

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310156

研究課題名(和文)クマリンのプレニル基転移酵素ファミリーの開拓と触媒機能の高次制御

研究課題名(英文)Discovery of coumarin prenyltransferase family and the regulation of catalytic function

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物において生理活性物質の一角をなすプレニル化クマリンは、セリ科やミカン科に広く分布する。その生合成において、鍵となるプレニル化酵素遺伝子は従前未解明であったが、本研究において、パセリ(セリ科)およびレモン(ミカン科)からクマリンに特異的なプレニル基転移酵素遺伝子を世界に先駆けて同定した。本酵素ファミリーは、9回の膜貫通ドメインを持つ疎水性のタンパク質であり、プレニル基質に対してもアクセプター基質に対しても高い特異性を示すことが示された。また酵素活性にはマグネシウムが必要で、細胞内局在は色素体であることも明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Prenylated coumarins widely occur in Apiaceae and Rutaceae. They show toxicity to herbivores and pathogens serving as protectants for plants that produce those metabolites, while those coumarin compounds show a variety of biological activities to humans, as well. Prenyltransferase, a key enzyme in the biosynthesis, has been first identified at the gene level from parsley (Apiaceae) and lemon (Rutaceae).

Prenyltransferase family for coumarins show high hydrophobicity via typically nine transmembrane alpha-helices, and they show strict specificity to both prenyl donor and acceptor substrates. For the catalytic function, Mg²⁺ is required and the subcellular localization of these membrane proteins is demonstrated to be plastids in plant cells.

研究分野：植物生化学

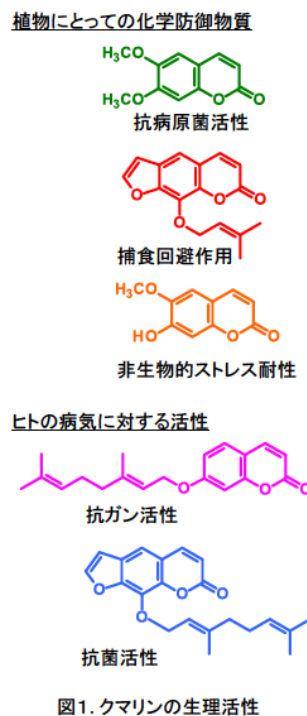
キーワード：プレニル基転移酵素 クマリン ジメチルアリルジリン酸 ゲラニルジリン酸 膜結合性酵素 色素体
局在

1. 研究開始当初の背景

プレニル化されたポリフェノール類は、生理活性物質として主に薬学、農学領域などで盛んに研究されており、その数は1,000種近くにも及び(Tahara et al., 1995; Botta et al., 2005)。その活性は、抗菌、抗腫瘍、抗チロシナーゼ、抗NO産生、エストロゲン活性など極めて多岐に及び、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(Yazaki et al. 2009)。プレニル化されるポリフェノールには、フラボノイド、クマリン、フェニルプロパン、キサントンなどが知られ、これら母核となる芳香族の種類の違いに加え、プレニル鎖長、その位置と数、プレニル側鎖の水酸化や閉環など、その多様性は生理活性にも反映されている。しかしその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最近まで30年以上もの間、遺伝子のクローニング例はただの一報も報告されてこなかった。

こうした中、応募者は2008年、基本的なフラボノイドであるナリンゲニンを特異的にプレニル化する酵素、N8DTのクローニングに世界で初めて成功した(Sasaki et al., 2008)。これにより、フラボノイドなど芳香族を基質とできるプレニル化酵素が、実はビタミンE生合成に関わる酵素蛋白質のファミリー(HPT)に属するメンバーであることが明らかとなった。この成果を皮切りに、フラボノイドを中心にして芳香族のプレニル化酵素の研究が飛躍的に進むようになった(Akashi et al., 2009.; Tsurumaru et al., 2010; Sasaki et al. 2011)。

しかしながら、これまでにクローニング例のある芳香族プレニル化酵素は、ほとんどがマメ科植物からの遺伝子である上、大部分がフラボノイド類を基質とする酵素遺伝子である。一方、クマリンなど、他の芳香族基質を認識できるプレニル化酵素に関しては、研究開始当時、論文レベルでは全く未知の状態であった。さらに、天然にはミカン科に多く見出されるクマリン類に代表されるように、様々な生理活性を示す活性物質としても認識され(図1)、またO-プレニル化フェノールが存在



するが、クローニングの報告があるプレニル化酵素はいずれもC-C結合を形成するC-プレニル化酵素にとどまっていた。

2. 研究の目的

応募者がマメ科植物から取得したN8DT1やG6DTは、それぞれフラボノイド類のフラバノンとイソフラボンに特異的な分子種であった。本研究では、この研究領域の深化と発展に取って決定的に重要なクマリンのプレニル化酵素を中心に据え、そのクローニングと、現在まで全く報告例のないO-プレニル化酵素の取得を第一目標にした。これら新しい機能的特徴を持った酵素蛋白質がどのようなアミノ酸配列を持つのかを知ることは、酵素化学の基礎的理解に資するものとして、また酵素蛋白質の分子進化を論じる上で極めて重要である。また、これまでプレニル化酵素ファミリーでは、しばしばin vivoとin vitroでの酵素機能が違うという現象が観察されていたが、応募者は、このユニークな性質の原因は、未同定の調節サブユニットによるものではないかと考えた。そこで本研究では、その調節サブユニットの証明を行うことを第2の目的とした。さらにはこれまでプラ

スチド局在としてしか論じられてこなかった本酵素群の詳細な膜局在性の解析を行うことを目指した。

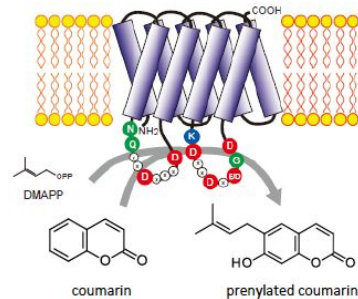


図2. 膜貫通型プレニル基転移酵素とプレニル化反応

3. 研究の方法

本研究では以下の1)クマリンを基質とする初めてのプレニル基転移酵素のクローニングとその解析(図2); 2)世界初となる植物芳香族のO-プレニル化酵素遺伝子の同定と取得; 3)本酵素がプラスチド内のどの膜系に局在して最終産物の蓄積あるいは分泌の仕分けに関わるか、4) in vivoとin vitroでの酵素機能の違いの原因となっている、プレニル基転移酵素の調節サブユニットの取得と蛋白間相互作用の解析を行う。さらに新しい化合物群を認識するメンバーの開拓を含め、このユニークな酵素ファミリーの全体像理解に資することとした。具体的には以下のアプローチを用いた。

1)レモン外果皮にはフラノクマリンのO-プレニル(ゲラニル)体が大量に含まれることから、これを遺伝資源にして、独自のノウハウからデザインした縮重プライマーを用い、膜結合性プレニル基転移酵素ファミリーに特徴的なアミノ酸配列を持つ全長cDNA(CIPT-1)を得る。

2)次世代シーケンサーを用いた大規模 EST 解析を行い、そのシーケンスデータの中から、3つのクライテリア(プラスチド局在、Mg²⁺ 要求性 D-rich モチーフ、膜貫通ドメイン)を満たすクローンをインシリコで絞り込み、その全長配列を取得して、*O*-プレニル化活性を有するものを同定する。

3)GFPあるいはYFPをC-末端に融合させたCl-PT1, SfN8DT1, AtHPTの3種の発現コンストラクトをタバコBY-2培養細胞とシロイヌナズナに導入発現させ、蛍光蛋白質の局在を共焦点レーザー顕微鏡にて局在する膜を突き止める。

4)CIPT-1を植物発現用のバイナリーベクターにゲイトウェイで組み込み、タバコBY-2培養細胞またはシロイヌナズナを形質転換する。酵素活性の確認後、生きた細胞にウンベリフェロンを投与してバイトランスフォーメーションにより生産されるプレニル化化合物を追跡する。また、レモンの果皮からプラスチド画分を分離し、そこから蛋白質画分を調製する。これとクローニングしたCIPT-1のリコンビナント蛋白質を混合し、プレニル基の種類や位置に与える影響を評価する。

4. 研究成果

プレニル化フラノクマリンを多量に含むレモンの外果皮から蛋白質を調製して酵素活性を調べ、その酵素の特性を明らかにした。この成果に関しては、論文としてまとめ、報告した(Munakata R. et al. 2012)。

上記の論文に掲載したデータを基にして、レモンの外皮からクローニングした膜結合性タンパク質のcDNA(CIPT-1)をシャトルベクターpDR196にサブクローニングし、出芽酵母の形質転換と当研究室で確立した酵素アッセイ法を組み合わせ、CIPT-1がクマリンのプレニル化酵素であることを突き止めた(図3)。酵母で発現させたりコンビナント蛋白質を用いて基質特異性を調べた結果、CIPT-1はごく限られたクマリンのみをプレニルアクセプター基質とすること、その中ではウンベリフェロンを最も良い基質とすること、またプレニルドナー基質としては炭素数10のGPPのみに高い特異性を示すことを突き止めた。また二価カチオン要求性、至適pH、Km値など酵素化学的諸性質を明らかにし、フラボノイド特異的なSfN8DT1、SfG6DT等とよく類似

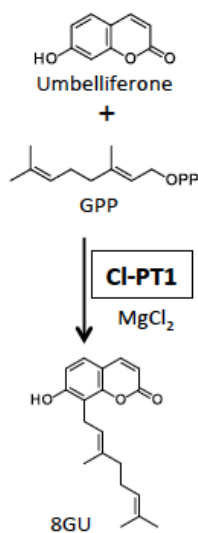


図3. レモンのCl-PT1の反応

した性質を持つ膜結合型酵素であることを明らかにした。

クマリン特異的なプレニル化酵素がクローニングできたことから、レモンの果皮から蛋白質画分を調製し、CIPT-1のリコンビナント蛋白質を混合し、プレニル基の種類や位置に与える影響を調べた。しかしながら、ネイティブなタンパク質の添加により、基質ならびに生産物特異性に目立った影響は認められなかった。このことは、形質転換体のin vivoでの生産物特異性がホスト植物種により影響を受けることを説明できるものではない。おそらく、遺伝子種により、また化合物の種類により酵素機能の特異性に影響が出やすいものとそうでないものがあると考察した。

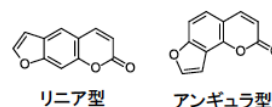


図4. フラノクマリンの2サブグループ

膜結合型プレニル化酵素の分子進化を論じるため、柑橘類以外の植物ファミリーに遺伝子源を求め、フラノクマリンを多量に含むセリ科のパセリから、クマリンを基質とするプレニル基転移酵素の候補遺伝子を取得した。フラノクマリンは、基本骨格の芳香環の並び方から、「リニア型」と「アンギュラ型」の2つに分けられるが(図4)、いずれのグループのフラン環もプレニル基に由来することがわかっている。また、「リニア型」と「アンギュラ型」のどちらが最終産物になるかは、前駆体であるウンベリフェロンのプレニル化部位の違いで決定されるため、ウンベリフェロンのプレニル基転移酵素はその重要性から長年探し求められていた。この研究でクローニングしたcDNAは膜結合型タンパク質をコードしており、その予測アミノ酸配列から、有力なプレニル基転移酵素と考えられたため、PcPTと命名してさらなる解析に供した。

このPcPTを*Nicotiana benthamiana*に一過的に発現させ、そのマイクロソーム画分を用いて酵素活性を調べたところ、PcPTはウンベリフェロンを最も良いアクセプター基質とし、ジメチルアリルジリ

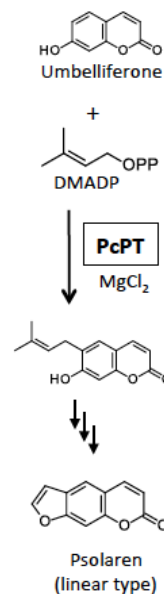


図5. フラノクマリンの生合成経路

ン酸 (DMAPP) を特異的プレニル基質とする PT である事が判明した。クマリン基質におけるプレニル化位置は、6 位が優位であり、リニア型のフラノクマリンの生合成にとって鍵となる重要酵素であることが判明した。さらに、クマリン生合成酵素 C2'H と PcPT とを発現させた *N. benthamiana* で、プレニル化クマリンの形成に成功し、フラノクマリンの代謝工学に新しい可能性を提示した (図 5)。

並行して、従前全くクローニング例のない *O*-プレニル化酵素を *O*-プレニル化活性の高いカンキツ類に求め、レモンやグレープフルーツなどから 6 種類のプレニル基転移酵素 (PT) の遺伝子をクローニングして活性を *N. benthamiana* の系で確認した。いずれもクマリン基質の PT 活性を示したが、全て *C*-プレニル化酵素活性を示した。そこで次世代シーケンサーを用いてグレープフルーツの RNA-Seq 解析を行い、新たに *O*-PT の候補として 4 クローンを取得した。これについては現在酵素活性の確認を行っている。一方、並行して進めていたセリ科植物のアシタバから、世界で初めてとなる *O*-プレニル化酵素を見いだすことができた。*O*-プレニル化酵素に関しては、今後の研究を進展させ、論文化につなげる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 29 件)

Kawasaki, K., Koeduka, T., Sugiyama, A., Sasaki, K., Linley, P.J., Shitan, S., Kumano, T., Yamamoto, H., Ezura, H., Kuzuyama, T., Yazaki, K., Metabolic engineering of flavonoids with prenyltransferase and chalcone isomerase genes in tomato fruits, *Plant Biotech.*, 査読有, Vol. 31 (5), 567-571 (2014).

Munakata, R., Inoue, T., Koeduka, T., Karamat, F., Olry, A., Sugiyama, A., Takanashi, K., Dugrand, A., Froelicher, Y., Tanaka, R., Uto, Y., Hori, H., Azuma, J., Hehn, A., Bourgaud, F., Yazaki, K., Molecular cloning and characterization of a geranyl diphosphate-specific aromatic prenyltransferase from *Citrus limon*, *Plant Physiol.*, 査読有, 166(1), 80-90, 2014.

棟方涼介、矢崎一史、植物の化学防御物質フラノクマリン類の生合成に関するプレニル化酵素、バイオサイエンスとインダストリー、査読有, Vol. 72(4), 312-314 (2014)

Karamat, F., Olry, A., Munakata, R., Koeduka, T., Sugiyama, A., Paris, C., Hehn, A., Bourgaud, F., Yazaki, K., A coumarin-specific prenyltransferase catalyzes the crucial biosynthetic reaction for furanocoumarin formation in parsley, *Plant J.*, 査読有, 77 (4), 627-638, 2014.

Tanaka, R., Uto, Y., Ohnaka, K., Ohta, Y., Yazaki, K., Umemoto, N., Nakata, E., Hori, H., Prenylated acylphloroglucinol derivatives: isoprenomics-based design, syntheses and antioxidative activities, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 査読有, 737 (4), 251-256, 2012.

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, *Biosci. Biotech. Biochem.* 査読有, 76(7), 1389-1393, 2012.

Tsurumaru, Y., Sasaki, K., Miyawaki, T., Uto, Y., Momma, T., Umemoto, N., Momose, M., and 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(1), 393-398 (2012).
他省略

〔学会発表〕(計 30 件)

Munakata, R., Inoue, T., Koeduka, T., Karamat, F., Olry, A., Sugiyama, A., Takanashi, K., Dugrand, A., Froelicher, Y., Tanaka, R., Uto, Y., Hori, H., Azuma, J., Hehn, A., Bourgaud, F., Yazaki, K., Membrane-bound dimethylallyl-transferase for umbelliferone catalyzes the first committed biosynthetic reaction in furanocoumarin formation, The XXVIIIth International Conference on Polyphenols & The 8th Tannin Conference, 2nd - 6th September, 2014 (Nagoya)

棟方涼介、Jacob Florence、肥塚崇男、杉山 暁史、矢崎一史、芳香族基質アシタバからの芳香族基質 *O*-プレニル化酵素 cDNA の単離と機能解析、第 32 回日本植物細胞分子生物学会、2014 年 8 月 2 日 ~ 22 日 (盛岡)

Kazufumi Yazaki, Prenyltransferase: an enzyme family contributing to the chemical diversity of plant secondary metabolites, 50th Memorial Symposium on Phytochemistry, 13th November, 2013 (Tokyo) : 招待講演

Kazufumi Yazaki, Dynamics of polyphenolic compound accumulation in plants, International Symposium on Metabolon: Dynamics of Plant Secondary Metabolism, 12th September, 2013 (Sapporo) : 招待講演
棟方 涼介、Karamat Fazeelat、Alexandre Olry、肥塚 崇男、井上 剛史、杉山 暁史、田中 涼、宇都 義浩、堀 均、東 順一、Alain Hehn、Frédéric Bourgaud、矢崎 一史、クマリン類の化学構造多様性の鍵となるプレニル基転移酵素ファミリーの解明、第 23 回イソプレノイド研究会、2013 年 9 月 14 日 (東京)

他省略

〔図書〕(計 6件)

Shitan, N., Sugiyama, A., Yazaki, K., Chapter 19, Functional analysis of jasmonic acid-responsive secondary metabolite transporters, In: Methods in Molecular Biology Vol. 1011 “Jasmonate Signaling, Methods and Protocols” (Eds. Alain Goossens and Laurens Pauwels), Springer Science + Business Media, LLC, pp. 241-250, 2013. (Total 347 page) doi: 10.1007/978-1-62703-414-2_19.

他省略

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: New method for inhibiting production of furanocoumarins in plants

発明者: Bourgaud, F., Hehn, A., Olry, A., Munakata, R., Yazaki, K., Mizutani, M.

権利者: Bourgaud, F.

種類:

番号: 37 CFR 1.76

出願年月日: 2015年2月25日

国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ等

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

(2) 研究分担者

杉山 暁史 (SUGIYAMA, Akifumi)

京都大学・生存圏研究所・助教

研究者番号: 20598601