

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：23201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780120

研究課題名(和文) チューリップ耐病性二次代謝産物の活性化に関わる新規酵素系の解明

研究課題名(英文) Elucidation of novel enzymatic system involved in the activation of the defensive secondary metabolites in the tulip

研究代表者

野村 泰治 (NOMURA, Taiji)

富山県立大学・工学部・助教

研究者番号：40570924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、チューリップにおける主要二次代謝産物であるチューリップシド(Pos)類をアグリコンのラクトン化体である抗菌活性物質チューリップパリン(Pa)類へと変換する酵素系の解明を目的とした。主要Pos類であるPosAおよびPosBはそれぞれに対応するPosA変換酵素とPosB変換酵素によって、PaAおよびPaBへとそれぞれ変換されることが分かった。本酵素は加水分解酵素であるカルボキシルエステラーゼと高い配列相同性を有していたが、加水分解反応は全く触媒せず、分子内エステル転移によるラクトン形成反応のみを触媒する非常にユニークな酵素であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： This study was performed to identify the enzymes involved in the conversion of tuliposides (Pos), the major secondary metabolites in tulip, to antimicrobial tulipalins (Pa), the lactonized aglycons of Pos. I found that PosA and PosB, which are the major forms of Pos in the tulip cultivar, are converted to the corresponding PaA and PaB by PosA-converting enzyme and PosB-converting enzyme, respectively. Amino acid sequences of those enzymes were similar to the carboxylesterases, which typically catalyze hydrolysis reactions. However, the Pos-converting enzymes catalyzed no hydrolysis of Pos, but the formation of Pa through lactonization. Pos-converting enzymes were identified as the unique lactone-forming carboxylesterases, specifically catalyzing intramolecular transesterification.

研究分野：植物生化学、生物有機化学、植物分子生物学

科研費の分科・細目：農芸化学(生物生産化学・生物有機化学)

キーワード：チューリップ チューリップシド チューリップパリン チューリップシド変換酵素 カルボキシルエステラーゼ 二次代謝 生合成 酵素

1. 研究開始当初の背景

糖エステル化合物であるチューリップシド(Pos)類はチューリップにおける主要二次代謝産物である。主要化合物種は PosA と PosB であり、各々のアグリコンのラクトン化体はチューリップリン(Pa)A および PaB とよばれる。Pos 類は生理活性を有していないが、Pa 類は抗菌、殺虫などの様々な生理活性を示すことから、Pos から Pa への変換はチューリップの生体防御において重要な役割を担っていると考えられる。

Pos 類は試験管内では中性以上の pH において非酵素的に Pa 類へと変換されるが、植物体内には Pos 類が大量に蓄積している一方で、Pa 類は微量しか検出されない。そこで、この Pos (貯蔵型) から Pa (活性型) への変換反応は生体内では酵素によって触媒されているのではないかと、との仮説のもと、酵素学的見地から解析が進められた結果、この反応を特異的に触媒する酵素「Pos 変換酵素」が当研究室において発見され、Pos から Pa への変換反応は生体内でも自発的に起こっているという定説を覆すに至った。この発見によって、チューリップ植物体における Pos→Pa 変換系の全容解明のためには、本変換系に関わる酵素・酵素遺伝子の同定や機能解析によって、生化学および分子生物学的基盤を一から構築する必要性が生じた。

2. 研究の目的

本研究では、Pos→Pa 変換系に関与する酵素および酵素遺伝子を全て同定した上で、酵素の反応機構、酵素の細胞内局在、酵素遺伝子の発現様式、の3点を詳細に解析し、本変換系によるチューリップの生体防御機構を組織、細胞および分子レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 花弁由来 PosA 変換酵素遺伝子の単離と機能解析

本研究の開始時点で、チューリップ花弁からの Pos 変換酵素の精製がなされていた。そこで、精製酵素の N 末端および内部アミノ酸配列を解析後、degenerate RT-PCR および RACE-PCR を行うことで、*TgTCEA* と命名した新規遺伝子 cDNA を単離した。次に、*TgTCEA* 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。金属アフィニティーおよびゲルろ過クロマトグラフィーによって組換え酵素を均一に精製し、基質特異性や反応速度論解析を含む酵素学的諸性質の解析を行った。また、開花期のチューリップ各組織における *TgTCEA* 遺伝子の転写レベルを定量 RT-PCR によって解析した。

TgTCEA 酵素の一次配列がカルボキシルエステラーゼファミリー酵素と高い相同性を

示したことから、同ファミリー酵素で保存性の高いアミノ酸残基(HGGモチーフ中の Gly、触媒三つ組残基を構成する Ser, Asp, His) に変異を導入した組換え酵素を大腸菌で発現させ、酵素活性を測定することで、これらアミノ酸残基の触媒過程への関与を検証した。

(2) 球根由来 PosA 変換酵素遺伝子の単離と機能解析

花弁から単離された *TgTCEA* 遺伝子の転写レベルをチューリップの各組織において調べたところ、球根においてのみ全く発現がみられなかったことに加え、以前に球根から精製された Pos 変換酵素の性状が花弁から精製されたものとは異なっていたことから、球根特異的に発現している Pos 変換酵素アイソザイム遺伝子の存在が強く示唆された。そこで、球根からの同酵素遺伝子の単離を行った。球根精製酵素の部分アミノ酸配列に基づいた degenerate RT-PCR および RACE-PCR を経て、新規遺伝子 *TgTCEA-bl* cDNA を単離した。次に、(1)と同様に大腸菌で発現させた組換え酵素の性状解析およびチューリップ組織における遺伝子発現様式の解析を行った。

(3) PosB 変換酵素の精製、酵素遺伝子の単離および機能解析

高い PosB 変換酵素活性が検出される開花期チューリップの葯からの PosB 変換酵素の精製に先立ち、葯部分における酵素活性の分布を、葯組織そのものと葯に付着している花粉に分けて調べた。酵素活性の大半は花粉に由来することが分かったため、花粉を回収・凍結乾燥し(86 g DW)、酵素精製に供した。粗酵素液を硫酸分画後、各種カラムクロマトグラフィーを経て、PosB 変換酵素を均一に精製した。精製酵素の N 末端および内部アミノ酸配列を解析後、花粉から調製した mRNA に対して degenerate RT-PCR および RACE-PCR を行うことで、*TgTCEB* と命名した新規遺伝子 cDNA を単離した。次に、(1)と同様に大腸菌で発現させた組換え酵素の性状解析を行った。

(4) Pos 変換酵素の細胞内局在解析

PosA および PosB 変換酵素のいずれも、精製酵素の N 末端アミノ酸配列と cDNA クローニングに基づく全長アミノ酸配列の比較から、N 末端にシグナル配列(transit peptide: TP)を有していることが分かった。そこで、当該シグナルの C 末端に緑色蛍光タンパク質(GFP)を融合したタンパク質(TP-GFP)を発現するように設計したプラスミド DNA を作成し、パーティクルボンバードメントによってタマネギ表皮細胞に導入した。共焦点レーザー顕微鏡下で GFP の蛍光を観察することで、当該シグナルによる輸送ターゲット細胞小器官(=PosA および PosB 変換酵素の成熟ポリペプチドが局在する細胞小器官)を解析した。

4. 研究成果

(1) 花卉由来 PosA 変換酵素遺伝子の同定

チューリップ組織中に蓄積する主要 Pos 類は組織によって異なっており、球根や花卉では PosA が、根や葯では PosB が主に蓄積している。そこで、両 Pos 類を基質として、各組織から調製した粗酵素中における Pos 変換酵素活性を測定したところ、PosA と PosB に対する変換酵素活性の比は組織によって異なっており、各組織中の PosA と PosB の量比と概ね対応していることが分かった。Pos 類から Pa 類への変換反応が 1 種の Pos 変換酵素によって触媒されているのであれば、A/B 活性比は組織間で一定となるはずであるが、その比が組織によって異なっていることから、チューリップには「PosA 変換酵素」と「PosB 変換酵素」の少なくとも 2 種類の Pos 変換酵素が存在していることが示唆された。研究に先立って球根と花卉から精製されていた Pos 変換酵素は、いずれも PosA をよい基質とし、PosB に対する反応効率は PosA に対するその 1/10 程度と低いものであったことから、それを「PosA 変換酵素」と再定義した。

花卉からの PosA 変換酵素遺伝子のクローニングの結果、TgTCEA と命名した新規遺伝子が得られた。TgTCEA 酵素の一次配列はカルボキシルエステラーゼファミリータンパク質と高い相同性を示した。精製酵素の N 末端アミノ酸配列との比較によって推定されたシグナルペプチドを除いた成熟ポリペプチドを大腸菌で発現させ、組換え酵素を得た。精製された組換え酵素は、天然型酵素と同様にダイマー酵素であり、Pos を Pa へと変換する活性を有することが確認された。また、反応速度論解析の結果、PosA と PosB に対する反応効率の比 (A/B) は 22 であり、PosA を良好な基質とすることが示された。

チューリップ各組織における TgTCEA 遺伝子の発現レベルを定量 RT-PCR によって解析したところ、その発現レベルは花卉において最も高かったが、球根においては全く発現がみられなかった。このことから、球根では他組織とは異なる PosA 変換酵素アイソザイムが発現していることが示唆された。この結果は、先に花卉と球根から精製された PosA 変換酵素の分子質量や性状が異なっていることから支持されるものであった。

(2) 球根由来 PosA 変換酵素遺伝子の同定

遺伝子クローニングに先立ち、球根を構成する 4 層のりん片と最内部の花芽における PosA 変換酵素活性の分布を調べたところ、その活性は花芽にはほとんど無く、りん片において検出された。そこで、りん片 mRNA からの遺伝子クローニングを行ったところ、花卉由来の TgTCEA とアミノ酸レベルで約 77% の相同性を示す新規遺伝子 TgTCEA-b が得られた。TgTCEA-b も TgTCEA と同様に N 末端にシグナルペプチドを有していた。シグナル領

域を除いた成熟ポリペプチドを大腸菌で発現させた組換え酵素は Pos から Pa への定量的変換反応を触媒し、PosB よりも PosA に対して約 20 倍高い反応効率を示したことから、PosA 変換酵素をコードしていることが確認された。TgTCEA-b の転写レベルを組織別に調べたところ、TgTCEA-b 遺伝子は球根において有意に発現していることが確認された。本遺伝子の発現は予想したような球根特異的なものではなく、他組織においても若干の発現が認められたが、球根では TgTCEA-b のみが発現しており、それ以外の組織では TgTCEA が優先的に発現していることが分かった。すなわち、チューリップでは組織によって PosA 変換酵素アイソザイムの使い分けがなされていることが明らかとなった。

(3) Pos 変換酵素の反応機構

TgTCEA 酵素はカルボキシルエステラーゼファミリーに属する酵素であることが分かったが、典型的なカルボキシルエステラーゼはエステルを加水分解し、カルボン酸とアルコールを生成物として与える。これが TgTCEA 酵素にもあてはまるならば、PosA を基質とした酵素反応における生成物は α -メチレン- γ -ヒドロキシ酪酸 (以下、ヒドロキシ酸) とグルコースとなるはずであるが、本酵素反応ではヒドロキシ酸は生成せず、ヒドロキシ酸のラクトン化体である PaA とグルコースが化学量論的に生成する。酵素による加水分解によって生成したヒドロキシ酸が非酵素的に環化し、ラクトン化体となっている可能性が考えられたため、ヒドロキシ酸そのものを酵素反応および反応停止条件下でインキュベートしたが、非酵素的なラクトン化はみられなかった。このことから、PosA を基質とした TgTCEA 酵素による反応で生成する PaA は、基質の酵素的加水分解によって生成したヒドロキシ酸が非酵素的に環化して生成したのではなく、TgTCEA 酵素によるエステル転移反応によって直接生成していることが明らかとなった。すなわち、TgTCEA 酵素は分子内エステル転移反応によるラクトン形成を触媒する、これまでに知られていなかった新しいタイプのカルボキシルエステラーゼであることが分かった (図)。

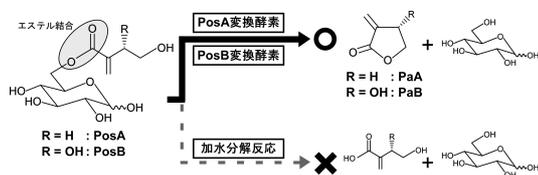


図 Pos変換酵素が触媒するPos類からPa類への変換反応

そこで、カルボキシルエステラーゼファミリータンパク質で保存性の高いアミノ酸残基 (HGG モチーフ中の Gly、触媒三つ組残基を構成する Ser, Asp, His) に変異を導入した組換え酵素を大腸菌で発現させ、酵素活性を測定したところ、いずれの変異体も酵素活性

は痕跡レベルにまで低下したことから、本酵素においても加水分解反応触媒型の典型的なカルボキシルエステラーゼと同様に、これらの保存アミノ酸が触媒過程に関与していることが分かった。

その反応機構は以下のように推定された。まず、触媒三つ組残基である Asp - His - Ser のチャージリレーによって活性化された Ser の水酸基が、基質 PosA のカルボニル炭素に求核攻撃し、HGG モチーフ中の 2 つの Gly によって安定化された四面体中間体を経由した後、グルコースが脱離することでアシル-酵素複合体が形成される。典型的なカルボキシルエステラーゼの場合は、アシル-酵素複合体に活性化された水分子が求核攻撃することで加水分解反応が進行するが、TgTCEA 酵素の場合は、水分子ではなく活性化された基質末端の水酸基がアシル-酵素複合体のカルボニル基近傍に配位されることで求核反応が起こり、環構造を形成する。その後、酵素の Ser 残基が脱離すると同時に PaA が生成する。この反応機構は以下に述べる PosB 変換酵素についても同様であると考えられる。

(4) PosB 変換酵素遺伝子の同定

開花期のチューリップ葯で検出される高い PosB 変換酵素活性について、その局在性を調べたところ、葯でみられる酵素活性の大半は葯に付着している花粉に由来することが分かった。そこで、花粉からの PosB 変換酵素の精製を行った。精製酵素は PosA 変換酵素と同様にダイマー酵素であったが、そのサブユニット分子質量は 47 kDa で、PosA 変換酵素のサブユニット分子質量（花弁由来=39 kDa、球根由来=35 kDa）とは異なっていた。本酵素は PosA をよい基質とする PosA 変換酵素とは対照的に、PosA よりも PosB に対して 150 倍程度高い反応効率を示した。このことから、Pos 変換酵素には基質 PosA と PosB に対応する PosA 変換酵素と PosB 変換酵素が存在するという当初の仮説が裏付けられた。

花粉からの PosB 変換酵素遺伝子のクローニングを行ったところ、TgTCEB と命名した新規遺伝子が得られた。TgTCEB も TgTCEA（および TgTCEA-b）と同様にカルボキシルエステラーゼファミリーに属することが分かったが、TgTCEB の一次配列は PosA 変換酵素（TgTCEA, TgTCEA-b）とは明らかに異なっており、アミノ酸レベルでの相同性は TgTCEA と 52.4%、TgTCEA-b と 53.4%であった。TgTCEB も TgTCEA や TgTCEA-b と同様に N 末端にシグナルペプチドを有していた。シグナル領域を除いた成熟ポリペプチドを大腸菌で発現させた組換え酵素は Pos から Pa への定量的変換反応を触媒し、天然型酵素と同様に PosA よりも PosB に対して約 140 倍高い反応効率を示したことから、PosB 変換酵素をコードしていることが確認された。

(5) Pos 変換酵素の細胞内局在

チューリップ植物体においては PosA および PosB 変換酵素が構成的に発現しているにもかかわらず、基質である PosA や PosB は安定的に貯蔵されている。その理由を明らかにするため、PosA および PosB 変換酵素の細胞内局在を調べた。上記の酵素精製と遺伝子クローニングによって存在が明らかになった、Pos 変換酵素 N 末端のシグナルペプチドと GFP の融合タンパク質を一過的に発現させたタマネギ表皮細胞において、GFP の蛍光は特徴的なドットとして観察され、これはプラスチド移行シグナルを融合した蛍光タンパク質の局在パターンと一致した。このことから、Pos 変換酵素はチューリップの細胞内ではプラスチドに局在していることが強く示唆された。一方、基質である Pos 類は、グルコースエステルであることや、酸性条件以外では不安定であることから、弱酸性環境にある液胞内に貯蔵されているものと考えられる。すなわち、健常植物体では Pos 類と Pos 変換酵素はそれぞれ液胞とプラスチドという異なるオルガネラに存在することで酵素反応を回避しており、感染や摂食等による細胞破砕に伴い両者が接触すると、酵素反応によって速やかに活性物質である Pa 類を生成するという防御機構が成立しているものと考えられる。酵素触媒による貯蔵物質から活性物質への変換例は、グルコシノレートや靑酸配糖体をはじめとして植物において数多く知られているが、チューリップにおいては Pos 変換酵素によって触媒される糖エステル（Pos）からラクトン（Pa）への変換反応がその化学防御において中心的役割を担っているものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Taiji Nomura, Aya Tsuchigami, Shinjiro Ogita, Yasuo Kato, Molecular diversity of tuliposide A-converting enzyme in the tulip. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77: 1042-1048 (2013) 【査読有】

DOI: 10.1271/bbb.130021

Taiji Nomura, Shinjiro Ogita, Yasuo Kato, A novel lactone-forming carboxylesterase: Molecular identification of a tuliposide A-converting enzyme in tulip. *Plant Physiology*, 159: 565-578 (2012) 【査読有】

DOI: 10.1104/pp.112.195388

野村泰治、加藤康夫、チューリップ二次代謝産物チューリップシド類の活性化に関わる新規カルボキシルエステラーゼ。 *バイオサイエンスとインダストリー*, 70: 360-364 (2012) 【査読無】

http://www.jba.or.jp/pc/archive/2012/vol70_no5.html

〔学会発表〕(計 25 件)

川上祥平、林絵美子、野村泰治、荻田信二郎、加藤康夫、Environmentally benign process for the preparation of antimicrobial tulipalin B from tulip biomass. 第 55 回日本植物生理学会年会、2014 年 3 月 18-20 日、富山大学

Yasuo Kato, Taiji Nomura, Shinjiro Ogita, Environment-conscious process for the preparation of antimicrobial tulipalin B from tulip biomass. Enzyme Engineering XXII, 2013 年 9 月 22-26 日、Toyama

野村泰治、林絵美子、川上祥平、荻田信二郎、加藤康夫、チューリップバイオマスを原料とした石油非依存的プロセスによる抗菌化合物チューリップパリン B の調製、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 24-28 日、東北大学

野村泰治、林絵美子、川上祥平、荻田信二郎、加藤康夫、チューリップバイオマスを原料とした酵素変換および石油非依存的精製プロセスによる抗菌化合物チューリップパリン B 調製法の確立、第 16 回生体触媒化学シンポジウム、2012 年 11 月 29-30 日、富山県民会館

野村泰治、土上彩、荻田信二郎、加藤康夫、チューリップにおけるチューリップポシド A 変換酵素の分子多様性、植物化学調節学会第 47 回大会、2012 年 10 月 27-28 日、山形大学

Taiji Nomura, Shinjiro Ogita, Yasuo Kato, Molecular diversity of tuliposide A-converting enzyme in tulip. 51st Annual Meeting of the Phytochemical Society of North America, 2012 年 8 月 11-15 日、Western University, London, Canada

Yasuo Kato, Shinjiro Ogita, Taiji Nomura, A novel lactone-forming carboxylesterase from tulip: molecular identification and application. Gordon Research Conference 2012 (Biocatalysis), 2012 年 7 月 8-13 日、Bryant University, Smithfield, USA

野村泰治、荻田信二郎、加藤康夫、分子内エステル転移反応によるラクトン形成を触媒する新規カルボキシルエステラーゼ：チューリップポシド A 変換酵素遺伝子のチューリップ花弁からの単離および機能解析、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 22-26 日、京都女子大学

Taiji Nomura, Shinjiro Ogita, Yasuo Kato, Molecular characterization of tuliposide A-converting enzyme in tulip. Phytochemical Society of North America 50th Anniversary Meeting, 2011 年 12 月 10-15 日、Fairmont Orchid, Hawaii, USA

野村泰治、荻田信二郎、加藤康夫、チューリップ花弁からのチューリップポシド A 変換酵素遺伝子の単離、植物化学調節学会第 46 回大会、2011 年 11 月 1-2 日、宇都宮大学

Yasuo Kato, Taiji Nomura, Shinjiro Ogita, Enzymes responsible for the action of antimicrobial secondary metabolites in tulip. 16th Japanese-German Workshop on Enzyme Technology, 2011 年 9 月 14 日、Toyama

〔産業財産権〕

出願状況 (計 6 件)

名称：チューリップポシド B をチューリップパリン B に変換する酵素活性の高いタンパク質及びそれをコードするポリヌクレオチド

発明者：野村泰治、加藤康夫、荻田信二郎

権利者：富山県

種類：特許

番号：特願 2013-195338

出願年月日：2013 年 9 月 20 日

国内外の別：国内

名称：チューリップパリン類の製造方法

発明者：野村泰治、加藤康夫、荻田信二郎

権利者：富山県

種類：特許

番号：特願 2012-250803

出願年月日：2012 年 11 月 15 日

国内外の別：国内

名称：チューリップポシド類をチューリップパリン類に変換する酵素活性を有するタンパク質及びそれをコードするポリヌクレオチド

発明者：野村泰治、加藤康夫、荻田信二郎

権利者：富山県

種類：特許

番号：特願 2012-151642

出願年月日：2012 年 7 月 5 日

国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pu-toyama.ac.jp/BR/kato/>

5. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 泰治 (NOMURA, Taiji)

富山県立大学・工学部・助教

研究者番号：40570924