

令和 3 年 4 月 27 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05463

研究課題名(和文)植物二次代謝生合成におけるユニークなラクトン化酵素の分子多様性の解明

研究課題名(英文)Molecular diversity of a unique lactone-forming enzyme for the secondary metabolite biosynthesis in plants

研究代表者

野村 泰治(Nomura, Taiji)

富山県立大学・工学部・准教授

研究者番号：40570924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、植物の属や科を横断して存在する植物二次代謝産物の生合成系がどのような分子進化過程を経て獲得されているのかを明らかにすることを目的とした。主にチューリップの二次代謝産物として知られているチューリップポシド類/チューリップパリン類の生合成系を対象とし、特に、チューリップポシド類をチューリップパリン類へと変換する「チューリップポシド変換酵素」の複数の植物種からの同定と機能解析を行った。その結果、少なくともユリ科チューリップ属に属する同属異種植物におけるPos変換酵素は、共通祖先に存在していた祖先型酵素が種分化に伴って分岐進化することで獲得されたものであることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物二次代謝産物の中には、複数の属や科を横断して存在しているものがある。本研究では、そのような植物二次代謝産物の生合成反応が、進化的起源が同じ酵素によって触媒されているのか、あるいは起源が全く異なる酵素が同一の反応を触媒するように進化したのかを明らかにすることを主要命題とした。本研究で得られた成果は、医薬をはじめとした有用植物二次代謝産物の生合成系を解明する上でも有用な知見となり、将来的にはそのような有用植物二次代謝産物を効率的に生産する技術開発にも資するものである。

研究成果の概要(英文)：This study was performed to reveal how the same plant secondary metabolite is biosynthesized in distantly related plant species. For this purpose, we used the biosynthetic system of tuliposides and tulipalins, which are well-known secondary metabolites in tulip, as a model. Through the identification of "tuliposide-converting enzyme", an enzyme catalyzing the conversion of tuliposides to tulipalins, from wild tulip species, it was found that the tuliposide-converting enzyme in tulip cultivars and wild species, which belong to the same genus but are distinct species, evolved through divergent evolution from an ancestral enzyme.

研究分野：植物生化学、生物有機化学、植物細胞工学

キーワード：二次代謝 生合成 酵素 分子進化 チューリップポシド チューリップパリン チューリップポシド変換酵素 カルボキシエステラーゼ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

チューリップシド (Pos) 類およびチューリップリン (Pa) 類は、チューリップにおける主要な二次代謝産物として広く知られている。グルコースエステルである Pos 類が、健常植物体において高濃度で蓄積しているにもかかわらず顕著な生物活性を示さないのに対して、Pos 類の側鎖ヒドロキシ酸のラクトン化体である Pa 類は、健常植物体においては痕跡量しか存在しないにもかかわらず抗菌・殺虫等の顕著な生物活性を示す。

我々が以前チューリップ栽培品種から発見した「Pos 変換酵素」は、Pos 類から Pa 類への特異的な変換反応を触媒するが、この発見には 2 つの重要な学術的意義があった。1 つ目は、「Pos 類から Pa 類への変換反応は植物体内で非酵素的に起こる」という定説を覆したことである。2 つ目は、Pos 変換酵素が、カルボキシルエステラーゼファミリーの酵素でありながら、分子内エステル転移によるラクトン化反応のみを触媒するユニークな「加水分解反応非触媒型カルボキシルエステラーゼ」であったことである。

## 2. 研究の目的

Pos/Pa 類は、主に単子葉植物のユリ科 (チューリップ属を含む 3 属) と近縁のユリズイセン科 (アルストロメリア属を含む 2 属) に存在するが、なぜかこれらとは遺伝的に遠縁の双子葉植物であるバラ科 (シモツケ属) にも存在する。一般的に、「同一の二次代謝産物は同一の生合成経路によって生合成される」と考えられているが、これは、祖先型生合成酵素が種分化に伴って「分岐進化」したという前提に基づいている。しかしながら近年、遺伝的に遠縁の植物種では、全く異なるファミリーの酵素が同一の反応を触媒するように進化する「収束進化」を経て、同機能の生合成酵素を獲得しているのではないかと、との問題提起がなされ、植物二次代謝研究における重要な命題の 1 つとなっている。

本命題の解明のためには、「普遍的に存在しない」、「遺伝的に遠縁の植物種に分布する」、「生合成系の鍵酵素が同定されている」という 3 つの条件を満たす二次代謝系を研究対象とする必要があるが、Pos/Pa 生合成系はこれらの必要条件をすべて満たすことから、本命題解明のための最適な研究対象であると考えられた。そこで本研究では、Pos/Pa 生合成系の鍵酵素である「Pos 変換酵素」を、同定済みのチューリップ栽培品種 (*Tulipa gesneriana*) 以外の植物種から同定、比較解析を行い、これによって、科内および科間における二次代謝生合成酵素の分子多様性についての知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) チューリップ原種における Pos 含有量および Pos 変換酵素活性の定量

チューリップ原種 (*Tulipa turkestanica*) の開花期の植物体を各組織に分離し、その含水メタノール抽出物を HPLC 分析に供することで Pos 含有量を定量した。Pos 類の分析に際しては、チューリップ栽培品種の主要 Pos 類である 6-モノアシル型 Pos 類 (6-PosA と 6-PosB) に加えて、原種において著量存在することが報告されている 1,6-ジアシル型 Pos 類 (PosD と PosF) および 1-モノアシル型 Pos 類 (1-PosA) を対象とした。Pos 変換酵素活性については、各組織から粗酵素を調製し、上記の各種 Pos 類を基質として反応を行い、Pa 類の生成量に基づいて活性を評価した。また、葉を対象として、生育初期 (土から芽が出始めた段階) から後期 (開花後、花が枯れた段階) まで経時的に、Pos 含有量および Pos 変換酵素活性の定量を行った。

### (2) チューリップ原種からの PosA 変換酵素の精製、酵素遺伝子単離、機能解析

生育初期の葉の粗酵素液を硫酸分画後、5 段階のカラムクロマトグラフィーに順次供することで、PosA 変換酵素を均一に精製した。精製酵素は Edman 分解法による N 末端アミノ酸配列解析に加えて、トリプシン消化物の LC-MS/MS 解析に供し、部分アミノ酸配列を取得した。LC-MS/MS 解析に先立ち、*T. turkestanica* 葉の RNA-seq 解析を行い、MASCOT server を用いて MS/MS データを RNA-seq データベースに対して検索することで、部分アミノ酸配列の取得と候補遺伝子配列の同定を行った。これによってピックアップされた候補遺伝子配列に基づいて、葉から調製した mRNA に対して RT-PCR を行うことで、*TtTCEA1* と命名した新規遺伝子 cDNA を単離した。併せて、ゲノム PCR によってゲノム配列のクローニングも行った。次に、*TtTCEA1* の成熟ポリペプチド領域を大腸菌で発現させ、組換え酵素を調製した。His-tag を利用した金属アフィニティー精製、トロンピンによるタグ領域の切断、およびゲルろ過クロマトグラフィーによって、タグを含まない組換え酵素を均一に精製し、基質特異性や反応速度パラメーターを含む酵素学的諸性質の解析を行った。また、開花期の植物体の各組織、ならびに葉の生育過程における *TtTCEA1*

遺伝子の転写レベルを定量 RT-PCR によって解析した。

#### (3) チューリップ原種からの PosB 変換酵素の精製、酵素遺伝子単離、機能解析

開花期の葉の粗酵素液を硫酸分画後、4 段階のカラムクロマトグラフィーに順次供することで、PosB 変換酵素を均一に精製した。(2)と同様に部分アミノ酸配列解析を行い、RNA-seq データベースからピックアップされた候補遺伝子配列に基づいて、葉から調製した mRNA に対して RT-PCR を行うことで、*TtTCEB1* および *TtTCEB2* と命名した新規遺伝子 2 種の cDNA を単離した。併せて、ゲノム PCR によってゲノム配列のクローニングも行った。*TtTCEB1* と *TtTCEB2* それぞれについて、(2)と同様に成熟ポリペプチド領域を大腸菌で発現させ、タグを含まない組換え酵素を均一に調製し、基質特異性や反応速度パラメーターを含む酵素学的諸性質の解析を行った。また、(2)と同様に、*TtTCEB1* と *TtTCEB2* 遺伝子の転写レベルの定量 RT-PCR による解析を行った。

#### (4) ユキヤナギからの Pos 変換酵素の精製

バラ科シモツケ属植物であるユキヤナギの枝葉部から粗酵素を調製し、6-PosA または 6-PosB を基質とした Pos 変換酵素活性の測定を行った。当初、全く酵素活性を検出することができなかったため、酵素抽出時に種々の安定化剤の添加を検討することで、安定的に酵素を抽出、活性測定できる条件を確立した。その上で、PosA 変換酵素の精製を行った。粗酵素を硫酸分画後、5 段階のカラムクロマトグラフィーに順次供することで、PosA 変換酵素を精製した。

### 4. 研究成果

#### (1) チューリップ原種における Pos 含有量および Pos 変換酵素活性の定量

開花期の各組織における Pos 類の含有量を HPLC 分析によって定量した。PosA 変換酵素の基質となる Pos 類については、6-PosA は葯、葉、雌しべ、花糸、根の順に高かったが、PosD は雌しべ、花糸、葉、葯、茎の順に高く、6-PosA と PosD の含有量の対応はみられなかった。PosB 変換酵素の基質となる Pos 類についても、6-PosB は雌しべ、花糸、花弁、葉、茎の順に高かったが、PosF は葉、雌しべ、茎、花弁、花糸の順に高く、6-PosB と PosF の含有量の対応はみられなかった。また、球根と根を除く組織においては 1-PosA も検出されたが、その含有量は他の Pos 類と比べると有意に少ないものであった。

次に、開花期の各組織における PosA および PosB 変換酵素活性 (A 活性、B 活性) を測定した。両酵素活性とも雌しべ、花糸、花弁の順に高く、葉以外のすべての組織において B 活性よりも A 活性の方が高かった。両酵素活性の比が組織間で異なることから、原種においても栽培品種と同じく、PosA 変換酵素と PosB 変換酵素の少なくとも 2 種類が存在することが強く示唆された。

原種チューリップは特に花部組織が小さいため、目的の Pos 変換酵素活性が高い組織であっても酵素精製材料として大量の組織を採取することが難しい。そこで、上記の酵素活性測定の結果、有意レベルの A、B 両活性が検出され、なおかつ組織が大きくサンプル採取が容易な葉を酵素精製の対象とすることとした。生育初期から後期にかけて 1 週間毎にサンプリングした葉サンプルについて、Pos 類の含有量を定量した結果、6-PosB と PosF については、経時的に減少する傾向がみられたが、6-PosA は逆に開花期まで徐々に増加する傾向がみられた。1-PosA と PosD は生育期間を通して低レベルでほぼ一定を保っていた。

葉の生育過程における Pos 変換酵素活性を測定した結果、A 活性は生育期間を通してほぼ一定を保っていたのに対して、B 活性は生育初期に高く、その後経時的に減少する傾向がみられた。また、葉では生育期間を通して A 活性よりも B 活性の方が数倍程度高かった。

#### (2) チューリップ原種からの PosA 変換酵素の精製、酵素遺伝子単離、機能解析

生育初期の葉 100 g から粗酵素を抽出後、硫酸分画を含む 6 段階の精製ステップを経て、精製倍率 553 倍にて PosA 変換酵素を均一に精製した。本酵素のサブユニット分子質量は 35 kDa、ネイティブ分子質量は 82 kDa と見積もられたことから、本酵素は栽培品種の酵素と同様に二量体酵素であると推定された。本酵素は 6-PosB よりも 6-PosA に対して有意に高い活性を示すことが確認された。また、本酵素はジアシル型 Pos 類である PosD および PosF を基質として Pa 類と 1-PosA を生成する活性も有していた。基質特異性検討の結果、本酵素は Pos 類の 6 位側鎖のみに作用し、6-PosB よりも 6-PosA を良い基質とするが、モノアシル型 Pos 類よりもジアシル型 Pos 類をより良い基質とすることが分かった。この性質は栽培品種由来の PosA 変換酵素と同様であったことから、原種、栽培品種を問わず PosA 変換酵素としての固有の性質であると考えられた。

精製酵素の部分アミノ酸配列解析を経て行った葉からの PosA 変換酵素遺伝子のクローニングの結果、*TtTCEA1* と命名した新規遺伝子が得られた。大腸菌において発現・精製した組換え酵素は、天然型酵素と同様に二量体を形成し、その酵素活性も天然型酵素と同等であった。また、定量 RT-PCR 解析の結果、*TtTCEA1* 遺伝子の転写レベルは、(1)における酵素活性と良い一致を示

すことも確認された。

TtTCEA1 酵素の一次配列は栽培品種の PosA 変換酵素と同じくカルボキシルエステラーゼファミリーに属することが明らかとなった。このことから、同属異種植物であるチューリップ栽培品種と原種における PosA 変換酵素は、共通祖先に存在していた祖先型酵素が種分化に伴って分岐進化したものである可能性が強く示唆された。

#### (3) チューリップ原種からの PosB 変換酵素の精製、酵素遺伝子単離、機能解析

開花期の葉 100 g から粗酵素を抽出後、硫酸分画を含む 5 段階の精製ステップを経て、精製倍率 29 倍にて PosB 変換酵素を均一に精製した。本酵素のサブユニット分子質量は 52 kDa であり、栽培品種由来の酵素 (45 kDa 程度) とは大きく異なっていた。また、本酵素はゲルろ過において排除体積で溶出されたため正確なネイティブ分子質量を求めることができなかったが、サブユニット数十個からなる巨大分子を形成していることが分かった。これは、二量体を形成する栽培品種の PosB 変換酵素や、(2)における原種の PosA 変換酵素にはみられなかった特徴である。本酵素は 6-PosA よりも 6-PosB に対して有意に高い活性を示すことが確認された。また、本酵素はジアシル型 Pos 類である PosD および PosF を基質として Pa 類と 1-PosA を生成する活性も有していた。基質特異性検討の結果、本酵素は、(2)の PosA 変換酵素と同様に、Pos 類の 6 位側鎖のみに作用し、6-PosA よりも 6-PosB を良い基質とするが、モノアシル型 Pos 類よりもジアシル型 Pos 類をより良い基質とすることが分かった。以上のことから、この性質は、原種、栽培品種を問わず Pos 変換酵素としての固有の性質であると考えられた。

精製酵素の部分アミノ酸配列解析を行って行った葉からの PosB 変換酵素遺伝子のクローニングの結果、TtTCEB1 および TtTCEB2 と命名した新規遺伝子 2 種が得られた。大腸菌において発現・精製した組換え酵素は、天然型酵素と同様に多量体を形成し、その酵素活性も天然型酵素と同等であった。多量体形成が組換え酵素においても再現されたことから、これは原種の PosB 変換酵素固有の性質であることが強く示唆された。定量 RT-PCR 解析の結果、TtTCEB1 遺伝子の転写レベルは TtTCEB2 遺伝子の転写レベルよりも有意に高いものであったことから、原種の PosB 変換酵素の多量体構造は、主に TtTCEB1 がコードするポリペプチドによって形成されていることが示唆された。

TtTCEB1 および TtTCEB2 酵素の一次配列は栽培品種の PosB 変換酵素と同じくカルボキシルエステラーゼファミリーに属することが明らかとなった。このことから、(2)の結果と併せて、同属異種植物であるチューリップ栽培品種と原種における Pos 変換酵素は、共通祖先に存在していた祖先型酵素が種分化に伴って分岐進化したものである可能性が強く示唆された。

#### (4) ユキヤナギからの Pos 変換酵素の精製

バラ科シモツケ属植物であるユキヤナギの枝葉部から粗酵素を調製し、6-PosA または 6-PosB を基質とした Pos 変換酵素活性の測定を行った。チューリップと同様に調製した粗酵素においては、当初全く酵素活性を検出することができなかったことから、酵素の不安定性ならびに抽出液中の夾雑物による酵素活性の阻害が考えられた。そこで、酵素抽出時に種々の安定化剤の添加を検討した結果、安定的に酵素を抽出、活性測定できる条件を確立することができた。その際、B 活性に比べて A 活性が有意に高かったことから、まず PosA 変換酵素の精製を行った。粗酵素を硫酸分画後、5 段階のカラムクロマトグラフィーに順次供することで、PosA 変換酵素を精製した。現在 (本報告書作成時点) 酵素学的諸性質の解析を進めているところである。今後、当該酵素遺伝子の単離と並行して PosB 変換酵素の精製を進めていく予定である。さらに、本研究の期間内に着手できなかったユリズイセン科植物における Pos 変換酵素の同定も進めていく必要がある。これによって、単子葉植物 (ユリ科とユリズイセン科) と双子葉植物 (バラ科) における Pos 変換酵素が分岐進化と収束進化のいずれの過程を経て獲得されたものであるのかが明らかとなる。これは、Pos/Pa 生合成系に限らず、科を横断して存在する同一の植物二次代謝産物の生合成系がどのような分子進化過程を経て獲得されたか、という根源的な問いに対する回答を与える重要な知見となると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Taiji Nomura, Ryo Kuchida, Naoki Kitaoka, Yasuo Kato	4. 巻 82
2. 論文標題 Molecular diversity of tuliposide B-converting enzyme in tulip ( <i>Tulipa gesneriana</i> ): identification of the third isozyme with a distinct expression profile	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 810-820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2018.1438170	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Taiji Nomura, Shinjiro Ogita, Yasuo Kato	4. 巻 188
2. 論文標題 One-step enzymatic synthesis of 1-tuliposide A using tuliposide-converting enzyme	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Biochemistry and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 12-28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12010-018-2903-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yasuo Kato, Takashi Futanaga, Taiji Nomura	4. 巻 29
2. 論文標題 Substrate specificity of tuliposide-converting enzyme, a unique non-ester-hydrolyzing carboxylesterase in tulip: Effects of the alcohol moiety of substrate on the enzyme activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 664-667
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2018.12.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Taiji Nomura, Shinjiro Ogita, Yasuo Kato	4. 巻 75
2. 論文標題 Isolation and identification of tuliposides D and F from tulip cultivars	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Zeitschrift für Naturforschung C	6. 最初と最後の頁 7-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1515/znc-2019-0123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taiji Nomura, Yasuo Kato	4. 巻 75
2. 論文標題 Identification of tuliposide G, a novel glucoside ester-type tuliposide, and its distribution in tulip	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Zeitschrift fur Naturforschung C	6. 最初と最後の頁 75-86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1515/znc-2019-0176	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 加藤康夫、中川恵蔵、近堂菜月、北岡直樹、野村泰治
2. 発表標題 チューリップシド/チューリップパリン類の抗細菌活性の精査
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 二永貴、野村泰治、北岡直樹、加藤康夫
2. 発表標題 チューリップシド変換酵素の基質認識におけるアルコール部位の影響
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部第183回例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野村泰治
2. 発表標題 植物二次代謝酵素の機能分化：加水分解反応を触媒しないエステラーゼ「チューリップシド変換酵素」の発見と有用物質生産への応用
3. 学会等名 東北大学大学院工学研究科応用生命化学セミナー「植物特化代謝研究の新潮流」
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野村泰治、山口航平、荻田信二郎、加藤康夫
2. 発表標題 チューリップにおけるジアシル型チューリップシド類の存在
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 二永貴、野村泰治、北岡直樹、加藤康夫
2. 発表標題 アシル側鎖末端deoxy型基質によるチューリップシド変換酵素の阻害
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤康夫、二永貴、北岡直樹、野村泰治
2. 発表標題 チューリップシド変換酵素の基質認識におけるアルコール部位の影響
3. 学会等名 第21回生体触媒化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuo Kato, Taiji Nomura
2. 発表標題 Substrate specificity of tuliposide-converting enzyme, a unique non-ester-hydrolyzing carboxylesterase in tulip: effects of the alcohol moiety of substrate on the enzyme activity
3. 学会等名 1st Japan-Germany-Switzerland Workshop for Enzyme Technology and Bioprocess Development
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田真子、野村泰治、北岡直樹、加藤康夫
2. 発表標題 巨大植物二次代謝酵素の発見：チューリップ原種からのチューリップシドB変換酵素の精製および性状解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 関西・中部支部2019年度合同神戸大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野村泰治
2. 発表標題 植物二次代謝酵素の機能分化：加水分解反応を触媒しないカルボキシルエステラーゼ「チューリップシド変換酵素」の発見と応用
3. 学会等名 京大大学生存圏研究所特別講義（植物二次代謝）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野村泰治、上田真子、北岡直樹、加藤康夫
2. 発表標題 チューリップ原種からのチューリップシドA変換酵素の精製および性状解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上田真子、野村泰治、北岡直樹、加藤康夫
2. 発表標題 巨大植物二次代謝酵素の発見：チューリップ原種からのチューリップシドB変換酵素の精製および性状解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	加藤 康夫  (Kato Yasuo)  (20254237)	富山県立大学・工学部・教授    (23201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------