

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21310141

研究課題名（和文）フラボノイドの高機能化に関わるプレニル化酵素遺伝子ファミリーの機能解剖と酵素工学

研究課題名（英文）Molecular dissection of prenyltransferase family involved in flavonoid functionalization and the enzyme engineering

研究代表者

矢崎 一史（YAZAKI KAZUFUMI）

京都大学・生存圏研究所・教授

研究者番号：00191099

研究成果の概要（和文）：フラボノイド特異的なプレニル基転移酵素 SfN8DT-1 の配列を元に、さらにクララ培養細胞からイソフラボンに特異的な SfG6DT、カルコンに特異的な SfLDT を取得した。これらはいずれも、9 回の膜貫通ドメインとプラスチド配向性シグナルを持ち、ビタミン E の生合成酵素ファミリーに類似であることが判明した。またダイズのファイトアレキシン生産に重要なプレニル化酵素 GmG4DT、またマメ科以外のオオバギ（トウダイグサ科）からもそれぞれ基質ならびに生産物特異性の高い酵素をクローニングした。さらに性質の異なる SfN8DT と SfG6DT の間でキメラ酵素を作成し、基質認識部位の絞り込みに成功した。またプレニル化化合物の代謝工学を、植物および微生物ホストにおいて行った。

研究成果の概要（英文）：The first isoflavone-specific prenyltransferase SfG6DT and the first chalcone-specific one SfLDT have been cloned from cultured cells of *Sophora flavescens* by utilizing flavone-specific prenyltransferase SfN8DT-1. Both have 9 transmembrane alpha-helices and plastid-targeting signal, and by phylogenetic analysis it was turned out that all those flavonoid prenyltransferase belong to prenyltransferase family for vitamin E biosynthesis. Moreover, a new enzyme GmG4DT involved in phytoalexin biosynthesis in soybean has been identified. Beyond Leguminosae, flavonoid prenyltransferases have been isolated in *Macaranga tanarius* (Euphorbiaceae), as well. By making serial chimeric enzyme between SfN8DT and SfG6DT, a determinant region for substrate recognition could be determined. Furthermore, metabolic engineering using those enzyme genes have been carried out in plant and bacterial hosts.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：フラボノイド・プレニル化・酵素工学・膜蛋白質・プラスチド局在

1. 研究開始当初の背景
プレニル化フラボノイドは、主に薬学、農学

領域で、抗菌、抗腫瘍、抗チロシナーゼ、抗 NO 産生などの活性成分として同定されてい

たが、その種類は多岐に及び、1,000 種近い化合物が知られていた。注目すべきはそれら生理活性の多くがプレニル側鎖の存在に依存している点にある。しかし鍵となるプレニル化酵素は膜結合性であることが多く、取り扱いの困難さから過去 30 年以上もの間、遺伝子のクローニングはただの一例も報告されてこなかった。筆者は芳香族基質プレニル化酵素の研究に携わってきた過程で、フラボノイドのプレニル化酵素遺伝子をクローニングするためには、培養細胞を用いた EST 解析から最初の酵素遺伝子を突き止め、そこからこの未知な酵素ファミリー解明の扉を開くことが必須と考えた。

世界的でもアメリカ、カナダ、ドイツ、オランダなど多くの研究グループが懸命にこの種の遺伝子を追い求めているが、未だこの研究室も単離に成功していない段階であった。

2. 研究の目的

本研究では、フラボノイドなどポリフェノールの高機能化を司るプレニル化酵素ファミリーの全体像を解明することを目的とし、未解明のこの酵素群の遺伝子情報の充実を図る。次いで、それらの基質特異性や生産物特異性などの基本的酵素機能を明らかにする。さらにキメラ遺伝子の手法を用い、基質認識関わるドメインの絞り込みと、細胞内局在性など生化学的に解明し、本酵素が属するファミリーの特徴づけをする。一方で、産業界からのニーズに応えるべく、プレニル化合物の安定供給に向け、生合成工学を駆使した生産手法の基盤構築を目指す。

3. 研究の方法

研究計画は大きく 3 つの実験プログラムに分けた。

(1) 遺伝子リソースの増強。膜結合性プレニル化酵素のファミリーの中で、芳香族基質としてフラボノイドの認識にアミノ酸配列について情報集積を行う。そのために、我々がすでに持っているマメ科植物の複数の遺伝子以外に、クワ科やトウダイグサ科の代表的植物を用い、既に準備済みである EST データより、フラボノイド特異的プレニル化酵素の cDNA を網羅的に取得する。これらを出芽酵母に発現させ、その酵素機能を証明する。

(2) 変異酵素を用いた保存アミノ酸の生化学的解析。フラボノイドを基質として認識する酵素に特化して保存されるアミノ酸配列に着目し、これをホモゲンチジン酸など他の芳香族を基質とするサブファミリーの保存領域とキメラにした酵素、また部位特異的変異導入による変異酵素をシステムティックに作成し、その基質認識性を酵素活性と K_m 値により比較する。これら生化学データを蓄

積し、酵素機能と必須アミノ酸配列の情報を整理する。

(3) 形質転換酵母を用いた生産研究。膜蛋白質であることから、酵母を使ったバイオトランスフォーメーションと、リコンビナント N8DT-1 が非常に高い安定性を有することを利用し、大量発現、膜蛋白質の固定化の系を確立し、安定生産に向けて新たな可能性を開く。

4. 研究成果

(1) 遺伝子リソースの増強。フラボノイドのプレニル化酵素のアミノ酸配列情報を充実させるために、プレニル化酵素遺伝子のリソースを増やすことに注力した。まずクララの cDNA プールから、SfN8DT-1 の内部配列を用いて RACE を行い、イソフラボンに特異的な SfG6DT とカルコンに対してのみ活性を示す SfiLDT をクローニングすることに成功し、それぞれプレニル基質、フラボノイド基質両方に対して特異性が高いこと、また生産物は 1 種類しか得られないことからプレニル基の導入位置に対しても高い特異性を持つ酵素であることが明らかとした。これ以外に、ダイズから、ファイトアレキシンのグリセオリンの生合成に必須なプレニル化酵素 GmG4DT を同定した。これは、プレロカルパン骨格を持ったごく一部のフラボノイドのみに高い特異性を示した。

一方で、カルコンやナリンゲニンといったフラボノイドをはじめ、苦味酸として知られるフルログルシノールのプレニル化合物も大量に含むホップを材料とし、その雌花から cDNA ライブラリーを作成した。プレニル化合物は雌花の中でもルプリン（腺鱗）に局在しているため、ライブラリー作成には、ルプリン部分のみを集めたものを材料とし、ルプリンのマーカー遺伝子が濃縮された良質のライブラリーを作成できた。EST 解析の結果、膜結合型のプレニル化酵素をコードしていると思われる cDNA フラグメントが複数認められ、クラスタリングを行った結果、マメ科プレニル化酵素と中程度のアミノ酸相同性を有する cDNA が見出され、HIPT-1 と名付けた。RACE により、その全長 cDNA を得て、酵母、植物など様々なホスト系において高発現を試みた結果、バキュロウイルスの系でのみ発現が確認されたため、この昆虫細胞から調製したマイクロソーム画分を使って酵素機能を詳細に調べた。その結果、HIPT-1 は、基質特性が広いメンバーであり、3 種類のフロログルシノール誘導体とナリンゲニンカルコンをプレニル・アクセプター基質とすることが分かった。プレニルドナーは炭素 5 の DMAPP であり、1 つのプレニル基を導入する酵素であることが判明した。また二価カチオンに関しては、Mg に対する狭い要求性を示し

た。アサ科から初めてクローニングされたプレニル化酵素として有用な遺伝子情報となった。

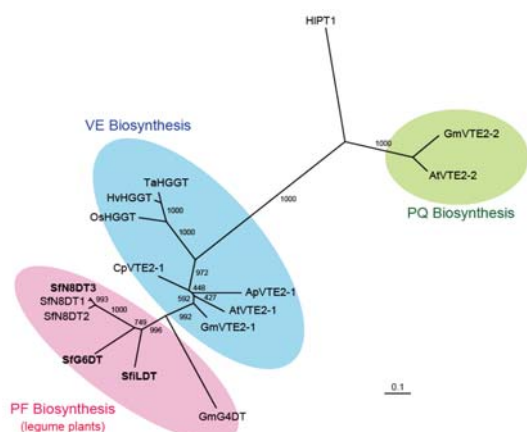


図1. 芳香族プレニル化酵素の分子系統樹

既知の膜結合型プレニル機転移酵素の分子系統樹を描いたところ、いずれもビタミンEの生合成上のプレニル基転移酵素（基質はホモゲンチジン酸）のファミリーに属したが、マメ科のプレニル化酵素は基質特異性の違いに関わらず、マメ科だけのクレードを形成した（図1、図2）。

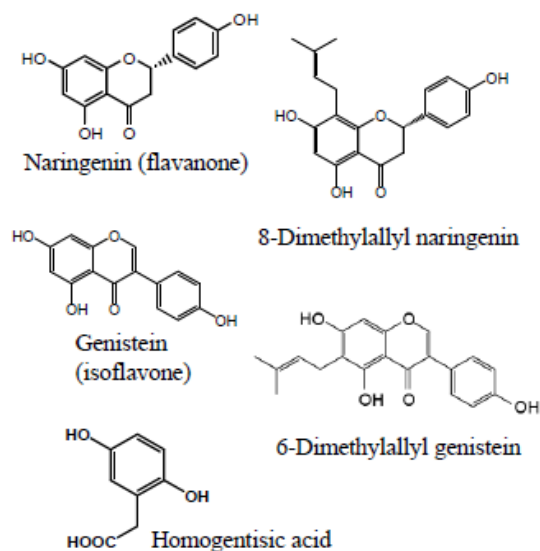


図2. 本研究で主に対象にした化合物

一方、ホップのプレニル化酵素 HIPT-1 は、ほかのフラボノイド特異的な分子種とは明らかに異なるクレードに分類された。これが HIPT-1 の特徴的な基質特異性によるものか、あるいは植物の系統分類上の距離を反映しているのかは今後の解析を待たねばならないが、今回の実績により、初めてマメ科以外

の植物種から二次代謝系のポリフェノールプレニル化に関わる酵素遺伝子が同定できたことは意義深い。なお、HIPT-1はホップの苦み成分である、フムロン、ルプロンの生合成に関わる分子種として、数十年来探索されてきた遺伝子で、産業上の意味も大きい。

これとは別に、トウダイグサ科に属する樹木であるオオバギは、果実の腺鱗に大量のプレニル化化合物を含む。この植物のプレニル化フラボノイドの特徴は、B-環にゲラニル基を有していることで、新たな科に属するプレニル基転移酵素というだけでなく、B-環特異的な酵素機能を持つクローンが得られることが期待された。この植物に関しても、同様のアプローチで、腺鱗特異的な cDNA ライブラリを作成した。これまでに、プレニル化酵素遺伝子の候補として得られた6種類のcDNAのうち、2種類でフラバノンの1種エリオジクチオールにプレニル基を導入する活性が得られた。しかし異種発現が安定ではなく、詳細な解析を行うには至っていない。しかしいずれの分子においても、膜貫通 α ヘリックスは9と予想され、トポロジーとしては他とほぼ同一であり、保存アミノ酸を含むループは膜の同じ方向に向いていることが示唆された（図3）。

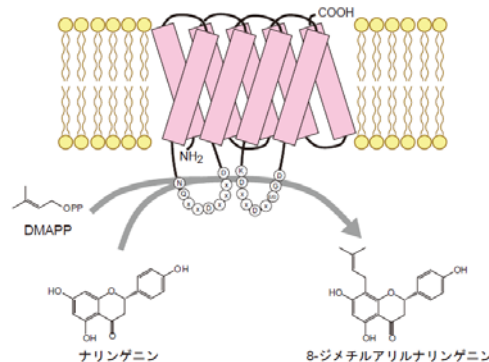


図3. プレニル基転移酵素の推定トポロジー SfN8DT の酵素反応を例示

(2) 変異酵素を用いた保存アミノ酸の生化学的解析。本ファミリーに属する酵素の分子解剖の点からは、フラバノイド特異的な SfN8DT-1 とイソフラボン特異的な SfG6DT に着目した。いずれも同一のマメ科植物クララ (*Sophora flavescens*) から得られていることに加え、どちらも DMAPP をプレニルドナーとするが、前者はフラバノンの8位のみ、後者はイソフラボンの6位のみプレニル基を導入する（図4）。

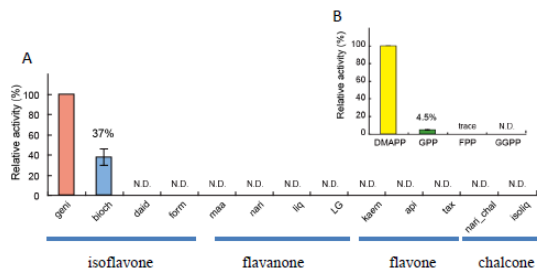


図4. SfG6DTの基質特異性

A: プレニルアクセプタ基質
B: プレニルドナー基質

そこでこれらのキメラを作ることで、基質特性あるいはプレニル位置を決定している部分が特定できるのではないかと考え、10種のキメラタンパク質を作成して酵素反応を行い、基質および生産物を解析した。なお、キメラ作成に当たって、接合部は両者で完全に同一の配列を持つ部分4か所において行った。その結果、両方の特異性を規定しているドメインとして、第5番目の膜貫通 α ヘリックスを含む約30アミノ酸の領域まで絞り込むことができた(図5)。

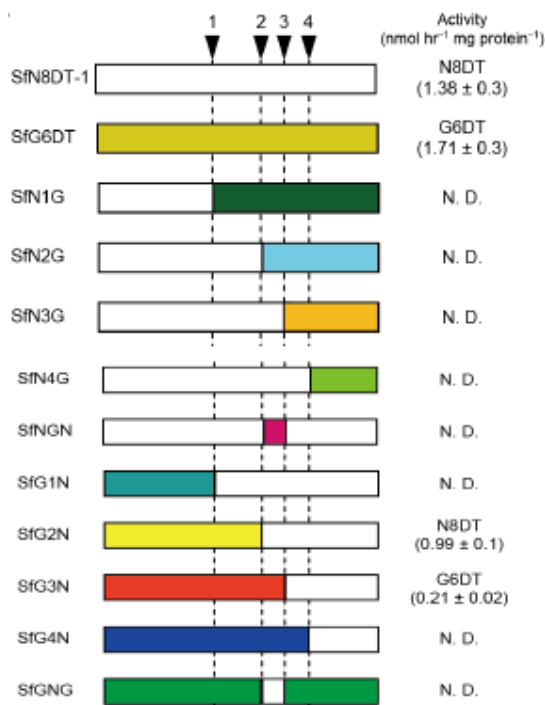


図5. N8DTとG6DTのキメラ酵素とその活性
1~4は接合部を示す。

(3) 形質転換酵母を用いた生産研究。代謝工学による生産系の構築に関して、徹底的な代謝デザインの検討により、プラスチド局在の必要性や宿主依存的な酵素機能の改

変など新たな知見を得ることができた。すなわち、ホストを微生物とした場合と高等植物とした場合の利点と欠点をまとめたが、本報告では内在性基質を使ったプレニル化合物の生産を評価するため、おもに植物をホストとした成果を記す。多くの実験例があるが、最もシステマティックに行ったのが、マメ科のミヤコグサをホストとした研究で、微生物由来の可溶性のプレニル基転移酵素と比較しながら、植物の膜結合型プレニル化酵素の生産に対する寄与を評価した。

プレニル化酵素源とした微生物は放線菌で、これら微生物の可溶性のプレニル化酵素は植物フラボノイドも基質として認識できるが、その基質特異性が非常に広いのが特徴である。用いた酵素はグラニルジリン酸(GPP)に特異的なNphB、DMAPPに特異的なSCO7190、さらに唯一フェニルプロパノイドも認識できるNovQである。植物のプレニル化酵素としては、SfN8DT-1とSfG6DTを代表に用い、すべてプロモータにはCaMV 35Sプロモータを用いてドライブした。

実験として行ったのは、プレニル化合物の生産のために必要な細胞内コンパートメントを特定するために、サイトゾル、プラスチド、ミトコンドリアと3つの細胞内局在にするよう、プレニル化酵素のN末端を改変したことである(図6)。

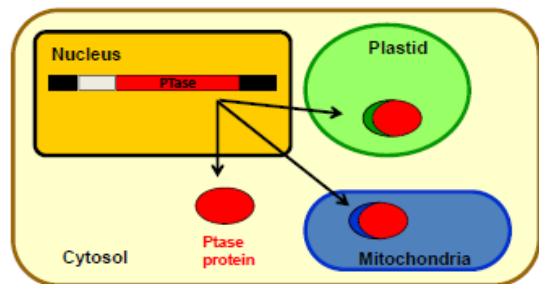


図6. プレニル化酵素を局在させた3つの細胞内コンパートメント

合計600ラインを超える形質転換体を作成して、mRNAレベル、タンパク質レベル、プレニル化合物の生産レベルにおいて詳細に検討した結果、プラスチドが、プレニル化酵素タンパク質の安定性にも、プレニル化合物の生産にも最も適していることが明らかとなった。しかし残念ながら、ミヤコグサの場合は細胞内のプレニル・アクセプタのレベルが低いいためか、プレニル化合物の生産をさせるためには基質を外部から供給せねばならなかった。

そこで、別のホストとして、トマトにプレニル基転移酵素遺伝子を導入し、発現させた。トマトは、果実にナリゲニンカルコンをアグリコンの形で大量に含むことが知られて

いる。またナリンゲニカルコンはカルコンイソメラーゼ (CHI) の働きによって容易にナリンゲニンに変わるだけでなく、この変換反応は非酵素的にも進行するため、インビボでナリンゲニンを供給できるのではないかと考えた。そこで、導入する際に、プロモータとして果実に特異的な E8 プロモータを用いることとし、ナリンゲニンが基質であることから、植物の SfN8DT-1 と、比較のため放線菌の SCO7190 にトランジットペプチドを付加したものを導入した。

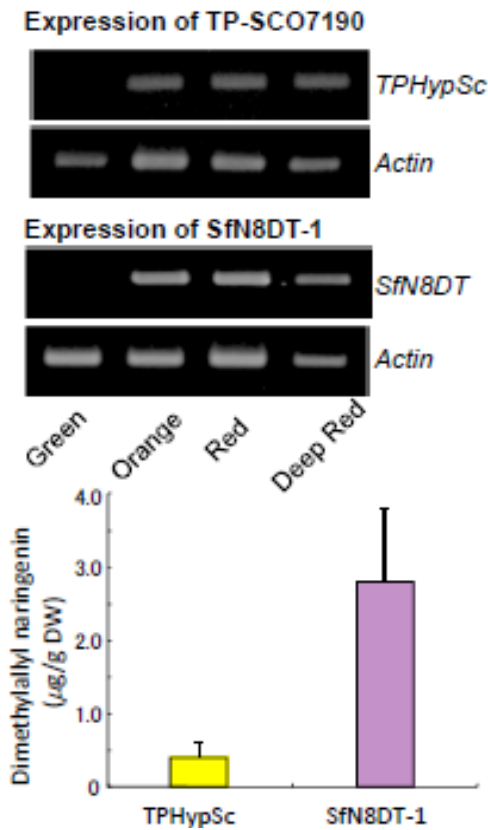


図7. 組換えトマトにおけるプレニル化酵素遺伝子の発現 (上) とプレニル化化合物生産 (下)

形質転換トマトの果実を解析したところ、これらの遺伝子発現はトマト果実の登熟に従って上昇することと、基質投与することなく 8-プレニルナリンゲニンがトマトの果実で生産されていたことが確認された (図7)。放線菌の遺伝子を用いた場合に、生産量は $0.38 + 0.2 \mu\text{g/gDW}$ であったのに対し、植物の酵素を用いた場合には $2.8 + 1.0 \mu\text{g/gDW}$ のプレニル化化合物の生成が認められた (図7)。なお、トマトはプレニル化フラボノイドを生産しないため、こうしたプレニル化ポリフェノールを生産しない植物種にプレニル化フラボノイドを生産させた代謝工学のユニークな例として、本成果は国内外で高く

評価され、多くの招待公演につながった。

興味深かったのは、大腸菌で作らせたリコンビナントの SCO7190 はフラボノイドの6位にプレニル基を導入するのに対し、トマトでこのタンパク質を発現させるとフラボノイドの3'-位にプレニル基を導入したことである (図8)。このことは、宿主生物によって、プレニル基転移酵素の生産物特異性が影響を受けたことを示唆している。この機構解明は今後の課題と考える。

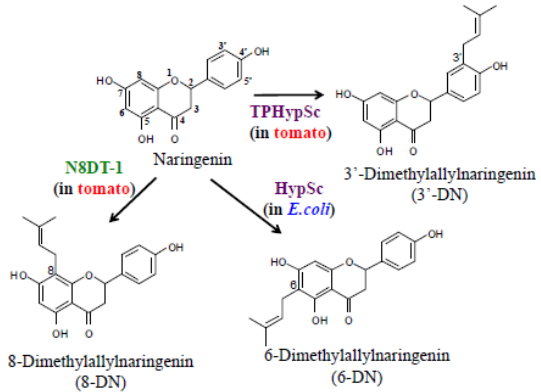


図8. 生産物特異性に与えるホストの影響

最後に、植物を宿主とした場合と微生物を宿主とした場合のプレニル化化合物の生産量を、シロイヌナズナと酵母を使ってどちらも 0.1 mM のナリンゲニン投与化で比較した。その結果、シロイヌナズナでは 9 cm プレート 10 枚当たり、約 $5 \mu\text{g/gDW}$ のプレニル化ナリンゲニンが得られたのに対し、酵母の培養物を使った場合には 30 ml 培地当たりで $10 - 15 \mu\text{g/gDW}$ の同化合物の生産が認められた。ただし、前者の場合は植物体内に生産物が蓄積したのに対し、微生物による生産の場合、プレニル化化合物はほぼ全量培地から回収される特徴があった。植物は種により基質投与を必要としない場合もあるため、単に生産量だけでは両生産系の優劣はつけがたいが、本実績は今後、プレニル化化合物の代謝工学研究を行う上で最初の定量的実験情報として役立つものと期待される。

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 10 件)

- ① Tsurumaru, Y., (6 人省略), Yazaki, K., Characterization of HIPT-1, a membrane-bound prenyltransferase responsible for the biosynthesis of bitter acids in hops, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (査読有), 417, 2012, 393-398, DOI: org/10.1016/j.bbrc.2011.11.125
- ② Sugiyama, A., (11 人略), Yazaki, K.,

- Metabolic engineering for the production of prenylated polyphenols in transgenic legume plants using bacterial and plant prenyltransferases, *Metab. Eng.*, (査読有), 13, 2011, 629-637, DOI: 10.1016/j.ymben.2011.07.003
- ③ Sasaki, K., Tsurumaru, Y., Yamamoto, H., Yazaki, K., Molecular characterization of a membrane-bound prenyltransferase specific for isoflavone from *Sophora flavescens*, *J. Biol. Chem.*, (査読有), 286, 2011, 24125-24134, DOI: 10.1074/jbc.M111.244426
- ④ Shitan, N., (5人省略), Yazaki, K., A Tolerance gene for prenylated flavonoid encodes 26S proteasome regulatory subunit in *Sophora flavescens*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, (査読有), 75, 2011, 982-984, DOI: org/10.1271/bbb.10066
- ⑤ Koeduka, T., (8人省略), Yazaki, K., Production of prenylated flavonoids in tomato fruits expressing a prenyltransferase gene from *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Plant Biol.*, (査読有), 13, 2011, 411-415 DOI: 10.1111/j.1438-8677.2010.00409.x
- ⑥ Ohara, K., Sasaki, K., Yazaki, K., Two solanesyl diphosphate synthases with different subcellular localizations and their respective physiological roles in *Oryza sativa*. *J. Exp. Bot.*, (査読有), 61, 2010, 2683-2692, DOI: 10.1093/jxb/erq103
- ⑦ Ohara, K., (5人省略), Yazaki, K., Monoterpene engineering in a woody plant *Eucalyptus camaldulensis* using a limonene synthase cDNA. *Plant Biotech. J.*, (査読有), 8, 2010, 28-37, DOI: 10.1111/j.1467-7652.2009.00461.x
- ⑧ Tsurumaru, Y., (4人省略), Yazaki, K., An aromatic prenyltransferase-like gene HIPT-1 preferentially expressed in lupulin glands of hop. *Plant Biotech.*, (査読有), 27, 2010, 199-204 DOI: 10.5511/plantbiotechnology.27.199
- ⑨ Akashi, T., Sasaki, K., Aoki, T., Ayabe, S., Yazaki, K., Molecular cloning and characterization of a cDNA for pterocarpan 4-dimethylallyltransferase catalyzing the key prenylation step in the biosynthesis of glyceollin, a soybean phytoalexin. *Plant Physiol.*, (査読有), 149, 2009, 683-693, DOI: 10.1104/pp.108.123679
- ⑩ Yazaki, K., Sasaki, K., Tsurumaru, Y., Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondary metabolites. *Phytochemistry*, (査読有), 70, 2009, 1739-1745, DOI: 10.1016/j.phytochem.2009.08.023

[学会発表] (計 12 件)

招待公演のみ記載

- ① Yazaki, K., Flavonoid-specific prenyltransferases, a membrane-bound enzyme family responsible for polyphenol diversity, 50th Phytochemical Society of North America, 14th December, 2011, Kohala Coast (Hawaii)
- ② 矢崎一史、植物の芳香族化合物の高機能化を司るプレニル化酵素、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 23 日、京都市
- ③ 矢崎一史、機能性低分子としてのプレニル化ポリフェノールと生合成工学」第 62 回日本生物工学会 2010 年 10 月 28 日、宮崎
- ④ Yazaki, K., Prenyltransferases for flavonoids in plants and the utilization of the genes to engineer tomato plant, Crop Functional Genomics, 14-16, April, 2010, Jeju Island (Korea)
- ⑤ 矢崎一史、植物の芳香族基質プレニル基転移酵素と機能性植物低分子、2010 年度日本農芸化学会大会 シンポジウム 2010 年 3 月 31 日、東京
- ⑥ 矢崎一史、生合成と蓄積に関する植物細胞の役割分担、第 46 回植物化学シンポジウム、2009 年 12 月 17 日、神戸
- ⑦ Yazaki, K., Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondary metabolites, Colloquium of the Priority Programme –Evolution of Metabolic Diversity– (SPP1152), April 3-5, 2009, Freising, Germany

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 新規のプレニル化酵素活性を有するタンパク質とそれをコードする遺伝子
 発明者: 矢崎 一史、梅基 直行
 権利者: キリンホールディングス株式会社
 種類: 出願
 番号: 特願 2009-146754
 出願年月日: 平成 21 年 6 月 19 日
 国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.rish.kyoto-u.ac.jp/W/LPGE/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢崎 一史 (YAZAKI KAZUFUMI)
 京都大学・生存圏研究所・教授
 研究者番号: 00191099