

メタボローム解析を基盤とした有用資源植物に関する研究

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 筑波薬用植物栽培試験場
研究者 木内 文之

アントシアニンおよびアルカロイドについて、生産パターン異なる変異体等を用いてメタボローム解析等を行い、生産特異的遺伝子の機能を解析した。また、イチヨウ葉テルペノイド、フラボノイドの季節変動並びにマオウ成分の栽培地による変化を解析した。

分担研究者

- (1) 千葉大学大学院薬学研究院 斉藤和季
- (2) サントリー (株) 先進技術応用研究所 田中良和
- (3) (株) 常磐植物化学研究所 妹尾修次郎

A. 研究目的

植物は生薬として、また医薬品および医薬品製造原料の供給源等として、古くから疾病の治療、健康の維持・増進に大きく貢献してきている。近年様々な疾患の発症メカニズムの解明に伴い、各疾患に特異的な創薬ターゲットの設定とそれに奏功する化合物のハイスループットスクリーニングが行われており、その対象として植物成分は依然重要な位置を占めている。さらに、健康の維持・増進を目的とした食品等として、様々な植物およびその抽出物が市場に出回っている。現在我々が持っている植物の成分に関する知識は、よく研究されている薬用植物についても、主要成分或は非常に活性が強い成分に関するものにすぎず、植物に含まれる成分全体から見ると極く一部に限られたものである。このことが、植物成分の更なる有効利用の妨げになっているとともに、生薬や植物エキスの品質管理の難しさ、さらには散見される植物成分による健康被害の原因の一つとなっている。

近年、高速液体クロマトグラフィー／質量分析計 (LC - MS) のような高感度分離分析技術や、飛行時間型質量分析計 (TOFMS) およびフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計 (FT - ICR - MS) のような高分解能分析技術の発展に伴い、生体成分全体 (メタボローム)

を網羅的に分析し、生体機能の理解に繋げようとする研究が生まれて来た。このメタボローム解析を有用資源植物に適用することにより成分の全体像を把握することは、生薬や植物エキス製品の有効性・安全性を評価する有効な手段となることが期待されるとともに、新たな成分の発見とその利用に道を拓くことが期待される。また、植物の栽培条件・気候条件等の変化による成分プロファイルの変化を検討することにより、栽培条件等の改良や製品の品質管理に有効に利用できると考えられる。さらに、メタボローム解析によって得た情報を発現遺伝子の情報と組み合わせることにより、特定の2次代謝産物の生合成に関与する遺伝子の同定および代謝経路の制御機構の全体像の理解が可能になると考えられることから、植物による薬用成分等の効率的な生産の基礎となることが期待される。

本研究では、イチヨウ葉の化学成分についてその季節変動を明らかにして最も良い採集時期を決定し、GAP に準じたイチヨウ葉の栽培に役立て、イチヨウ葉エキスの安定した多成分系を継続的に安定供給することに役立てるための基礎的データを得るとともに、マオウの化学成分の網羅的分析を検討した。また、シロイヌナズナおよびシソにおけるアントシアニン生産、およびチャボイナモリにおける抗腫瘍性アルカロイドであるカンプトテシン生産について、遺伝子組換えによるメタボロームの変化について検討した。

B. 研究方法

シロイヌナズナおよびシソのアントシアニン過

剰生産変異体である *pap1-D* 変異体およびアカジソと、野生型シロイヌナズナおよびアオジソをコントロールとして用いてアントシアニン生産特異的遺伝子のプロファイリングを行った。シロイヌナズナは全ゲノム情報が利用できるモデル植物であり、DNA チップが利用可能なので、*pap1-D* 変異体については Affimetrix ATH1 Gene Chip を用いたマイクロアレイ解析を行った。また、シソについてはアカジソとアオジソを用いた PCR-select subtraction 法および mRNA differential display 法によりアカジソ特異的遺伝子をプロファイリングした。

また、アラビドプシスのアントシアニンアシル基転移酵素遺伝子ホモログ 2 種 (At1g03940、At3g2959) がコードする酵素活性を明らかにし、これらの遺伝子が組換え植物において植物の二次代謝物にどのような影響を与えるのかを解析した。

さらに、カンプトテシンを高生産するチャボイナモリ毛状根とこの毛状根由来で植物ホルモンの添加により脱分化しアルカロイド生産能を失った懸濁培養細胞を用いて PCR-select subtraction 法により毛状根特異的遺伝子をプロファイリングした。

これらの生産特異的遺伝子について、シロイヌナズナについてはそれぞれの遺伝子のノックアウトラインのメタボロム解析を行い、そのフラボノイド組成の変化から遺伝子の機能を決定した。また、シソから得られたアカジソ特異的遺伝子については組換えタンパク質を用いた生化学的解析の他に、シロイヌナズナのホモログ遺伝子のノックアウトラインに導入することにより機能解析を行った。チャボイナモリについては、メタボロム変化による機能解析を目的にアルカロイド生産特異的遺伝子の RNAi 形質転換毛状根を作製した。

イチョウ葉生産の目的で栽培している (有) 日本イチョウファーム (福島県相馬郡) で標準的固体 5 本を選び、日当たりと個体差を等の条件を平均化するために、縦に竹で 5 分割して、時計回りに区分をずらせて、毎月各個体の 1/5 を 5 固体分合わせて、1 検体とし、5 月から 9 月まで採集した。この検体について、フラボノイド (クエルセチン及びケンフェロール) およびテルペンラクトン (ピロバライド、ギンコライド A、B 及び C) 含量を HPLC で定量した。

生育状況がマオウの成分に与える影響について解析するために、株分けで増やしたマオウの

苗を北海道、筑波、種子島の各薬用植物栽培試験場で栽培している *Ephedra intermedia* (Ep-13 系統) について、開花期並びにそれから 3 週間後の地上部をサンプリングし、60°C で乾燥した後成分を FT-MS で分析した。

尚、本研究は植物のみを対象とすることから、倫理面での問題は無い。

C. 研究結果

(1) シロイヌナズナ *PAP1* 変異体におけるトランスクリプトム解析とメタボロム解析

シロイヌナズナのアントシアニン過剰蓄積変異体 *pap1-D* 変異体では、CaMV 35S プロモーター由来のエンハンサー配列を含むアクティベーションタグにより *Myb* 転写調節因子である *Pap1* 遺伝子の発現が増加している。この変異体について野生型をコントロールとして約 23,000 遺伝子のマイクロアレイ解析を行った。その結果、*pap1-D* では野生型シロイヌナズナと比べて *Pap1* 遺伝子の他にアントシアニン合成の触媒酵素であるカルコン合成酵素 (CHS)、カルコン異性化酵素 (CHI)、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL)、フラボノイド 3-水酸化酵素 (F3H)、デヒドロフラボノール還元酵素 (DFR)、アントシアニン合成酵素 (ANS)、フラボノイド 3'-水酸化酵素 (F3'H) の遺伝子が発現誘導されていることが明らかになった。さらに *pap1-D* 変異体では、機能不明の 3 つの糖転移酵素遺伝子および 2 つのアシル転移酵素遺伝子の発現が有意に上昇していることが明らかとなった。

そこでこれらの糖転移酵素遺伝子ならびにアシル基転移酵素遺伝子について、それぞれのノックアウトラインの代謝物の詳細なプロファイリングを行った。その結果、フラボノイドの配糖化およびアシル化パターンの変化から、それぞれの遺伝子産物の機能が明らかになった。さらに組換えタンパク質を用いた *in vitro* アッセイによりそれぞれの触媒機能が確認された (Tohge *et al.*, 2005)。

(2) アラビドプシスのアントシアニンアシル転移酵素ホモログの機能解析

2 種の cDNA (At1g03940、At3g2959 由来) を導入した大腸菌の発現ベクター (ヒスチジンタグとの誘導蛋白質を発現する) で形質転換した大腸菌を培養し、遺伝子発現を誘導した。大腸菌から、

粗酵素を抽出した後、キレートカラムで組換え酵素を精製した。組換え酵素の発現は、SDS ポリアクリルアミド電気泳動と抗ヒスチジン抗体によるウェスタン法で解析した。組換え酵素を用いてアントシアニンアシル基転移酵素活性を測定し、反応液を高速液体クロマトグラフィーにより解析した。組換え At1g03940、At3g2959 酵素の発現を確認できた。At1g03940 は、Fig. 1 の I の反応 (シアニジン 3-グルコシドに対する芳香族アシル基の転移反応) を、At3g2959 は、Fig. 1 の II の反応 (シアニジン 3, 5-ジグルコシドに対するマロニル基の転移反応) を触媒することが示された。また、At1g03940 は、カフェオイル CoA でもクマロイル CoA でも、利用できた。

(3) アカジソとアオジソを用いたアントシアニン生産特異的遺伝子のプロファイリングと成分プロファイリング

シソにおいて遺伝的に固定されたアントシアニン成分変種であるアカジソとアオジソを用いて、mRNA differential display および PCR-select subtraction を行うことにより、アカジソ特異的遺伝子をプロファイリングした。その結果、アカジソではアオジソに比べてアントシアニン生合成に関与する既知の遺伝子群を始め、光シグナル関連遺伝子およびいくつかの機能不明遺伝子の発現が増加していることが明らかになった。(Yamazaki et al., 2003)。また、アカジソとアオジソの成分プロファイリングにより両者はアントシアニンの含有量には大きな差異が見られるが、ロズマリン酸をのぞき、アントシアニン以外のフラボノイド、アミノ酸や有機酸などの他の成分には大きな差が見られないことが示された。ロズマリン酸のみがアオジソにより多く含まれることが明らかになった。また、これまでにシソのアントシアニン酵素遺伝子群が光により協調的発現誘導を受けることが明らかにされている。そこでアカジソとアオジソにおける光照射に伴うメタボロム変動を解析中である。

(4) アカジソ特異的遺伝子の機能解析

PCR-select subtraction 法および mRNA differential display 法によりアカジソ特異的遺伝子として得られたアントシアニン合成酵素 (ANS)、グルタチオン S-転移酵素 (GST) 遺伝子およびカルコン異性化酵素 (CHI) 遺伝子についてそれぞれの転写産物の機能を解析した。

ANS については、X 線解析に基づく既知のタ

ンパク質の構造をもとにした反応エネルギーの計算結果と ^{18}O 取り込み実験の結果よりロイコアントシアニジンからアントシアニン生成過程の分子メカニズムを明らかにした (Turnbull et al., 2004)。

また、GST と CHI については、PCR-select subtraction 法により得られた cDNA 断片の塩基配列情報をもとに、3'-RACE および 5'-RACE を行いそれぞれの全長 cDNA クローン、*PfGST1* および *PfCHI1* を得た。*PfGST1* は、アントシアニン蓄積部位で発現していた (Fig. 2)。また、シロイヌナズナにおけるホモログ遺伝子の欠損した *tt19* 変異体の葉柄におけるアントシアニン蓄積を相補した (Fig. 3)。このことから *PfGST1* がアントシアニン蓄積に関与する GST であることが示された。ただし、*tt19* 変異体の種皮の色素欠損は *PfGST1* によって相補されなかった。また、*PfCHI1* を大腸菌で発現させて得た組換えタンパク質が CHI 活性を有することが示された。

(5) 各種アントシアニン変異体の抗酸化活性の測定

シロイヌナズナの *pap1-D* 変異体および *PAP1* cDNA 過剰発現体等のアントシアニンを過剰生産する変異体について、それぞれのアントシアニンおよびプロアントシアニン含有量と *in vitro* での抗酸化活性を測定した。その結果、抗酸化活性にはアントシアニンよりもプロアントシアニンが強く寄与することが明らかになり、健康科学への応用を目指した植物抗酸化物質生産エンジニアリングのための基礎的な知見を得た (Nakajima et al., 2004; Tohge et al., 2005)。

(6) チャボイナモリ毛状根におけるカンプトテシン生産特異的遺伝子のプロファイリングと機能解析

まず、カンプトテシン高生産毛状根について成分のプロファイリングを行った。この毛状根から、既知のトリプトファン脱炭酸酵素 (TDC)、ストリクトシジン合成酵素 (STR) 遺伝子のクローニングを行った。また、 $[1-^{13}\text{C}]$ グルコースの毛状根への取り込み実験によりカンプトテシン生合成経路が非メバロン酸経路を経由することを明らかにした (Yamazaki et al., 2004)。また、チャボイナモリにおける効率のよい形質転換系を構築した (Watase et al., 2004; Asano

et al., 2004)。さらにカンプトテシン高生産毛状根と植物ホルモンの添加により脱分化しアルカロイド生産能を失った毛状根由来の懸濁培養細胞を用いて PCR-select subtraction 法により毛状根特異的遺伝子をプロファイリングした。その結果、既知のトリプトファン脱炭酸酵素 (TDC)、ストリクトシジン合成酵素 (STR) 遺伝子の他に、グラニオール 10-水酸化酵素 (G10H)、セコロガニン合成酵素 (SLS)、複数の P450、ABC トランスポーターおよび転写調節因子のホモログ遺伝子断片が得られた。さらにこれらの配列をもとに RNAi コンストラクトを作製し、RI バイナリーベクター系によりチャボイナモリ植物を形質転換し毛状根を得た。現在、これらの毛状根におけるメタボロムの変化を解析中である。

(7) イチヨウ葉成分の季節変動

2003 年に於いては、5 月から 9 月にかけて葉の重量 (Fr. Wt.) が 346g から 649g へと暫増し、乾燥重量も 100.7g から 182.3g へと増加した。乾燥重量に対する総フラボノイド含量は 5 月の 1.66% から 7 月に 1.72% へ増加した後、暫時減少したが最高値の 86% 以上であった。参考に調べた黄変葉 (9 月 29 日に採取) の総フラボン含量は 1.50% を示し、黄変の影響は大きくないと考えられた。フラボノイドの中では kaempferol が減少し quercetin が増加し、kaempferol の一部が quercetin に変換したと思われる。

一方、総テルペノイドは漸増し 7 月に 0.405% になり、その後暫時減少し 9 月には 0.239% になった。参考に採取した黄変葉では総テルペノイド含量が 0.104% と 7 月の 1/4 になった。bilobalide, ginkgolide A, ginkgolide B, ginkgolide C のテルペンノイドはいずれも減少した、黄変に伴ってテルペノイドは分解するか又は幹、根の組織に移行する可能性が示唆された。2003 年は 10 年に 1 度という冷夏の年であり、葉の面積当り生産量が例年に比べて少なかったため、2003 年 10 月末に施肥 (堆肥) を行なった。その結果、2004 年 8 月末の 1 本当り乾燥葉重量が前年度の 2.7 倍となった。2004 年度の気候は 8 月に乾燥気味ではあったが例年と同じ程度の気温、降雨量、日照時間であった。総フラボン重量およびテルペン重量は夫々 2003 年が 1.66 g から 2.36 g および 0.244 g から 0.586 g であったのに対して、2004 年は夫々

3.73 g から 5.48 g および 0.824 g から 1.610 g と大きな増大を示した。

(8) マオウ成分の網羅的解析

北海道、筑波、種子島の 3 栽培地で各々 2 つの生育時期に採取したサンプル (合計 6 検体) の FT-MS データについて主成分分析を行った結果、これらの検体は各々明瞭に区別ができ、各々の関係を見ると、同一栽培地の検体は他の栽培地のものと較べ近い関係にあった。また、栽培地間で見ると、筑波と種子島が北海道に較べより近い関係にあった。しかし、主成分分析では各栽培地或は開花期とその後を区別する特徴は見られなかった。これらを区別する特徴については、個々のデータを更に細かく検討する必要がある。

FT-MS 分析では、一つの成分が一つの質量ピークとして現れることを前提としているが、今回の分析では、マオウの主要成分であるエフェドリンの脱水体に相当する質量イオンが、エフェドリンのイオンの 4 倍程度の強度で観察された。この脱水体相当イオンが観測された ionspray - positive TOF の条件でエフェドリンの MS を測定すると脱水体のイオンが出やすいこと、このイオンとエフェドリンのイオン強度の比が、異なるサンプル間でほぼ一定であることなどから、このイオンは本来サンプル中であつた化合物ではなく、測定中にエフェドリンから生じたフラグメントイオンが強く観測されたものと考えられる。

D. 考察

シロイヌナズナの *papI-D* 変異体で発現上昇している遺伝子を解析することにより、アントシアニンおよびフラボノールの糖転移およびアシル転移を触媒する酵素遺伝子を明らかにした。シロイヌナズナゲノム中には糖転移酵素遺伝子が約 150、アシル転移酵素が約 60 も存在するが、このうちアントシアニン生産特異的遺伝子を絞り込むことによってアントシアニンの分子修飾に関わる遺伝子を特定することができた。

アラビドプシスのアントシアニンにアシル基を転移する (Fig. 1) には、2 つの芳香族アシル基と 1 つのマロニル基が含まれる。これらの転移反応を触媒する酵素も BAHc アシル基転移酵素ファミリーに属する At1g03940 および At3g2959 であることがわかった。また Fig. 1 の III の反応は、別のアシル基転移酵素により触媒されると思

われる。

また、ゲノム情報が利用できないシソについては、成分変種を用いてアントシアニン生産する変種特異的の遺伝子をプロファイリングした。この結果をシロイヌナズナ *PAP1* 変異体におけるマイクロアレイ解析結果と比較すると、シソでは光シグナル伝達以下で想定される *PAP1* 相当の調節因子による制御より上流において遺伝子発現が制御されることによりアカジソにおけるアントシアニン過剰蓄積に至っていることが明らかになった。さらにアカジソから得られた新規の *GST*, *CHI* 遺伝子について、それぞれシロイヌナズナのホモログ遺伝子欠損変異体の相補および組換えタンパク質を用いた *in vitro* アッセイによりそれぞれの機能を明らかにした。*PfGST1* によって *tt19* 変異体の種皮の色素欠損が相補されなかったのは、ペチュニアの *AN9* が *tt19* の種皮色素欠損を相補しないことと同様であり、*PfGST1*, *AN9* と *TT19* の間に種皮のプロアントシアニン蓄積における働きに違いのあることが示唆された。

また、これらのアントシアニン過剰生産変異体についてその抗酸化活性の健康科学への応用を目指して、それぞれのアントシアニンおよびプロアントシアニン含有量と *in vitro* での抗酸化活性を測定した。その結果、抗酸化活性にはアントシアニンよりもプロアントシアニンが強く寄与することが明らかになり、植物抗酸化物質生産エンジニアリングのための基礎的な知見を得た。

イチヨウ葉の生産量は肥料及び気候によって大きく変動することがわかった。またイチヨウ葉中のフラボノイドおよびテルペノイドの含有率 (%) は好天に恵まれ、施肥を行って成長が良い条件では低下した。しかし、固体当りの収穫量は増加した。日本におけるイチヨウ葉の栽培条件を確立するためには更に研究を継続する必要があると思われる。

3ヶ所栽培地で各々2つの生育時期に採取したマオウのサンプル(合計6検体)のFT-MS分析データを用いた主成分分析により、これらのサンプルを明瞭に区別できたことから、FT-MSによる成分の網羅的分析は、薬用植物の栽培地や生育時期を区別する一つの手法となり得るものと考えられる。しかし、各産地或は生育時期等を判別するには、多くの検体を測定してデータを蓄積し、その中から各検体を特徴付ける成分パターンを抽出する必要があるものと思われる。また、FT-MSによる含有成分の分析におい

ては、本来サンプルに含まれていない化合物に相当するイオンが強く検出される可能性があることを考慮して、化合物の同定を確実に行う必要がある。

E. 結論

植物成分の網羅的分析を利用解析手法により、アントシアニン等の生合成に於ける遺伝子発現と物質代謝の関連に関する有用な知見を得ることができた。また、成分の網羅的分析が薬用・有用植物の規格、品質管理などに利用できるものであることも明らかになった。こうしたメタボローム解析の手法を利用した研究は、データを蓄積することにより有用資源植物に関する研究に様々な活用が期待できるものである。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) J. J. Turnbull, J. Nakajima, R.W.D. Welford, M. Yamazaki, K. Saito and C.J. Schofield (2004) Mechanistic studies on three 2-oxoglutarate-dependent oxygenases of flavonoid biosynthesis—Anthocyanidin synthase, flavonol synthase, and flavone 3 β -hydroxylase. *J. Biol. Chem.*, **279**: 1206-1216
- 2) Y. Yamazaki, M. Arita, H. Takayama, H. Sudo, M. Yamazaki, N. Aimi, and K. Saito (2004) Biosynthesis of camptothecin. *In silico* and *in vivo* tracer study from [1-¹³C] glucose. *Plant Physiol.* **134**: 161-170
- 3) I. Watase, H. Sudo, M. Yamazaki, and K. Saito (2004) Regeneration of transformed *Ophiorrhiza pumila* plants producing camptothecin. *Plant Biotech.*, **21**: 337-342
- 4) T. Asano, I. Watase, H. Sudo, H. Takayama, N. Aimi, M. Yamazaki, and K. Saito (2004) Camptothecin production by *in vitro* culture of *Ophiorrhiza liukiensis* and *O. kuroiwai*. *Plant Biotechnology*, **21**: 275-281
- 5) J. Nakajima, I. Tanaka, S. Seo, M. Yamazaki and K. Saito (2004) LC-PDA/ESI-MS profiling and radical scavenging activity of anthocyanins in various berries. *J. Biomed. Biotech.*, **2004**: 241-247
- 6) T. Okada, M. M. Yokota-Hirai, H.

Suzuki, M. Yamazaki and K. Saito (2005) Molecular characterization of a novel quinolozidine alkaloid *O*-tigloyltransferase: cDNA cloning, catalytic activity of recombinant protein and expression analysis in *Lupinus* plants. *Plant Cell Physiol.*, 46: 233-244

2. 学会発表

- 1) M. Yamazaki, Y. Yamazaki, A. Urano, T. Asano, H. Sudo and K. Saito, Profiling of metabolites and transcripts in camptothecin producing plants. 3rd International Congress on Plant Metabolomics, アイオワ (米国)、平成 16 年 6 月 3-6 日
- 2) 峠隆之、栗津原元子、野路征昭、山崎真巳、関原明、小林正智、篠崎一雄、斉藤和季、シロイヌナズナアクティベーションタグラインを用いたメタボロミクス-フラボノイド蓄積量の変化した変異株のスクリーニングと網羅的遺伝子発現解析および代謝物プロファイリング-. 第 22 回日本植物細胞分子生物学会・シンポジウム、秋田、平成 16 年 8 月 9-10 日
- 3) 西山泰孝、峠隆之、北山雅彦、山崎真巳、斉藤和季、*PAP1* 遺伝子過剰発現体を用いた網羅的解析によるアントシアニン生合成関連酵素遺伝子の特定と機能解析. 第 22 回日本植物細胞分子生物学会・シンポジウム、秋田、平成 16 年 8 月 9-10 日
- 4) 柴田雅久、西山泰孝、峠隆之、山崎真巳、斉藤和季、赤シソ特異的に発現する遺伝子群のプロファイリングと機能解析. 第 22 回日本植物細胞分子生物学会・シンポジウム、秋田、平成 16 年 8 月 9-10 日
- 5) 岡田岳人、平井優美、山崎真巳、斉藤和季、ルピン系アルカロイド生合成を触媒するアシル転移酵素「13 α -ヒドロキシマルチフロリン/13 α -ヒドロキシシルパニン *O*-チグロイル転移酵素 (HMT/HLTase)」遺伝子の機能解析. 日本生薬学会第 51 回年会、神戸、平成 16 年 9 月 9-10 日
- 6) 浅野孝、須藤浩、北島満里子、高山廣光、相見則郎、山崎真巳、斉藤和季、リュウキユウイナモリ毛状根のエリシター等によるインドールアルカロイド生産制御. 日本生薬学会第 51 回年会、神戸、平成 16 年 9 月 9-10 日
- 7) M. Yamazaki, Integration of metabolomics and transcriptomics of

anthocyanin over-producing mutants in *Arabidopsis thaliana* and *Perilla frutescens* var. *crispa*. Germany-Japan Seminar on Molecular Regulation of Plant Secondary Metabolism, かずさ、平成 16 年 9 月 20-23 日

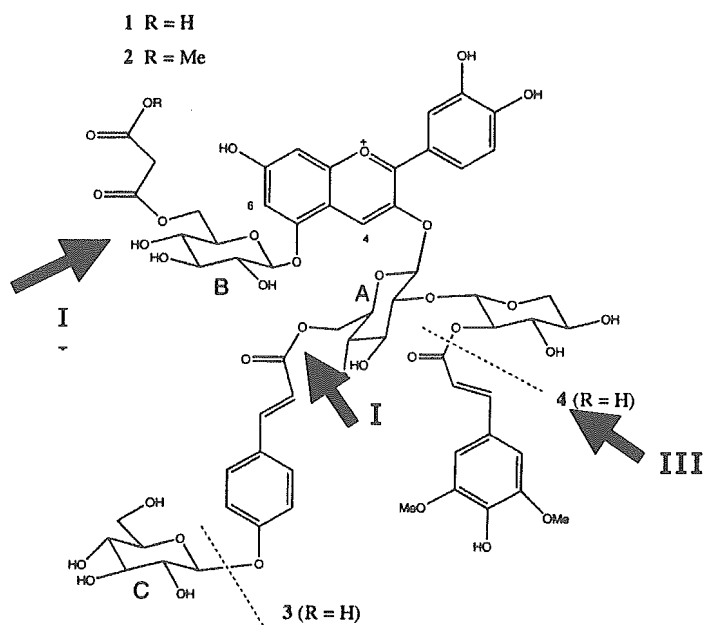
- 8) 荒川雄一郎、岡田岳人、平井優美、山崎真巳、斉藤和季、ルピン系アルカロイド生合成に関与すると考えられる時アミン酸化酵素に関する生化学的・分子生物学的研究. 第 48 回日本薬学会関東支部大会、千葉、平成 16 年 10 月 9 日
- 9) 山崎真巳、アントシアニン変異体におけるトランスクリプトミクスとメタボロミクスの統合-モデル植物から実用植物へ-、第 41 回植物化学シンポジウム「植物二次代謝の分子生物学の展開」、京都、平成 16 年 11 月 26 日

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

Table 1 組換えアシル基転移酵素を用いた反応のまとめ。%は、クロマトグラムの面積。

アシル受容体	cyanidin 3-glucoside			cyanidin 3-sophoroside			cyanidin 3,5-diglucoside		
	カフェオイル-CoA	クマロイル-CoA	マロニル-CoA	カフェオイル-CoA	クマロイル-CoA	マロニル-CoA	カフェオイル-CoA	クマロイル-CoA	マロニル-CoA
At1g03940	73.8%	70.8%	0.0%	1.7%	1.064% (18.647分)	0.0%	2.3%	1.661% (17.831分)	0.0%
					1.72% (21.507分)	0.0%		5.052% (19.219分)	
								3.172% (21.535分)	
At3g29590	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.6%

Fig. 1 アラビドプシスに含まれるアントシアニン



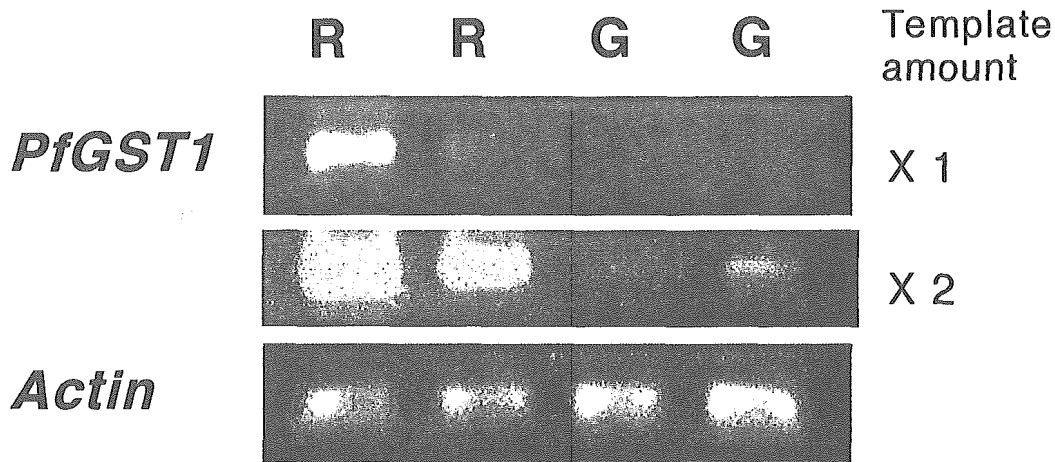


Fig. 2 *PfGST1* の発現解析

半定量的 RT-PCR によりアカジソ葉 (RL)、アカジソ茎 (RS)、アオジソ葉 (GL)、アオジソ茎 (GS) における *PfGST1* の発現を解析した。*PfGST1* の発現量は、赤ジソの葉で最も多く、ついでアカジソ茎、青ジソ茎の順であった。この発現パターンはそれぞれの組織のアントシアニン含有量と相関していた。

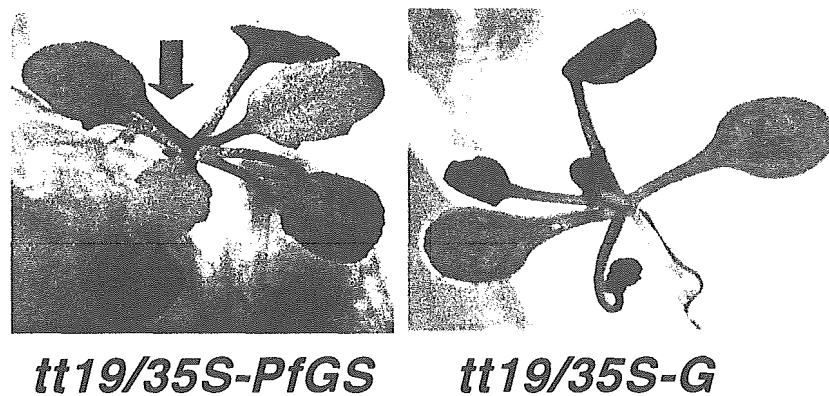


Fig. 3 *PfGST1* によるシロイヌナズナ *tt19* 変異体におけるアントシアニン蓄積欠損の相補

CaMV35S プロモーター下流に *PfGST1* あるいは β -グルクロニダーゼ 遺伝子を結合したキメラ遺伝子をシロイヌナズナ *tt19* 変異体に導入した。写真は、抗生物質をふくむ選択培地で培養した T1 植物である。*PfGST1* の導入発現によって葉柄におけるアントシアニン蓄積能が回復した。