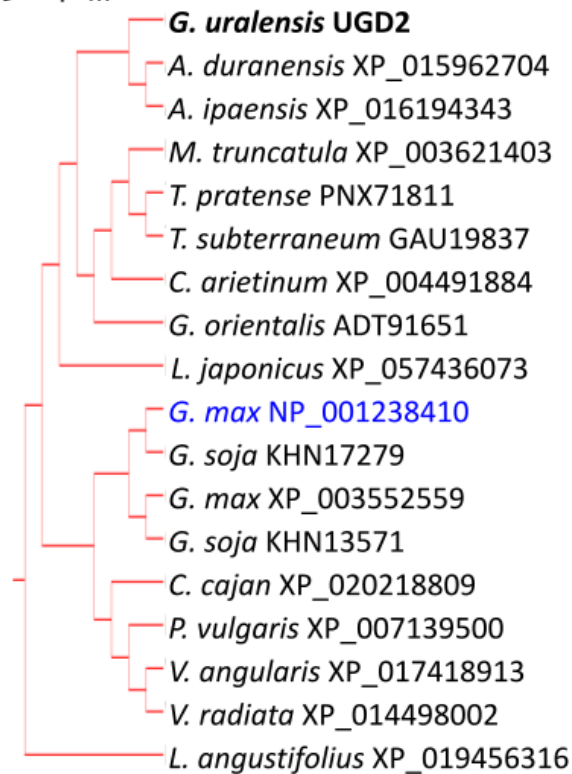
(c)

クレード II



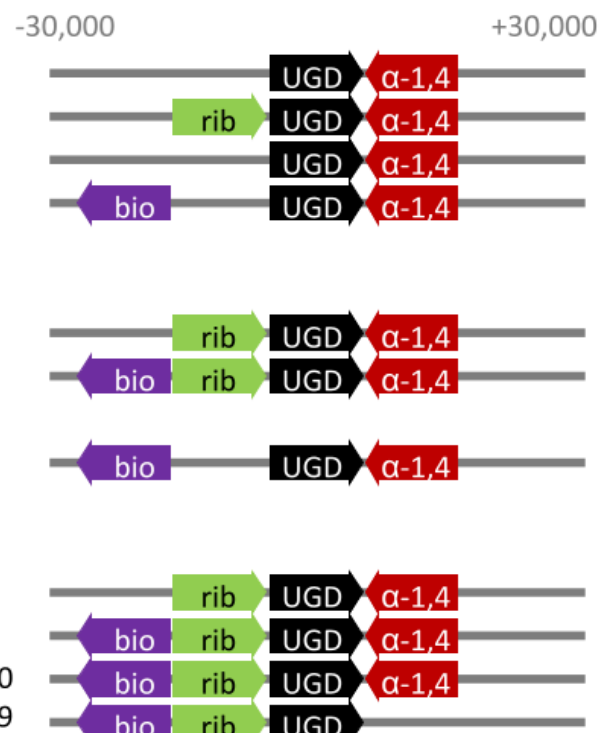
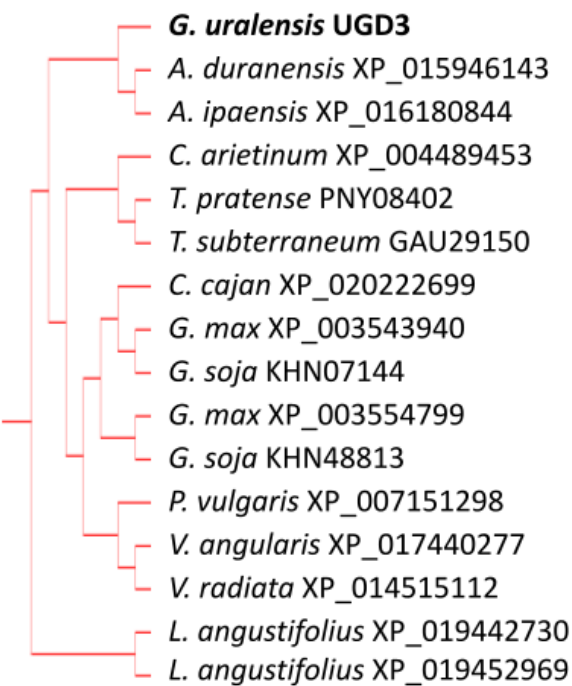
(d)

クレード III



(e)

クレード IV



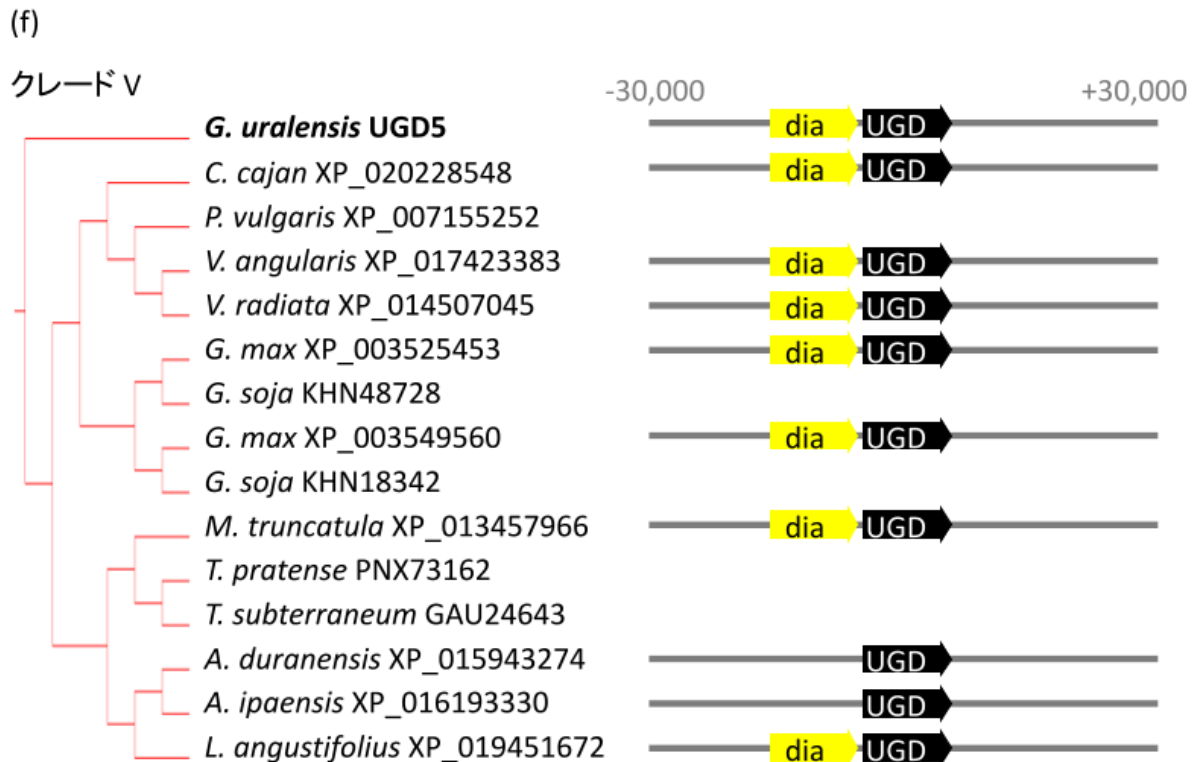


図 4-1 クレード I-V に属する UGD タンパク質をコードする遺伝子のシンテニー解析

(a) 植物 UGD タンパク質の系統樹解析. ヒトの UGD タンパク質 (*Homo sapiens* XP_005262724) をアウトグループとして, 植物由来の推定 UGD タンパク質の最尤系統樹を構築した. スケールはアミノ酸置換数による進化的距離を表す. 樹上の黒丸は, 先行研究において既に機能同定されている UGD タンパク質を示す. マメ科 UGD タンパク質は赤色の枝で, マメ科以外のバラ類 UGD タンパク質は紫色の枝で, バラ類以外の真正双子葉類 UGD タンパク質は青色の枝で, 単子葉類 UGD タンパク質は緑色の枝で示す. (b) クレード I の UGD タンパク質をコードする遺伝子のシンテニー解析. (c) クレード II の UGD タンパク質をコードする遺伝子のシンテニー解析. (d) クレード III の UGD タンパク質をコードする遺伝子のシンテニー解析. (e) クレード IV の UGD タンパク質をコードする遺伝子のシンテニー解析. (f) クレード V の UGD タンパク質をコードする遺伝子のシンテニー解析. (b)-(f) の左側の系統樹はクレード I-V の拡大図を示す. 先行研究で UGD 活性が確認されているタンパク質は青字で示す. 右側は系統樹に示す UGD タンパク質をコードする遺伝子上流および下流 30 kb 領域に存在する遺伝子のアノテーションを示す. ゲノム配列を記載していない UGD タンパク質は NCBI からゲノム情報が取得出来なかったことを示す. 同一ゲノム配列へ紐づけている *C. arietinum* XP_004505368 と *C. arietinum* XP_012572519 は, 同一遺伝子由来のタンパク質であることを示す. アノテーションの略称はそれぞれ以下のとおりである. UGD: UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ, β -glu: β -グルコシダーゼ 40, α -1,4: α -1,4 グルカンホスホリラーゼ L アイソザイム, bio: ビオチンカルボキシルキャリアタンパク質, rib: 40S リボソームタンパク質, BAG: BAG ファミリー分子シャペロ

ンレギュレーター 8 葉緑体様, LYR: LYR モチーフ含有タンパク質 4B, dia: ジアシルグリセロールキナーゼドメインタンパク質.

○ *UGD* 遺伝子の転写解析

クレード間で *UGD* の生理学的な特性の差異があるかを検討するために、データベースが公開されているマメ科について、推定 *UGD* 遺伝子の転写パターンを解析した。タルウマゴヤシとダイズについては、系統樹解析に用いた推定 *UGD* タンパク質の Accession 番号とそれをコードする遺伝子 ID, および、それぞれのデータベースにおいて blastn 検索で抽出された推定 *UGD* 遺伝子との対応を表 4-5 (タルウマゴヤシ) と表 4-6 (ダイズ) に示す。ミヤコグサについては、系統樹解析に用いた推定 *UGD* タンパク質の Accession 番号とデータベースにおいて blastp 検索で抽出された Transcript ID との対応を表 4-7 に示す。

先行研究において機能同定されているダイズの *GmUGD* 遺伝子は、根でよく発現していることが報告されている (Seitz et al. 2000). そこで *UGD* 遺伝子の根での転写レベルを解析した (図 4-2). なお、ウラルカンゾウは RNA-Seq による FPKM 値, タルウマゴヤシとミヤコグサはマイクロアレイによる転写量, ダイズは次世代シーケンサーによる RPKM 値として取得した。解析の結果, 本研究で解析した全てのマメ科植物において、クレード III (*GuUGD2* タンパク質が属する系統; 図 4-2 において赤色のバーで示す) の *UGD* タンパク質をコードする遺伝子は最も高い転写レベルを示した。また、クレード II (*GuUGD4* タンパク質が属する系統; 図 4-3 において青色のバーで示す) とクレード V (*GuUGD5* タンパク質が属する系統; 図 4-3 において緑色のバーで示す) の *UGD* タンパク質をコードする遺伝子は、転写レベルが低いか、植物種によってはデータベースに登録されていなかった。

表 4-5 GenBank のタンパク質および遺伝子名と MtGEA の probe set ID の対応

GenBank		MtGEA (ver. 3)
タンパク質 Accession	遺伝子 ID	probe set ID

XP_003607793	11440905	(対応なし)
XP_003621403	11415271	Mtr.48440.1.S1_at
XP_013457966	25493872	Mtr.41235.1.S1_at
XP_003614035	11416106	Mtr.25689.1.S1_at

タルウマゴヤシは GenBank に登録されている推定 UGD タンパク質に紐づけられた遺伝子配列をクエリとして, 対応する gene model name を取得した.

表 4-6 GenBank のタンパク質および遺伝子名と SoyBase の gene model name の対応

GenBank タンパク質 Accession	遺伝子 ID	SoyBase (Wm82.a1.v1.1) gene model name
NP_001304614	100820448	Glyma01g06970
XP_003518763	100799142	Glyma02g12870
NP_001238410	548074	Glyma08g26520
XP_003552559	100803962	Glyma18g50000
XP_003543940	100802280	Glyma13g06050
XP_003554799	100810907	Glyma19g03500
XP_003525453	100781197	Glyma05g00590
XP_003549560	100794368	Glyma17g08490

ダイズは GenBank に登録されている推定 UGD タンパク質に紐づけられた遺伝子配列をクエリとして, 対応する gene model name を取得した.

表 4-7 GenBank のタンパク質と *Lotus Base* gene の probe set ID の対応

GenBank タンパク質 Accession	<i>Lotus Base</i> (MG20 v3.0 genome) Transcript ID
AK339713	Lj2g3v1254000.1

AK339764	Lj1g3v3007740.1
(対応なし)	Lj0g3v0246929.1
(対応なし)	Lj4g3v0679860.1
(対応なし)	Lj2g3v1079540.2

ミヤコグサは GenBank に登録されている推定 UGD タンパク質のアミノ酸配列をクエリとして、対応する Transcript ID を取得した。このため、GenBank のタンパク質に対応する遺伝子 ID の記載は割愛する。

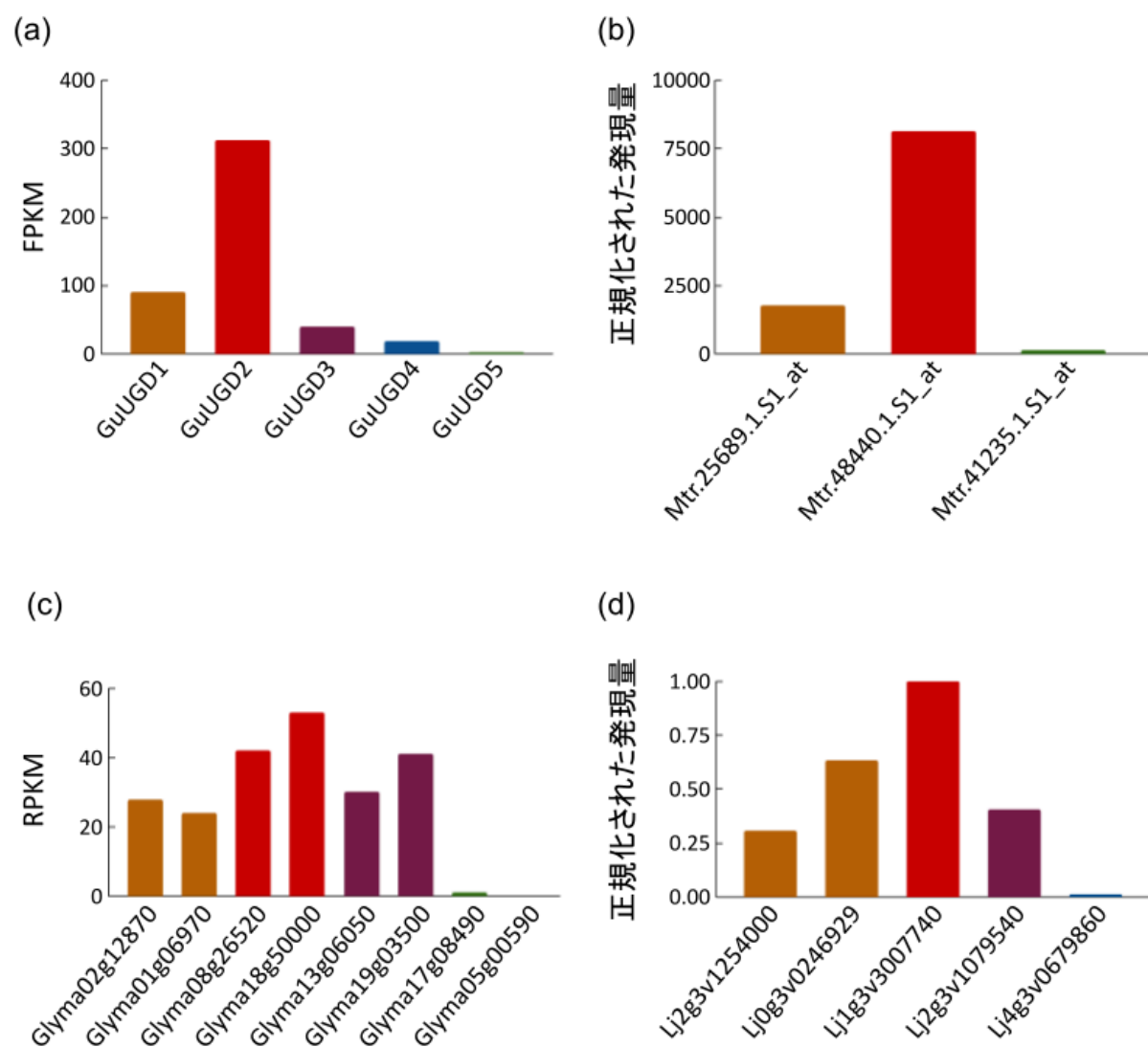


図 4-2 マメ科の根における UGD 遺伝子の転写レベル

(a) ウラルカンゾウの根における *UGD* 遺伝子の転写レベル. (b) タルウマゴヤシの根における *UGD* 遺伝子の転写レベル. (c) ダイズの根における *UGD* 遺伝子の転写レベル. (d) ミヤコグサの根における *UGD* 遺伝子の転写レベル. 遺伝子名はそれぞれのデータベースに登録されている ID を示す. 系統樹解析で同じクレードに属する *UGD* タンパク質をコードする遺伝子を同じ色で示す (クレード I は橙色, クレード III は赤色, クレード IV は紫色, クレード II は青色, クレード V は緑色). 遺伝子の並び順は, ウラルカンゾウの *GuUGD* 遺伝子名順に従っており, 左からクレード I, III, IV, II, V となっている. 同じ色のバーが 2 つある植物種は, 同じクレードに属する *UGD* 遺伝子が 2 分子種登録されていたことを示している.

● *GuUGD* と同じクレードに属する推定 *UGD* タンパク質の機能解析

ウラルカンゾウの *UGD* タンパク質と同じクレードに属する推定 *UGD* タンパク質の機能を解析するために, 当研究室で保有するマメ科のタルウマゴヤシ, ダイズ, ミヤコグサのサンプルから *UGD* 遺伝子の単離を試みた. しかし, ダイズとミヤコグサでは, タンパク質をコードしていない遺伝子断片が多く PCR 増幅されたため, *UGD* 遺伝子の単離を断念した. そこで, 本章ではタルウマゴヤシから単離した *MtUGD* 遺伝子の機能解析について記載する.

○ *UGD* 遺伝子の単離

GuUGD1-5 タンパク質と高い相同性を持つ配列として GenBank から抽出されたタルウマゴヤシの 4 つの推定 *UGD* 遺伝子配列に対応するプライマーを設計し, PCR を行った結果, 3 つの推定 *UGD* 遺伝子の全長コーディング配列が増幅された. それぞれ *GuUGD1* タンパク質との同一性が高い順に *MtUGD1-3* タンパク質とする. *MtUGD1-3* タンパク質の推定アミノ酸配列は *MtUGD* タンパク質の間 (74–85% ; 表 4-8) よりも, それぞれ特定の *GuUGD* タンパク質と高い同一性を示した (82–99% ; 表 4-9). *MtUGD1-3* タンパク質が最も高い同一性を示す *GuUGD* タンパク質と同じクレードに属するかを, 系統樹解析に用いたタルウマゴヤシの *UGD* タンパク質を単離した *MtUGD1-3* タンパク質に置き換えて再度系統樹を構築して確認した. その結果, *MtUGD1* タンパク質は *GuUGD4* タンパク質と同じクレード II,

MtUGD2 タンパク質は GuUGD2 タンパク質と同じクレード III, MtUGD3 タンパク質は GuUGD5 タンパク質と同じクレード V に属した.

表 4-8 MtUGD タンパク質の間のアミノ酸配列同一性

UGD 名	MtUGD2	MtUGD3
MtUGD1	85%	74%
MtUGD2		74%

表 4-9 MtUGD タンパク質と GuUGD タンパク質の間のアミノ酸配列同一性

UGD 名	GuUGD1	GuUGD2	GuUGD3	GuUGD4	GuUGD5
MtUGD1	90%	86%	87%	99%	81%
MtUGD2	87%	95%	92%	85%	82%
MtUGD3	74%	75%	75%	74%	82%

○ UGD 組換えタンパク質の解析

MtUGD 組換えタンパク質は, 第 2 章で記した GuUGD 組換えタンパク質と同様に, 大腸菌発現系 No. 5 を用いて発現誘導し, 精製した. また, 酵素活性試験で検出される活性が, 精製過程で除去されなかった大腸菌のタンパク質に由来する酵素活性でないことを確認するために, 空のベクターを導入した大腸菌から抽出されたタンパク質をコントロールとして用いた (図 4-3 において E と示す). 図 4-3 に SDS-PAGE の結果を示す. MtUGD1-3 組換えタンパク質溶液では, UGD 組換えタンパク質の予想される分子量と一致する約 50 kDa のバンドがそれぞれのレーンにおいて最も明瞭に観察された (図 4-3 左). さらに, ウェスタンブロッティングを用いて組換えタンパク質に融合させた His タグを検出すると, 同じ位置に同じ形のバンドが検出された

(図 4-3 右). 一方で, 空のベクターを導入した大腸菌から得られたタンパク質溶液ではこのバンドは確認されなかったことから, このバンドを UGD 組換えタンパク質であると同定した.

UDP-Glc を基質, NAD^+ を補酵素とする反応液を LC-MS で分析した結果, MtUGD1-3 組換えタンパク質の反応物からは, UDP-GlcA 標準品と同じ m/z 579.1 および保持時間 0.74 分を示す単一のピークが検出された (図 4-4). このピークは, 空ベクターを導入した大腸菌の抽出液 (図 4-4 で Empty と示す) を添加した反応物からは検出されなかったことから, UDP-GlcA であると同定した. また, このピークは MtUGD2 組換えタンパク質反応物で最も大きく, MtUGD3 組換えタンパク質で最も小さかった (図 4-4).

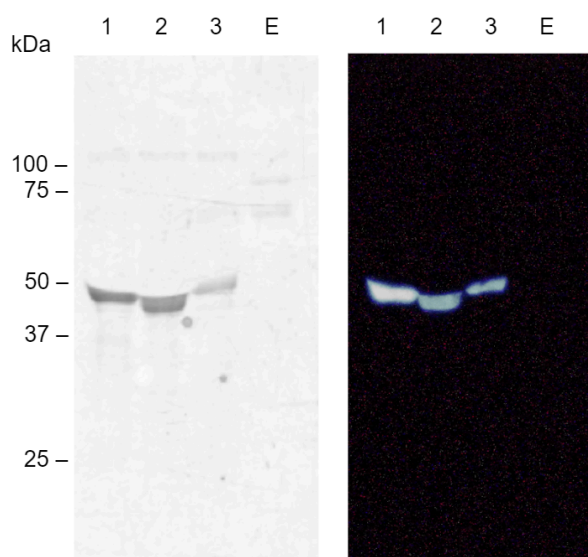


図 4-3 精製した MtUGD 組換えタンパク質の SDS-PAGE および ウェスタンブロッティング

左パネルは UV 染色した SDS-PAGE ゲルを示す. 右パネルは同じゲルから転写したウェスタンブロッティング膜に対して抗 His 抗体を用いて検出した結果を示す. UGD 組換えタンパク質は約 50 kDa として検出された. レーン 1-3: 精製した組換え MtUGD1-3 組換えタンパク質; E: empty (空ベクターを導入した大腸菌から, UGD 遺伝子を導入した大腸菌と同じ培養条件と精製プロセスで得られたタンパク質溶液).

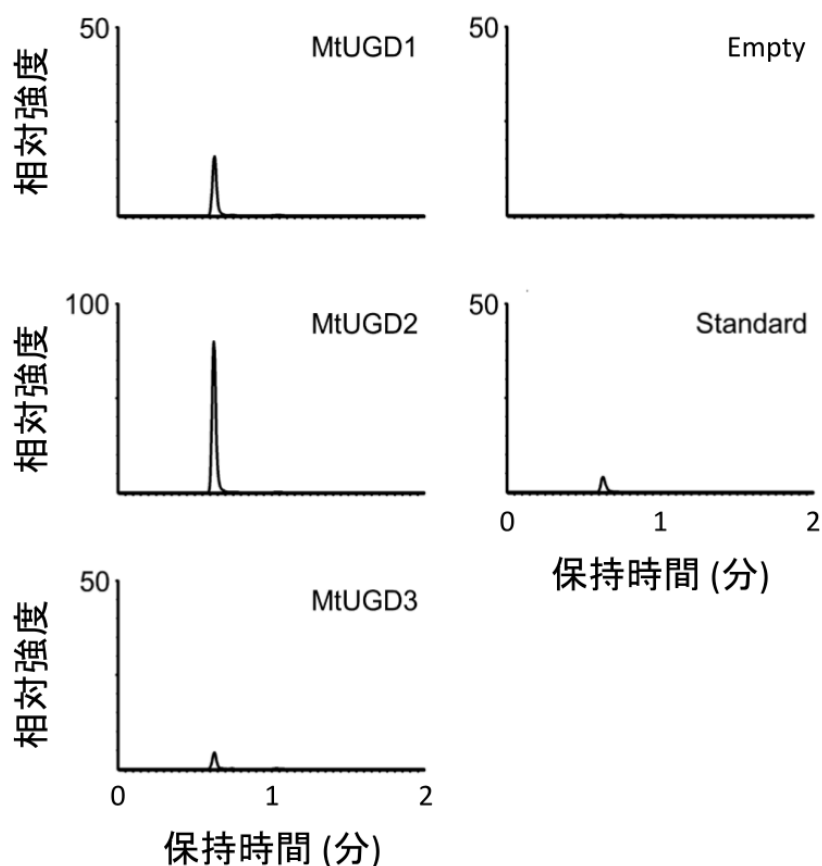


図 4-4 MtUGD 組換えタンパク質を用いた *in vitro* 酵素反応生成物の LC-MS クロマトグラム

LC-MS で検出された m/z 579.1 のピーク. MtUGD2 組換えタンパク質の反応物から検出されたピーク強度を 100% とする. Standard は, 標準試薬として用いた UDP-GlcA のピークを示す.

● UGD タンパク質のアミノ酸配列と酵素活性

○ アミノ酸配列のアライメント解析

GuUGD5 タンパク質と MtUGD3 タンパク質の酵素活性が, 他の GuUGD タンパク質や MtUGD タンパク質と比較して低い可能性が示唆されたため, GuUGD5 タンパク質と MtUGD3 タンパク質において, 酵素活性に影響するアミノ酸残基のバリエーションが存在するかを検証した. GuUGD1-5 タンパク質と MtUGD1-3 タンパク質を用いてアライメントを行ったところ, GuUGD5 タンパク質と MtUGD3 タンパク質には他の UGD タンパク質には見られない特異的なアミノ酸残基がいくつか共通して確認された (図 4-5 において黄色の背景で示す). 特に注目すべきは, 活性中心に位

置し, UDP-Glc と結合することで UGD 活性において重要な役割を果たすと考えられているアルギニン残基 (R) が, GuUGD5 タンパク質と MtUGD3 タンパク質ではリシン残基 (K) に置換されていたことである (図 4-5 において赤の枠で示す). このアルギニン残基は, これまでに機能同定されている全ての植物 UGD タンパク質において保存されていた (図 4-6). このバリエーションが GuUGD5 タンパク質と MtUGD3 タンパク質が属するクレード V の UGD タンパク質に共通の性質であるかを調べるために, クレード I-V に属する全ての UGD タンパク質を用いてアライメントを行った. その結果, クレード I-IV に属する UGD タンパク質ではいずれもアルギニン残基が保存されており, クレード V に属する UGD タンパク質ではいずれもリシン残基が保存されていた (図 4-7 において赤枠で示す). 加えて, クレード I-IV に属する UGD タンパク質では, このアルギニン残基の 4 つ上流にグリシン残基 (G), 3 つ上流にトレオニン残基 (T), 2 つ上流にアスパラギン酸残基 (D) が共通して保存されていた (図 4-7 (a)-(d) において黄色の枠で示す). 一方で, クレード V に属する UGD タンパク質では, リシン残基の 3 つ上流にリシン残基 (K), 2 つ上流にアスパラギン残基 (N) が共通して保存されていた (図 4-7 (e) において黄色の枠で示す). リシン残基の 4 つ上流は多くの植物種でセリン残基 (S) に置き換わっていたが, アズキ (*Vigna angularis*) とリョクトウ (*Vigna radiata* var. *radiata*) ではクレード I-IV の UGD タンパク質と同じグリシン残基 (G) が保存されていた. なお, UGD タンパク質においては, このほかにも酵素活性において重要なアミノ酸残基がいくつか報告されているが, これらの中にクレード V に属する UGD タンパク質に特異的なバリエーションは見られなかった.

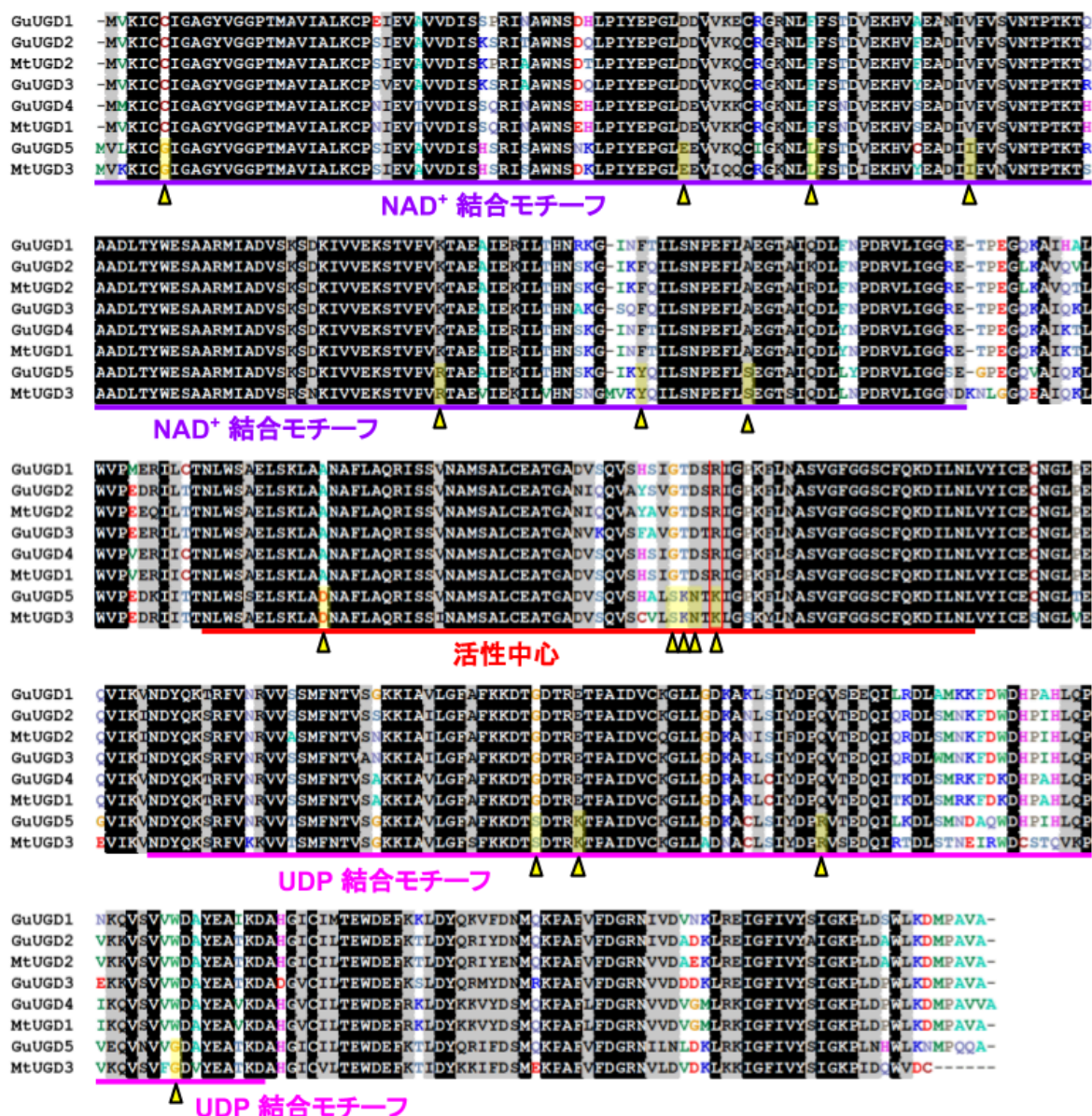


図 4-5 本研究においてクローニングされた UGD アミノ酸配列のアライメント

GuUGD1-5 タンパク質と MtUGD1-3 タンパク質のアミノ酸配列のアライメント結果を示す. 黄色の上向き矢印を付けた黄色背景のアミノ酸残基は GuUGD1-4 タンパク質と MtUGD 1-2 タンパク質では同一のアミノ酸が保存されており, かつ, GuUGD5 タンパク質と MtUGD3 タンパク質ではそれとは異なる特異的なアミノ酸が保存されている箇所を示す. 赤枠は中でも特に, 先行研究によって重要な役割を果たすと推定されているアルギニン残基 (R) とそのバリエーションにあたるリシン残基 (K) を示す.

<u>G.uralensis</u> UGD5	KNT K IGP
<u>G.uralensis</u> UGD1	TDSRIGP
<u>G.uralensis</u> UGD2	TDSRIGP
<u>G.uralensis</u> UGD3	TDTRIGP
<u>G.uralensis</u> UGD4	TDSRIGP
<u>A.thaliana</u> UGD1	TDTRIGP
<u>A.thaliana</u> UGD2	TDSRIGP
<u>A.thaliana</u> UGD3	KDSRIGP
<u>A.thaliana</u> UGD4	TDSRIGS
<u>E.grandis</u> UGD	KDSRIGP
<u>G.max</u> UGD	TDSRIGP
<u>P.tremula</u> x <u>P.tremuloides</u> UGD	KDSRIGP
<u>P.persica</u> UGD	KDTRIGP
<u>Z.mays</u> UGD-A	KDTRIGP
<u>Z.mays</u> UGD-B	KDTRIGP

図 4-6 GuUGD タンパク質と機能同定されている植物 UGD タンパク質のアライメントの一部抜粋

BioEdit の ClustalW を用いて, GuUGD1-5 タンパク質と先行研究で機能同定されている植物 UGD タンパク質のアミノ酸配列のアライメントを行い, そのうち UGD 活性において重要な役割を果たすことが報告されているアルギニン残基 (R) とその左右の合計 7 アミノ酸残基の配列を示す. 赤枠で囲ったアルギニン残基 (R) もしくはリシン残基 (K) は図 4-5 の赤枠と対応する. GuUGD5 タンパク質に特異的なアミノ酸残基を黄色の背景で示す.

(a)

***G. uralensis* UGD1**

A. duranensis XP_015965363

A. ipaensis XP 016202894

C. cajan XP 020206708

C. arietinum XP 004490146

G. max XP 003518763

G. max NP 001304614

G. soja KHN30001

L. japonicus AK339713

L. japonicus BT144983

L. angustifolius XP 019434827

L. angustifolius XP 019456146

L. angustifolius XP 019461259

M. truncatula XP 003614035

P. vulgaris XP 007153536

T. pratense PNX72466

T. subterraneum GAU50389

V. angularis XP 017436926

V. radiata XP 014492945

[illegible]

(b)

***G. uralensis* UGD2**

A. duranensis XP_015962704

A. ipaensis XP 016194343

C. cajan XP 020218809

C. arietinum XP 004491884

G. orientalis ADT91651

G. max NP 001238410

G. max XP_003552559

G. soja KHN17279

G. soja KHN13571

L. japonicus AK339764

L. angustifolius XP_019456316

M. truncatula XP 003621403

P. vulgaris XP 007139500

T. pratense PNX71811

T. subterraneum GAU19837

V. angularis XP 017418913

V. radiata XP 014498002

Q	U	A	Y	S	U	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	W	A	S	V
Q	U	S	F	A	U	G	T	D	T	R	I	G	P	K	F	L	W	A	S	V
Q	U	S	F	A	U	G	T	D	T	R	I	G	P	K	F	L	W	A	S	V
Q	U	S	Y	S	U	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	W	A	S	V
Q	U	A	Y	A	U	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	W	A	S	V
Q	U	A	Y	S	U	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	W	A	S	V
Q	U	S	Y	S	U	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	W	A	S	V
Q	U	S	Y	S	U	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	W	A	S	V
Q	U	S	Y	S	U	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	W	A	S	V
Q	U	S	Y	S	U	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	W	A	S	V
Q	U	A	Y	S	U	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	W	A	S	V
Q	U	A	Y	A	U	G	T	D	T	R	I	G	P	K	F	L	W	A	S	V
Q	U	S	H	S	I	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	S	A	S	V
Q	U	S	Y	S	U	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	W	A	S	V
Q	U	S	F	A	U	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	W	A	S	V
Q	U	S	F	A	U	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	W	A	S	V
Q	U	S	Y	S	U	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	W	A	S	V
Q	U	S	Y	S	U	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	W	A	S	V

(c)

***G. uralensis* UGD3**

A. duranensis XP_015946143
A. ipaensis XP_016180844
C. cajan XP_020222699
C. arietinum XP_004489453
G. max XP_003554799
G. max XP_003543940
G. soja KHN48813
G. soja KHN07144
L. angustifolius XP_019452969
L. angustifolius XP_019442730
P. vulgaris XP_007151298
T. pratense PNY08402
V. angularis XP_017440277
V. radiata XP_014515112
T. subterraneum GAU29150

Q	U	S	F	A	V	G	T	D	T	R	I	G	P	K	F	L	N	A	S	V
Q	U	S	F	A	V	G	T	D	T	R	I	G	P	K	F	L	N	A	S	V
Q	U	S	F	A	V	G	T	D	T	R	I	G	P	K	F	L	N	A	S	V
Q	U	S	Y	A	V	G	T	D	T	R	I	G	P	K	F	L	N	A	S	V
Q	U	S	Y	A	V	G	T	D	T	R	I	G	P	K	F	L	N	A	S	V
Q	U	S	Y	A	V	G	T	D	T	R	I	G	P	K	F	L	N	A	S	V
Q	U	S	Y	A	V	G	T	D	T	R	I	G	P	K	F	L	N	S	S	V
Q	U	S	Y	A	V	G	T	D	T	R	I	G	P	K	F	L	N	A	S	V
Q	U	S	Y	A	V	G	T	D	T	R	I	G	P	K	F	L	N	S	S	V
Q	U	S	F	A	V	G	T	D	T	R	I	G	P	K	F	L	N	A	S	V
Q	U	S	F	A	V	G	T	D	T	R	I	G	P	K	F	L	N	A	S	V
Q	U	S	Y	A	V	G	T	D	T	R	I	G	P	K	F	L	N	A	S	V
Q	U	S	Y	A	V	G	T	D	T	R	I	G	P	K	F	L	N	A	S	V
Q	U	T	Y	A	V	G	T	D	T	R	I	G	P	K	F	L	N	A	S	V
Q	U	S	Y	A	V	G	T	D	T	R	I	G	P	K	F	L	N	A	S	V
Q	U	S	Y	A	V	G	T	D	T	R	I	G	P	K	F	L	N	A	S	V

(d)

***G. uralensis* UGD4**

A. duranensis XP_020994926
A. ipaensis XP_016190890
C. cajan XP_020221450
C. arietinum XP_012572519
C. arietinum XP_004505368
L. angustifolius XP_019445907
L. angustifolius XP_019424489
M. truncatula XP_003607793
P. vulgaris XP_007157843
T. pratense PNY08180
T. subterraneum GAU47535
V. angularis XP_017423083
V. radiata XP_014507044

Q	U	S	H	S	I	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	S	A	S	V
Q	U	S	H	S	I	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	N	A	S	V
Q	U	S	H	S	I	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	N	A	S	V
Q	U	S	H	A	T	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	N	A	S	V
E	U	S	H	S	V	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	N	A	S	V
E	U	S	H	S	V	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	N	A	S	V
Q	U	S	H	S	I	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	S	A	S	V
Q	U	S	H	A	I	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	S	S	S	V
Q	U	A	Y	A	V	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	N	A	S	V
Q	U	S	H	S	I	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	N	S	S	V
E	U	S	H	S	I	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	N	A	S	V
E	U	S	H	S	I	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	N	A	S	V
Q	U	S	H	S	I	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	N	A	S	V
Q	U	S	H	S	I	G	T	D	S	R	I	G	P	K	F	L	N	A	S	V

(e)

<i>G. uralensis</i> UGD5	QVSHALSKNTKIGPKFLNASV
<i>G. max</i> XP_003525453	QVSHALSKNTKIGPKFLNASV
<i>G. soja</i> KHN48728	QVSHALSKNTKIGPKFLNASV
<i>G. max</i> XP_003549560	QVSHALSKNTKIGPKFLNASV
<i>G. soja</i> KHN18342	QVSHALSKNTKIGPKFLNASV
<i>C. cajan</i> XP_020228548	QVSHALSKNTKIGPKFLNASV
<i>P. vulgaris</i> XP_007155252	QVSLALSKNTKIGPKFLNASV
<i>V. angularis</i> XP_017423383	QVSLALGKNTKIGPKFLNASV
<i>V. radiata</i> XP_014507045	QVSLALGKNTKIGPKFLNASV
<i>L. angustifolius</i> XP_019451672	QLSDALSKNTKIGPKFLNASV
<i>A. duranensis</i> XP_015943274	QVSLALSKNPKIGPRFLNASV
<i>A. ipaensis</i> XP_016193330	QVSLALSKNPKIGPRFLNASV
<i>T. pratense</i> PNx73162	QVSCVL SKNTKL GSKYLNASV
<i>T. subterraneum</i> GAU24643	QVSCVL SKNTKL GSKYLNASV
<i>M. truncatula</i> XP_013457966	QVSCVL SKNTKL GSKYLNASV

図 4-7 クレード I-V に属す UGD タンパク質のアミノ酸配列のアライメントの一部抜粋

図の並び順は、ウラルカンゾウの UGD タンパク質の名順に従っており、上から (a) クレード I に属する UGD アミノ酸配列のアライメント、(b) クレード III に属する UGD アミノ酸配列のアライメント、(c) クレード IV に属する UGD アミノ酸配列のアライメント、(d) クレード II に属する UGD アミノ酸配列のアライメント、(e) クレード V に属する UGD アミノ酸配列のアライメントを示す。UGD 活性において重要な役割を果たすことが報告されているアルギニン残基 (R) もしくはそのバリエーションに当たるリシン残基 (K) を赤枠で囲み、その左右の合計 21 アミノ酸残基の配列を示す。また、図 4-5 において黄色背景で表示した GuUGD5 タンパク質と MtUGD3 タンパク質に特異的なアミノ酸残基に対応する配列を黄色の枠で示す。

○ GuUGD1-5 タンパク質の 3D モデルの解析

UGD 活性において重要な役割を果たしていると推定されているアルギニン残基や他のクレード V に特異的なアミノ酸残基が、GuUGD タンパク質において UDP-Glc や NAD^+ との相互作用に影響を与える可能性があるかを明らかにするために、GuUGD1-5 タンパク質の 3D モデルを構築した。GuUGD1-5 タンパク質のアミノ酸配列をクエリとして SWISS-MODEL において構造予測を行った結果、GuUGD2 タンパク質と GuUGD5 タンパク質はヒト UGD タンパク質ホモヘキサマーの結晶構造 (図 4-8; Beattie et al. 2018) をテンプレートとして構築された。GuUGD2 タンパ

ク質および GuUGD5 タンパク質とヒト UGD タンパク質の配列相同性を表 4-10 に示す. 一方, GuUGD1 タンパク質, GuUGD3 タンパク質, GuUGD4 タンパク質の 3D モデルはヒト UGD タンパク質をテンプレートとして構築されなかったため, GuUGD2 タンパク質の 3D モデルをテンプレートとして構築した.

図 4-9 にヒト UGD タンパク質の結晶構造と GuUGD1-5 タンパク質の 3D モデルの重ね合わせ解析の結果を示す. GuUGD1-5 タンパク質はヒト UGD タンパク質の結晶構造 (図 4-9 においてピンク色で示す) と全体的に良く重なっており, 構造が高度に保存されていることが確認された. GuUGD1-4 タンパク質のアルギニン残基 (R; Arg²⁵⁶) と比べて GuUGD5 タンパク質はリシン残基 (K; Lys²⁵⁷) となっていることで, 窒素原子が 1 つ減り, さらに UDP-Glc の酸素原子との間の距離が長くなっていた (図 4-9). このほかのクレード V に特異的なアミノ酸残基はいずれもタンパク質の表面に位置しており, 基質と近接する位置にあったのは GuUGD5 タンパク質のリシン残基 (K; Lys²⁵⁷) とその 3 つ上流のリシン残基 (K; Lys²⁵⁴) と 2 つ上流のアスパラギン残基 (N; Asn²⁵⁵) のみであった.

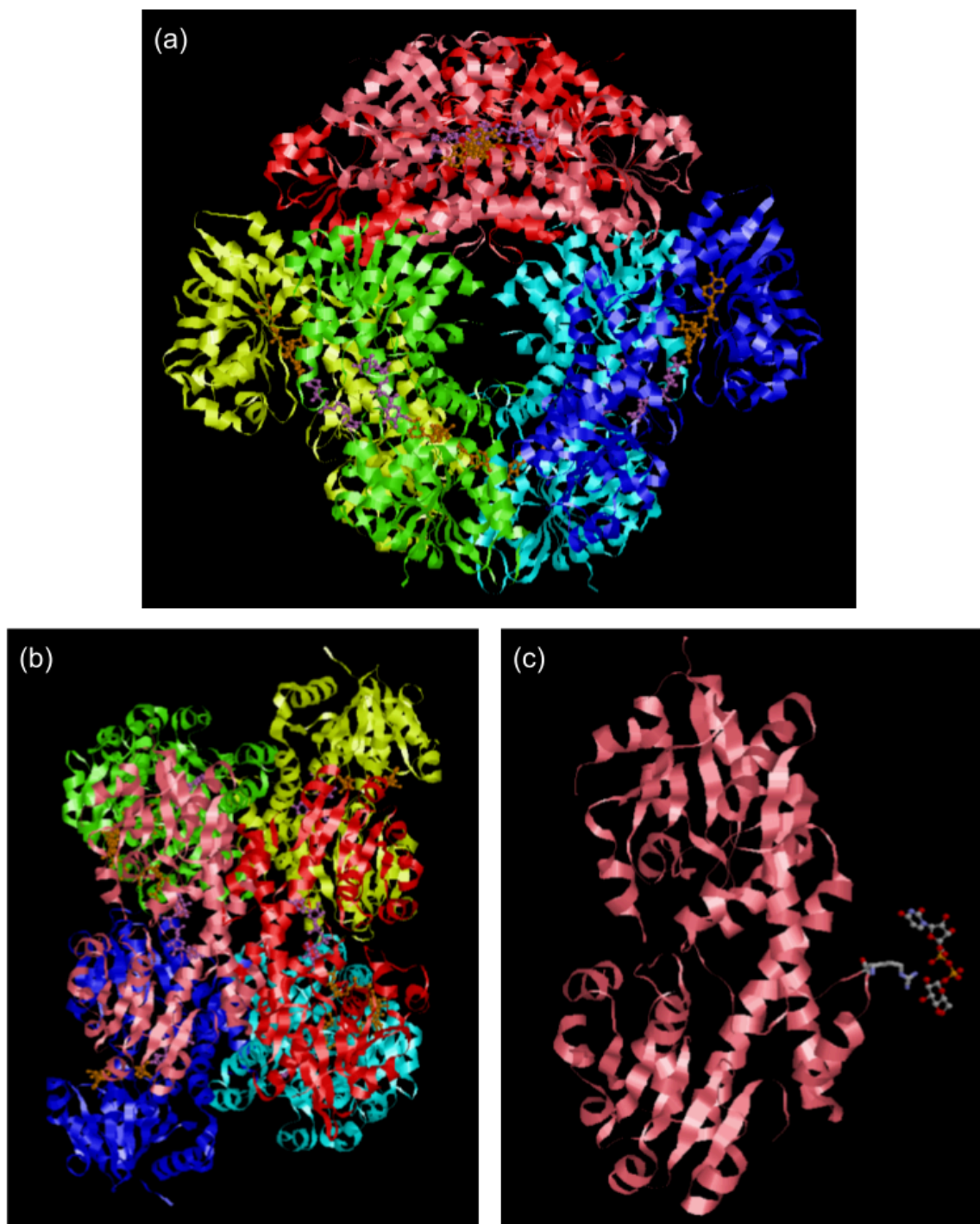


図 4-8 ヒト UGD タンパク質の 3D モデル

SWISS-MODEL において, GuUGD2 タンパク質と GuUGD5 タンパク質の 3D モデル構築のテンプレートとしたヒト UGD タンパク質ホモヘキサマー構造を示す. (a) を基準の向きとすると, (b) は上から見た図を示す. (a) と (b) では, UDP-Glc を紫色で, NAD^+ をオレンジ色で示す. (c) は (b) と同じアングルで見た UGD タンパク質のチェーン A とその近くに位置する UDP-Glc を示す. UDP-Glc と酵素活性において重要であると考えられているアルギニン残基 (ヒト UGD タンパク質では 260 番目に位

置する) を CPK 配色 (酸素, 窒素, 炭素, リンの原子をそれぞれ赤色, 青色, 灰色, オレンジ色) で示す. アルギニン残基はスティックで, UDP-Glc はボールとスティックで表示する.

表 4-10 ヒト UGD タンパク質の X 線結晶ホモヘキサマー構造と GuUGD タンパク質の相同性

Isoform	Template			Sequence				Quality	
	SMTL ID	Biounit Oligo State	Method	Seq identity (%)	Seq similarity	Range	Coverage	QSQE	GMQE
GuUGD2	6c4j.2	Homo-hexamer	X-ray, 2.53 Å	61.46	0.48	1-469	0.97	0.63	0.78
GuUGD5	6c4j.2	Homo-hexamer	X-ray, 2.53 Å	59.44	0.47	2-471	0.97	0.62	0.78

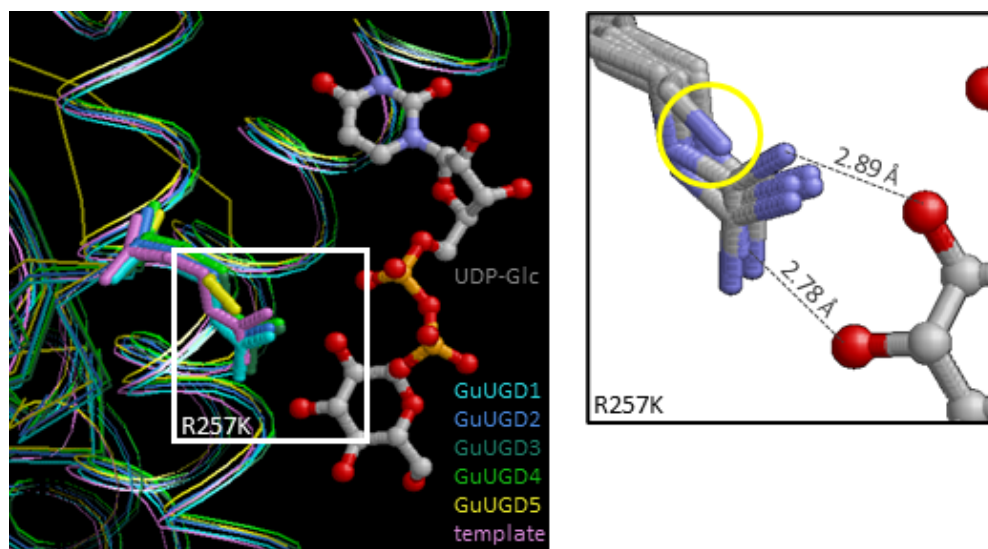


図 4-9 3D モデルの重ね合わせ解析

ヒト UGD タンパク質ホモヘキサマー構造をテンプレートとして, SWISS-MODEL を用いて構築した GuUGD タンパク質の 3D モデル. 左の図の白い四角で一部を囲んだアミノ酸残基は, クレード V に特異的なバリエーションが見られ, かつ, 先行研究において重要な役割を果たすと推定されているアルギニン残基 (GuUGD5 タンパク質ではリシン残基) を示す. 右の図は左の図の白枠部分の拡大図で, GuUGD5 タンパク質のリシン残基を黄色の丸で示している. UDP-Glc および右の図は CPK 配色 (酸素, 窒素, 炭素, リンの原子をそれぞれ赤色, 青色, 灰色, オレンジ色) で表示する. アルギニン残基とリ

シン残基はスティックで、UDP-Glc はボールとスティックで表示する。また、原子間の距離は基質 (UDP-Glc) とヒト UGD タンパク質の結晶構造 (template) との距離を示す。

○ アミノ酸変異を加えた GuUGD2 組換えタンパク質の酵素活性

3D モデル解析の結果において基質である UDP-Glc に比較的近い位置を占めていることが示されたクレード V に特異的なアミノ酸残基が UGD の酵素活性に影響を与えるかを調べるために、もっとも触媒定数の高かった GuUGD2 タンパク質 (表 2-12) のアミノ酸残基を GuUGD5 タンパク質で見られるアミノ酸残基に置き換えて活性試験を行った。なお、GuUGD5 タンパク質のアミノ酸残基を GuUGD2 タンパク質で見られるアミノ酸残基に置き換える実験も試みたが、タンパク質を十分な量調製することができなかったため試験を断念した。GuUGD2 変異タンパク質として、1 アミノ酸変異を加えた GuUGD2 V251L mutant, GuUGD2 G252S mutant, GuUGD2 T253K mutant, GuUGD2 D254N mutant, GuUGD2 S255T mutant, GuUGD2 R256K mutant と、これらすべてを変異させた GuUGD2 VGTDSR251–256LSKNTK mutant の合計 7 種類の変異タンパク質を作製した (UGD タンパク質の酵素活性において重要であると考えられているアルギニン残基は GuUGD2 タンパク質の 256 番に位置する)。図 4-10 に GuUGD2 アミノ酸変異タンパク質の SDS-PAGE の結果を示す。いずれの GuUGD2 アミノ酸変異タンパク質溶液においても、UGD 組換えタンパク質の予想される分子量と一致する約 50 kDa のバンドがそれぞれのレーンにおいて最も明瞭に観察された (図 4-10 左)。さらに、ウェスタンブロッティングを用いて組換えタンパク質に融合させた His タグを検出すると、同じ位置に同じ形のバンドが検出されたことから (図 4-10 右)、このバンドを GuUGD2 アミノ酸変異タンパク質であると同定した。

NADH 濃度の変化に伴う 340 nm での吸光度変化を測定して GuUGD2 アミノ酸変異タンパク質の酵素活性を評価した (図 4-11)。UGD 酵素活性において重要であると推定されているアルギニン残基に変異を加えた GuUGD2 R256K mutant 以外にも、GuUGD2 D254N mutant と GuUGD2 VGTDSR251–256LSKNTK mutant でも NADH の蓄積に伴う吸光度の変化が検出されなかった。また、GuUGD2 G252S mutant では、野生型の GuUGD2 WT と比較して反応速度が低下した。GuUGD2

V251L mutant, GuUGD2 S255T mutant の反応速度は, GuUGD2 WT の反応速度と有意差は見られなかった. 一方で, GuUGD2 T253K mutant は, GuUGD2 WT と比較して 1.5 倍速い反応速度を示した.

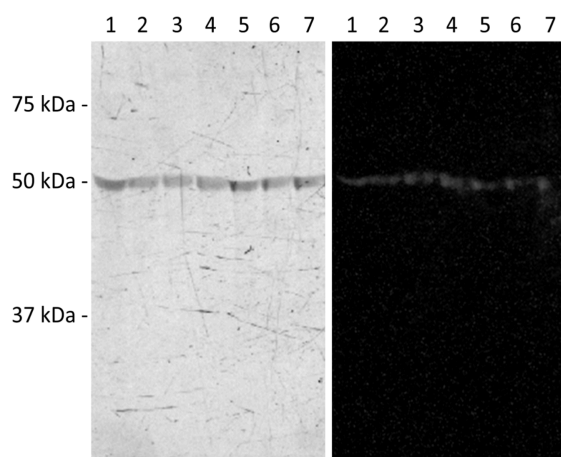


図 4-10 精製した GuUGD2 アミノ酸変異タンパク質の電気泳動

左パネルは UV 染色した SDS-PAGE ゲルを示す. 右パネルは同一ゲルから転写したウェスタンブロットティング膜で抗 His 検出した結果を示す. UGD 組換えタンパク質は約 50 kDa として検出された. レーン 1: GuUGD2-V251L mutant, 2: GuUGD2-G252S mutant, 3: GuUGD2-T253K mutant, 4: GuUGD2-D254N mutant, 5: GuUGD2-S255T mutant, 6: GuUGD2-R256K mutant, 7: GuUGD2-251-256 mutant.

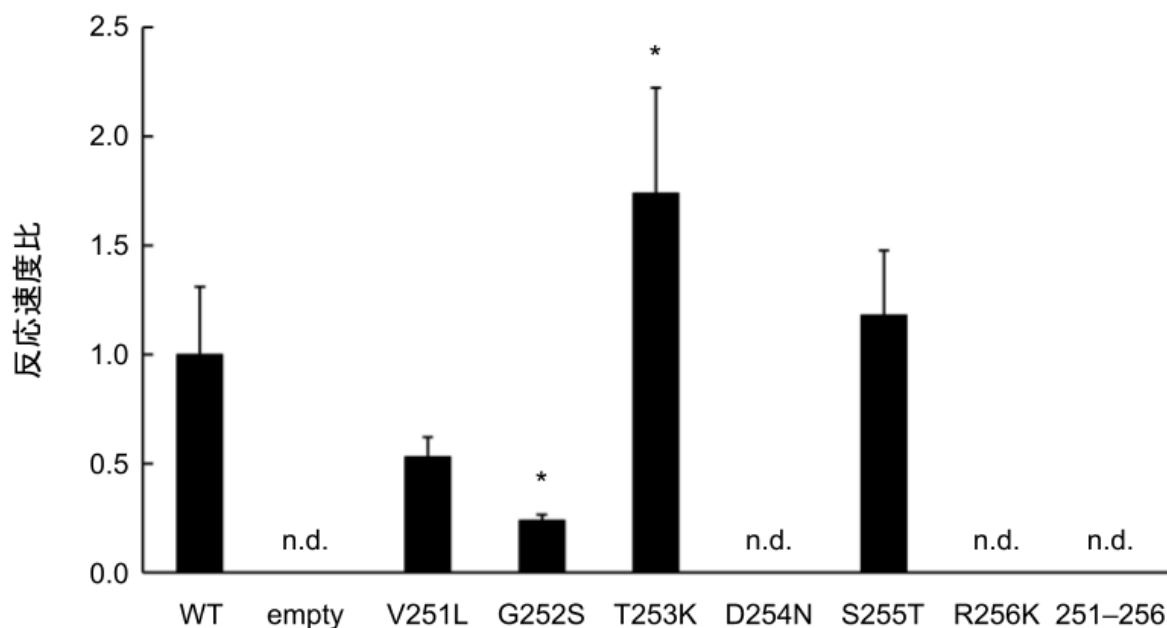


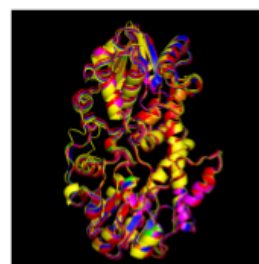
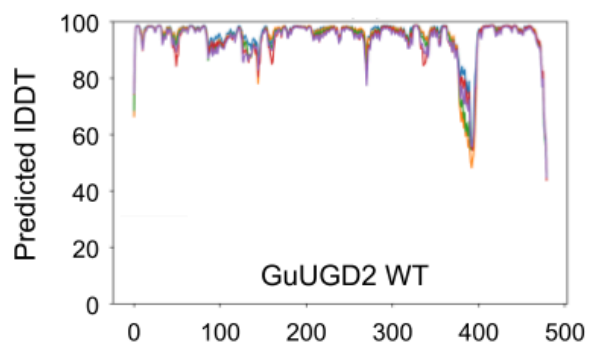
図 4-11 UGD アミノ酸変異タンパク質を用いた *in vitro* 酵素反応において検出された初速度

WT: 野生型の GuUGD2, empty: ネガティブコントロールとして用いた空ベクターを導入した大腸菌の抽出液, 251: GuUGD2 V251L mutant, 252: GuUGD2 G252S mutant, 253: GuUGD2 T253K mutant, 254: GuUGD2 D254N mutant, 255: GuUGD2 S255T mutant, 256: GuUGD2 R256K mutant, 251-256: GuUGD2 VGTDSR251-256LSKNTK mutant. n.d. は酵素反応に伴う波長 340 nm の吸光度の増加が検出されなかったことを示す. WT の反応速度を 1 とした. エラーバーは 3 つの精製酵素ロットの標準偏差を示す. アスタリスクは, WT とアミノ酸変異タンパク質の間の反応速度の有意差を示す. Dunnett 検定, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

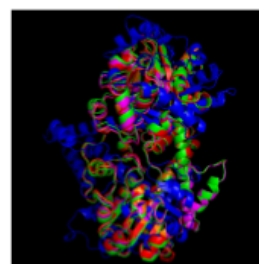
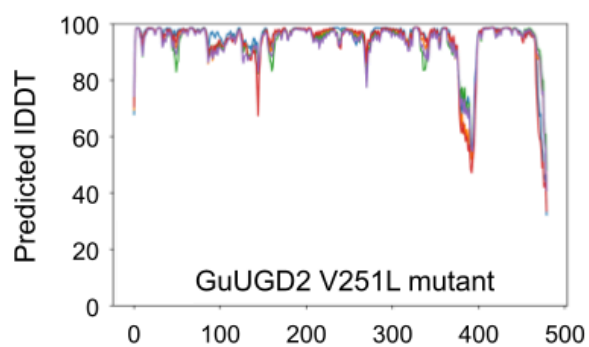
○ アミノ酸変異を加えた GuUGD2 タンパク質の 3D モデルの解析

251-256 番目のアミノ酸残基の変異が GuUGD2 のタンパク質構造にどのような変化をもたらすかを解析するために, AlphaFold2 を用いて GuUGD2 アミノ酸変異タンパク質の 3D モデルを構築した. 野生型 GuUGD2 タンパク質の 3D モデルとそれぞれの変異型 GuUGD2 タンパク質の 3D モデルの構造と精度を図 4-12 に示す. いずれの 3D モデルも IDDT 値は全体的に大きく, 高い精度でモデリングされた (図 4-12 左). また, AlphaFold2 で構築された GuUGD2 WT の 3D モデル rank_1-5 (図 4-12 右; rank_1, rank_2, rank_3, rank_4, rank_5 をそれぞれ青, オレンジ, 緑, 赤, 赤

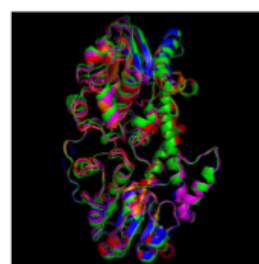
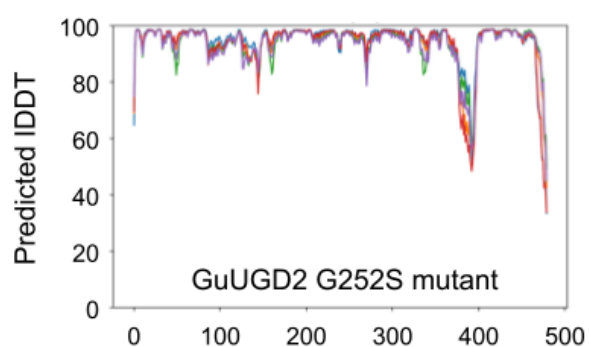
紫色で示す) はいずれも SWISS-MODEL によってホモロジーをもとに構築された 3D モデル (図 4-12 右; 黄色で示す) と良く重なった. 一方で, GuUGD2 V251L mutant, GuUGD2 T253K mutant, GuUGD2 R256K mutant の rank_1 は rank_2-5 と, GuUGD2 VGTDSR251-256LSKNTK mutant の rank_1 と rank_5 は rank_2-4 と重なり度合いの低い構造として構築された (図 4-12 右). そこで, GuUGD2 WT, GuUGD2 G252S mutant, GuUGD2 D254N mutant, GuUGD2 S255T mutant は AlphaFold2 で予測された rank_1 のモデルを, GuUGD2 V251L mutant, GuUGD2 T253K mutant, GuUGD2 R256K mutant, GuUGD2 VGTDSR251-256LSKNTK mutant は AlphaFold2 で予測された rank_2 のモデルを用いて, 重ね合わせ解析を行った (図 4-13). アルギニン残基からリシン残基への変異では (GuUGD2 R256K mutant), 基質である UDP-Glc と相互作用が予測される窒素原子の数が減り, 位置も大きく変化することが確認された. また, アスパラギン酸残基がアスパラギン残基に変異していることで (GuUGD2 D254N mutant), アルギニン残基 (Arg²⁵⁶) の窒素原子の近くに位置していた酸素原子が 1 つ減り, 代わりに窒素原子が 1 つ増えていた. 一方で, 活性の低下が見られたセリン残基 (S; Ser²⁵²) と, 活性の上昇が見られたリシン残基 (K; Lys²⁵³) は, どちらも UDP-Glc からは遠くに位置しており, UDP-Glc の周辺に大きな変化は見られなかった.



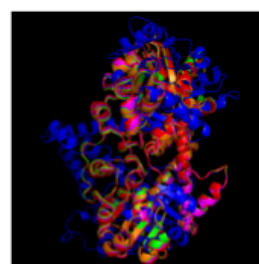
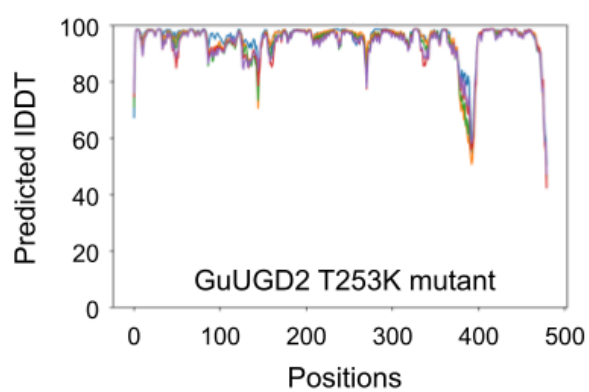
GuUGD2 WT



GuUGD2 V251L mutant



GuUGD2 G252S mutant



GuUGD2 T253K mutant

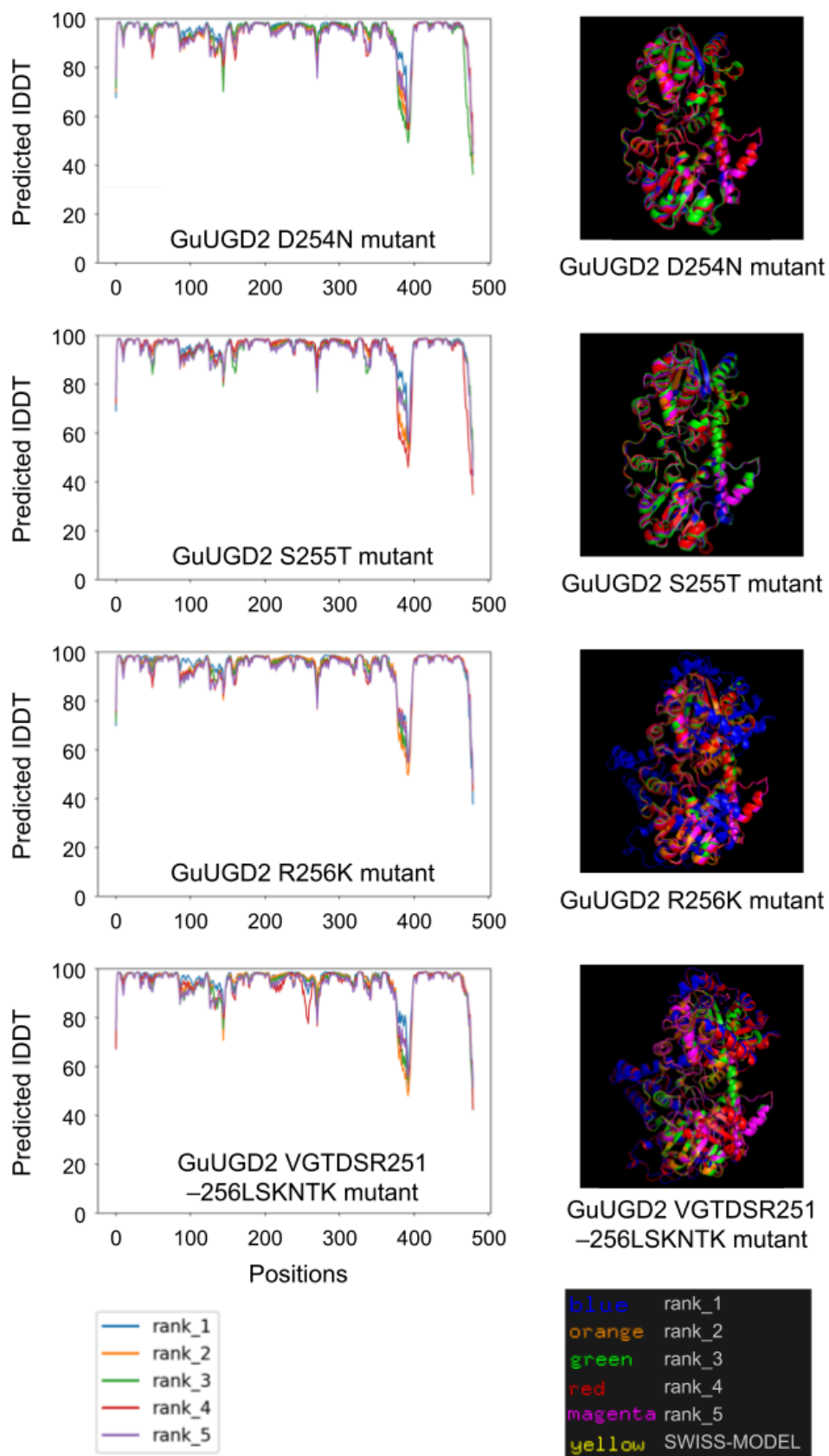


図 4-12 AlphaFold2 で予測された GuUGD2 タンパク質 3D モデルの精度

左にアミノ酸残基の位置ごとに推測される IDDT (The Local Distance Difference Test) を, 右に rank_1-5 の 3D モデルの重ね合わせの結果を示す. また, GuUGD2 WT については, 図 4-9 で描画した SWISS-MODEL によってホモロジーをもとに構築された 3D モデルの chain A も重ね合わせて示す (yellow). IDDT の値が高いほど精度が良いことを示す.

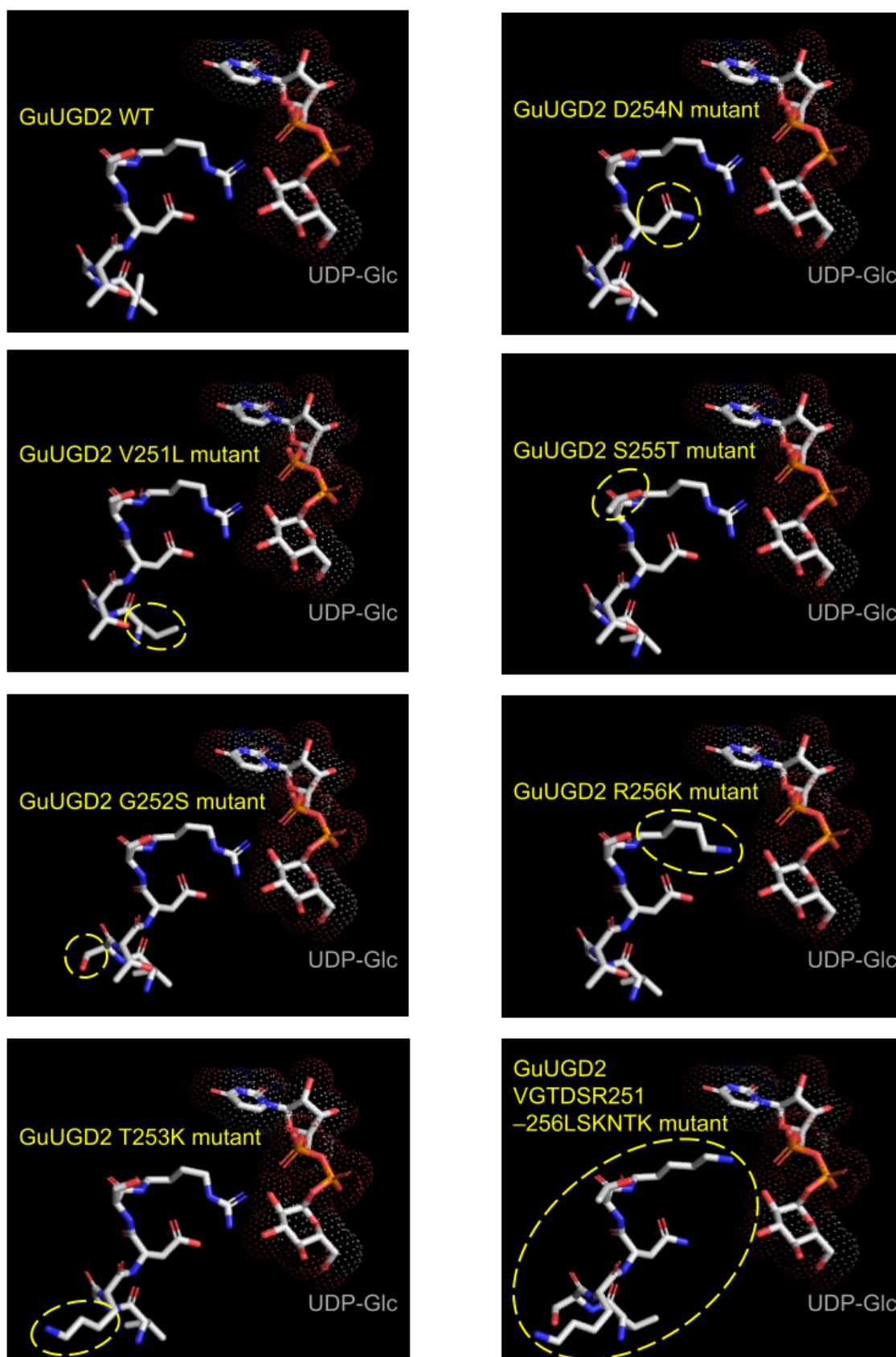


図 4-13 野生型 GuUGD2 タンパク質および GuUGD2 アミノ酸変異タンパク質の 3D モデル

野生型の GuUGD2 タンパク質と GuUGD2 アミノ酸変異タンパク質の 251–256 番目のアミノ酸残基をスティックで、UDP-Glc をドットとスティックで示す。また、炭素、酸素、窒素、リンの原子はそれぞれ灰色、赤色、青色、オレンジ色で示す。変異を加えたアミノ酸残基の位置を点線で示す。UDP-Glc はヒト UGD タンパク質の結晶構造に組み込まれている構造を重ね合わせて表示している。GuUGD2 WT, GuUGD2 G252S mutant, GuUGD2 D254N mutant, GuUGD2 S255T mutant は AlphaFold2 で予測された rank_1 のモデルを、GuUGD2 V251L mutant, GuUGD2 T253K mutant, GuUGD2 R256K mutant, GuUGD2 VGTDSR251–256LSKNTK mutant は AlphaFold2 で予測された rank_2 のモデルを示す。

4.4 考察

● UGD タンパク質の系統解析

第 2 章で GuUGD5 組換えタンパク質の酵素活性が検出されなかったことを受けて、植物における UGD 遺伝子の進化的背景を明らかにすることを目的とした。まず、GuUGD1–5 タンパク質をクエリとする相同性検索により、NCBI の GenBank に登録されている植物の推定 UGD タンパク質を幅広く抽出した。その結果、多くの植物が複数の推定 UGD アイソフォームを有していることが明らかになった (表 4-4)。次に、これらのアミノ酸配列を用いて系統樹解析を行った結果、GuUGD タンパク質はマメ科植物の UGD タンパク質と共に 5 つのクレードに分類された (図 4-1)。マメ科植物のほとんどがクレード I–V に属する UGD タンパク質をそれぞれ 1 分子種ずつ有しており、クレードごとに特有のシンテニーが観察されたことから、マメ科植物の共通祖先ではすでに UGD タンパク質が 5 分子種に分岐していたことが示唆された。なお、ひとつのクレードに 2 分子種が属しているマメ科植物や、特定のクレードに属する UGD タンパク質を欠くマメ科植物は、植物種の分化時に遺伝子重複や喪失が起こったのではないかと考えられる。また、系統樹では単子葉類といくつかの真正双子葉類の UGD タンパク質が分岐したあとに、真正双子葉類の UGD タンパク質のみからなるクレード (クレード A–C) が形成されていた。このことから、真正双子葉類の分化後に UGD タンパク質が 3 分子種に分化したことが示唆された。加えて、クレード I とクレード II はクレード A の共通祖先、クレード III とクレード IV はクレード B の共通祖先からマメ科の分化時に派生した近縁種であり、クレード V はクレード C の共通祖先から派生したことが示唆された。

これまでに行われた UGD タンパク質の系統樹解析は、極めて少ない植物種しか用いておらず (Klinghammer and Tenhaken 2007; Tian et al. 2014), 植物の UGD アイソフォームの数や分化の時期は未解明な点が多かった。本研究は多数の植物種の推定 UGD タンパク質を用いて系統樹解析を行った初めての報告であり、植物 UGD アイソフォームに関する基盤的な情報を提供するものである。系統樹解析に用いた UGD タンパク質は高い相同性を保持しており、酵素活性が確認されている UGD タンパク質は系統樹上で散在していたことから、GenBank から抽出された推定 UGD タンパク質は UGD 活性を保持している可能性が高いと考えられる。しかし、酵素活性が確認されている UGD タンパク質は少なく、特に第 2 章で酵素活性を確認できなかった GuUGD5 タンパク質が属するクレード V の推定 UGD タンパク質の酵素活性については実験的な検証が必要である。

クレード間で UGD タンパク質の生理学的な特性の差異があるかを検討するために、データベースが公開されている複数のマメ科において、クレードごとに特定の UGD 遺伝子の転写パターンが見られないか確認した。GenBank に登録されている推定 UGD 遺伝子の数とそれぞれのマメ科のデータベースに登録されている推定 UGD 遺伝子の数 (表 4-5, 表 4-7) が一致しない理由は、データの出所となった個体の違いや、実験手法の違いによるものと思われる。本解析に用いたデータは、ウラルカンゾウが FPKM, ダイズが RPKM, タルウマゴヤシとミヤコグサがマイクロアレイの正規化された転写量であり、植物種によってデータの種類が異なるため、植物間で UGD 遺伝子の転写量の比較を行うことは適切ではないが、植物内で UGD 遺伝子間の転写量を比較することは可能である。その結果、いずれの植物においても最も転写量が多い遺伝子は、クレード III に属する UGD タンパク質に最も同一性の高いアミノ酸配列をコードする遺伝子であることが明らかになった (図 4-2)。また、クレード IV とクレード V に属する UGD タンパク質に最も同一性の高いアミノ酸配列をコードする遺伝子は、どの植物種においても比較的転写量が少ないことが明らかになった。これらの結果は、クレードごとに UGD タンパク質の生理学的な特性が保存されている可能性があることを示唆している。しかし、転写量と生理学的な機能の間には大きな隔たりがあるため、クレードごとに生理学的な特性があるかを明らかにするためには、2005 年に Kärkönen らが UGD 遺伝子変異トウモロコシを用いて行った代謝物の解析のような、さらなる実験を複数のマメ科において行う必要がある。

第 3 章において、ソヤサポニンやグリチルリチンの生合成に特化した GuUGD アイソフォームは存在しないことが示唆された。特にグリチルリチンは、カンゾウ属に特有の植物特化代謝物であり、マメ科が誕生した時点ではその生合成経路はまだ確立していなかったと考えられる。本章において、UGD がマメ科の共通祖先において既に 5 分子種存在していたこと、同じクレードの UGD アイソフォームをコードするマメ科 *UGD* 遺伝子の発現パターンが類似していることが示唆されたことから、カンゾウ属が誕生したときにグリチルリチン生合成に適応した UGD 分子種が新たに誕生したのではなく、マメ科共通祖先から受け継がれた UGD がそのまま利用された可能性が高いと推測される。

● GuUGD と同じクレードに属する推定 UGD タンパク質の機能解析

ウラルカンゾウの UGD タンパク質と同じクレードに属する UGD 分子種が UGD 活性を有するかを調べるために、マメ科植物の *UGD* 遺伝子の機能同定を試みた。タルウマゴヤシ、ダイズ、ミヤコグサから *UGD* 遺伝子の単離を試みたが、ダイズとミヤコグサでは遺伝子をコードしない DNA 断片が多数 PCR 増幅され、*UGD* 遺伝子の単離が困難であったため、これらの種では *UGD* 遺伝子の単離を断念し、タルウマゴヤシのみ *UGD* 遺伝子の解析を行った。タルウマゴヤシからは、GenBank に登録されている 4 種類の推定 UGD タンパク質のうちの 3 種類に対応する遺伝子配列が単離された。MtUGD1 タンパク質は GuUGD4 タンパク質と、MtUGD2 タンパク質は GuUGD2 タンパク質と、MtUGD3 タンパク質は GuUGD5 タンパク質と最も同一性が高く (表 4-9)、それぞれクレード II、クレード III、クレード V に属した。MtUGD1-3 組換えタンパク質の酵素反応生成物の LC-MS 分析において UDP-GlcA が検出されたことから、MtUGD1-3 組換えタンパク質は UGD 酵素活性を有していることが示された (図 4-4)。また、MtUGD3 組換えタンパク質で検出された UDP-GlcA のピークは他の MtUGD 組換えタンパク質で検出されたピークより小さかったことから、MtUGD3 タンパク質は MtUGD1 タンパク質と MtUGD2 タンパク質に比べて酵素活性が低い可能性があると考えられる。これらの結果は、クレード V に属する UGD タンパク質の中にも酵素活性を持つ UGD タンパク質が存在することを明らかにした一方で、クレード V に属する UGD タンパク質には酵素活性が低くな

るようなアミノ酸残基が特異的に保存されている可能性を示唆している。しかし、MtUGD1-3 組換えタンパク質については、速度論的パラメータの解析を行っていないため、MtUGD3 タンパク質の酵素活性が他の MtUGD タンパク質より低いかはさらなる検証が必要である。また、クレード V に属する UGD タンパク質に特異的なアミノ酸配列が酵素活性に影響を与えているかについても検証が必要である。

● 酵素活性において重要なアミノ酸残基の探索

UGD タンパク質の酵素活性に影響を与えるアミノ酸残基を特定することを目的とした。まず初めに、酵素活性の低かった GuUGD5 タンパク質と MtUGD3 タンパク質に特異的なアミノ酸残基がないかを調べるために GuUGD1-5 タンパク質と MtUGD1-3 タンパク質のアライメント解析を行ったところ、酵素活性に重要な役割を果たすと予測されているアルギニン残基 (Campbell et al. 2000; Egger et al. 2011) を含む、いくつかのアミノ酸残基が共通して別のアミノ酸残基に置き換わっていることが明らかになった (図 4-5)。このアルギニン残基 (R) は先行研究において酵素活性が確認されている植物の UGD タンパク質では共通して保存されていたことから (図 4-6)、このバリエーションは GuUGD5 タンパク質や MtUGD3 タンパク質の酵素活性に影響を与えている可能性が高いと考えられる。さらに、このアミノ酸残基のバリエーションがクレードに共通の性質であるかを調べるために、クレード I-V に属する UGD タンパク質を用いてアライメント解析を行ったところ、クレード I-IV に属する UGD タンパク質ではアルギニン残基 (R) が保存されており、クレード V に属する UGD タンパク質ではリシン残基 (K) が保存されていることが明らかになった (図 4-7)。さらに、クレード I-IV に属する UGD タンパク質では、このアルギニン残基の 3 つ上流にあるトレオニン残基 (T) と 2 つ上流にあるアスパラギン酸残基 (D) が保存されている一方で、クレード V に属する UGD タンパク質では、アルギニン残基とトレオニン残基がリシン残基 (K) に、アスパラギン酸残基がアスパラギン残基 (N) に共通して置き換わっていることが明らかになった (図 4-7)。

これらのアミノ酸残基が酵素活性に影響を与える可能性があるかを調べるために、GuUGD1-5 タンパク質の 3D モデルを解析した。シロイヌナズナの UGD タンパク質はヘキサマーとして働くことが報告されている (Oka and Jigami 2006)。

SWISS-MODEL では植物 UGD タンパク質のテンプレート候補は提示されなかったため、基質である UDP-Glc と補酵素である NAD^+ との結合情報が含まれているヒト UGD タンパク質ホモヘキサマーの結晶構造をテンプレートとして GuUGD2 タンパク質と GuUGD5 タンパク質の 3D モデルを構築した。その他の GuUGD タンパク質の 3D モデルは GuUGD2 タンパク質をテンプレートとして構築した。酵素活性において重要であると考えられているアルギニン残基およびクレード V に属する UGD タンパク質に特有のリシン残基は、GuUGD1-5 タンパク質では UDP-Glc 近傍に位置することが予測された (図 4-9)。また、GuUGD5 タンパク質では、アルギニン残基からリシン残基への置き換わっていることで、UDP-Glc の酸素原子との水素結合が予測される窒素原子の数が減り、原子間距離が長くなっていることが予測された。この差異は、GuUGD5 タンパク質と UDP-Glc の相互作用を弱め、結果的に UDP-Glc への親和性や酵素活性を低下させている可能性があると考えられる。

● 酵素活性において重要なアミノ酸残基の特定

クレード V に特異的なアミノ酸残基が UGD タンパク質の酵素活性に影響を与えているかを調べるために、GuUGD2 タンパク質の 251-256 番目のアミノ酸残基に変異を加えて酵素活性試験を行った。本活性試験では、タンパク質の調製と反応測定に伴う誤差が生じることが予想されたため、それぞれ 3 ロットずつ精製タンパク質を調製して試験を行った。その結果、GuUGD2 タンパク質のグリシン残基 (G; Gly²⁵²), アスパラギン酸残基 (D; Asp²⁵⁴), アルギニン残基 (R; Arg²⁵⁶) を GuUGD5 タンパク質で見られるアミノ酸残基に変異させたタンパク質 (GuUGD2 G252S mutant, GuUGD2 D254N mutant, GuUGD2 R256K mutant) において酵素活性の低下が見られた (図 4-11)。このことから、これら 3 つのアミノ酸残基が UGD 活性の維持において重要であることが示された。一方、トレオニン残基 (T; Thr²⁵³) をクレード V に特有のリシン残基 (K; Lys²⁵³) に置換した GuUGD2 T253K mutant では酵素活性が高くなることが示された (図 4-11)。アルギニン残基については、ヒトの UGD タンパク質 (*Homo sapiens*; Arg²⁶⁰; Egger et al. 2011) と化膿性レンサ球菌の UGD タンパク質 (*Streptococcus pyogenes*; Arg²⁴⁴; Campbell et al. 2000) において UDP-Glc の C-2 と C-3 の水酸基と水素結合をすることが報告されている。本研究では、このアルギニン

残基のほかに、その 4 つ上流のグリシン残基と 2 つ上流のアスパラギン酸残基も UGD タンパク質の酵素活性において重要であることと、3 つ上流にあるトレオニン残基をリシン残基へ置き換えることで酵素活性が向上することを新たに明らかにした。これらのアミノ酸残基は、アスパラギン酸残基を除いて化膿性レンサ球菌では保存されておらず (Campbell et al. 2000), マメ科植物の UGD タンパク質に特異的なアミノ酸残基と酵素活性の関係性であると考えられる。アスパラギン残基 (N) とリシン残基 (K) はクレード V に属する UGD タンパク質だけに共通して保存されていることから (図 4-7), クレード V に属する UGD タンパク質はいずれも酵素活性が低い可能性があると考えられる。クレード V に属する UGD タンパク質をコードする遺伝子は、転写レベルが低いという特性を持つ可能性もあるため (図 4-2), クレード V に属する UGD タンパク質は植物の生体においてはあまり機能していないアイソフォームである可能性が示唆される。アイソフォームの生体における機能について検証するためには、UGD 遺伝子変異植物の解析を行う必要がある。トレオニン残基はクレード I-IV に属する UGD タンパク質に共通して保存されていることから、GuUGD2 タンパク質以外の植物 UGD タンパク質においても、同様の変異を加えることで酵素活性が高くなる可能性があると考えられる。

アミノ酸の変異が GuUGD2 のタンパク質構造に与える影響を解析するために、AlphaFold2 を用いて GuUGD2 WT タンパク質と GuUGD2 アミノ酸変異タンパク質の 3D モデルを構築した。AlphaFold2 を用いて構築した GuUGD2 WT タンパク質の 3D モデルと SWISS-MODEL を用いて構築した 3D モデルは構造全体が良く重なっていたことから (図 4-12), どちらの方法で予測されたモデルも比較的信頼性が高いと考えられる。UGD タンパク質は、多くの生物種が保有しているため相同なタンパク質の数が多く、結晶構造が解析されているものもあり、さらに互いに相同性が高いことから、どちらの方法でも比較的精度よくモデリングしやすいタンパク質であると考えられる。なお、図は割愛するが、GuUGD1 タンパク質、GuUGD3-5 タンパク質も AlphaFold2 と SWISS-MODEL で予測された 3D モデルが全体的に良く重なっており、同様の構造が予測された (ただし、AlphaFold2 で予測された GuUGD1, GuUGD4, GuUGD5 タンパク質の 3D モデル rank_1 は、rank_2-5 および SWISS-MODEL で構築された 3D モデルとは重なり度合いが低かった)。AlphaFold2 を用いて構築した GuUGD2 アミノ酸変異タンパク質の 3D モデルも GuUGD2 WT と同様の構造で構

築された。ただし, GuUGD2 V251L mutant, GuUGD2 T253K mutant, GuUGD2 R256K mutant, GuUGD2 VGTDSR251-256LSKNTK mutant の AlphaFold2 で予測された 3D モデル rank_1 は他の rank のモデルとは重なり度合いが低かったため (図 4-12), 重ね合わせ解析では rank_2 の 3D モデルを使用した。GuUGD2 アミノ酸変異タンパク質の 3D モデルと GuUGD2 WT の 3D モデルの重ね解析を行った結果, GuUGD2 R256K mutant は GuUGD5 タンパク質での予測 (図 4-9) と同様に, UDP-Glc との相互作用が弱まっている可能性が示唆された (図 4-13)。また, GuUGD2 D254N mutant では, 酸素原子が窒素原子に置き換わったことで, 近傍にあるアルギニン残基 (Arg²⁵⁶) の位置が変化して UDP-Glc との親和性が低下しているのではないかと考えられる (図 4-13)。酵素活性の低下が見られた GuUGD2 G252S mutant と, 活性の上昇が見られた GuUGD T253K mutant は (図 4-11), 変異を加えたアミノ酸残基が UDP-Glc とは遠い位置に存在していたことから (図 4-13), 基質や補酵素と直接相互作用するのではなく, タンパク質の立体構造に変化を引き起こすことで, 酵素活性部位の位置がわずかに変化し, 結果として酵素活性が変化しているのではないかと考えられる。本研究では, 得られた GuUGD2 アミノ酸変異タンパク質の量が少なかったため, 速度パラメータの測定は行わなかったが, これらの仮説を検証するためには, 変異タンパク質の速度論的パラメータの測定や, 基質との結合距離のような構造的なパラメータの測定など, より詳細な解析が必要である。

本研究では, UGD タンパク質の生化学的特性に着目してアミノ酸配列を比較することで, UGD タンパク質の酵素活性において重要なアミノ酸残基を新しく同定することに成功した。この中には, 基質とは直接作用しない位置に存在するアミノ酸残基も含まれていた (図 4-13)。このように, アイソフォームの比較という手法は, 従来のランダムな変異体の作製や結晶構造の解析といった手法と並び, 酵素活性において重要なアミノ酸残基を特定するための有効な手法であると考えられる。本研究では酵素活性を高める変異が 1 つ示唆されたが, 今後さらに UGD タンパク質の構造と酵素活性に対する知見が蓄積すれば, これらの情報をもとにアミノ酸をデザインすることで, 触媒定数と基質親和性の高い UGD タンパク質を創出し, より効率的な酵素反応が可能になると考えられる。

第 5 章 酵母発現系を用いたグリチルリチン生産の評価

5.1 緒言

一般に植物は成長にかかる時間が長く、例えばウラルカンゾウは生薬として認められる量のグリチルリチンを蓄積するのに数年を要することが知られている。このような植物の産生する有用な植物特化代謝物を活用するために、異種宿主に生合成プロセスを再構築して人工的に植物特化代謝物を生産する方法が開発されている。異種宿主には、植物よりも増殖速度が速く、培養環境も比較的安価に用意でき、より大量培養に適した微生物が選択されることも多い (Atanasov et al. 2015)。ただし、宿主が産生する代謝物を起点として植物特化代謝物の生合成プロセスを再構築するためには、目標とする植物特化代謝物の合成を触媒する酵素とそれをコードする遺伝子をすべて把握していることが条件となる (Wang et al. 2011)。一方で、生化学的に最適化された酵素を組み合わせることで、生産性や安定性を向上させることができるという利点もある。

一般的に用いられる宿主である出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は *UGD* 遺伝子を持たないため、グリチルリチンのようなグルクロニドを生産する場合には、*UGD* 遺伝子を導入して発現させる必要がある。*UGD* 遺伝子を導入した出芽酵母が UDP-GlcA を生産できることはすでに確認されており、シロイヌナズナの *AtUGDI* 遺伝子を発現させた出芽酵母では、 $5.7 \mu\text{mol g}^{-1}$ (dry weight) の UDP-GlcA が蓄積したと報告されている (Oka and Jigami 2006)。この先行研究では同時に、基質である UDP-Glc プールの量が *UGD* 遺伝子を発現させていない株の約半分の $1.2 \mu\text{mol g}^{-1}$ (dry weight) にまで低下したことも報告されている。したがって、触媒定数の大きい *UGD* アイソフォームの遺伝子を出芽酵母に導入することでより短時間に植物特化代謝物を生産できる可能性があるのに加えて、基質に対する親和性の高い *UGD* アイソフォームを用いることでより少ない基質量でも反応を進行させられる可能性もあるのではないかと考えられる。そこで本章では、第 2 章の GuUGD 速度論的パラメータ解析において最も大きな触媒定数を示したウラルカンゾウの GuUGD2 組換えタンパク質と、最も高い基質親和性を示した GuUGD4 組換えタンパク質、および、コントロールとしてシロイヌナズナの *AtUGD2* 組換えタンパク質を用いて、酵母発現系に

におけるグリチルリチン蓄積量を比較し、UGD タンパク質の生化学的特性がプロダクトの生産量に与える影響を解析した。

5.2 実験方法

● 酵母発現系の構築

GuUGD2 遺伝子または *GuUGD4* 遺伝子をプライマー 72–75 (表 5-1) を用いて PCR 増幅し、遺伝子の両端に *SpeI* と *EcoRI* 制限酵素サイトを挿入した。これを、*SpeI* と *EcoRI* 制限酵素と In-Fusion HD cloning kit (タカラバイオ) を用いて、酵母用発現ベクターである pESC-HIS ベクター (Agilent Technologies) の *SpeI* と *EcoRI* 制限酵素サイトへ挿入した。プラスミドは、Frozen-EZ Yeast Transformation II™ (ZYMO RESEARCH, アメリカ合衆国 カリフォルニア州 アーバイン) を用いて、コンピテントセル化された *UGD* 遺伝子以外のグリチルリチン合成酵素遺伝子が導入されている *S. cerevisiae* INVScI (pYES3 [*AtADH1/LjbAS*], pESC-LEU [*GAL10/LjCPR*; *GAL1/GuCYP88D6*], pESC-URA [*GAL10/MtCYP72A63*; *GAL1/GuUGT73P12*], pESC-HIS [*GAL1/GuCSyGT*]; Chung et al. 2020) に、同キットの EZ 3 solution とともに加えて、30 °C でインキュベートした。

表 5-1 *UGD* 遺伝子発現酵母の作製に用いたプライマー

No.	配列 (5' to 3')	用途
72	ATCCATCGATACTAGTTATGCCACAGCTGGCATG	<i>GuUGD2</i> (Forward)
73	TTGAAAATTCGAATTATGGTGAAGATTTGCTGCAT	<i>GuUGD2</i> (Reverse)
74	ATCCATCGATACTAGTTAGGCCACTACTGCAGG	<i>GuUGD4</i> (Forward)
75	TTGAAAATTCGAATTATGATGAAGATTTGTTGCATTG	<i>GuUGD4</i> (Reverse)

- UGD 組換えタンパク質の発現誘導

UGD 遺伝子を導入した出芽酵母を 2% のグルコースを含む SD (-Trp, -Leu, -Ura, -His) 液体培地で 5 日前培養後, 100 mL あたり OD 0.2–0.4 になるように細胞を回収し, 2% のガラクトースを含有する SD (-Trp, -Leu, -Ura, -His) 液体培地に移し替え, 100 mL スケール, 30 °C, 200 rpm にて 10 日振とうすることで組換えタンパク質の発現を誘導した. *GuUGD2* 遺伝子を導入した出芽酵母と *GuUGD4* を導入した出芽酵母はそれぞれ 3 ラインずつ培養した.

- グリチルリチンの抽出

4500 rpm で室温にて 10 分遠心分離することで培地を除去し, 出芽酵母のペレットの重さを測定したあと -80 °C で保存した. 出芽酵母のペレットに, 培地除去前の培養液 40 mL あたり, それぞれ HPLC-グレード 1-ブタノールが 4 mL, グラスビーズが約 1 mL, 1 mM のオレアノール酸 (内部標準として添加) が 40 μ l となるように加えた. 高速振盪機 CM-1000 (東京理化工機, 日本 東京都) のメモリを speed 15 にセットして, 10 分間ボルテックスして細胞を破壊し, 上清を回収した. 同じ量のブタノールで合計 10 回抽出し, 60 °C に設定した concentrator で蒸発させたあと, 800 μ l の HPLC-グレードメタノールに溶かした.

- LC-MS を用いたプロダクトの分析

HPLC-グレードメタノールに溶解させた出芽酵母抽出液 100 μ l を HPLC-グレードメタノールで 5 倍希釈したあと, 孔径 0.2 μ m の GLクロマトディスク水系型式 4A フィルター (ジーエルサイエンス) を通し, 30 °C に設定した ACQUITY UPLC HSS C18 カラム (1.8 μ m, 2.1 $\times$ 150 mm; Waters) と VanGuard プレカラム (1.8 μ m, 2.1 $\times$ 5 mm; Waters) を取り付けたタンデム四重極検出器付き ACQUITY™ Ultra-Performance LC システム (Waters) を用いて, クロマトグラフィーを行った. 移動相は, 0.025% [v/v] の酢酸を加えた HPLC-グレード水 (移動相 1) と, 0.025% の酢酸を加えた アセトニトリル (移動相 2) を用いた. はじめの 6 分間は移動相 2 を

30% とし、その後 22 分間かけて 100% に増やす勾配を設定し、流速は 0.2 ml min^{-1} とした。化合物はマイナスイオンモードのエレクトロスプレーイオン化法でイオン化した。マススペクトルは、 $100\text{--}1200 \text{ m/z}$ の範囲で記録した。質量分析計の設定は、キャピラリー電圧 $+2.5 \text{ kV}$ 、コーン電圧 80 V 、引出電圧 3 V 、ソース温度 $150 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、デソルベーション温度 $350 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、コーンガスフロー 50 L h^{-1} 、デソルベーションガスフロー 600 L h^{-1} とした。データの取得と解析には、MassLynx (ver.4.1, Waters) を使用した。各サンプルは $5 \mu\text{l}$ 注入し、標準試料として用いたグリチルリチン (和光純薬工業, 大阪府, 日本)、グリチルレチン酸-3-O-モノグルクロニド (ナカライテスク)、グリチルレチン酸 (Extrasynthese, フランス ジュネ) の保持時間と比較してピークを同定した。

5.3 結果

本章では、UGD アイソフォームの生化学的な特性の違いが出芽酵母を用いたグリチルリチン生産に及ぼす影響を評価した。第 2 章において高い触媒定数 (k_{cat}) を示した GuUGD2 タンパク質と、高い基質親和性 (K_m) を示した GuUGD4 タンパク質をコードする遺伝子を、グリチルリチン合成酵素の遺伝子とともに出芽酵母に導入した。また、シロイヌナズナの AtUGD2 タンパク質をコードする遺伝子をポジティブコントロールとして、空ベクターをネガティブコントロールとして使用した。遺伝子組換え出芽酵母は、GuUGD2 遺伝子と GuUGD4 遺伝子それぞれについて 3 ラインずつ作製した。LC-MS を用いて出芽酵母の抽出液を解析した結果、グリチルリチン合成酵素とともに UGD 遺伝子を発現させた出芽酵母からは、標準品として使用したグリチルリチンおよび中間体のグリチルレチン酸 3-O-モノグルクロニドと同じ m/z と保持時間を持つピークが検出された一方で、空のベクターを導入した出芽酵母ではこれらのピークが検出されなかったことから、これらのピークはグリチルリチンあるいはグリチルレチン酸 3-O-モノグルクロニドであると同定した。GuUGD2 発現出芽酵母と GuUGD4 発現出芽酵母では、グリチルリチンの生産量に差は見られなかった (表 5-2)。一方で、グリチルリチン合成酵素と AtUGD2 遺伝子を発現させた出芽酵母からは、GuUGD2 遺伝子や GuUGD4 遺伝子を発現させた出芽酵母よりも多くのグリチルリチンおよびグリチルレチン酸 3-O-モノグルクロニドが検出された。空のベク

ターを導入した出芽酵母からは、グリチルリチンあるいはグリチルレチン酸 3-O-モノグルクロニドは検出されなかった一方で、アグリコンであるグリチルレチン酸は最も多く検出された。また、グリチルレチン酸、グリチルレチン酸 3-O-モノグルクロニド、グリチルリチンの総量は、*AtUGD2* 遺伝子を発現させた出芽酵母で最も多く検出され、次いで *GuUGD2* 遺伝子もしくは *GuUGD4* 遺伝子を発現させた出芽酵母で多く、空のベクターを導入した出芽酵母では最も少なかった。

表 5-2 遺伝子組換え出芽酵母から抽出物されたグリチルリチンおよび前駆体の量

	グリチルリチン	グリチルレチン酸 3-O-モノグルクロニド	グリチルレチン酸
GuUGD2	26.6 ± 5.4	0.6 ± 0.2	1.4 ± 1.2
GuUGD4	27.6 ± 2.7	0.6 ± 0.1	1.2 ± 0.5
AtUGD2	94.1 ± 5.0	2.6 ± 0.2	1.9 ± 0.1
空ベクター	n.d.	n.d.	2.5 ± 0.4

グリチルリチン合成酵素の遺伝子と *UGD* 遺伝子を発現させた出芽酵母から抽出された代謝物の量を示す。単位はすべて nmol g-cell^{-1} 。GuUGD2 および GuUGD4 の数値は 3 ラインの出芽酵母の平均値 ± SE を表し、AtUGD2 および空ベクターの数値は 3 回測定 of 平均値 ± SE を表す。

5.4 考察

本章では、LC-MS を用いて出芽酵母におけるグリチルリチンの生産量を解析した。出芽酵母において発現させた *UGD* タンパクの質量は、夾雑物が多いため正確に測定できていない。しかし、UDP-Glc の濃度が *UGD* タンパク質の K_m 値よりも十分に低いと仮定すると、反応速度は触媒効率 (k_{cat}/K_m) を速度定数として基質濃度と酵素濃度に比例すると考えられる。また、反応速度が生成物の量 (GlcA を 2 分子含むグリチルリチン 1 mol あたり UDP-GlcA が 2 mol, GlcA を 1 分子含むグリチルレチン酸 3-O-モノグルクロニド 1 mol あたりの UDP-GlcA が 1 mol と生産されたとみなす) に比例すると仮定し、さらに基質である UDP-Glc 濃度が出芽酵母間で一定であったと仮定すると、*UGD* のタンパク質量の比は、GuUGD2 : GuUGD4 : AtUGD2 = (26.6

$\times 2 + 0.6 \times 1) / 0.0031 : (27.6 \times 2 + 0.6 \times 1) / 0.0045 : (94.1 \times 2 + 2.6) / 0.0156 \div 1.4 : 1 : 1$ と推定できる.

いずれの *UGD* 遺伝子を発現させた出芽酵母においても, アグリコンのグリチルレチン酸や中間体のグリチルレチン酸 3-O-モノグルクロニドの量は最終生成物であるグリチルリチンに比べて少なかった (表 5-2). この結果は, 糖転移反応が速やかに進行していることを示していると考えられる. また, 本研究で作製した酵母発現系においては, アグリコンであるグリチルレチン酸の合成がグリチルリチン合成における律速段階になっている可能性が示唆された. *GuUGD2* 遺伝子を発現させた出芽酵母と *GuUGD4* 遺伝子を発現させた出芽酵母からは同程度のグリチルリチンが検出されたが, *AtUGD2* 遺伝子を発現させた出芽酵母では約 3.5 倍量のグリチルリチンが検出された (表 5-2). さらに興味深いことに, *AtUGD2* 遺伝子を発現させた出芽酵母では, 中間体のグリチルレチン酸 3-O-モノグルクロニドおよびアグリコンのグリチルレチン酸の量も *GuUGD2* 遺伝子あるいは *GuUGD4* 遺伝子を発現させた出芽酵母よりもそれぞれ約 4 倍, 約 1.5 倍の量で検出された (表 5-2). *AtUGD2* タンパク質は *GuUGD* タンパク質の中で最も触媒定数が高かった *GuUGD2* タンパク質よりもさらに 2 倍近く高い触媒定数を持つことが報告されている (*GuUGD2* タンパク質は k_{cat} 1.01 s^{-1} ; 表 2-12, *AtUGD2* タンパク質は k_{cat} 1.92 s^{-1} ; Klinghammer and Tenhaken 2007). これらのことから, 触媒定数の高い *UGD* アイソフォームを用いることで, 出芽酵母におけるグリチルリチンの生産量だけでなく, アグリコンであるグリチルレチン酸の生産量も増加する可能性があることが示唆された. また, 空のベクターを導入した出芽酵母におけるグリチルレチン酸の量 ($2.5 \text{ nmol g-cell}^{-1}$) よりも, *UGD* 発現出芽酵母におけるグリチルレチン酸の下流の代謝物の総量 (グリチルレチン酸の量, グリチルレチン酸 3-O-モノグルクロニドの量, グリチルリチンの量の総和は, *GuUGD2* 遺伝子発現出芽酵母と *GuUGD4* 遺伝子発現出芽酵母で約 $30 \text{ nmol g-cell}^{-1}$, *AtUGD2* 遺伝子発現出芽酵母で約 $100 \text{ nmol g-cell}^{-1}$) が多いことも, *UGD* 遺伝子の発現によりグリチルレチン酸の下流の反応が進行することで, アグリコンであるグリチルレチン酸の生産も間接的に促進される可能性があることを示唆している.

出芽酵母内に基質である UDP-Glc が十分量存在していれば触媒定数が高いほど反応速度は速くなるが, 実際には, *UGD* 遺伝子を発現させた出芽酵母では野生型と比較して UDP-Glc の量が約半分にまで減少したことが報告されており (Oka and Jigami

2006), このような条件下では触媒定数よりも基質親和性が重要な因子となる. GuUGD2 タンパク質は GuUGD4 タンパク質よりも触媒定数は高いが (GuUGD2 タンパク質は k_{cat} 0.89 s^{-1} , GuUGD4 タンパク質は k_{cat} 0.25 s^{-1} ; 表 2-12), UDP-Glc に対する親和性は低い (GuUGD2 タンパク質は K_m $285 \mu\text{M}$, GuUGD4 タンパク質は K_m $55 \mu\text{M}$; 表 2-12). その結果, 両者の触媒効率ほぼ同じであった (GuUGD2 タンパク質は k_{cat}/K_m $0.0031 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$, GuUGD4 タンパク質は $0.0045 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$; 表 2-12). グリチルリチンの生産量が *GuUGD2* 遺伝子を発現させた出芽酵母と *GuUGD4* 遺伝子を発現させた出芽酵母の間に大きな差が見られなかったことから, 出芽酵母内の UDP-Glc 濃度が低く, UGD タンパク質の触媒定数だけでなく UDP-Glc に対する親和性もグリチルリチンの生産量に影響を与えていることが示唆された. なお, *GuUGD2* 遺伝子や *GuUGD4* 遺伝子を発現させた出芽酵母の約 3.5 倍のグリチルリチンが検出された *AtUGD2* タンパク質の触媒効率は GuUGD2 タンパク質や GuUGD4 タンパク質より高いことが報告されている ($0.0156 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$; Klinghammer and Tenhaken 2007). 出芽酵母におけるグリチルリチン生産量と UGD アイソフォームの生化学的な特性の関係を解析した研究は本研究が初めてであり, 触媒定数と基質親和性の両方が高い UGD アイソフォームを用いることで出芽酵母におけるグリチルリチン生産量を向上させることができることを明らかにした.

第 6 章 総括

● 各章の総括

本研究の第 2 章では、ウラルカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis*) の UGD 遺伝子の同定を試みた。トランスクリプトームデータベースから抽出された UGD タンパク質と相同な配列をコードする 5 つの遺伝子を実験系を用いて解析した結果、4 つの遺伝子が UGD タンパク質をコードすることが示された。このうち、触媒効率が特に高く、遺伝子の転写レベルが最も高い GuUGD2 タンパク質がウラルカンゾウの UGD 機能において特に大きな貢献をしているアイソフォームであることが示唆された。またこの研究は、シロイヌナズナ (Klinghammer and Tenhaken 2007) に続く、複数の UGD アイソフォームを機能解析した先駆的な研究である。

本研究の第 3 章では、植物特化代謝における GuUGD の生理学的な特性に違いが見られないか検証した。グリチルリチン生合成およびソヤサポニン生合成を活性化することが報告されているジャスモン酸メチルと、UGD 遺伝子の転写が活性化することが報告されているアブシジン酸に対する転写応答を、GuUGD1-4 遺伝子とグリチルリチン生合成あるいはソヤサポニン生合成を触媒する酵素の遺伝子と比較した。その結果、いずれの GuUGD 遺伝子も、グリチルリチン生合成あるいはソヤサポニン生合成を触媒する酵素遺伝子と類似する転写応答を示さなかったことから、トリテルペノイドサポニンの生合成に特化した GuUGD が存在する可能性は低く、これらの代謝物の生合成においても、ウラルカンゾウの UGD 機能において特に大きな貢献をしていると推定される GuUGD2 タンパク質が大きく貢献している可能性が高いことが示唆された。また、転写が活性化されるタイミングが糖転移酵素より遅かったことから、GuUGD1-4 タンパク質はサポニンの生合成によって消費された UDP-GlcA を充填する役割を果たしている可能性があるかと推測される。

本研究の第 4 章では、植物 UGD アイソフォームの系統解析を行い、系統の特性や、酵素活性に影響を与えるアミノ酸残基を特定することを目的とした。植物 UGD タンパク質の系統樹解析の結果から、UGD アイソフォームは、マメ科共通祖先において 5 つの分子種に分かれていた可能性が高いことが示された。さらに、GuUGD タンパク質と同じクレードに属するタルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*) の UGD タンパク

質をコードする遺伝子を 3 つ新たに機能同定し, GuUGD タンパク質とのアミノ酸配列の比較, および, GuUGD2 アミノ酸変異タンパク質の酵素活性試験を通して, GuUGD2 タンパク質のグリシン残基 (Gly²⁵²) と, アスパラギン酸残基 (Asp²⁵⁴) が, アルギニン残基 (Arg²⁵⁶) と同様に酵素活性において重要であることを明らかにした. 加えて, GuUGD2 タンパク質のトレオニン残基 (Thr²⁵³) をリシン残基に置換することで酵素活性が高くなることも示された. これらのアミノ酸残基はクレード I-V に属するマメ科の UGD タンパク質に共通して保存されていることから, 他のマメ科 UGD タンパク質についても同様の変異を加えることで酵素活性を変化させられる可能性が示唆された.

本研究の第 5 章では, 出芽酵母を用いた合成系において UGD タンパク質の生化学的特性がグリチルリチンの生産量に与える影響を解析した. その結果, 触媒定数と基質親和性の両方の特性がグリチルリチン生産量に影響を与えることが示唆された. また, 触媒効率の高い UGD アイソフォームを用いることで, 出芽酵母におけるグリチルリチンの生産量だけでなく, アグリコンであるグリチルレチン酸の生産量も増加する可能性があることが示唆された.

● 展望

本研究では, 生化学的な特性および転写レベルから, 植物特化代謝物の生合成を含むウラルカンゾウの UGD 機能において, GuUGD2 タンパク質が特に大きな貢献をしていることが示唆された (第 2-3 章). また, UGD アイソフォームの生化学的特性と転写パターンはマメ科において保存されている可能性があると考えられる (第 4 章). さらに, マメ科 UGD タンパク質の活性中心に位置するトレオニン残基をリシン残基に置換することで酵素活性を高められる可能性が示唆された (第 4 章). 加えて, 触媒効率の高い UGD タンパク質の利用は, 酵母発現系を用いたグリチルリチン生産において有利であることが示唆された (第 5 章). これらの知見は, 植物品種改良や異種宿主を用いたグルクロニドの生産において, 生産効率を改善することに役立つと考えられる.

植物が産生する代謝物の中には生理活性を有するものが多数存在し、医薬品、食品、日用品など、産業分野で広く利用されている。GlcA 修飾されたグルクロニドは、トリテルペノイド（テルペノイドの一種）、フラボノイド（フェニルプロパノイドの一種）、アルカロイド（窒素含有化合物の一種）に見られ、様々な生理活性を示すことが知られている（表 6-1）。アグリコン自体が生理活性を示す場合もあるが、ソヤサポゲノール B とそのグルクロニド（ソヤサポゲノール B, ソヤサポゲノール B モノグルクロニド, ソヤサポニン III, ソヤサポニン I）の例では、GlcA 修飾によって肝保護作用が增強されることが報告されている（Ikeda et al. 1998）。このように、UGD タンパク質は多くの植物やグルクロニドの生合成において重要な役割を果たす酵素である。

表 6-1 植物が生合成するグルクロニドと薬理活性

分類	植物特化代謝物	生合成する植物の一例	マメ科での報告	生理活性の例
トリテルペノイド	Calenduloside E; Oleanolic acid 3-O-glucuronide	<i>Aralia</i> spp.; タラノキ属 ¹	有	心筋の虚血再灌流傷害の緩和 (Wang et al. 2020a)
トリテルペノイド	Ginsenoside Ro; Polysciasaponin P3; Chikusetsusaponin 5	<i>Panax ginseng</i> ; オタネニンジン ³	無	抗炎症 (Zhang et al. 2015)
トリテルペノイド	Glycyrrhizin	<i>Glycyrrhiza</i> spp.; カンゾウ属 ¹	有	抗潰瘍, 抗ウィルス, 肝保護, 抗遺伝毒性 (Isbrucker and Burdock 2006)
トリテルペノイド	Kudzusaponin SA3	<i>puerariae radix</i> ; カッコン (Arao et al. 1997)	有	抗肝毒性 (Arao et al. 1997)
トリテルペノイド	Soyasaponin I; Soyasaponin Bb	<i>Glycine max</i> ; ダイズ ¹	有	アルドースレダクターゼ特異的阻 (Balestri et al. 2019)
トリテルペノイド	Soyasaponin II	<i>Glycine max</i> ; ダイズ ¹	有	肝保護 (Wang et al. 2020b)
トリテルペノイド	Soyasaponin III	<i>Glycine max</i> ; ダイズ ¹	有	肝保護 (Ikeda et al. 1998)

分類	植物特化代謝物	生合成する植物の一例	マメ科での報告	生理活性の例
トリテルペノイド	Soyasaponin IV	<i>Glycine max</i> ; ダイズ ²	有	肝保護 (Kinjo et al. 1998)
トリテルペノイド	Soyasaponin V; Soyasaponin Ba	<i>Glycine max</i> ; ダイズ ²	有	アルドースレダクターゼ阻害 (Balestri et al. 2019)
トリテルペノイド	Soyasaponin A1	<i>Impatiens sicutifer</i> ¹	有	抗アテローム性動脈硬化 (Xie et al. 2020)
トリテルペノイド	Soyasaponin A2	<i>Glycine max</i> ; ダイズ (Xie et al. 2020)	有	抗アテローム性動脈硬化 (Xie et al. 2020)
トリテルペノイド	Soyasaponin Aa	<i>Glycine max</i> ; ダイズ ³	有	抗肥満 (Yang et al. 2015)
トリテルペノイド	Soyasaponin Ab	<i>Glycine max</i> ; ダイズ ³	有	抗肥満 (Yang et al. 2015)
トリテルペノイド	Soyasapogenol B monoglucuronide	<i>Glycine max</i> ; ダイズ ¹	有	肝保護 (Ikeda et al. 1998)
フラボノイド	Acacetin 7-glucuronide	<i>Chaenomeles sinensis</i> ; カリン ¹	無	

分類	植物特化代謝物	生合成する植物の一例	マメ科での報告	生理活性の例
フラボノイド	Apigenin 7-diglucuronide	<i>Glechoma longituba</i> ; カキドオシ (Bian et al. 2017)	無	抗炎症, 抗酸 (Bian et al. 2017)
フラボノイド	Apigenin 7-glucuronide	<i>Sonchus</i> spp.; ノゲシ属 ¹	無	骨形成不全症 I 型におけるコラーゲン合成の促進 (Galicka and Nazaruk 2007)
フラボノイド	Baicalin	<i>Thalictrum baicalense</i> ; ハルカラマツ ¹	無	抗炎症, 抗酸化, 抗ウイルス (Li et al. 2011)
フラボノイド	Bracteoside	<i>Centaurea jacea</i> ; ヤグルマアザミ ¹	無	
フラボノイド	Chrysin 7-glucuronide	<i>Scutellaria</i> spp.; タツナミソウ属 ¹	無	抗片頭痛 (Zheng et al. 2021)
フラボノイド	Eriodictyol 7-glucuronide	<i>Chrysanthemum indicum</i> ; シマカンギク ¹	無	
フラボノイド	Hibifolin	<i>Abelmoschus manihot</i> ; トロロアオイ ¹	無	神経毒性を防ぐ (Zhu et al. 2009)
フラボノイド	Isorhamnetin 3-glucuronide	<i>Rubus</i> spp.; キイチゴ属 ¹	有	血圧低下 (Galindo et al. 2012)

分類	植物特化代謝物	生合成する植物の一例	マメ科での報告	生理活性の例
フラボノイド	Kaempferol 3-glucuronide	<i>Phaseolus vulgaris</i> ; インゲンマメ ¹	有	抗炎症 (Khajuria et al. 2018)
フラボノイド	Luteolin 3'-glucuronide	<i>Rosmarinus officinalis</i> ; ローズマリー ¹	無	
フラボノイド	Luteolin 5-glucuronide	<i>Dumortiera hirsuta</i> ; ケゼニゴケ ¹	無	
フラボノイド	Luteolin 7-glucuronide	<i>Salix babylonica</i> ; シダレヤナギ ¹	有	胆汁分泌促進 (Benedek et al. 2006)
フラボノイド	Myricetin 3-glucuronide	<i>Potentilla anserina</i> ; ヨウシュツルキンバイ ¹	無	抗炎症 (Hiermann et al. 1998)
フラボノイド	Oroxindin; Wogonoside	<i>Scutellaria</i> spp.; タツナミソウ属 ¹	無	抗酸化, 抗ウイルス (Li et al. 2011)
フラボノイド	Oroxylin 7-glucuronide	<i>Scutellaria</i> spp.; タツナミソウ属 ¹	無	抗片頭痛 (Zheng et al. 2021)
フラボノイド	Patuletin 3-glucuronide	<i>Arnica sachalinensis</i> ; オオウサギギク ¹	無	

分類	植物特化代謝物	生合成する植物の一例	マメ科での報告	生理活性の例
フラボノイド	Quercetin 3-O-glucuronide; Miquelianin; Querciturone	<i>Persicaria hydropiper</i> ; ヤナギタデ ¹	有	抗炎症 (Derlindati et al. 2012)
フラボノイド	Quercetin 4-glucuronide	<i>Psidium guajava</i> ; グアバ ¹	無	
フラボノイド	Quercetin 7-glucuronide	<i>Tanacetum parthenium</i> ; ナツシロギク ¹	無	
フラボノイド	Scutellarin	<i>Sempervivum ruthenicum</i> ; センベルビブム ¹	無	血管新生阻害 (Wang et al. 2014)
フラボノイド	Theograndin I	<i>Theobroma grandiflorum</i> ; クプアス ¹	無	
フラボノイド	Theograndin II	<i>Theobroma grandiflorum</i> ; クプアス ¹	無	抗酸化 (Yang et al. 2003)
アルカロイド	Morphine-3-glucuronide	<i>Papaver somniferum</i> ; ケシ ¹	無	非小細胞肺癌の免疫回避の促進 (Wang et al. 2021)

生合成する植物の一例は、それぞれ 1: LOTUS (<https://lotus.naturalproducts.net/>) ; 2: ChemFaces (<http://www.chemfaces.net/>) ; 3: MedChemExpress (<https://www.medchemexpress.com/>) を出展とする.

植物特化代謝物の有用性に着目し、その生産方法として、植物の栽培、植物細胞や組織の培養、異種宿主による生産など、様々なアプローチが開発されている (Atanasov et al. 2015). 植物を利用する場合、品種改良により、有効成分の蓄積やストレス耐性などの形質に優れた個体などを選抜し、生産効率を高めることが可能である。遺伝子組み換え、ゲノム編集、塩基編集は、突然変異による品種改良と比べて、目的の形質を導入することが容易であるという利点があるが、そのためには対象となる遺伝子の同定が必要である。UGD タンパク質は細胞壁合成や植物特化代謝物の合成に関与する酵素であり、UGD タンパク質の活性を向上させることで、成長速度や植物特化代謝物の生産量を増加させることができる可能性がある。実際に、シロイヌナズナにおいてグイマツ (*Larix gmelinii*) やカジノキ (*Broussonetia kazinoki* × *Broussonetia papyifera*) 由来の UGD 遺伝子を過剰発現させた実験では、野生型と比較して成長速度が速く、寒冷ストレスに対する耐性も高まったことが報告されている (Li et al. 2017; Ji et al. 2020). 塩基編集は 1 塩基単位で書き換えることができる新しい技術で、ゲノム編集とは異なり、2 本鎖 DNA の切断や、外来配列の導入が不要であり (Komor et al. 2016), 品種改良や医療など様々な分野において活用が期待されている技術である。UGD 遺伝子の塩基編集に関する報告はまだないが、この技術を用いて UGD タンパク質の活性を強化し、植物の成長やグルクロニドの生合成を促進することができると考えられる。本研究では、活性中心に位置するトレオニン残基をリシン残基に置換することで UGD の酵素活性を高められる可能性が示唆された。また、酵素活性や転写レベルの高さから、クレード III に属する UGD アイソフォームが特に重要な役割を担っていることが示唆された。従って、例えばマメ科のクレード III に属する UGD タンパク質のトレオニン残基をリシン残基に置換することで、グルクロニド蓄積量、成長速度、寒冷ストレス耐性といった形質を改善できる可能性があると期待される。この推測を検証するためには、UGD 遺伝子を変異させた植物を用いた実験が必要である。

グリチルリチンのように、植物特化代謝物は精製された化合物としても使用されることから、異種宿主を用いたグルクロニドの生産も産業的な価値の大きい手法である。出芽酵母において UGD 遺伝子とグリチルリチン生合成酵素遺伝子を発現させた例では、単位培養液あたり約 $800 \mu\text{g l}^{-1}$ (約 $1 \mu\text{mol l}^{-1}$; Chung et al. 2020) のグリチルリチンが生産されたことが報告されている。本研究では、触媒効率の高い UGD タン

パク質を用いることでグリチルリチンの生産が促進される可能性があることを示した. 本研究の成果まとめた 2021 年発表の論文 (Kawasaki et al. 2021) を引用した研究において, ヒト UGD タンパク質をより酵素活性の高いシロイヌナズナの UGD タンパク質に置き換えることで, 組換え酵母におけるカレンズロシド E (トリテルペノイドグルクロニドの一種) の生産量を 14.6 mg l^{-1} から 17.7 mg l^{-1} に増加させることに成功したことが報告されている (Ren et al. 2022). 今後, より触媒効率の高い新しい UGD アイソフォームの同定や, アミノ酸配列のデザインにより, さらに効率的に異種宿主におけるグルクロニド生産が行えるようになると期待される.

引用文献

Afendi FM, Okada T, Yamazaki M, Hirai-Morita A, Nakamura Y, Nakamura K, Ikeda S, Takahashi H, Altaf-Ul-Amin M, Darusman LK, et al. (2012) KNApSAC family databases: Integrated metabolite–plant species databases for multifaceted plant research. *Plant Cell Physiol* 53:1–12

Amino S, Takeuchi Y, Komamine A (1985) Changes in enzyme activities involved in formation and interconversion of UDP-sugars during the cell cycle in a synchronous culture of *Catharanthus roseus*. *Physiol Plant* 64:111–117

Arao T, Udayama M, Kinjo J, Nohara T, Funakoshi T, Kojima S (1997) Preventive effects of saponins from *Puerariae Radix* (the root of *Pueraria lobata* OHWI) on *in vitro* immunological injury of rat primary hepatocyte cultures. *Biol Pharm Bull* 20:988–991

Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P, Temml V, Wang L, Schwaiger S, Heiss EH, et al. (2015) Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol Adv* 33:1582–1614

Balestri F, Leo MD, Sorce C, Cappiello M, Quattrini L, Moschini R, Pineschi C, Braca A, Motta CL, Settimo FD, et al. (2019) Soyasaponins from Zolfino bean as aldose reductase differential inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem* 34:350–360

Baum D (2008) Reading a phylogenetic tree: The meaning of monophyletic groups. *Nat Educ* 1

Beattie NR, Pioso BJ, Sidlo AM, Keul ND, Wood ZA (2018) Hysteresis and allostery in human UDP-glucose dehydrogenase require a flexible protein core. *Biochemistry* 57:6848–6859

Benedeka B, Geisza N, Jäger W, Thalhammer T, Koppa B (2006) Choleretic effects of yarrow (*Achillea millefolium* s.l.) in the isolated perfused rat liver. *Phytomedicine* 13: 702–706

- Benedito VA, Torres-Jerez I, Murray JD, Andrianakaja A, Allen S, Kakar K, Wandrey M, Verdier J, Zuber H, Ott T, et al. (2008) A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J* 55:504–513
- Benkert P, Biasini M, Schwede T (2011) Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* 27:343–350
- Bertoni M, Kiefer F, Biasini M, Bordoli L, Schwede T (2017) Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Sci Rep* 7:10480
- Bian M, Zhang Y, Du X, Xu J, Cui J, Gu J, Zhu W, Zhang T, Chen Y (2017) Apigenin-7-diglucuronide protects retinas against bright light-induced photoreceptor degeneration through the inhibition of retinal oxidative stress and inflammation. *Brain Res* 1663: 141–150
- Bienert S, Waterhouse A, de Beer TAP, Tauriello G, Studer G, Bordoli L, Schwede T (2017) The SWISS-MODEL repository-new features and functionality. *Nucleic Acids Res* 45:D313–D319
- Caffall KH, Mohnen D (2009) The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr Res* 344:1879–1900
- Campbell RE, Mosimann SC, Rijn IVD, Tanner ME, Strynadka NCJ (2000) The first structure of UDP-glucose dehydrogenase reveals the catalytic residues necessary for the two-fold oxidation. *Biochemistry* 39:7012–7023
- Chen H, Liu Y, Zhang X, Zhan X, Liu C (2013) Cloning and characterization of the gene encoding β -amyrin synthase in the glycyrrhizic acid biosynthetic pathway in *Glycyrrhiza uralensis*. *Acta Pharm Sin B* 3: 416–424
- Chung SY, Seki H, Fujisawa Y, Shimoda Y, Hiraga S, Nomura Y, Saito K, Ishimoto M, Muranaka T (2020) A cellulose synthase-derived enzyme catalyses 3-O-glucuronosylation in saponin biosynthesis. *Nat Commun* 11:5664.

- Dalessandro G, Northcote DH (1977) Possible control sites of polysaccharide synthesis during cell growth and wall expansion of pea seedlings (*Pisum sativum* L.). *Planta* 134:39–44
- Davies MD, Dickinson DB (1972) Radiochemical assay for UDP-glucose dehydrogenase. *Anal Biochem* 47:209–217
- Derlindati E, Dall'Asta M, Ardigò D, Brighenti F, Zavaroni I, Crozierc A, Rio DD (2012) Quercetin-3-*O*-glucuronide affects the gene expression profile of M1 and M2a human macrophages exhibiting anti-inflammatory effects. *Food Funct* 3: 1144–1152
- Dougherty BA, Rijn IVD (1993) Molecular characterization of has B from an operon required for hyaluronic acid synthesis in group A streptococci. Demonstration of UDP-glucose dehydrogenase activity. *J Biol Chem* 268:7118–7124
- Ebringerová A, Hromádková Z, Heinze T (2005) Hemicellulose. *Polysaccharides I* 186:1–67
- Egger S, Chaikuad A, Kavanagh KL, Oppermann U, Nidetzky B (2011) Structure and mechanism of human UDP-glucose 6-dehydrogenase. *J Biol Chem* 286:23877–23887
- Esaki S, Konishi F, Kamiya S (1978) Synthesis and taste of some glycosides of glycyrrhetic acid. *Agric Biol Chem* 42:1599–1600
- Fanani MZ, Fukushima EO, Sawai S, Tang J, Ishimori M, Sudo H, Ohyama K, Seki H, Saito K, Muranaka T (2019) Molecular basis of C-30 product regioselectivity of legume oxidases involved in high-value triterpenoid biosynthesis. *Front Plant Sci* 10: 1–16
- Field B, Osbourn AE (2008) Metabolic diversification—independent assembly of operon-like gene clusters in different plants. *Science* 320:543–547
- Field B, Fiston-Lavier AS, Kemen A, Geisler K, Quesneville H, Osbourn AE (2011) Formation of plant metabolic gene clusters within dynamic chromosomal regions. *PNAS* 108:16116–16121

- Galicka A, Nazaruk J (2007) Stimulation of collagen biosynthesis by flavonoid glycosides in skin fibroblasts of osteogenesis imperfecta type I and the potential mechanism of their action. *Int Mol Med* 20:889–895
- Galindo P, Rodriguez-Gómez I, González-Manzano S, Dueñas M, Jiménez R, Menéndez C, Vargas F, Tamargo J, Santos-Buelga C, Pérez-Vizcaíno F, et al. (2012) Glucuronidated quercetin lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats via deconjugation. *PLoS ONE* 7:e32673
- Gálvez L, González EM, Arrese-Igor C (2005) Evidence for carbon flux shortage and strong carbon/nitrogen interactions in pea nodules at early stages of water stress. *J Exp Bot* 56: 2551–2561
- Ge X, Penney LC, Rijn IVD, Tanner ME (2004) Active site residues and mechanism of UDP-glucose dehydrogenase. *Eur J Biochem* 271:14–22
- Guex N, Peitsch MC, Schwede T (2009) Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *ELECTROPHORESIS* 30:S162–S173
- Hamberger B, Bak S (2013) Plant P450s as versatile drivers for evolution of species-specific chemical diversity. *Phil Trans R Soc B* 368:20120426
- Hayashi H, Sudo H (2009) Economic importance of licorice. *Plant Biotechnol* 26:101–104
- Hayashi T, Matsuda K (1981) Biosynthesis of xyloglucan in suspension-cultured soybean cells. Evidence that the enzyme system of xyloglucan synthesis does not contain β -1,4-glucan 4- β -D-glucosyltransferase activity (EC 2.4.1.12). *Plant Cell Physiol* 22: 1571–1584
- Hayashi H, Huang P, Inoue K (2003) Up-regulation of soyasaponin biosynthesis by methyl jasmonate in cultured cells of *Glycyrrhiza glabra*. *Plant Cell Physiol* 44: 404–411

- He J, Benedito VA, Wang M, Murray JD, Zhao PX, Tang Y, Udvardi MK (2009) The *Medicago truncatula* gene expression atlas web server. BMC Bioinformatics 10:441
- Hiermann A, Schramm HW, Laufer S (1998) Anti-inflammatory activity of myricetin-3-O- β -D-glucuronide and related compounds. Inflamm Res 47: 421–427
- Hill RA, Connolly JD (2013) Triterpenoids. Nat Prod Rep 30:1028–1065
- Hinterberg B, Klos C, Tenhaken R (2002) Recombinant UDP-glucose dehydrogenase from soybean. Plant Physiol Biochem 40:1011–1017
- Ikeda T, Udayama M, Okawa M, Arao T, Kinjo J, Nohara T (1998) Partial hydrolysis of soyasaponin I and the hepatoprotective effects of the hydrolytic products. Study of the structure-hepatoprotective relationship of soyasapogenol B analogs. Chem Pharm Bull 46:359–361
- Isbrucker RA, Burdock GA (2006) Risk and safety assessment on the consumption of Licorice root (*Glycyrrhiza* sp.), its extract and powder as a food ingredient, with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin. Regul Toxicol Pharmacol 46:167–192
- Ji RH, Zhang Z, Guo X, Bao YL, Zhang WB, Lin XF, Bai SL (2020) Cloning and characterization of a UDP-glucose dehydrogenase gene from mulberry *Broussonetia kazinoki* $\times$ *Broussonetia papyifera*. BIOLOGIA PLANTARUM 64: 667–678
- Jones DT, Taylor WR, Thornton JM (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. Bioinformatics 8:275–282
- Jozwiak A, Sonawane PD, Panda S, Garagounis C, Papadopoulou KK, Abebie B, Massalha H, Almekias-Siegl E, Scherf T, Aharoni A (2020) Plant terpenoid metabolism co-opts a component of the cell wall biosynthesis machinery. Nat Chem Biol 16: 740–748

Kärkönen A, Murigneux A, Martinant JP, Pepey E, Tatout C, Dudley BJ, Fry SC (2005) UDP-glucose dehydrogenases of maize: A role in cell wall pentose biosynthesis. *Biochem J* 391:409–415

Kärkönen A, Fry SC (2006) Novel characteristics of UDP-glucose dehydrogenase activities in maize: non-involvement of alcohol dehydrogenases in cell wall polysaccharide biosynthesis. *Planta* 223:858–870

Kawasaki A, Chikugo A, Tamura K, Seki H, Muranaka T (2021) Characterization of UDP-glucose dehydrogenase isoforms in the medicinal legume *Glycyrrhiza uralensis*. *Plant Biotechnol* 38:205–218

Khajuria V, Gupta S, Sharma N, Tiwari H, Bhardwaj S, Dutt P, Satti N, Nargotra A, Bhagat A, Ahmed Z (2018) Kaempferol-3-o- β -d-glucuronate exhibit potential anti-inflammatory effect in LPS stimulated RAW 264.7 cells and mice model. *Int Immunopharmacol* 57: 62–71

Kinjo J, Imagire M, Udayama M, Arao T, Nohara T (1998) Structure-hepatoprotective relationships study of soyasaponins I-IV having soyasapogenol B as aglycone. *Planta Med* 63: 233–236

Kitagawa I (2002) Licorice root. A natural sweetener and an important ingredient in Chinese medicine. *Pure Appl Chem* 74:1189–1198

Kitagawa I, Hori K, Sakagami M, Hashiuchi F, Yoshikawa M, Ren J (1993) Saponin and sapogenol. Xlix. On the constituents of the roots of *Glycyrrhiza inflata* BATALIN from Xinjiang, China. Characterization of two sweet oleanane-type triterpene oligoglycosides, apioglycyrrhizin and araboglycyrrhizin. *Chem Pharm Bull* 41:1350–1357

Kliebenstein DJ, Osbourn A (2012) Making new molecules – evolution of pathways for novel metabolites in plants. *Curr Opin Plant Biol* 15:415–423

Klinghammer M, Tenhaken R (2007) Genome-wide analysis of the UDP-glucose dehydrogenase gene family in *Arabidopsis*, a key enzyme for matrix polysaccharides in cell walls. *J Exp Bot* 58:3609–21

Kojoma M, Ohyama K, Seki H, Hiraoka Y, Asazu SN, Sawa S, Sekizaki H, Yoshida S, Muranaka T (2010) *In vitro* proliferation and triterpenoid characteristics of licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fischer, Leguminosae) stolons. *Plant Biotechnol* 27:59–66

Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR (2016) Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 533:420–424

Koressaar T, Remm M (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23:1289–1291

Krokida A, Delis C, Geisler K, Garagounis C, Tsikou D, Peña - Rodríguez LM, Katsarou D, Field B, Osbourn AE, Papadopoulou KK (2013) A metabolic gene cluster in *Lotus japonicus* discloses novel enzyme functions and products in triterpene biosynthesis. *New Phytol* 200:675–690

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) Mega X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547–1549

Labate MTV, Bertolo ALF, Nascumento DD, Gutmanis G, Andrade AD, Rodrigues MJC, Camargo ELO, Boaretto LF, Moon DH, Bragatto J, et al. (2010) Cloning and endogenous expression of a *Eucalyptus grandis* UDP-glucose dehydrogenase cDNA. *Genet Mol Biol* 33:686–695

Li C, Lin G, Zuo Z (2011) Pharmacological effects and pharmacokinetics properties of *Radix Scutellariae* and its bioactive flavones. *Biopharm Drug Dispos* 32: 427–445

Li Y, Yu C, Qiao J, Zang Y, Xiang Y, Ren G, Wang L, Zhang X, Liu C (2016) Effect of exogenous phytohormones treatment on glycyrrhizic acid accumulation and preliminary exploration of the chemical control network based on glycyrrhizic acid in root of *Glycyrrhiza uralensis*. *Rev Bras* 26: 490–496

- Li NN, Chen L, Li XH, Li Q, Zhang WB, Takechi K, Takano H, Lin XF (2017) Overexpression of UDP-glucose dehydrogenase from *Larix gmelinii* enhances growth and cold tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Biol Plantarum* 61: 95–105
- Litterer LA, Plaisance KL, Schnurr JA, Storey KK, Jung HJG, Gronwald JW, Somers DA (2006) Biosynthesis of UDP-glucuronic acid in developing soybean embryos: possible role of UDP-sugar pyrophosphorylase. *Physiol Plant* 128:200–211
- Macrae E, Quick WP, Benker C, Stitt M (1992) Carbohydrate metabolism during postharvest ripening in kiwifruit. *Planta* 188:314–323
- Mochida K, Sakurai T, Seki H, Yoshida T, Takahagi K, Sawai S, Uchiyama H, Muranaka T, Saito K (2017) Draft genome assembly and annotation of *Glycyrrhiza uralensis*, a medicinal legume. *Plant J* 89:181–194
- Mohnen D (2008) Pectin structure and biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 11:266–277
- Morrell S, Rees T (1986) Sugar metabolism in developing tubers of *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* 25:1579–1585
- Mugford ST, Qi X, Bakht S, Hill L, Wegel E, Hughes RK, Papadopoulou K, Melton R, Philo M, Sainsbury F, et al. (2009) A serine carboxypeptidase-like acyltransferase is required for synthesis of antimicrobial compounds and disease resistance in oats. *Plant Cell* 21: 2473–2484
- Mugford ST, Louveau T, Melton R, Qi X, Bakht S, Hill L, Tsurushima T, Honkanen S, Rosser SJ, Lomonossoff GP, et al. (2013) Modularity of plant metabolic gene clusters: A trio of linked genes that are collectively required for acylation of triterpenes in oat. *Plant Cell* 25: 1078–1092
- Mun T, Bachmann A, Gupta V, Stougaard J, Andersen SU (2016) *Lotus* Base: An integrated information portal for the model legume *Lotus japonicus*. *Sci Rep* 6:39447

Neufeld EF, Hall CW (1965) Inhibition of UDP-D-glucose dehydrogenase by UDP-D-xylose: A possible regulatory mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 19:456–461

Nomura Y, Seki H, Suzuki T, Ohyama K, Mizutani M, Kaku T, Tamura K, Ono E, Horikawa M, Sudo H, et al. (2019) Functional specialization of UDP-glycosyltransferase 73P12 in licorice to produce a sweet triterpenoid saponin, glycyrrhizin. *Plant J* 99:1127–1143

Nützmann HW, Osbourn A (2014) Gene clustering in plant specialized metabolism. *Curr Opin Biotechnol* 26:91–99

Oka T, Jigami Y (2006) Reconstruction of de novo pathway for synthesis of UDP-glucuronic acid and UDP-xylose from intrinsic UDP-glucose in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J* 273:2645–2657

Owatworakit A, Townsend B, Louveau T, Jenner H, Rejzek M, Hughes RK, Saalbach G, Qi X, Bakht S, Roy AD, et al. (2013) Glycosyltransferases from oat (*Avena*) implicated in the acylation of avenacins. *J Biol Chem* 288:3696–3704

Qi X, Bakht S, Leggett M, Maxwell C, Melton R, Osbourn A (2004) A gene cluster for secondary metabolism in oat : Implications for the evolution of metabolic diversity in plants. *PNAS* 101:8233–8238

Qi X, Bakht S, Qin B, Leggett M, Hemmings A, Mellon F, Eagles J, Werck-Reichhart D, Schaller H, Lesot A, et al. (2006) A different function for a member of an ancient and highly conserved cytochrome P450 family: From essential sterols to plant defense. *PNAS* 103:18848–53

Qiao J, Luo Z, Li Y, Ren G, Liu C, Ma X (2017) Effect of abscisic acid on accumulation of five active components in root of *Glycyrrhiza uralensis*. *Molecules* 22

Ramilowski JA, Sawai S, Seki H, Mochida K, Yoshida T, Sakurai T, Muranaka T, Saito K, Daub CO (2013) *Glycyrrhiza uralensis* transcriptome landscape and study of phytochemicals. *Plant Cell Physiol* 54:697–710

- Rao RS, Ravishankar GA (2002) Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 20: 101–153
- Reboul R, Geserick C, Pabst M, Frey B, Wittmann D, Lütz-Meindl U, Léonard R, Tenhaken R (2011) Down-regulation of UDP-glucuronic acid biosynthesis leads to swollen plant cell walls and severe developmental defects associated with changes in pectic polysaccharides. *J Biol Chem* 286:39982–39992
- Rees TA, Leja M, Macdonald FD, Green JH (1984) Nucleotide sugars and starch synthesis in spadix of *Arum maculatum* and suspension cultures of *Glycine max*. *Phytochemistry* 23:2463–2468
- Ren S, Sun Q, Zhang L, Sun W, Li Y, Feng X, Li C (2022) Sustainable production of rare oleanane-type ginsenoside Ro with an artificial glycosylation pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Green Chem* 24:8302–8313
- Robertson D, Smith C, Bolwell GP (1996) Inducible UDP-glucose dehydrogenase from French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) locates to vascular tissue and has alcohol dehydrogenase activity. *Biochem J* 313:311–317
- Schlüpmann H, Bacic A, Read SM (1994) Uridine diphosphate glucose metabolism and callose synthesis in cultured pollen tubes of *Nicotiana glauca* Link et Otto. *Plant Physiol* 105: 659–670
- Schmidt BM, Ribnicky DM, Lipsky PE, Raskin I (2007) Revisiting the ancient concept of botanical therapeutics. *Nat Chem Biol* 3:360–366
- Seifert GJ (2004) Nucleotide sugar interconversions and cell wall biosynthesis: How to bring the inside to the outside. *Curr Opin Plant Biol* 7:277–284
- Seitz B, Klos C, Wurm M, Tenhaken R (2000) Matrix polysaccharide precursors in *Arabidopsis* cell walls are synthesized by alternate pathways with organ-specific expression patterns. *Plant J* 21:537–546

Seki H, Ohyama K, Sawai S, Mizutani M, Ohnishi T, Sudo H, Akashi T, Aoki T, Saito K, Muranaka T (2008) Licorice β -amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin. PNAS 105:14204–14209

Seki H, Sawai S, Ohyama K, Mizutani M, Ohnishi T, Sudo H, Fukushima EO, Akashi T, Aoki T, Saito K, et al. (2011) Triterpene functional genomics in licorice for identification of CYP72A154 involved in the biosynthesis of glycyrrhizin. Plant Cell 23:4112–4123

Severin AJ, Woody JL, Bolon YT, Joseph B, Diers BW, Farmer AD, Muehlbauer GJ, Nelson RT, Grant D, Specht JE, et al. (2010) RNA-Seq atlas of *Glycine max*: A guide to the soybean transcriptome. BMC Plant Biol 10:160

Shabani L, Ehsanpour AA, Asghari G, Emami J (2009) Glycyrrhizin production by in vitro cultured *Glycyrrhiza glabra* elicited by methyl jasmonate and salicylic acid. Russ J Plant Physiol 56:621–626

Shilpa K, Varun K, Lakshmi BS (2010) An alternate method of natural drug production: eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. J Plant Sci 5: 222–247

Somerville C, Bauer S, Brininstool G, Facette M, Hamann T, Milne J, Osborne E, Paredes A, Persson S, Raab T, et al. (2004) Toward a systems approach to understanding plant cell walls. SCIENCE 306:2206–2211

Spicer AP, Kaback LA, Smith TJ, Seldin MF (1998) Molecular cloning and characterization of the human and mouse UDP-glucose dehydrogenase genes. J Bio Chem 273:25117–25124

Stewart DC, Copeland L (1998) Uridine 5'-diphosphate-glucose dehydrogenase from soybean nodules. Plant Physiol 116:349–355

Strominger JL, Mapson LW (1957) Uridine diphosphoglucose dehydrogenase of pea seedlings. Biochem J 66:567–572

Strominger JL, Kalekar HM, Axelrod J, Maxwell ES (1954) Enzymatic oxidation of uridine diphosphate glucose to uridine diphosphate glucuronic acid. *J Am Chem Soc* 76:6411–6412

Tamura K, Yoshida K, Hiraoka Y, Sakaguchi D, Chikugo A, Mochida K, Kojoma M, Mitsuda N, Saito K, Muranaka T, et al. (2018) The basic helix–loop–helix transcription factor GubHLH3 positively regulates soyasaponin biosynthetic genes in *Glycyrrhiza uralensis*. *Plant Cell Physiol* 59:783–796

Tenhaken R, Thulke O (1996) Cloning of an enzyme that synthesizes a key nucleotide sugar precursor of hemicellulose biosynthesis from soybean:UDP-glucose dehydrogenase. *Plant Physiol* 112:1127–1134

Thimmappa R, Geisler K, Louveau T, Maille PO, Osbourn A (2014) Triterpene biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Biol* 65:225–257

Tian J, Du Q, Li B, Zhang D (2014) Single-nucleotide polymorphisms in the 5'UTR of UDP-glucose dehydrogenase (PtUGDH) associate with wood properties in *Populus tomentosa*. *Tree Genet Genomes* 10:339–354

Tsuno Y, Fujimatsu T, Endo K, Sugiyama A, Yazaki K (2018) Soyasaponins: A new class of root exudates in soybean (*Glycine max*). *Plant Cell Physiol* 59:366–375

Turner W, Botha FC (2002) Purification and kinetic properties of UDP-glucose dehydrogenase from sugarcane. *Arch Biochem Biophys* 407 407:209–216

Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3 — new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40:e115

Verdier J, Torres-Jerez I, Wang M, Andriankaja A, Allen SN, He J, Tang Y, Murray JD, Udvardi MK (2013) Establishment of the *Lotus japonicus* Gene Expression Atlas (LjGEA) and its use to explore legume seed maturation. *Plant J* 74: 351–362

Vogt T, Jones P (2000) Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *Trends Plant Sci* 5:380–386

- Wang Y, Chen S, Yu O (2011) Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 91:949–956
- Wang D, Wang L, Gu J, Yang H, Liu N, Lin Y, Li X, Shao C (2014) Scutellarin inhibits high glucose-induced and hypoxia-mimetic agent-induced angiogenic effects in human retinal endothelial cells through reactive oxygen species/hypoxia-inducible factor-1 α /vascular endothelial growth factor pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 64: 218–227
- Wang R, Wang M, Zhou J, Dai Z, Sun G, Sun X (2020a) Calendulose E suppresses calcium overload by promoting the interaction between L-type calcium channels and Bcl2-associated athanogene 3 to alleviate myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Adv Res* 34: 173–186
- Wang F, Gong S, Wang T, Li L, Luo H, Wang J, Huang C, Zhou H, Chen G, Liu Z, et al. (2020b) Soyasaponin II protects against acute liver failure through diminishing YB-1 phosphorylation and Nlrp3-inflammasome priming in mice. *Theranostics* 10: 2714–2726
- Wang K, Wang J, Liu T, Yu W, Dong N, Zhang C, Xia W, Wei F, Yang L, Ren X (2021) Morphine-3-glucuronide upregulates PD-L1 expression *via* TLR4 and promotes the immune escape of non-small cell lung cancer. *Cancer Biol Med* 18: 155–171
- Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, de Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L, et al. (2018) SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* 46:W296–W303
- Xie Q, Xiong F, Wu X, Chen J, Gu X, Su C, Xiao L, Zheng Z, Wei Y, Ullah H, et al. (2020) Soyasaponins A₁ and A₂ exert anti-atherosclerotic functionalities by decreasing hypercholesterolemia and inflammation in high fat diet (HFD)-fed ApoE^{−/−} mice. *Food Funct* 11:253–269

- Yang H, Protiva P, Cui B, Ma C, Baggett S, Hequet V, Mori S, Weinstein IB, Kennelly EJ (2003) New bioactive polyphenols from *Theobroma grandiflorum* (“cupuacu”). J Nat Prod 66:1501–1504
- Yang SH, Ahn EK, Lee JA, Shin TS, Tsukamoto C, Suh J, Mei I, Chung G (2015) Soyasaponins Aa and Ab exert an anti-obesity effect in 3T3-L1 adipocytes through downregulation of PPAR γ . Phytother Res 29:281–287
- Zalitis J, Feingold DS (1969) Purification and properties of UDPG dehydrogenase from beef liver. Arch Biochem Biophys 132:457–465
- Zhang XH, Xu XX, Xu T (2015) Ginsenoside Ro suppresses interleukin-1 β -induced apoptosis and inflammation in rat chondrocytes by inhibiting NF- κ B. Chin J Nat Med 13: 283–289
- Zheng G, Gan L, Jia LY, Zhou DC, Bi S, Meng ZQ, Guan GJ, Huang MM, He X, Zhang CF, et al. (2021) Screen of anti-migraine active compounds from Duijinsan by spectrum-effect relationship analysis and molecular docking. J Ethnopharmacol 279:114352
- Zhua JTT, Choi RCY, Xiea HQ, Zhenga KYZ, Guoa AJY, Bi CWC, Laua DTW, Li J, Donga TTX, Laub BWC, et al. (2009) Hibifolin, a flavonol glycoside, prevents β -amyloid-induced neurotoxicity in cultured cortical neurons. Neurosci Lett 461: 172–176

本報に関する論文

Ayumi Kawasaki, Ayaka Chikugo, Keita Tamura, Hikaru Seki, Toshiya Muranaka (2021)
Characterization of UDP-glucose dehydrogenase isoforms in the medicinal legume
Glycyrrhiza uralensis. *Plant Biotechnology*. 38:205-218

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科、村中俊哉教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究を進めるうえで、日頃から貴重なご助言を頂戴しました大阪大大学院工学研究科、關光准教授、安本周平助教に心から御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、*G. uralensis* 308-19 株の苗をご提供いただいた武田薬品工業株式会社（京都府）武田薬品緑化植物園に感謝いたします。また、*G. uralensis* 北海道医療大系統の組織培養ストロンを提供していただいた小城間氏（北海道医療大学）に感謝いたします。

本研究を行うに際し、技術的助言と原稿の講評をいただいた千代直樹氏、技術協力をいただいた深本恵子氏、いつも協力し励ましてくださった細胞工学領域の事務の方、学生の皆様に心から感謝いたします。