

博士論文

メタボローム解析技術による植物二次代謝
産物の代謝経路の探索

令和3年（2021年）

平賀靖英

目次

略語表	1
第1部 序論	4
1.1 植物成分と Sustainable Development Goals.....	4
1.2 植物成分の総数	7
1.3 植物成分の多様性	10
1.4 メタボローム解析	18
1.5 本研究の目的	22
第2部 ヒメツリガネゴケのフラボノイド代謝研究	26
2.1 緒言	26
2.2 材料および方法	28
2.2.1 植物材料.....	28
2.2.2 試薬.....	28
2.2.3 培養条件および分析条件.....	29
2.2.4 安定同位体元素を用いた培養条件.....	30
2.2.5 LC-Orbitrap™-MS 分析条件.....	31
2.2.6 メタボローム解析.....	31
2.2.7 ShiftedIonsFinder の概要と活用	34
2.3 結果	36
2.3.1 ヒメツリガネゴケのメタボローム解析.....	36
2.3.2 ヒメツリガネゴケのフラボノイド解析.....	38
2.3.3 ヒメツリガネゴケのルテオリンの検出と確認.....	42
2.4 考察	45
第3部 ミヤコグサのフラボノイド代謝研究	50
3.1 緒言	50
3.2 材料および方法	57
3.2.1 試薬.....	57
3.2.2 LjF8H 遺伝子の単離	57
3.2.3 LjF8H 遺伝子のゲノム構造	58
3.2.4 LjF8H の分子系統解析	58
3.2.5 LjF8H 遺伝子の発現解析	61

3.2.6	LjF8H 遺伝子の酵母での異種発現系の構築	62
3.2.7	酵母ミクロソーム画分の調製および LjF8H の活性反応	62
3.2.8	LC/MS 解析	64
3.2.9	基質ナリングニンの酵素反応生成物の精製および NMR 測定	65
3.2.10	LjF8H 遺伝子のシロイヌナズナでの異種発現系の構築	66
3.2.11	形質転換シロイヌナズナ植物を用いた LjF8H の活性反応	67
3.2.12	ペチュニアでの LjF8H 遺伝子の異種発現系の構築	68
3.2.13	形質転換ペチュニア植物の代謝産物解析	69
3.3	結果	71
3.3.1	LjF8H の cDNA クローンの選抜および同定	71
3.3.2	LjF8H の系統樹分析	75
3.3.3	異なる植物器官および花の発達段階における LjF8H の発現解析	79
3.3.4	酵母における組換え LjF8H の酵素活性と補因子効果	81
3.3.5	酵母における組換え LjF8H の基質受容性の確認	84
3.3.6	他植物における LjF8H の異種発現	93
3.4	考察	100
第4部	パパイヤのアルカロイド代謝研究	106
4.1	緒言	106
4.2	材料および方法	111
4.2.1	植物材料	111
4.2.2	代謝産物の抽出	111
4.2.3	LC-Orbitrap TM -MS 分析	112
4.2.4	データ処理およびピークアノテーション	114
4.2.5	統計解析	116
4.2.6	タンパク質分解酵素の活性測定	117
4.2.7	ベンジルグルコシノレート (BG) の定量分析	117
4.2.8	総ポリフェノール含有量の測定	118
4.2.9	パパイヤの茎と根における BG の定量分析	119
4.2.10	新鮮パパイヤ果実におけるタンパク質分解酵素の活性測定	120

4.3	結果	122
4.3.1	パパイヤ抽出物のメタボローム解析	122
4.3.2	パパイヤ果実の果皮と果肉の比較メタボローム解析	128
4.3.3	LC/MS データを用いたカルパイン誘導体のアノテーション	131
4.3.4	カルパイン誘導体の推定代謝ネットワーク	146
4.3.5	乾燥処理のパパイヤの機能性の評価	148
4.4	考察	151
	総括	154
	謝辞	157
	参考文献	159
	印刷公表論文	185

略語表

2ODD/2ODG/DOX	2-Oxoglutarate-dependent dioxygenase
BA	Benzyl adenine, 6-Benzylaminopurine
BG	Benzyl glucosinolate
C4H	Cinnamate 4-hydroxylase
CDS	Coding sequence
CYP	Cytochrome P450, Cytochrome P450-dependent monooxygenase
CaMV35S	Cauliflower mosaic virus 35S
CoA	Coenzyme A
Col-0	Columbia-0
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
DW	Dry Weight
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ESI	Electrospray ionization
F3H	Flavanone 3-hydroxylase
F3'5'H	Flavonoid 3', 5'-hydroxylase
F3'H	Flavonoid 3'-hydroxylase
F6H	Flavonoid 6-hydroxylase
F8H	Flavonoid 8-hydroxylase
FAD	Flavin adenine dinucleotide
FAOSTAT	Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database
FLS	Flavonol synthase
FMO	Flavin containing monooxygenase
FNS I	Flavone synthases I
FNS II	Flavone synthases II
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry
GC/MS	Gas chromatography-mass spectrometry
GNPS	Global Natural Products Social Molecular Networking
Glc	Glucose
GlcUA	Glucuronic acid
HPLC	High performance liquid chromatography
Hz	Hertz

IPP	Isopentenyl diphosphate
IT	Injection Time
LC-FT-ICR/MS	Liquid chromatography-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry
LC-HRMS	Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
LC/MS	Liquid chromatography/mass spectrometry
MEP	2-C-Methyl-D-erythritol 4-phosphate
MS	Murashige and Skoog
MS/MS	Tandem mass spectrometry
MVA	Mevalonate
NAA	α -Naphthaleneacetic acid, 1-Naphthaleneacetic acid
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NMR	Nuclear magnetic resonance
OX	Over-Expression
PAL	Phenylalanine ammonia-lyase
PAO	Protochlorophyllide a oxygenase
PCA	Principal component analysis
PCR	Polymerase chain reaction
PDA	Photodiodearray
QC	Quality Control
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse transcription PCR
Rha	Rhamnose
SD	Synthetic Defined
SDGs	Sustainable Development Goals
SG	Synthetic Growth
TLC	Thin-layer chromatography
TM	Trade Mark
TPS	Terpene synthase
U	Unit
UV	Ultraviolet
VC	Vector Control

Xyl	Xylose
cDNA	complementary DNA
cps	Counts per Second
min	Minute
ppm	Parts per Million

第1部 序論

1.1 植物成分と Sustainable Development Goals

Sustainable Development Goals (SDGs, 持続可能な開発目標) は、未来の地球と人類のために、持続可能な開発を行い、人類が共存できる社会を作るための17の具体的な目標を定めたものであり、2015年9月の国連サミットで国連加盟193か国が2016年から2030年の15年間で達成するために掲げた目標である (<https://www.jp.undp.org/content/tokyo/ja/home/sustainable-development-goals.html>)。民間企業でもそれぞれの目標に貢献できるかを組織の社会的責任として取り組んでいる。

植物成分を中心とする植物科学の研究は、これら17の具体的な目標に対して、多くの項目で直接的或いは間接的に貢献できる可能性を秘めていると考えられている(図1)。例えば、①穀物、豆類などの植物は、農作物の観点から目標2(飢餓をゼロに)に直接的に貢献でき、②医薬品原料や機能性食品の原料の観点から目標3(すべての人に健康と福祉を)に直接的に貢献でき、③植物油脂および糖由来アルコールなどのバイオ燃料の観点から目標7(エネルギーをみんなにそしてクリーンに)に直接的に貢献できるなど3つの項目は想像しやすい。また、工業原材料(天然ゴムなど)、森林形成、生物循環および環境などの観点を考慮すると、④目標6(安全な水とトイレを世界中に)、⑤目標9(産業と技術革新の基盤をつくろう)、⑥目標11(住み続けられるまちづくりを)、⑦目標13(気候変動に具体的な対策を)、⑧目標14(海の豊かさを守ろう)および⑨目標15(陸の豊かさも守ろう)に間接的に貢献できるなど6つの項目まで拡大可能である。このように、植物科学の研究の魅力は、地球

上の人類が誰でも関心を持つ研究として、SDGsの17項目の内、少なくとも9項目に貢献できる研究開発成果を生じる研究分野であると考えられる（表1）。こうした状況から、植物科学の研究の中で、植物成分の研究が新たな産業創出および経済成長の分野にも拡大可能であると考えられる。

最近、植物を「物質生産のためのバイオリクター」と考え、植物に外来有用遺伝子の導入を行い、これを用いて効率的に医薬品や工業製品の原料を生産するというシステムを構築して、遺伝子組換え植物を利用する「植物分子農業（Plant Molecular Farming）」という新しい農業形態が提案されている（Buyel 2018）。植物を用いた物質生産自体は従来から研究されていたが、単純な生産コストでは化学プラントや微生物発酵による生産に打ち勝てなかった。しかしながら、廃棄物処理や環境負荷を含めた地球上の物質循環全体の維持コストを考えると、またその持続性のための技術開発や産業創出も考慮すると、植物を用いた物質生産には新たな優位性が期待されている（Mohammadinejad *et al.* 2019）。このように、SDGsの観点からも植物科学は世界的に注目されてきており、新たな価値の創造のための挑戦が始まっている。

SUSTAINABLE DEVELOPMENT GOALS



図 1 SDGs の具体的目標と植物科学研究がもたらす SDGs の具体的目標への効果

赤枠：直接的な貢献，青枠：間接的な貢献 出典元 国連開発計画（UNDP）駐日代表事務所 赤と青の枠づけは筆者による追記

表 1 SDGs の具体的目標と関連する植物成分

番号	SDGs の具体的目標	関連する植物成分
2	飢餓をゼロに	炭水化物，タンパク質，脂質，ビタミン，ミネラルなど
3	すべての人に健康と福祉を	アルカロイド，フラボノイド，タンニン，ポリフェノールなど
6	安全な水とトイレを世界中に	水質浄化に関与する成分など
7	エネルギーをみんなにそしてクリーンに	糖類，発酵アルコール，油脂，脂肪酸など
9	産業と技術革新の基盤をつくろう	パルプ，天然ゴム，木材，色素など
11	住み続けられるまちづくりを	森林浴，花に関与する成分など
13	気候変動に具体的な対策を	光合成に関与するタンパク質など
14	海の豊かさを守ろう	生物循環に関与するタンパク質など
15	陸の豊かさも守ろう	生物循環に関与するタンパク質など

1.2 植物成分の総数

古くから、植物は人類に薬、繊維および栄養を提供する天然有機化合物（化学物質）の宝庫の源として役立ってきた（表 2）（Saklani and Kutty 2008; Wurtzel and Kutchan 2016）。植物成分には一次代謝産物（primary metabolite）と二次代謝産物（secondary metabolite）が存在し、主として、炭素、水素、酸素、窒素から構成される有機化合物である。これら植物成分は全て植物生体内の物質代謝系によって創りだされるものであり、植物に限らず生物の創り出す有機化合物が「代謝産物（metabolites）」と呼ばれる理由はそのためである。一次代謝産物とは、生体を維持するのに必須の物質群であり、DNA、RNA、タンパク質、炭水化物、脂質など高分子化合物およびその構成単位であるアミノ酸、単糖類、脂肪酸などが挙げられる。これらは、植物以外の生物にも共通の物質群である。また、植物の細胞壁の主成分である高分子多糖類のセルロースおよびヘミセルロースは、植物体を構成する不溶性繊維質として分類され、高等植物の木化に関与する高分子のフェノール性化合物であるリグニンは、木質の繊維として分類され、同じく植物の一次代謝産物として分類されている。一方、二次代謝産物は、先に述べた医薬品原料（表 2）になっているという実績がある（Wurtzel and Kutchan 2016）。二次代謝産物は、脂肪酸、アミノ酸など一次代謝系から派生してできた天然有機化合物である。植物成分の中には、未だその必要性が解明されていない植物成分もあるが、花の色素のような受粉における誘因成分や防虫効果を持つ一部の成分では、その機能が知られている（安田 2003）。二次代謝産物が生物にとって広く生産され、共通に存在する化学成分でないことから、副次的物質という意味から、二次代謝産物と呼ばれている。また、二次代謝産物はそれぞれの生物にとって固有の産物である点が

根本的に異なるので、植物特異（的）代謝産物（Specialized Metabolites）と呼ばれる場合が増えてきた。植物が生産する代謝産物は、いずれも人類にとっては重要な存在であるが、それぞれの利用のされ方には大きな違いがある。人類は野菜や穀類などに含まれる一次代謝産物を栄養素として摂取しているのに対し、薬用として利用してきた植物の薬効成分はいずれも二次代謝産物である（Wurtzel and Kutchan 2016）。

以上のように、植物成分（代謝産物）は重要であることが分かるが、果たして、地球上にどのくらいの植物成分が存在するのかは非常に興味を持たれる。

維管束植物（維管束と呼ばれる通道組織を有する植物）は、地球上に約 39.1 万種も存在（The Royal Botanic Kew Gardens 2016）すると報告され、種子植物（顕花植物）の総数は、22 万～26 万種と考えられている（Scotland and Wortley 2003）。2003 年、Dixon と Strack らにより植物界全体では 20 万種の多種多様な代謝産物の存在が予測されている（Dixon and Strack 2003）が、最近、生物情報学を用いて、その数はより精密に計算予測されている。学術論文に報告のある天然有機化合物を集めたデータベースが国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学計算システムズ生物学研究室の金谷重彦教授により整理されて、

KNApSAcK Family

（http://www.knapsackfamily.com/KNApSAcK_Family/）という名前で公開されている（Afendi *et al.* 2012）。そこには、2 万 2 千の植物から約 5 万 1 千種類の植物成分が登録されていて、植物と成分分布データの統計解析の結果から、1 種の植物だけに特異的な成分は平均して 4.7 個であることから、地球上の植物成分の総数は少なくとも約 106 万種類存在すると見積もられている（Afendi *et al.* 2012）。植物成分が単離・構造決定され、論文公開されている総数が、5 万 1 千個（2 万 2 千種の植物成分）であり、薬用植物として認識されている植物が

全体の10%未満（約2万8千種）であること（The Royal Botanic Kew Gardens 2017）を考慮すると、地球上にはまだ人類が知らない植物成分が数多く存在する可能性が秘められている。また、新薬の約6割は天然有機化合物からの構造情報を利用しているという調査結果を考慮すると、今後、未利用の植物種から新規の機能性（生理活性）成分の発見が期待される（斉藤 2017）。

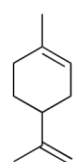
表2 代表的な植物天然有機化合物とその用途

植物成分 ()内は英名	植物名 ()内は学名	用途 ()内は英名
コカイン (cocaine)	コカノキ (<i>Erythroxylum coca</i>)	局所麻酔 (local anesthesia)
パクリタキセル (paclitaxel)	太平洋イチイ (<i>Taxus brevifolia</i>)	癌 (cancer)
キニーネ (quinine)	キナノキ (<i>Cinchona officinalis</i>)	マラリア (malaria)
アルテミシン (artemisinin)	コカノキ (<i>Erythroxylum coca</i>)	マラリア (malaria)
スコポラミン (scopolamine)	ベラドンナ (<i>Atropa belladonna</i>)	鎮痙薬 (antispasmodic)
グリチルリチン (glycyrrhizin)	スペインカンゾウ (<i>Glycyrrhiza glabra</i>)	消炎薬, 去痰薬 (anti-inflammatory, expectorant)
セルロー (cellulose)	ワタ (<i>Gossypium davidsonii</i>)	綿布 (cotton cloth)
ピレトリン I (pyrethrin I)	シロバナムシヨケギク (<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i>)	昆虫防除 (insect control)
β-カロテン (β-carotene)	トウモロコシ (<i>Zea mays</i>)	プロビタミン A (provitamin A)
ジゴキシン (digoxin)	ジギタリス (<i>Digitalis purpurea</i>)	うっ血性心不全 (congestive heart failure)
アジマリン (ajmaline)	インドジャボク (<i>Rauwolfia serpentina</i>)	心不整脈 (cardiac arrhythmia)

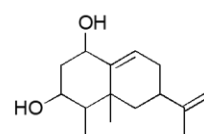
1.3 植物成分の多様性

先に述べた通り、植物は約 100 万種以上を超える多様な天然有機化合物を生産すると考えられている (Afendi *et al.* 2012) . その植物の天然有機化合物の多様性は、生合成経路により、3 分類に大別することができる。植物成分、つまり植物由来天然有機化合物の代表的なものとして、1) テルペノイド (terpenoid) , 2) アルカロイド (alkaloid) および 3) フェニルプロパノイド (phenylpropanoid) が挙げられる (Buchanan *et al.* 2015) (図 2) .

テルペノイド (25,000 種類以上)
メバロン酸・非メバロン酸経路

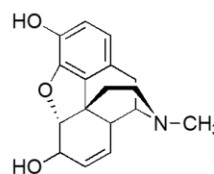


リモネン
(モノテルペン)

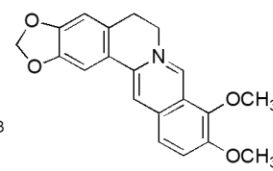


カプジオール
(セスキテルペン)

アルカロイド (12,000 種類以上)
アミノ酸類

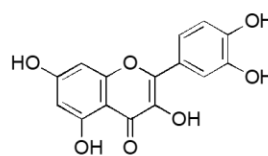


モルヒネ

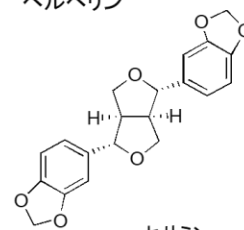


ベルペリン

フェニルプロパノイド (8,000 種類以上)
シキミ酸経路, 酢酸-マロン酸経路



ケルセチン



セサミン

図 2 多様な構造を持つ植物二次代謝産物の種類と生合成経路

1) テルペノイドとは、炭素数 5 のイソプレン単位からなる一群の天然有機化合物の総称であり、イソプレノイド経路により生合成される (水谷ら. 2019; 竹田ら. 2017) . イソプレン単位の数によって分類する場合、炭素数が 5 個の

ものはヘミテルペン (hemiterpene) , 10 個のものはモノテルペン

(monoterpene) , 15 個のものはセスキテルペン (sesquiterpene) , 20 個のものはジテルペン (diterpene) , 25 個のものはセスタテルペン (sesterterpene) , 30 個のものはトリテルペン (triterpene) , 35 個のものはセスクアテルペン

(sesquarterpene) , 40 個のものはテトラテルペン (tetraterpene) という. これらのテルペノイドは, 異なるテルペノイド合成酵素 (terpene synthase, TPS) により生合成されることが知られている (図 3) .

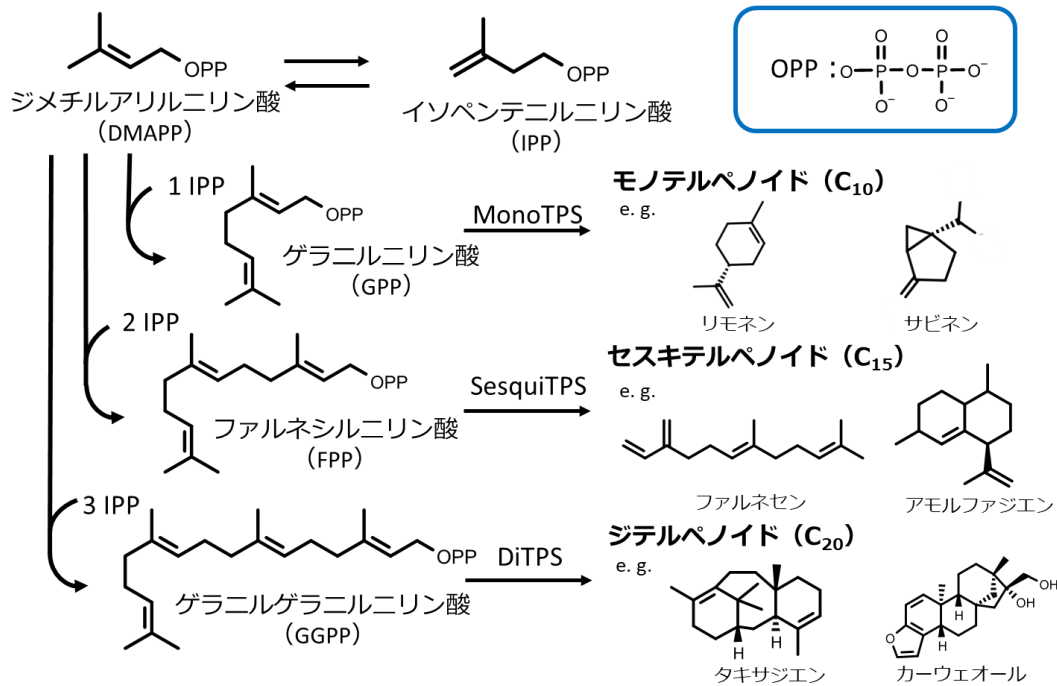


図 3 異なるテルペノイド合成酵素 (Terpene synthase; TPS) により生合成されるテルペノイドの多様性

DMAPP, Dimethylallyl diphosphate; IPP, Isopentenyl diphosphate; GPP, Geranyl diphosphate; FPP, Farnesyl diphosphate; GGPP, Geranylgeranyl diphosphate; MonoTPS, Monoterpene synthase; SesquiTPS, Sesquiterpene synthase; DiTPS, Diterpene synthase

炭素数 10 および 15 の例として、レモンやオレンジの香り成分であるモノテルペンのリモネン (limonene) および唐辛子に含まれるファイトアレキシンの 1 種であるセスキテルペンのカプシジオール (capsidiol) などが有名である (図 2) . また、テルペノイド (イソプレノイド) 経路は、メバロン酸 (MVA) を生合成中間体とする「メバロン酸経路 (MVA 経路)」と、MVA が関与しない別の生合成ルートである「非メバロン酸経路 (2-C-メチル-D-エリスリトール-4-リン酸 : MEP 経路)」に分けることができる (図 4) . MVA 経路は細胞質に、MEP 経路は葉緑体や白色体などのプラスチドに存在する . MVA 経路は、酢酸の活性化体であるアセチル補酵素 A (アセチル CoA) より始まる . アセチル CoA がクライゼン縮合によってアセチル化体であるアセトアセチル CoA となり、さらにアルドール縮合を受けると炭素数 6 の 3-ヒドロキシ-3-メチル-グルタリル CoA (HMG-CoA) が生成する . すなわち、3 分子のアセチル CoA から 1 分子の HMG-CoA が生成する . 続いて、HMG-CoA が還元されると本経路の重要な中間体である MVA が合成される . その後、数工程の反応を経て、炭素数 5 の炭素鎖伸長反応の出発物質であるイソペンテニル二リン酸 (IPP) に変換される . サポニンで知られているトリテルペン、ステロイドなどが MVA 経路により生合成される (図 4) . 一方、モノテルペン、ジテルペンおよび β カロテンで知られているテトラテルペンは、MEP 経路により、生合成される (図 4) . 以上、これらテルペノイドは最も多様性に富む植物成分として知られており、2 万 5 千種以上、単離報告されている (Buchanan *et al.* 2015) (図 2) .

色素体

細胞質基質

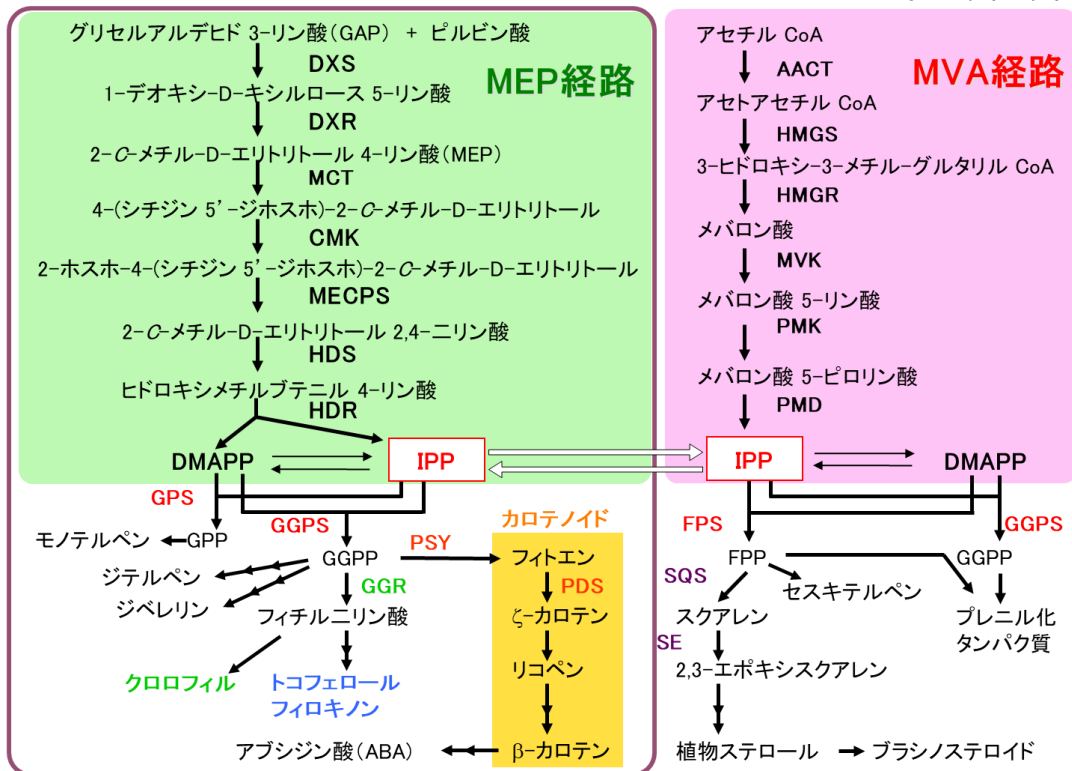


図4 高等植物におけるテルペノイド（イソプレノイド）代謝経路の一部

In the MEP pathway,

GAP, D-Glyceraldehyde 3-phosphate; DXS, 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase; DXR, 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase; MEP, 2-C-Methyl-D-erythritol 4-phosphate; MCT, 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphate cytidyltransferase; CMK, 4-(Cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase; MECPS, 2-C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase; HDS, Hoxymethylbutenyl diphosphate synthase; HSR, Hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase; DMAPP, Dimethylallyl diphosphate; IPP: Isopentenyl diphosphate; GPS, Geranyl diphosphate synthase; GPP: Geranyl diphosphate; GGPS, Geranylgeranyl diphosphate synthase; GGPP, Geranylgeranyl diphosphate; GGR, Geranylgeranyl diphosphate reductase; ABA, Abscisic acid; PSY, Phytoene synthase ; PDS, Phytoene desaturase.

In the MVA pathway,

AACT, Acetoacetyl-CoA thiolase; HMGS, Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase; HMGR, Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase; MVA, Mevalonate ; MVK, Mevalonate-5-kinase; PMK, Phosphomevalonate kinase; PMD, Mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase; FPS, Farnesyl diphosphate synthase; FPP, Farnesyl diphosphate; SQS, Squalene synthase; SE, Squalene epoxidase.

2) アルカロイドとは、植物由来の窒素を含む有機塩基類で、強い生物活性を有する天然有機化合物の総称である（水谷ら. 2019; 竹田ら. 2017）。多くのアルカロイドは酸塩基抽出（連続する溶媒抽出により、混合物から酸処理と塩基処理で抽出する実験操作）によって粗抽出物から精製できる。アルカロイドは、炭素、水素、窒素の他に酸素や硫黄の元素を含み、まれに塩素、臭素、リンといった元素を含むことが報告されている。生合成的には、アミノ酸を出発物質とするアミノ酸経路によって生成される真性アルカロイド（モルヒネ、アトロピン、キニーネ、コカインなど）と、非アミノ酸由来のプロソイド（シュード）アルカロイド（エフェドリン、アコニチン、ソラニンなど）に分類される。ケシ（ケシ科, *opium poppy*) の実から採取されるモルヒネおよびキハダ（ミカン科）やオウレン（キンポウゲ科）などに含まれるベンジルイソキノリンアルカロイドであるベルベリンなどが有名である（図2）。最近では、「アミノ酸や核酸など別のカテゴリーに入る生体分子を除いて、広く含窒素有機化合物」をアルカロイドと定義づけしている。微量で多彩な生物活性を示すことから医薬品として用いられているものも多く、また新たな医薬品開発のためのリード化合物としても重要である。これらアルカロイドは、1万2千種以上、単離報告されている（図2）（Buchanan *et al.* 2015）。

3) フェニルプロパノイドとは、フェニルアラニンを起源とする、1-フェニルプロパン（C6-C3）が複数縮合した形の化合物およびその化合物の誘導体の総称である（水谷ら 2019; 竹田ら 2017）。フェニルプロパノイドの生合成はフェニルアラニンの脱アミノ化によってケイヒ酸が生成するところから始まる。ケイヒ酸はパラ位に水酸化を受けて4-クマル酸となる。ここから、4-クマル酸の活性化体である4-クマロイル補酵素A（4-クマロイル CoA）が作られ、マロニル CoA と縮合することで、フラボノイド類の生合成が始まる。なお、4-クマ

ル酸はベンゼン環 (C6) に直鎖状プロパン (C3) が結合した C6-C3 単位を基本骨格とする天然芳香族化合物であり、フェニルアラニンがシキミ酸経路によって生合成されることから、フェニルプロパノイドはシキミ酸経路によって生合成される。各種ケイヒ酸誘導体が生成する狭義のフェニルプロパノイド化合物は芳香を有する天然有機化合物が多く、ケイヒアルデヒドやアネトール、オイゲノールなど香料や芳香性健胃薬などの原料になっている。また、C3 部分でラクトン環を形成したクマリン類、C6-C3 単位 2-4 個が結合したリグナン類、シキミ酸から生成したバニリンや安息香酸などの C6-C1 化合物も広義のフェニルプロパノイドに属する。主に維管束植物で見られるポリフェノールと呼ばれる化合物の一部もこれに含まれる。1-フェニルプロパン (C6-C3) が複数縮合した形の化合物およびその化合物の誘導体には、フラボノイド (flavonoid) やスチルベノイド (stilbenoid) も含まれていて、シキミ酸と酢酸-マロン酸の複合経路により生合成される。農作物 (タマネギやソバなど) をはじめ多くの植物に含まれるフラボノイドの一種でフラボノール骨格を持つ物質であるケルセチンおよびゴマの成分セサミンなどが有名である。これらフェニルプロパノイドは、8 千種以上、単離報告されている (図 2) (Buchanan *et al.* 2015)。その他に、シキミ酸と酢酸-マロン酸の複合経路によって生合成される天然有機化合物も多く存在する。

以上のように、100 万種以上を超える多様な天然有機化合物に関する「天然有機化合物の多様性」は一般的に「骨格合成反応の多様性と修飾反応の多様性」で説明することができる (図 5) (Tohge *et al.* 2005; 及川 2011)。骨格合成酵素の例としては、芳香族アミノ酸のチロシンから生じた (S) レチクリンに対して作用する植物に特徴的な環化酵素が挙げられる。ケシ (ケシ科) では、モルヒネ合成酵素により (S) レチクリンからモルヒネが生合成され、キ

ハダ（ミカン科），オウレン（キンポウゲ科）およびメギ（メギ科）では，ベルベリンブリッジ酵素により（S）レチクリンからベルベリンが生合成される．また，シキミ酸と酢酸-マロン酸の複合経路により，4-クマロイル CoA とマロニル CoA の縮合反応に対して植物ごとにその縮合回数と環化様式の異なる酵素が知られている．先に述べたテルペノイドの生合成経路の炭素数 5 のイソプレネン単位からなる縮合回数も同様な「骨格合成反応の多様性」を生じることが知られている．一方，骨格合成酵素の多様性に加えて，骨格形成後の「修飾反応の多様性」も重要な経路である．水酸化，配糖化，メチル化，メチレンジオキシ化やアシル化などが様々な骨格の化合物に対して生じることによって，より一層の構造多様性が生じることが知られている．修飾反応において，天然有機化合物の構造上の特徴から，様々な修飾反応が酸素原子を介して生じていることが重要であると思われる．なお，ゲノムサイズが小さく，最初のゲノム解析が終了したアブラナ科のモデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) に確認された最も修飾化されたフラボノイド (Tohge *et al.* 2016) およびアントシアニン (Tohge *et al.* 2005) の構造を図 6 に示したが，配糖化，アシル化，およびマロニル化による選択的な修飾反応が生じている．修飾化反応の途中の中間代謝産物を含めると，多種多様な二次代謝産物が存在することが想像可能である．

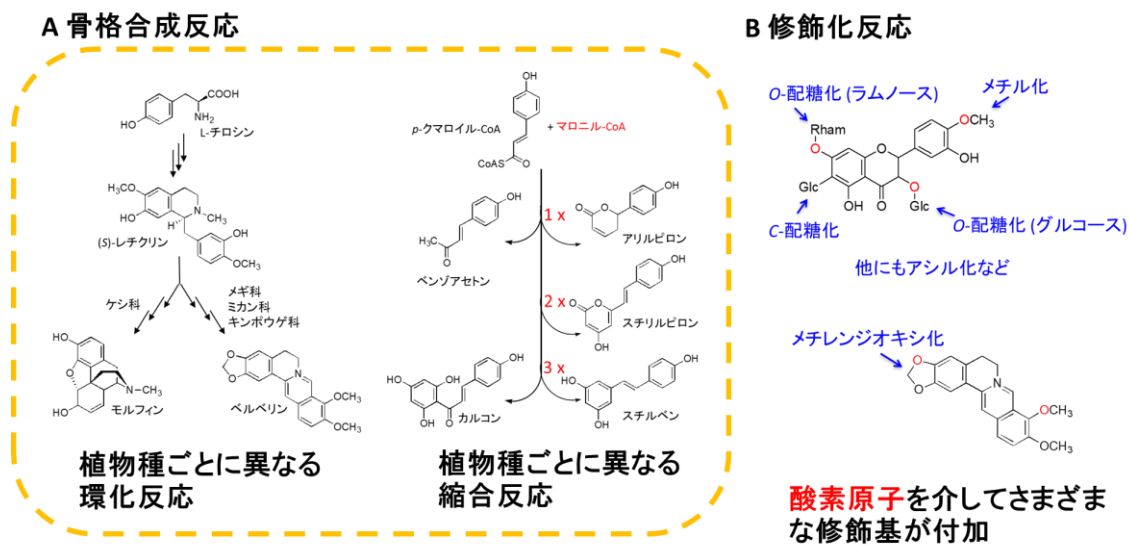


図5 構造多様性をもたらす骨格合成反応と修飾反応

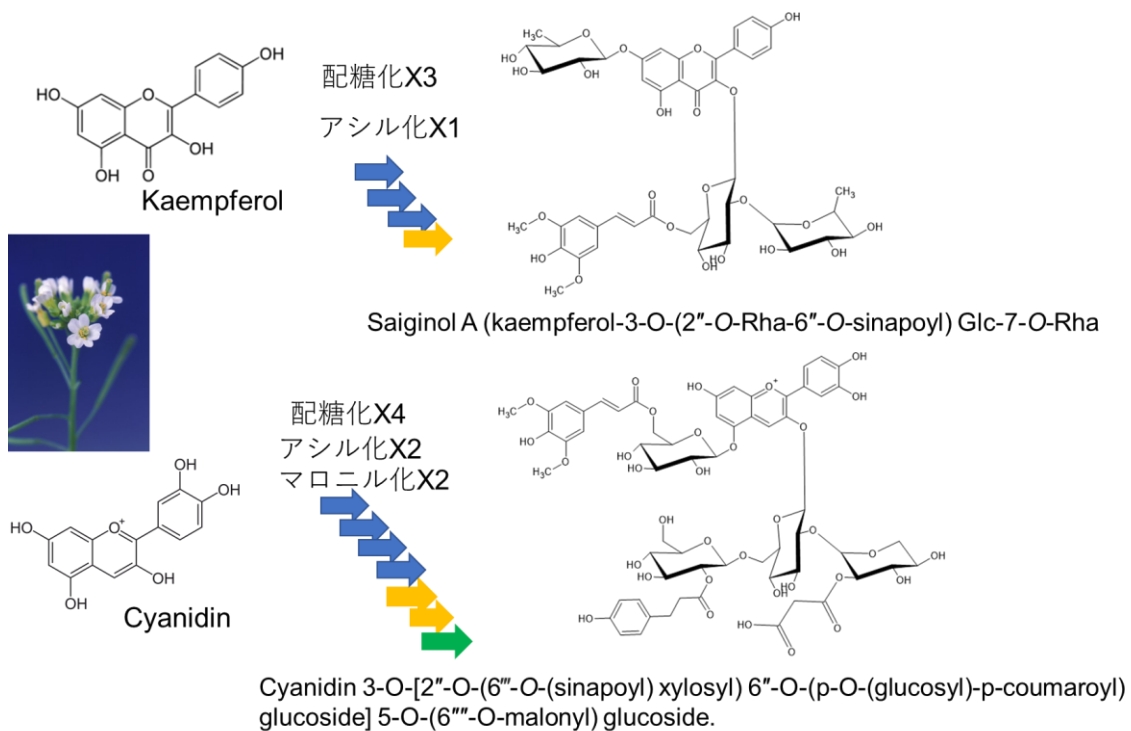


図6 モデル植物のシロイヌナズナに存在する修飾化されたフラボノイド（上）およびアントシアニン（下）

青色の矢印は配糖化反応，オレンジ色の矢印は，芳香族アシル化反応，緑色の矢印は，マロニル化反応を示す。

1.4 メタボローム解析

生物を扱う研究分野において、オミックス解析（網羅的な成分解析，オーム解析とも呼ばれる）が注目されている．生物のセントラルドグマ説の流れに沿って，遺伝子（DNA）配列の網羅的解析である（1）ゲノム解析，遺伝子が発現して生じた RNA 分子の網羅的な遺伝子発現解析を行う（2）トランスクリプトーム解析，転写された RNA が翻訳されて，アミノ酸のペプチド結合によりタンパク質が生成し，そのタンパク質の網羅的解析を行う（3）プロテオーム解析，そして，生成したタンパク質が翻訳後修飾されてできた酵素が，低分子化合物（糖，アミノ酸，脂肪酸）から一次代謝産物（生物の生命現象維持の必須の代謝産物）および二次代謝産物（外的要因，子孫繁栄など，付加的な代謝産物）を生成し，この代謝産物全体を網羅的に解析する（4）メタボローム解析が，生物を深く理解する上で必須な情報であると言われている（図7）．

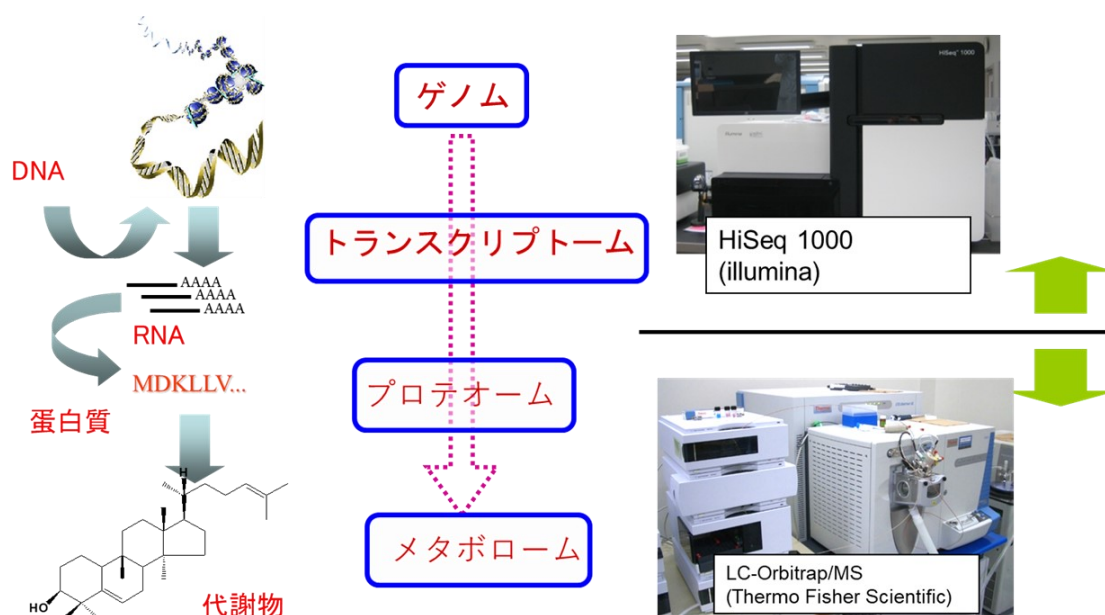


図7 植物のポスト・ゲノム研究に用いる分析機器

HiSeq1000 は ilimina 社の次世代シーケンサー. LC-Orbitrap™-MS は Thermo Fischer Scientific 社の LC-MS TM は Trademark の略で商標を表す

植物研究においても、2000年にモデル植物のシロイヌナズナのゲノム解読が報告（Arabidopsis Genome 2000）され、それ以降、植物のポスト・ゲノム研究が盛んになり、現在（令和3年2月23日）までに615種類の植物がゲノム解読されている（plabiPD; <https://plabipd.de>）。使用する周辺の分析機器も、網羅的、高感度、高分解能で、日々発展してきた。ゲノム、RNA分析は次世代シーケンサーを用い、タンパク質、代謝産物は、質量分析計（MS）を用いることが主流になっている。言い換えれば、この2種の分析機器で全ての分子種を網羅的に分析することで、植物の理解を深める研究に役立つ事が知られている。

植物のポスト・ゲノム時代から研究されてきた質量分析計（MS）或いは核磁気共鳴（NMR）機器を用いたメタボローム解析技術は、約20年間の研究で、天然有機化合物の探索、生合成経路の発見および生理機能の研究に革新的な影響を与える技術として、多くの研究者が注目して利用している。生体内の網羅的な成分（全代謝産物）検出を目的とするメタボローム解析（メタボロミクス）は、従来の分析化学的手法に加えて、情報生物学（バイオインフォマティクス）の手法が融合した研究領域である。植物科学の分野においても、アノテーション（化合物の情報付加）の概念と豊富な各種化合物データベースの利用により、植物を扱う創薬・食品・化粧品分野で、効率的な研究開発を加速する技術として注目されている。しかし、未だに植物成分の全容解明や画一化（共有プラットフォーム）手法の確立および植物成分と機能性との相関解析の評価など、多くの課題が残されている（齊藤 2019; 草野ら. 2008）。

メタボローム解析は、試料中に存在する化合物を網羅的に検出して注釈付けし、それらの試料間での質的・量的な変動を多変量解析など統計的な解析により捉える解析手法である。また、ノンターゲット解析であるメタボローム解析は、特定成分のみに注目するのではなく化合物全体を把握できることから、ノ

ンバイアスな観点からの試料の特徴づけや、特徴的成分を発見することができる(図8)。

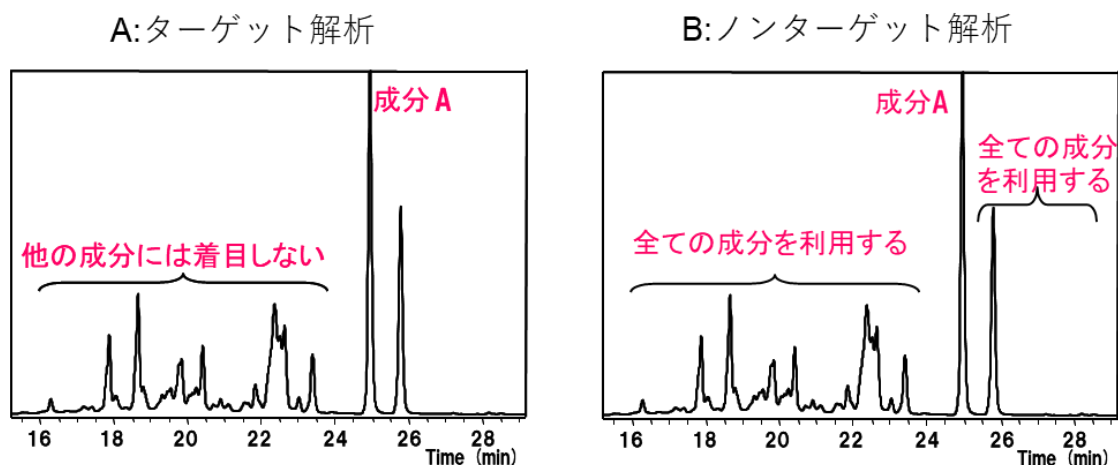


図8 メタボローム解析(ノンターゲット解析)の概念

Aはターゲット解析で、例えば注目した成分Aに相当するピーク情報のみを取り扱う解析である。Bはノンターゲット解析で、注目した成分Aを含む検出された全てのピーク情報を取り扱う解析である。

メタボローム解析技術を扱う研究分野では、成分の「アノテーション(annotation)」という用語を用いることが多い。一般的には、アノテーションとは、あるデータに対して関連する情報(メタデータ)を注釈として付与すること、およびその付与された情報自体を示す。メタボローム解析におけるアノテーションとは、検出されたイオンピークに対して、化合物名、化合物分類名、に物理化学的性質および生物学的情報を付加すること、およびその付与された情報自体を示す。アノテーションは未知化合物の構造の同定を行うために必要なプロセスの一部であり、例えば、芳香族(ベンゼン環)の有無、分子式の付加および化合物データベース検索結果などの構造推定のための情報を付加する。本研究でも、アノテーションにより、分子式、データベースの検索結果、代謝産物の標準物質の比較結果など、幅広い情報を付与している。

植物成分の分析に用いる LC-MS（液体クロマトグラフィー質量分析計）および GC-MS（ガスクロマトグラフィー質量分析計）からの出力データを得る概略図（図 9）を示した（1.5 の注釈①）。生データには、化合物の分離に寄与した保持時間、イオン化されたイオンの分離に寄与した質量電荷比（ m/z ）、イオン量を示した intensity の 3 次元データが出力される。メタボローム解析では、この得られた 3 次元データを全て処理することが重要であり、アライメント（化合物ピークの整列化：サンプル間比較）という工程の結果（図 9 のエクセル定量データ）、多変量解析などのサンプル間の比較解析が可能となる。このように、従来の個別な特定分析とは異なる手法で植物成分の全体像を捉えることが可能である（図 9）。

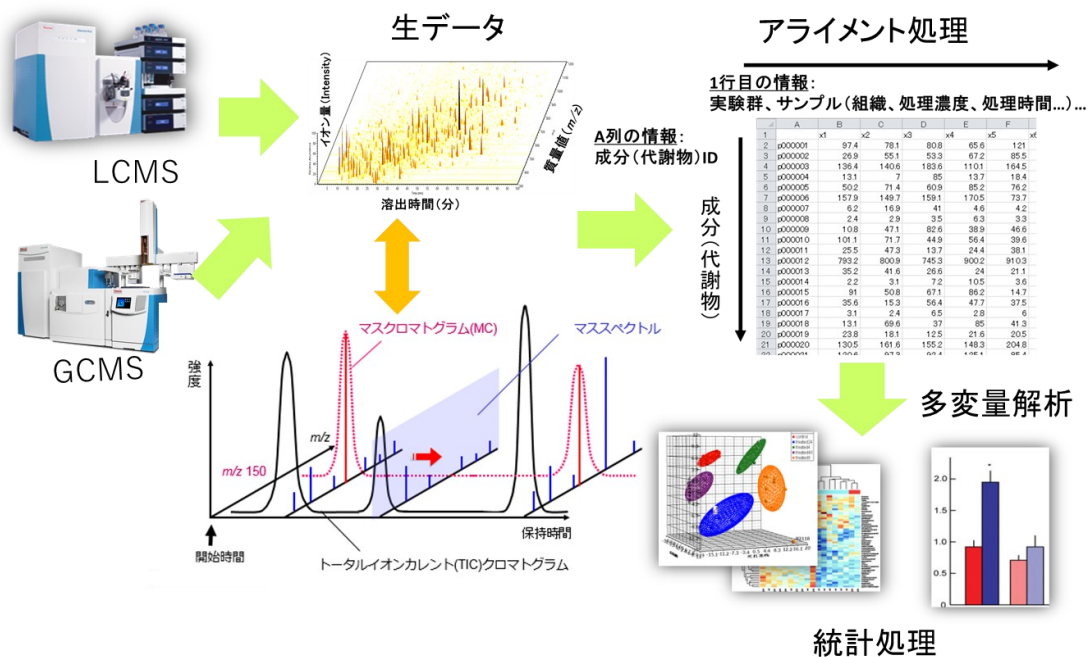


図 9 メタボローム解析技術の流れ

LC-MS または GC-MS の出力データから、データ処理（エクセル出力）および統計解析
アライメント工程とは、複数の分析データを保持時間から得られたピーク ID と MS データから得られた情報を用いて、サンプルとピーク ID による整列化を行う工程である。

1.5 本研究の目的

先に述べたメタボローム解析技術が、天然有機化合物の探索、生合成経路の発見および生理機能の研究に革新的な影響（変化）を与える技術であることを踏まえて、メタボローム解析技術における研究成果の出口（実用化への応用）を思案した（図 10）。ある未利用資源植物に対して、メタボローム解析技術を適用して網羅的な植物成分分析を行うことで、既知成分および新規成分の発見の情報を得ることが可能となる。有機合成による目的の天然有機化合物の供給量の確保とは別の手法で、以下のことが可能であると考えた。得られた既知成分および新規成分に関して、その成分の代謝（生合成）経路の推測ができ、それに関与する酵素、遺伝子の単離が可能となる。そして、遺伝子工学により、異種生物での物質生産（大量）が可能となり、新規の生理活性探索実験へと繋がることが予想できる。既知成分でも、知られていない機能性の発見をもたらす可能性を秘めている。そして、新規成分では機能性評価と共に、知財（特許財産）を産むことが可能である。

ある植物が網羅的な成分分析されると・・

既知成分及び新規成分の発見(情報)



代謝(生合成)経路の推測



酵素、遺伝子の単離



物質生産(大量)が可能



新規の生理活性への実験

未だ解析対象植物が少ない

図 10 メタボローム解析技術の実用研究への効果

メタボローム解析技術においては、液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) およびガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) の分析機器が選択可能である (次頁の注釈①)。多くの植物由来の機能性天然有機化合物が二次代謝産物であること、LC/MS 分析がフェノール性有機化合物の検出が得意であること、および一次代謝産物の経路 (KEGG Pathway : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Pathway ; <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) (Kanehisa *et al.* 2002) にある代謝産物の検出数の比較 (図 11) で成分検出数が高いことから、LC/MS を本研究に用いることにした。

注釈① 本論文では、LC-MS を液体クロマトグラフィー質量分析計の分析装置と定義し、LC/MS を液体クロマトグラフィー/質量分析法の分析手法と定義する。同様に、GC-MS および GC/MS もそれぞれ、ガスクロマトグラフィー質量分析計の分析装置とガスクロマトグラフィー/質量分析法の分析手法と定義する。

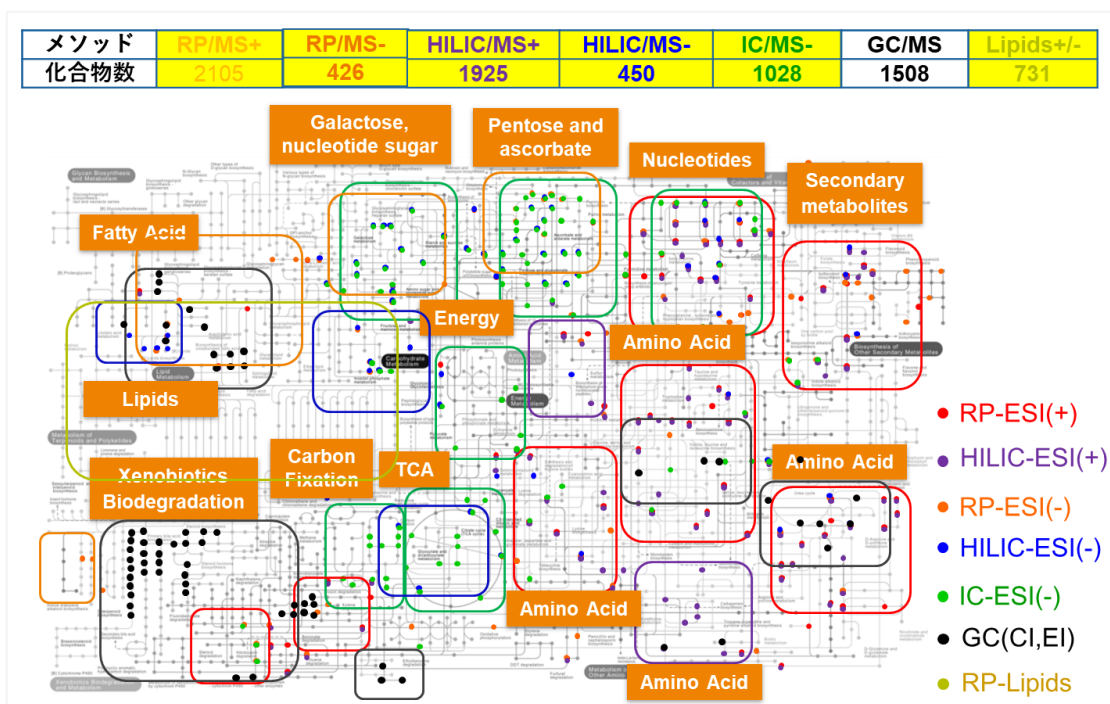


図 11 LC/MS および GC/MS の検出代謝産物の数の比較 (Thermo Fischer Scientific 社の資料より)

赤丸/枠 RP-ESI (+) : Reverse Phase-Electrospray ionization (逆相カラムとエレクトロスプレーイオン化 positive mode) で検出される代謝産物; 紫丸/枠 HILIC-ESI (+) : Hydrophilic Interaction Chromatography-Electrospray ionization (親水性相互作用クロマトグラフィーのエレクトロスプレーイオン化 positive mode) で検出される代謝産物; オレンジ丸/枠 RP-ESI (-) : Reverse Phase- Electrospray ionization (逆相カラムとエレクトロスプレーイオン化 negative mode) で検出される代謝産物; 青丸/枠 HILIC-ESI (-) : Hydrophilic Interaction Chromatography- Electrospray ionization (親水性相互作用クロマトグラフィーのエレクトロスプレーイオン化 negative mode) で検出される代謝産物; 緑丸/枠 IC-ESI (-) : Ion Chromatography- Electrospray ionization (イオンクロマトグラフィーのエレクトロスプレーイオン化 negative mode) で検出される代謝産物; 黒丸/枠 GC (CI, EI) : Gas Chromatography- chemical ionization, electron ionization (ガスクロマトグラフィーの化学イオン化, 電子イオン化) で検出される代謝産物; 黄緑丸/枠 RP-Lipid : Reverse Phase- Lipid (逆相カラムの脂質) で検出される代謝産物

本研究では、植物の主な機能性成分として多くの研究開発に利用されている二次代謝産物を網羅的に研究可能な LC/MS を用いて、モデル植物および実用

植物でメタボローム解析を行った。図 10 に示した通り、植物が網羅的な成分分析されると、実用研究への応用が期待されるが、研究開始当時、メタボローム解析が行われた植物種が少なかったことから、まずはよく研究されているモデル植物での解析を行い、そこで確立した解析方法や解析結果を実用植物での解析に役に立てる、という方針を考えた。本研究では、既知化合物および未知化合物を含む多数の天然有機化合物の探索を行い、天然有機化合物の網羅的な情報検索に基づいて、モデル植物としてコケ植物のヒメツリガネゴケおよびマメ科植物のミヤコグサを、実用植物としてパパイヤ科植物のパパイヤを用いて、研究を実施した。これらの実験材料を含む光合成生物の系統樹を、図 12 に示した（長谷部 2015）。

本研究では、特定分析とは全く異なる視点から LC/MS を活用した結果、植物由来の機能性二次代謝産物の代謝経路の探索の成果について報告する。

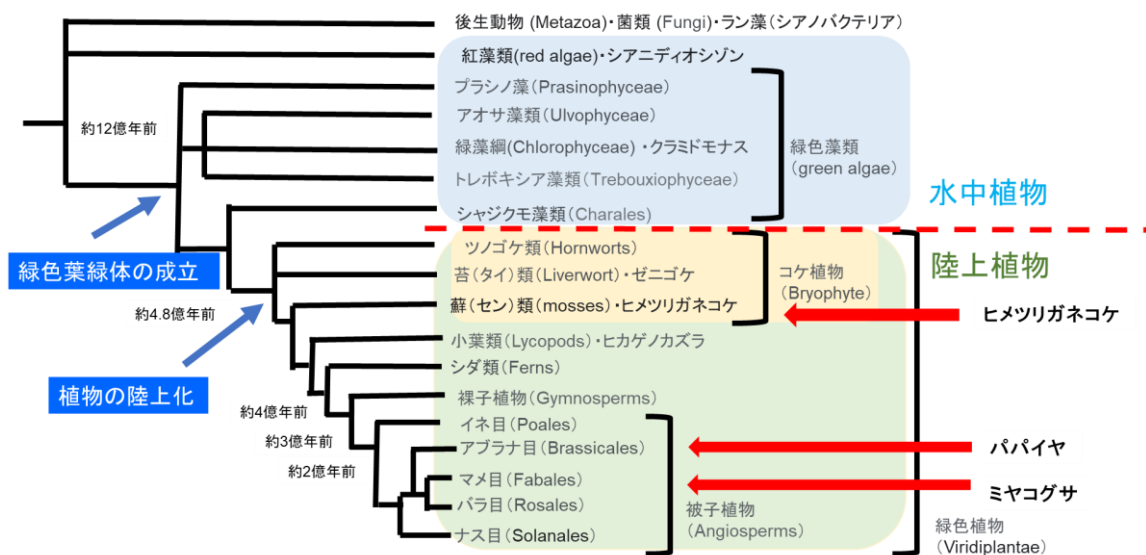


図 12 光合成生物の系統樹—本研究対象植物（3 種類のヒメツリガネゴケ，ミヤコグサ，パパイヤ）を含む—

出典元 自然科学研究機構 基礎生物学研究所 生物進化研究部門 長谷部光泰研究室の HP

(http://www.nibb.ac.jp/evodevo/tree/00_index) に基づくデータを用いて、筆者による本研究対象植物を追加

第2部 ヒメツリガネゴケのフラボノイド代謝研究

2.1 緒言

コケ植物は、約4億7000万年前のオルドビス紀に初期の水に住む藻類から分岐した最も初期に出現した陸上植物（非維管束植物）である（Karol *et al.* 2001; Lewis and McCourt 2004; Ruhfel *et al.* 2014; Wodniok *et al.* 2011）。コケ植物であるヒメツリガネゴケ（*Physcomitrella patens*）は、進化の起点が陸上植物の分岐点にあり、2008年にゲノム配列が決定され、遺伝子導入による形質転換系も確立しているため、モデル植物として研究されている（Lang *et al.* 2018; Rensing *et al.* 2008）。太陽光からの紫外線 UV-B（280~320 nm）は、フリーラジカルの産生によって直接的または間接的に DNA、RNA 或いはタンパク質に損傷を与える影響があるので、コケ植物が陸上で生活するために、進化過程で紫外線 UV-B からの保護機構（フリーラジカル産生の防御機能）を獲得する必要があると考えられていた（Foyer *et al.* 1994; Jin *et al.* 2000; Li *et al.* 1993; Ries *et al.* 2000）。

先に述べた通り、植物は多種多様な代謝産物を生合成し、その総数は106万種類と推定されている（Afendi *et al.* 2012）。これら植物代謝産物のうち、二次代謝産物が大部分を占める。これらの二次代謝産物は、植物を外部に変化する環境に順応させるために進化してきたと考えることができる。

フラボノイドは植物二次代謝産物の主要クラスのひとつであり、フェニルプロパノイドの1種で、シキミ酸経路、酢酸-マロン酸経路の複合経路により生合成される。また、植物の UV フィルターとして機能することが知られている（Stafford 1991; Tohge *et al.* 2016; Winkel-Shirley 2001a）。一例として、ヒメツ

リガネゴケの UV-B 照射に応答して、ケルセチン誘導体および未知の代謝産物の蓄積が報告されている (Wolf *et al.* 2010) . しかしながら、ヒメツリガネゴケのフラボノイド成分に関する生合成研究などの詳細な研究報告がないことから、LC/MS メタボローム解析でのフラボノイドプロファイリング分析を実施する計画を立てた。光合成生物に関するフラボノイド生産能の分岐点を図 13 に示した (Bowman *et al.* 2017; Yonekura-Sakakibara *et al.* 2019; 末次, 和田 2013) .

本研究では、高精度・高分解能を有するイオントラップ/Orbitrap™ 型質量分析と連結した液体クロマトグラフィー, LC-Orbitrap™-MS (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて、ヒメツリガネゴケの LC/MS メタボローム解析を行った。

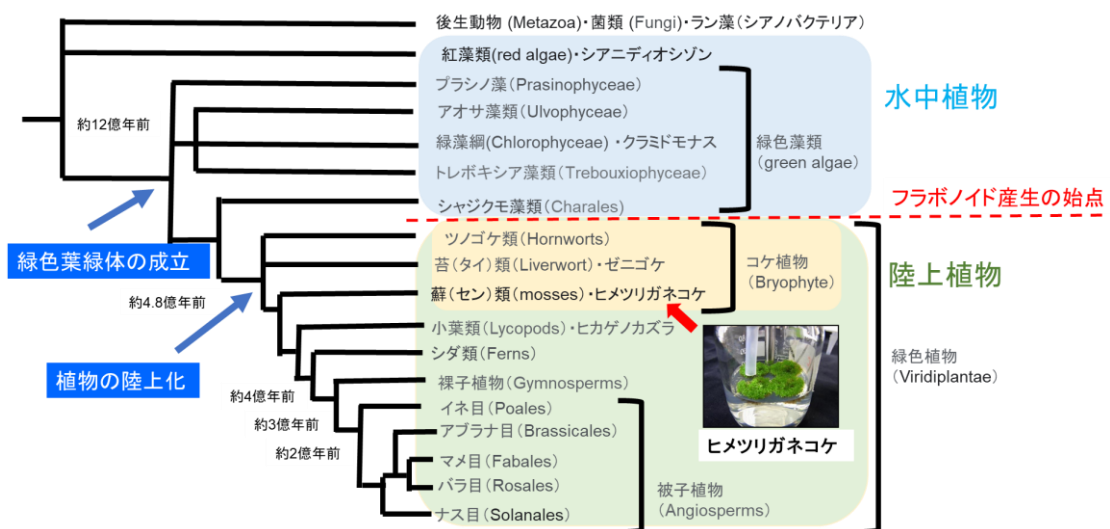


図 13 ヒメツリガネゴケを含む光合成生物の系統樹とフラボノイド生産能の分岐点

出典元 自然科学研究機構 基礎生物学研究所 生物進化研究部門 長谷部光泰研究室の HP

(http://www.nibb.ac.jp/evodevo/tree/00_index) に基づくデータを用いて、筆者によるフラボノイド分布を追加

2.2 材料および方法

2.2.1 植物材料

長谷部光泰博士（大学共同利用機関法人自然科学研究機構 基礎生物学研究所）から分与を受けた英国 Gransden Wood 株のヒメツリガネゴ (*Physcomitrella patens*) を用いた.

2.2.2 試薬

ルテオリン (luteolin) は, Plantech UK (Berkshire, UK) から購入した. 本研究で使用した LC/MS グレードの有機溶媒はすべて FUJIFILM Wako Pure Chemical Co. (Osaka, Japan) から購入した. ヒメツリガネゴの茎葉体培養に用いた安定同位体元素でない無機塩は, すべて FUJIFILM Wako Pure Chemical Co. (Osaka, Japan) から購入した. 1× Gamborg's Vitamin Solution, 安定同位体酸素 ($^{18}\text{O}_2$) および安定同位体二酸化炭素 ($^{13}\text{CO}_2$) は, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) から購入した. また, 安定同位体酸素 ($^{18}\text{O}_2$) を含む空気「 ^{18}O -labeled air (21.7% $^{18}\text{O}_2$, 0.0394% CO_2 , and balance N_2)」および安定同位体二酸化炭素 ($^{13}\text{CO}_2$) を含む空気 (388 ppm $^{13}\text{CO}_2$ and balance air) は, 株式会社タツオカ (Chiba, Japan) で委託調製した. $^{13}\text{C}_6$ -glucose は, Isotec Corporation (Seoul, KOREA) から購入した. 質量数 15 の安定同位体窒素を含む硝酸アンモニウム $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ および硝酸カリウム K^{15}NO_3 , 質量数 34 の安定同位体を含む硫酸マグネシウム $\text{Mg}^{34}\text{SO}_4$ は SI サイエンス株式会社 (Saitama, Japan) から購入した. フィタゲルは, FUJIFILM Wako Pure Chemical Co. (Osaka, Japan) から購入した.

2.2.3 培養条件および分析条件

ヒメツリガネゴケの茎葉体は、密閉ガラスボトルシステム（図 14）（Kera *et al.* 2018）を使用して、2 ヶ月間の 16 時間（明所）/ 8 時間（暗所）の長日条件下で、22°C で 0.5% グルコースを含む固体（0.5% ファイタゲル使用）の 1/2MS（Murashige and Skoog）培地（Murashige and Skoog 1962）で培養した。統計解析によるデータの正規化を行うために、3 個の培養ボトルを用いて、それぞれ同一条件でヒメツリガネゴケの茎葉体を培養した。3 個の培養ボトルから培養した茎葉体をそれぞれ、収穫し、液体窒素中で凍結し、凍結乾燥した。全サンプルを乳鉢 乳棒で粉砕した後、代謝産物を 80% メタノールで抽出し、LC/MS に注入した。分析条件は後述（2.2.5）するが、マメ科植物タルウマゴヤシ（*Medicago truncatula*）のメタボローム解析と同一分析手法で行った（Kera *et al.* 2018）。

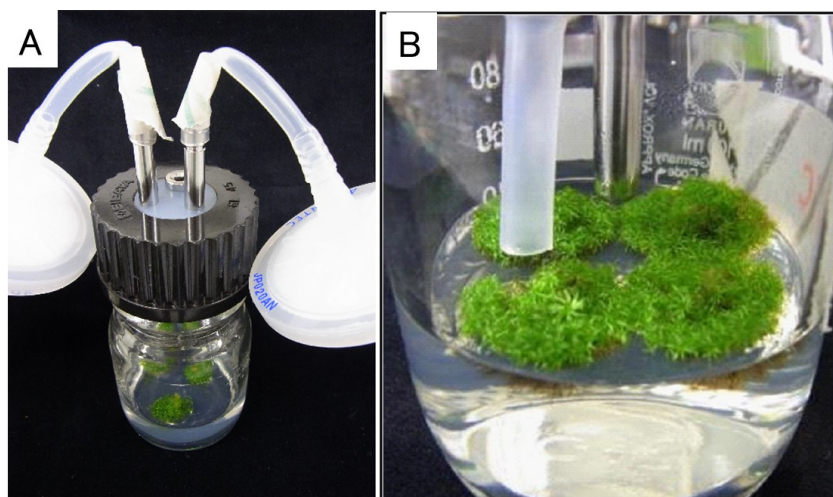


図 14 密閉ガラスボトルシステムによるヒメツリガネゴケの茎葉体の培養
A 全体図 B 拡大図

2.2.4 安定同位体元素を用いた培養条件

ヒメツリガネゴケの茎葉体の培養において、炭素、窒素、酸素、硫黄の元素を安定同位体元素 (^{13}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{34}S) に置換するために、培養中の培地および空気中の構成元素に関して、可能な限り、安定同位体元素を含む試薬に置き換えた。なお、各安定同位体元素を用いた 1/2MS 培地は 3 個の培養ボトルを用いて、それぞれ同一条件でヒメツリガネゴケの茎葉体を培養した。

酸素に関しては、密閉ガラスボトルシステム (図 14) での培養期間の空気を 20% $^{18}\text{O}_2$ に置換した。また、窒素に関しては、硝酸アンモニウム $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ および硝酸カリウム K^{15}NO_3 を MS 培地中に加え、密閉ガラスボトルシステム (図 14) で培養期間の窒素源を安定同位体窒素 (^{15}N) に置換した。

炭素に関しては、安定同位体炭素を含むグルコース ($^{13}\text{C}_6\text{-glucose}$) を MS 培地中に加え、また、安定同位体炭素を含む空気 (0.2% の $^{13}\text{CO}_2$) に置換し、密閉ガラスボトルシステム (図 14) での培養期間の炭素源を安定同位体炭素 (^{13}C) に置換した。

硫黄に関しては、硫酸マグネシウム $\text{Mg}^{34}\text{SO}_4$ を MS 培地中に加え、密閉ガラスボトルシステム (図 14) での培養期間の硫黄源を安定同位体硫黄 (^{34}S) に置換した。

以上、各安定同位体元素 ($^{13}\text{C}_6\text{-glucose} + ^{13}\text{CO}_2$; $\text{K}^{15}\text{NO}_3 + ^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$; $^{18}\text{O}_2$; $\text{Mg}^{34}\text{SO}_4$) によるヒメツリガネゴケの培養を実施し、*de novo* 合成されるヒメツリガネゴケ代謝産物の元素置換標識を行った。

2.2.5 LC-Orbitrap™-MS 分析条件

カラム	TSKgel ODS-100V (4.6 × 250 mm, 5 μm; TOSOH)
カラム温度	40°C
移動相	移動相 A: 0.1%ギ酸水溶液 移動相 B: 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液
移動相流速	0.4 mL/分
試料注入量	2 μL

LC グラジエントプログラム

時間 (分)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0.0	97	3
45.0	3	97
50.0	3	97
57.0	97	3

MS 分析条件

完全質量スキャン (フルスキャンM) はエレクトロスプレーイオン化 (ESI) の陽性モード (positive mode) で $m/z=100$ から 1500 の質量範囲で測定した。各完全質量スキャンから最も強い 5 つのイオンの MS/MS をイオントラップにより測定した。

2.2.6 メタボローム解析

本研究では、LC/MS によるメタボローム解析については、千葉県木更津市にある (公財) かずさ DNA 研究所が独自に開発したメタボローム解析ソフトウェア (ツール) を用いた。主に用いたソフトウェアは、PowerGet (図 15) (Sakurai *et al.* 2014) および ShiftedIonsFinder (図 16, 17) (Kera *et al.* 2014) である。これらの 2 つのソフトウェアは微量検出された成分の情報を可能な限り利用 (偽陽性ピークもピックアップ) することを目的として作られており、

高速なデータ解析処理が可能で、様々なメタボローム解析研究者の意見を反映して作成されたソフトウェアである。

PowerGet は、ノンターゲット解析に用いられる自動解析ソフトウェアである。比較サンプルと全検出ピークのアライメントテーブルの作成、全ピークに対して精密質量値を基に分子式を算出、化合物データベース検索が可能である (図 15)。

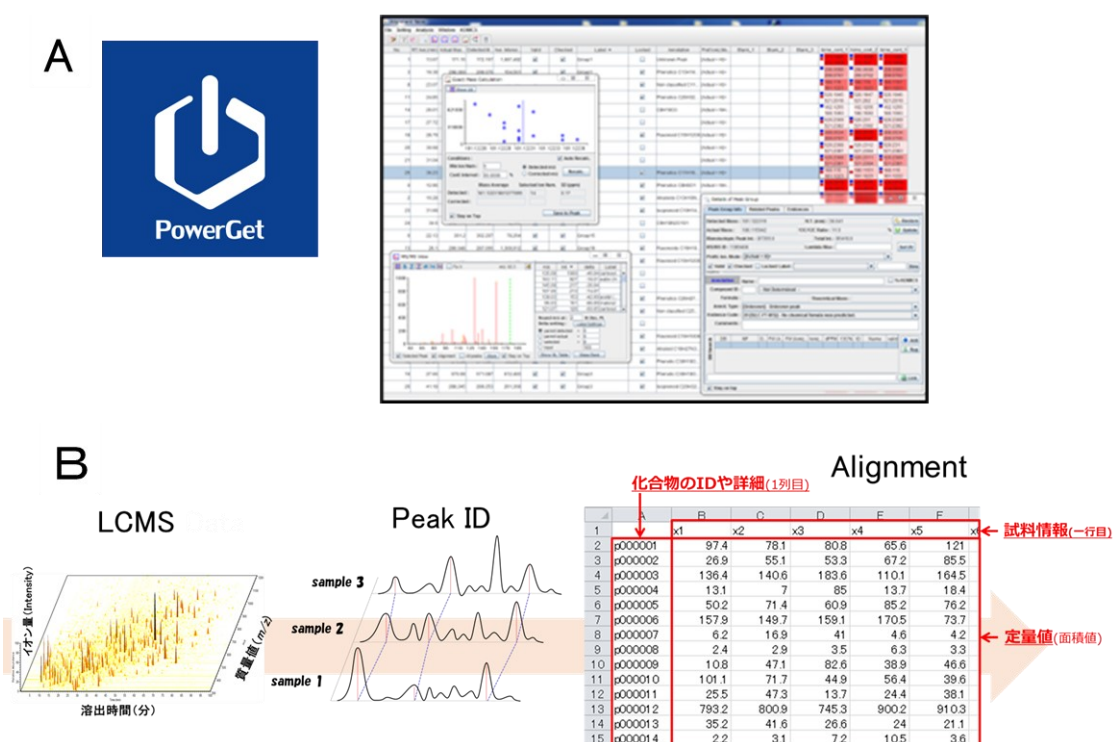


図 15 (公財) かずさ DNA 研究所で開発されたメタボローム解析ソフトウェア PowerGet の概略 A ソフトウェアのロゴおよび起動画面 B 多サンプルを整理化するアライメント機能

ShiftedIonsFinder は、質量値の差分解析に用いられる自動解析ソフトウェア (マススペクトル比較解析ツール) である (図 16)。安定同位体元素の検出と構造多様性をもたらす水酸化、メチル化および配糖化などの修飾化の検出が可能である。ShiftedIonsFinder は、精密質量差分 (Shifted) に着目してマススペクトルを比較し、代謝産物ピーク (Ions) 同士を発見、関連付けをすること

(Finder) を得意とする。そのため、安定同位体の取り込み実験（トレーサー実験）や化学修飾（配糖化やアシル化など）に起因する誘導体といった質量変化を伴う事象の情報を従来のアノテーション情報に加えることができる。これにより、特に未知の天然有機化合物探索における膨大な代謝産物ピークの一次スクリーニング作業を効率的に行うことが可能となる（図 16）。

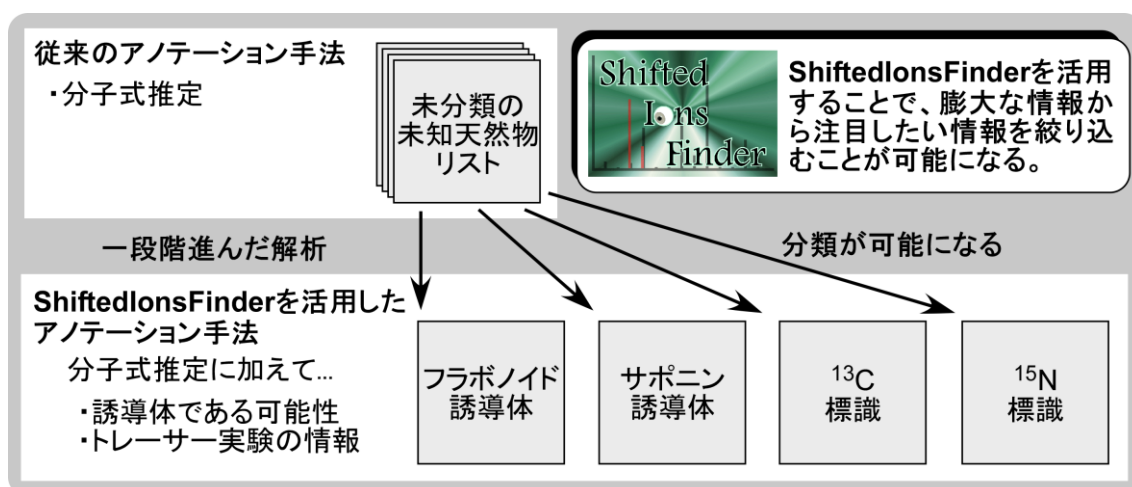


図 16 (公財) かずさDNA研究所で開発されたメタボローム解析ソフトウェア ShiftedIonsFinder の概略および未知天然有機化合物のアノテーション手法における ShiftedIonsFinder の役割を示す。

分析条件の詳細に関しては、データベース「Metabolonote」 (Ara *et al.* 2015) に登録され、論文公開後、閲覧可能である (<http://metabolonote.kazusa.or.jp/SE44/>) 。

LC/MS 分析データの生データは、アクセス番号 MDLC1_36678-36686, MDLC1_40772-40779, MDLC1_40782-40785, MDLC1_40787-40790 として MassBase メタボロームデータベース (<http://webs2.kazusa.or.jp/massbase/>) (Ara *et al.* 2021) に登録され、無料でダウンロード可能である。

2.2.7 ShiftedIonsFinder の概要と活用

1) 安定同位体で標識された代謝産物ピークの選抜手法の概要

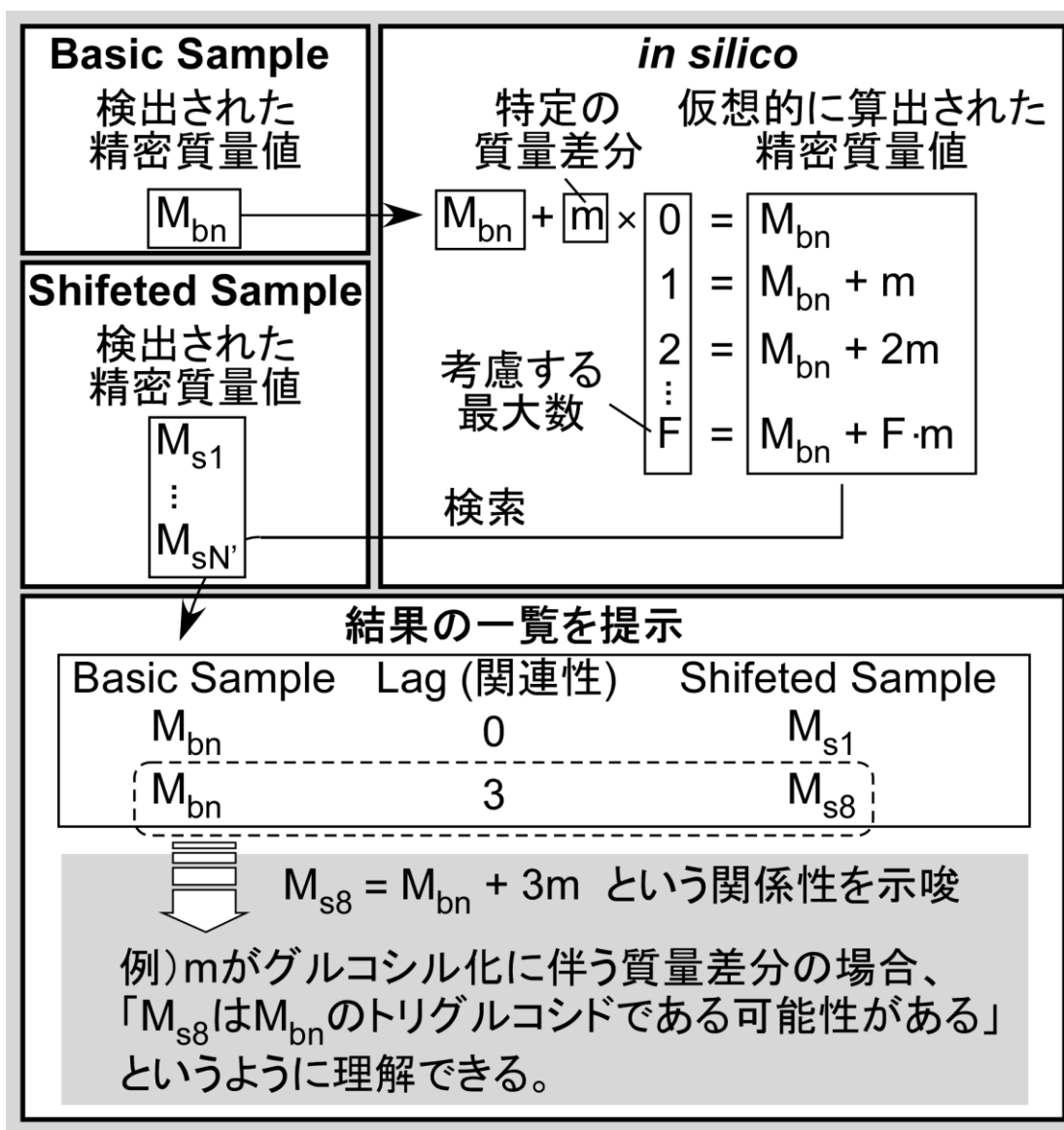
従来、分析データ中から同位体標識ピークを探す場合、あらかじめ検索対象とする天然有機化合物を指定する必要がある、このことが未知の天然物の同位体標識ピーク検索を困難にしていた。ShiftedIonsFinder を用いた解析では、Basic Sample に非標識サンプル中に見られる代謝産物ピークリスト、Shifted Sample に安定同位体標識サンプル中に見られるピークリストを設定し、安定同位体の取り込み（例えば ^{12}C と ^{13}C の質量差分）に由来する質量差分を選択することで、既知、未知に関わらず標識された天然有機化合物を網羅的に発見することが可能である。この解析では Lag（関連性）は天然有機化合物中に取り込まれた安定同位体原子の数と理解することができる。

2) 化学修飾に起因する誘導体の探索手法の概要

フラボノイドやサポニンに代表されるように、植物中に見出される天然有機化合物の中には配糖化やアシル化といった化学修飾を受けて蓄積しているものがある。更に、これらの修飾パターンは生物種（植物種）によって異なっており、どのような修飾を受けて蓄積しているか予測するのは困難である。このような状況で、化合物データベース検索による代謝産物アノテーションを行った場合、例えば糖が一つ多い（または少ない）といった違いだけで未知の天然有機化合物として扱われてしまう。ShiftedIonsFinder を用いた解析では、Basic Sample に研究対象のアグリコンリスト、Shifted Sample にサンプル中に見られる代謝産物ピークリストを設定し、化学修飾に由来する質量差分を選択することで、既知、未知に関わらずサンプル中に存在する研究対象の天然有機化合物の誘導体を網羅的に発見できることが期待される。この解析では Lag（関連

性) は天然有機化合物中に存在する修飾基の数と理解することができる (図 17 ; 図中の例) .

図 17 ShiftedIonsFinder の基本機能



本ツールは Basic Sample (クエリー) に記載されたピークの精密質量値 (図 17; M_{bn}) に対し, 特定の質量差分 (m) の倍数值 ($0 \sim F$) を加算することで, 仮想的なピークの精密質量値 ($M_{bn} \sim M_{bn} + Fm$) を算出する. その後, 仮想ピーク (算出した精密質量値) が Shifted Sample (リファレンス, $M_{s1} \sim M_{sN'}$) に存在するか検索を行い, 結果の一覧を提示することができる. Basic Sample と Shifted Sample の関係性は Lag (該当した際の倍数值) で示される.

2.3 結果

2.3.1 ヒメツリガネゴケのメタボローム解析

3 個の培養ボトルを用いて、それぞれ同一条件で培養したヒメツリガネゴケの茎葉体の 80%メタノール抽出液から得られた LC/MS 分析生データファイルを MSGet (下記の注釈②) および PowerGet (Sakurai *et al.* 2014) によって分析し、3 つの分析生データから共通に検出された 661 本の再現性が得られる有効なイオンピークを抽出した。そして、MFSearcher (Sakurai *et al.* 2013) によるアノテーション (下記の注釈③) を実施後、2 ppm の質量精度範囲の中で、217 本のピークの元素組成は単一元素組成、3 本のピークは複数の元素組成として推定された (表 3)。

表 3 メタボローム解析結果での 2 ppm 以内の元素組成の結果

Status	Number (peaks)	Rate (%)
Single	217	32.8
Multiple	3	0.5
No hits	441	66.7
Total	661	100.0

注釈② Xcalibur ソフトウェア (ThermoFisher 社) で出力された .raw ファイルから、全 MS データおよび PDA データをテキスト形式で出力する (公財) かずさ DNA 研究所が開発したソフトウェア

注釈③ アノテーションとは、検出されたイオンピークに対して、化合物名、化合物分類名、物理化学的性質および生物学的情報を付加すること、およびその付与された情報自体を示す (1.4 メタボローム解析にて記述)。

得られた 217 本のピークに関して、MFSearcher の検索機能に含まれる KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) (Kanehisa *et al.* 2002) , KNApSAcK (<http://www.knapsackfamily.com/KNApSAcK>) (Afendi *et al.* 2012) , HMDB (<https://hmdb.ca/>) (Wishart *et al.* 2018) および LIPIDMAPS (<https://www.lipidmaps.org/>) (Fahy *et al.* 2007) などの複数のデータベースを検索することによって、86 本のピークを一次代謝産物としてアノテーションし、47 本のピークを二次代謝産物としてアノテーションした (表 4) . そして、47 本中 11 本のピークをフラボノイドに分類した (表 4) .

表 4 化合物分類 (カテゴリー) ごとのデータベース検索結果

Category		Number (peaks)	Rate (%)
Aminocarboxylic acids	Primary metabolite	32	23.5
Sugars	Primary metabolite	30	22.0
Nucleotides	Primary metabolite	2	1.4
Lipids	Primary metabolite	14	10.2
Organic acids	Primary metabolite	8	5.8
Flavonoids	Secondary metabolite	11	8.0
Alkaloids	Secondary metabolite	1	0.7
Iridoids	Secondary metabolite	2	1.4
Steroids	Secondary metabolite	3	2.2
Phenolic	Secondary metabolite	19	13.9
Terpenoids	Secondary metabolite	3	2.2
Others*	Secondary metabolite	8	5.8

*Others は明示された分類名以外の化合物で、アノテーション数が非常に少ない化合物を分類した

2.3.2 ヒメツリガネゴケのフラボノイド解析

次に、フラボノイド誘導体は既存のデータベースには存在していない（登録されていない）可能性があるため、化合物データベースに依存せずに網羅的にフラボノイド骨格で、非修飾のフラボノイドアグリコンの修飾変動を予測するために、全検出ピークに関して ShiftedIonsFinder（組成式差分解析ソフトウェア）による更なる詳細な解析を行った（表 5）（Kera *et al.* 2014）。修飾化反応の候補として、キシロイル（Xyl）化の質量差分値（ $C_5H_8O_4$, m/z 132.04226）、グルコシル化（Glc）化の質量差分値（ $C_6H_{10}O_5$, m/z 162.05282）、ラムノシル（Rha）化の質量差分値（ $C_6H_{10}O_4$, m/z 146.05791）、グルクロニド（GlcUA）化の質量差分値（ $C_6H_8O_6$, m/z 176.03209）、シナモイル化の質量差分値（ $C_9H_6O_1$, m/z 130.04186）、クマロイル化の質量差分値（ $C_9H_6O_2$, m/z 146.03678）、カフェオイル化の質量差分値（ $C_9H_6O_3$, m/z 162.03169）、フェルロイル化の質量差分値（ $C_{10}H_8O_3$, m/z 176.04734）、およびマロニル化の質量差分値（ $C_3H_2O_3$, m/z 89.0003939）を修飾グループとして選択し、パラメーターは先述と同様で実施した（Kera *et al.* 2018）。その結果、3つの追加のピーク（合計 14 のピーク）がフラボノイド誘導体として推測された。

表 5 フラボノイドアグリコン（フラボノイドの非糖部の構造）の基本リスト

ShiftedIonsFinder に用いたリスト

No.	Ave. mass (detected)	Ave. mass (actual)	Name	Molecular formula	Ionization
0	255.0651853	254.0579088	Daidzein (Isoflavone), Chrysin (Flavone)	$C_{15}H_{10}O_4$	$[M+H]^+$
1	269.0444498	268.0371734	Coumestrol (Pterocarpan)	$C_{15}H_8O_5$	$[M+H]^+$
2	269.0808353	268.0735589	Formononetin (Isoflavone)	$C_{16}H_{12}O_4$	$[M+H]^+$

3	271.0600999	270.0528234	Sulphuretin (Aurone), Apigenin (Flavone), Genistein (Isoflavone)	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M+H] ⁺
4	271.0600999	271.0606485	Pelargonidin (Anthocyanidin)	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	[M] ⁺
5	271.0964854	270.0892089	Medicarpin (Pterocarpan)	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	[M+H] ⁺
6	273.0757499	272.0684735	Naringenin chalcone (Chalcone), Butein (Chalcone), Naringenin (Flavanone)	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	[M+H] ⁺
7	275.0914	274.0841236	Phloretin (Dihydrochalcone)	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	[M+H] ⁺
8	285.0757499	284.0684735	Biochanin A (Isoflavone)	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M+H] ⁺
9	287.0550145	286.0477381	Aureusidin (Aurone), Luteolin (Flavone), Kaempferol (Flavonol)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M+H] ⁺
10	287.0550145	287.0555631	Cyanidin (Anthocyanidin)	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	[M] ⁺
11	289.0706646	288.0633881	Eriodictyol (Flavanone), Dihydrokaempferol (Flavanonol), Pentahydroxychalcone (Chalcone)	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	[M+H] ⁺
12	291.0863146	290.0790382	Leucopelargonidin (Leucoanthocyanidin), Catechin (Flavanol)	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	[M+H] ⁺
13	301.0706646	300.0633881	Chrysoeriol (Flavone)	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	[M+H] ⁺
14	301.0706646	301.0712131	Peonidin (Anthocyanidin)	C ₁₆ H ₁₃ O ₆	[M] ⁺
15	303.0499291	302.0426527	Bracteatin (Aurone), Quercetin (Flavonol), Tricetin (Flavone)	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	[M+H] ⁺
16	303.0499291	303.0504777	Delphinidin (Anthocyanidin)	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	[M] ⁺
17	303.0863146	302.0790382	Hesperetin (Flavanone)	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	[M+H] ⁺
18	305.0655792	304.0583027	Dihydroquercetin (Flavanonol)	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	[M+H] ⁺
19	307.0812293	306.0739528	Leucocyanidin (Leucoanthocyanidin), Gallocatechin (Flavanol)	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	[M+H] ⁺
20	313.0706646	312.0633881	Wairol (Pterocarpan)	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	[M+H] ⁺
21	319.0448437	318.0375673	Myricetin (Flavonol)	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	[M+H] ⁺
22	321.0604938	320.0532174	Dihydromyricetin (Flavanonol)	C ₁₅ H ₁₂ O ₈	[M+H] ⁺
23	323.0761439	322.0688674	Leucodelphinidin (Leucoanthocyanidin)	C ₁₅ H ₁₄ O ₈	[M+H] ⁺

元素組成の効果的な推定のために、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{18}O および ^{34}S 標識サンプルは、前述のように密閉ボトルシステムを使用して調製した (Kera *et al.* 2018) . この標識サンプルの分析の比較解析により、各検出ピークから得られた組成式の正しい元素の数と種類を判定することが可能であり、結論として、得られた単一組成式のデータの確からしさ (信頼性) を確認した.

そして、最終的にデータのキュレーション (計算結果として得られた推測情報を整理して確認すること) を手動で行い、14本のピークの元素組成のうち、13本のピークを単一として確認し、13種類のフラボノイド誘導体の存在が示唆された (表6) .

表6 アノテーションにより予測されたフラボノイドのリスト

No	Retention time (min)	Detected m/z	Ionization	Molecular formula	Annotation
1	24.7	571.0872	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_{12}$	Biflavonoid ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6 \times 2$)
2	25.4	287.0551	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	Flavonoid
3	26.9	571.0871	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_{12}$	Biflavonoid ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6 \times 2$)
4	27.1	607.1082	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{30}\text{H}_{22}\text{O}_{14}$	Biflavonoid ($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_7 \times 2$)
5	27.1	589.0977	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{30}\text{H}_{20}\text{O}_{13}$	No DB hits
6	27.6	571.0872	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_{12}$	Biflavonoid ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6 \times 2$)
7	27.7	573.1027	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{30}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	Biflavonoid ($\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_6 \times 2$)
8	28.9	589.0977	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{30}\text{H}_{20}\text{O}_{13}$	No DB hits
9	29.2	287.0551	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	Luteolin
10	30.1	571.0870	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_{12}$	Biflavonoid ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6 \times 2$)
11	30.6	571.0871	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_{12}$	Biflavonoid ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6 \times 2$)
12	30.8	573.1026	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{30}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	Biflavonoid ($\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_6 \times 2$)
13	36.7	488.2200	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{O}_6$	Flavonoid

表6には、フラボノイドアグリコンの二量体であるビフラボノイドやフラボン骨格を有するルテオリンが存在することが推測された。なお、ShiftedIonsFinderを用いて、安定同位体の取り込み (例えば ^{12}C と ^{13}C の質量差分) に由来する質量差分を選択した。図18に示したようにピーク9 (ルテオリ

ンと推測) のデータにおいて, ^{13}C 標識データでは, 15 個分の質量差分の質量値が検出され, ^{18}O 標識のデータでは, 2 個分の質量差分の質量値が検出された. 一方, ^{15}N 標識および ^{34}S 標識のデータでは, 付加された質量差分の質量値が検出されなかった. 従って, ピーク 9 (ルテオリンと推測) の代謝産物の組成式として MFSearcher (Sakurai *et al.* 2013) によるデータベース検索結果から示された $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$ の確からしさを再検証することができた (図 18) .

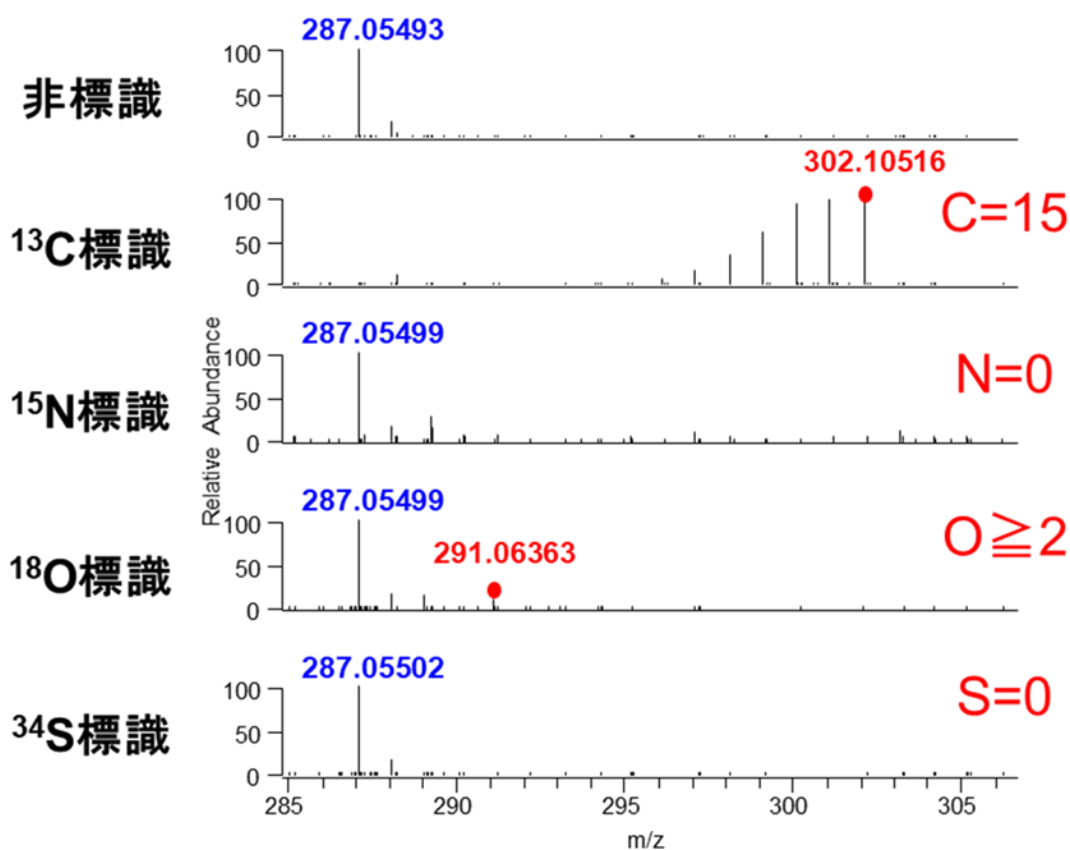


図 18 ピーク 9 (ルテオリンと推測) の代謝産物の組成式 ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$) の再確認

2.3.3 ヒメツリガネゴケのルテオリンの検出と確認

ヒメツリガネゴケからフラボンは、同定されていないが、非標識サンプルの LC/MS 分析データから、ピーク 2 (m/z 287.0551, $C_{15}H_{10}O_6$, 25.4 分) およびピーク 9 (m/z 287.0551, $C_{15}H_{10}O_6$, 29.2 分) が組成式 ($C_{15}H_{10}O_6$) を持つフラボノイドであると推測された (図 19A 中)。先に述べた通り、組成式

($C_{15}H_{10}O_6$) の再確認を各標識サンプル (^{13}C , ^{15}N , ^{18}O および ^{34}S) の分析データと ShiftedIonsFinder を用いて確認した (図 18)。質量電荷比 m/z 287.0551 \pm 10 ppm のクロマトグラムにおいて、標準物質のルテオリンの保持時間は 29.2 分 (図 19A 下) であり、ピーク 9 の保持時間と同じであった。また、ピーク 9 およびルテオリンの m/z 287 の MS/MS 分析データの比較、すなわち MS/MS フラグメントパターン (開裂した質量電荷比 m/z 151, m/z 161, m/z 241, m/z 245, m/z 269 および m/z 287 の値と強度) の比較を行い、ピーク 9 はルテオリンであると判断した (図 19)。一方、マメ科モデル植物タルウマゴヤシ

(*Medicago truncatula*) の安定同位体酸素を用いたメタボローム解析の結果 (Kera *et al.* 2018) では、アピゲニン (apigenin) の A 環および B 環の酸素原子に安定同位体標識の質量数 18 の酸素原子は僅かであった。この結果と比較すると、ピーク 9 は構造中に 2 つの安定同位体標識の質量数 18 の酸素原子を含むことが明らかとなり (図 19C), ルテオリンの B 環の 3' および 4' 位の水酸基が安定同位体酸素により標識化された結果であると示唆することができた (図 19C, 図 20)。図 19C における m/z 287.0551 は分子式 ($C_{15}H_{10}O_6$) , m/z 288.0585 は分子式 ($C_{14}^{13}C_1H_{10}O_6$) , m/z 289.0593 は分子式 ($C_{15}H_{10}O_5^{18}O_1$) , および m/z 291.0635 は分子式 ($C_{15}H_{10}O_4^{18}O_2$) から生じる分子イオンとして、それぞれ帰属することが可能である。おそらく、ルテオリンの B 環の酸素原子に

安定同位体標識の質量数 18 の酸素原子が取り込まれていると推測することができた (図 20) .

以上の結果から、標準品分析および安定同位体分子状酸素 ($^{18}\text{O}_2$) 標識検体と非標識検体の比較 (同位体による質量シフト) から、ヒメツリガネゴケで初めてルテオリンの確認に成功した.

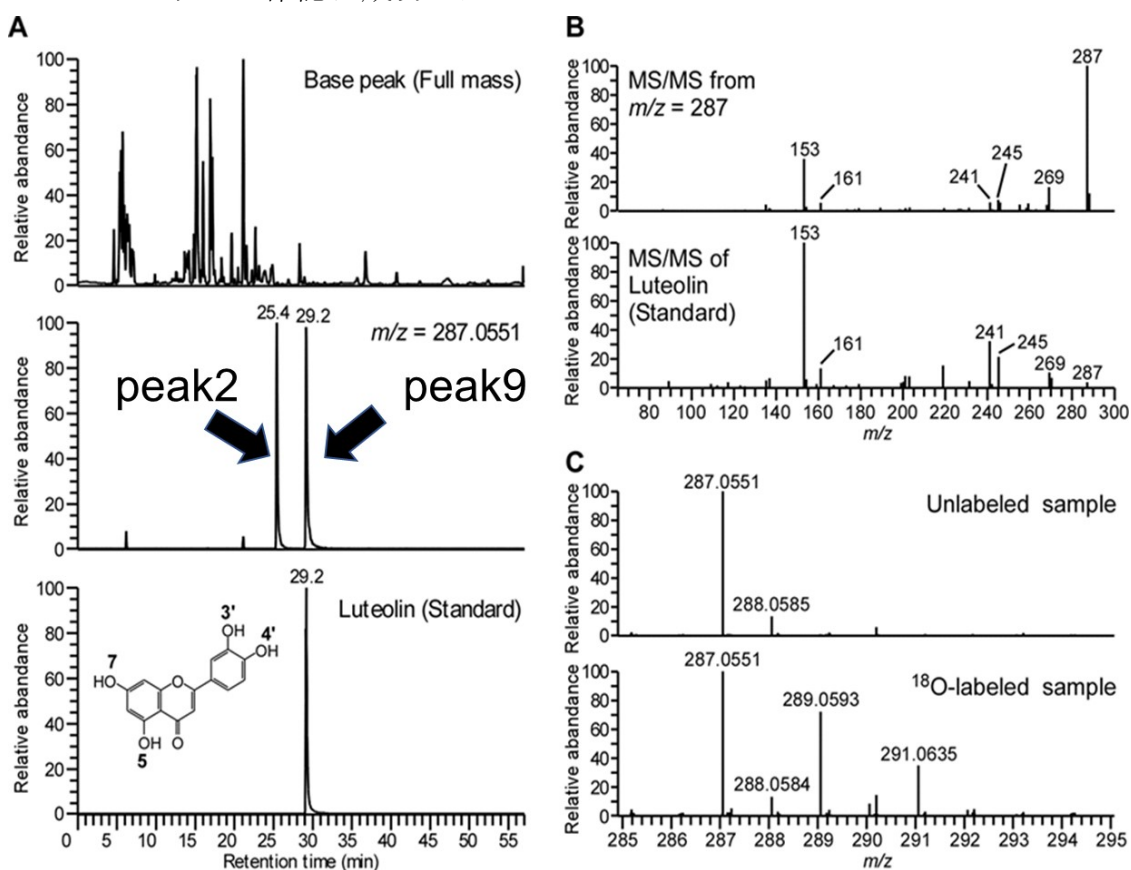


図 19 ヒメツリガネゴケの LC/MS 分析データ

A LC/MS 分析データのイオンクロマトグラム

上: 非標識サンプルの完全な質量スキャン;

中: 非標識サンプルの質量電荷比 m/z 287.0551 \pm 10 ppm のクロマトグラム

下: 標準物質のルテオリンの質量電荷比 m/z 287.0551 \pm 10 ppm のクロマトグラム

B m/z 287 の MS/MS 分析データ

上: 非標識サンプルの質量電荷比 m/z 287 の MS/MS 分析

下: 標準物質のルテオリンの質量電荷比 m/z 287 の MS/MS 分析

C 保持時間 (29.2 分) の Full mass scan

上: 非標識サンプルの保持時間 (29.2 分) の Full mass scan

下: ^{18}O 標識サンプルの保持時間 (29.2 分) の Full mass scan

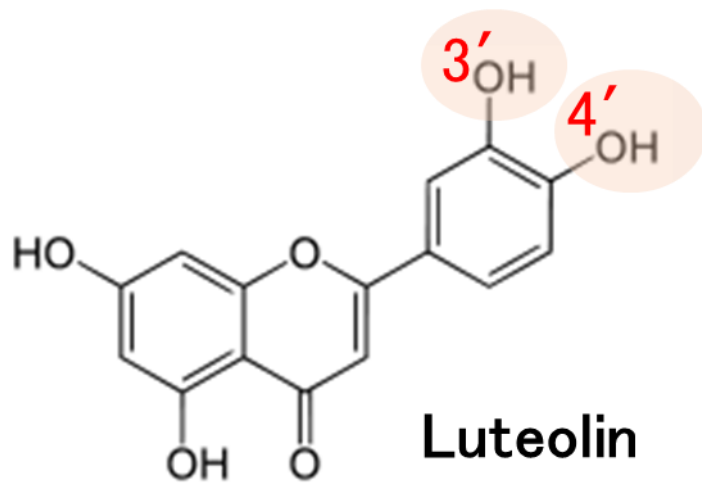


図 20 ルテオリンの構造

安定同位体酸素原子 (^{18}O) の標識がされた水酸基を赤枠で示す.

2.4 考察

研究当初、ヒメツリガネゴケに新規の天然有機化合物の発見を期待して、メタボローム解析データを取得した。得られた 217 本のピークに関して、データベース情報を駆使して、新規性の発見を試みた。残念ながら、新規の天然有機化合物の発見には至らなかった。しかし、メタボローム解析を行う上で、フラボノイド類の種類が多い事が明らかとなり、ヒメツリガネゴケのフラボノイド成分に関して、LC/MS 分析データが無く、研究報告が少ないことが判明した。今回、本研究成果で、ヒメツリガネゴケで初めてルテオリンの確認に成功したことは環境応答や陸上植物への進化の過程を考察する上で、意味のある研究成果であると考えている。

ルテオリンはフラボノイドの分類上、フラボン骨格を有する化合物である。フラボンはフラボン合成酵素 (FNS) により触媒され生合成される。また、FNS はオキシグルタル酸依存性のジオキシゲナーゼ (2ODD/2OGD ファミリー) の FNSI およびチトクロム P450 依存性のモノオキシゲナーゼ (CYP93B) の FNSII に分類される (Martens and Mithofer 2005)。FNSI はセリ科植物で確認報告され、FNSII はマメ科植物で確認報告されている (小埜 2012)。

本研究以前の時点では、ヒメツリガネゴケのゲノム上には、既知のフラボン合成酵素遺伝子 (FNSI, FNSII) の相同遺伝子はないと報告 (Koduri *et al.* 2010) されていることから、フラボン生合成経路が存在しないと考えられていた。

アピゲニン配糖体とルテオリン配糖体がコケ植物 *Bryum algens* (Webby *et al.* 1996) と *Leptostomum macrocarpon* (Brinkmeier *et al.* 1998) に含まれていることが薄層クロマトグラフィー (TLC) での検出および単離報告されている。本研

究は、ヒメツリガネゴケにおけるルテオリンの存在を、フラボン生合成機構を用いて明らかにした最初の報告である。

表 6 で示したピークのうち、以下の 8 つのピークは、Biflavonoid (C-C または C-O-C 結合によって結合されたフラボノイド部分の二量体) として、アノテーションした。ピーク 1, 3, 6, 10, および 11 の元素組成 ($C_{30}H_{18}O_{12}$)。ピーク 4 ($C_{30}H_{22}O_{14}$) およびピーク 7, 12 ($C_{30}H_{20}O_{12}$) は、それぞれ $C_{15}H_{10}O_6$, $C_{15}H_{12}O_7$, $C_{15}H_{11}O_6$ の二量体の成分に対応した。フラボノイドの二量体を生成すると水素原子が 2 つ少なくなる傾向にある。さらに、ピーク 5 および 8

($C_{30}H_{20}O_{13}$) は、ハイヒバゴケ (*Hypnum cupressiforme*) で報告されたビフラボノイドの可能性がある (Sievers *et al.* 1992)。ヤノウエノアカゴケ (*Ceratodon purpureus*) に蓄積されたビフラボノイドは抗酸化作用と UV 保護機能を有するとの報告 (Waterman *et al.* 2017) もあることから、本研究で確認されたヒメツリガネゴケのビフラボノイドは、UV 保護特性を有する可能性も考えられる。

最近、マルバツボゼニゴケ (*Plagiochasma appendiculatum*) (Han *et al.* 2014) およびヘチマゴケ (*Pohlia nutans*) (Wang *et al.* 2020) から、2-オキシグルタル酸依存性のジオキシゲナーゼ型 FNSI が報告された。この結果を受けて、改めて、ヒメツリガネゴケのゲノムで、同じコケ植物の FNSI の遺伝子の相同性検索を行った。その結果、予備的なデータではあるが、FNSI 遺伝子のオーソログ (XP_024374366) が確認された。このヒメツリガネゴケ FNSI 候補遺伝子 (XP_024374366) とヘチマゴケ (*Pohlia nutans*) FNSI (MK036763) のアミノ酸配列での相同性は 79% を示した (図 21)。

```

MK036763      MAAAVEQGICWSHERVQSVAEQGLLEIPASYIRPAEERPNSRQSSSLKEIPVIDLAQGGP
XP_024374366 MLGFS-----SFERVQSLSEQGLEVPSSYIRPAEERPS--ISELVGEIPVIDLADGSL
* ..          *.*****:*****:*****:*****:*****:*. : *****:*.

MK036763      DVSAQVQGACRDWGFQVNVHGVPLELLERIREIGAIFYARPMEEKLAYACRDAGTAPEG
XP_024374366 DVTAQIGQACREWGFQVNVHGVPKELLLNRMLELGAIFYAKPMEEKLAYACKDPGTAPEG
**:**:*****:*****:***** **:**: *:*****:*****:*****:*.*****

MK036763      YGSRMLVKDEQVLDWRDYIDHHSPLSRRNINRWPADPPHYRSTIEEFSDETSKLAQRLL
XP_024374366 YGSRMLVKEEQVMDWRDYIDHHTLPLSRRNPSRWSPDPPHYRSMEEFSDTCKLARRIL
*****:**:*****:***** .**:*:*****:*****.***:**:
Fe(2+) 2-oxoglutarate dioxygenase domain

MK036763      GFISESLGLPAQFLEEAVGEPSONIVINFYPPCPQPDLTGLQSHSDMGAITLLLQDDVA
XP_024374366 GHISESLGLPTQFLEDAVGEPAQNIVINYYPTCPQQLTGLQAHSDMGAITLLLQDDVA
* .*****:***:*****:*****:*.*****:*****:*****:*****

MK036763      GLQVKRNNEWFTIQPMREAFVNVNLGDMCQILTNDIYKSVEHRVVVNGERSRYSVATFYDP
XP_024374366 GLQVKKNNEWSTIQPIRDTFVVNLGDMQLQILSNDKYRSVEHRTVVNGERARKSVAVFYDP
*****:*** **:*:***** **:* *:******.*****:* ***.***

MK036763      AKTRLISPAAPLVDKDRPALFPSILFGEHVATWYSGPGDGKKNIDSLVIE
XP_024374366 AKNRLISPAAPLVDKDHPALFPSILYGDHVLNWYSGPGDGKRTIDSLIE
** .*****:*****:*****:*** .*****:*.*****:*.

```

図 21 ヒメツリガネゴケ FNSI 候補遺伝子 (XP_024374366) とヘチマゴケ (*Pohlia nutans*)

FNSI (MK036763) の比較

*は完全に一致している :は強い類似性のあるグループに属している

・は弱い類似性のあるグループに属している

オレンジ色の箇所は、Fe (2+) および 2-oxoglutarate dioxygenase の結合領域を示す

今回、ルテオリンの生合成経路を考察すると、おそらくルテオリンはナリンゲニンを基質とし、フラボノイド 3'ヒドロキシラーゼ (F3'H) および FNSI の関与が示唆される (図 22) . F3'H に関しては、ヘチマゴケ (*Pohlia nutans*) からの遺伝子の存在およびヒメツリガネゴケのオーソログの存在が報告されている (Liu *et al.* 2014) . 今後、ナリンゲニンからルテオリンへの生合成ルートに関して詳細な解析を行うためには、遺伝子の単離と機能解析が必要と考えられる.

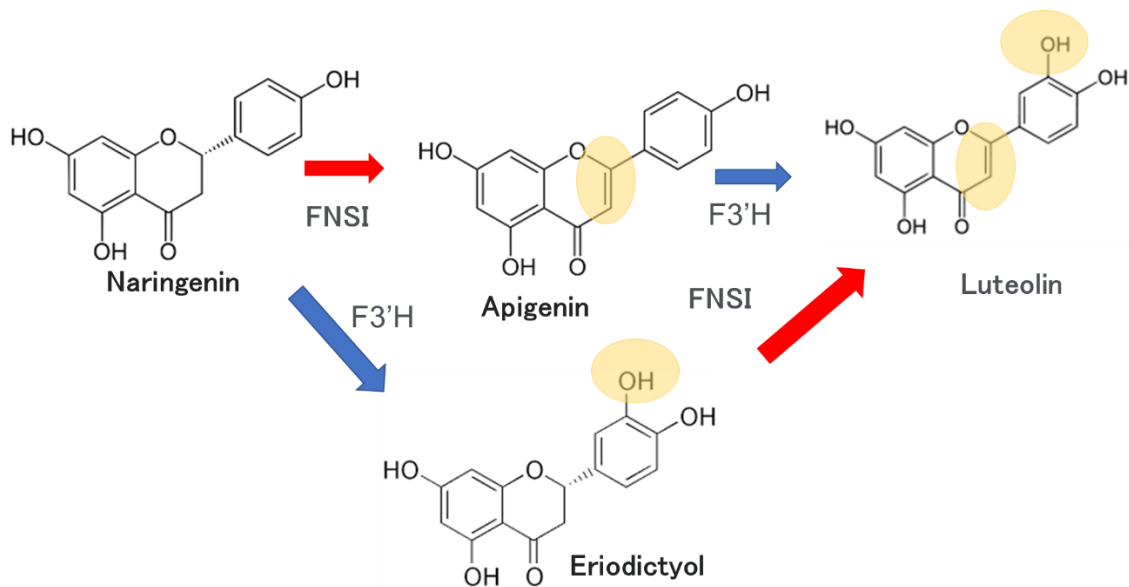


図 22 ルテオリンの生合成経路の予測

FNSI, type I Flavone synthase; F3'H, Flavonoid 3'-hydroxylase

赤い矢印は、FNSI での酵素反応を示す。青い矢印は、F3'H での酵素反応を示す。

また、ルテオリンの B 環の 3'および 4'位の水酸基の安定同位体酸素により標識化された結果 (図 19C, 図 22) に関して、B 環の 3'の水酸基は CYP450 の F3'H による分子状安定同位体酸素原子の付加による効果であると推測できる。そして、B 環の 4'位の水酸基はフェニルプロパノイド生合成経路の初期酵素である CYP450 の Cinnamate 4-hydroxylase (C4H) による分子状安定同位体酸素原子の付加による効果であると推測できる (図 23)。

本研究成果は、ヒメツリガネゴケにおけるフラボンの生合成経路 (代謝経路) の存在を提唱するものであり、LC/MS メタボローム解析によって、ゲノム解析からのアプローチでは発見することができなかった二次代謝産物の代謝経路推定を実現したものである。

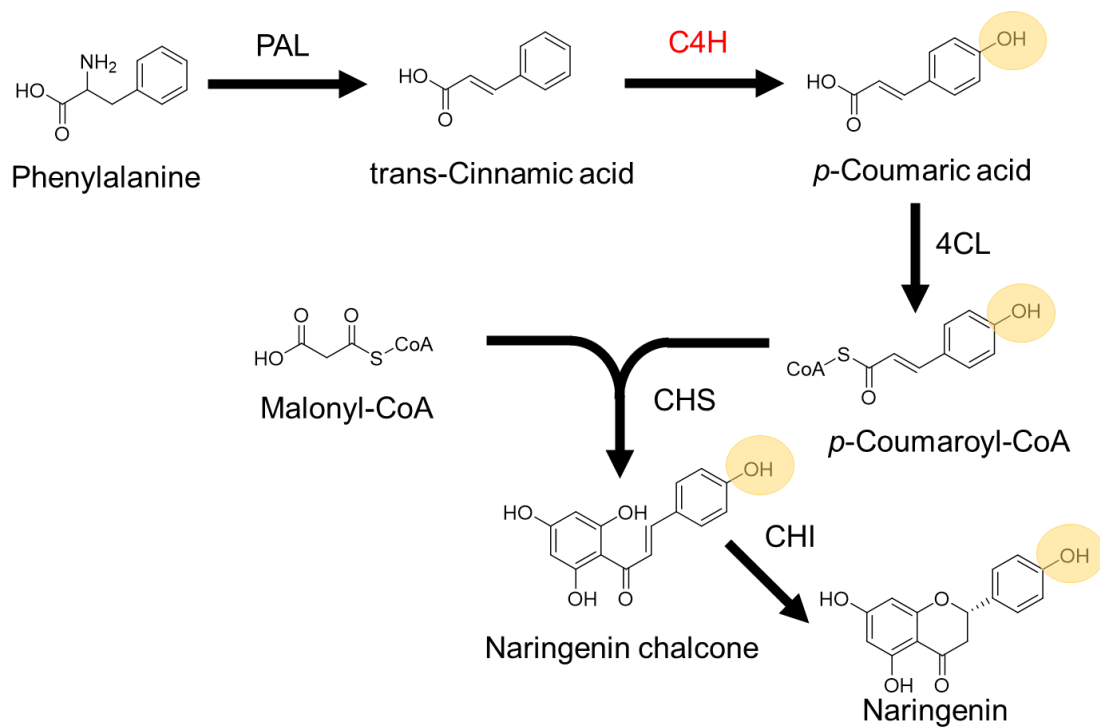


図 23 フェニルプロパノイド生合成経路（フェニルアラニンからナリンゲニン）

PAL, Phenylalanine ammonia-lyase; C4H, Cinnamate 4-hydroxylase; 4CL, 4-Coumarate: coenzyme A ligase; CHS, Chalcone synthase; CHI, Chalcone isomerase

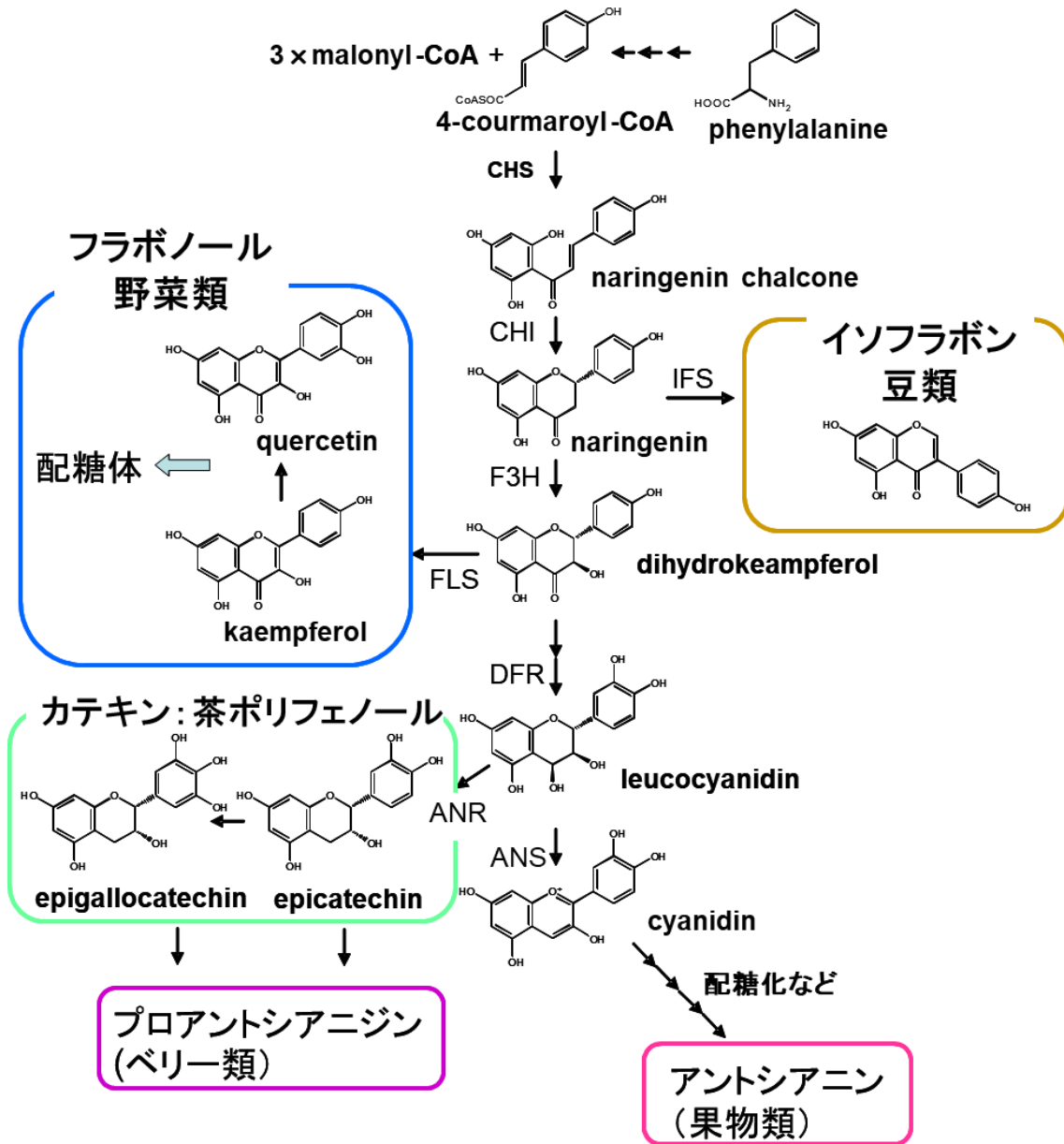
第3部 ミヤコグサのフラボノイド代謝研究

3.1 緒言

フラボノイドは、植物器官に色を与え、植物の成長に有益な効果をもたらす、環境ストレス条件への適応をサポートすることが知られている天然有機化合物である (Iwashina 2015; Petrusa *et al.* 2013; Sharma *et al.* 2019a) . 花の色は、受粉のために昆虫や鳥を引き付けることや、紫外線の有害な影響から植物を保護することが知られている。花弁の黄色の色に対するカルコン、オーロン、フラボノールの寄与は、いくつかの植物種で報告されている。一般的なフラボノールに加えて、ケルセタゲチン (6-ヒドロキシケルセチン) , ゴシペチン (8-ヒドロキシケルセチン) , それらの誘導体 (6-および8-ヒドロキシル化フラボノール) は、キク科, アオイ科, マメ科, ケシ科植物では、花弁の黄色の色素に関与していることが知られている (Dudek *et al.* 2016; Geissman and Steelink 1957; Harborne 1969; Schliemann *et al.* 2006; Suzuki *et al.* 2008) . また、フラボノイドは、図 24 に示したように、色素だけでなく野菜のフラボノール配糖体、お茶のカテキン (Chen *et al.* 2017) , 大豆のイソフラボン (Garcia-Calderon *et al.* 2020) , ベリー類のアントシアニン (Liu *et al.* 2018) など、多くの機能性成分としても知られている。

フラボノイドの基礎骨格の炭素原子のナンバリング (numbering) 図と環状構造の部位の呼称を図 25 に示した。

A



B



図 24 フラボノイドの生合成経路と各代表的なフラボノイド成分

A 酢酸・マロン酸，シキミ酸の複合経路であるフェニルプロパノイド生合成経路の分類に属するフラボノイド生合成経路

B フラボノイド成分の種類と代表的な植物素材

CHS, Chalcone synthase; CHI, Chalcone isomerase; IFS, 2-Hydroxyisoflavanone synthase; F3H Flavanone 3-hydroxylase; FLS, Flavonol synthase; DFR, Dihydroflavonol 4-reductase; ANS, Anthocyanidin synthase; ANR, Anthocyanidin reductase

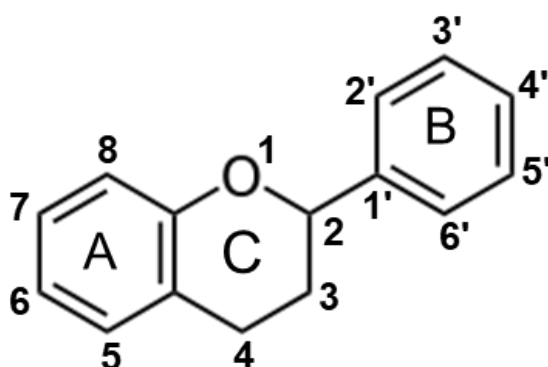


図 25 フラボノイドの基礎骨格の炭素原子のナンバリング (numbering) 図と環状構造の部位の呼称

フラボノイド構造の基本的な C6-C3-C6 骨格は，2つの芳香環と1つの複素環からなり，一般に3つのマロニル CoA と1つの 4-coumaroyl-CoA の縮合反応によって合成される (図 24) (Chen *et al.* 2017; Winkel-Shirley 2001b) . また，フラボノイドの基本骨格である C6-C3-C6 骨格を左から，A 環，C 環，B 環と呼称 (図 25) する. フラボノイド構造のさらなる構造および機能性の修飾は，酸化，還元，グリコシル化，メチル化およびアシル化の各反応によって基本構造に加えられる (Saito *et al.* 2013) . フラボノイドの各環の水酸基は，O-グリコシル化，メチル化，アシル化など，その後の修飾化反応の標的になるので，非常に重要な置換基である. フラボノイド生合成経路において，フラボノイドの A 環の 5 位および 7 位の酸素原子はマロニル CoA に由来し，B 環の 4'位の酸素

原子は 4-coumaroyl-CoA に由来する。そして、フラボノイド生合成経路の重要な中間産物であるナリングニンが生成される。その後、ナリングニン生合成に続いて、C 環の 3 位の水酸化反応は、2-オキシグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ (2ODD) 型のフラバノン 3-ヒドロキシラーゼ (F3H) によって触媒され、3'位および 5'位の水酸化反応は、シトクロム P450 依存性モノオキシゲナーゼ (CYP) 型のフラボノイド 3'ヒドロキシラーゼ (F3'H) , フラボノイド 3', 5'ヒドロキシラーゼ (F3'5'H) によって触媒される (図 26) (Ayabe and Akashi 2006; Wang *et al.* 2019) . これらフラボノイドの B 環および C 環の水酸化反応に加えて、A 環の 6 位および 8 位における水酸化反応 (図 26) は、固有の植物の特異的な代謝産物の生合成経路において報告されている。

フラボノイド 6-ヒドロキシラーゼ (F6H) は、最初に 2ODD 型の酸化酵素として同定され、ケルセタゲチン (6-ヒドロキシケルセチン) およびその誘導体の合成酵素として、ユキノシタ科ネコノメソウ属植物 (*Chrysosplenium americanum*) の葉からクローン化された (Anzellotti and Ibrahim 2000, 2004) . さらに、CYP 型 F6H はマメ科植物のダイズ (*Glycine max* L.) から、フラバノン 6-ヒドロキシラーゼ (CYP71D9) (Latunde-Dada *et al.* 2001) , 別名マリゴールドとして知られているキク科植物のセンジュギク (千寿菊) (*Tagetes erecta* L) およびコウオウソウ (紅黄草) (*Tagetes patula* L) から quercetagenin synthase (ケルセタゲチン合成酵素) (Halbwirth *et al.* 2004) , シソ科植物バジル (*Ocimum basilicum* L.) から 7-O-methylated apigenin (flavone) 6-hydroxylase (7O メチルアピゲニン 6 ヒドロキシラーゼ) (CYP82D33) (Berim and Gang 2013) およびシソ科植物コガネバナ (*Scutellaria baicalensis* GEORG) から chrysin (flavone) 6-hydroxylase (クリシン 6 ヒドロキシラーゼ) (SbCYP82D1.1) (Zhao *et al.* 2018) が単離報告されている。

一方、フラボノイド 8-ヒドロキシラーゼ (F8H) 活性に関しては、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) およびフラビンアデニンジヌクレオチド (Flavin adenine dinucleotide, FAD) の存在下で、初めてキク科のアラゲシュンギク

(*Chrysanthemum segetum*) のミクロソーム画分で検出された。また、シソ科植物バジル (*Ocimum basilicum* L.) から PAO 型の F8H である salvigenin

(flavone) 8-hydroxylase (サルビゲニン 8 ヒドロキシラーゼ) (Berim *et al.*

2014) が単離報告され、シソ科植物コガネバナ (*Scutellaria baicalensis*

GEORG) (SbCYP82D2) から、chrysin 8-hydroxylase (クリシン 8 ヒドロキシ

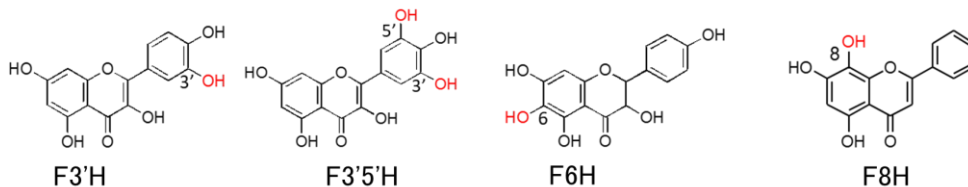
ラーゼ) (Zhao *et al.* 2018) が単離報告されている。しかし、ゴシペチン生合

成経路に関与するフラボノイド 8 水酸化酵素 (フラボノイド 8-ヒドロキシラー

ゼ, F8H) は、未だに単離報告 (同定) されていない。

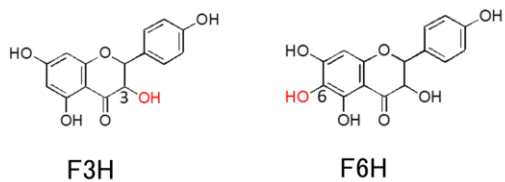
1. シトクロム P450

(CYP71D, CYP73A, CYP75A, CYP75B, CYP81E, CYP82D, CYP93B, CYP93C)



(マメ科、シソ科、キク科) (シソ科)

2. 2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ (2ODD, 2ODG, DOX)



(ユキノシタ科)

図 26 植物由来のフラボノイド骨格合成後のフラボノイド水酸化酵素の特徴およびゴシペチン生合成経路の推測

F3H, Flavanone 3-hydroxylase; F3'5'H, Flavonoid 3', 5'-hydroxylase; F3'H, Flavonoid 3'-hydroxylase; F6H, Flavonoid 6-hydroxylase; F8H, Flavonoid 8-hydroxylase; 2ODD/2ODG/DOX, 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenase

マメ科のモデル植物ミヤコグサ (*Lotus japonicus*, accession Miyakojima MG-20) は花色が黄色い植物である。ミヤコグサはゲノム解析が終了 (Sato *et al.* 2008) しており、遺伝子発現配列タグ (Expressed Sequence Tags, EST) などの遺伝子リソースが整備され、そのゲノム配列データベースが構築されている (Asamizu *et al.* 2003; Asamizu *et al.* 2004; Kaneko *et al.* 2003; Kato *et al.* 2003; Nakamura *et al.* 2002; Sato *et al.* 2001) 。以前にミヤコグサの器官別 (花, 葉, 茎, 根) の LC/MS メタボローム解析でのフラボノイドプロファイリング分析結果から、黄色の花弁にゴシペチン (8 位の水酸化ケルセチン) の 3 位配糖体 (gossypetin 3-*O*-glucoside および gossypetin 3-*O*-galactoside) が特異的に蓄積していることを報告している (図 27) (Suzuki *et al.* 2008) 。先で述べた通り、キク科のアラゲシュンギク (*Chrysanthemum segetum*) の花由来のミクロソーム画分で、フラボノイド 8 位ヒドロキシラーゼ (F8H) の活性が補因子として FAD および NADPH/NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate/ Nicotinamide adenine dinucleotide) の存在下で報告 (Halbwirth and Stich 2006) されたことから、ミヤコグサにおいて花弁で特異的に発現している F8H 遺伝子の存在が予測された (図 28) 。そこで、ミヤコグサの花弁の色素形成に関与しているゴシペチンの生合成経路に寄与しているヒドロキシラーゼ遺伝子の単離を目的として、ミヤコグサの EST データベースおよびゲノム配列の解析を行った。

本研究では、ミヤコグサの花弁から構築した非冗長である EST データを用いて、ミヤコグサ由来のゴシペチン生合成に関与するフラボノイド 8-ヒドロキシラーゼ (*Lotus japonicus* flavonoid 8-hydroxylase, LjF8H) の遺伝子を単離することができた。LjF8H は、染色体 III 上の単一のコピー遺伝子であり、6 つのエキソンで構成され、初期開花期に芽で発現される。系統学的分析は、LjF8H が植

物中の新しいフラボプロテインモノオキシゲナーゼに分類されることを示唆した。また、酵母における LjF8H 遺伝子の異種発現実験では、構造類似の基質を広く受け入れる広い基質受容性を有する NADPH 依存性のケルセチン 8-ヒドロキシラーゼ活性を示した。さらに、シロイヌナズナおよびペチュニアにおける LjF8H の形質転換発現実験により、ゴシペチンおよび 8-ヒドロキシケンフェロールの生合成が確認できた。この研究は、ゴシペチン生合成に関与する F8H のクローニングおよび同定を証明できた最初の研究報告である。

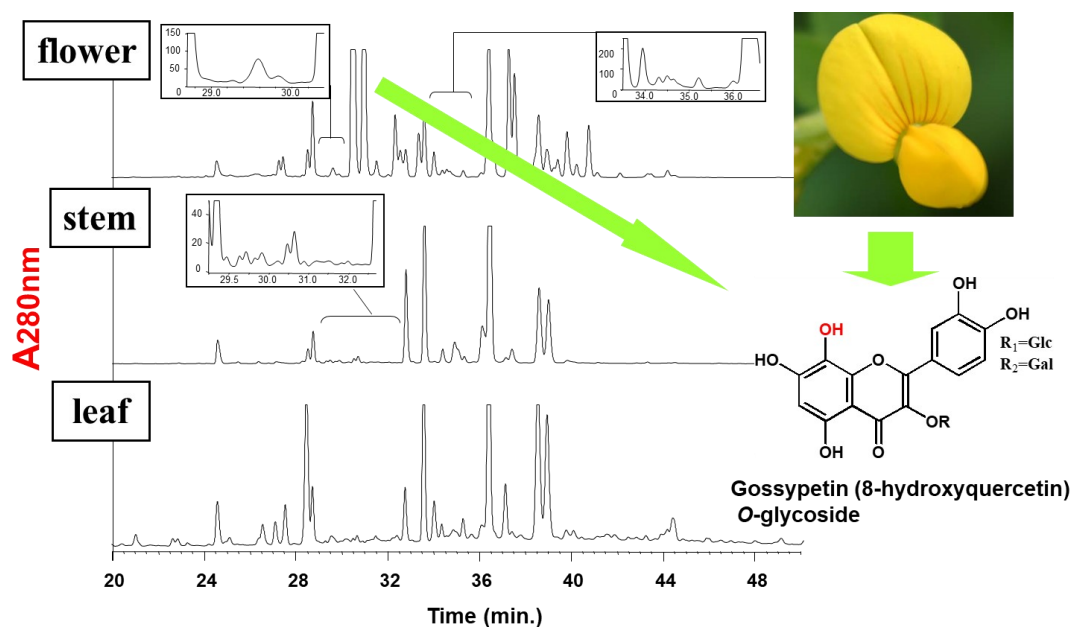


図 27 ミヤコグサ（器官組織別）の比較メタボローム解析

LC/MS の分析プロファイリング 吸光度 (280nm) で化合物の UV 吸収をモニターした
 上段：花弁，中段：茎，下段：葉の各抽出液を用いた。Glc, Glucose; Gal, Galactose

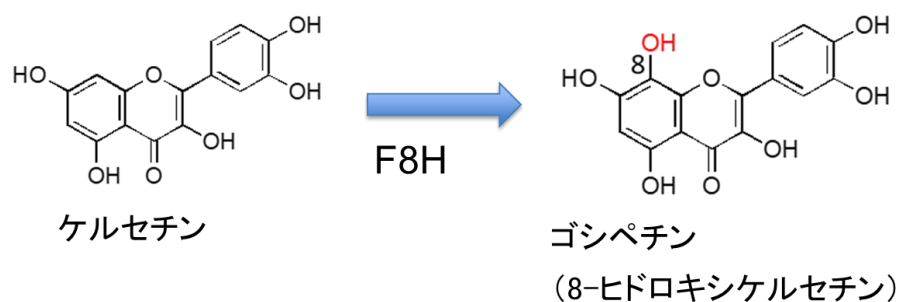


図 28 ミヤコグサの花弁に存在するゴシペチン生合成経路

F8H, Flavonoid 8-hydroxylase

3.2 材料および方法

3.2.1 試薬

ゴシペチン (gossypetin) , ケルセタゲチン (quercetagetin) , ケルセチン (quercetin) , ナリンゲニン (naringenin) , エリオディクチオール (eriodictyol) , アピゲニン (apigenin) , ルテオリン (luteolin) , タキシフォリン (taxifolin) , ケンフェロール (kaempferol) および 8-ヒドロキシケンフェロール (8-hydroxykaempferol) は, Plantech UK (Berkshire, UK) から購入した. 本研究で使用した LC/MS グレードの有機溶媒はすべて FUJIFILM Wako Pure Chemical Co. (Osaka, Japan) から購入した.

3.2.2 LjF8H 遺伝子の単離

図 28 に示したように, ミヤコグサの花弁に存在するゴシペチン生合成経路に関与する目的の酵素遺伝子であるフラボノイド 8-ヒドロキシラーゼ (LjF8H) の cDNA クローンをミヤコグサ (*L. japonicus*) から単離するために, ミヤコグサのアクセッション Miyakojima MG-20 で整備された遺伝子発現リソースである重複配列を除いた非冗長な EST (expressed sequence tags) データベース (Asamizu *et al.* 2004) を用いて, データマイニング (Data mining) による *in silico* 遺伝子クローニングを行った. アミノ酸配列による機能ドメインおよびモチーフ解析に関しては, 花芽で特異的に発現する EST 情報に対して, InterPro ソフトウェア (Jones *et al.* 2014) によって検索した. 得られた LjF8H の候補クローンに対応するクローンの中で最も長い挿入を有

する cDNA クローン (MFB088d08) に対して, 全ての転写領域の全塩基配列決定を行った.

3.2.3 LjF8H 遺伝子のゲノム構造

LjF8H cDNA 配列をターゲットとするプライマーセットを用いて BAC (bacterial artificial chromosome) ライブラリーからスクリーニングを行い, LjF8H 遺伝子を含む BAC (bacterial artificial chromosome) クローン (LjB13E21 と名付けた) を単離した. LjB13E21 の塩基配列の決定方法は, 引用した論文に記載されたショットガン手法に従って実施し, 評価した (Sato *et al.* 2001; Sato *et al.* 2008). 得られた LjB13E21 配列は, 染色体番号 3 (chr3) の擬似分子の下端の領域に存在することが判明した. ミヤコグサゲノム解読レベル 3 (v3.0) の位置 45,279,832 および 45,368,564 の間に対応することが明らかとなった.

3.2.4 LjF8H の分子系統解析

タンパク質のアミノ酸配列は, ClustalW ソフトウェア (Thompson *et al.* 1994) を用いてアライメントした. 系統樹は MEGA-X software (ver. 10.0.5) (Kumar *et al.* 2018) で近隣結合法を用いて作成した. ブートストラップ (bootstrap) の値は, 1,000 反復で計算した. 進化距離はポアソン距離法 (Poisson correction method) を用いて計算した. 使用するアミノ酸配列の Genbank IDs を表 7 に示す. なお, ゲノム解読された植物の遺伝子配列から予測されるタンパ

ク質配列情報も取り入れて、特に、LjF8H と近い遺伝子を取り上げて、分子系統解析を行った。

表 7 分子系統樹解析で用いた植物由来酸化酵素のアクセッション番号の一覧

Abbreviation	Binomial name	Accession number
At1g12130 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_172677.1
At1g12160 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_172680.1
At1g12200 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_172684.1
At1g62600 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_176448.1
At1g62620 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_176450.2
At1g63340 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_176523.4
At1g63370 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_176526.1
At1g63390 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_176526.1
At5g07800 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_196397.1
At5g61290 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_200937.1
FLS Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_001190266.1
FMO1 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_173359.3
GS-OX1 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_176761.1
GS-OX2 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_001320894.1
GS-OX3 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_176444.1
GS-OX4 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_564797.1
GS-OX5 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_001323223.1
MO1 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_001190738.2
MO2 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_195566.1
MO3 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_196151.1
NOGC1 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_176446.1
PAO Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_190074.1
PTC52 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_849444.1
YUCCA Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_001329230.1
YUCCA10 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_175321.1
YUCCA11 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_173564.1
YUCCA2 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_193062.1
YUCCA3 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_171955.1
YUCCA4 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_196693.1

YUCCA5 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_199202.1
YUCCA6 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_001190399.2
YUCCA7 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_180881.1
YUCCA8 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_194601.1
YUCCA9 Ath	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_171914.1
3HB6H Cca	<i>Cajanus cajan</i>	KYP68774.1
F6H Cam	<i>Chrysosplenium americanum</i>	AAU04696.1
Monoxygenase Car	<i>Cicer arietinum</i>	XP_027191098.1
CYP81E1 Gec	<i>Glycyrrhiza echinata</i> L.	BAA22422.1
CYP93B1 Gec	<i>Glycyrrhiza echinata</i> L.	BAA22423.1
CYP73A1 Htu	<i>Helianthus tuberosus</i>	CAA78982.1
LOC105644763 Jcu	<i>Jatropha curcas</i>	XP_020538915.1
LOC109355610 Lan	<i>Lupinus angustifolius</i>	XP_019454396.1
Chr1g0211181 Mtr	<i>Medicago truncatula</i>	XP_024628123.1
Chr4g035655 Mtr	<i>Medicago truncatula</i>	KEH29341.1
Chr5g0399671 Mtr	<i>Medicago truncatula</i>	XP_024640429.1
CYP82D33	<i>Ocimum basilicum</i> L.	AGF30364.1
F8H-1 Oba	<i>Ocimum basilicum</i> L.	AII16850.1
F8H-2 Oba	<i>Ocimum basilicum</i> L.	AII16848.1
PTC52-1 Oba	<i>Ocimum basilicum</i> L.	AII16851.1
CYP75A1 Phy	<i>Petunia x hybrida</i>	AUI38391.1
CYP75B Phy	<i>Petunia x hybrida</i>	AAD56282.1
011G004100g Pvu	<i>Phaseolus vulgaris</i>	XP_007131324.1
LOC109947717 Ppe	<i>Prunus persica</i>	XP_020414188.1
Pyn_02647 Pye	<i>Prunus yedoensis</i> var. <i>nudiflora</i>	PQM33851.1
Pyn_10783 Pye	<i>Prunus yedoensis</i> var. <i>nudiflora</i>	PQQ02178.1
CYP82D1.1 Sba	<i>Scutellaria baicalensis</i>	ASW21050.1
CYP82D2 Sba	<i>Scutellaria baicalensis</i>	ASW21052.1
Hypothetical protein Tsu	<i>Trifolium subterraneum</i>	GAU44291.1
08g213400 Van	<i>Vigna angularis</i>	KOM51307.1
Urate hydroxylase Van	<i>Vigna angularis</i>	XP_017432741.1
Monoxygenase Vra	<i>Vigna radiata</i> var. <i>radiata</i>	XP_014521347.1
09G233400 Gma	<i>Glycine max</i>	XP_003533524.1
10G282100 Gma	<i>Glycine max</i>	XP_003535754.1
12G003400 Gma	<i>Glycine max</i>	XP_003540567.1

20G107200 Gma	<i>Glycine max</i>	XP_006605859.1
CYP71D9 Gma	<i>Glycine max</i>	NP_001304582.2
CYP93C1 Gma	<i>Glycine max</i>	NP_001238515.2
F3H/FHT Gma	<i>Glycine max</i>	NP_001236797.1
FLS Gma	<i>Glycine max</i>	NP_001237419.1
Monoxygenase Gma	<i>Glycine max</i>	XP_003540567.1
ANS Gma	<i>Glycine max</i>	ABY51685.1

3.2.5 LjF8H 遺伝子の発現解析

形質転換シロイヌナズナ植物での LjF8H 遺伝子導入の遺伝子発現解析は、半定量的 RT-PCR 解析手法にて確認した。ベクターコントロール (VC) および LjF8H 遺伝子の挿入したシロイヌナズナの苗から全 RNA を調製し、TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 (TaKaRa Bio) を用いて、cDNA を合成して、RT-PCR 増幅を行った。RT-PCR で使用したプライマーを以下に示す。内部標準遺伝子は、アクチン (*Act2*) 遺伝子を用いた。LjF8H 遺伝子の増幅は、1 セットの 2 種類のプライマー (5'-CGGAATTCATGGAGAGAAATGAAGATGTGG-3'および 5'-GCTCTAGACTATAGAGTCCCACAATCATAG-3') を用い、26 サイクルで行った。アクチン (*Act2*) 遺伝子の増幅は、1 セットのプライマー (5'-ATGGCTGATGGTGAAGACATTC-3'および 5'-TCAGAAGCACTTCCTGTGAAC-3') を用い、24 サイクルで行った。

3.2.6 LjF8H 遺伝子の酵母での異種発現系の構築

異種発現で LjF8H の機能解析を行う目的での酵母発現ベクターの構築では、*LjF8H* cDNA のタンパク質に翻訳される全長コーディング領域 (CDS) を 1 セットのプライマー (2 種類) (5'-CGGAATTCATGGAGAGAAATGAAGATGTGG-3' および 5'-GCTCTAGACTATAGAGTCCCACAATCATAG-3') で PCR 増幅させた。得られた PCR 断片を酵母発現ベクター pYES2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) の制限酵素 *EcoRI-XbaI* のサイトに挿入した。

目的の LjF8H 遺伝子を導入した形質転換酵母 (LjF8H/BJ2168) および対照実験であるベクターのみを導入した形質転換酵母 (pYES2/BJ2168) をそれぞれ、SD 培地にて、30°C, 200 rpm で振盪培養を行った。2 日間培養後、それぞれの酵母を 27°C で 10 分間 5,000×g で遠心分離により回収した。そして、得られた沈殿物 (培養酵母) を SG 培地にて再懸濁を行い、SG 培地にて 30°C, 200 rpm で 2 日間振盪培養を行った。最後に、それぞれの酵母を室温で 10 分間 5,000×g で遠心分離して集菌し、得られた沈殿物 (培養酵母) を -80°C で保存した。

3.2.7 酵母ミクロソーム画分の調製および LjF8H の活性反応

保存した培養酵母を破壊して細胞内成分の抽出を行い、回転数の異なる遠心分離分画法によってオルガネラ (細胞小器官) の分画を次の通りに実施した。Zymolyase 溶液「50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5), 1 M sorbitol, 10 mM MgCl₂, 30 mM DTT および 2 mg/mL Zymolyase 100T (NACALAI TESQUE, Kyoto,

Japan) 」で、培養酵母を再懸濁し、28°C、1時間インキュベーションし、ガラスビーズ入りのホモジナイザーで破壊した。破壊された細胞残渣（未破碎細胞、核、細胞骨格）を除くために、抽出液を4°Cで5分間300×gで遠心分離した後、得られた上清（可溶性画分）を4°Cで10分間13,000×gでさらに遠心分離して、沈殿物（ミトコンドリア、リソソーム、ペルオキシソーム）を除き、再上清画分（可溶性画分）を調製した。最後に、ミクロソーム（小胞体）画分を調製するために、得られた再上清画分（可溶性画分）を4°Cで1時間150,000×gで超遠心分離した。ミクロソーム（小胞体）画分の沈殿物を洗浄するために、100 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）に再懸濁し、再度、4°Cで1時間150,000×gで遠心分離した。得られた洗浄したミクロソーム画分を100 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）に再懸濁して酵素活性測定に用いた。

酵素活性測定に関しては、標準的なアッセイ混合物として、最終容量500 μLに100 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 7.0, 0.4%アスコルビン酸ナトリウム）、10 μM FAD, 100 μM NADPH, 100 μM 各種フラボノイド, 50 μg タンパク質が含まれるように調製した。酵素活性溶液を30°Cで2時間インキュベートした後、50 μLの氷酢酸により、酵素反応を停止した。そして、反応生成物を500 μLの酢酸エチルでVortex Mixerで攪拌抽出し、4°Cで5分間15,000×gで遠心分離した。上層の酢酸エチル分画を回収し、窒素ガスで乾燥し、抽出エキスを2-メトキシエタノール200 μLで溶解した。その後、代謝産物の分析まで-80°Cで保存した。

タンパク質濃度測定は、市販のQuick Start Bradford Protein Assay（Bio-Rad, Hercules, CA, USA）を用い、牛血清アルブミン（bovine serum albumin）を標準タンパク質として測定した。

3.2.8 LC/MS 解析

酵母による酵素活性測定による代謝産物の解析は以下に示す LC/MS (Agilent 1100 series system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) および LTQ-Orbitrap™ (Thermo Fisher Scientific) 分析を行った。

LC-Orbitrap™-MS 分析条件

カラム	TSKgel ODS-100V (4.6 × 250 mm, 5 μm; TOSOH)
カラム温度	40°C
移動相	移動相 A: 0.1%ギ酸水溶液 移動相 B: 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液
移動相流速	0.5 mL/分
UV 吸収	フォトダイオードアレイ (PDA) 検出器

LC グラジエントプログラム

時間 (分)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0.0	70	30
20.0	3	97
25.0	3	97
30.0	70	30

MS 分析条件

完全質量スキャン (フルスキャンM) はエレクトロスプレーイオン化 (ESI) の陽性モード (positive mode) で測定し, Orbitrap™ 質量分析計 (解像度=100,000, 質量範囲 $m/z=100.0\sim 1500.0$) で記録され, MS/MS データはイオントラップまたは Orbitrap™ 型イオントラップによる各フルスキャンの 5 つの最も強いイオンで取得した。

LC/MS 解析では、酵素反応生成物を確認するために、ShiftedIonsFinder (マススペクトル比較解析ツール) による網羅的な解析を行った。具体的には、ゴシペチンを含むその他関連フラボノイド誘導体の検出および確認に関して、次に示すパラメーターで ShiftedIonsFinder (Kera *et al.* 2014) を用いて解析した。

ShiftedIonsFinder Parameters;

Max fold: Pentose ($C_5H_8O_4$) = 5, Deoxy hexose ($C_6H_{10}O_4$) = 5, Hexose ($C_6H_{10}O_5$) = 5, Uronic acid ($C_6H_8O_6$) = 5;

Mass difference = 3 ppm,

RT difference = 60

3.2.9 基質ナリンゲニンの酵素反応生成物の精製および NMR 測定

キラルカラムを用いた HPLC 分析の場合、形質転換酵母 (LjF8H/BJ2168) を、SD 培地にて 30°C, 160rpm で振盪培養した。20 時間後、室温で 5,000×g 10 分間、遠心分離して、SG 培地で再懸濁し、30°C で 25 µg/mL の 2 (RS) -ナリンゲニンを含む SG 培地にて 160rpm で 2 日間振盪培養した。培養した形質転換酵母 (LjF8H/BJ2168) を遠心分離にて、酵母を回収し、基質の 2 (RS) -ナリンゲニンおよび反応生成物が残存すると思われる培養液 (上清) を酢酸エチルで抽出し、濃縮後、35%アセトニトリルを有するキラルカラム (Chiralcel OD-RH; 4.6 × 150 mm, 5 µm; DAICEL, Osaka, Japan) を用いて、カラム温度 35°C, 35%アセトニトリルの移動相および 500 µL/分の流速で HPLC によって分離した。また、分取分取 HPLC にて、反応生成物のピークに分取および単離精製を行った。

精製された各化合物の 200 μg を使用して, JNM ECA-500 system (JEOL, Tokyo, Japan) で $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを取得した. 化合物のデータ解析は, 以前の化合物の分析機器の報告データ (Chen *et al.* 2012; Miyake *et al.* 2003) と比較した.

3.2.10 LjF8H 遺伝子のシロイヌナズナでの異種発現系の構築

LjF8H の植物内における酵素機能を調べるために, 形質転換植物の作出が容易なモデル植物のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を利用した.

アブラナ科植物のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) での形質転換実験では, LjF8H cDNA の全長コーディング領域 (CDS) を 1 セットのプライマー (2 種類)

(5'-TCTAGAATGGAGAGAAATGAAGATGTGGAG-3'および
5'-GAGCTCCTATAGAGTCCCACAATCATAGCG-3') で PCR 増幅し, 得られた PCR 断片を植物発現型バイナリーベクター pBE2113 (Mitsuhara *et al.* 1996) の制限酵素 *Xba*I-*Sac*I のサイトに挿入した.

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) Col-0 野生株の苗 (seedling) は 16 時間 (明所) / 8 時間 (暗所) の長日条件下で, 22°C で MS (Murashige and Skoog) (Murashige and Skoog 1962) 寒天培地およびバーミキュライト (expanded vermiculite) の入った苗ポットにて育成した. 外来遺伝子が無い空ベクターと pBE2113-LjF8H (LjF8H 遺伝子の挿入) のバイナリーベクターは, エレクトロポレーション法により土壌細菌 *Agrobacterium tumefaciens* strain

(GV3101::pMP90) へ導入して、シロイヌナズナへ、floral dip 法 (Clough and Bent 1998) で形質転換植物を得た。形質転換シロイヌナズナの T1 苗は、50 mg/L カナマイシン添加したムラシゲ・スクーグ (MS) 寒天培地で耐性マーカー (抗生物質カナマイシン耐性) の選抜を行った。遺伝子挿入部位の異なる独立した形質転換シロイヌナズナの各 T1 苗を選抜後、自家受粉による遺伝子挿入部位の異なる T2 種子を得た。

そして、得られた T2 種子を栽培した後代の形質転換シロイヌナズナの T2 ラインは、挿入遺伝子の確認および酵素基質であるケルセチン投与による代謝産物解析などさらなる実験材料に用いた。

挿入遺伝子の確認では、それぞれ total RNA を 5 つの独立したトランスジェニックライン (LjF8H-OX) から抽出し、半定量 RT-PCR により LjF8H 遺伝子の発現を解析した。代謝産物解析では、対照実験 (ベクターコントロール) および LjF8H-OX2 (最も高発現していたライン) のシロイヌナズナの苗を、0.1 mM ケルセチンを用いた液体 MS 培地で 1 週間培養した。その後、80%メタノールで抽出した後、代謝産物を LC/MS 分析した。

3.2.11 形質転換シロイヌナズナ植物を用いた LjF8H の活性反応

形質転換シロイヌナズナ植物を用いた酵素活性測定に関しては、形質転換シロイヌナズナ植物の培養中の MS 培地中にケルセチンを添加し、共存培養を行う投与実験を実施し、培養期間中に投与されたケルセチンの代謝変換することに期待して、LC/MS による代謝産物の確認を行った。

目的の LjF8H 遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナ (LjF8H-OXs) および対照実験であるベクターのみを導入した形質転換シロイヌナズナ (VC) の種

子をそれぞれ、30 µg/mL カナマイシンを用いた MS 液体培地で 4 週間培養した。そして、生長した苗をフラスコ中に 25mg のケルセチン（終濃度 100 µM）を含む MS 液体培地に移植した。移植後、一週間培養して、苗を液体窒素にて凍結させた。その後、代謝産物の分析まで -80°C で保存した。

植物での酵素反応生成物の確認は、植物の内在性酵素による代謝変換の影響を受けると考えられる。従って、新規の代謝産物を確認するために、代謝産物を前報で実施した分析手法（Kera *et al.* 2018; Shimada *et al.* 2005）に従って 80% メタノール抽出および酸加水分解処理後に、LC/MS（Agilent 1100 series system（Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA）および LTQ-OrbitrapTM（Thermo Fisher Scientific）分析を行った。LC/MS 分析条件および解析手法は前述（3.2.8）に従い、実施した。

3.2.12 ペチュニアでの LjF8H 遺伝子の異種発現系の構築

LjF8H は花卉の色素に関与していることから、花卉における色調（色素）の変化を期待して、ナス科植物のペチュニア（*Petunia x hybrida*）を利用した。

ナス科植物のペチュニア（*Petunia x hybrida*）での形質転換実験では、LjF8H およびバラ（rose）由来のフラボノール合成酵素 FLS（GenBank: AB038247.1）の両方の cDNA クローンを植物発現型バイナリーベクター pSPB5213 中に挿入した。その挿入領域の前後には、強化されたカリフラワーモザイク 35S プロモーター（Mitsuhara *et al.* 1996）およびオリジナルベクターの pBinPLUS を利用して、土壌細菌 *Agrobacterium* マンノピン合成酵素ターミネーターの発現制御存在下になるように、ベクター構築を行った。この手法では、宿主であるライン PL のペチュニア植物には、ケンフェロール

含量を増加させるためにバラ由来のフラボノールシンターゼ (FLS) 遺伝子も同時に挿入する共発現システムを用いた。FLS の利用目的は、ペチュニアの色素がアントシアンであるので、ペチュニアで黄色色素のフラボノールを蓄積することを期待した。

ペチュニア (*Petunia x hybrida*) 培養器苗は 16 時間 (明所) / 8 時間 (暗所) の条件下で、22°C で培養した。LjF8H およびバラ由来の FLS を過剰発現した形質転換ペチュニア植物は、宿主であるペチュニア (ライン PL) を用いて、アグロバクテリウムリーフディスク法 (*Agrobacterium*-mediated leaf disc transformation method) で作出した。形質転換ペチュニア植物は、BA (6-ベンジルアデニン) (1 mg/L) および NAA (α ナフタレン酢酸) (0.1 mg/L) を添加した MS 寒天培地上の 50 mg/L カナマイシンによって選択された (Tsuda *et al.* 2004)。LjF8H およびバラ由来の FLS を過剰発現した形質転換ペチュニア植物は、HPLC にて、フラボノールおよびフラボンの解析を行った。宿主植物として用いたペチュニア (ライン PL) はフラボノイドの B 環の水酸化酵素 (ヒドロキシラーゼ) に関連するフラボノイド 3'ヒドロキシラーゼ (F3'H) とフラボノイド 3',5'ヒドロキシラーゼ (F3'5'H) が欠損している植物であり、淡いピンクの花びらを咲かし、アロマデンドリン (ジヒドロケンフェロール) とケンフェロールを蓄積する。

3.2.13 形質転換ペチュニア植物の代謝産物解析

形質転換ペチュニア植物の代謝産物の分析に関して、成熟した花びらを採取し、液体窒素で凍結させた。その後、代謝産物の分析まで -80°C で保存した。

得られた複数の形質転換ペチュニア植物から意味のある形質転換体を選抜するために、酵素反応生成物の確認を行う HPLC によるスクリーニングを実施した。形質転換ペチュニア植物の代謝産物の分析では、宿主のペチュニア植物（PL Line）に蓄積しているフラボノールおよびフラボンの代謝産物が確認できる前報に従い HPLC で分析した（Tsuda *et al.* 2004）。

シロイヌナズナの実験と同様、ペチュニア植物でも内在性酵素による代謝変換の影響を受けると考えられたので、代謝産物を前報で実施した分析手法（Kera *et al.* 2018; Shimada *et al.* 2005）に従って 80%メタノール抽出および酸加水分解処理後に、LC/MS（Agilent 1100 series system（Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA）および LTQ-OrbitrapTM（Thermo Fisher Scientific））分析を行った。LC/MS 分析条件および解析手法は前述（3.2.8）に従い、実施した。

3.3 結果

3.3.1 LjF8H の cDNA クローンの選抜および同定

ミヤコグサでの異なる組織（器官）からのフラボノイドのメタボローム解析では、液体クロマトグラフィー連結型フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析（LC-FT-ICR/MS）を用いて、黄色の花弁にゴシペチン（8位の水酸化ケルセチン）の3位配糖体（gossypetin 3-*O*-glucoside および gossypetin 3-*O*-galactoside）が特異的に蓄積していることが報告されている（図 27）（Suzuki *et al.* 2008）。この結果から、花弁でのみゴシペチンがケルセチンの8位の水酸化反応により生合成されていると推測できた。そして、データマイニング（Data mining）による *in silico*（コンピュータを用いた）遺伝子クローニング（遺伝子探索）を行った。その結果、ミヤコグサ（アクセッション Miyakojima MG-20）の EST データ（Asamizu *et al.* 2004）を精査し、フラボノイド 8 ヒドロキシラーゼ（F8H）の存在を確認した。

重複配列を除く非冗長な 74,472 個のクローンから、蕾や花で特異的に発現している 320 個のクローンを選抜した。次に、「オキシダーゼ関連遺伝子」のアノテーション情報（次頁の注釈④）を用いて第二のスクリーニングを行い、蕾および花弁の両方で発現を確認されている 1 個のクローン、蕾のみで発現している 3 個のクローン、花弁のみで発現している 1 個のクローンを選抜した。

注釈④ 遺伝子解析でのアノテーションとは、核酸およびアミノ酸配列に対して、相同検索後、遺伝子名、遺伝子分類名、機能学的性質および生物学的情報を付加すること、およびその付与された情報自体を示す。

これらは、全て、“oxidase-relate gene”というキーワードが遺伝子の機能予測でアノテーションされているクローンである。さらに、候補遺伝子の選抜を絞るために、キク科のアラゲシュンギク (*Chrysanthemum segetum*) の花卉での F8H の植物酵素活性の論文 (Halbwirth and Stich 2006) で報告された F8H の酵素活性には、補酵素として NADPH および FAD を必要とすることから、ミヤコグサ由来の F8H も同じ特性を持つと推測した。選抜されたクローンを用いて、InterPro ソフトウェア (Jones *et al.* 2014) を使用して NADPH および FAD 結合モチーフを持つものを探索したところ、蕾のみで発現している 1 個のクローンが選抜された。なお、花特異的な EST データには、他の種類のオキシゲナーゼ遺伝子、例えば、オキソグルタル酸依存性のジオキシゲナーゼ (2ODD/2OGD ファミリー) やチトクロム P450 依存性のモノオキシゲナーゼ (P450 ファミリー) は存在していなかった。

結論として、F8H の機能を有すると推測する cDNA クローン (MFB088d08) を EST データマイニングおよび機能予測に必要な活性ドメイン検索により、74,472 個のクローンから 1 個のクローンに選抜することに成功した。cDNA クローン (MFB088d08) のタンパク質翻訳領域を含むクローニングインサートの全塩基配列を決定し、推定 F8H 遺伝子のコード配列を LjF8H (*Lotus Japonicus* Flavonoid 8- hydroxylase) と名付けた。LjF8H のインサートの塩基配列では、1203 塩基対で 400 のアミノ酸配列からなる分子量 44.5kDa のポリペプチドをコードすることが明らかとなった (図 29B)。

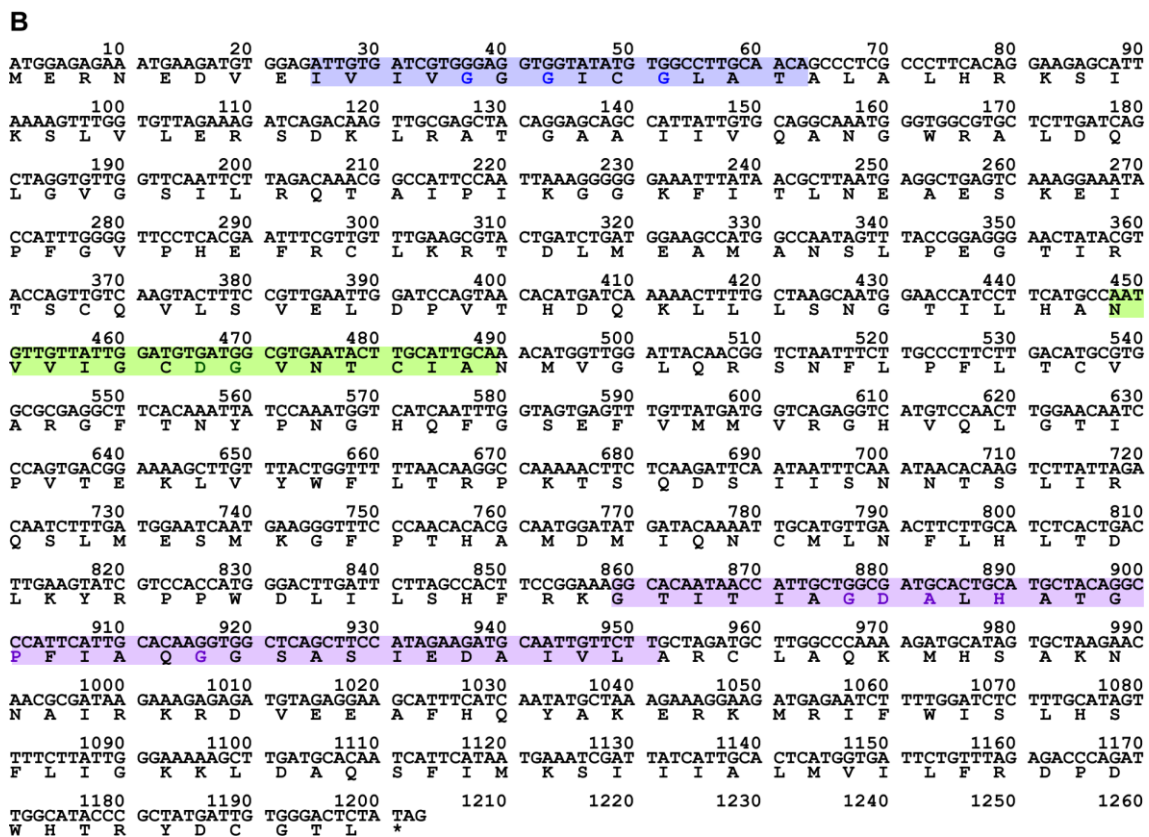
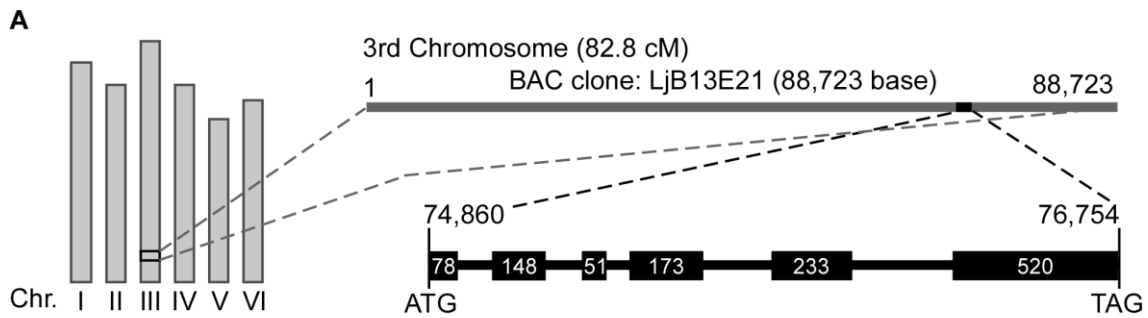


図 29 ミヤコグサ (アクセッション Miyakojima MG-20) 由来のフラボノイド 8-ヒドロキシラ
ーゼ (F8H) cDNA のクローニング

A : F8H のゲノム構造 黒の BOX はエキソン領域を示す。

B : LjF8H の塩基配列および推定コードアミノ酸配列 青色の配列は, FAD/NADPH binding motif , 緑色
の配列は, DG motif, 紫色の配列は, GD motif を示す. その中で, 重要なアミノ酸残基は各色で示す.

LjF8H のゲノム情報を得るために、ミヤコグサ由来の BAC クローンを用いて、ハイブリダイズ法による BAC クローンのスクリーニングを行い、LjF8H 遺伝子のコード配列は、染色体 III に位置する 6 つのエキソン内の 1,200 塩基対からなることを明らかにした (図 29A) . 以前の報告にある (Eppink *et al.* 1997; Montersino and van Berkel 2012) , N 末端 GxGxxG 配列, DG 配列, および NADPH および FAD 依存性オキシダーゼの共通モチーフである GD 配列はすべて LjF8H (図 29B) で検出され, LjF8H が NADPH および/または FAD 依存性オキシゲナーゼであることを示唆した.

3.3.2 LjF8H の系統樹分析

LjF8H は他の植物で F8H として単離，機能解析された遺伝子との相同配列を比較した．シソ科植物バジル (*Ocimum basilicum* L.) 由来の Rieske-type (2Fe-2S) および PAO 型の salvigenin 8-hydroxylase, *Ocimum basilicum* flavone 8-hydroxylase (ObF8H-1) (Berim *et al.* 2014) とは 20.3%，シソ科植物コガネバナ (*Scutellaria baicalensis* GEORG 由来 P450 の chrysin 8-hydroxylase (SbCYP82D2) (Zhao *et al.* 2018) とは，25.2%の低い identity であった．このことは，LjF8H が PAO または CYP ファミリーではないことを示唆している．LjF8H の分子系統樹を，前述の F8Hs (Berim *et al.* 2014; Zhao *et al.* 2018) ，機能同定されているフラボノイド 6 ヒドロキシラーゼ F6Hs (Anzellotti and Ibrahim 2000, 2004; Berim and Gang 2013; Latunde-Dada *et al.* 2001; Zhao *et al.* 2001) ，および植物由来の酸化酵素 (Berim *et al.* 2014; Hansen *et al.* 2007; Kawai *et al.* 2014; Mizutani and Ohta 2010) を用いて構築した (図 30) ．その結果，LjF8H は CYPs, DOXs および PAOs とは異なるモノオキシゲナーゼのグループに分類された．さらに，LjF8H は活性に補酵素である NADPH および/または FAD を必要とする (Schlaich 2007) 植物由来 FMO 群に最も近く分類された．しかしながら，LjF8H には F モチーフ (FXGXXXHXXXY) (Fraaije *et al.* 2002) が存在しなかった．すべての既知の植物由来 FMO の中には F モチーフ (FXGXXXHXXXY) が保存 (Schlaich 2007) されていることを考慮して，LjF8H が既知の植物由来 FMO のグループに属していないことが確認された．これらの結果は，LjF8H が植物の新しい FMO グループに属する可能性があることを示唆している．事実，図 30 に示された LjF8H が含まれるグループは，ゲノム解読された植物の遺伝子情報を元に予測されたアミノ酸配列情報を有す

るタンパク質の候補が集中していた。このグループでの機能同定されたタンパク質は極めて少なく、フラボノイド生合成に関与する酵素は存在していない。以上のことから、F8Hの酵素活性を有するLjF8Hは新しいフラビンモノオキシゲナーゼ依存性のタンパク質であると推測した。

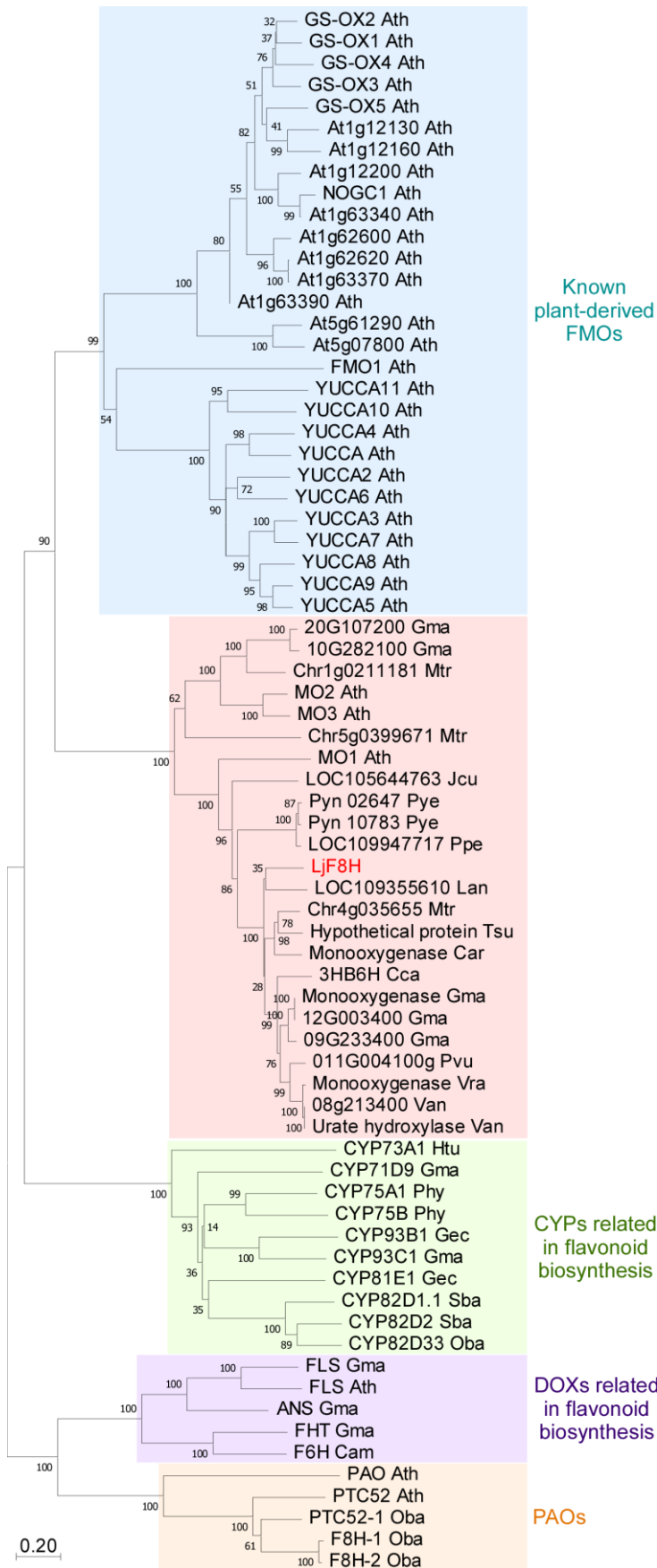


図 30 植物由来の酸化酸素のアミノ酸配列に基づく分子系統解析

Known plant-derived FMOs

CYPs related in flavonoid biosynthesis

DOXs related in flavonoid biosynthesis

PAOs

アメリカ国立生物工学情報センター (National Center for Biotechnology Information, NCBI) から入手した ClustalW ソフトウェアを使用してアライメント (整列化) した。系統樹は、ブートストラップ (1000 反復) によって、MEGA7 ソフトウェアを使用して、近隣結合法によって構築および描画した。ブートストラップの値は、各ブランチの横に表示した。線の長さはポアソン補正法によって計算される進化距離を示し、ラベルはタンパク質名 (または AGI コード) と種の略語である。略語を以下に示す。

Ath, *Arabidopsis thaliana*; Cam, *Chrysosplenium americanum*; Car, *Cicer arietinum*; Cca, *Cajanus cajan*; Gec, *Glycyrrhiza echinata* L.; Gma, *Glycine max*; Htu, *Helianthus tuberosus*; Jcu, *Jatropha curcas*; Lan, *Lupinus angustifolius*; Mtr, *Medicago truncatula*; Oba, *Ocimum basilicum* L.; Phy, *Petunia x hybrida*; Ppe, *Prunus persica*; Pvu, *Phaseolus vulgaris*; Pye, *Prunus yedoensis* var. *nudiflora*; Sba, *Scutellaria baicalensis*; Tsu, *Trifolium subterraneum*; Van, *Vigna angularis*; Vra, *Vigna radiata* var. *radiata*.

これらのシーケンスの accession numbers は表 7 に記載した。

略語: FMO, Flavin containing monooxygenase; CYP, Cytochrome P450; DOX, 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenase; PAO, Pheophorbide a oxygenase

3.3.3 異なる植物器官および花の発達段階における LjF8H の発現解析

先に述べた通り，ミヤコグサの EST データマイニングから得られた LjF8H 遺伝子はミヤコグサの蕾のみ発現している遺伝子であるとされている．今回，ミヤコグサの花の発達段階における LjF8H 遺伝子の発現解析は植物検体（材料）を用いて，リアルタイム RT-PCR 解析を行った．さらにまた，最近，公開されているミヤコグサ遺伝子解析データベースである LotusBase

(<https://lotus.au.dk/>) (Mun *et al.* 2016) を用いて，*in silico* 分析も追加解析した．その結果，図 31 に示されたように，LjF8H 遺伝子は葉，茎，鞘には全く発現しておらず，花の初期の発達段階（蕾からそれ以降）で発現していることが確認された．この結果は，EST 情報を相補する結果である．

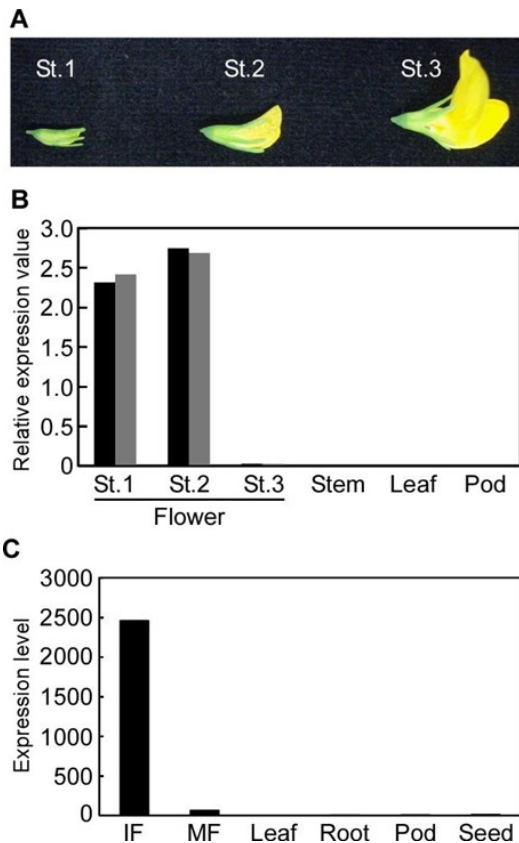


図 31 ミヤコグサの花の発達段階における LjF8H の遺伝子発現解析

A ミヤコグサの花の発達段階の区別。ミヤコグサ（アクセッション Miyakojima MG-20）は前報（Suzuki *et al.* 2008）で述べた方法に従って、自然光下、温室で栽培された。ミヤコグサの花の発達段階は蕾（St.1）、初期段階の花（St.2）、成熟した花（St.3）に分かれている。

B ミヤコグサ花、茎、葉および鞘のサンプルを収集し、リアルタイム RT-PCR（reverse transcription-polymerase chain reaction）のために液体窒素で凍結した。全 RNA 抽出後、PrimeScript RT reagent Kit（TaKaRa Bio, Shiga, Japan）を用いて cDNA を合成した。各値は、2 つの独立したシードバッチから作成された cDNA から分析された（黒、第 1 分析、グレー、第 2 分析）。TB Green Premix Ex Taq II（TaKaRa Bio）を利用して、標的（LjF8H）遺伝子の PCR 増幅を行った。内部標準遺伝子は、 β Tubulin（encoded by *Tubb*）遺伝子を用いた。LjF8H 遺伝子の増幅は、1 セットの 2 種類のプライマー-LjF8H（5'-AACGGTCTTTCtTGCCCTTC-3', 5'-TTTCCGTA CTGGGATTTTC-3'）、*Tubb* 遺伝子の増幅は、1 セットの 2 種類のプライマー-Tubb（5'-GGGCCAAAGGGCATTACA-3', 5'-TCCAGACCCAGTTCACCTC-3'）を使用した。

C 各組織（未熟な花（IF）、成熟した花（MF）、葉、根、鞘、および種子）における LjF8H 遺伝子の発現量をミヤコグサ遺伝子解析データベースである LotusBase（<https://lotus.au.dk/>）（Mun *et al.* 2016）を用いて、*in silico* 分析した。LotusBase における LjF8H 遺伝子の Gene/Transcript/Probe ID は LotjaGi3g1v0554900 である。

3.3.4 酵母における組換え LjF8H の酵素活性と補因子効果

LjF8H の酵素活性を同定するために、LjF8H の全長 cDNA を大腸菌発現ベクターである pCold-TF ベクターにサブクローニングした。そして、組換え LjF8H を大腸菌 BL21 細胞で過剰発現し、Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィーで精製した。ケルセチンを基質とする酵素活性を測定した結果、精製された LjF8H の活性を検出することができなかった。大腸菌でタンパク質を発現させる際、タンパク質の正しいフォールディングが起こらず、封入体 (inclusion body) を形成したことが、活性が得られなかった原因の一つであると考えた。そこで、LjF8H は、酵母発現ベクターである pYES ベクターを用いて出芽酵母 BJ2168 細胞で異種発現した。ガラスビーズホモジナイザーおよび遠心分離を用いた酵母細胞破壊の後、上清はさらに超遠心分離し、ミクロソーム画分を調製した。In vitro 酵素アッセイを行うために、基質としてケルセチン、FAD と NADPH を補因子として、得られたミクロソーム画分を用いて酵素活性測定を実施した。反応生成物を LC/MS 分析にて確認した結果を図 32 に示した。LC/MS で 12.16 分に *m/z* 319.0446 でピークを示し、その反応生成物がゴシペチンの質量値に対応した (図 32A)。標準物質のゴシペチンの分析データも 12.16 分で溶出し、6 位水酸化ケルセチンであるケルセタゲチンの分析データでは、保持時間は 11.77 分であった。保持時間を比較するとケルセタゲチン、ゴシペンチンの順番であった。そして、反応生成物と標準物質のゴシペチンの分析データの比較を行い、両分析データ共に類似のタンデム質量分析 (MS/MS) フラグメンテーションパターンを示した (図 32B)。これらの結果は、ゴシペチンが BJ2168 細胞における LjF8H の酵素生成産物であり、LjF8H が F8H 酵素活性を保持していることを示している。

ミクロソーム画分を用いた F8H の酵素活性測定は、FAD または NADPH の有無にかかわらず、その活性の補因子要件を調査するために、同じ方法で行われた。LjF8H は NADPH の添加しない時には活性を示さなかったが、一方、FAD の添加はその活性に影響を及ぼさなかった（図 32A）。これらの結果は、NADPH が LjF8H 活性に必要な補因子であることを示している。

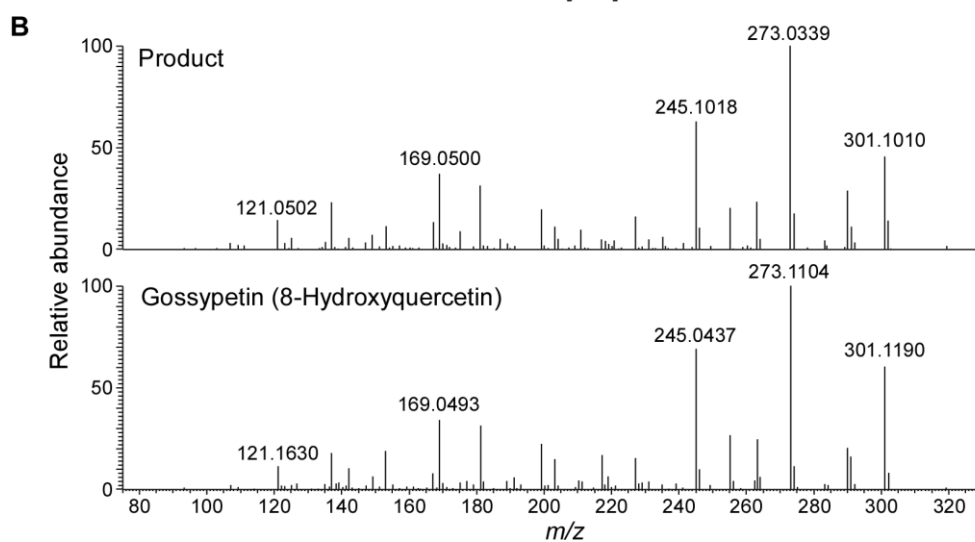
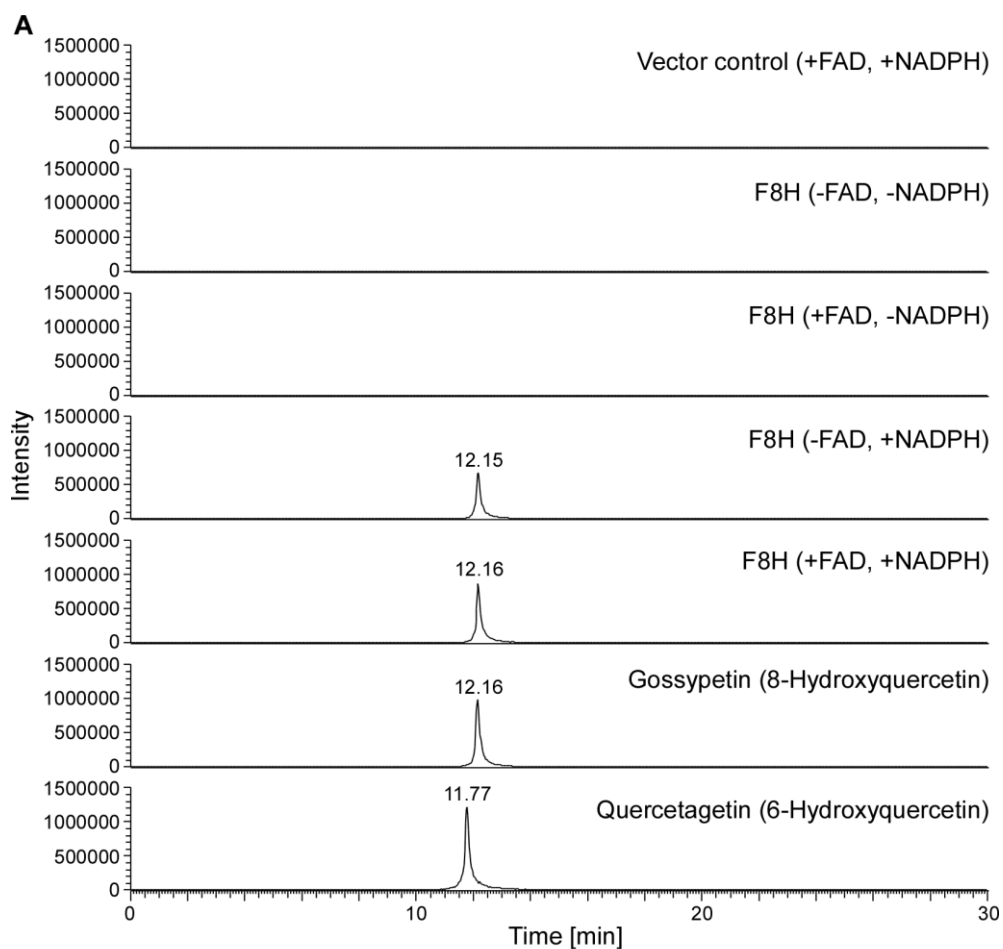


図 32 LC/MS を用いて組換え LjF8H の触媒反応での生成物の同定

A Orbitrap™ 質量分析による反応溶液のフルスキャン. 液体クロマトグラフィー (LC) のプロファイルを [Hydroxy quercetin+H]⁺, m/z 319.0446 ± 10 ppm の質量クロマトグラムでモニターした.

B イオントラップ質量分析計による m/z 319.04 のタンデム質量分析 (MS/MS) 解析

3.3.5 酵母における組換え LjF8H の基質受容性の確認

既に他の植物から報告された F8H は狭い基質の受容を示す (Berim *et al.* 2014; Halbwirth and Stich 2006; Zhao *et al.* 2018) . 本研究では, フラボノールのケルセチンおよびケンフェロールに加えて, フラバノンのナリンゲニンおよびエリオディクチオール, フラボンのアピゲニンおよびルテオリン, そして, フラバノールのタキシフォリンの各種フラボノイドを LjF8H の潜在的な基質として酵素活性測定に用いた (図 33) .

その結果, ベクターのみを含むネガティブコントロールでは酵素反応生成物は検出されなかったが, その一方, 各水酸化反応に基づく, 予測される化合物に対応するピークは LjF8H の酵素活性反応で検出された (図 34, 表 8) . 具体的には, フラボンのアピゲニンを基質とした酵素反応では, LC/MS で 13.52 分に m/z 287.0550 で 1 本のピークを示し, その反応生成物が水酸化アピゲニンの質量値に対応した (図 34A) . 同じくフラボンのルテオリンを基質とした酵素反応では, LC/MS で 12.05 分に m/z 303.0499 で 1 本のピークを示し, その反応生成物が水酸化ルテオリンの質量値に対応した (図 34B) . また, フラボノールのケンフェロールを基質とした酵素反応では, LC/MS で 13.79 分に m/z 303.0499 で 1 本のピークを示し, その反応生成物が水酸化ケンフェロールの質量値に対応した (図 34E) . 一方, フラバノンのナリンゲニンを基質とした酵素反応では, LC/MS で 12.98 分および 13.43 分に m/z 289.0707 で計 2 本のピークを示し, その反応生成物が水酸化ナリンゲニンの質量値に対応した (図 34C) . 同じくフラバノンのエリオディクチオールを基質とした酵素反応では, LC/MS で 11.28 分および 11.92 分に m/z 305.0656 で計 2 本のピークを示し, その反応生成物が水酸化エリオディクチオールの質量値に対応した (図

34D) . そして、フラバノノールのタキシフォリンを基質とした酵素反応では、LC/MS で 8.73 分および 9.39 分に $m/z321.0605$ で計 2 本のピークを示し、その反応生成物が水酸化タキシフォリンの質量値に対応した (図 34F) . 従って、既知の F8H とは異なり、本研究で使用した LjF8H は酵素活性を調査したすべての基質と反応した. 興味深いことに、ナリンゲニン, エリオディクチオール, またはタキシフォリンを使用した場合, 主反応生成物のピークの左側 (溶出時間の前) に小さな副産物のピークが検出された (図 34, 表 8) .

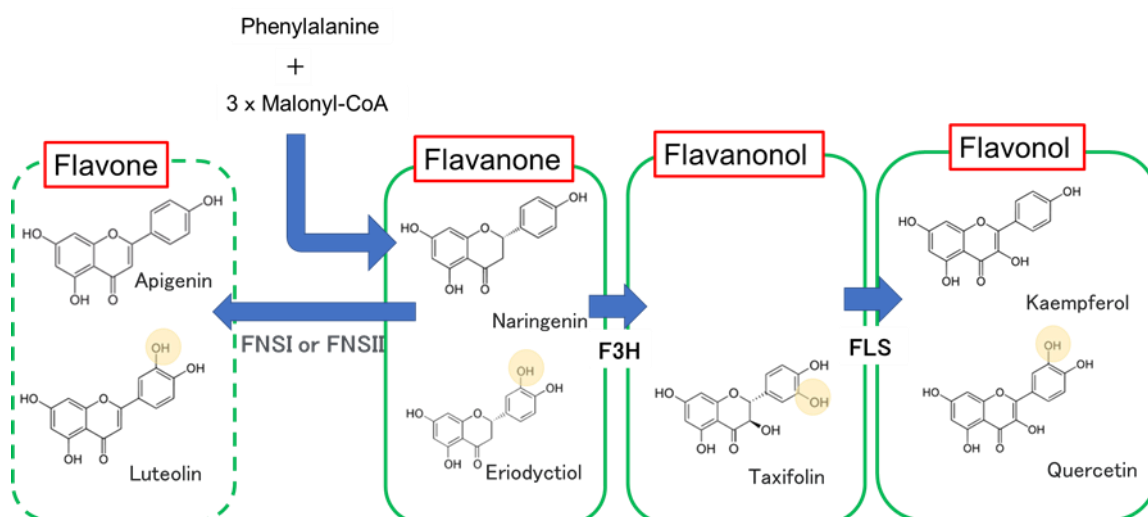


図 33 酵素活性に用いたフラボノイドの構造

青矢印は生合成経路を示す. 緑の枠は同じ骨格を示す. 緑の点線枠は, ミヤコグサで報告のない化合物 F3'H, Flavonoid 3'-hydroxylase; FLS, Flavonol synthase; FNS I, Flavone synthases I; FNS II, Flavone synthases II

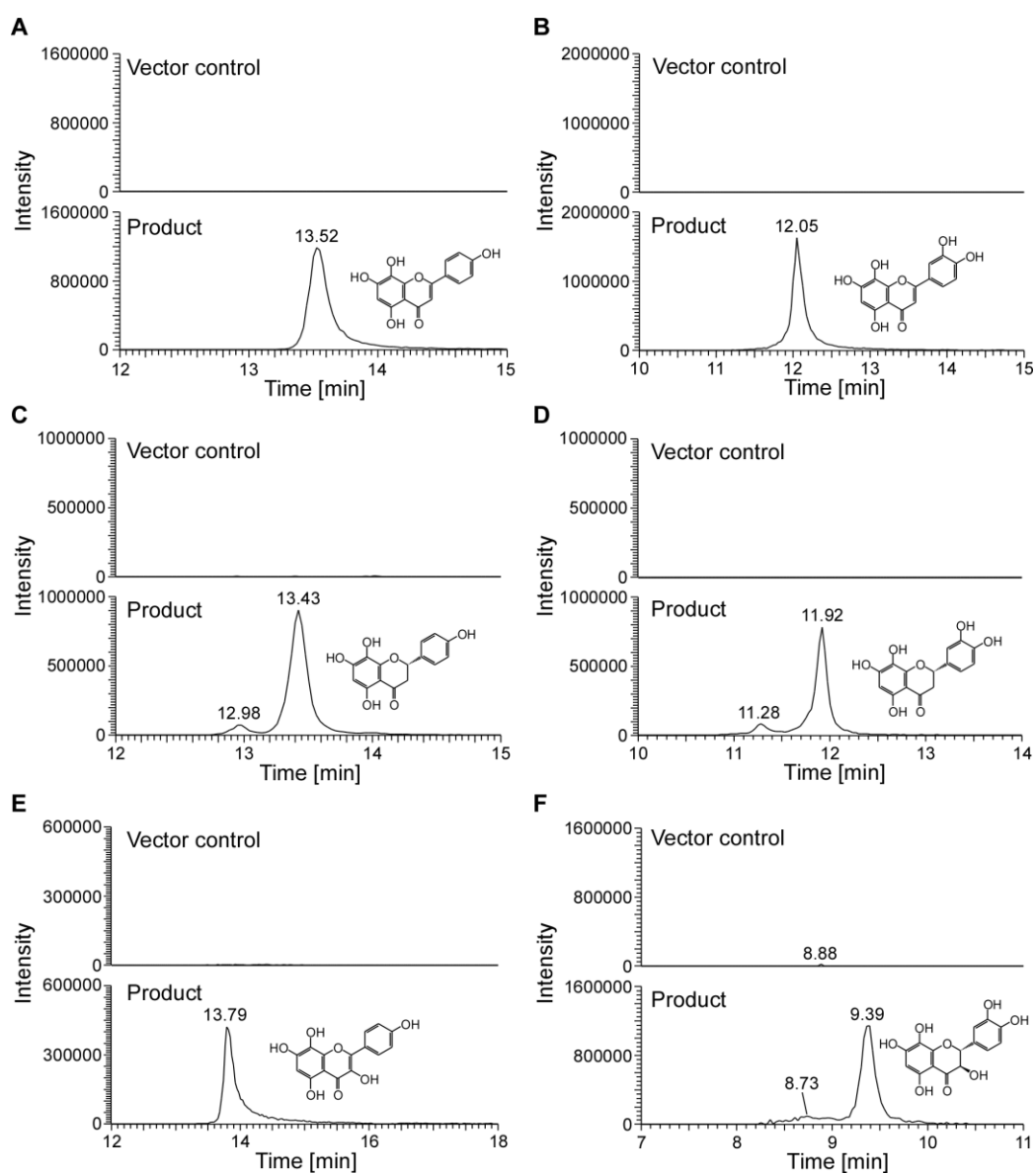


図 34 各種フラボノイド基質を用いて、組換え LjF8H で触媒反応の生成物に対する LC/MS 分析
 クロマトデータは Orbitrap™ 質量分析による反応溶液のフルスキャンである。

液体クロマトグラフィー (LC) プロファイルでは、検出目的の生成物に対応する正確な質量の MS クロマトグラムでモニターした。

以下の各水酸化体は以下の条件でモニターした。

- A. [hydroxy apigenin + H]⁺, m/z 287.0550 ± 10 ppm;
- B. [hydroxy luteolin + H]⁺, m/z 303.0499 ± 10 ppm;
- C. [hydroxy naringenin + H]⁺, m/z 289.0707 ± 10 ppm;
- D. [hydroxy eriodictyol + H]⁺, m/z 305.0656 ± 10 ppm;
- E. [hydroxy kaempferol + H]⁺, m/z 303.0499 ± 10 ppm;
- F. [hydroxy taxifolin + H]⁺, m/z 321.0605 ± 10 ppm.

表 8 LjF8H が受け入れる酵素基質の一覧とそれらに対応する生成物の量

Substrates	Products	Relative peak area of product ^a [%]
Quercetin	Gossypetin (8-hydroxyquercetin) *	100
Apigenin	Isoscutellarein (8-hydroxyapigenin)	98
Luteolin	8-hydroxyluteolin	173
Naringenin	Isocarhamidin (8-hydroxynaringenin)	71
Naringenin	Carthamidin (6-hydroxynaringenin)	6
Eriodictyol	8-hydroxyeriodictyol	44
Eriodictyol	6-hydroxyeriodictyol	8
Kaempferol	Herbacetin (8-hydroxykaempferol) **	50
Taxifolin	Dihydrogossypetin (8-hydroxytaxifolin)	21
Taxifolin	6-hydroxytaxifolin	Not detected

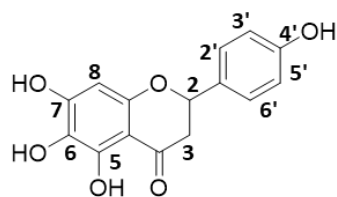
a 生成物の各ピーク面積は、全体のスキヤンのフォトダイオードアレイ (PDA) のクロマトグラムから計算した。

* LjF8H 遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナで検出された生成物

** LjF8H 遺伝子を導入した形質転換ペチュニアで検出された生成物

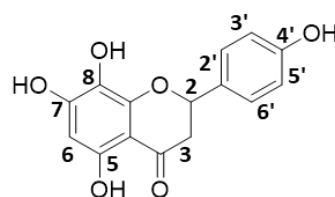
次に、ナリングニンを基質にした反応生成物の構造を明らかにするために、分取 HPLC にて、生成物のピークの分取および単離精製を行った。¹H-NMR から、ナリングニン由来の主な酵素反応生成物がイソカルサミジン (8-hydroxynaringenin) , 副産物はカルサミジン (6-hydroxynaringenin) と同定した (図 35A) 。 イソカルサミジンおよびカルサミジンの ¹H-NMR のチャートは図 35B および 35C にそれぞれ示した。

A



Carthamidin

$^1\text{H-NMR}$ (methanol- d_4);
 δ : 2.68 (1H, *dd*, $J = 3.0, 17.0$ Hz, H-3 $_{eq}$),
 δ : 3.09 (1H, *dd*, $J = 13.0, 17.0$ Hz, H-3 $_{ax}$),
 δ : 5.30 (1H, *dd*, $J = 3.0, 13.0$ Hz, H-2),
 δ : 5.96 (1H, *s*, H-8),
 δ : 6.80 (2H, *d*, $J = 8.5$ Hz, H-3',5'),
 δ : 7.30 (2H, *d*, $J = 8.5$ Hz, H-2',6').



Isocarthamidin

$^1\text{H-NMR}$ (methanol- d_4);
 δ : 2.73 (1H, *dd*, $J = 3.0, 17.0$ Hz, H-3 $_{eq}$),
 δ : 3.16 (1H, *dd*, $J = 12.5, 17.0$ Hz, H-3 $_{ax}$),
 δ : 5.39 (1H, *dd*, $J = 3.0, 12.5$ Hz, H-2),
 δ : 5.94 (1H, *s*, H-6),
 δ : 6.82 (2H, *d*, $J = 8.5$ Hz, H-3',5'),
 δ : 7.38 (2H, *d*, $J = 8.5$ Hz, H-2',6').

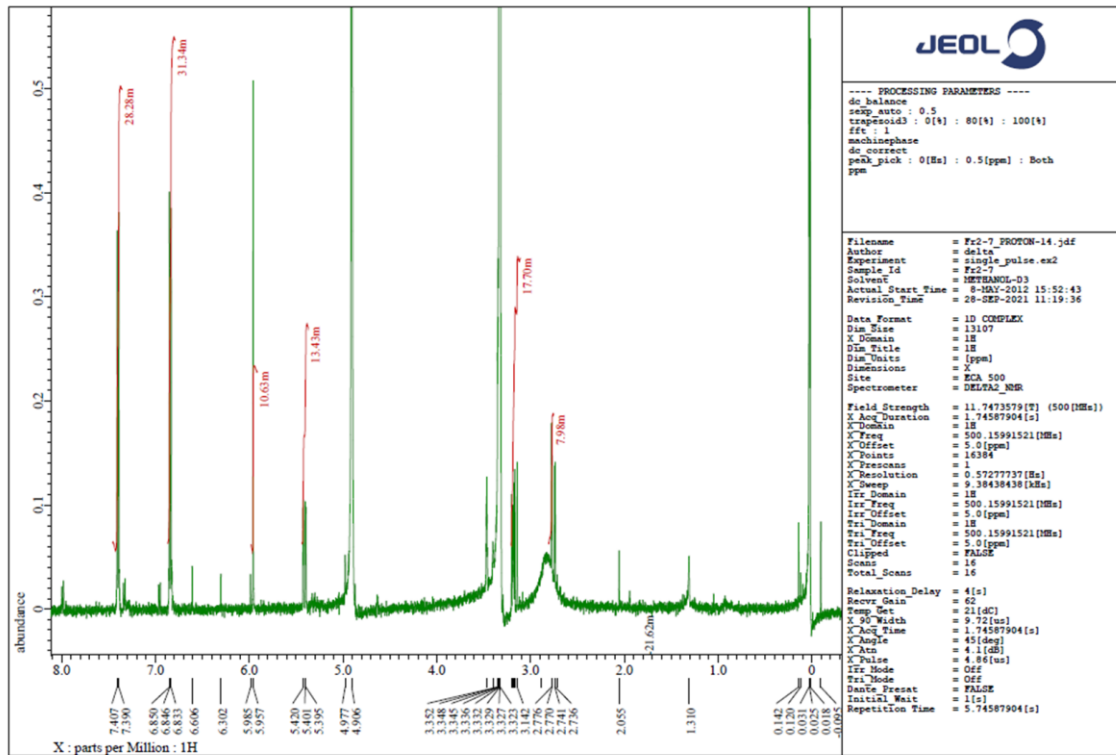
図 35 カルサミディンおよびイソカルサミディンの $^1\text{H-NMR}$ 値の帰属および $^1\text{H-NMR}$ のチャート

A カルサミディンおよびイソカルサミディンの構造および $^1\text{H-NMR}$ 値の帰属

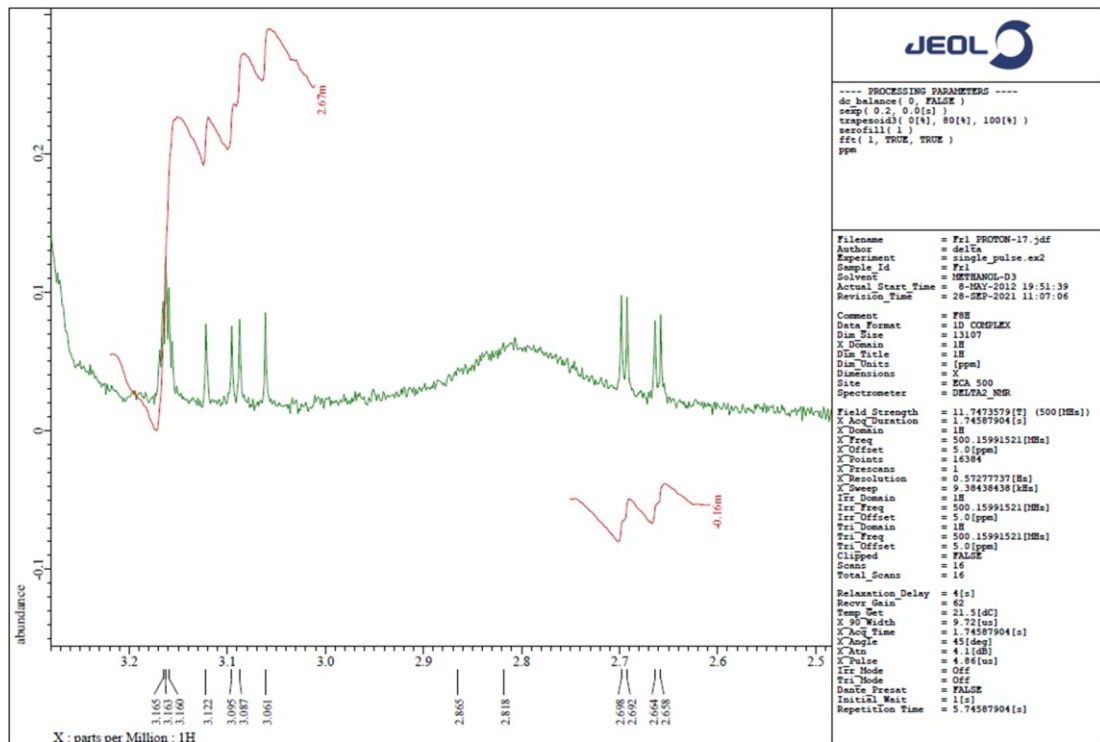
B1, B2, B3 カルサミディンの $^1\text{H-NMR}$ のチャート

C1, C2, C3 イソカルサミディンの $^1\text{H-NMR}$ のチャート

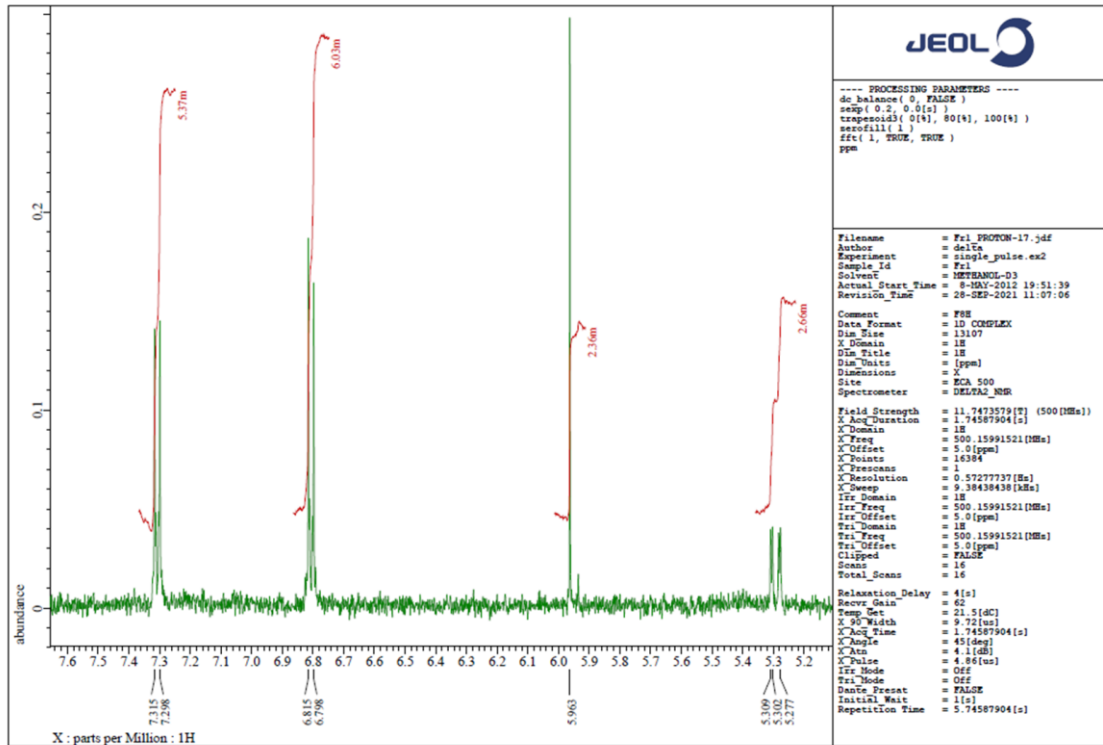
B1 カルサミディンの ¹H-NMR のチャート (全体図)



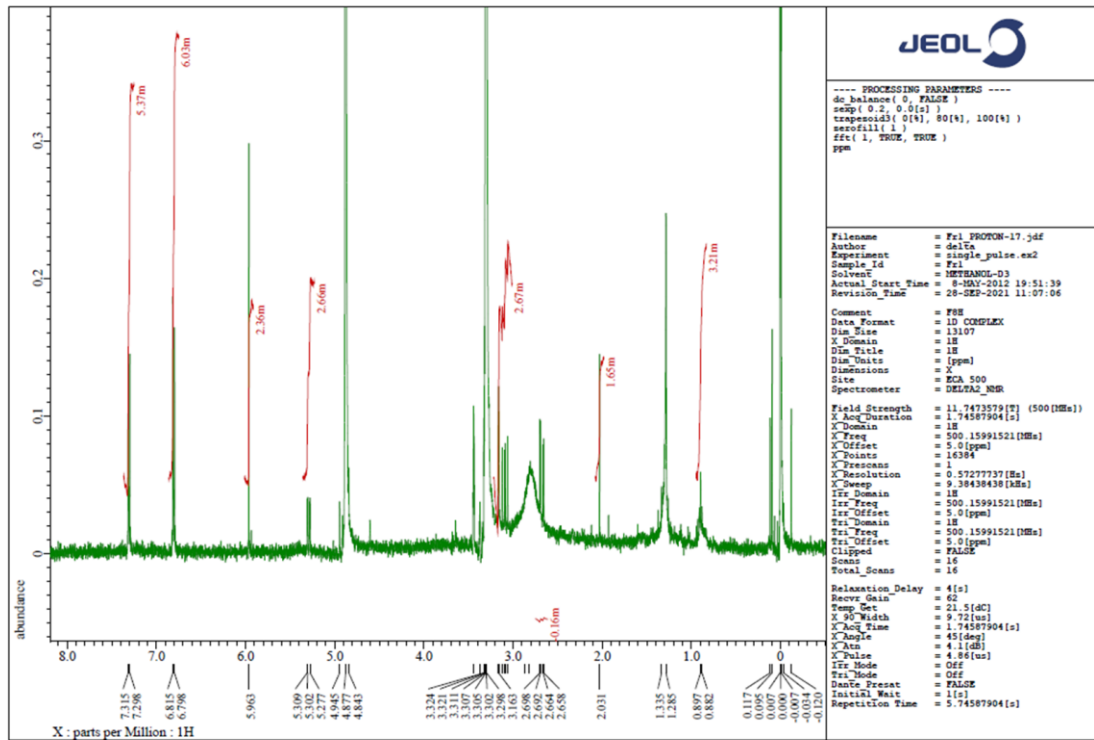
B2 カルサミディンの ¹H-NMR のチャート (2.3ppm から 3.3ppm の拡大図)



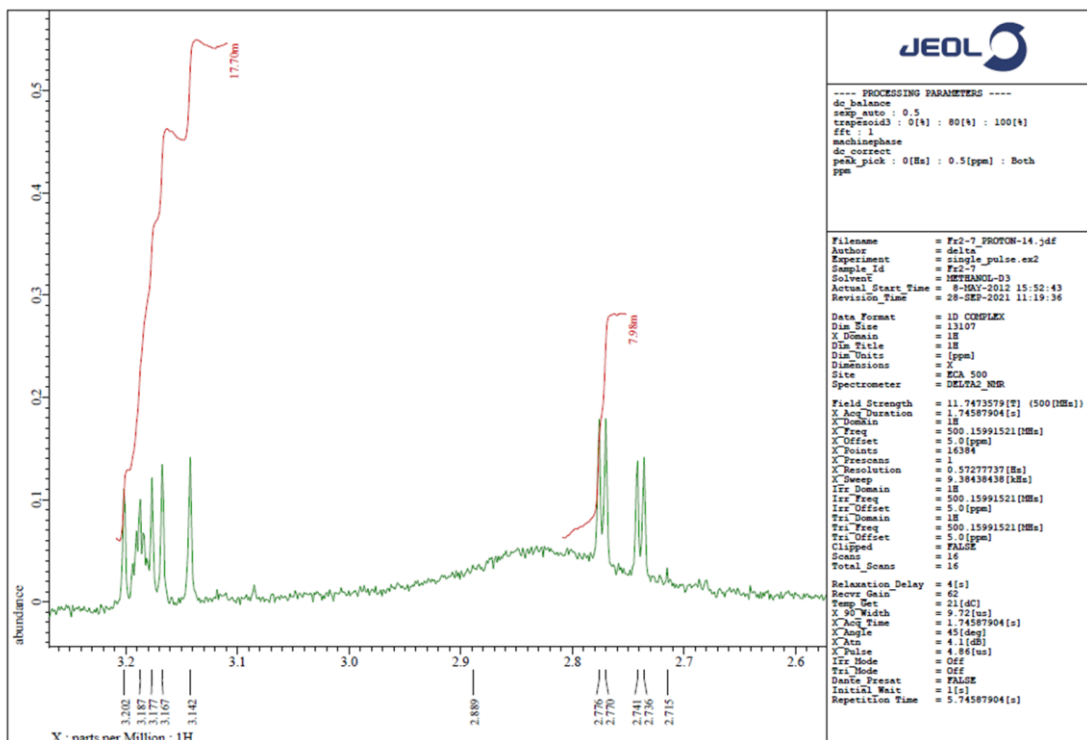
B3 カルサミディンの ¹H-NMR のチャート (5.1ppm から 7.7ppm の拡大図)



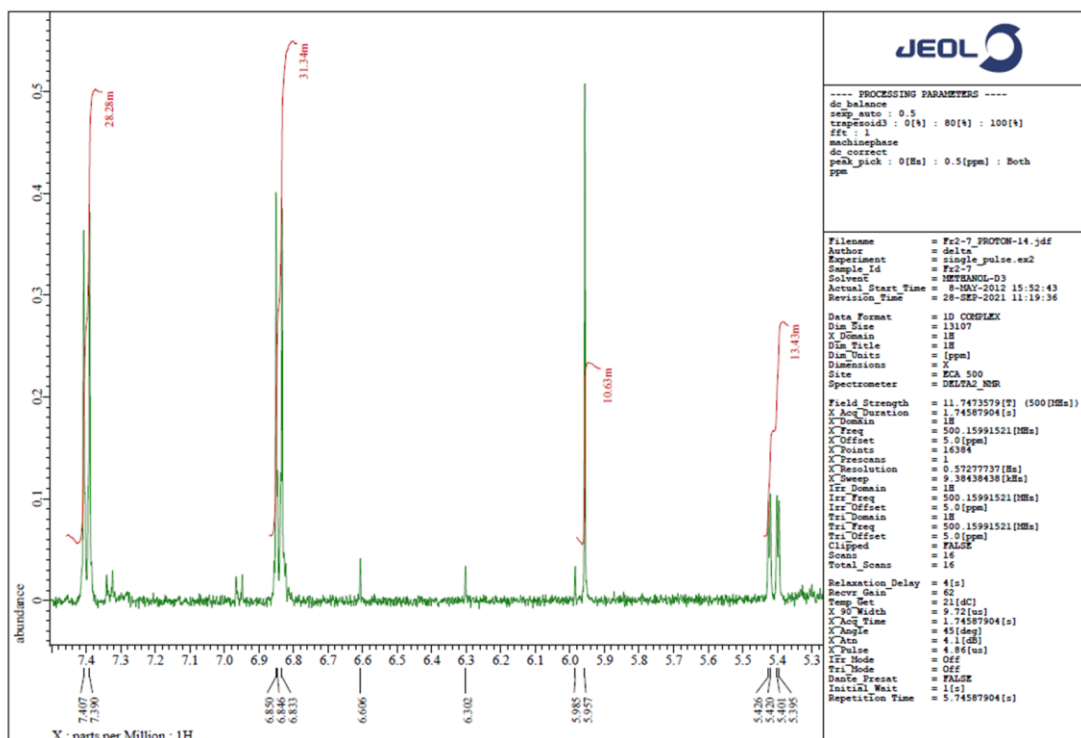
C1 イソカルサミディンの ¹H-NMR のチャート (全体図)



C2 イソカルサミデインの $^1\text{H-NMR}$ のチャート (2.6ppm から 3.3ppm の拡大図)



C3 イソカルサミデインの $^1\text{H-NMR}$ のチャート (5.3ppm から 7.5ppm の拡大図)



フラバノンとフラバノノール骨格では、C環の2位と3位の炭素原子間の結合が飽和しているため、使用される基質のB環の構造状態が生成物の特異性に影響を与える可能性がある。ナリンゲニンはB環の芳香族の立体構造から、2*R*-ナリンゲニンと2*S*-ナリンゲニンが存在（図36）し、いずれがLjF8Hの基質として利用されるのか興味があったので、さらに検討を進めた。pYES-F8Hが導入された形質転換酵母（LjF8H/BJ2168）を用いて、ラセミ体のナリンゲニンの存在下で、SD培地およびSG培地で2日間共存培養した。酵素活性後の残存する基質のナリンゲニンを、キラルカラムを用いたHPLCによって分離し、対照実験（pYES2/BJ2168）と比較した。その結果、2*R*-ナリンゲニンと2*S*-ナリンゲニンの比は、対照実験で反応後も変化しないままであったが、LjF8Hを発現する反応液では変化した（図36）。これらの結果は、LjF8Hが2*S*-異性体のみを受け入れることを示唆した。

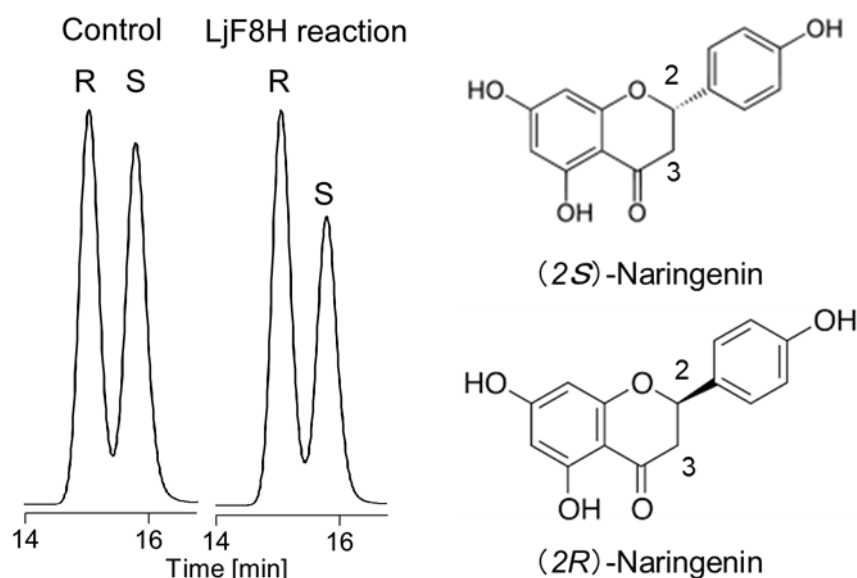


図36 キラルカラムを用いたHPLC分析によるナリンゲニン基質の残留量の確認およびナリンゲニンの立体構造異性体

組換え酵母株LjF8H/BJ2168細胞は、2*RS*-ナリンゲニンの存在下でSDまたはSG培地で培養した。残存した基質を酢酸エチルで抽出し、乾燥、メタノール中に再懸濁し、HPLCにより分析した。

3.3.6 他植物における LjF8H の異種発現

LjF8H が植物細胞で、何らかの機能を持っているかどうかを調査するために、植物発現型ベクター (pBE2113 ベクター) を用いて、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター (CaMV35S プロモーター) の制御下で、アブラナ科のモデル植物シロイヌナズナでの過剰発現実験を試みた。5 つの独立したトランスジェニックライン (LjF8H-OX) を用いた半定量 RT-PCR 結果により、LjF8H 遺伝子の発現を確認析した (図 37A)。そして、対照実験 (ベクターコントロール) および LjF8H-OX2 (図 37A から最も高発現していたライン) のシロイヌナズナの苗を用いて、0.1 mM ケルセチンを添加した液体 MS 培地での共存培養を行った、その後、代謝産物を LC/MS 分析した。その結果、シロイヌナズナに存在する内因性修飾酵素によって、ゴシペチンのアグリコンは確認されなかった。しかし、組成式差分解析が可能な ShiftIonsFinder ソフトウェア (Kera *et al.* 2014) による検索を行った結果、いくつかのゴシペチン配糖体の存在が確認された。おそらく、LjF8H の触媒反応でゴシペチンが生成し、シロイヌナズナに存在する内因性修飾酵素によって配糖体まで代謝が進んだと考えられた。そして、抽出物の酸加水分解は、標準物質のゴシペチンの分析データの比較により、LjF8H-OX2 の抽出から標準物質のゴシペチンの分析データと同じ保持時間 (25.82 分) のピーク (図 37B) および一致した MS/MS フラグメントデータ (図 37C) が確認され、対照実験 (ベクターのみ) の抽出からは同じ保持時間でピークは検出されなかった (図 37B)。LjF8H は野生型のシロイヌナズナでは存在していないが、これらの異種発現の結果は、シロイヌナズナ植物において LjF8H が機能し、生成物のゴシペチンがシロイヌナズナ植物由来の内因性フラボノイド糖転移酵素の基質としても機能することを示した。

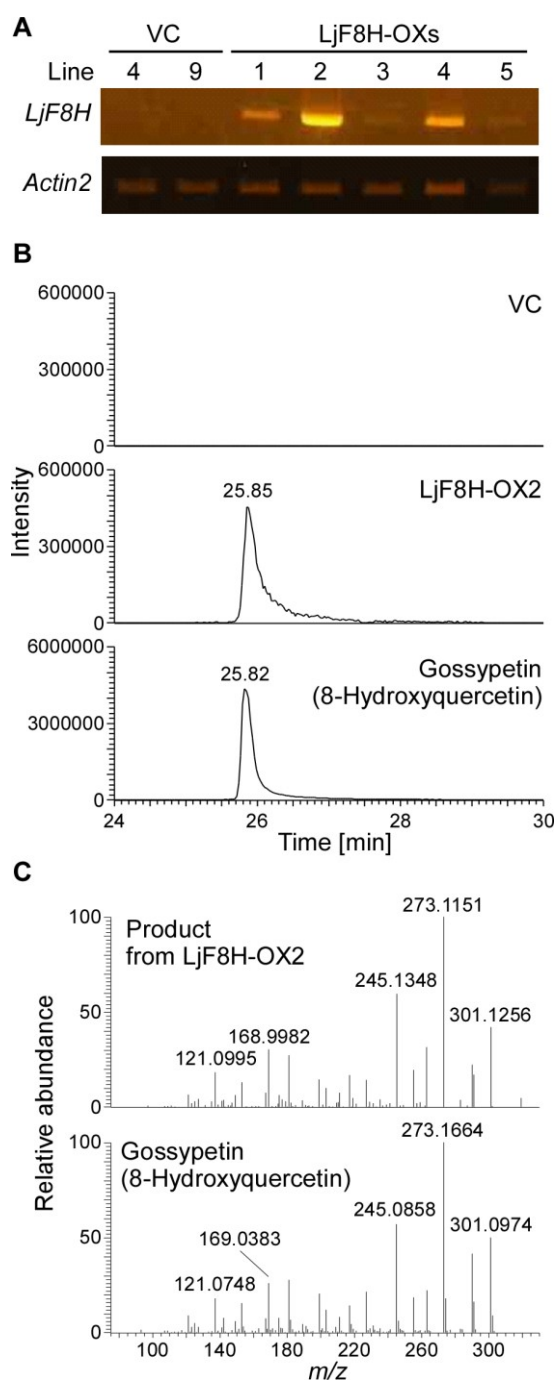


図 37 シロイヌナズナを用いた LjF8H の異種表現系の解析

A. LjF8H の相対発現を、Act2 を内部制御とした半定量的逆転写-PCR により分析した。数字はトランスジェニックラインを示す。VC: ベクターコントロール (対照実験)

B. クロマトグラムは、Orbitrap™ 質量分析による反応溶液のフルスキャンを示す。液体クロマトグラフィー (LC) プロファイルを [hydroxyquercetin+H]⁺, m/z 319.0446 ± 10 ppm の質量クロマトグラムでモニターした。

C. イオントラップ質量分析計による m/z 319.04 のタンデム質量分析 (MS/MS) 解析

次に、シロイヌナズナ以外の植物での機能解析を行うために、花の色調の研究でよく利用されているナス科植物のペチュニア (*Petunia x hybrida*, the line PL) を用いて、LjF8H 遺伝子を異種発現する形質転換植物を作出した。宿主であるライン PL のペチュニア植物には、ケンフェロール含量を増加させるためにバラ由来のフラボノールシンターゼ (FLS) 遺伝子も同時に挿入する共発現システムを用いた。その結果、形質転換ペチュニア植物は、独立した合計 24 個体が得られ、18 個体の植物がバラ由来の FLS と LjF8H が共に遺伝子発現していた。次に、形質転換ペチュニア植物を花形成まで生育させ、それら 18 個体の花弁のフラボノールおよびフラボンの HPLC 分析を行った。その結果、8 個体の形質転換ペチュニア植物に、コントロールの宿主植物では生産しなかった化合物のピークが得られたことを明らかにした (図 38)。

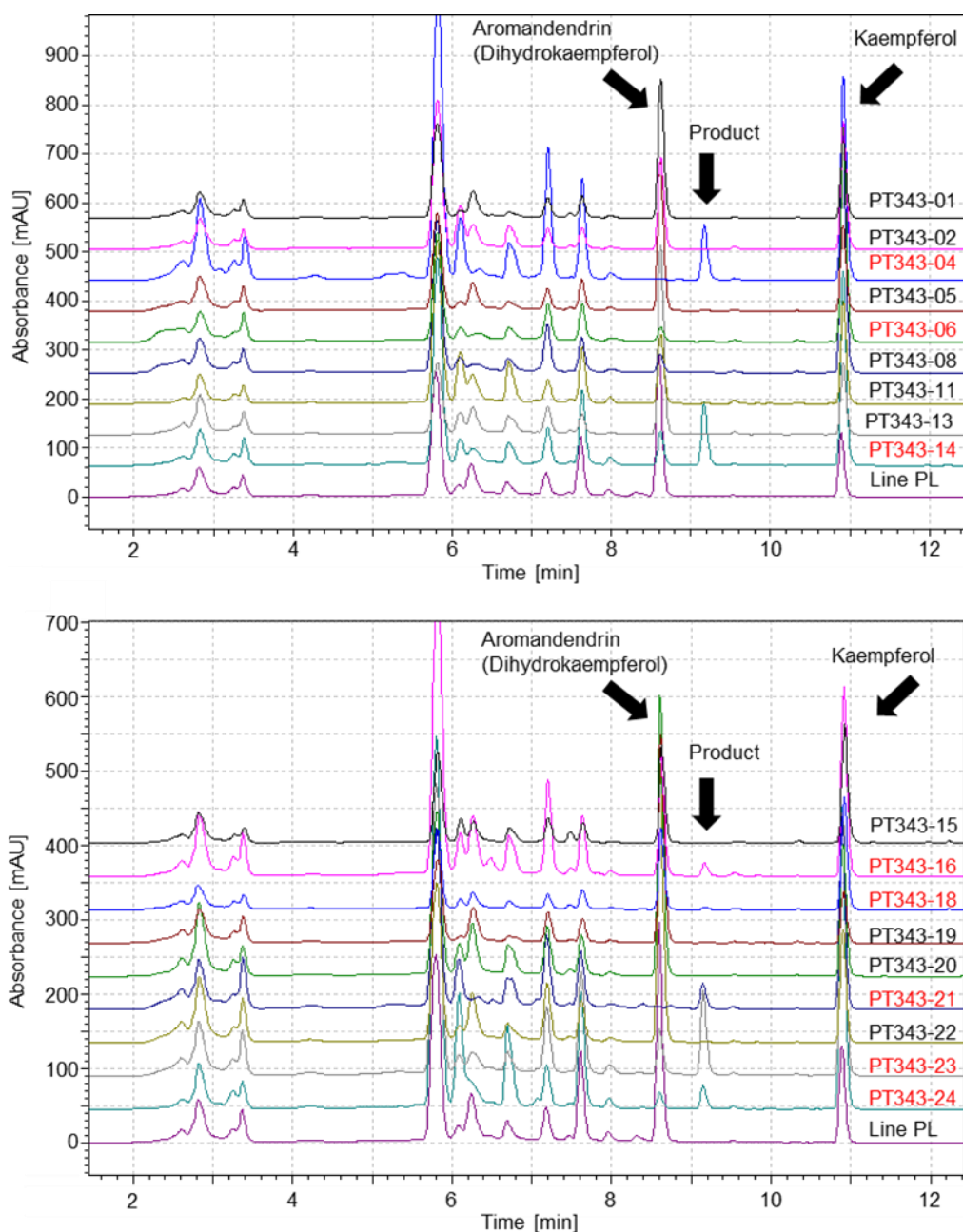


図 38 18 個体の形質転換ペチュニアを用いた HPLC 分析スクリーニング

先に報告した手法 (Tsuda *et al.* 2004) に従って、 β -グリコシダーゼで処理したメタノール抽出物の HPLC プロファイル (280 nm で検出) を実施した.

[HPLC-PDA 分析条件]

HPLC Column: Shim-pack ODS (4.6 x 150 mm, 5 μ m)

移動相 A: 0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA) / 水

移動相 B: 0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA) / 90%アセトニトリル

LC グラジエントプログラム: 移動相 B 濃度 (%) : 20% (10 分まで) \rightarrow 70% (16 分まで) \rightarrow 70% (17 分まで) \rightarrow 20% (28 分まで) PDA (Photodiode Array Detector) : 250 – 400 nm

8 個体の形質転換ペチュニア植物のうち、3 個体の独立した形質転換植物ライン (PT343-4, PT343-14, PT343-23) の花色がピンク色から白色に変化した (図 39A) . その後、この色素の変化した植物に注目して、更なる解析を進めた。さらに、PL (対照実験) におけるケンフェロール誘導体、PT343-4, PT343-14, および PT343-23 ラインを LC/MS 分析し、化合物の構造を解明した (図 39B および図 40) .

PL の花にケンフェロールとアロマデンドリン (ジヒドロケンフェロール) が蓄積した結果 (図 39B および図 40) に対し、3 個体の独立した形質転換植物ライン (PT343-4, PT343-14, PT343-23) では、アロマデンドリンは減少し、溶出時間 11.88 分で新たなピークが増加した (図 39B および図 40) . その新たなピークの保持時間および MS/MS フラグメントパターンが標準物質であるヘルバセチン (8-ヒドロキシケンフェロール) (図 39C) と一致したことから、形質転換ペチュニア植物で LjF8H の機能が働き、ケンフェロールを基質として 8-ヒドロキシケンフェロールが生成したことが明らかとなった。これらの結果は、ケンフェロールがフラボノイドの基質として、ペチュニア植物において LjF8H が機能することを示した。

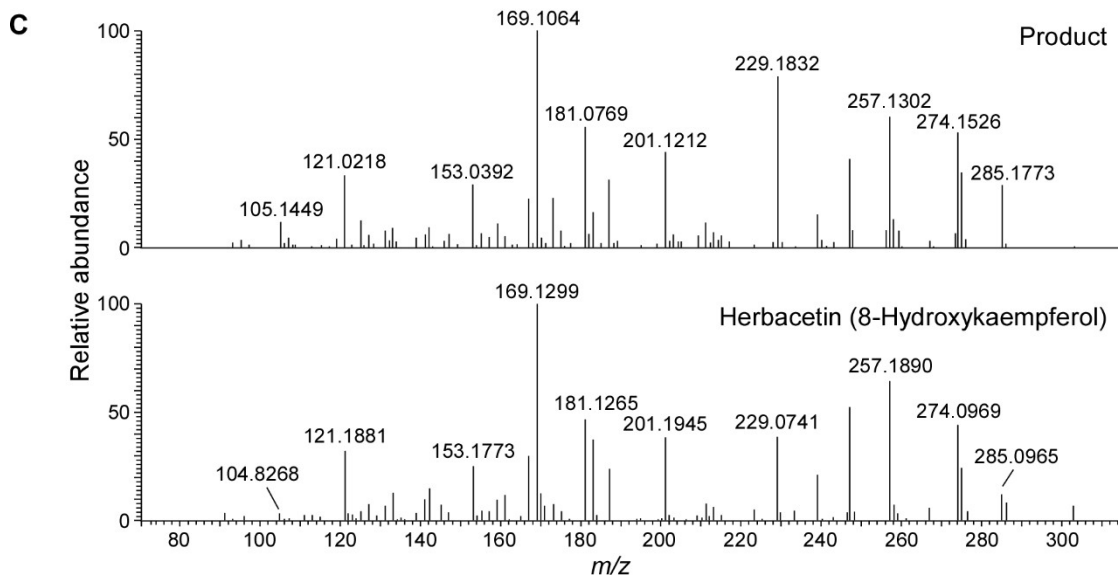
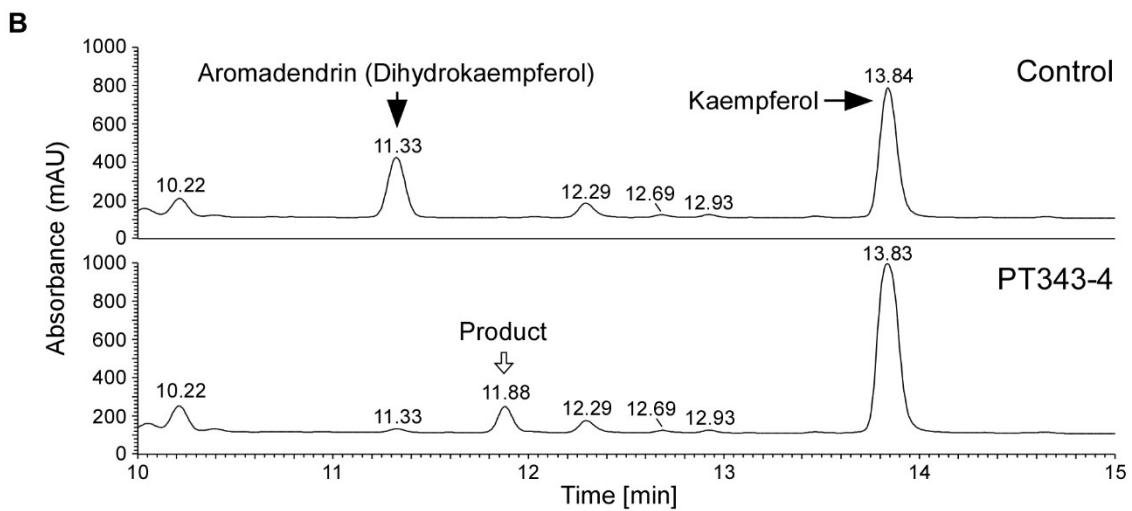


図 39 形質転換ペチュニアにおける花抽出液の LC/MS 分析

A. ライン PL (対照実験) と形質転換ペチュニア植物の花の写真 (PT343-4, PT343-14, PT343-23)

B. プロファイルは, Orbitrap™ 質量分析による反応溶液のフルスキャンで示した. HPLC プロファイル をフォトダイオードアレイ (PDA) で検出した.

C イオントラップ質量分析計による m/z 303.0499 の MS/MS 分析.

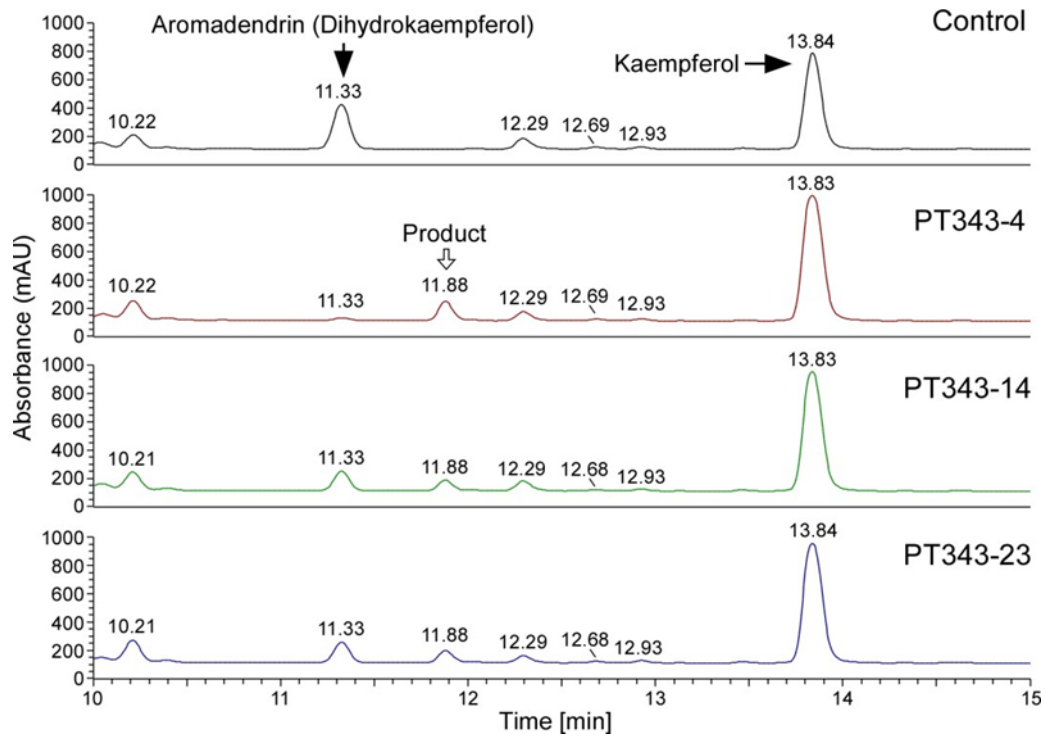


図 40 形質転換ペチュニアにおける花抽出液の HPLC 分析 (PDA 検出)

宿主の line PL (対照実験) および形質転換ペチュニア植物ライン (PT343-4, PT343-14, PT343-23) は LC/MS 解析を行った。

3.4 考察

ミヤコグサは、花の中でゴシペチン配糖体を生合成し、蓄積する。そして、花卉の黄色の色調に影響を与える。有名な黄色を呈するフラボノイドのオーロン (aurone) とは異なり、一般的なフラボノール配糖体は淡黄色の色素として機能することがある。また、ケルセチン配糖体は淡黄色の顔料として利用されるが、ケンフェロール配糖体は利用されない。

ケルセタゲチン (6位の水酸化ケルセチン) およびゴシペチン (8位の水酸化ケルセチン) は、キク科、アオイ科、マメ科、ケシ科などの植物種の花びらに蓄積している。特に、ゴシペチン配糖体は花卉の黄色がかった花びらの基底の部分に蓄積するが、ケシ科植物の先端部には存在しない (Dudek *et al.* 2016)。花卉中のゴシペチンの不均一な分布は、色調以外の特定の機能を意味すると考えられる。文献報告のあるシソ科植物から単離された F8Hs である ObF8H-1 および SbCYP82D2 は、花とは異なり、それぞれ植物の毛状突起および根内で機能することが報告され、特殊な代謝プロセスで機能するように進化したと考えられる。本研究以前の時点では、花卉におけるゴシペチン生合成に関与する F8H は未確認であった。

本研究では、F8H の候補クローンを、ミヤコグサの蕾の EST データを用いたデータマイニング (Data mining) による *in silico* 遺伝子クローニングを行った。その結果、EST クローンライブラリーから F8H の候補クローン

(MFB088d08 cDNA クローン) をピックアップして、全塩基配列を決定した。遺伝子発現解析では、LjF8H が初期開花発生段階での相対的発現が高いことを示唆し (図 31)、LjF8H が開花前の花色素生成にも寄与する可能性があることを示唆した。キク科のアラゲシュンギク (*Chrysanthemum segetum*) の F8H の活

性は、開花発達段階における開花の直前に高い酵素活性が保持され、花がしおれる過程で減少することが報告 (Halbwirth and Stich 2006) されている。本研究の LjF8H 発現パターンの結果 (図 31) と一致している。実際、本研究の LjF8H を過剰発現した形質転換ペチュニアでは、ピンクから白に花の色の変化を示した (図 38A)。ペチュニアにおいて、ピンク色は主にアントシアニン (Tanaka and Brugliera 2013; Tsuda *et al.* 2004) に由来している。従って、LjF8H によるフラボノールおよびフラバノノールの 8-ヒドロキシ化は、花卉中のアントシアニン生合成経路で同じ基質に作用して、おそらく競合する可能性がある。つまり、花色の変化は、アントシアニンが減ってフラボノールが増えたためと考えられた。また、フラボノイドは花卉の表皮細胞内でのみ合成され、挿入した LjF8H 遺伝子は、本研究では全ての組織で機能する構成的プロモーターが使用しているので、花卉細胞の全ての組織で転写される。従って、花卉の表皮細胞のみで発現するプロモーターを利用すれば、花の色調も異なった結果になると予想される。

LjF8H は、他植物で報告された F8H と比較して、アミノ酸配列および酵素化学的性質が異なることを示した。アミノ酸の相同性検索の結果、LjF8H は FAD/NAD (P) 結合モチーフを保持していたが、それは FAD と NAD (P) H 依存性オキシダーゼであることを示唆した (図 29B)。酵母のミクロソーム画分を用いた酵素活性測定は、LjF8H がその活性のために NADPH を必要とし、FAD を必要としないことを示唆した (図 32A)。NADPH については、キク科のアラゲシュンギク (*Chrysanthemum segetum*) 由来の F8H も同様に活性に必要であった。一方、アラゲシュンギク由来の F8H は FAD がその活性のために必要であり、LjF8H の酵素活性測定の結果とは異なっていた。これについて、LjF8H がその活性のために本当に FAD を必要としないという解釈の他に、

LjF8H が酵母で発現する過程で、酵母の内在性の FAD と強固に結合していたため、外部からの FAD を必要としなかった可能性も考える。この可能性を支持するものとして、シュードモナス属 (*Pseudomonas* sp.) 細菌由来のタキシフォリン 8-モノオキシゲナーゼ (EC 1.14.13.19) について報告が存在する (Jeffrey et al. 1972)。部分的に精製されたタキシフォリン 8-モノオキシゲナーゼ (EC 1.14.13.19) は、蛍光励起スペクトルからフラボタンパク質であることが確認された。しかし、シュードモナス属細菌由来無細胞抽出物を用いた活性測定では、FAD の添加は初期速度を刺激せず、FAD の酵素への緊密な結合が暗示された。LjF8H の FAD 要求性について結論を出すには、今後、さらに検討する必要がある。

キク科のアラゲシュンギク (*Chrysanthemum segetum*) の F8H は、フラボノール骨格のケルセチンとフラボン骨格のルテオリンは基質として活性を示すが、フラバノン、フラバノノール、または 6'-デオキシカルコンを基質として作用しないことが報告されている (Halbwirth and Stich 2006)。さらに、ケシ科植物のバジル (シソ科) 由来の ObF8H-1 は、フラボン骨格のサルビゲニン (salvigenin) (図 41) およびクリスマルチン (crisimaritin) (図 41) に対して、高い特異性を示した (Berim et al. 2014)。また、ケシ科植物のコガネバナ由来の SbCYP82D2 はフラボン骨格のクリシン (chrysin) (図 41) に対して活性であるが、他のフラボンまたはフラバノンに対しては活性を示さなかった (Zhao et al. 2018)。一方、本研究の LjF8H はフラバノン、フラボン、フラバノノール、およびフラボノールを基質として作用することを示した (図 34, 表 8)。この広範囲な基質の受け入れは、LjF8H が植物の花びら中でゴシペチンに加えて、他のフラボノイドの 8-ヒドロキシル化フラボノイドを生合成する可能性を有することを示している。

ミヤコグサにおいて、ナリンゲニンから F3H, F3'H, および FLS によって、ケルセチンが生合成される過程で、いくつかの中間体も生合成される。それらの中間体の 8 位も LjF8H によってヒドロキシル化される可能性が考えられる。フラボンに関しては、ミヤコグサではフラボン合成酵素 I (FNS I) およびフラボン合成酵素 II (FNS II) の存在が確認されておらず、ミヤコグサの花弁で生合成することはできないが、LjF8H は基質としてフラボンを使用することができる。フラボノイド生合成経路では、フラボノイドの効率的な生産と時間/特殊分布のためのフラボノイド代謝産物に関与する各種の酵素がタンパク質複合体を形成して、機能していると考えられている (Nakayama *et al.* 2019) 。 LjF8H の内因性基質およびミヤコグサにおけるゴシペチン生合成経路は不明であった。今回、特徴的な LjF8H の広範な基質受容性の結果 (図 34, 表 8) に基づいて、フラボノイド生合成経路 (図 42) を予測した。

ゴシペチンとジヒドロゴシペチンの両方がツツジ科植物のエリカ・キネリア (*Erica cinerea*) に蓄積している報告 (Bennini *et al.* 1993; Kaouadji *et al.* 1992) は、ミヤコグサにおけるジヒドロゴシペチンを経由したゴシペチン生合成経路の存在を示唆することができる。ミヤコグサの花弁におけるゴシペチン生合成経路をよりよく理解するために、LjF8H の本来の内因性基質と LjF8H がフラボノイド代謝産物の生成にどのように関与するのかについては、さらなる調査が必要である。

興味深いことに、LjF8H の分子系統樹は、LjF8H が CYP, 2ODD (2OGD, DOX) , または PAO と関連していないことを示した (図 30) 。 LjF8H に最も近い既知の酸化酵素グループは、植物ホルモンのオーキシン生合成に関与する YUCCA (Zhao *et al.* 2001) およびグルコシノレート生合成に関与する GS-OX1 (Hansen *et al.* 2007) を含有する植物由来 FMO グループであることが判明し

た. LjF8H の分岐点の情報から, LjF8H が FMO グループのメンバーであるが, 既知の植物由来 FMO の 1 つではないことを示唆した. van Berkel による細菌由来のフラボプロテインモノオキシゲナーゼ分類 (van Berkel *et al.* 2006) に基づいて, 植物由来の FMO はクラス B に分類され, 一方, 先に述べたシュードモナス属 (*Pseudomonas sp.*) 細菌由来のタキシフォリン 8-モノオキシゲナーゼ (EC 1.14.13.19) は, クラス A に分類される. LjF8H と 42% のアミノ酸配列で同一性を有する機能同定未知の MO1 (At4g15760) は, 既知の植物由来 FMO とは異なっているため, この分岐点 (図 30 の青枠の FMO のグループと LjF8H を含むピンク色のグループ) は植物種による分岐ではないことを示唆している. LjF8H を含むピンク色のグループはゲノム解読されたマメ科植物の予測したタンパク質が多く存在し, 機能同定未知のタンパク質が存在していた (図 30) . 今回, ピンク色のグループで唯一, 機能同定されたタンパク質は LjF8H のみであった.

本研究の結果から, LjF8H が植物で同定された最初のクラス A に分類されるフラボプロテインモノオキシゲナーゼである可能性を示唆している.

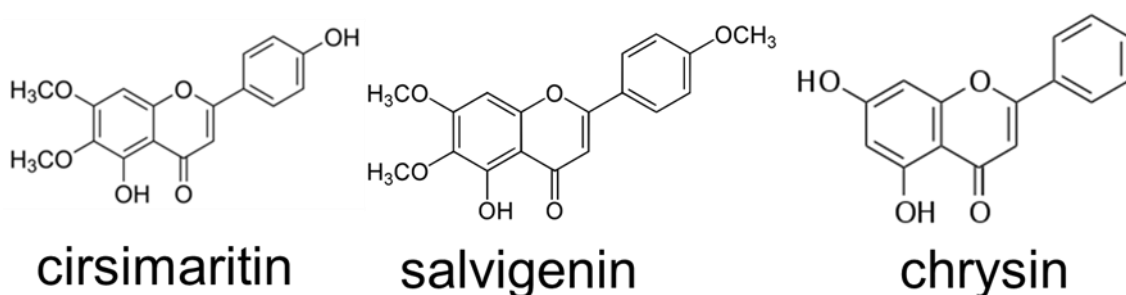


図 41 考察で記述したフラボノイド構造

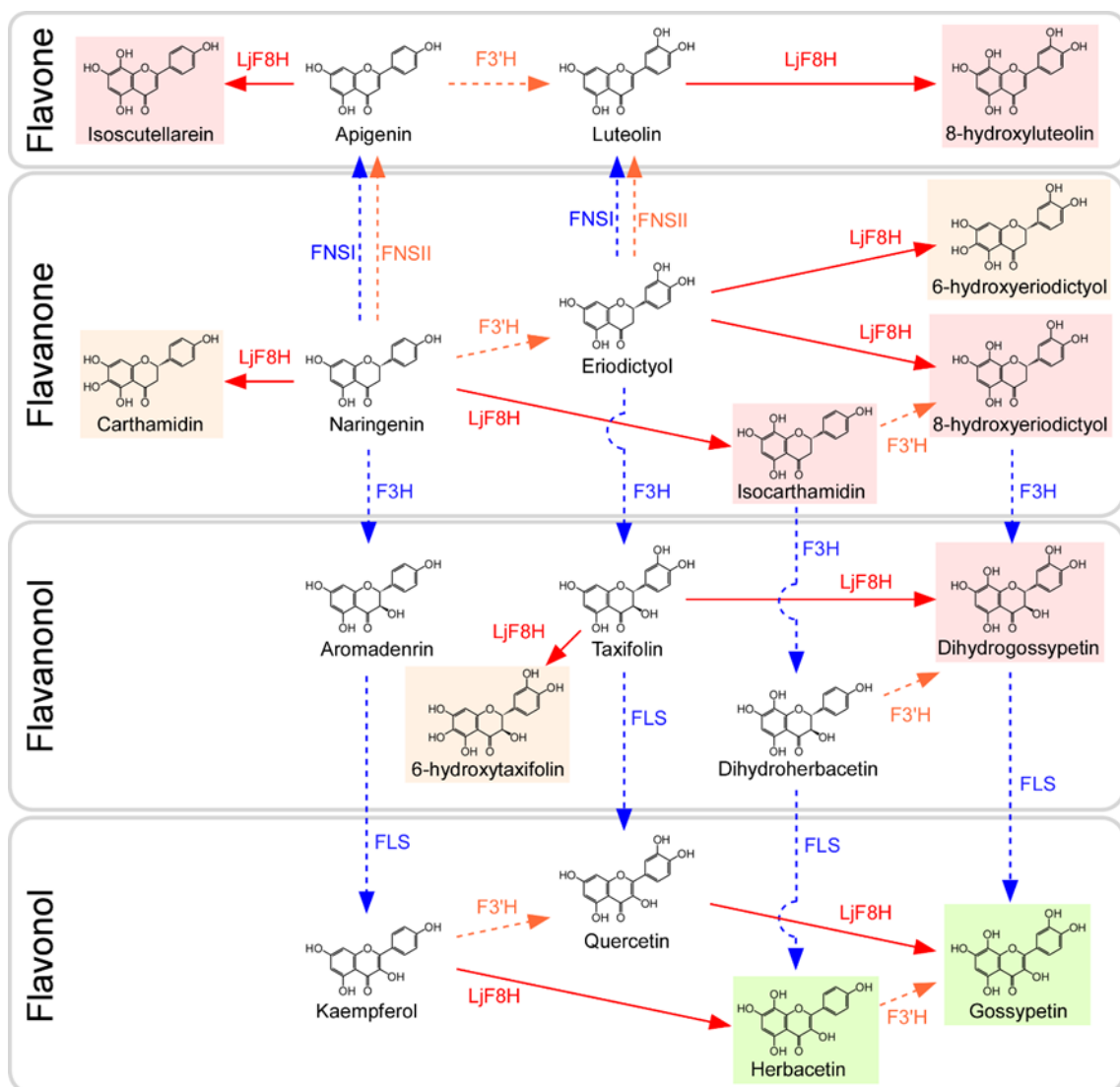


図 42 酵母の発現実験の *in vitro* assay の解析結果に基づく LjF8H の広範な基質受容性の概略および予測可能な生合成経路

基質受容性の結果は、図 34 および表 8 に示した酵素活性測定結果に基づいて構築した。

酵素反応生成物は、赤色 (*in vitro* assay の主成分)、黄色 (*in vitro* assay の副成分)、または緑色 (形質転換植物シロイヌナズナまたはペチュニアでも検出された主成分) で強調した。

赤の矢印は、LjF8H による触媒反応を示した。

オレンジの破線矢印は、推定シトクロム P450 依存性モノオキシゲナーゼによる触媒反応を示した。

青の破線矢印は、推定 2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼによる触媒反応を示した。

略語: F3H, Flavanone 3-hydroxylase; F3'H, Flavonoid 3'-hydroxylase; FLS, Flavonol synthase; FNS I, Flavone synthases I; FNS II, Flavone synthases II.

第4部 パパイヤのアルカロイド代謝研究

4.1 緒言

ヒメツリガネゴケおよびミヤコグサなどのモデル植物は、多くの研究者が利用し、基礎研究の材料として利用しやすい。このモデル植物の代謝産物の研究においてLC/MSメタボローム解析技術が実施され、そこで確立した解析方法や解析結果はモデル植物以外の植物での解析にも役に立つと考えている。そこで、食品原材料にも利用される農作物などの実用植物での機能性代謝産物研究に、LC/MSメタボローム解析技術が適用可能かを検討することを考えた。本研究ではスーパーフードとして注目されているパパイヤを用いて研究を実施した。

パパイヤ科植物のパパイヤ (*Carica papaya* L.) は熱帯および亜熱帯諸国で、また温帯国で広く栽培されている。2018年の調査では、アジアは世界のパパイヤ生産量の58%を占め、次いで南米(13%)、アフリカ(11%)、カリブ海(9%)、北米(8%)、中米(2%)の生産量が続いている「Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database (FAOSTAT, 国際連合食糧農業機関統計データベース)」、<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>」。熟したパパイヤ果実の果肉は世界的に人気のある食品である。デザートとして新鮮な状態で食したり、ジャムやお酒、お菓子に加工したりしている。西洋では珍しいが、青パパイヤとも呼ばれる未熟果実の果肉は、料理、漬物の製造、アジア諸国でサラダとして使用されている (Ikram *et al.* 2015)。これらの料理用途に加えて、葉、種子、樹皮、果実、根および乳液を含むパパイヤの様々な部分が伝統的な民間伝承薬や工業製品の資源として使用されてきた (Aravind 2013;

Jaiswal and Jain 2018) . 果実は、インドでは胃の不調、肥満および尿路感染症を治療するために利用されている (Krishna *et al.* 2008) . 従って、パパイヤ果実は機能性食品と考えることができる. また、パパイヤの果実の果肉とは異なり、果実の皮はほとんど利用されず、食品産業では廃棄物として処分にされている. しかし、果皮は抗酸化活性を有するので、化粧品などの薬用適用で使用されている (Krishna *et al.* 2008) . パパイヤ中に含まれるフェノール性化合物、カロテノイド、グルコシノレートおよびアルカロイドなどの様々な植物化学成分の存在は、医薬品の治療特性および食品の機能性を担うことが可能である (Ikram *et al.* 2015; Pathak *et al.* 2018) . 植物化学成分に加えて、乳液や果実から抽出されたパパインなどのタンパク質分解酵素は、食品産業においてお肉の軟化剤や飲料物の清澄剤 (透明化剤) としても利用されている (Esti *et al.* 2013; Nitsawang *et al.* 2006) .

未熟果実から完熟果実への登熟過程 (図 43) は、植物化学成分の変化による食品の品質への影響だけでなく、関連する治療効果にも影響を及ぼすことが知られている (Der Agopian *et al.* 2020; Ganneru *et al.* 2020; Gayosso-García Sancho *et al.* 2011; John *et al.* 2018; Rossetto *et al.* 2008; Sanimah and Sarip 2015) . 二次代謝産物の研究の観点から、果肉で高抗酸化力を有する全カロテノイドの増加 (Gayosso-García Sancho *et al.* 2011) , 果皮と果肉の両方で抗癌作用 (Mi *et al.* 2011) を有するベンジルイソチオシアネートの増加 (Rossetto *et al.* 2008) , および果皮と果肉の両方でベンジルイソチオシアネートの前駆体であるベンジルグルコシノレートの減少 (Rossetto *et al.* 2008) が報告されている. しかし、これらの研究報告は限られた既知の代謝産物のみをターゲットにした研究である.

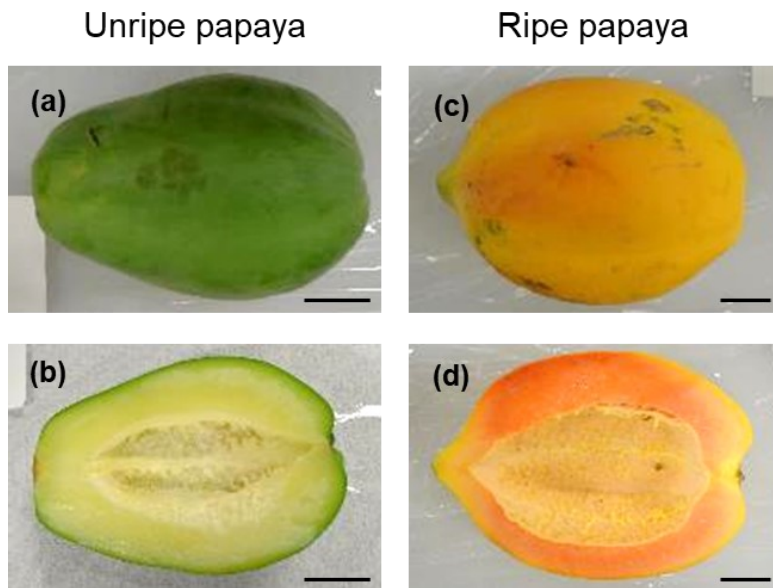


図 43 パパイヤ果実の全体 (a, c) と輪切り (b, d) の写真
未熟パパイヤ (左パネル) および完熟パパイヤ (右パネル) をメタボローム解析およびプロテアーゼ活性解析に用いた. スケールバーは 3 cm を示す.

パパイヤのメタボローム解析に関する研究報告に関して、ガスクロマトグラフィ質量分析計 (GC-MS) を用いた未熟パパイヤの果肉 (Der Agopian *et al.* 2020; Ganneru *et al.* 2020; Sanimah and Sarip 2015) および収穫後のパパイヤの果皮 (Wu *et al.* 2019) のノンターゲット解析によるメタボローム解析結果が報告されている。また、NMR を用いたパパイヤの葉と種子でのノンターゲット解析によるメタボローム解析結果が報告されている (Gogna *et al.* 2015)。しかし、液体クロマトグラフ高分解能質量分析計 (LC-HRMS) を用いたノンターゲットのメタボローム分析は、特に果皮に関しては、現在まで報告されていない。従って、登熟過程のパパイヤ果皮と果肉に関して、機能性成分を含めた包括的な代謝産物のダイナミクス (変動動向) を解析した研究報告例はない。未熟パパイヤ果実と完熟パパイヤ果実の代謝産物の網羅的な解析を、全体的な違いから特殊な代謝産物を調べるために、LC-OrbitrapTM-MS を用いて、未熟およ

び完熟パパイヤ果実（果皮および果肉）の抽出物の網羅的な代謝プロファイリングを実施した。LC/MS メタボローム解析技術を用いて、何千もの代謝産物候補の中から、未熟と完熟パパイヤ果実（果皮と果肉）に蓄積された機能性代謝産物の候補を発見した。

一方、パパイヤは果実以外に葉、茎、根および皮などの十分に活用されていない部分が多くあり、機能性代謝産物も含まれている可能性がある。先に述べた通り、パパイヤは多年生植物であり、その果実は熱帯諸国で年間を通じて栽培、収穫されている。しかし、日本では温帯地域で栽培すると、パパイヤ植物は冬を乗り切ることができないので、枯れたパパイヤ植物（葉、茎、根）は廃棄される（図 44）。そして、先に述べた通り、パパイヤ果実の皮は食品産業において廃棄されている。本研究では、十分に活用されていない植物部位、特にパパイヤ果実の果皮などが、栄養補助食品や植物化学物質の供給源として有効利用できるかを調査する研究も実施した。本研究では、この目的のために、パパイヤの乾燥粉末を用いた。パパイヤの乾燥粉末の機能性代謝産物に焦点を当てた理由は、一部の果物や野菜の乾燥粉末が、貯蔵や輸送の容易さ、および貯蔵寿命の延長などの利点により工業用食品材料として一般的に使用されているためである（Karam *et al.* 2016）。乾燥粉末の品質は乾燥プロセスに大きく依存している（Sablani 2006）。そこで、今回、パパイヤの乾燥粉末におけるベンジグルグルコシノレート（BG）（図 45）含量、総ポリフェノール含量、タンパク質分解酵素活性などの代表的な機能性代謝産物を定量分析し、詳細な評価を行った。

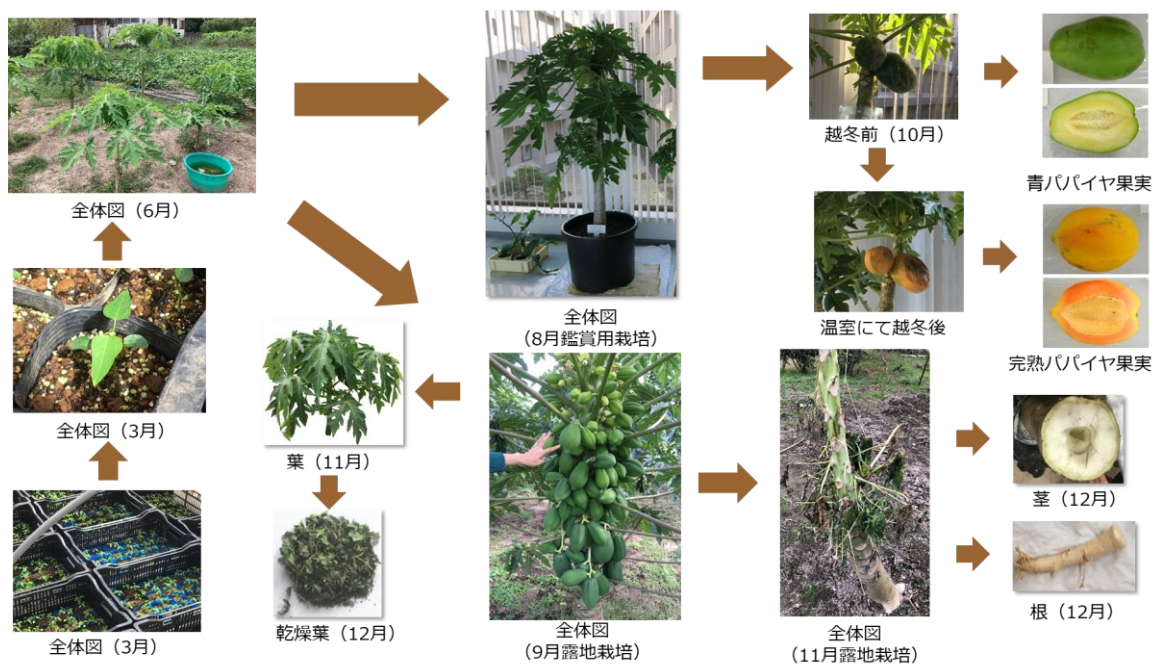
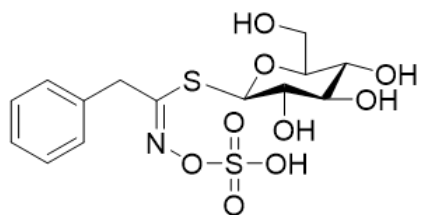


図 44 日本（千葉県）でのパパイヤ植物の通年栽培（露地栽培と温室栽培）



Benzyl glucosinolate (BG)

図 45 ベンジルグルコシノレートの構造

4.2 材料および方法

4.2.1 植物材料

未熟および完熟パパイヤ果実 (*Carica papaya* L.) は 2019 年に沖縄県の地元市場から入手した。4 個体の未熟および完熟の果実をそれぞれ、包丁で果皮と果肉に分けて、その後計 16 検体 (未熟果皮 4 個, 未熟果肉 4 個, 完熟果皮 4 個, 完熟果肉 4 個) を実験サンプルとして、メタボローム解析に供した。実験サンプルは、小さく細断した後、液体窒素にて凍結した。凍結したサンプルを秤量し、ブレンダーで粉砕した。果皮および果肉をコニカルチューブに入れ、代謝産物を抽出するまで -80°C で保存した。果肉の乾燥粉末処理を解析するために、2018 年から 2019 年に平田機工株式会社の近隣の木野農園の温室で、種子から生長させた未熟パパイヤ果実を別々の植物個体から 3 バッチ (群) として収穫した。未熟果実の乾燥粉末の処理工程は熊本県にある九国ベジフル株式会社に委託した。未熟果実は、 25°C で 20 分間、次いで 35°C で 100 分間の加熱処理と粉砕処理にて乾燥粉末に加工した。最後に、果実は乾燥、粉砕およびサイズフィルタリングを行った。未熟果実の乾燥粉末の粒径は約 $180\ \mu\text{m}$ であった。統計解析によるデータの正規化を行うために、乾燥粉末の実験サンプルは収穫した 3 バッチ (群) の未熟果実から作出した。

4.2.2 代謝産物の抽出

凍結したサンプル (100 mg) を 100%メタノール $300\ \mu\text{L}$ と混合し、破砕装置 TissueLyser II (QIAGEN Inc., Hilden, Germany) でジルコニアビーズと均質化し、 $25\ \text{Hz}$ で 2 分間セット処理を行った。ホモジナートを $15,000\ \text{rpm}$ で 10 分間遠

心分離した。脂溶性成分を除去するために、上清を Mono-Spin C18 column (GL Science Inc., Tokyo, Japan) を用いて濾過した。溶出液を 2 µm の polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (GL Science Inc.) で濾過し、濾液を LC-OrbitrapTM-MS で分析した。

4.2.3 LC-OrbitrapTM-MS 分析

LC-OrbitrapTM-MS を用いたメタボローム解析は、(公財) かずさ DNA 研究所が提供するメタボローム解析受託サービスの LC/MS 基本解析 (http://www.biosupport.kazusa.or.jp/sub_center3/index.php/lcms-basic/) を利用した。

LC-OrbitrapTM-MS システムは高速液体クロマトグラフィー Ultimate 3000 RSLC (Thermo Fisher Scientific) を接続した高分解能質量分析装置 Q Exactive (Thermo Fisher Scientific) を用いている。各装置の主な設定値は以下に示す。

Ultimate 3000 分析条件

カラム	InertSustain AQ-C18 (2.1 x 150 mm, 3 µm-particle, GL Science)
カラム温度	40°C
移動相	移動相 A: 0.1%ギ酸水溶液 移動相 B: アセトニトリル
移動相流速	0.2 mL/分
試料注入量	2 µL

LC グラジエントプログラム

時間 (分)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0.0	98	2
3.0	98	2

30.0	2	98
35.0	2	98
35.1	98	2
40.0	98	2

Q Exactive 分析条件

測定時間	3 - 30 分
イオン化法	Electro Spray Ionization (ESI)
spray voltage	3.2 kV
capillary temperature	300 °C
測定質量範囲	<i>m/z</i> : 80 - 1,200
フルスキャン分解能	70,000 at <i>m/z</i> 200
automatic gain control (AGC) target	1e6
collision induced dissociation (CID) -based data dependent MS/MS (DDMS2) acquisition mode	
MS/MS プレカーサー選択法	Data Dependent Scan (Top 10) *1 (注釈⑤) HCD MS2 scans
automatic gain control (AGC) target	1e5
max injection time (IT)	50 ms
MS/MS スキャン分解能	17,500 at <i>m/z</i> 200
isolation window	<i>m/z</i> 2.0
stepped normalized collision energy (N) CE	0/50/80
underfill ratio	5%
Dynamic Exclusion (注釈⑥)	20 sec

注釈⑤ Data Dependent Scan (Top 10)

フルスキャンで検出されたプレカーサーイオンのうち、強度上位 10 個を MS/MS スペクトル測定に供する設定である。

注釈⑥ Dynamic Exclusion

より多くのプレカーサーイオンの MS/MS スペクトルを測定するために、一度測定したプレカーサーイオンを所定時間の間 MS/MS スペクトル測定対象から除外する設定である。

LC/MS 分析の再現性と安定性については、各分析試料のイオンクロマトグラムピークの最大イオン強度からピーク検出に十分なシグナル ($10^8 \sim 10^9$ cps) が得られていること、LC/MS QC Reference Material (Waters Corporation, Massachusetts, USA) に含まれる 9 種類の濃度既知標準化合物を分析前後に QC (Quality Controls) サンプルとして分析し、保持時間、検出感度の変動が規定範囲内であることを確認している。

LCMS QC Reference Material (Model: 186006963) に含まれる化合物

Component	Formula	Detect Ion	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)
Acetaminophen	$\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_2$	152.0712	10
Caffeine	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$	195.0882	1.5
Sulfaguanidine	$\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$	215.0603	5
Sulfadimethoxine	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$	311.0814	1
Val-Tyr-Val	$\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_5$	380.2185	2.5
Verapamil	$\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_4$	455.2910	0.2
Terfenadine	$\text{C}_{32}\text{H}_{41}\text{NO}_2$	472.3216	0.2
Leu-Enkephalin	$\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_7$	556.2771	2.5
Reserpine	$\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_9$	609.2812	0.6

Conc.は Concentration (濃度) を表す。

分析データは Xcalibur software version 4.0.27.13 (Thermo Fisher Scientific Inc.) を使用して取得した。

4.2.4 データ処理およびピークアノテーション

ProteoWizard (Chambers *et al.* 2012) および (公財) かずさ DNA 研究所のメタボロームグループによって開発された PowerGetBatch software (Sakurai and Shibata 2017) をベースとした自動処理プログラムシステムを利用して、カラムクロマトグラムデータと質量クロマトグラムデータからピーク検出、ピーク特

性評価, サンプル/ピークアライメントを行った. 検出されたピークの代謝産物のアノテーションは, 検出 m/z 値と推定付加イオンに基づいて, MFSearcher tool (Sakurai *et al.* 2013) を使用して化合物データベースを検索または元素組成式を予測することによって行った. MFSearcher ツールの UC2 検索モードは, 質量精度 5 ppm の範囲内で, KNApSAcK

(<http://www.knapsackfamily.com/KNApSAcK>) (Afendi *et al.* 2012) と HMDB (<https://hmdb.ca/>) (Wishart *et al.* 2018) の化合物データベースの検索を行った. そして, 次に, 1) 元素組成を予測するための ExactMassDB-HR2 データベース (<http://webs2.kazusa.or.jp/mfsearcher/exmassdb-hr2/>), 2) 分子量が 1000 未満の 20 種類のアミノ酸のオリゴペプチドで構成される Pep1000 データベース (<http://webs2.kazusa.or.jp/mfsearcher/pep1000/>) および 3) 約 200 種類の市販植物および微生物由来の代謝産物の標準物質を含むインハウスの分析データライブラリーを用いた追加検索を行った. これらの検索結果を使用して, 手動で 16 種類の代謝産物カテゴリーに分類を行った (4.3.1 の表 9) (Sano *et al.* 2012). 化合物データベース中の候補化合物の構造が共通の構造を共有するかどうかを指標にして, 16 種類の代謝産物カテゴリー (アルカロイド, アミノカルボン酸 (アミノ酸), カロテノイド, クマリン, 脂肪酸誘導体, フラボノイド, 糖脂質, グルコシノレート, イリドイド, ヌクレオチド, 有機酸, フェノール性化合物, リン脂質, ポルフィリン, 糖, ステロイド, テルペノイド) に分類した. 複数の分類に属する構造がある場合, 上位の分類カテゴリーに全てが含まれる場合を除いて, 他の代謝産物分類を割り当てることはしなかった. (例えば, フェノール性化合物はクマリン, フラボノイド, およびイリドイドの上位の分類カテゴリーである).

表 10 (4.3.1) で示した化合物のマススペクトルパターンを確認するために、Compound Discoverer 3.0 ソフトウェア (Thermo Fisher Scientific) の機能を用いて、mzCloud mass spectral library (18,667 種類のマススペクトル, 2020 年 11 月 24 日の登録数; Thermo Fisher Scientific Inc.) のマススペクトルを検索した。そして、公共マススペクトルデータベースである MassBank (<http://www.massbank.jp/>) (Horai *et al.* 2010) , GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) (<https://gnps.ucsd.edu/>) (Wang *et al.* 2016) と同様なマススペクトルが収録されている mzVault public MS/MS library pos/neg (303,026 種類のマススペクトル, 2020 年 11 月 24 日の登録数, Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて、マススペクトルの相同性検索を行った。

4.2.5 統計解析

主成分分析 (PCA) は、Microsoft Excel の統計処理機能を持つフリーのソフトウェア (<http://prime.psc.riken.jp/compms/others/main.html>) (Matsuo *et al.* 2017) を用いて、前処理を非変換および Pareto scaling で、サンプル間の違いを特徴づけるために行った。Pareto scaling は変数を分散の平方根で除した値で算出される。この Pareto scaling は、強度の弱いスペクトルを適度に強調する場合に利用される前処理であり、メタボローム解析でも良く利用されている (Worley and Powers 2013) 。独立した各 4 つの重複サンプルの全てで検出されたピークを用いて、比較メタボローム解析を行った。student t-test (Cui and Churchill 2003) 検定を用いた Volcano plot 解析は、Microsoft Excel に基づく in house プログラムを使用して、得られたデータセットに対して実行した。倍率

変化は、未熟サンプルの平均ピーク強度を完熟サンプルの平均ピーク強度で割って算出した。

4.2.6 タンパク質分解酵素の活性測定

未熟パパイヤの乾燥果実粉末 (5 g) を 100 mL のシステイン緩衝液 (pH 4.5) と混合し、60 分間氷上に静置した。抽出液を 10 分間 3,000 rpm で遠心分離した。上清をステンレス製の金網 (メッシュサイズ 45 μm) でろ過し、酵素溶液として使用した。38°C で 10 分間予熱した 0.6% (w/v) カゼイン溶液 (pH 6.0) の 5 mL に酵素溶液の 1 mL を加え、酵素反応を開始した。38°C で 10 分間予熱した。この酵素反応溶液を 38°C で 60 分間インキュベートし、0.44 mol/L トリクロロ酢酸 5 mL を加えて酵素反応を停止させた。続いて、38°C で 30 分間再びインキュベートし、No. 5C filter paper (ADVANTEC Toyo Co. Ltd.) を用いて濾過した。吸光度は 275 nm (遊離した芳香族アミノ酸の吸収) で測定した。1 単位のタンパク質分解酵素活性は、pH 6.0 および 38°C で 275 nm での吸光度を 1 分間あたり 0.01 増加させるために必要な酵素量と定義した。この乾燥果実粉末のタンパク質分解酵素活性測定は (一財) 日本食品分析センターに委託した。

新鮮な未熟果実および完熟果実に対するタンパク質分解酵素活性の測定方法は後述 (4.2.10) する。

4.2.7 ベンジルグルコシノレート (BG) の定量分析

乾燥果実粉末 (0.4 g) を 50% (v/v) メタノール 30 mL に再懸濁し、10 分間インキュベートした。混合物を 2,500 rpm で 5 分間遠心し、上清を新しいチュ

ーブに移した。沈殿した材料に対して、50%メタノールで2回、再抽出した。得られた上清の総容積は、50%メタノールで100 mLに調整した。この溶液を、ベンジルグルコシノレート (BG) 含有量を HPLC で測定した。

HPLC 分析条件

カラム	Unison UK-C18 (4.6 × 250 mm, 3 μm-particle, Imtakt Co. Kyoto, Japan)
カラム温度	40°C
移動相	移動相 A: 0.1%リン酸水溶液 移動相 B: 0.1%リン酸アセトニトリル溶液
移動相流速	1mL/分
検出波長	214 nm

この乾燥果実粉末のベンジルグルコシノレート (図 45) の定量分析は (一財) 日本食品分析センターに委託した。パパイヤの茎、根および市販のマカエキスに対するベンジルグルコシノレートの定量測定は後述 (4.2.9) する。

4.2.8 総ポリフェノール含有量の測定

乾燥果実粉末の総ポリフェノール含有量の測定はフォリン-チオカルト一試薬 (Folin-Ciocalteu reagent) (Folin and Ciocalteu 1927) を用いた活性測定を行った。この乾燥果実粉末の総ポリフェノール含有量の測定は (一財) 日本食品分析センターに委託した。

4.2.9 パパイアの茎と根における BG の定量分析

2017年に千葉県の子葉農産株式会社で栽培された未熟パパイア (*Carica papaya* L.) の茎および根を千葉県農産より入手し、ベンジルグルコシノレート (BG) の定量分析に用いた。アブラナ科植物のマカ (*Lepidium meyenii*) のエキスパウダーは、(株)常磐植物化学研究所から入手した。サンプルを細断し、ブレンダーで粉砕した。サンプルとマカ抽出粉末 (100 mg) を 300 μ L の 75%メタノールと混合し、破砕装置 TissueLyser II (QIAGEN Inc., Hilden, Germany) を用いてジルコニアビーズで均質化し、それぞれ 25Hz で 2 分間行った。ホモジナートを 15,000rpm で 10 分間遠心分離した。脂溶性成分を除去するために、上清を Mono-Spin C18 column (GL Science Inc., Tokyo, Japan) を用いて濾過した。溶出液を 2 μ m の polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (GL Science Inc.) で濾過した。未熟パパイアの根と茎およびマカの抽出物を濃縮するために、抽出物を真空中で乾燥させ、75%メタノール中に再懸濁し、LC/MS/MS システム (LC-MS8050; Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) に注入した。

LC-MS8050 分析条件

カラム	InertSustain AQ-C18 (2.1 x 50 mm, 1.9 μ m-particle, GL Science)
カラム温度	40°C
移動相	移動相 A: 0.1%ギ酸水溶液 移動相 B: アセトニトリル
移動相流速	0.4 mL/分
試料注入量	2 μ L

LC-MS8050 グラジエントプログラム

時間 (分)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0.0	98	2
7.0	2	98
8.0	2	98
10.0	98	2

LC-MS8050 分析条件

測定時間	0 - 10 分
イオン化法	Electro Spray Ionization (ESI) negative mode
The transitions for the MRM	
Q1	<i>m/z</i> 408
Q2 collision energy	21 eV
Q3	<i>m/z</i> 97

BG の濃度は、標準物質の BG (Tokyo Chemical Industry Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いて作成した検量線を用いて決定した。

4.2.10 新鮮パパイヤ果実におけるタンパク質分解酵素の活性測定

4.2.1 で述べたメタボローム解析で用いた 16 検体 (未熟果皮 4 個, 未熟果肉 4 個, 完熟果皮 4 個, 完熟果肉 4 個) の植物材料のうち, 各 3 個を実験サンプルとして, タンパク質分解酵素活性を測定した。実験サンプルは, 小さく細断して, 次いで, 液体窒素で凍結した。凍結したサンプルを秤量し, 次にブレンダーで粉砕した。果皮および果肉をコニカルチューブに入れ, 代謝産物を抽出するまで -80°C で保存した。凍結試料からタンパク質分解酵素の抽出方法は, Chaiwut らの改良法 (Chaiwut *et al.* 2010) で行った。凍結したサンプルを 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) と 1:9 (w/v) の比率で混合し, 30 分間放置した。

抽出液を 4°C で 10,000rpm で 20 分間遠心分離した。上清は、No. 5C filter paper (ADVANTEC Toyo Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いて濾過し、タンパク質分解酵素活性測定に用いた。酵素溶液のタンパク質分解酵素活性測定方法は、Chaiwut らの改良法 (Chaiwut *et al.* 2007) で行った。2 mL の酵素溶液と 0.5 mL の活性化溶液 (40 mM システイン, 20 mM EDTA 2Na 塩) を含む反応混合物を、38°C で 5 分間インキュベートした。酵素反応は、1% (w/v) カゼイン溶液 2.5 mL を添加することによって開始した。30 分後、7.5 mL の 5% 冷トリクロロ酢酸を加えて反応を停止させた。上清を 10,000 rpm で 20 分間遠心分離して、上清を 275 nm で吸光度を測定した。1 単位のタンパク質分解酵素活性は、pH 7.0 および 38°C で 275 nm での吸光度を 1 分間、0.01 増加させるために必要な酵素の量と定義した。

4.3 結果

4.3.1 パパイヤ抽出物のメタボローム解析

未熟および完熟パパイヤ果実（果皮および果肉）の抽出物に含まれる植物特異的代謝産物（Specialized Metabolites）を明らかにするために、LC-OrbitrapTM-MS を利用したノンターゲットな網羅的メタボローム解析を行った。各抽出物の代表的な全イオンクロマトグラムは、代謝産物の量と種類が異なることを表すパターンを示した（図 46）。

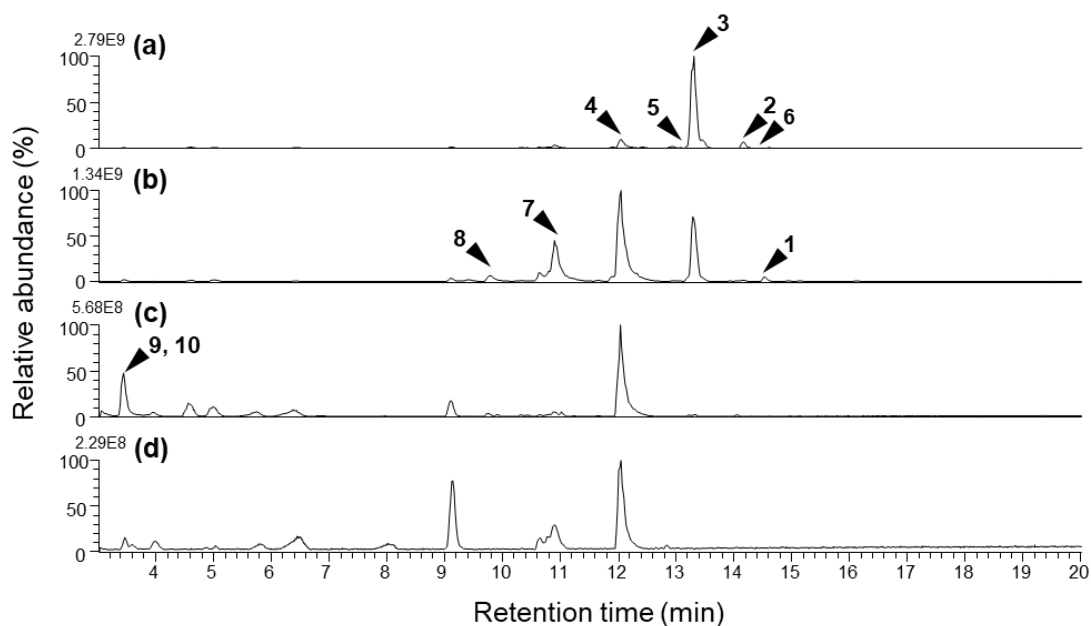


図 46 パパイヤ果実の (a) 未熟果皮，(b) 完熟果皮，(c) 未熟果肉，および (d) 完熟果肉からの代謝産物の抽出エキスのトータルイオンクロマトグラム

各分析データの左上の隅に、フルスケールのイオン強度を示した。化合物の番号は、表 10 に対応している。

LC/MS 分析データをピーク検出およびアライメントを行った後、6,536 本のピークを抽出した。6,536 本のピークの中で、692 本のピークに関して、化合物データベース検索を用いてアノテーション（注釈⑦）を行い、その後 16 種類の代謝産物の構造にもとづく化合物カテゴリーに分類した（表 9）。その結果、100 以上のピークが機能性代謝産物（Sánchez and Vázquez 2017; Shahidi and Ambigaipalan 2015）の候補を含む可能性があるアミノカルボン酸（ジペプチドおよびトリペプチド候補を含む）およびフェノール性化合物として分類された（表 9）。

表 9 各検体での化合物分類の数（ピーク数）

Chemical category	Unripe Peel	Ripe Peel	Unripe Pulp	Ripe Pulp	Total
Aminocarboxylic acids	117	196	173	166	229
Sugars	14	24	16	28	36
Nucleotides	20	16	33	28	43
Fatty acid derivatives	21	33	13	23	35
Organic acids	7	13	11	11	16
Alkaloids	30	31	30	29	36
Glucosinolates	4	6	5	6	6
Coumarins	20	19	4	11	26
Flavonoids	10	9	6	2	13
Phenolics	85	111	77	118	172
Steroids	4	6	5	5	8
Terpenoids	23	32	17	25	42
Others*	12	21	13	18	30
Total	367	517	403	470	692

*Others は、Glycolipids, Phospholipids, Porphyrins および Iridoids の分類を含む。

注釈⑦ メタボローム解析におけるアノテーションとは、検出されたイオンピークに対して、化合物名、化合物分類名、物理化学的性質および生物学的情報を付加すること、およびその付与された情報自体を示す（1.4 メタボローム解析にて記述）。

未熟の果皮と比較して、完熟の果皮は、多くの化合物カテゴリーのピーク数が増えていた。この事実は、登熟過程で、機能性代謝産物に変化していることを示唆している。6,536本のピークを用いたPCAのスコアプロット(図47A)の結果から、未熟および完熟果皮における代謝産物のピークパターンの違いは、未熟および完熟果肉間の代謝産物のピークパターンの違いよりも大きいことが示唆された。この現象は、登熟過程における果皮の代謝産物の種類と量の変化が、果肉の代謝産物の種類の変化よりもより注目すべきであることを示唆した。PCAのローディングプロット(図47B)の結果から、スコアプロット内のサンプルを分離するために寄与した代謝産物ピークを抽出した。これらの代謝産物ピークの中で、いくつかのピークはパパイヤの既知のアルカロイドであるカルパインの誘導体(表10の化合物1, 2, 3, 4, 7, および8)としてアノテーションされた。表10では、アノテーションされた異なる代謝産物ピークに対して、予測された分子式、保持時間、MS/MSフラグメンテーションパターンなどの情報を示した。表10に示した化合物のアノテーションの詳細については、後述(4.3.3)する。カルパインはパパイヤ葉に蓄積している苦味性アルカロイドであり、強力な抗ウイルスおよび抗プラズマ活性を有すると報告されている(Julianti *et al.* 2014a; Radhakrishnan *et al.* 2017)。文献調査の結果、今までカルパインはパパイヤの葉のみで報告されているが、本研究で初めてパパイヤ果実でもカルパインの存在が確認された。カルパインはパパイヤ以外の植物では、サルバドル科植物であるアジマテトラカンタ(*Azima tetracantha*)の各組織(成葉と若葉、種子、茎、トゲおよび根)でも報告されている(Bennett *et al.* 2004)。さらに、LC/MS分析データが登録されているメタボローム解析データベースである食品メタボロームレポジトリ(<http://metabolites.in/foods/>) (Sakurai and Shibata 2017)を利用して、パパイヤ由来の代謝産物の検索を行っ

た。その結果、完熟パパイヤの果実の LC/MS データセットに化合物 **3** から **8** の候補ピークが存在していた。また、このデータベース内における他の食品サンプル中には、化合物 **1** から **8** の候補ピークは存在していなかった。

カルパインがパパイヤ果物でも存在する可能性が示されたが、本研究の化合物アノテーションは、質量電荷比 (m/z)、化合物データベース検索、および MS/MS スペクトルから予測された分子式に基づいて推測したもので、標準物質を使用した確認は行っていない。

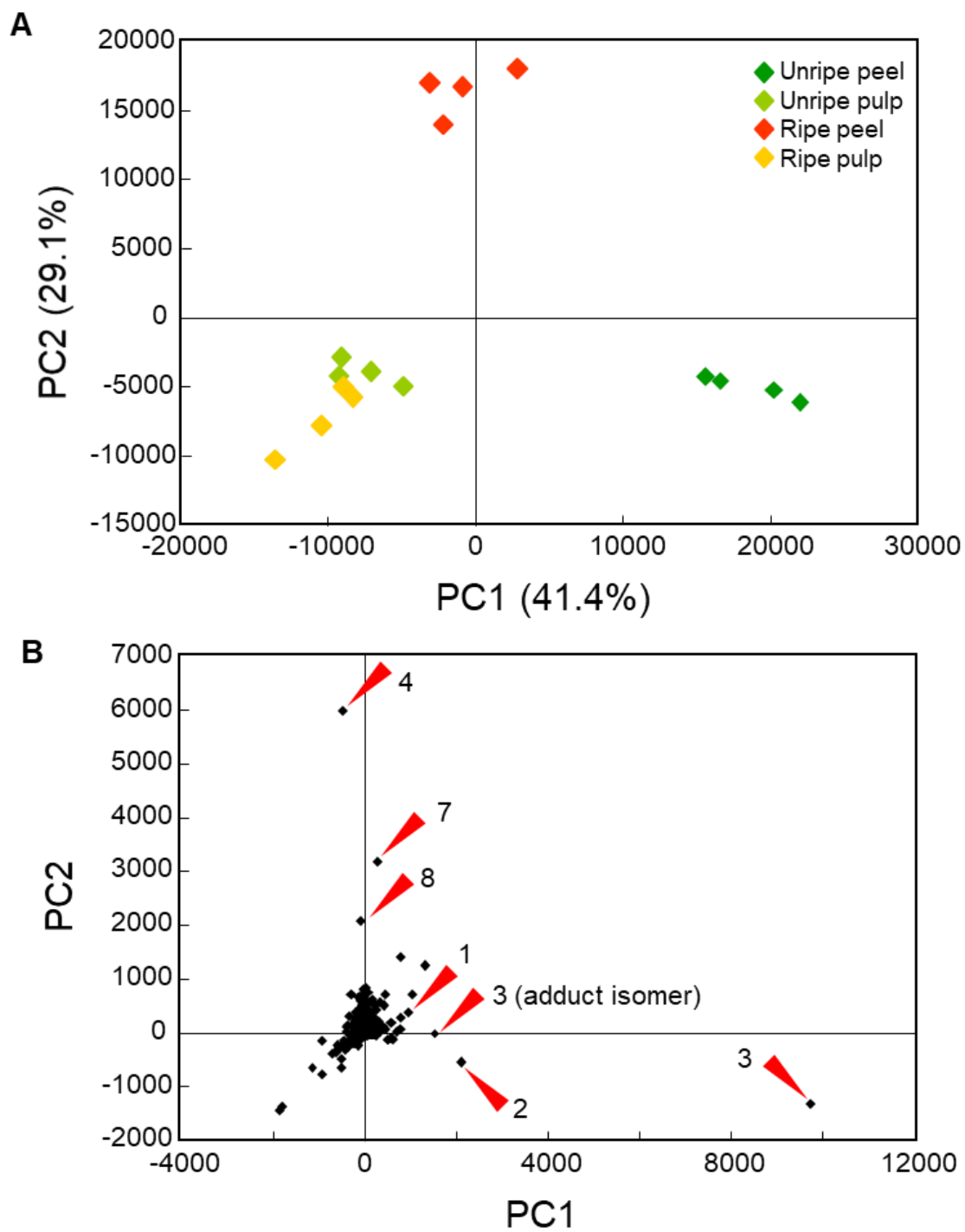


図 47 パパイヤ果実エキスの PCA

A はスコアプロット，B はローディングプロットを示す．化合物の番号は，表 10 に対応している．

表 10 各検体におけるアノテーションされたピークの数と分類

Compound No.	Annotation	Molecular Formula	Retention time (min)	Detected <i>m/z</i>	Adduct ion	MS/MS fragments (<i>m/z</i>)	Peak No.*
1	Carpaine, putative	C ₂₈ H ₅₀ N ₂ O ₄	14.55	240.196	[M+2H] ²⁺	240, 222	4559
			14.55	479.385	[M+H] ⁺	479, 240, 222	4560
2	Dehydrocarpaine I, putative	C ₂₈ H ₄₈ N ₂ O ₄	14.16	239.188	[M+2H] ²⁺	240, 239, 238, 222, 220	4389
			14.16	477.369	[M+H] ⁺	477, 238, 220	4388
3	Dehydrocarpaine II, putative	C ₂₈ H ₄₆ N ₂ O ₄	13.32	238.18	[M+2H] ²⁺	238, 220	3931
			13.32	475.353	[M+H] ⁺	475, 238, 220	3932
4	Dehydro-carpamic acid, putative	C ₁₄ H ₂₅ NO ₃	12.05	256.191	[M+H] ⁺	256, 238, 220	3098
5	Carpamic acid, putative	C ₁₄ H ₂₇ N ₁ O ₃	13.09	258.206	[M+H] ⁺	258, 240, 222	3807
6	Hydrolyzed methylated derivative of dehydrocarpaine II, putative	C ₂₉ H ₅₀ N ₂ O ₅	14.42 14.40	254.193 507.380	[M+2H] ²⁺ [M+H] ⁺	254, 238, 220 252, 220	4516 **
7	Dehydro-carpamic acid glycoside, putative	C ₂₀ H ₃₅ NO ₈	10.96	418.244	[M+H] ⁺	418, 256, 238, 220	2342
8	Hydroxyl derivative of dehydro-carpamic acid, putative	C ₁₄ H ₂₅ NO ₄	9.76	272.186	[M+H] ⁺	272, 254, 212, 194	1443
9	Glutathione putative	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	3.45	308.091	[M+H] ⁺	308, 179, 162, 116, 84, 76, 59	201
10	Glycyl-Cysteine, putative	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃ S	3.45	179.049	[M+H] ⁺	179, 162, 116, 76, 59	194

*このピーク番号は、PowerGet でのデータ解析結果で出力される番号である。

**このピークは LC/MS の生データからマニュアル作業で確認したピークである。

4.3.2 パパイヤ果実の果皮と果肉の比較メタボローム解析

未熟および完熟パパイヤ果実（果皮，果肉）の代謝産物の違いを包括的に理解するために，より信頼できる代謝産物のピーク（すなわち，同種の各4個体の分析データで4個体全てにおいて検出されたピーク）を用いて，比較メタボローム解析を行った．図48Aに，代謝産物ピーク数を用いたベン図を示した．その結果，582個（29.9%）および569個（49.1%）はそれぞれ，未熟および完熟パパイヤの果皮と果肉で共通に検出された代謝産物ピーク数（括弧内は割合）を示した．パパイヤの果皮と果肉に対して，未熟と完熟の特異的な代謝産物ピークを比較すると，果皮では，（124対1241）で，果肉では，（132対459）で，いずれも，完熟した方が特異的な代謝産物ピークが増加する傾向にあった（図48A）．そして，それぞれの代謝産物ピークに関して，化合物分類によるその傾向を確認すると，アミノカルボン酸（アミノ酸）が完熟の果皮で増加しており，一方，フェノール化合物が完熟の果肉で増加していた．果皮や果肉におけるこれらの変化は，味だけでなく，人間の健康のための機能性にも影響を与える可能性がある．

未熟および完熟パパイヤの果皮と果肉で共通に検出された代謝産物ピークについて，volcano plots 解析を実施した．代謝産物の含有量比が2倍以上の変化があり，有意差（Probability; P）が1%未満の代謝産物を特異的な代謝産物ピークとして，色分けして表示した（図48B）．その結果，230本の代謝産物のピークが選抜され，いくつかの代謝産物のピークは，果皮の中のカルパイン関連のアルカロイド（**2**，**3**，**4**，**6**および**8**）とアノテーションされた．これらのカ

ルパイン関連のアルカロイドのアノテーションの詳細については、次のセクションで説明する。

デヒドロカルパイン I (2) および II (3) とアノテーションされたピークは、完熟した果皮で減少していた。この現象は、完熟果皮の苦味の減少と関係があると考えられる。さらに、グルタチオン (9) およびジペプチドであるグリシルシステイン (10) は、未熟の果肉で有意差のある代謝産物としてアノテーションされた。この減少も、果実の登熟過程に生じた酸化プロセスに関連 (Jimenez *et al.* 2002) している可能性があると考えられる。

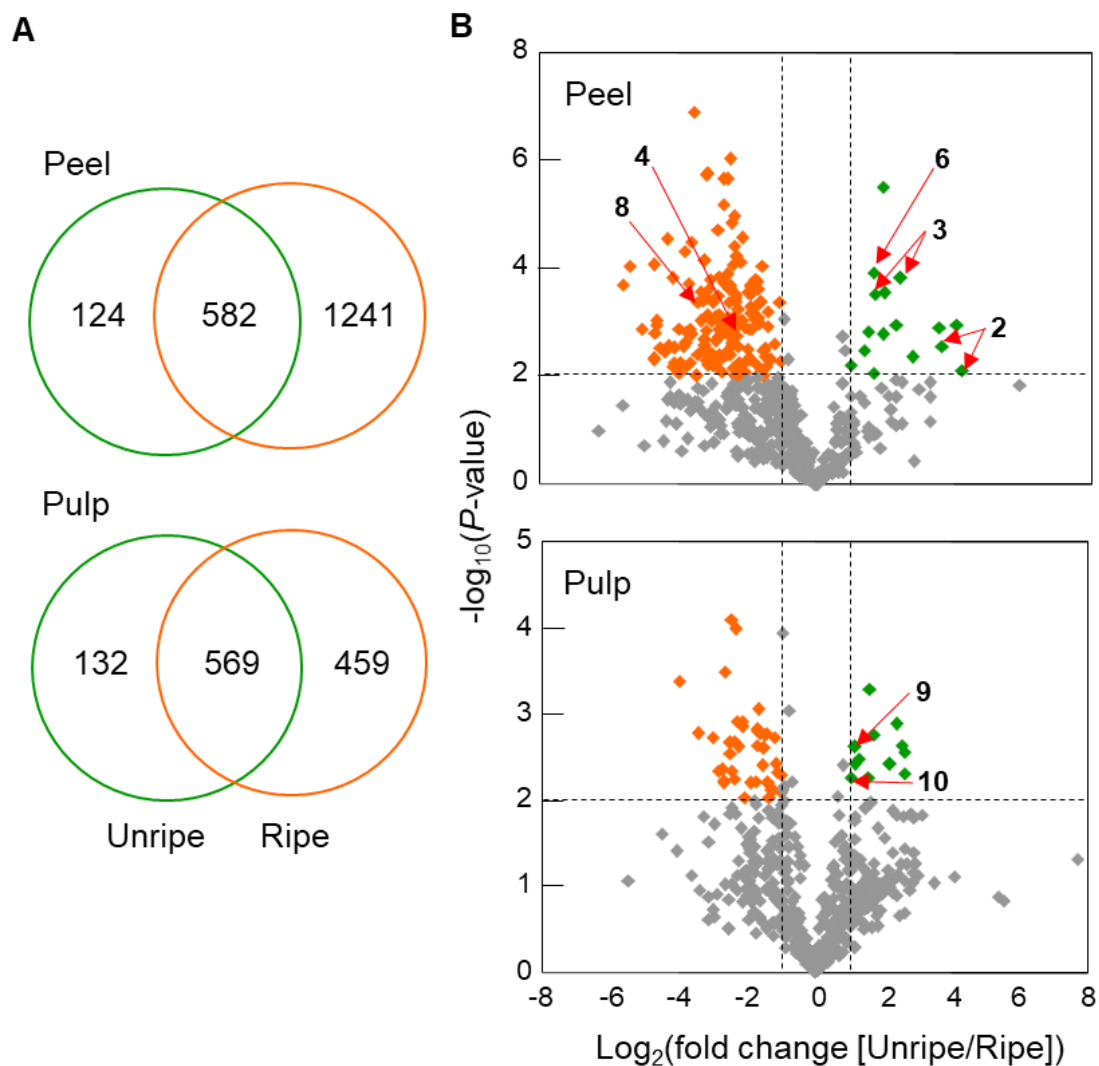


図 48 未熟（円の緑色）および完熟（円のオレンジ色）のパパイヤ果実（果皮と果肉）の代謝産物データを用いた比較分析

A 代謝産物ピーク数を用いたベン図.

B 代謝産物の含有量比を用いた Volcano plots.

代謝産物の含有量比が 2 倍以上の変化があり、有意差 P が 1%未満の代謝産物は緑色（未熟）またはオレンジ（完熟）で強調されている.

化合物の番号は、表 10 に対応している.

4.3.3 LC/MS データを用いたカルパイン誘導体のアノテーション

LC-OrbitrapTM-MS を用いた分析データに基づく、代謝産物プロファイリングによる未熟および完熟パパイヤ果実の比較により、パパイヤの主要アルカロイドとして知られるカルパイン (図 49) (Julianti *et al.* 2014b) およびカルパインの代謝関連の誘導体 (1~8) の存在が示唆された。これらの化合物のアノテーションの手順は以下に説明する。

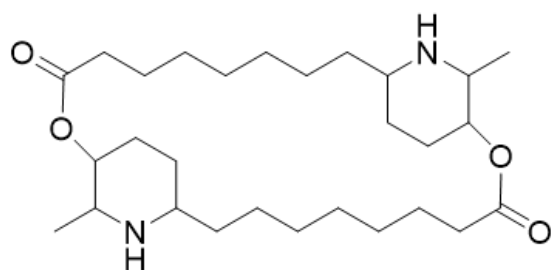


図 49 カルパイン (carpaine) の構造

化合物 **1** は、LC/MS 分析データのフルスキャン分析で、 m/z 479.385 $[M+H]^+$ およびその多価イオン m/z 240.196 $[M+2H]^{2+}$ として検出された (図 50) . **1** の分子式 ($C_{28}H_{50}N_2O_4$) は精密質量値から算出した。化合物データベース検索の結果、**1** はカルパインの情報と一致した。そして、パパイヤ果実に関する代謝産物の研究報告のマススペクトルデータに基づいて、カルパインと推測した (Jiao *et al.* 2010) . その根拠について詳しく述べる。

1 の MS/MS スペクトルデータは次に述べる結果を示した。1) m/z 479.385 $[M+H]^+$ をプレカーサーイオンとして、 m/z 240.196 $[\text{half molecular} + H]^+$ および m/z 222.185 $[\text{half molecular} + H - H_2O]^+$ のプロダクトイオンが得られた。2) m/z 240.196 $[\text{half molecular} + H]^+$ をプレカーサーイオンとして、 m/z 222.185 $[\text{half}$

molecular + H - H₂O]⁺のプロダクトイオンが得られた (図 50) . m/z 240.196 の MS/MS フラグメントイオンの結果は, 既報の研究で報告された [half molecular + H]⁺ と同等なデータと考えられた (Jiao *et al.* 2010) . **1** の MS/MS スペクトルデータは, Shrama らの研究報告 (Sharma *et al.* 2019b) されたデータの MS/MS スペクトルと類似していた. さらに, カルパインの構造に関して, Compound Discoverer 3.0 ソフトウェア (Thermo Fisher Scientific) を用いて, 注目したモノアイソトピックイオン (monoisotopic mass) の MS/MS フラグメントパターンの質量電荷比 (m/z) に基づくイオンフラグメントの構造を予測した. m/z 479.385, 240.196 および 222.185 のフラグメントイオンの構造は, 図 50 に示すように予測された (イオン化構造として図内に表示した) .

以上のように, 本研究の LC/MS 分析データ解析, 文献記載のカルパインの LC/MS 分析データの比較解析, そして, *in silico* での MS/MS フラグメント予測解析の結果から, **1** はカルパイン (図 50) であると判断した.

これ以降, カルパインの分子内構造の特徴として, 2 つの質量電荷比 (m/z 240 と 222) のイオンペアーに着目して, **2** から **8** の解析を行った.

1: Carpaine, putative (C₂₈H₅₀N₂O₄)

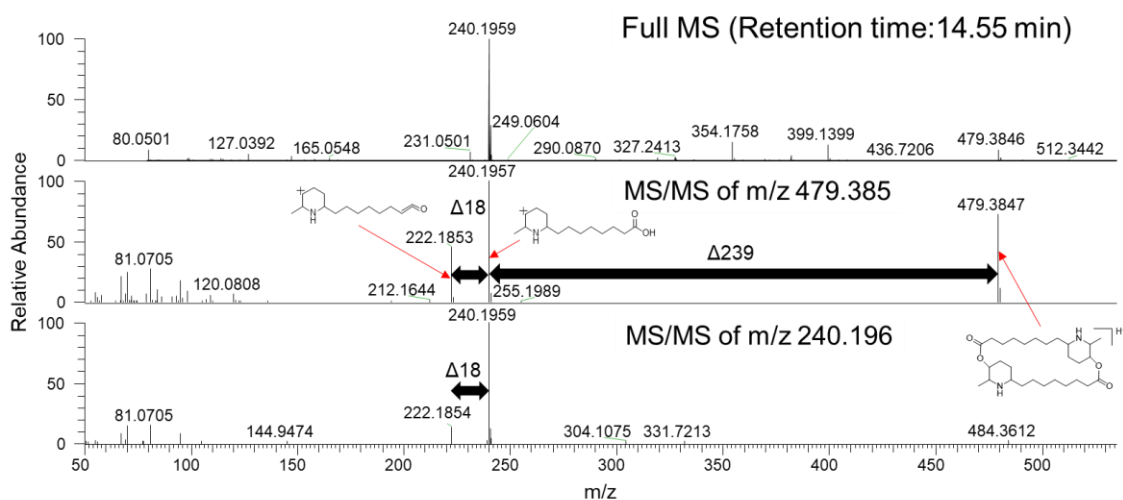


図 50 1 の LC/MS 解析

上段 保持時間 14.55 分の Full MS ; 中段 m/z 479.385 の MS/MS; 下段 m/z 240.196 の MS/MS

2 および **3** は、既報のパパイヤの葉の抽出液に存在するデヒドロカルパイン I および II としてアノテーションされた (Tang 1979) . その根拠は以下の通りである.

2 は、LC/MS 分析データのフルスキャン分析で、 m/z 477.369 [M + H]⁺ および多価イオン m/z 239.188 [M + 2H]²⁺ として検出された (図 51) . **2** の分子式

(C₂₈H₄₈N₂O₄) は精密質量値から算出した. **1** の分子式 (C₂₈H₅₀N₂O₄) と **2** の分子式 (C₂₈H₄₈N₂O₄) の組成式の差分析では、**2** は **1** よりも水素原子が 2 つ少ないことから、デヒドロカルパイン I と推定した. **2** の MS/MS スペクトルデータは次に述べる結果 (図 51) を示した. 1) m/z 477.369 [M + H]⁺ をプレカーサーイオンとして、 m/z 238.180 [half molecular of carpaine + H - H₂]⁺ および m/z 220.170 [half molecular of carpaine + H - H₂ - H₂O]⁺ のプロダクトイオンが得られた. 2) m/z 239.188 [half molecular of carpaine + 2H - H₂]²⁺ をプレカーサーイオ

ンとして、 m/z 220.170 [half molecular of carpaine + H - H₂ - H₂O]⁺のプロダクトイオンが得られた。 m/z 238.180 の MS/MS フラグメントイオンは[half molecular of carpaine + H - H₂]⁺と同等と推定された。1 および 2 のマススペクトルデータの比較では、以下のフラグメントイオンペアで同様のパターンを示した。すなわち、 m/z 240.196 (1) および m/z 238.180 (2) そして、 m/z 222.185 (1) および m/z 220.170 (2) は、1 および 2 の組成式の差分解析で確認された水素原子 2 個の違いが同じように確認された。従って、2 は既知成分であるデヒドロカルpain I (図 52) とアノテーションされた。

2: Dehydrocarpaine I, putative (C₂₈H₄₈N₂O₄)

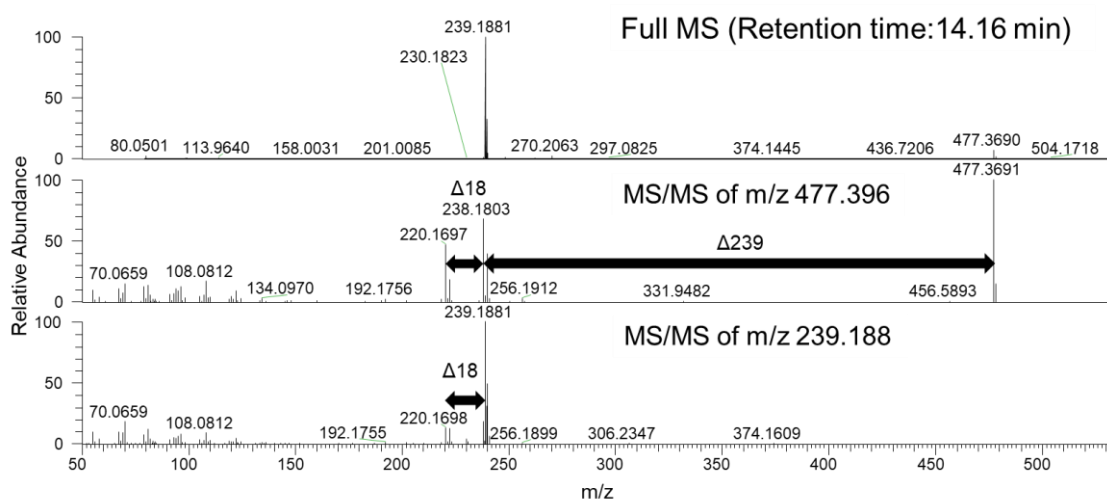


図 51 2 の LC/MS 解析

上段 保持時間 14.16 分の Full MS ; 中段 m/z 477.396 の MS/MS; 下段 m/z 239.188 の MS/MS

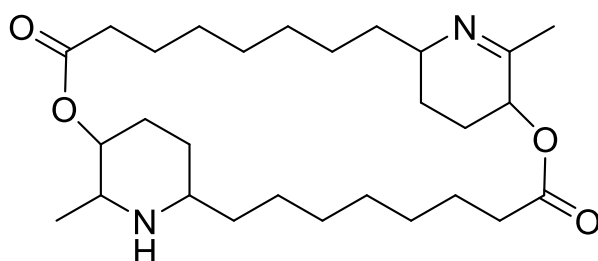


図 52 デヒドロカルpain I (dehydrocarpaine I) の構造

一方, **3** は LC-MS 分析データのフルスキャン分析で, m/z 475.353 $[M + H]^+$ および多価イオン m/z 238.180 $[M+2H]^{2+}$ として検出された (図 53) . **3** の分子式 ($C_{28}H_{46}N_2O_4$) は精密質量値から算出した. **2** の分子式 ($C_{28}H_{48}N_2O_4$) と **3** の分子式 ($C_{28}H_{46}N_2O_4$) の組成式の差分解析では, **3** は **2** よりも水素原子が 2 つ少ないことから, **3** をデヒドロカルpain II と推定した. **3** の MS/MS スペクトルデータは, 次に述べる結果 (図 53) を示した. 1) m/z 475.353 $[M + H]^+$ をプレカーサーイオンとして, m/z 238.180 $[\text{half molecular} + H]^+$ および m/z 220.170 $[\text{half molecular} + H - H_2O]^+$ のプロダクトイオンが得られた. 2) m/z 238.180 $[\text{half molecular} + H]^+$ をプレカーサーイオンとして, m/z 220.170 $[\text{half molecular} + H - H_2O]^+$ のプロダクトイオンが得られた. m/z 238.180 の MS/MS フラグメントイオンは, $[\text{half molecular} + H]^+$ と同等と推定された. **2** および **3** のマススペクトルデータの比較では, 以下のフラグメントイオンペアによる同様のパターンを示した. すなわち, m/z 238.180 (**2**) および m/z 238.180 (**3**) , m/z 220.170 (**2**) および m/z 220.170 (**3**) として, 同じ MS/MS フラグメントイオンが確認された. 従って, **3** は既知成分であるデヒドロカルpain II (図 54) とアノテーションされた.

3: Dehydrocarpaine II, putative (C₂₈H₄₆N₂O₄)

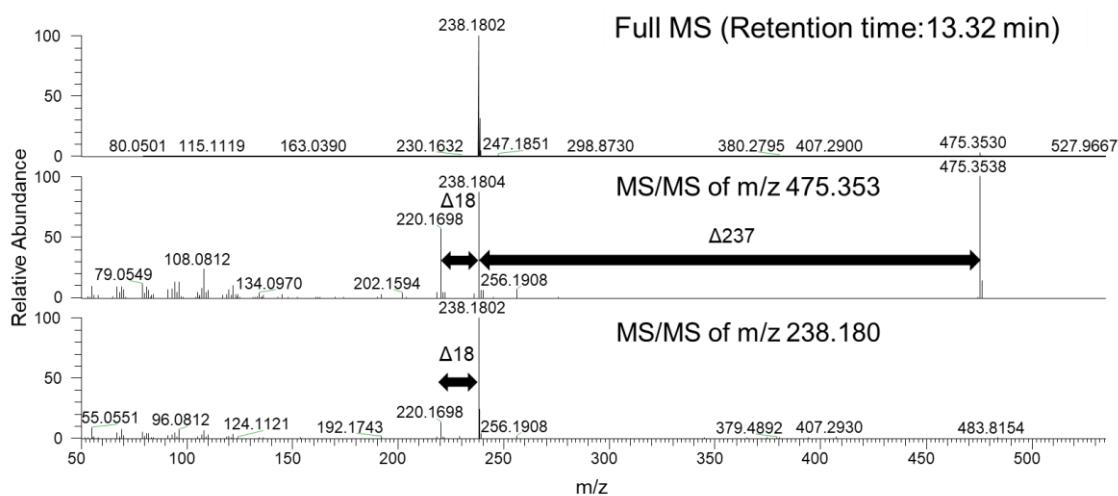


図 53 3 の LC/MS 解析

上段 保持時間 13.32 分の Full MS ; 中段 m/z 475.353 の MS/MS; 下段 m/z 238.180 の MS/MS

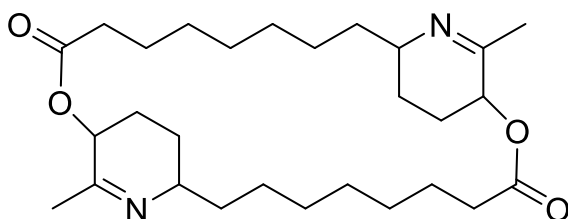


図 54 デヒドロカルパイン II (dehydrocarpaine II) の構造

4 から 8 は、既報の研究で報告 (Julianti *et al.* 2014a) された予測した分子式の差分解析および MS/MS スペクトルのニュートラルロス (neutral losses) に基づき、カルパイン誘導体或いは関連化合物としてアノテーションされた。その詳細は以下に述べる。

5 は、LC/MS 分析データのフルスキャン分析で、 m/z 258.206 [M + H]⁺として検出された (図 55) 。 5 の分子式 (C₁₄H₂₇NO₃) は精密質量値から算出した。この分子組成式は、パパイヤ葉エキス中で確認されたカルパム酸 (Julianti *et al.*

2014a) と同じであった。5 の MS/MS スペクトルデータでは, m/z 258.170 $[M + H]^+$ をプレカーサーイオンとして, m/z 240.196 $[M + H - H_2O]^+$ および m/z 222.186 $[M + H - H_2O - H_2O]^+$ のプロダクトイオンが得られた (図 55) 。 その MS/MS フラグメントイオンは, 1 のカルパインの MS/MS フラグメントイオンで特徴的なフラグメントイオン (m/z 240 および m/z 222) と同じであった。さらに, 1, 2, 3 および 5 の LC 分析カラムにおける保持の順序は, 5 が 1, 2 および 3 よりも先に溶出し, より親水性であることを示唆した。既報の研究報告 (Julianti *et al.* 2014a) では, 比較的類似した LC 条件下での化合物 (カルパイン, カルパム酸, および推定デヒドロカルパイン I および II) の溶出の順序は, 本研究の結果と同じ順序であった。従って, 5 は既知成分であるカルパム酸 (図 56) とアノテーションされた。

5: Carpaimic acid, putative (C₁₄H₂₇NO₃)

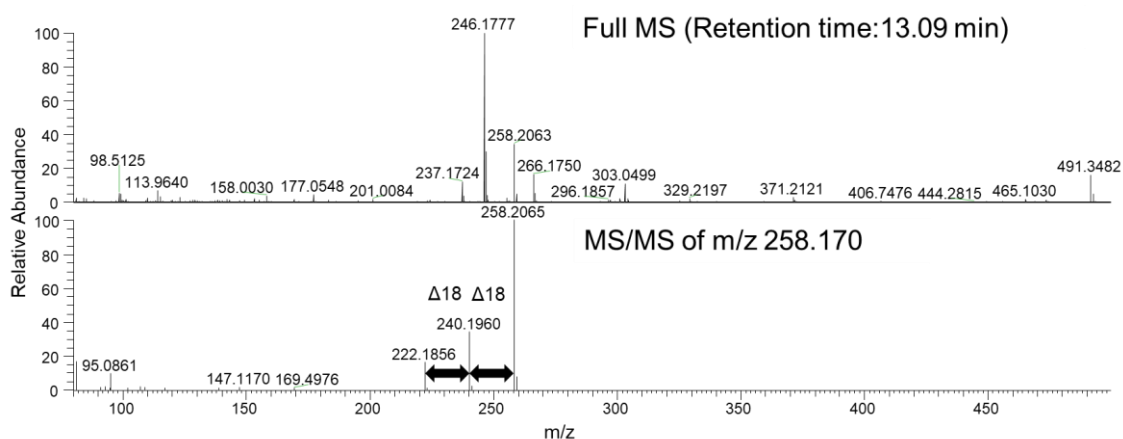


図 55 5 の LC/MS 解析

上段 保持時間 13.09 分の Full MS; 下段 m/z 258.170 の MS/MS

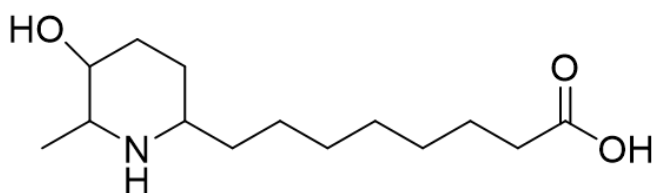


図 56 カルパム酸 (carpamic acid) の構造

4 は、LC/MS 分析データのフルスキャン分析で、 m/z 256.191 $[M+H]^+$ として検出された (図 57) . 4 の分子式 ($C_{14}H_{25}NO_3$) は精密質量値から算出した. 4 の分子式 ($C_{14}H_{25}NO_3$) と 5 の分子式 ($C_{14}H_{27}NO_3$) の組成式の差分解析では、4 は 5 よりも水素原子が 2 個少ないことから、4 はデヒドロカルパム酸と推測した. また、4 の MS/MS スペクトルデータは、 m/z 256.191 $[M+H]^+$ をプレカーサーイオンとして、 m/z 238.180 $[M+H-H_2O]^+$ および m/z 220.170 $[M+H-H_2O-H_2O]^+$ のプロダクトイオンが得られた (図 57) . その MS/MS フラグメントイオンは、1 のカルパインの MS/MS フラグメントイオンで特徴的なフラグメントイオン (m/z 240 および m/z 222) より、水素原子が 2 つ少ないフラグメントイオン (m/z 238 および m/z 220) であった. 4 および 5 の LC カラムにおける保持の順序は、4 が 5 よりも先に溶出し、より親水性であることを示唆した. その理由は、C-C 結合の二重結合が単結合に還元することにより、親水性の特性がわずかに増加することより保持時間が短くなると推測した. 従って、4 はデヒドロカルパム酸 (図 58) とアノテーションされた.

4: Dehydro-carpamic acid, putative (C₁₄H₂₅NO₃)

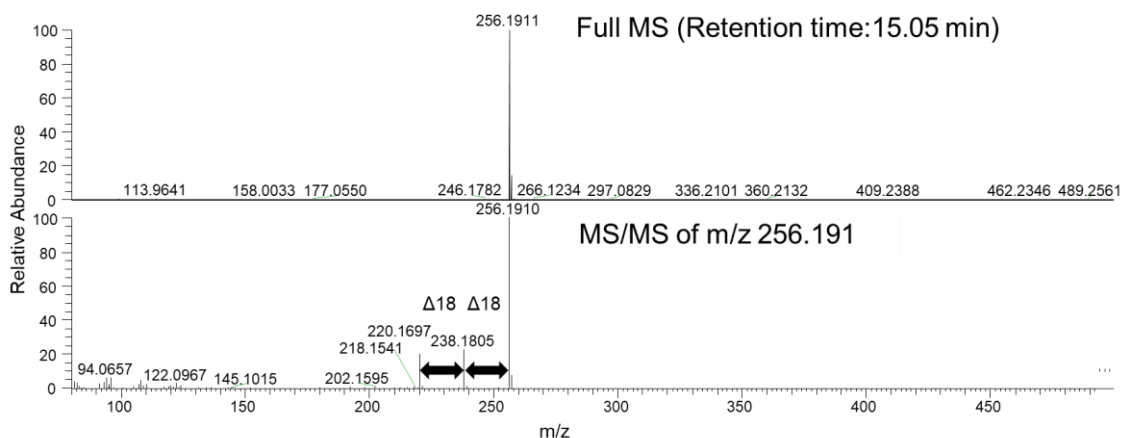


図 57 4 の LC/MS 解析

上段 保持時間 15.05 分の Full MS; 下段 m/z 256.191 の MS/MS

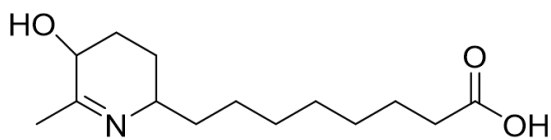


図 58 デヒドロカルパム酸 (dehydro-carpamic acid) の推定構造

2 重結合の位置は不確定

7 は, LC/MS 分析データのフルスキャン分析で, m/z 418.244 [M + H]⁺ として検出された (図 59) . 7 の分子式 (C₂₀H₃₅NO₈) は精密質量値から算出した. 7 の分子式 (C₂₀H₃₅NO₈) と 4 の分子式 (C₁₄H₂₅NO₃) の組成式の差分析では, 7 は 4 よりも分子式 (C₆H₁₀O₅) が多いことから, 7 をデヒドロカルパム酸配糖体 (dehydro-carpamic acid glycoside) と推測した. また, 7 の MS/MS スペクトルデータは m/z 418.223 [M + H]⁺ をプレカーサーイオンとして, m/z 256.191 [M + H - hexose]⁺, 238.180 [M + H - hexose - H₂O]⁺ および 220.170 [M + H - hexose - H₂O - H₂O]⁺ のプロダクトイオンが得られた (図 59) . その MS/MS フラグメントイオンは, 2 のカルパインの MS/MS フラグメントイオンで特徴的なフラグメ

ントイオン (m/z 240 および m/z 222) より水素原子が 2 個少ないフラグメントイオン (m/z 238 および m/z 220) であった. さらに, **4** および **7** の LC 分析カラムにおける保持の順序は, **7** が **4** よりも先に溶出し, より親水性であることを示唆した. その理由は, 糖 (hexose) の結合により, 親水性の特性が増加することより保持時間が短くなると考えられる. 従って, **7** はデヒドロカルパム酸配糖体 (dehydro-carpamic acid glycoside) (図 60) とアノテーションされた. 図 60 の **7** の構造は, あくまで構造の一例である. なぜなら, 付加する糖残基の位置を特定 (または推定) することや, 糖の構造もアルドース/ケトース構造を特定または推定することができないためである.

7: Dehydro-carpamic acid glycoside, putative ($C_{20}H_{35}NO_8$)

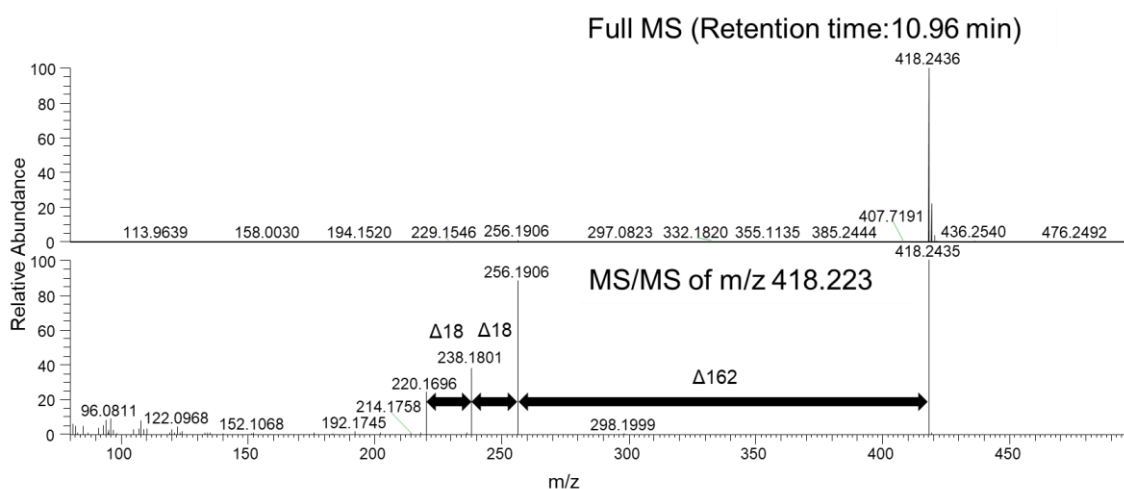


図 59 **7** の LC/MS 解析

上段 保持時間 10.96 分の Full MS; 下段 m/z 418.223 の MS/MS

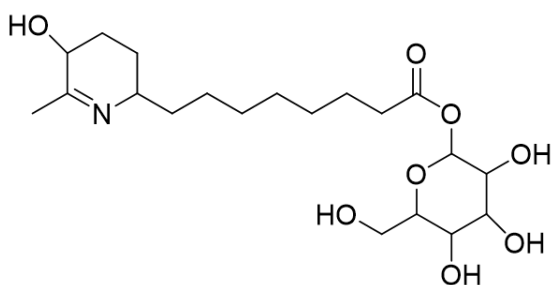


図 60 デヒドロカルパム酸配糖体 (dehydro-carpamic acid glycoside) の推定構造

配糖化および2重結合の位置は不確定

8 は、LC/MS 分析データのフルスキャン分析で、 m/z 272.186 $[M + H]^+$ として検出された (図 61) . **8** の分子式 ($C_{14}H_{25}NO_4$) は精密質量値から算出した. **8** の分子式 ($C_{14}H_{25}NO_4$) と **4** の分子式 ($C_{14}H_{25}NO_3$) の組成式の差分解析では、**8** は **4** よりも酸素原子 (O) が 1 個多いことから、**8** を水酸化デヒドロカルパム酸 (hydroxyl derivative of dehydro-carpamic acid) と推測した. また、**8** の MS/MS スペクトルデータは、 m/z 272.676 $[M + H]^+$ をプレカーサーイオンとして、 m/z 254.175 $[M + H - H_2O]^+$ および 236.165 $[M + H - H_2O - H_2O]^+$ のプロダクトイオンが得られた (図 61) . その MS/MS フラグメントイオン (m/z 254 および m/z 234) は、**4** のカルパインの MS/MS スペクトル中の特徴的なフラグメントイオン (m/z 240 および m/z 222) よりも 14 マスユニット多い値 (+O-2H と解釈可能) であった. さらに、**4** および **8** の LC 分析カラムにおける保持の順序は、**8** が **4** よりも先に溶出し、より親水性であることを示唆した. その理由は、水酸基の結合により、親水性の特性が増加することより、保持時間が短くなると考えられる. 従って、**8** は水酸化デヒドロカルパム酸 (hydroxyl derivative of dehydro-carpamic acid) とアノテーションされた. しかし、図 62 の **8** の構造は、あくまで一例を示したものである. なぜなら、付加する水酸基の位置を特定 (または推定) することができないためである.

8: Hydrolyzed derivative of dehydro-carpamic acid, putative (C₁₄H₂₅NO₄)

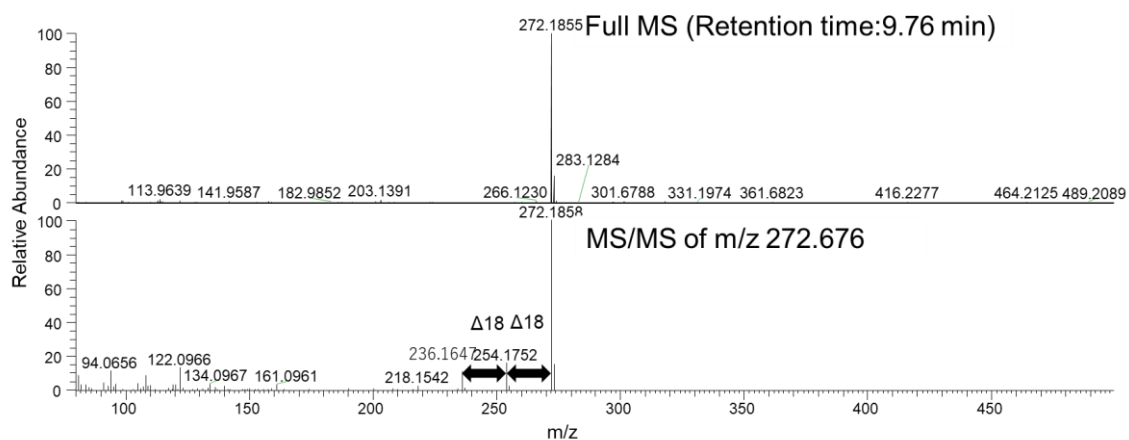


図 61 8 の LC/MS 解析

上段 保持時間 9.76 分の Full MS; 下段 m/z 272.676 の MS/MS

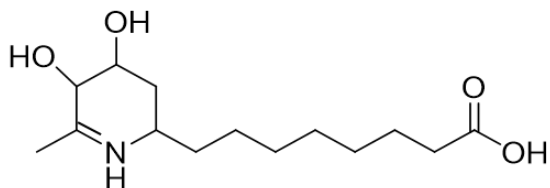


図 62 水酸化デヒドロカルパム酸 (hydroxyl derivative of dehydro-carpamic acid) の推定構造
水酸化および 2 重結合の位置は不確定

6 は, LC/MS 分析データのフルスキャン分析で, m/z 507.377 [M + H]⁺および多価イオン m/z 254.193 [M + 2H]²⁺として検出された (図 63) . 6 の分子式

(C₂₉H₅₀N₂O₅) は精密質量値から算出した. 既報の研究で, パパイヤの葉の抽出液に存在する水酸化メチル化カルパイン (hydrolyzed and methyl derivative of carpaine) の分子式 (C₂₉H₅₂N₂O₅) が報告されている (Julianti *et al.* 2014a) . この分子式 (C₂₉H₅₂N₂O₅) と 6 の分子式 (C₂₉H₅₀N₂O₅) の差分析で確認された水素原子 2 個の違いから, 6 は水酸化メチル化デヒドロカルパイン II

(hydrolyzed and methyl derivative of dehydrocarpaine II) と推測した. さらに, 6

の MS/MS スペクトルデータは次に述べる結果 (図 63) を示した. 1) m/z 507.377 $[M + H]^{2+}$ をプレカーサーイオンとして, m/z 252.196 [half molecular of carpaine + H + $CH_2 - H_2$]⁺ および m/z 220.170 [half molecular of carpaine + H - $H_2 - H_2O$]⁺ のプロダクトイオンが得られた. 2) m/z 254.175 $[M + 2H]^{2+}$ をプレカーサーイオンとして, m/z 238.180 [half molecular of carpaine + H - H_2]⁺ および m/z 220.170 [half molecular of carpaine + H - $H_2 - H_2O$]⁺ のプロダクトイオンが得られた. その MS/MS フラグメントイオンは, **1** のカルパインの MS/MS フラグメントイオンで特徴的なフラグメントイオン (m/z 240 および m/z 222) より水素原子が 2 個少ない (m/z 238 および m/z 220) であった. 従って, **6** は水酸化メチル化デヒドロカルパイン II (hydrolyzed and methyl derivative of dehydrocarpaine II) (図 64) とアノテーションされた.

6: Hydrolyzed methylated derivative of dehydrocarpaine II, putative (C₂₉H₅₀N₂O₅)

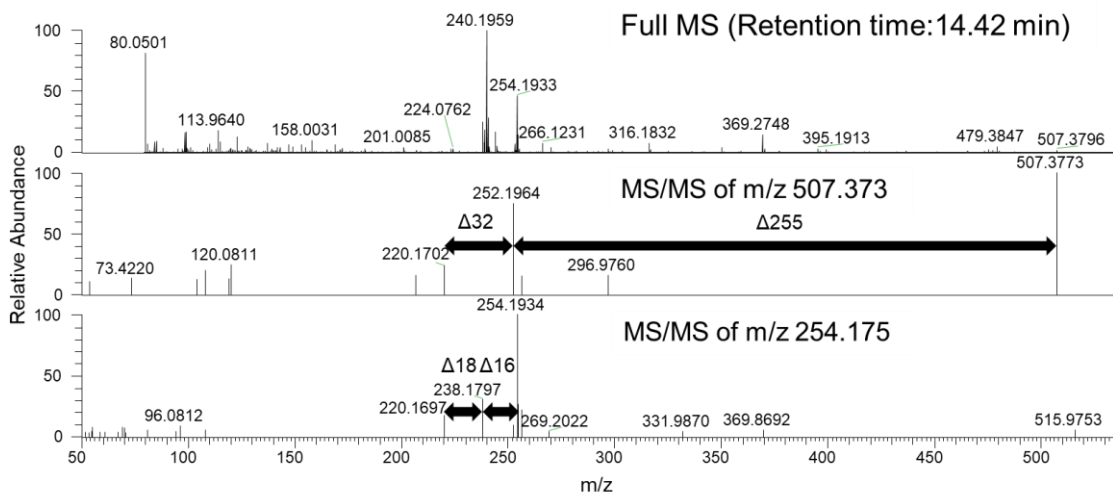


図 63 **6** の LC/MS 解析

上段 保持時間 14.42 分の Full MS; 下段 m/z 254.175 の MS/MS

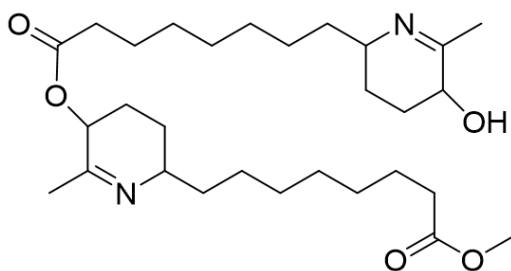


図 64 水酸化メチル化デヒドロカルpain II (hydrolyzed methylated derivative of dehydrocarpaine II)の推定構造

水酸化およびメチル化の位置は不確定

1 から 10 に関して, Compound Discoverer 3.0 ソフトウェアを用いて, MS/MS フラグメントの相同性検索を行った結果, 1 から 8 は類似の MS/MS フラグメントデータが存在していなかった. それに対して 9 および 10 は, それぞれ, グルタチオン (glutathione) (図 65) およびグリシルシステイン (glycyl-cysteine) (図 66) と同じ MS/MS フラグメントパターンを示した.

9: Glutathione, putative (C₁₀H₁₇N₃O₆S)

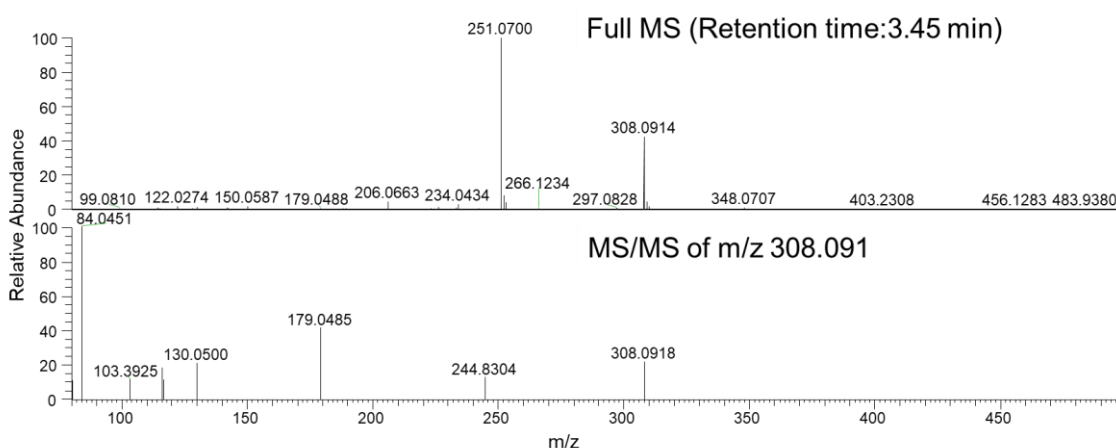


図 65 9 の LC/MS 解析

上段 保持時間 3.45 分の Full MS; 下段 m/z 308.091 の MS/MS

10: Glycyl-cysteine, putative (C₅H₁₀N₂O₃S)

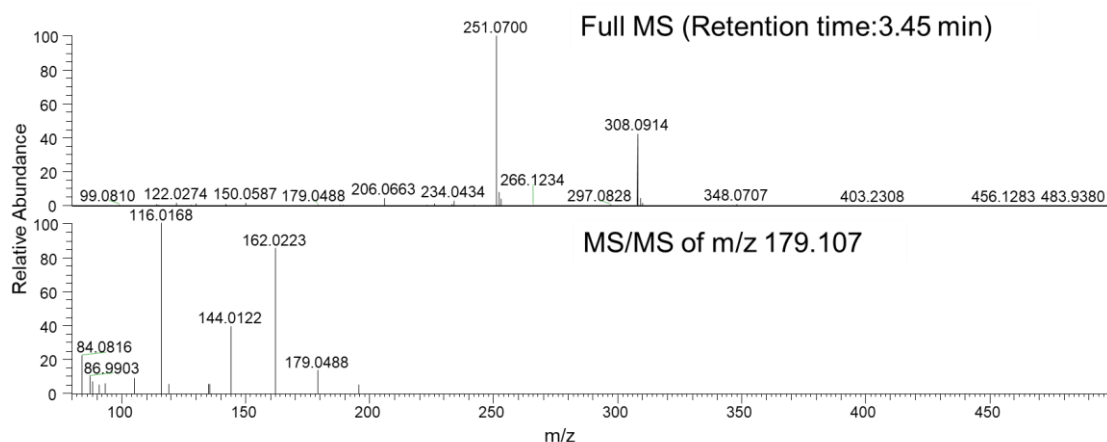


図 66 10 の LC/MS 解析

上段 保持時間 3.45 分の Full MS; 下段 m/z 179.107 の MS/MS

さらに、カルパインおよびその誘導体に関して、MassBank (<http://www.massbank.jp/>) (Horai *et al.* 2010), GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) (<https://gnps.ucsd.edu/>) (Wang *et al.* 2016) および METLIN (<https://metlin.scripps.edu/>) (Guijas *et al.* 2018) などのいくつかの MS/MS フラグメントデータベースによる検索を行った。その結果、該当する化合物の登録は無かった。1 から 8 の構造を確認するには、分離・精製などのさらなる研究が必要である。

本研究の成果であるカルパイン誘導体または関連化合物に関するこれらの候補のフルマススペクトルデータおよび MS/MS フラグメント情報は、今後のパイアの成分研究および他の植物の LC/MS メタボロームデータ解析に役立つ可能性がある。

4.3.4 カルパイン誘導体の推定代謝ネットワーク

本研究で、表 10 でまとめた推測したカルパインおよびその誘導体 (1 から 8) のリストに関して、お互いの代謝経路の関係性を理解するために、分子式の差分解析の結果に基づいて、カルパイン誘導体に対する推定代謝ネットワークを構築した (図 67) . 図 67 では、これらの化合物の推定構造も示し、各化合物の未熟および完熟での含有量比率を円グラフで示した. 3 つの既知の代謝産物候補 (カルパイン, デヒドロカルパイン I および II) は、2 つの水素の違いに関連しており、関連酵素は未だ単離報告されていないが、生合成経路における脱水素化反応を示唆することができる. また、カルパム酸は、パパイヤにおける既知の代謝産物 (Julianti *et al.* 2014a) であるが、生合成経路は不明である. 化合物のアノテーションに関して、デヒドロカルパム酸 (4) および水酸化メチル化デヒドロカルパイン II (hydrolyzed methylated derivative of dehydrocarpaine II, 6) の 2 つのカルパイン誘導体の候補化合物を、デヒドロカルパインとカルパム酸の間の可能性のある中間代謝産物として配置した. さらに、カルパム酸の 2 つの誘導体、すなわちデヒドロカルパム酸配糖体 (7) と水酸化デヒドロカルパム酸 (8) が予測された. これらは、酵素反応または化学反応によってカルパインまたはデヒドロカルパインから分解および修飾される可能性がある. 興味深いことに、1-3 および 6 は未熟果皮に多く蓄積し、4, 5, 7, および 8 は完熟果皮に多く蓄積していた (図 67 の円グラフを参照) . 果実の登熟過程において、果皮の部分で、推定されたカルパイン誘導体は減少し、推定されたカルパム酸誘導体は増加した. これらの結果は、果実の登熟過程中的カルパインの分解経路の存在、または完熟果皮でのカルパム酸か

らのカルパインの生合成の抑制効果を示唆している。今後、これらの仮説を解明するためには、さらに酵素学的・分子生物学的研究が必要である。

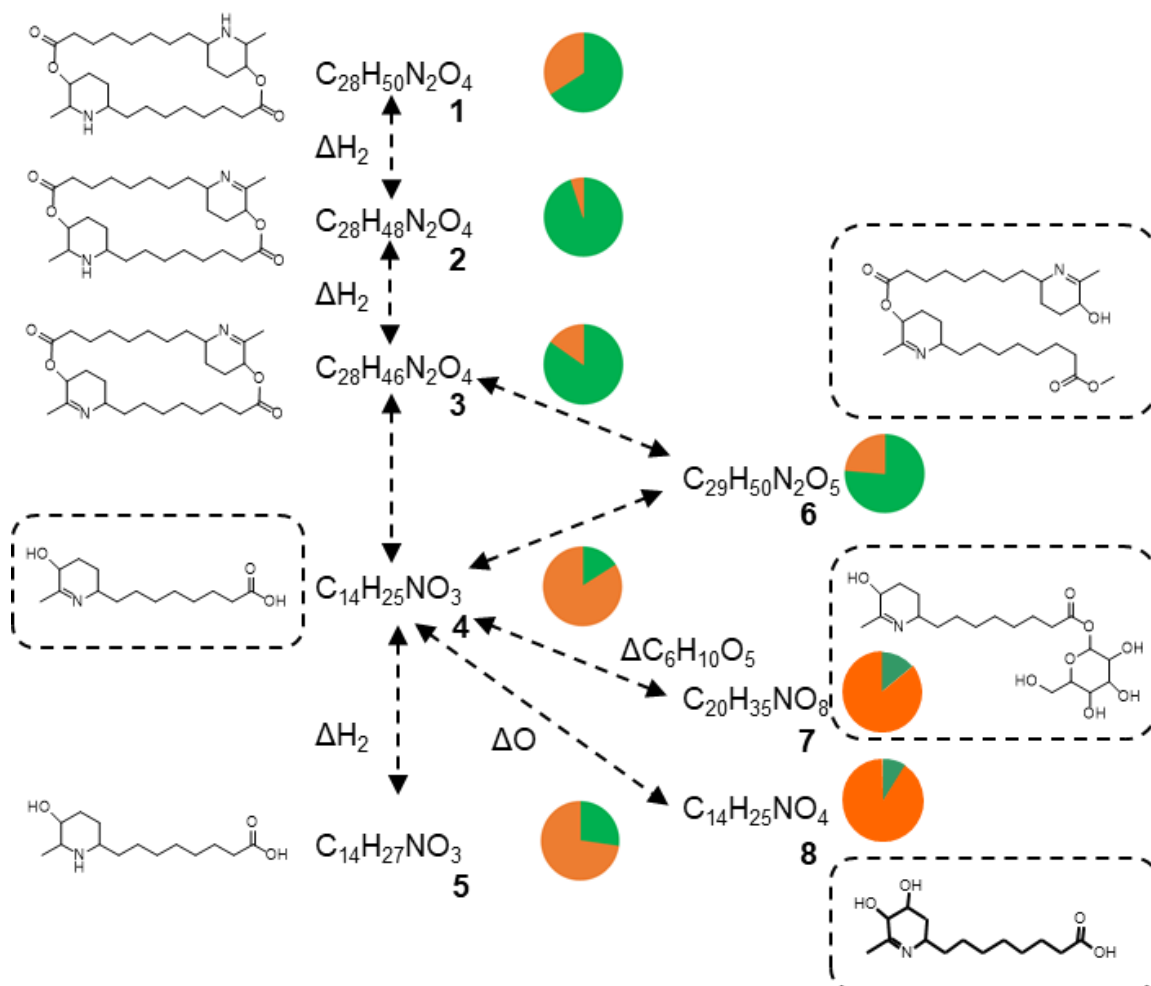


図 67 パパイヤ果実の未熟（緑色）および完熟（オレンジ色）の果皮における特異的な代謝産物であるカルパイン誘導体に対する推定代謝ネットワーク

点線の二重矢印は、反応経路の可能性を示す。円グラフは各化合物の含有量比率を示す。化合物の番号は、表 10 に対応している。カルパイン誘導体候補の推定構造は、化合物の番号に隣接して示した。報告されていない新規の代謝産物の構造は、点線の丸い四角形で囲んでいる。以下の番号は、各化合物を示す。carpaine (1), dehydrocarpaine I (2), dehydrocarpaine II (3), dehydro-carpamic acid (4), carpamic acid (5), hydrolyzed methylated derivative of dehydrocarpaine II (6), dehydro-carpamic acid glycoside (7), hydroxyl derivative of dehydro-carpamic acid (8)

4.3.5 乾燥処理のパパイヤの機能性の評価

果物や野菜の乾燥粉末は、素材の貯蔵や輸送の容易さおよび貯蔵保管期間の延長などの利点がある (Karam *et al.* 2016) . 従って、パパイヤ果実の乾燥処理粉末において、機能性成分の評価を行った。今回、機能性成分の測定には、ベンジルグルコシノレート (BG) 含有量、総ポリフェノール含量およびタンパク質分解酵素活性の3種類を測定した。なお、BG (図 45) は、アブラナ科植物のマカ (*Lepidium meyenii*) (Li *et al.* 2015) に含まれる機能性代謝産物で、パパイヤ (葉, 果実および種子) においても報告されている (Li *et al.* 2012; Nakamura *et al.* 2007; Rossetto *et al.* 2008; Williams *et al.* 2013) .

本研究では、乾燥粉末処理した果実での BG 含有量は、 88.67 ± 19.14 mg/100 g Dry Weight (DW) (n=3) であった。また、果皮同様、廃棄されるパパイヤの茎および根においても BG 含有量を測定した。その BG 含有量は、市販のマカ抽出物の BG 含有量と同等であった (表 11) .

表 11 パパイヤの茎と根のベンジルグルコシノレート (BG) 含有量

Sample	Benzy glucosinolate (g/100 DW)
stem	1.95 ± 0.02
root	4.81 ± 0.10
Maca	3.92 ± 0.06

数値は3つの技術的な反復の実験値の平均±標準偏差を示す。DWはDry Weight (乾燥重量)を示す。

次に、乾燥粉末処理した果実の総ポリフェノール含有量は、 476.67 ± 47.26 mg/100 g DW (n=3) であった。総ポリフェノール含有量は、一般に抗酸化活性と相関関係にあり、食品に期待される重要な機能である。本研究結果は、パパイヤ果実が加工食品として種々の機能的利用価値を有することを示唆している

．さらに，本研究では 100 種類以上のフェノール性化合物の候補が，新鮮なパパイヤ果実に存在することが示唆された（表 9）．新しい抗酸化化学物質を探索し，フェノール性化合物とそれらの機能性（抗酸化活性など）の関係を調べるために，メタボローム解析技術は重要であると考えられる．このことは，本メタボローム解析技術の有用性を示している．

乾燥粉末処理した果実におけるタンパク質分解酵素活性は，乾燥および粉碎処理工程があったにもかかわらず検出され，その値は 8922 ± 1525 U/g DW

($n=3$) であった．新鮮な未熟パパイヤおよび完熟パパイヤの果実の果皮と果肉におけるタンパク質分解酵素活性を比較した結果，果皮が未熟果実と完熟果実の両方において，果肉よりも高い酵素活性を有することを明らかにした（表 12）．そして，完熟果皮は未熟果皮よりも 10 倍以上高いタンパク質分解酵素活性を示した（表 12）．

表 12 未熟および完熟パパイヤ抽出液におけるタンパク質分解酵素活性

Sample	Activity (U/g FW)
Unripe peel	8.9 ± 3.2
Unripe pulp	2.5 ± 0.8
Ripe peel	168.9 ± 60.8
Ripe pulp	20.5 ± 1.9

数値は 3 つの独立した生物学的な反復実験に基づく値の平均 \pm 標準偏差を示す．FW は Fresh Weight（新鮮重量）を示す．

乾燥粉末処理した果実におけるこれらの結果から，加熱および粉末処理後も BG 含有量，総ポリフェノール含有量およびタンパク質分解酵素活性が検出可能であり，機能性が保持されていることを示唆した．また，予備的な実験結果であるが，今まで主に廃棄されて十分に活用されていない部分（茎，根，未熟果皮および完熟果皮）にも，このような機能性を有することが明らかとなった

．つまり，これらの部位は十分に利用価値があると考えられる．今後，異なる乾燥および粉碎法を用いた各部分（果実および他の組織）の乾燥粉末の機能成分およびタンパク質分解酵素活性の詳細な評価を行うことが必要であるが，そうした研究を進めることで，パパイヤの乾燥粉末を機能性材料の供給源として利用促進することが可能となると考えられる．

4.4 考察

本研究は、カルパインの代謝経路を予測した初めての研究報告である。LC-OrbitrapTM-MS を用いたメタボローム解析により、PCA および Volcano plot 解析から選抜された特徴的な 10 個の成分中、8 種類のカルパインの関連成分として、その構造が推定された。今回、パパイヤにおける 8 種類のカルパイン誘導体では、カルパイン以外の標準物質が購入不可能であったことから、標準物質を用いた代謝産物の同定は行わずに、文献情報、分子式および化合物データベース、実分析データベース（マスマスペクトルデータベース、食品メタボロームレポジトリなど）、解析ソフトウェアによる MS/MS フラグメントイオンパターン予測や組成式差分解析を駆使して、可能な限りアノテーションの精度を高めて、代謝経路の中間産物を予測した。構造予測情報と分子式を基にした推定代謝ネットワークを構築することで、これまで全く情報のなかったカルパインの生合成経路の仮説構築が可能となった。推定代謝ネットワークで隣り合う化合物は、生体内で必ずしも 1 つの酵素反応で結ばれるとは限らないが、ネットワーク上で近くにある化合物どうしが、既存の様々な酵素反応（脱水素、水酸化、糖付加など）の組み合わせで結ばれている可能性はある。このように、推定代謝ネットワークを用いて代謝経路の予測精度を高めることで、遺伝子単離のための仮説構築が可能となった。反応中間体の構造決定も必要ではあるが、今回得られた結果をもとに、カルパインの生合成経路の研究の進展が期待できる。また、これらの分析および解析手法は、他の植物のメタボローム解析にも適用・活用が可能であると考えられる。

化合物の同定を行うためには、代謝産物の標準物質を用いたメタボローム解析が重要であるが、常に代謝産物の標準物質が入手できるとは限らない。利用

可能な多くの二次代謝産物は、世界各国の研究室で所有されている場合が多く、商用化されて試薬として購入できる二次代謝産物は天然に存在する全有機化合物の一部でしかない。個別に有機合成を行うことも可能ではあるが、ノンターゲットメタボローム解析結果として提示される、多数の可能性のある推定構造の全てを安価に合成することは困難な現状である。メタボローム解析技術におけるこの問題を解決するためには、大規模な植物のメタボローム解析データの登録された、アノテーション情報を含む実測値ベースのデータベースの拡充が役立つと考えられる。特に、構造特性を表す MS/MS フラグメント情報の公的データベースにおける拡充が重要である。

本研究では、未利用部分として廃棄されているパパイアの果皮、根および茎の有効利用の可能性を示すことができた。LC-OrbitrapTM-MS を用いたメタボローム解析により、心血管効果を有するアルカロイドとして知られるカルパインの誘導体が未熟果実の果皮に多く存在している可能性を示した。このことから、未利用部分として廃棄されている青パパイアの果皮の有効利用の可能性が示された。さらに、未熟果実の加熱および粉末処理後に、機能性成分である BG 含量、総ポリフェノール含量およびタンパク質分解酵素活性が分解消失せず、残っていた。また、パパイアの栽培にて廃棄される茎や根においても、BG 含量を確認し、今後の利用価値に重要なデータを示した。パパイアにマカ成分と同じ機能性成分として BG が存在していたこと自体は驚くべき成果でない。なぜなら、前述 (1. 5) の図 12 で示した植物の系統分類では、パパイア科とアブラナ科は同じアブラナ目に属しているため、アブラナ科植物であるマカの成分が同じ目に属するパパイアにも含まれたことが確認できたからである。しかしながら、廃棄されてきたパパイアの茎および根には、マカ植物と同等およびそれ以上の BG が含まれることを示した結果は産業利用上重要であり、

興味深い。本研究の機能性の結果とメタボローム解析結果から、パパイヤ植物の全体が機能性食品として利用可能になる可能性を秘めていることが判明した。今後、パパイヤの廃棄される部分、すなわち、十分に活用されていない部分に関する機能性のさらなる調査は、食品および製薬業界における機能性材料の供給源としての利用価値を高める可能性を秘めている。

総括

本研究では、植物二次代謝産物を網羅的に研究可能な液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) を用いて、モデル植物 (ヒメツリガネゴケおよびミヤコグサ) および実用植物 (パパイヤ) でメタボローム解析を行った。LC-MS は従来、植物成分のターゲット分析に用いられてきたが、それとは全く異なる視点から LC-MS を活用した結果、本博士論文では植物由来の機能性二次代謝産物の代謝経路の探索の成果を 3 例報告することができた。

第 2 部では、モデルコケ植物ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) の網羅的なフラボノイドプロファイリング解析の報告例がなかったことから、高精度・高分解能の LC-Orbitrap™-MS を用いたメタボローム解析を行った。その結果、13 種類のフラボノイド誘導体の存在が示唆され、その多くはフラボノイド二量体と推測された。更に、標準品分析および安定同位体 (¹⁸O) 標識検体と非標識検体の比較 (同位体による質量シフト) から、*P. patens* で初めてルテオリンの同定に成功した。そして、ゲノム配列の再解析により、FNS I の相同遺伝子の存在を確認し、フラボン生合成経路を予測した。本研究成果は、LC/MS メタボローム解析によって、ゲノム解析からのアプローチでは発見することができなかった機能性二次代謝産物の代謝経路推定を実現したものである。

第 3 部では、モデルマメ科植物ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) の LC/MS メタボローム解析結果から得られた黄色の花弁に特異的に蓄積しているゴシペチン (ケルセチンの 8 位水酸化体) の 3 位配糖体に関与するゴシペチン合成酵素 (フラボノイド 8 位ヒドロキシラーゼ, F8H) 遺伝子の存在を推測し、遺伝子

の単離と機能解析を行った。その結果、ゴシペチン生合成活性を有する LjF8H 遺伝子の単離に成功し、酵母や植物の異種発現系でも機能することが明らかとなった。機能解析により、基質特異性が低く、多くの種類のフラボノイドを基質とする酵素活性を示した。特に、フラボノイドの C 環の 2 位と 3 位で C-C 結合が飽和した化合物であるフラバノンとフラバノールを基質とした場合に、酵素反応の副産物として 6 位の水酸化体も産生した。さらに、ナリングニン（フラバノン）の 2*S*-異性体のみを受け入れ、基質の立体構造状態が反応生成物の特異性に影響を与える可能性を示唆した。分子系統学的解析から、LjF8H は既知の植物由来フラビンモノオキシゲナーゼ (FMO) 群とは異なる系統に属することが明らかとなった。本研究は、ゴシペチン生合成経路に関与する F8H 遺伝子を最初に同定した成果であり、LC/MS メタボローム解析と遺伝子発現情報を組み合わせることで、二次代謝産物の生合成経路の予測から遺伝子単離を可能にした実例である。

第 4 部では、農作物のパパイヤ (*Carica papaya* L.) の果実のノンターゲット解析によるメタボローム解析の報告例がないことから、LC-OrbitrapTM-MS を用いたメタボローム解析を行った。PCA および Volcano plot 解析から、選抜された特徴的な 10 個の成分中、8 種類の成分がカルパインの誘導体と推定された。分子式をもとに、8 種類のカルパイン関連成分の推定代謝ネットワークを予測して解析したところ、登熟過程の果皮においてカルパイン誘導体が減少し、カルパム酸（カルパイン誘導体の前駆体）が増加したことが明らかとなった。このことは、果実の熟成中にカルパインの分解が促進している、または完熟果皮でカルパインの合成が抑制されていることを示唆している。本研究は、LC/MS メタボローム解析によって、新規の中間産物の検出も含めて、未解明のカルパ

イン代謝経路を予測することに成功した初めての例である。また、青パパイヤ果実を乾燥粉末に加工しても、機能性成分であるベンジルグルコシノレート (BG) , 総ポリフェノールおよび乳液成分のパパインを含むタンパク質分解酵素活性が残存することを示した。加えて、パパイヤの茎および根には、マカ植物と同等およびそれ以上の BG が含まれることを明らかにし、パパイヤの未利用部位を機能性成分の原材料として利用可能なことを示唆した。

以上、本研究では、天然有機化合物の探索および生合成経路の研究における基盤技術として LC/MS メタボローム解析技術を用いることで、植物由来の二次代謝産物としての新規成分（既知成分も含め）の発見、代謝経路の推測および関連代謝酵素遺伝子の単離を行う研究の道筋を実証できた。今後、地球上の未利用植物資源等にも注目し、本研究で実施したメタボローム解析技術を用いることで、植物成分の全容解明のための大規模な成分情報の収集、新規の機能性成分の発見およびその成分の代謝経路の解明が可能になると考えられる。

謝辞

本研究課題を遂行するにあたり、終始御指導、ご鞭撻を賜りました公益財団法人かずさDNA研究所 ゲノム事業推進部生体分子解析グループ 鈴木秀幸グループ長（現、平田機工株式会社 研究開発本部 上席研究員）に謹んで御礼申し上げます。

本研究課題を実施する際、植物オミックス研究、特にメタボローム解析技術を取得するために、当時、かずさDNA研究所に在籍していた鈴木秀幸薬学博士と出会い、かずさDNA研究所の研究ネットワークを通じて、多くの植物研究者と知り合うことが出来ました。メタボローム解析技術を取得の上で、かずさDNA研究所の鈴木秀幸の主催する研究グループのスタッフの皆様（研究員、技術員、実験補助員、事務補助員）に心よりお礼申し上げます。また、本研究課題に携わった多くの研究者を中心とする関係者各位にお礼申し上げます。

特に、本研究課題を通して、熱意ある親身な多くの貴重なご助言、ご協力をいただきました東京農業大学 解良康太助教、京都大学生存圏研究所 荒武特任准教授、工学院大学先進工学部 杉山健二郎講師に心よりお礼申し上げます。

ヒメツリガネゴケ研究課題において、多くの貴重な解析データ、ご助言、ご協力をいただきました Thermo Fisher Scientific 株式会社 永島良樹ケミスト、

常磐植物化学研究所 嶋田典基課長，国立遺伝学研究所 櫻井望特任准教授に深く感謝いたします。

ミヤコグサ研究課題において，多くの貴重な解析データ，ご助言，ご協力をいただきました常磐植物化学研究所 嶋田典基課長，Thermo Fisher Scientific 株式会社 永島良樹ケミスト，大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 金森千奈大学院生，青木考教授，太田大策教授，サントリー株式会社植物科学研究所 石黒加奈子研究員，田中良和研究所長，日本大学生物資源科学部 佐藤優花大学生，明石智義准教授，東北大学，生命科学研究科 佐藤修正教授，（公財）かずさDNA研究所 須田邦裕技術員，平川英樹施設長，柴田大輔特別客員研究員に深く感謝いたします。

パパイヤ研究課題において，多くの貴重な解析データ，ご助言，ご協力をいただきました（公財）かずさDNA研究所 ゲノム事業推進部 生体分子解析グループ 秋元奈弓特任研究員，佐藤大特任研究員，新保さやか技術専門員，小澤馨史技術専門員，工学院大学先進工学部 佐藤菜央大学院生，Thermo Fisher Scientific 株式会社 永島良樹ケミストに深く感謝いたします。

日頃より，様々な形でご協力，ご支援をいただきました，平田機工株式会社 研究開発本部の皆様ならびに友人，家族へ心より感謝申し上げます。

最後に，今回，日本大学大学院薬学研究科学位論文審査に関し，書類申請など，多くの貴重なご助言，ご協力をいただきました日本大学薬学部 生薬学研究室 松崎桂一教授に心より感謝申し上げます。

参照文献

Afendi, F.M., Okada, T., Yamazaki, M., Hirai-Morita, A., Nakamura, Y., Nakamura, K., Ikeda, S., Takahashi, H., Altaf-Ul-Amin, M., Darusman, L.K., Saito, K. and Kanaya, S. (2012) KNApSAcK family databases: integrated metabolite-plant species databases for multifaceted plant research. *Plant and Cell Physiology* **53**: e1.

Anzellotti, D. and Ibrahim, R.K. (2000) Novel flavonol 2-oxoglutarate dependent dioxygenase: affinity purification, characterization, and kinetic properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **382**: 161-172.

Anzellotti, D. and Ibrahim, R.K. (2004) Molecular characterization and functional expression of flavonol 6-hydroxylase. *BMC Plant Biology* **4**: 20.

Ara, T., Enomoto, M., Arita, M., Ikeda, C., Kera, K., Yamada, M., Nishioka, T., Ikeda, T., Nihei, Y., Shibata, D., Kanaya, S. and Sakurai, N. (2015) Metabolonote: a wiki-based database for managing hierarchical metadata of metabolome analyses. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **3**: 38.

Ara, T., Sakurai, N., Suzuki, H., Aoki, K., Saito, K. and Shibata, D. (2021) MassBase: A large-scaled depository of mass spectrometry datasets for metabolome analysis. *Plant Biotechnology* **38**: 167-171.

Arabidopsis Genome, I. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815.

Aravind, G.D., Bhowmik, Duraivel, S. Harish, G. (2013) Traditional and Medicinal Uses of *Carica papaya*. *Journal of Medicinal Plants Studies* **1**: 07-15.

Asamizu, E., Kato, T., Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T. and Tabata, S. (2003) Structural analysis of a *Lotus japonicus* genome. IV. Sequence features and mapping of seventy-three TAC clones which cover the 7.5 mb regions of the genome. *DNA Research* **10**: 115-122.

Asamizu, E., Nakamura, Y., Sato, S. and Tabata, S. (2004) Characteristics of the *Lotus japonicus* gene repertoire deduced from large-scale expressed sequence tag (EST) analysis. *Plant Molecular Biology* **54**: 405-414.

Ayabe, S. and Akashi, T. (2006) Cytochrome P450s in flavonoid metabolism. *Phytochemistry Reviews* **5**: 271-282.

Bennett, R.N., Mellon, F.A., Rosa, E.A.S., Perkins, L. and Kroon, P.A. (2004) Profiling Glucosinolates, Flavonoids, Alkaloids, and Other Secondary Metabolites in Tissues of *Azima tetracantha* L. (Salvadoraceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 5856-5862.

Bennini, B., Chulia, A.J., Kaouadji, M. and Delage, C. (1993) (2R,3R)-Dihydroflavonol aglycone and glycosides from *Erica cinerea*. *Phytochemistry* **33**: 1233-1236.

Berim, A. and Gang, D.R. (2013) The roles of a flavone-6-hydroxylase and 7-O-demethylation in the flavone biosynthetic network of sweet basil. *Journal of Biological*

Chemistry **288**: 1795-1805.

Berim, A., Park, J.J. and Gang, D.R. (2014) Unexpected roles for ancient proteins: flavone 8-hydroxylase in sweet basil trichomes is a Rieske-type, PAO-family oxygenase. *The Plant Journal* **80**: 385-395.

Bowman, J.L., Kohchi, T., Yamato, K.T., Jenkins, J., Shu, S., Ishizaki, K., Yamaoka, S., Nishihama, R., Nakamura, Y., Berger, F., Adam, C., Aki, S.S., Althoff, F., Araki, T., Arteaga-Vazquez, M.A., Balasubramanian, S., Barry, K., Bauer, D., Boehm, C.R., Briginshaw, L., Caballero-Perez, J., Catarino, B., Chen, F., Chiyoda, S., Chovatia, M., Davies, K.M., Delmans, M., Demura, T., Dierschke, T., Dolan, L., Dorantes-Acosta, A.E., Eklund, D.M., Florent, S.N., Flores-Sandoval, E., Fujiyama, A., Fukuzawa, H., Galik, B., Grimanelli, D., Grimwood, J., Grossniklaus, U., Hamada, T., Haseloff, J., Hetherington, A.J., Higo, A., Hirakawa, Y., Hundley, H.N., Ikeda, Y., Inoue, K., Inoue, S.I., Ishida, S., Jia, Q., Kakita, M., Kanazawa, T., Kawai, Y., Kawashima, T., Kennedy, M., Kinose, K., Kinoshita, T., Kohara, Y., Koide, E., Komatsu, K., Kopischke, S., Kubo, M., Kyoizuka, J., Lagercrantz, U., Lin, S.S., Lindquist, E., Lipzen, A.M., Lu, C.W., De Luna, E., Martienssen, R.A., Minamino, N., Mizutani, M., Mizutani, M., Mochizuki, N., Monte, I., Mosher, R., Nagasaki, H., Nakagami, H., Naramoto, S., Nishitani, K., Ohtani, M., Okamoto, T., Okumura, M., Phillips, J., Pollak, B., Reinders, A., Rovekamp, M., Sano, R., Sawa, S., Schmid, M.W., Shirakawa, M., Solano, R., Spunde, A., Suetsugu, N., Sugano, S., Sugiyama, A., Sun, R., Suzuki, Y., Takenaka, M., Takezawa, D., Tomogane, H., Tsuzuki, M., Ueda, T., Umeda, M., Ward, J.M., Watanabe, Y., Yazaki, K., Yokoyama, R., Yoshitake, Y., Yotsui, I., Zachgo, S. and Schmutz, J. (2017) Insights into Land Plant Evolution Garnered from the *Marchantia polymorpha* Genome. *Cell* **171**: 287-304 e215.

Brinkmeier, E., Geiger, H. and Zinsmeister Hans, D. (1998) Flavone-7-O-sophorotriosides and Biflavonoids from the Moss *Leptostomum macrocarpon* (Leptostomataceae)*. In *Zeitschrift für Naturforschung C* p. 1.

Buchanan, B.B., Gruissem, W. and Jones, R.L. (2015) *Biochemistry & molecular biology of plants*, 2nd Edition. p. 1264 p. John Wiley & Sons.

Buyel, J.F. (2018) Plant Molecular Farming - Integration and Exploitation of Side Streams to Achieve Sustainable Biomanufacturing. *Frontiers in Plant Science* **9**: 1893.

Chaiwut, P., Nitsawang, S., Shank, L. and Kanasawud, P. (2007) A Comparative Study on Properties and Proteolytic Components of Papaya Peel and Latex Proteases. *Chiang Mai Journal of Science* **34**: 109-118.

Chaiwut, P., Rawdkuen, S. and Benjakul, S. (2010) Extraction of protease from *Calotropis procera* latex by polyethylene glycol–salts biphasic system. *Process Biochemistry* **45**: 1148-1155.

Chambers, M.C., Maclean, B., Burke, R., Amodei, D., Ruderman, D.L., Neumann, S., Gatto, L., Fischer, B., Pratt, B., Egertson, J., Hoff, K., Kessner, D., Tasman, N., Shulman, N., Frewen, B., Baker, T.A., Brusniak, M.Y., Paulse, C., Creasy, D., Flashner, L., Kani, K., Moulding, C., Seymour, S.L., Nuwaysir, L.M., Lefebvre, B., Kuhlmann, F., Roark, J., Rainer, P., Detlev, S., Hemenway, T., Huhmer, A., Langridge, J., Connolly, B., Chadick, T., Holly, K., Eckels, J., Deutsch, E.W., Moritz, R.L., Katz, J.E., Agus, D.B., MacCoss, M., Tabb, D.L. and Mallick, P. (2012) A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nature Biotechnology* **30**: 918-920.

Chen, C., Wei, K., Wang, L., Ruan, L., Li, H., Zhou, X., Lin, Z., Shan, R. and Cheng, H. (2017) Expression of Key Structural Genes of the Phenylpropanoid Pathway Associated with Catechin Epimerization in Tea Cultivars. *Frontiers in Plant Science* **8**: 702.

Chen, V., Staub, R.E., Baggett, S., Chimmani, R., Tagliaferri, M., Cohen, I. and Shtivelman, E. (2012) Identification and analysis of the active phytochemicals from the anti-cancer botanical extract Bezielle. *PloS One* **7**: e30107.

Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**: 735-743.

Cui, X. and Churchill, G.A. (2003) Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. *Genome Biology* **4**: 210.

Der Agopian, R.G., Fabi, J.P. and Cordenunsi-Lysenko, B.R. (2020) Metabolome and proteome of ethylene-treated papayas reveal different pathways to volatile compounds biosynthesis. *Food Research International* **131**: 108975.

Dixon, R.A. and Strack, D. (2003) Phytochemistry meets genome analysis, and beyond. *Phytochemistry* **62**: 815-816.

Dudek, B., Warskulat, A.C. and Schneider, B. (2016) The Occurrence of Flavonoids and Related Compounds in Flower Sections of *Papaver nudicaule*. *Plants (Basel)* **5**.

Eppink, M.H., Schreuder, H.A. and Van Berkel, W.J. (1997) Identification of a novel conserved sequence motif in flavoprotein hydroxylases with a putative dual function in FAD/NAD(P)H binding. *Protein Science* **6**: 2454-2458.

Esti, M., Benucci, I., Lombardelli, C., Liburdi, K. and Garzillo, A.M.V. (2013) Papain from papaya (*Carica papaya* L.) fruit and latex: Preliminary characterization in alcoholic–acidic buffer for wine application. *Food and Bioproducts Processing* **91**: 595-598.

Fahy, E., Sud, M., Cotter, D. and Subramaniam, S. (2007) LIPID MAPS online tools for lipid research. *Nucleic Acids Research* **35**: W606-612.

Folin, O. and Ciocalteu, V. (1927) On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry* **73**: 627-650.

Foyer, C.H., Lescure, J.C., Lefebvre, C., Morot-Gaudry, J.F., Vincentz, M. and Vaucheret, H. (1994) Adaptations of Photosynthetic Electron Transport, Carbon Assimilation, and Carbon Partitioning in Transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* Plants to Changes in Nitrate Reductase Activity. *Plant Physiology* **104**: 171-178.

Fraaije, M.W., Kamerbeek, N.M., van Berkel, W.J. and Janssen, D.B. (2002) Identification of a Baeyer-Villiger monooxygenase sequence motif. *FEBS Letters* **518**: 43-47.

Ganneru, S., Shaik, H., Peddi, K. and Mudiam, M.K.R. (2020) Understanding the metabolic perturbations in *Carica papaya* Linn. due to different ripening practices/agents

using gas chromatography-mass spectrometry based metabolomics. *Analytical Science Advances*.

Garcia-Calderon, M., Perez-Delgado, C.M., Palove-Balang, P., Betti, M. and Marquez, A.J. (2020) Flavonoids and Isoflavonoids Biosynthesis in the Model Legume *Lotus japonicus*; Connections to Nitrogen Metabolism and Photorespiration. *Plants (Basel)* **9**.

Gayosso-García Sancho, L.E., Yahia, E.M. and González-Aguilar, G.A. (2011) Identification and quantification of phenols, carotenoids, and vitamin C from papaya (*Carica papaya* L., cv. Maradol) fruit determined by HPLC-DAD-MS/MS-ESI. *Food Research International* **44**: 1284-1291.

Geissman, T.A. and Steelink, C. (1957) Flavonoid Petal Constituents of *Chrysanthemum segetum* L. *The Journal of Organic Chemistry* **22**: 946-948.

Gogna, N., Hamid, N. and Dorai, K. (2015) Metabolomic profiling of the phytomedicinal constituents of *Carica papaya* L. leaves and seeds by ¹H NMR spectroscopy and multivariate statistical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **115**: 74-85.

Guijas, C., Montenegro-Burke, J.R., Domingo-Almenara, X., Palermo, A., Warth, B., Hermann, G., Koellensperger, G., Huan, T., Uritboonthai, W., Aisporna, A.E., Wolan, D.W., Spilker, M.E., Benton, H.P. and Siuzdak, G. (2018) METLIN: A Technology Platform for Identifying Knowns and Unknowns. *Analytical Chemistry* **90**: 3156-3164.

Halbwirth, H., Forkmann, G. and Stich, K. (2004) The A-ring specific hydroxylation of flavonols in position 6 in *Tagetes* sp. is catalyzed by a cytochrome P450 dependent monooxygenase. *Plant Science* **167**: 129-135.

Halbwirth, H. and Stich, K. (2006) An NADPH and FAD dependent enzyme catalyzes hydroxylation of flavonoids in position 8. *Phytochemistry* **67**: 1080-1087.

Han, X.J., Wu, Y.F., Gao, S., Yu, H.N., Xu, R.X., Lou, H.X. and Cheng, A.X. (2014) Functional characterization of a *Plagiochasma appendiculatum* flavone synthase I showing flavanone 2-hydroxylase activity. *FEBS Letters* **588**: 2307-2314.

Hansen, B.G., Kliebenstein, D.J. and Halkier, B.A. (2007) Identification of a flavin-monooxygenase as the S-oxygenating enzyme in aliphatic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **50**: 902-910.

Harborne, J.B. (1969) Gossypetin and herbacetin as taxonomic markers in higher plants. *Phytochemistry* **8**: 177-183.

Horai, H., Arita, M., Kanaya, S., Nihei, Y., Ikeda, T., Suwa, K., Ojima, Y., Tanaka, K., Tanaka, S., Aoshima, K., Oda, Y., Kakazu, Y., Kusano, M., Tohge, T., Matsuda, F., Sawada, Y., Hirai, M.Y., Nakanishi, H., Ikeda, K., Akimoto, N., Maoka, T., Takahashi, H., Ara, T., Sakurai, N., Suzuki, H., Shibata, D., Neumann, S., Iida, T., Tanaka, K., Funatsu, K., Matsuura, F., Soga, T., Taguchi, R., Saito, K. and Nishioka, T. (2010) MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *Journal of Mass Spectrometry* **45**: 703-714.

Ikram, E.H.K., Stanley, R., Netzel, M. and Fanning, K. (2015) Phytochemicals of papaya and its traditional health and culinary uses – A review. *Journal of Food Composition and Analysis* **41**: 201-211.

Iwashina, T. (2015) Contribution to flower colors of flavonoids including anthocyanins: a review. *Natural Product Communications* **10**: 529-544.

Jaiswal, P. and Jain, B. (2018) Medicative Properties of *Carica papaya*-An Overview. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research* **13**: 10-17.

Jeffrey, A.M., Knight, M. and Evans, W.C. (1972) The bacterial degradation of flavonoids. Hydroxylation of the A-ring of taxifolin by a soil pseudomonad. *Biochemical Journal* **130**: 373-381.

Jiao, Z., Deng, J., Li, G., Zhang, Z. and Cai, Z. (2010) Study on the compositional differences between transgenic and non-transgenic papaya (*Carica papaya* L.). *Journal of Food Composition and Analysis* **23**: 640-647.

Jimenez, A., Creissen, G., Kular, B., Firmin, J., Robinson, S., Verhoeyen, M. and Mullineaux, P. (2002) Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. *Planta* **214**: 751-758.

Jin, H., Cominelli, E., Bailey, P., Parr, A., Mehrtens, F., Jones, J., Tonelli, C., Weisshaar, B. and Martin, C. (2000) Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal* **19**: 6150-6161.

John, A., Yang, J., Liu, J., Jiang, Y. and Yang, B. (2018) The structure changes of water-soluble polysaccharides in papaya during ripening. *International Journal of Biological Macromolecules* **115**: 152-156.

Jones, P., Binns, D., Chang, H.Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., Pesseat, S., Quinn, A.F., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Yong, S.Y., Lopez, R. and Hunter, S. (2014) InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* **30**: 1236-1240.

Julianti, T., De Mieri, M., Zimmermann, S., Ebrahimi, S.N., Kaiser, M., Neuburger, M., Raith, M., Brun, R. and Hamburger, M. (2014a) HPLC-based activity profiling for antiplasmodial compounds in the traditional Indonesian medicinal plant *Carica papaya* L. *Journal of Ethnopharmacology* **155**: 426-434.

Julianti, T., Oufir, M. and Hamburger, M. (2014b) Quantification of the antiplasmodial alkaloid carpaine in papaya (*Carica papaya*) leaves. *Planta Medica* **80**: 1138-1142.

Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S. and Nakaya, A. (2002) The KEGG databases at GenomeNet. *Nucleic Acids Research* **30**: 42-46.

Kaneko, T., Asamizu, E., Kato, T., Sato, S., Nakamura, Y. and Tabata, S. (2003) Structural analysis of a *Lotus japonicus* genome. III. Sequence features and mapping of sixty-two TAC clones which cover the 6.7 Mb regions of the genome. *DNA Research* **10**: 27-33.

Kaouadji, M., Thomasson, F., Bennini, B. and Chulia, A.J. (1992) Flavonoid glycosides from *Erica cinerea*. *Phytochemistry* **31**: 2483-2486.

Karam, M.C., Petit, J., Zimmer, D., Baudelaire Djantou, E. and Scher, J. (2016) Effects of drying and grinding in production of fruit and vegetable powders: A review. *Journal of Food Engineering* **188**: 32-49.

Karol, K.G., McCourt, R.M., Cimino, M.T. and Delwiche, C.F. (2001) The closest living relatives of land plants. *Science* **294**: 2351-2353.

Kato, T., Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E. and Tabata, S. (2003) Structural analysis of a *Lotus japonicus* genome. V. Sequence features and mapping of sixty-four TAC clones which cover the 6.4 mb regions of the genome. *DNA Research* **10**: 277-285.

Kawai, Y., Ono, E. and Mizutani, M. (2014) Evolution and diversity of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily in plants. *The Plant Journal* **78**: 328-343.

Kera, K., Fine, D.D., Wherritt, D.J., Nagashima, Y., Shimada, N., Ara, T., Ogata, Y., Sumner, L.W. and Suzuki, H. (2018) Pathway-specific metabolome analysis with ¹⁸O₂-labeled *Medicago truncatula* via a mass spectrometry-based approach. *Metabolomics* **14**: 71.

Kera, K., Ogata, Y., Ara, T., Nagashima, Y., Shimada, N., Sakurai, N., Shibata, D. and Suzuki, H. (2014) ShiftedIonsFinder: A standalone Java tool for finding peaks with

specified mass differences by comparing mass spectra of isotope-labeled and unlabeled data sets. *Plant Biotechnology* **31**: 269-274.

Koduri, P.K., Gordon, G.S., Barker, E.I., Colpitts, C.C., Ashton, N.W. and Suh, D.Y. (2010) Genome-wide analysis of the chalcone synthase superfamily genes of *Physcomitrella patens*. *Plant Molecular Biology* **72**: 247-263.

Krishna, L., Paridhavi, M. and Patel, J. (2008) Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of papaya (*Carica papaya* Linn.). *Indian Journal of Natural Products and Resources* **7**: 364-373.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution* **35**: 1547-1549.

Lang, D., Ullrich, K.K., Murat, F., Fuchs, J., Jenkins, J., Haas, F.B., Piednoel, M., Gundlach, H., Van Bel, M., Meyberg, R., Vives, C., Morata, J., Symeonidi, A., Hiss, M., Muchero, W., Kamisugi, Y., Saleh, O., Blanc, G., Decker, E.L., van Gessel, N., Grimwood, J., Hayes, R.D., Graham, S.W., Gunter, L.E., McDaniel, S.F., Hoernstein, S.N.W., Larsson, A., Li, F.W., Perroud, P.F., Phillips, J., Ranjan, P., Rokshar, D.S., Rothfels, C.J., Schneider, L., Shu, S., Stevenson, D.W., Thummler, F., Tillich, M., Villarreal Aguilar, J.C., Widiez, T., Wong, G.K., Wymore, A., Zhang, Y., Zimmer, A.D., Quatrano, R.S., Mayer, K.F.X., Goodstein, D., Casacuberta, J.M., Vandepoele, K., Reski, R., Cuming, A.C., Tuskan, G.A., Maumus, F., Salse, J., Schmutz, J. and Rensing, S.A. (2018) The *Physcomitrella patens* chromosome-scale assembly reveals moss genome structure and evolution. *The Plant*

Journal **93**: 515-533.

Latunde-Dada, A.O., Cabello-Hurtado, F., Czittrich, N., Didierjean, L., Schopfer, C., Hertkorn, N., Werck-Reichhart, D. and Ebel, J. (2001) Flavonoid 6-hydroxylase from soybean (*Glycine max* L.), a novel plant P-450 monooxygenase. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 1688-1695.

Lewis, L.A. and McCourt, R.M. (2004) Green algae and the origin of land plants. *American Journal of Botany* **91**: 1535-1556.

Li, J., Ou-Lee, T.M., Raba, R., Amundson, R.G. and Last, R.L. (1993) *Arabidopsis* Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to UV-B Irradiation. *Plant Cell* **5**: 171-179.

Li, J., Zou, Y., Sun, Q., Yang, C., Yang, J. and Zhang, L. (2015) Effect of physical and thermal processing upon benzylglucosinolate content in tubers of the Brassicaceae maca (*Lepidium meyenii*) using a novel rapid analytical technique. *International Journal of Food Science & Technology* **50**: 2443-2450.

Li, Z.-Y., Wang, Y., Shen, W.-T. and Zhou, P. (2012) Content determination of benzyl glucosinolate and anti-cancer activity of its hydrolysis product in *Carica papaya* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **5**: 231-233.

Liu, S., Ju, J. and Xia, G. (2014) Identification of the flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase genes from Antarctic moss and their regulation during abiotic stress. *Gene* **543**: 145-152.

Liu, Y., Tikunov, Y., Schouten, R.E., Marcelis, L.F.M., Visser, R.G.F. and Bovy, A. (2018) Anthocyanin Biosynthesis and Degradation Mechanisms in Solanaceous Vegetables: A Review. *Frontiers in Chemistry* **6**: 52.

Martens, S. and Mithofer, A. (2005) Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry* **66**: 2399-2407.

Matsuo, T., Tsugawa, H., Miyagawa, H. and Fukusaki, E. (2017) Integrated Strategy for Unknown EI-MS Identification Using Quality Control Calibration Curve, Multivariate Analysis, EI-MS Spectral Database, and Retention Index Prediction. *Analytical Chemistry* **89**: 6766-6773.

Mi, L., Di Pasqua, A.J. and Chung, F.L. (2011) Proteins as binding targets of isothiocyanates in cancer prevention. *Carcinogenesis* **32**: 1405-1413.

Mitsuhara, I., Ugaki, M., Hirochika, H., Ohshima, M., Murakami, T., Gotoh, Y., Katayose, Y., Nakamura, S., Honkura, R., Nishimiya, S., Ueno, K., Mochizuki, A., Tanimoto, H., Tsugawa, H., Otsuki, Y. and Ohashi, Y. (1996) Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiol* **37**: 49-59.

Miyake, Y., Minato, K., Fukumoto, S., Yamamoto, K., Oya-Ito, T., Kawakishi, S. and Osawa, T. (2003) New potent antioxidative hydroxyflavanones produced with *Aspergillus saitoi* from flavanone glycoside in citrus fruit. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **67**: 1443-1450.

Mizutani, M. and Ohta, D. (2010) Diversification of P450 genes during land plant evolution. *Annual Review of Plant Biology* **61**: 291-315.

Mohammadinejad, R., Shavandi, A., Raie, D.S., Sangeetha, J., Soleimani, M., Shokrian Hajibehzad, S., Thangadurai, D., Hospet, R., Popoola, J.O., Arzani, A., Gómez-Lim, M.A., Irvani, S. and Varma, R.S. (2019) Plant molecular farming: production of metallic nanoparticles and therapeutic proteins using green factories. *Green Chemistry* **21**: 1845-1865.

Montersino, S. and van Berkel, W.J. (2012) Functional annotation and characterization of 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase from *Rhodococcus jostii* RHA1. *Biochimica et Biophysica Acta* **1824**: 433-442.

Mun, T., Bachmann, A., Gupta, V., Stougaard, J. and Andersen, S.U. (2016) Lotus Base: An integrated information portal for the model legume *Lotus japonicus*. *Scientific Reports* **6**: 39447.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497.

Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E., Kato, T., Sato, S. and Tabata, S. (2002) Structural analysis of a *Lotus japonicus* genome. II. Sequence features and mapping of sixty-five TAC clones which cover the 6.5-mb regions of the genome. *DNA Research* **9**: 63-70.

Nakamura, Y., Yoshimoto, M., Murata, Y., Shimoishi, Y., Asai, Y., Park, E.Y., Sato,

K. and Nakamura, Y. (2007) Papaya seed represents a rich source of biologically active isothiocyanate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 4407-4413.

Nakayama, T., Takahashi, S. and Waki, T. (2019) Formation of Flavonoid Metabolons: Functional Significance of Protein-Protein Interactions and Impact on Flavonoid Chemodiversity. *Frontiers in Plant Science* **10**: 821.

Nitsawang, S., Hatti-Kaul, R. and Kanasawud, P. (2006) Purification of papain from *Carica papaya* latex: Aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. *Enzyme and Microbial Technology* **39**: 1103-1107.

Pathak, P.D., Mandavgane, S.A. and Kulkarni, B.D. (2018) Waste to Wealth: A Case Study of Papaya Peel. *Waste and Biomass Valorization* **10**: 1755-1766.

Petrussa, E., Braidot, E., Zancani, M., Peresson, C., Bertolini, A., Patui, S. and Vianello, A. (2013) Plant flavonoids--biosynthesis, transport and involvement in stress responses. *International Journal of Molecular Sciences* **14**: 14950-14973.

Radhakrishnan, N., Lam, K.W. and Norhaizan, M.E. (2017) Molecular docking analysis of *Carica papaya* Linn constituents as antiviral agent. *International Food Research Journal* **24**: 1819-1825.

Rensing, S.A., Lang, D., Zimmer, A.D., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., Nishiyama, T., Perroud, P.F., Lindquist, E.A., Kamisugi, Y., Tanahashi, T., Sakakibara, K., Fujita, T., Oishi, K., Shin, I.T., Kuroki, Y., Toyoda, A., Suzuki, Y., Hashimoto, S., Yamaguchi, K., Sugano, S., Kohara, Y., Fujiyama, A., Anterola, A., Aoki, S., Ashton, N.,

Barbazuk, W.B., Barker, E., Bennetzen, J.L., Blankenship, R., Cho, S.H., Dutcher, S.K., Estelle, M., Fawcett, J.A., Gundlach, H., Hanada, K., Heyl, A., Hicks, K.A., Hughes, J., Lohr, M., Mayer, K., Melkozernov, A., Murata, T., Nelson, D.R., Pils, B., Prigge, M., Reiss, B., Renner, T., Rombauts, S., Rushton, P.J., Sanderfoot, A., Schween, G., Shiu, S.H., Stueber, K., Theodoulou, F.L., Tu, H., Van de Peer, Y., Verrier, P.J., Waters, E., Wood, A., Yang, L., Cove, D., Cuming, A.C., Hasebe, M., Lucas, S., Mishler, B.D., Reski, R., Grigoriev, I.V., Quatrano, R.S. and Boore, J.L. (2008) The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* **319**: 64-69.

Ries, G., Heller, W., Puchta, H., Sandermann, H., Seidlitz, H.K. and Hohn, B. (2000) Elevated UV-B radiation reduces genome stability in plants. *Nature* **406**: 98-101.

Rossetto, M.R., Oliveira do Nascimento, J.R., Purgatto, E., Fabi, J.P., Lajolo, F.M. and Cordenunsi, B.R. (2008) Benzylglucosinolate, benzylisothiocyanate, and myrosinase activity in papaya fruit during development and ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 9592-9599.

Ruhfel, B.R., Gitzendanner, M.A., Soltis, P.S., Soltis, D.E. and Burleigh, J.G. (2014) From algae to angiosperms-inferred the phylogeny of green plants (Viridiplantae) from 360 plastid genomes. *BMC Evolutionary Biology* **14**: 23.

Sablani, S.S. (2006) Drying of Fruits and Vegetables: Retention of Nutritional/Functional Quality. *Drying Technology* **24**: 123-135.

Saito, K., Yonekura-Sakakibara, K., Nakabayashi, R., Higashi, Y., Yamazaki, M., Tohge, T. and Fernie, A.R. (2013) The flavonoid biosynthetic pathway in *Arabidopsis*:

structural and genetic diversity. *Plant Physiology and Biochemistry* **72**: 21-34.

Saklani, A. and Kutty, S.K. (2008) Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug Discovery Today* **13**: 161-171.

Sakurai, N., Ara, T., Enomoto, M., Motegi, T., Morishita, Y., Kurabayashi, A., Iijima, Y., Ogata, Y., Nakajima, D., Suzuki, H. and Shibata, D. (2014) Tools and databases of the KOMICS web portal for preprocessing, mining, and dissemination of metabolomics data. *BioMed Research International* **2014**: 194812.

Sakurai, N., Ara, T., Kanaya, S., Nakamura, Y., Iijima, Y., Enomoto, M., Motegi, T., Aoki, K., Suzuki, H. and Shibata, D. (2013) An application of a relational database system for high-throughput prediction of elemental compositions from accurate mass values. *Bioinformatics* **29**: 290-291.

Sakurai, N. and Shibata, D. (2017) Tools and databases for an integrated metabolite annotation environment for liquid chromatography–mass spectrometry-based untargeted metabolomics. *Carotenoid Science* **22**: 16-22.

Sánchez, A. and Vázquez, A. (2017) Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety* **1**: 29-46.

Sanimah, S. and Sarip, J. (2015) Metabolomic analysis of *Carica papaya* variety Eksotika and Sekaki. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science* **43**: 103-117.

Sano, R., Ara, T., Akimoto, N., Sakurai, N., Suzuki, H., Fukuzawa, Y., Kawamitsu,

Y., Ueno, M. and Shibata, D. (2012) Dynamic metabolic changes during fruit maturation in *Jatropha curcas* L. *Plant Biotechnology* **29**: 175-178.

Sato, S., Kaneko, T., Nakamura, Y., Asamizu, E., Kato, T. and Tabata, S. (2001) Structural analysis of a *Lotus japonicus* genome. I. Sequence features and mapping of fifty-six TAC clones which cover the 5.4 mb regions of the genome. *DNA Research* **8**: 311-318.

Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E., Kato, T., Nakao, M., Sasamoto, S., Watanabe, A., Ono, A., Kawashima, K., Fujishiro, T., Katoh, M., Kohara, M., Kishida, Y., Minami, C., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimizu, Y., Shinpo, S., Takahashi, C., Wada, T., Yamada, M., Ohmido, N., Hayashi, M., Fukui, K., Baba, T., Nakamichi, T., Mori, H. and Tabata, S. (2008) Genome structure of the legume, *Lotus japonicus*. *DNA Research* **15**: 227-239.

Schlaich, N.L. (2007) Flavin-containing monooxygenases in plants: looking beyond detox. *Trends in Plant Science* **12**: 412-418.

Schliemann, W., Schneider, B., Wray, V., Schmidt, J., Nimtz, M., Porzel, A. and Bohm, H. (2006) Flavonols and an indole alkaloid skeleton bearing identical acylated glycosidic groups from yellow petals of *Papaver nudicaule*. *Phytochemistry* **67**: 191-201.

Scotland, R.W. and Wortley, A.H. (2003) How many species of seed plants are there? *Taxon* **52**: 101-104.

Shahidi, F. and Ambigaipalan, P. (2015) Phenolics and polyphenolics in foods,

beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods* **18**: 820-897.

Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M. and Zheng, B. (2019a) Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. *Molecules* **24**.

Sharma, N., Mishra, K.P., Chanda, S., Bhardwaj, V., Tanwar, H., Ganju, L., Kumar, B. and Singh, S.B. (2019b) Evaluation of anti-dengue activity of *Carica papaya* aqueous leaf extract and its role in platelet augmentation. *Archives of Virology* **164**: 1095-1110.

Shimada, N., Sasaki, R., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Aoki, T. and Ayabe, S. (2005) A comprehensive analysis of six dihydroflavonol 4-reductases encoded by a gene cluster of the *Lotus japonicus* genome. *Journal of Experimental Botany* **56**: 2573-2585.

Sievers, H., Burkhardt, G., Becker, H. and Zinsmeister, H.D. (1992) Hypnogenols and other dihydroflavonols from the moss *Hypnum cupressiforme*. *Phytochemistry* **31**: 3233-3237.

Stafford, H.A. (1991) Flavonoid evolution: an enzymic approach. *Plant Physiology* **96**: 680-685.

Suzuki, H., Sasaki, R., Ogata, Y., Nakamura, Y., Sakurai, N., Kitajima, M., Takayama, H., Kanaya, S., Aoki, K., Shibata, D. and Saito, K. (2008) Metabolic profiling of flavonoids in *Lotus japonicus* using liquid chromatography Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Phytochemistry* **69**: 99-111.

Tanaka, Y. and Brugliera, F. (2013) Flower colour and cytochromes P450. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **368**: 20120432.

Tang, C.-S. (1979) New macrocyclic, Δ^1 -piperidine alkaloids from papaya leaves: dehydrocarpaine I and II. *Phytochemistry* **18**: 651-652.

The Royal Botanic Kew Gardens (2016) State of the World's Plants Report https://stateoftheworldsplants.org/2016/report/sotwp_2016.pdf

The Royal Botanic Kew Gardens (2017) State of the World's Plants Report https://stateoftheworldsplants.org/2017/report/SOTWP_2017.pdf

Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673-4680.

Tohge, T., Nishiyama, Y., Hirai, M.Y., Yano, M., Nakajima, J., Awazuhara, M., Inoue, E., Takahashi, H., Goodenowe, D.B., Kitayama, M., Noji, M., Yamazaki, M. and Saito, K. (2005) Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing an MYB transcription factor. *The Plant Journal* **42**: 218-235.

Tohge, T., Wendenburg, R., Ishihara, H., Nakabayashi, R., Watanabe, M., Sulpice, R., Hoefgen, R., Takayama, H., Saito, K., Stitt, M. and Fernie, A.R. (2016) Characterization of a recently evolved flavonol-phenylacyltransferase gene provides

signatures of natural light selection in Brassicaceae. *Nature Communications* **7**: 12399.

Tsuda, S., Fukui, Y., Nakamura, N., Katsumoto, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Fukuchi-Mizutani, M., Ohira, K., Ueyama, Y., Ohkawa, H., Holton, T.A., Kusumi, T. and Tanaka, Y. (2004) Flower color modification of *Petunia hybrida* commercial varieties by metabolic engineering. *Plant Biotechnology* **21**: 377-386.

van Berkel, W.J., Kamerbeek, N.M. and Fraaije, M.W. (2006) Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. *Journal of Biotechnology* **124**: 670-689.

Wang, H., Liu, S., Wang, T., Liu, H., Xu, X., Chen, K. and Zhang, P. (2020) The moss flavone synthase I positively regulates the tolerance of plants to drought stress and UV-B radiation. *Plant Science* **298**: 110591.

Wang, M., Carver, J.J., Phelan, V.V., Sanchez, L.M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D.D., Watrous, J., Kapono, C.A., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A.V., Meehan, M.J., Liu, W.-T., Crüsemann, M., Boudreau, P.D., Esquenazi, E., Sandoval-Calderón, M., Kersten, R.D., Pace, L.A., Quinn, R.A., Duncan, K.R., Hsu, C.-C., Floros, D.J., Gavilan, R.G., Kleigrew, K., Northen, T., Dutton, R.J., Parrot, D., Carlson, E.E., Aigle, B., Michelsen, C.F., Jelsbak, L., Sohlenkamp, C., Pevzner, P., Edlund, A., McLean, J., Piel, J., Murphy, B.T., Gerwick, L., Liaw, C.-C., Yang, Y.-L., Humpf, H.-U., Maansson, M., Keyzers, R.A., Sims, A.C., Johnson, A.R., Sidebottom, A.M., Sedio, B.E., Klitgaard, A., Larson, C.B., Boya P, C.A., Torres-Mendoza, D., Gonzalez, D.J., Silva, D.B., Marques, L.M., Demarque, D.P., Pociute, E., O'Neill, E.C.,

Briand, E., Helfrich, E.J.N., Granatosky, E.A., Glukhov, E., Ryffel, F., Houson, H., Mohimani, H., Kharbush, J.J., Zeng, Y., Vorholt, J.A., Kurita, K.L., Charusanti, P., McPhail, K.L., Nielsen, K.F., Vuong, L., Elfeki, M., Traxler, M.F., Engene, N., Koyama, N., Vining, O.B., Baric, R., Silva, R.R., Mascuch, S.J., Tomasi, S., Jenkins, S., Macherla, V., Hoffman, T., Agarwal, V., Williams, P.G., Dai, J., Neupane, R., Gurr, J., Rodríguez, A.M.C., Lamsa, A., Zhang, C., Dorrestein, K., Duggan, B.M., Almaliti, J., Allard, P.-M., Phapale, P., Nothias, L.-F., Alexandrov, T., Litaudon, M., Wolfender, J.-L., Kyle, J.E., Metz, T.O., Peryea, T., Nguyen, D.-T., VanLeer, D., Shinn, P., Jadhav, A., Müller, R., Waters, K.M., Shi, W., Liu, X., Zhang, L., Knight, R., Jensen, P.R., Palsson, B.Ø., Pogliano, K., Linington, R.G., Gutiérrez, M., Lopes, N.P., Gerwick, W.H., Moore, B.S., Dorrestein, P.C. and Bandeira, N. (2016) Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology* **34**: 828-837.

Wang, Z., Wang, S., Wu, M., Li, Z., Liu, P., Li, F., Chen, Q., Yang, A. and Yang, J. (2019) Evolutionary and functional analyses of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase genes involved in the flavonoid biosynthesis pathway in tobacco. *Planta* **249**: 543-561.

Waterman, M.J., Nugraha, A.S., Hendra, R., Ball, G.E., Robinson, S.A. and Keller, P.A. (2017) Antarctic Moss Biflavonoids Show High Antioxidant and Ultraviolet-Screening Activity. *Journal of Natural Products* **80**: 2224-2231.

Webby, R.F., Markham, K.R. and Lewis Smith, R.I. (1996) Chemotypes of the Antarctic moss *Bryum algens* delineated by their flavonoid constituents. *Biochemical*

Systematics and Ecology **24**: 469-475.

Williams, D.J., Pun, S., Chaliha, M., Scheelings, P. and O'Hare, T. (2013) An unusual combination in papaya (*Carica papaya*): The good (glucosinolates) and the bad (cyanogenic glycosides). *Journal of Food Composition and Analysis* **29**: 82-86.

Winkel-Shirley, B. (2001a) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* **126**: 485-493.

Winkel-Shirley, B. (2001b) It Takes a Garden. How Work on Diverse Plant Species Has Contributed to an Understanding of Flavonoid Metabolism. *Plant Physiology* **127**: 1399-1404.

Wishart, D.S., Feunang, Y.D., Marcu, A., Guo, A.C., Liang, K., Vazquez-Fresno, R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C., Karu, N., Sayeeda, Z., Lo, E., Assempour, N., Berjanskii, M., Singhal, S., Arndt, D., Liang, Y., Badran, H., Grant, J., Serra-Cayuela, A., Liu, Y., Mandal, R., Neveu, V., Pon, A., Knox, C., Wilson, M., Manach, C. and Scalbert, A. (2018) HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Research* **46**: D608-D617.

Wodniok, S., Brinkmann, H., Glockner, G., Heidel, A.J., Philippe, H., Melkonian, M. and Becker, B. (2011) Origin of land plants: do conjugating green algae hold the key? *BMC Evolutionary Biology* **11**: 104.

Wolf, L., Rizzini, L., Stracke, R., Ulm, R. and Rensing, S. (2010) The Molecular and Physiological Responses of *Physcomitrella patens* to Ultraviolet-B Radiation. *Plant*

Physiology **153**: 1123-1134.

Worley, B. and Powers, R. (2013) Multivariate Analysis in Metabolomics. *Current Metabolomics* **1**: 92-107.

Wu, Q., Li, Z., Chen, X., Yun, Z., Li, T. and Jiang, Y. (2019) Comparative metabolites profiling of harvested papaya (*Carica papaya* L.) peel in response to chilling stress. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **99**: 6868-6881.

Wurtzel, E.T. and Kutchan, T.M. (2016) Plant metabolism, the diverse chemistry set of the future. *Science* **353**: 1232-1236.

Yonekura-Sakakibara, K., Higashi, Y. and Nakabayashi, R. (2019) The Origin and Evolution of Plant Flavonoid Metabolism. *Frontiers in Plant Science* **10**: 943.

Zhao, Q., Cui, M.Y., Levsh, O., Yang, D., Liu, J., Li, J., Hill, L., Yang, L., Hu, Y., Weng, J.K., Chen, X.Y. and Martin, C. (2018) Two CYP82D Enzymes Function as Flavone Hydroxylases in the Biosynthesis of Root-Specific 4'-Deoxyflavones in *Scutellaria baicalensis*. *Molecular Plant* **11**: 135-148.

Zhao, Y., Christensen, S.K., Fankhauser, C., Cashman, J.R., Cohen, J.D., Weigel, D. and Chory, J. (2001) A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* **291**: 306-309.

安田 斉 (2003) 花色の生理・生化学. 内田老鶴圃.

及川 英秋 (2011) ゲノム資源化学. 学術の動向: p.66-69.

小椋 栄一郎 (2012) たゆたうたようせい

～配糖体化酵素から系統特異的な代謝を再考する～. 植物の生長調節 47:
p.101-113.

水谷 正治, 土反 伸和, 杉山 暁史, 轟 泰司 (2019) 基礎から学ぶ植物代謝
生化学. 羊土社.

斉藤 和季 (2017) 植物はなぜ薬を作るのか. 文藝春秋.

斉藤 和季 (2019) 植物メタボロミクス : ゲノムから解読する植物化学成
分. 裳華房.

草野 都, 福島 敦史, 斉藤 和季 (2008) メタボローム解析による植物代謝
ネットワークー多断層オミックスネットワークの現状と今後の展望. 臨床化学
37: p.368-374.

竹田 忠紘, 池城 安正, 高橋 邦夫, 斉藤 和季, 小林 義典 (2017) 天然医
薬資源学. 廣川書店.

長谷部 光泰 (2015) 陸上植物の系統. 進化の謎をゲノムで解く: p.176-187.

末次 憲之, 和田 正三 (2013) 陸上植物の光応答戦略. 植物科学最前線 4:
p.45-60.

印刷公表論文

本学位論文の内容は以下の発表論文による。

第2部の「ヒメツリガネゴケのフラボノイド代謝研究」は、日本植物バイオテクノロジー学会の学会誌（英文誌）*Plant Biotechnology* に発表した。

1. Yasuhide Hiraga, Takeshi Ara, Yoshiki Nagashima, Norimoto Shimada, Nozomu Sakurai, Hideyuki Suzuki, Kota Kera
Metabolome analysis using multiple data mining approaches suggests luteolin biosynthesis in *Physcomitrella patens*.
Plant Biotechnology, **37** (3) : 377-381, 2020
Impact Factor (2019/2020) : 1.200

第3部の「ミヤコグサのフラボノイド代謝研究」は、日本植物生理学会の学会誌（英文誌）*Plant & Cell Physiology* に発表した。

2. Yasuhide Hiraga, Norimoto Shimada, Yoshiki Nagashima, Kunihiro Suda, Tina Kanamori, Kanako Ishiguro, Yuka Sato, Hideki Hirakawa, Shusei Sato, Tomoyoshi Akashi, Yoshikazu Tanaka, Daisaku Ohta, Koh Aoki, Daisuke Shibata, Hideyuki Suzuki, Kota Kera
Identification of a flavin monooxygenase-like flavonoid 8-hydroxylase with gossypetin synthase activity from *Lotus japonicus*.
Plant & Cell Physiology, **62** (3) : 411-423, 2021
Impact Factor (2019/2020) : 4.062

第4部の「パパイヤのアルカロイド代謝研究」は、日本農芸化学会の学会誌
(英文誌) *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* に発表した.

3. Yasuhide Hiraga, Takeshi Ara, Nao Sato, Nayumi Akimoto, Kenjiro
Sugiyama, Hideyuki Suzuki, Kota Kera
Metabolic analysis of unripe papaya (*Carica papaya* L.) to promote its utilization
as a functional food.
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, **85** (5) :1194-1204, 2021
Impact Factor (2019/2020) : 1.360

本学位論文の審査は日本大学薬学部論文審査分科委員会で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 日本大学薬学部生薬学研究室教授 薬学博士 松崎桂一

副査 日本大学薬学部生物有機化学研究室教授 薬学博士 飯島洋

副査 日本大学薬学部生物有機化学研究室教授 薬学博士 内山武人

副査 日本大学薬学部薬品分析学研究室教授 薬学博士 四宮一総