

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22563

研究課題名(和文)植物フェノール類に対するプレニル化酵素の位置特異性を担う触媒機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of catalytic mechanisms underlying the regio-specificity of plant aromatic prenyltransferases

研究代表者

棟方 涼介(Munakata, Ryosuke)

京都大学・生存圏研究所・助教

研究者番号：40790275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物が生産するプレニル化フェノール類は約1000種類に及び、人の健康維持・向上に貢献する生理活性を示すなど非常に有益な化合物群である。これらの機能発現にはプレニル側鎖が重要であり、この側鎖はプレニル化酵素(PT)によってフェノール母核に転移される。この時、個々の植物PTはフェノール基質の決まった位置にプレニル側鎖を転移させるという高い位置特異性を示し、この特異性が効率的物質生産の鍵となる。本研究では、植物PTの位置特異性を担う触媒機構の解明を目指した。2年の研究期間で、変異酵素の生化学的解析や3Dモデリングなどを行い、PTの位置特異性を担うアミノ酸残基の発見と制御機構解明に迫ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プレニル化フェノール類は植物において病害虫に対する化学防御に寄与する他、抗ガン活性や抗肥満活性といった人の健康維持・向上に貢献する薬理活性を示すなど、植物科学のみならず薬学・食品科学など幅広い分野で着目される化合物群である。本研究は、プレニル化フェノール類の生合成の鍵となるプレニル化酵素の触媒機構解明を目指すものである。そのため、ここで得られた成果は植物の生存戦略の理解の深化に繋がり、また有益な生理活性を有するプレニル化フェノール類の大量生産といった応用研究の基礎となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Plants produce a variety of prenylated phenolics which show bioactivities beneficial to human health, where these bioactivities are often due to prenyl side chains attached to phenolic core structures. The transfer of prenyl moieties is catalyzed by prenyltransferases (PTs), which, in general, transfer prenyl moieties with high regio-specificity. This enzymatic property is useful for efficient production of prenylated phenolics. In this study, we aimed to elucidate catalytic mechanisms underlying the regio-specificity of plant PTs. By biochemical analysis of PT mutants and 3D modeling, we were able to approach the discovery of amino acid residues crucial to the regio-specificity and the catalytic mechanism by these residues.

研究分野：植物二次(特化)代謝

キーワード：プレニル化フェノール類 プレニル化酵素 位置特異性 触媒機構 3Dモデリング

### 1. 研究開始当初の背景

植物が生産するプレニル化フェノール類は約 1000 種類に及び、病害虫に対する化学防御に寄与する他、抗ガン活性や抗肥満活性といった人の健康維持・向上に貢献する薬理活性を示すなど、非常に多機能な化合物群である(図1)[1]。これらの機能の発現にはプレニル側鎖の存在が重要であり、プレニル側鎖はプレニル化酵素(Prenyltransferase: PT)によってフェノール母核に転移される。この時、個々の植物 PT は基質認識、及びプレニル化位置対して高い特異性を示す(図1)。この特異性は植物が種特異的な化学防御壁を構築する基礎となり[2]、また PT を利用してプレニル化フェノール類を大量生産する場合にも有用な特性である。しかしながら、この特異性を示す触媒メカニズムについては未知であった。

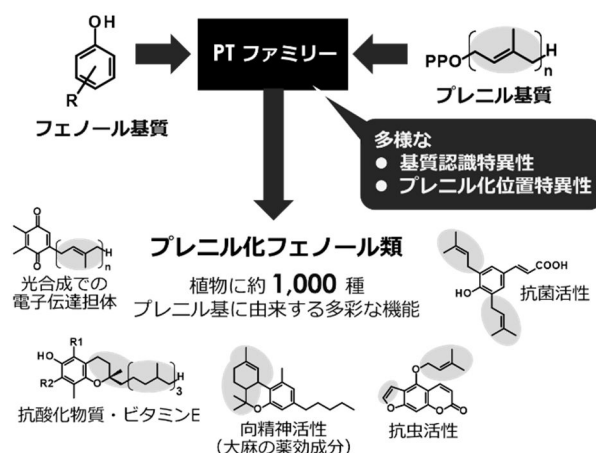


図1 植物フェノール類の高機能化を担う PT ファミリー  
個々のPTはフェノール基質、プレニル基質、及びプレニル化位置に対して高い特異性を示す。グレー背景：プレニル基に由来する炭素原子。

### 2. 研究の目的

植物 PT のプレニル化位置特異性を担う触媒機構の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

植物のフェノール類基質 PT は9つの膜貫通領域を持つタンパクであることから、結晶構造解析といった手段は困難と考えた。そこで、生化学的な酵素機能解析及び *in silico* モデリング解析によって実験を進めることとした。まず、アミノ酸配列の相同性が高いが特異性が異なる PT ペアを選定し、これらを様々な組み合わせで置換してキメラ酵素を作製する。これらの特異性を生化学的な酵素機能解析によって評価して、特異性の変化が生じたアミノ酸ドメインを特定する(図2A)。次に、重要なドメインについて両 PT

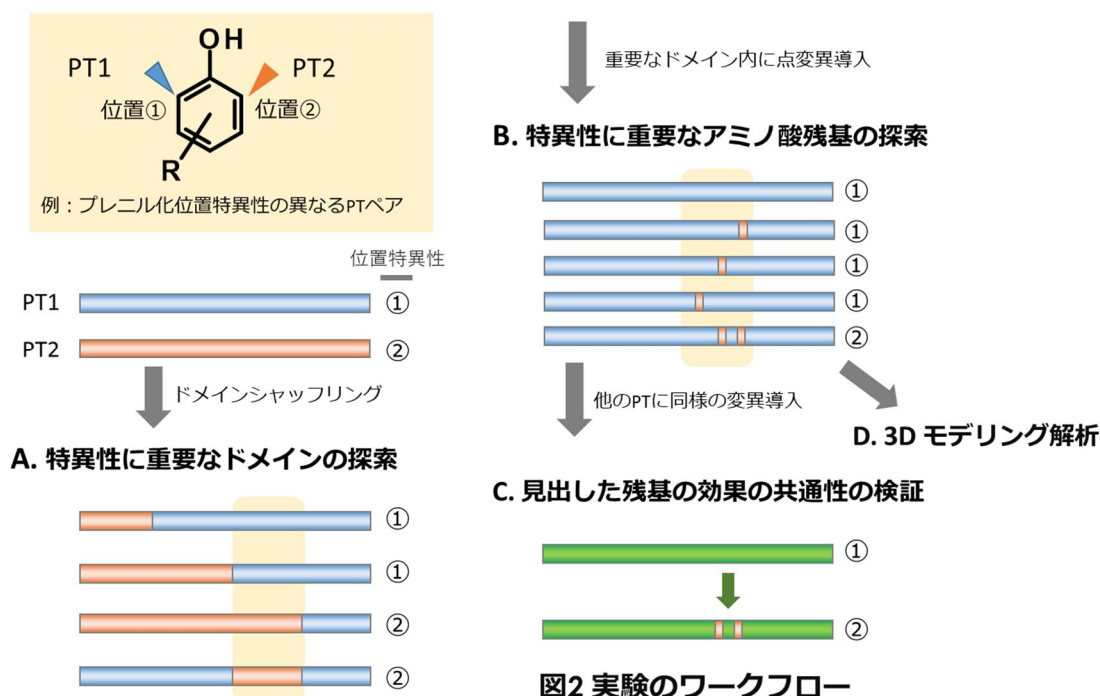


図2 実験のワークフロー

間のミスマッチ部位を残基レベルで交換することで、特異性に重要な領域をアミノ酸レベルまで絞り込む(図 2B)。また、特異性に影響のあるアミノ酸残基について他の PT でも同様の効果があるのかを検証する(図 2C)。さらに、*in silico* の 3D モデリングも組み合わせることで(図 2D)、見出したアミノ酸残基がどのようなメカニズムで特異性を制御しているのかを調べることにした。

#### 4. 研究成果

実験材料として、同じフェノール化合物を基質としてプレニル基を転移するが、互いにその転移位置(プレニル化位置特異性)が異なるという PT ペアを選定した。この PT ペアの全長を 5 つのドメインに分け、種々の組み合わせでドメインシャッフリングを行って計 30 個のキメラ酵素を作製した。本研究で独自に開発したハイスループットの酵素機能評価系によって、これらのキメラ酵素群のプレニル化位置特異性を解析した。さらに、位置特異性への影響が高かったドメインについて、PT ペアのミスマッチ部位を残基レベルで置換した変異体を作製した。得られた点変異酵素群の生化学的解析により、位置特異性を担う領域をアミノ酸残基レベルで探索した。さらに他の植物系統由来、また他の酵素活性を有する PT も用いて、候補アミノ酸残基が位置特異性に影響を及ぼしているかも調べた。上記の生化学的解析と並行して、3D モデリングも進めた。これらを始めとして、得られた研究結果は複数の国内学会で発表した。本研究の成果は植物の生存戦略の理解の深化に繋がり、また有益な生理活性を有するプレニル化フェノール類の大量生産といった応用研究の基礎となると考えられる。

#### 参考文献

- [1] K. Yazaki, K. Sasaki, Y. Tsurumaru, "Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondary metabolites", *Phytochemistry*, **70**, 1739-1745
- [2] M. Berenbaum et P. Feeny, "Toxicity of angular furanocoumarins to swallowtail butterflies: escalation in a coevolutionary arms race?", *Science*, **212**, 927-929

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 ○棟方 涼介, 高橋 宏暢, 肥塚 崇男, Alain HEHN, 矢崎 一史
2. 発表標題 植物フェノール類プレニ化酵素の位置特異性を担う触媒機構の解明に向けて
3. 学会等名 第30回イソプレノイド研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 ○韓 俊文, 棟方 涼介, 高橋 宏暢, 肥塚 崇男, Alain HEHN, 矢崎 一史
2. 発表標題 植物のフェノール基質プレニル化酵素の部位特異性を担う触媒機構
3. 学会等名 第38回日本植物バイオテクノロジー 学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○ Ryosuke MUNAKATA
2. 発表標題 Repeated evolution of furanocoumarin biosynthesis in plants
3. 学会等名 IRN France-Japan Frontiers in Plant Biology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○韓 俊文, 棟方 涼介, 高橋 宏暢, 肥塚 崇男, Alain HEHN, 矢崎 一史
2. 発表標題 植物のフェノール基質プレニル化酵素の部位特異性を担うアミノ酸残基の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会京都大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ○棟方涼介
2. 発表標題 植物二次代謝産物の高機能化を担うUbiAプレニル化酵素 ~新規遺伝子探索から酵素・代謝工学にむけて~
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（招待講演）
4. 発表年 2022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
研究協力者	高橋 宏暢  (Takahashi Hironobu)	徳島文理大学  (36102)	
研究協力者	肥塚 崇男  (Koeduka Takao)	山口大学  (15501)	
研究協力者	ヘーン アラン  (Hehn Alain)	ロレーヌ大学 / INRA e	
研究協力者	矢崎 一史  (Yazaki Kazufumi)	京都大学  (14301)	

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			
フランス	ロレーヌ大学/INRAE			