

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 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710214

研究課題名（和文）フラノクマリン生合成に関与するプレニル基転移酵素の単離と機能解析

研究課題名（英文）Isolation and characterization of prenyltransferases in furanocoumarin biosynthesis

研究代表者

肥塚 崇男（KOEDUKA TAKAO）

京都大学・化学研究所、助教

研究者番号：30565106

研究成果の概要（和文）：本研究は、植物が生産する多様な生理活性プレニル化クマリンの生合成機構の全容解明を目指しており、本生合成酵素の単離、機能解析を行った。レモン外果皮より調製した膜画分において、クマリン類を基質とする *O*-並びに *C*-プレニル化活性を検出し、プレニル化クマリン類の蓄積部位とその生合成部位が一致することを明らかにした。さらに、既知の芳香族基質プレニル基転移酵素の遺伝子配列情報をもとにミカン科から 4 種類、セリ科から 2 種類のクマリン基質プレニル基転移酵素と予想される完全長 cDNA を単離することにも成功した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we characterized the biosynthetic gene encoding to the coumarin-specific prenyltransferases to understand the molecular mechanism underlying the biosynthesis of multifunctional and bioactive prenylated coumarins that are produced in plants. We have detected both *O*- and *C*-prenyltransferase activities for coumarin substrates in the microsome fraction prepared from lemon (*Citrus limon*) peel, where large amounts of prenylated coumarins are accumulated. Moreover, we succeeded to isolate the full length of cDNAs, which would be encoding to coumarin-specific prenyltransferases, four genes from Rutaceae and two genes from Apiaceae.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：クマリン、プレニル基転移酵素、生合成

1. 研究開始当初の背景

近年、植物代謝産物であるポリフェノールの動脈硬化防止や抗酸化活性、抗腫瘍作用等

の生理活性に注目が集まり、市販の機能性食品やサプリメント、医薬品原料として産業界で広く利用されている。ポリフェノールは、

分子内に複数のフェノール性水酸基を持つ化合物の総称で、その基本骨格からフラボノイド、キサントン、クマリン、フロログルシンなどいくつかのグループに分けられる。植物が生合成するポリフェノールには、プレニル化やメチル化、配糖化されたものが多くあるが、それらは修飾される前の母核化合物にはない高い生理活性を有することが多い。特に、ミカン科やセリ科などの植物に含まれるプレニル化フラノクマリンは、修飾される前のクマリンに比べ、抗腫瘍活性、血液の抗凝固作用が増大することが知られている。しかしその生物学的重要性にも関わらず、天然資源としては希少植物を起源とすることや生成酵素が膜結合型であるため生化学的解析が遅れている。特に、クマリンを基質とするプレニル基転移酵素遺伝子の単離に関しては、未だ世界中で一例も報告がない。一方で、フラノクマリン生合成の研究は海外で古くから行われており、近年、フランスの研究グループによって(Larbat et al., J. Biol. Chem., 2009) 詳細な報告がなされた。しかしながら、フラノクマリン骨格が形成される環化の初期段階であるプレニル化反応(図 1)について明らかにしようとした例はこれまでにない。

そのような中、申請者らは、国内だけでなく世界に先駆けて揮発性フェニルプロパノイドの生合成遺伝子の単離及びその機能解析に成功している。このようなノウハウは同じフェニルプロパノイド化合物に属する(フラノ)クマリン生合成研究にも応用可能であり、プレニル化が関与するクマリン生合成経路の全容解明に大いに役立つと考えて本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究ではフラノクマリン生合成の分子機構全容の解明を目指し、(フラノ)クマリンを基質とするプレニル基転移酵素を単離同定し、以下の2つのプレニル化反応を遺伝子・タンパク質レベルで明らかにすることを目的とする。

(1) C-プレニル化反応：クマリンの環化に関わる C-プレニル基転移酵素の単離同定

フラノクマリン化合物群は大別して **Linear** 型と **Angular** 型に分類される(図 1)。これら2タイプのフラノクマリン類の生合成は、初期反応としてプレニル化が関与しており、クマリンの6位もしくは8位にプレニル基(ジメチルアシル基)が導入されることにより、

Linear 型もしくは **Angular** 型の基本骨格が形成される(図 1)。そして、これらフラノクマリンが、さらに水酸化や *O*-プレニル化、*O*-メチル化されることにより化学構造の多様性が生まれる。本研究では、フラノクマリン化学構造の多様性を制御する初期反応の *C*-プレニル基転移酵素を単離・機能解析し、多様な基質類縁化合物に対する基質認識機構を精査することでクマリン位置特異的プレニル化反応機構を解明する。さらに、これらの知見を基盤にして **Linear** 型と **Angular** 型フラノクマリン生合成の代謝制御機構を提唱することを目指す。

(2) *O*-プレニル化反応：フラノクマリンを基質とする *O*-プレニル基転移酵素の単離同定

現在までに報告されているポリフェノールプレニル基転移酵素は、芳香族基質の特異性が異なるものの全て基質の炭素原子にプレニル基を転移することで共通している。そこで、本研究では *O*-プレニル化クマリンを高蓄積するセリ科、ミカン科の植物から従前未解明の *O*-プレニル基転移酵素の単離同定を行う。そして、既知の *C*-プレニル基転移酵素に加え上記(1)で得られる酵素と遺伝子配列情報や酵素学的特性を比較し、クマリンを基質とするプレニル基転移酵素の触媒機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) プレニル化クマリン蓄積部位の同定

本研究達成には、本酵素の機能解析が必須であり、如何に効率良く候補酵素遺伝子を取得するかが鍵となる。そこで、第一段階のアプローチとしてプレニル化クマリンの組織別蓄積量を解析し、クマリン特異的プレニル基転移酵素を単離するためのリソースの最適化、決定を行うこととした。詳細な文献調査の結果、ミカン科、セリ科においてプレニル化合物の検出が多数報告されていることから、これら2種の植物を実験材料に選定し、組織別蓄積量を解析することとした。特にミカン科においては、果実にプレニル化合物の報告があることから外果皮、内果皮、果肉など詳細な組織別分析を行った。

(2) 植物粗酵素液を用いたクマリン基質プレニル化活性の機能解析

一般的に芳香族化合物を基質とするプレニル化酵素は膜タンパク質であり、二価カチオン要求性や芳香族基質の特異性に加え、プレニル基質（鎖長）に対して高い特異性を示すことが考えられている。上述（1）で求めたプレニル化クマリンが高蓄積している部位から粗酵素液を調製し、異なる芳香族基質（ベルガプトル、キサントトキソール、5-ヒドロキシ-7-メトキシクマリン、5,7-ジヒドロキシクマリン、ウンベリフェロン、5-メトキシ-7-ヒドロキシウンベリフェロン）、プレニル基質（ジメチルアリルニリン酸；DMAPP、ゲラニルニリン酸；GPP）および二価カチオン（ Mg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} ）に対する酵素活性を精査した。

（3）クマリン基質プレニル基転移酵素遺伝子の単離

上述（1）および（2）でプレニル化合物およびプレニル化活性が最も高かった組織から RNA を抽出し、縮重プライマーを用いた PCR クローニングのための出発材料とした。縮重プライマーの設計は、既知の芳香族プレニル基転移酵素の保存領域を用いた。得られた候補遺伝子のうち、その組織特異的発現がプレニル化クマリン蓄積および粗酵素液のプレニル化活性とパラレルに変動するものを選び、RACE-PCR により全長遺伝子を獲得することとした。得られた全長遺伝子については、既知のプレニル基転移酵素との遺伝子配列情報解析を行うとともに、酵母もしくはバキュロウィルス-昆虫細胞による異種発現系で組換え酵素として発現させ、タンパク質レベルでの機能解析に供する。

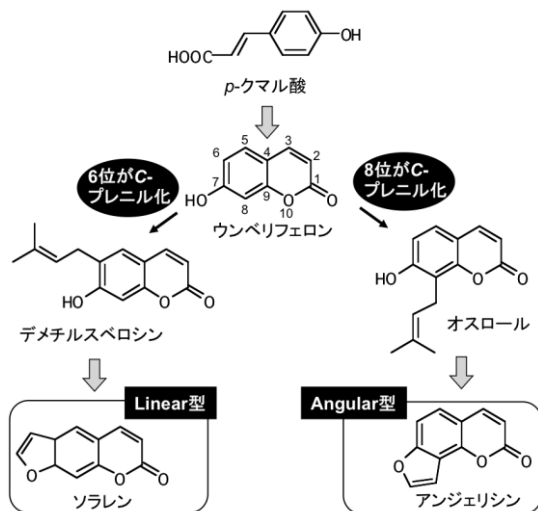


図1. C-プレニル化が関与するフラノクマリン生合成経路
灰色矢印は複数反応ステップを示す。

4. 研究成果

クマリンを高生産すると報告されている柑橘類において、プレニル化クマリンの組織別蓄積量を解析した結果、ユズ、カボス、レモン、グレープフルーツ、ライムいずれの場合においても内果皮ではほとんどプレニル化合物は検出されなかった。それに対し、外果皮ではベルガモチン、オーラプテンなどプレニル化クマリンの特異的蓄積が確認された。

そこで、レモン外果皮から超遠心分離によって調製した膜画分を粗酵素液として、プレニル化活性を測定した。芳香族基質としてベルガプトル、プレニル基質としてGPPを用いたところ、 Mg^{2+} 存在下でベルガプトルの5位水酸基がゲラニル化されたベルガモチンを生成した。このベルガプトルに対する *o*-プレニル化活性 (B50GT) は至適 pH が 7.5 であり、ベルガプトルおよびGPPに対する K_m 値がそれぞれ 140 ± 7 と $9 \pm 2 \mu M$ であった。二価カチオンに対する基質特異性を調べたところ、 Mg^{2+} (100%) が最も良い基質であり、それに引き続き Co^{2+} (56%), Ni^{2+} (54%), Mn^{2+} (31%), Fe^{2+} (25%), Zn^{2+} (8%) の順で相対活性が得られ、二価カチオン要求性は比較的広いことがわかった。一方、芳香族基質に対しては、ベルガプトル (100%) の他にキサントトキソール (98%)、5-ヒドロキシ-7-メトキシクマリン (36%) に対して活性が認められた。しかしながら、GPP の代わりに DMAPP を用いた場合や内果皮から調製した粗酵素液を用いた場合では B50GT 活性は見られなかった。一方でウンベリフェロンに対しては、8位炭素にゲラニル基を転移する活性が検出された。以上のことから、プレニル化クマリンの蓄積部位と生合成部位が一致することを明らかにした。

次にプレニル化クマリン量が最も多かった外果皮から total RNA を抽出し逆転写反応により、縮重プライマーによる PCR クローニングのための鋳型を作製した。縮重プライマーの設計には、フラボノイドを特異的にプレニル化する N8DT (Naringenin 8-dimethylallyltransferase) や G4DT (Glycinol 4-dimethylallyltransferase) など既知の芳香族プレニル基転移酵素の保存領域である膜貫通ドメインやアスパラギン酸リッチモチーフ (NQXXDXXXD) を用いた。

その結果、ホモゲンチジン酸プレニル基転移酵素 (HGGT) とアミノ酸レベルで約 50% の相同性をもつ PCR 断片 (約 300 bp) を得ることに成功した。この配列情報を基に 5' -RACE, 3' -RACE を行い、レモン外果皮から 1224bp の全長 cDNA を単離することに成功した。このレモン由来プレニル基転移酵素遺伝子は内果皮ではほとんど発現していないが、プレニル化クマリン量が多い外果皮において高発現していることが RT-PCR によって確認できた。さらに、レモンの場合と同様の手法により、プレニル化クマリンを生産するライム、ヘンルーダ、パセリ、セロリからも全長 cDNA を獲得しており、いずれの場合も HGGT とアミノ酸レベルで 50% 前後の相同性を示し、上述の膜貫通ドメインやアスパラギン酸リッチモチーフを含んでいることがわかった。得られたプレニル基転移酵素遺伝子について、バキュロウィルス-昆虫細胞発現系 (Sf9 細胞) にて発現させたが、顕著な組換えタンパク質の発現は確認できなかった。一方で、アグロバクテリウムによる一過的発現系を用いて *Nicotiana benthamiana* で発現させたところ、パセリ由来のプレニル基転移酵素はウンベリフェロンの投与によってプレニル化合物を作り出すことがわかった。

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 Munakata, R., Inoue, T., Koeduka, T., Sasaki, K., Tsurumaru, Y., Sugiyama, A., Uto, Y., Hori, H., Azuma, J., Yazaki, K., Characterization of Coumarin-specific Prenyltransferase Activities in *Citrus limon* Peel, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, (査読有) 印刷中

[学会発表] (計 6 件)

- ① 棟方涼介、井上剛史、肥塚崇男、佐々木佳菜子、鶴丸優介、杉山暁史、宇都義浩、堀均、東順一、矢崎一史、レモン果皮におけるクマリン基質プレニルトランスフェラーゼの検出と cDNA クローニング、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012/3/23、京都女子大学 (京都市)

- ② 肥塚崇男、染谷信孝、渡辺文太、松井健二、平竹潤、オイゲノール及び関連物質の抗菌活性における構造活性相関の解析、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012/3/23、京都女子大学 (京都市)

- ③ Munakata, R., Inoue, T., Koeduka, T., Sasaki, K., Tsurumaru, Y., Sugiyama, A., Uto, Y., Hori, H., Azuma, J., Yazaki, K., Studies on coumarin prenyltransferases involved in tolerance to pathogens and herbivores in lemon, International Symposium "Strategies of Plants against Global Environmental Change", 2011/12/8, 岡山大学 (倉敷市)

- ④ 井上剛史、棟方涼介、肥塚崇男、佐々木佳菜子、鶴丸優介、杉山暁史、宇都義浩、堀均、東順一、矢崎一史、レモンのクマリン基質プレニルトランスフェラーゼの単離と機能解析、日本植物細胞分子生物学会 2011 年度大会、2011/9/7、九州大学 (福岡市)

- ⑤ 井上剛史、肥塚崇男、佐々木佳菜子、鶴丸優介、杉山暁史、坂本正弘、東順一、矢崎一史、レモン由来のプレニル基転移酵素のクローニングと機能解析、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011/3/27、京都女子大学 (京都市)

- ⑥ 肥塚崇男、川崎崇、土反伸和、熊野匠人、山本秀明、佐々木佳菜子、原田英美子、杉山暁史、江面浩、葛山智久、矢崎一史、プレニル基転移酵素の過剰発現によるトマト形質転換体のフラボノイドの解析、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011/3/27、京都女子大学 (京都市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~hiratake/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

肥塚 崇男 (KOEDUKA TAKAO)
京都大学・化学研究所・助教
研究者番号：30565106

(2) 研究分担者
該当無し

(3) 連携研究者
該当無し