

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20780078

研究課題名(和文) 新奇テルペン合成酵素の構造と機能に関する研究

研究課題名(英文) Terpene synthases and terpene-modifying enzymes: structure, catalytic mechanism, and application.

研究代表者

伊藤 創平 (ITO SOHEI)

静岡県立大学・生活健康科学研究科・助教

研究者番号：70372836

研究成果の概要(和文)：植物が産生するテルペン類は、数千種類以上あるとされる。基質となるプレニル二リン酸、テルペン合成酵素、そしてテルペンを修飾する酵素が各々複数存在する事により、テルペンの多様性が生じている。われわれは、柑橘、茶等の植物から、多数のプレニルトランスフェラーゼ、テルペン合成酵素、そしてテルペン修飾酵素(テルペンアルコール脱水素酵素)をクローニングし、その特異性を決定した。特に、テルペンアルコール脱水素酵素と基質との複合体の結晶構造を、所属するファミリーの酵素の中で初めて解析することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Plants produce many thousands of terpenes for certain essential physiological roles. The enormous number and diversity of terpenes in plants is thought to arise from diversities of precursor-producing enzymes, terpene synthases and terpene-modifying enzymes. We performed identification, cloning, and characterization of these enzymes from *Citrus unshiu*, *Camellia sinensis*, etc. Especially, we determined the structure of terpene alcohol dehydrogenase complexed with substrate and coenzyme.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用生物化学

キーワード：タンパク質工学 X線結晶構造解析 モノテルペン合成酵素 セスキテルペン合成酵素 シンナミルアルコール脱水素酵素

1. 研究開始当初の背景

植物が産生するテルペン類は、テルペン合成酵素によって産生され、植物に耐熱性、活性酸素種耐性、光防護作用、抗菌・抗酸化作用をもたらし、食品の質を決める重要

な因子でもある。また、自ら移動できない植物は、生存戦略すなわち他の植物、益虫、害虫とコミュニケーション(Volatile Communication)をとる手段として β -ミルセン等の揮発性テルペンも利用している。

さらに、ヒト体内に取り込まれると代謝産物が直接脳に作用することで容易に脳内神経伝達物質に変動をもたらすリラックス・不安解消効果をもたらす等、テルペンが関与する研究分野は多岐にわたる。先に行われたゴードン会議 (Floral & Vegetative Volatiles) でもテルペン、特に炭素数 15 個 (C15) 以下の揮発性テルペンは話題の中心であった。静岡の特産品である茶や温州ミカンをはじめとする柑橘類の香りもまた、ストレス緩和作用や抗鬱作用があるといわれ、その精油成分中には 40 種類以上のテルペノイド (C10-C15) が含まれる。なお、テルペノイドは C5 イソプレネン単位に由来する GPP (ゲラニルピロリン酸) や FPP (ファルネシルピロリン酸) といったピロリン酸エステルから産生される。

2. 研究の目的

我々は、10 種の異なる柑橘の mRNA やゲノム DNA から新規テルペノイド合成酵素遺伝子のスクリーニングをする過程で、非天然型で細胞内での存在自体が不明である NPP (ネリルピロリン酸) を基質とするモノテルペン合成酵素があることを見出した。また、茶の香りには、モノテルペン及びその誘導体が多く含まれ品質を左右しているが、モノテルペン合成酵素を含め、その生合成に関わる酵素に関する報告は少ない。またレモンマートルという植物にはテルペンの一種であるシトラールが、多量に葉に含まれるが、その生合成に関わる酵素は未知であった。そこで、テルペンの前駆体を合成する短鎖プレニルトランスフェラーゼ、テルペン合成酵素、及びテルペンを修飾する酵素に焦点を当て、研究を行った。

3. 研究の方法

種々のサンプルの mRNA やゲノム DNA から各種酵素遺伝子を、Homology-based PCR 法、5' -RACE 法、3' -RACE 法、TAIL-PCR 法等を用いて増幅し、異種発現系にて大量発現させた。発現させた酵素を精製後、基質特異性など酵素学的性質の決定を行った。各遺伝子の発現量の確認を Real-time PCR 法、また反応機構を分子で解析するため、部位特異的変異体の作製、結晶化及び X 線結晶構造解析を試みた。

4. 研究成果

(1) 柑橘類のプレニルトランスフェラーゼ

温州ミカンの未熟果より 6 種類のプレニルトランスフェラーゼ (GPPS) のクローニングに成功した。GPPS はアミノ酸配列とサブ

ユニット構造の違いから 3 つのグループに分類されるが、それら 3 つのグループそれぞれに属する酵素をクローニングすることができた。1 つ目のグループは、現在まだ報告された酵素の少ないグループで、ここに属する酵素を CuGPPS1 とした。CuGPPS1 は IPP と DMAPP から GPP と少量のファルネシルニリン酸 (FPP) とゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP) を生成したが、その活性は非常に低かった。また配列から CuGPPS1 はミトコンドリア局在と予想され、モノテルペン合成には関与していないと思われる。2 つ目のグループはホモダイマーの GPPS が属するグループで、GGPPS と配列が似ていることが特徴である。このグループに属する酵素を CuGPPS2, 3 とした。両者は共に GPPS 活性を示したが、活性の強さは大きく異なっていた。特に活性の強い CuGPPS3 は、配列からモノテルペン合成が行われるプラスチド局在であると予測され、モノテルペン合成に関与している可能性が示唆された。またこれと似た配列を持ついくつかの酵素がジャスモン酸によって発現誘導されることから、特に植物の防御に関わるモノテルペン合成への関与が予想される。最後の 3 つ目のグループはラージサブユニット (LSU) とスモールサブユニット (SSU) からなるヘテロダイマーの GPPS のグループである。このグループでは SSU と 2 種の LSU が得られた。SSU 単独では GPPS、LSU 単独では GGPPS 活性を示したが、その活性は弱く、両者をあわせることで高い GPPS 活性が得られた。これらはプラスチド局在が予測され、精油に含まれるモノテルペン合成への関与が考えられた。

(2) NPP 依存性モノテルペン合成酵素

柑橘類より NPP 依存性という新奇な基質特異性を持つモノテルペン合成酵素のクローニングに成功したため、部位特異的変異体の作製により NPP 依存性を決定するアミノ酸残基の特定、非天然型基質を用いた反応機構の解析を行った。結果、部位特異的二重・三重変異体を作製することにより、NPP 依存性が GPP 依存性に変化し、NPP 依存性という希有な性質を決定しているアミノ酸残基を特定できた。非天然型基質への反応性は低く、反応経路の詳細な解析は今後の課題である。

(3) 茶のテルペン合成酵素

茶葉よりリナロール合成酵素のクローニングを試みた。結果、3 種のテルペン合成酵素のホモログが得られ、CsTPS1、CsTPS2、CsTPS3 と命名した。GPP、NPP、FPP を基質として反応産物を解析した結果、それぞれ、オシメン合成酵素、リナロール合成酵素、

ファルネセン合成酵素であることが分かった。しかし、CsTPS2 の活性は非常に低く、異種発現系によるミスフォールディング、もしくは機能していないホモログであることが考えられた。これら遺伝子の発現量の変化を、時期別、部位別、時間別(日周変動)、転写レベル(Real-time PCR により)で調べたが、生理学的な意義は見いだせなかった。翻訳レベルでの解析を現在進めている。

(4) シトラール合成に関する酵素

レモンマートルでモノテルペン合成酵素のスクリーニングを行ったところ、ゲラニオール及びリナロール合成酵素が個別に存在することを見出した。そこで、シトラールはアルコールデヒドロゲナーゼの一つのファミリーであるシナミルアルコールデヒドロゲナーゼ(CAD)ファミリーにより、リナロールを前駆体として産生されると考え、CADのクローニングを行った。結果、5つのCADを見出し、その特性解析及び結晶構造解析を行った。なお、CADは基質特異性が広く、テルペンアルコールを含む多様なアルコールの酸化する事ができるが、一次配列および基質特異性から ClassI(主にリグニン合成に関与)と ClassII(機能があまり特定されていない)に分類され、そのうち ClassII の CAD はゲラニオールに対して高い活性を持っていた。ClassI の CAD はシナミルアルコールなどの基質に対し高い活性を持っていたが、ゲラニオールに対する活性は低かった。ClassI の活性部位の一部を ClassII 型にすることで、ClassII よりゲラニオールに対して高い活性を持つ変異 ClassI CAD の創製に成功した。また、CADファミリーではじめて、基質、補酵素(NADH)との三者複合体の X線結晶構造解析に成功した。基質は、直接活性中心の亜鉛に配位し、補酵素からプロトンを受受するのに都合の良い位置に結合していた。

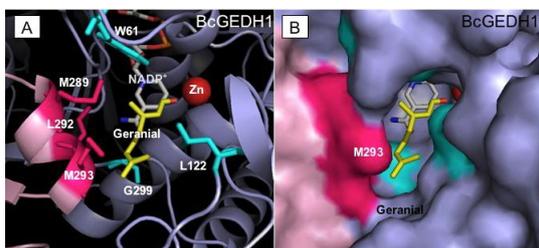


図. ClassII CAD の活性中心 A)黄色がゲラニオール、赤が亜鉛。B)分子表面図

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 7 件)

Sugiura, M*, Ito, S*[§], Saito, T., Niwa, Y., Koltunow, A. M., Sugimoto, O., and Sakai, H. Molecular cloning and characterization of a linalool synthase from lemon myrtle (accepted for publication) Biosci. Biotechnol. Biochem., 査読有, 2011, in press, *Equally contributors; [§], corresponding author

Saito, Y*, Ito, S*[§], Koltunow, A. M., and Sakai, H. Crystallization and preliminary X-ray analysis of geraniol dehydrogenase from Backhousia citriodora (lemon myrtle) Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun., 査読有, 67 巻, 2011, 665-667, *Equally contributors, [§] corresponding author

Ito, K*, Ito, S*, Shimamura, T., Weyand, S., Kawarasaki, Y., Misaka, T., Abe, K., Kobayashi, T., Cameron, A. D., and Iwata, S. Crystal Structure of Glucansucrase from the Dental Caries Pathogen Streptococcus mutans. J. Mol. Biol., 査読有, 408 巻, 2011, 177-186 *Equally contributors, [§] corresponding author

Ito K, Ito S, Shimamura T, Kawarasaki Y, Abe K, Misaka T, Kobayashi T, Iwata S., Crystallization and preliminary X-ray analysis of a glucansucrase from the dental caries pathogen Streptococcus mutans. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun., 査読有, 66 巻, 2010, 1086-1088

[学会発表] (計 22 件)

斉藤瑛介, 伊藤創平, Anna M. Koltunow, 酒井坦, レモンマートルの 5 つのアルコール脱水素酵素遺伝子のクローニングとその発現酵素の特性解析, 日本農芸化学会 2011 年度大会, 2011 年 3 月 26 日, 京都

Sakai, K., Fuchita, T., Ogawa, T., Kobayashi, E., Ito, S., and Sakai, H., Gene Expression Profiling of Some Aroma Relating Enzymes in Tea Leaves, The 4th International Conference on O-CHA (Tea), 2010 年 9 月 27 日, 静岡

Saito, Y., Ito, S., Sugiura, M., Koltunow, A. M., and Sakai, H., Characterization of key enzymes involved in citral synthesis in Lemon myrtle (*Bachhousia citriodora*), The 4th International Conference on O-CHA (Tea), 2010年9月27日, 静岡

Nagumo, K., Sakai, K., Ogawa, T., Ito, S., and Sakai, H., Cloning of Monoterpene Synthase Genes from *Camellia sinensis* and their Expression in Young Leaves, The 4th International Conference on O-CHA (Tea), 2010年9月27日, 静岡

南雲健太郎、杉浦瑞枝、伊藤創平、酒井 坦：茶 (*Camellia sinensis*) のモノテルペン合成酵素遺伝子のクローニング、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 29 日、東京

池田大樹、杉浦瑞枝、伊藤創平、酒井 坦：NPP 依存型リモネン/3-カレン合成酵素基質特異性に関する研究、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 29 日、東京

杉浦瑞枝、伊藤創平、酒井 坦：ミカン由来短鎖プレニルトランスフェラーゼのクローニングと機能解析、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 28 日、福岡

池田大樹、伊藤創平、杉浦瑞枝、鈴木康正、天野貴浩、酒井 坦：ユズ由来リモネン/3-カレン合成酵素の生産物の改変と基質特異性、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 28 日、福岡

M. Sugiura, S. Ito, H. Sakai: Geranyl diphosphate synthase from *Citrus unshiu* —cDNA cloning and functional expression—, The 2nd Nano-Biosymposium 2009, 2009 年 3 月 6 日, Shizuoka

杉浦瑞枝、丹羽康夫、Anna M. Koltunow, 杉本収、酒井 坦、伊藤創平：レモンマートル由来リナロール合成酵素遺伝子のクローニングと酵素の機能解析、第 52 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、2008 年 11 月 1

Cloning and characterization of a novel monoterpene synthase gene from *Citrus junos.*, Y. Niwa, S. Ito, T. Amano, M. Sugiura, H. Kobayashi, T. Nakayama, and H. Sakai, *Plant Biology* 2008, Mexico, 2008 年 6 月 27 日

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：組換えサビネン合成酵素及びその利用
発明者：酒井坦 伊藤創平
権利者：静岡県国立大学法人
種類：特許
番号：特願 2008-052890
出願年月日：20 年 3 月 4 日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 創平 (ITO SOHEI)

研究者番号：7 0 3 7 2 8 3 6