

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：33905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18902

研究課題名(和文) 多様性を持つシソ属植物精油成分の生合成経路および制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular cloning and characterization of a *Perilla frutescens* enzyme that catalyzes the essential oil biosynthesis

研究代表者

藤原 裕未 (Fujiwara, Yumi)

金城学院大学・薬学部・助教

研究者番号：90756511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：日本産シソ属植物には十数種類に分類されるさまざまな精油型がある。本研究では、シソ属植物の精油成分の生合成が遺伝的に制御されていることから、遺伝的に純系を維持した植物体を用いて、それらの遺伝子発現パターンを比較することで、精油成分の生合成に関わる酵素遺伝子を同定することを目的とした。シソを基原とする生薬ソヨウの品質に重要な化合物であるペリルアルデヒドの生合成に関わる酵素遺伝子を同定した。この酵素はシトクロムP450であり、リモネンを基質にペリルアルコールを生成し、さらに酸化することでペリルアルデヒドを合成した。

研究成果の概要(英文)：Perilla is the source of several oil types. A library of genetically pure lines of perilla has been established and many studies has been conducted showing that the syntheses of oil compounds are genetically controlled. With this library of pure strains of perilla, it is possible to compare expression levels of specific genes in different oil types and identify sequences relevant to the syntheses of oil compounds specific to the oil type. Herein described as the cloning and characterization of a cytochrome P450 enzyme mediating the synthesis of perillaldehyde. The recombinant protein catalyzed the hydroxylation and oxidation of limonene to perillyl alcohol and perillaldehyde.

研究分野：生薬学

キーワード：シソ属植物 精油成分 シトクロムP450 ペリルアルデヒド クローニング 機能的発現 酵素反応

## 1. 研究開始当初の背景

日本産シソ属植物は、十数種類に分類される様々な精油型を持ち、ペリルアルデヒドを豊富に含む精油型は日本では最も有名であり、生薬ソヨウの基原植物である。日本薬局方のソヨウの定義では、「ペリルアルデヒド 0.08%以上を含む」とされ、性状の項では「特異なおいがある」と規定しており、香氣すなわち精油成分はソヨウの品質に重要な成分である。

精油成分はモノテルペン型とフェニルプロペン型に大別されるが、これらの生合成は遺伝的に制御されていることが明らかとなっており、その生合成経路は推定されている。モノテルペン型精油成分の生合成を担う酵素は、ゲラニル二リン酸を基質とするリモネン合成酵素、リナロール合成酵素、ゲラニオール合成酵素など、精油成分生合成の初期ステップを担うものが既にクローニングされている。一方で、ペリルアルデヒドやペリラケトンなどの生合成の最終産物までを担う酵素は、ひとつもクローニングされていない。また、フェニルプロペン型精油成分の生合成に関わる酵素についても明らかにはなっていない。

## 2. 研究の目的

申請者のグループは、シソ属植物の精油成分の生合成が遺伝的に制御されていることから、遺伝的に純系を維持した植物体を用いて、それらの遺伝子発現パターンを比較し、いくつかのモノテルペン合成酵素を同定してきた。本研究はこの手法を利用して、モノテルペン化合物の生合成に関わる遺伝子を同定することを目的とし、生薬ソヨウの品質に重要な化合物であるペリルアルデヒドに焦点を当てた。

## 3. 研究の方法

(1) EST (expressed sequenced tag) ライブラリーの構築

植物材料は、いずれも自家受粉により純系を維持しているものを用いた。10系統、7種の精油型のシソの葉を用いて total RNA を抽出し、mRNA-Seq 手法により EST ライブラリーを作製した。EST ライブラリーデータを解析し、各 contig の遺伝子発現量を RPKM (reads per kilobase of exon per million mapped reads) 値の指標をもとに比較した。

(2) ペリルアルデヒドの生合成に関わる遺伝子のクローニング

ペリルアルデヒドの生合成は、リモネンの7位の水酸化によりペリルアルコールが生成し、続いてその水酸基の酸化が起こって完了すると推定されている。いずれのステップも酸化反応であり、リモネンからペリルアルコールを生合成する酵素として、シソからシトクロム P450 が同定されていることから、ペリルアルデヒドの一連の生合成に関わる

酵素はシトクロム P450 である可能性が高いと推測した。構築した EST ライブラリーデータを解析し、PA (ペリルアルデヒド) 型のみ特異的に高い発現量を示すシトクロム P450 として contig7307 を得た。Contig7307 の全長配列は RACE (randomly amplified cDNA ends) 法により決定した。

(3) ペリルアルデヒドの生合成に関わる遺伝子の酵母を用いたタンパク質発現

発現用クローンは AH22 株に LiCl 法を用いて形質転換し、シングルコロニーから液体培地で培養した。菌体から得たマイクロソーム画分を酵素反応に供した。

(4) ペリルアルデヒドの生合成に関わる遺伝子の酵素反応

得られたマイクロソーム画分を含む酵素反応液を調製し、リモネン、ペリルアルコール、ペリルアルデヒド、トランス-シソオールを基質とし、バイアル内にて酵素反応を行った。酵素反応終了後、バイアル内の揮発成分を捕集し SPME-GC/MS にて酵素反応生成物を測定した。

## 4. 研究成果

PA 型にのみ特異的に高い RPKM 値を示す contig 7307 は 1497 bp、499 アミノ酸で構成され、シトクロム P450 に高度に保存されているプロリンリッチ領域、酸素結合ポケット、ヘム結合領域を保持しており、CYP family number は CYP71AT146 に分類された。CYP71AT146 は既にシソから同定されていたリモネンからペリルアルコールの生合成に関わるシトクロム P450 である limonene-7-hydroxylase (Gen Bank ID : GQ120438) との相同性が 37% と低く、既知のものとは異なるものであった。

CYP71AT146 は酵母を用いた異種発現系によりタンパク質発現を行った。シトクロム P450 が機能するためには、分子状酸素の存在とともにヘムを還元しシトクロム P450 に結合した酸素分子を活性化するための還元力の供給が必要であるため、本研究では、NADPH シトクロム P450 還元酵素が共発現するように設計されたベクターを用いた。真核生物のシトクロム P450 は細胞内で小胞体またはミトコンドリアに存在する膜タンパクであるため、タンパク質発現させた酵母培養液からマイクロソーム画分を得た。

得られたマイクロソーム画分を用いて、リモネンを基質として反応開始から、30分、2時間、4時間、8時間、16時間で経時的にそれぞれ酵素反応を行い、SPME-GC/MSを用いて酵素反応生成物を測定した。その結果、反応開始30分後には、ペリルアルデヒドとペリルアルコールが生成した。その後2時間および4時間経過後の反応生成物は同様に、ペリルアルデヒドとペリルアルコールであった。反応開始後8時間では、ペリルアルデヒド、ペ

リルアルコールに加えてトランス-シソオールが生成し、16時間経過後では8時間経過後と同様、ペリルアルデヒド、トランス-シソオール、ペリルアルコールが確認された。また、コントロールとして CYP71AT146 を含まない空ベクターを用いた酵素反応液では、どの時間でも生成物は確認できなかった。この結果から、CYP71AT146 はリモネンを基質にペリルアルコール、ペリルアルデヒドおよびトランス-シソオールを生成することが示唆された。

次にペリルアルコールを基質として、同様に酵素反応を行った。その結果、反応開始30分後には、ペリルアルデヒドとトランスシソオールが生成した。その後2時間から16時間の経過につれて、ペリルアルデヒドの量が減少し、トランス-シソオールの量が増加した。コントロールとして CYP71AT146 を含まない空ベクターを用いた酵素反応液では、いずれの時間でも、トランス-シソオールのみが生成した。CYP71AT146 を含む酵素反応液でのみペリルアルデヒドが生成したことから、CYP71AT146 はペリルアルコールからペリルアルデヒドの生成に関わることが示唆された。またペリルアルコールからトランスシソオールの生成は、CYP71AT146 を含まない空ベクターの酵素反応液でも観察されたことと、還元反応であることから、ベクター上に共発現させた NADPH シトクロム P450 還元酵素による反応であると判断した。

また、ペリルアルデヒドを基質として、同様に酵素反応を行った。その結果、反応開始後30分でトランス-シソオールとペリルアルコールが生成した。その後、2時間から16時間経過するとともに、基質のペリルアルデヒドは減少するのに対し、反応生成物であるトランス-シソオールとペリルアルコールは増加した。コントロールとして CYP71AT146 を含まない空ベクターを用いた酵素反応液では、CYP71AT146 を含む酵素反応液と同様の化合物量の変化が確認された。CYP71AT146 を含む酵素反応液と含まない酵素反応液で同一の反応生成物が得られたこと、ペリルアルデヒドからトランス-シソオールおよびペリルアルコールが生成する反応はいずれも還元反応であることから、生成した化合物は CYP71AT146 による反応の生成物ではなく、ベクター上に発現する還元酵素による反応生成物であると判断した。

さらに、トランス-シソオールを基質として、同様に酵素反応を行った。その結果、CYP71AT146 を含む酵素反応液および含まない酵素反応液の両方で、いずれの時間でも反応生成物は得られなかった。

4つの基質を用いた酵素反応の結果から、CYP71AT146 はリモネンを基質にペリルアルコールを生成し、さらにペリルアルデヒドへと酸化する2つのステップの反応に関与することが明らかとなった。PA型のシソは日本薬局方で医療用として利用できる唯一の精油

型であり、ペリルアルデヒドの含量については規定がある。適格な医薬品であると判断するための指標成分についての生合成を明らかにすることは、品質評価のみならず生薬資源の有効利用においても重要である。

シソ属植物に含まれる精油成分の生合成には酸化反応や環化反応が含まれており、これらの反応にはシトクロム P450 が関与する可能性が高い。本研究では、ペリルアルデヒドに焦点を当てたが、構築した EST ライブラリーを用いて遺伝子の発現量を比較すると、他の精油型でも特異的に高い発現量を示す遺伝子が見ついている。今後はそれらをターゲットにし、シソ属植物の精油成分の生合成に関わる遺伝子の全容を解明することを考えている。また、異種発現系に関しては、酵母を宿主とした場合、発現量が少なく精製タンパク質を得られないという問題点があったため、高収量が期待できる大腸菌などの他の宿主を用いた異種発現系の構築も検討中である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

(1) Fujiwara Y, Ito M. Molecular cloning and characterization of a *Perilla frutescens* cytochrome P450 enzyme that catalyzes the later steps of perillaldehyde biosynthesis. *Phytochemistry*, 134, 26-37 (2017) (査読あり) <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.11.009>

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

藤原 裕未 (FUJIWARA, Yumi )  
金城学院大学・薬学部・助教  
研究者番号：90756511