

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860076

研究課題名(和文)四環性ジテルペン骨格の多様性をもたらす生合成メカニズムの分子生物学的解明

研究課題名(英文)Elucidation of the biosynthetic mechanism that leads to the diversity of the tetracyclic skeleton of diterpenes

研究代表者

山村 良美 (Yamamura, Yoshimi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・助教

研究者番号：30464027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、単離したエリシター誘導性のcytochrome P450 (P450)分子種の候補遺伝子SdCYP5、SdCYP6、SdCYP7およびSdCYP8は、高等植物の様々な二次代謝に関与するとされるCYP71ファミリーに分類され、その遺伝子発現はスコパリア葉におけるジテルペン生合成活性と密接な関係を有していた。さらに、ジテルペン生合成酵素群であるent-kaurene oxidase (CYP701Aファミリー)遺伝子(SdK01、SdK02)やent-kaurenoic acid oxidase (CYP88Aファミリー)遺伝子(SdKA01、SdKA02)の単離にも成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, SdCYP5, SdCYP6, SdCYP7 and SdCYP8, were isolated as elicitor inducible cytochrome P450 (P450) candidate genes, are classified in the CYP71 family. CYP71 family is involved in a variety of secondary metabolism in higher plants. The gene expression of SdCYP5 and SdCYP8 had a close relationship with SDB biosynthesis activity in Scoparia leaves. In addition, we also successfully isolated a set of diterpene biosynthetic enzyme genes, an ent-kaurene oxidase (SdK01 and SdK02, CYP701A family) and ent-kaurenoic acid oxidase (SdKA01 and SdKA02, CYP88A family) genes.

研究分野：植物生理学

キーワード：植物二次代謝 ジテルペン チトクロームP450 環化酵素 有用物質生産 エリシター

1. 研究開始当初の背景

Scoparia dulcis (スコパリア) は、ウイルス感染症や癌、骨粗鬆症などに効果があるとされる四環性ジテルペンを産生し、scopadulcic acid B (SDB) や scopadulciol が単離・構造決定されている。これらのジテルペンはそのユニークな構造と多彩な生物活性から相次いで全合成のターゲットとされたが、ラセミ体としてしか得られていない。SDBをはじめとするジテルペン類はすべて共通中間体ゲラニルゲラニルニリン酸(GGDP) からコパリルニリン酸 (*syn*-CDP または *ent*-CDP) を経て生合成されると考えられている。SDB 誘導体が *syn*-CDP 合成酵素 (CPS) 並びにそれに関連する特異的なチトクローム P450 (P450) により生合成されると想定されているのに対し、*ent*-kaurene を経て gibberellin に至る経路は *ent*-CPS およびそれにリンクする特異的な P450 が関わるものと思われる。我々の研究グループは、これまでに高等植物が一つの細胞内で多彩なジテルペン骨格を精密に作り分ける機構に関する研究を行ってきた。現在までに我々は、高等植物においてフラボノイドやアルカロイドなどの二次代謝に参与する酵素として知られている P450 が、スコパリアの SDB 生合成経路でおこる酸化または環化にも関与することを強く示唆する研究結果を得ている。すなわち、スコパリアをはじめとする、複数の四環性ジテルペン骨格を同一の細胞内で構築する植物において、それぞれの骨格を構築するための重要なステップは環化酵素といくつかの P450 が担っているものと推測される。一方、我々はスコパリアのジテルペン化合物のうち SDB とその誘導体がジャスモン酸 (JA) 刺激にตอบสนองして蓄積量が大きく変動し、また、その生合成に関わる遺伝子の発現が顕著に上昇することを確認している。これに対して、同じジテルペン化合物でありながら kaurene や gibberellin の JA 応答性は極めて低いことを認めている。更に、我々は JA 誘導性 P450 として、既に 67 種のフラグメントをスコパリアから単離し、これらがその相同性に依りていくつかのクラスに分けられる可能性を見出している。これに加えて、*ent*-CDP から *ent*-kaurene の合成を触媒する環化酵素である *ent*-kaurene 合成酵素および P450 還元酵素 (CPR) の単離にも成功し、発現特性や触媒能等の機能解析を進めている。本研究では、以上の成果を基盤として、ジテルペンの骨格形成に関わる酵素群、とりわけ一連の P450 の機能を明らかにし、多彩な四環性ジテルペン骨格を植物が細胞内で作り分ける機構を分子レベルで解明することを目的とする。

2. 研究の目的

本研究の目的は「植物が産生する多彩な四環性ジテルペン骨格を構築するための重要な因子である一連の P450 及び環化酵素遺伝子

を単離し、同じカテゴリーに分類されながらも化学構造上異なる基本骨格を持つ天然物が、一つの細胞の中でどのように作り分けられるかを分子生物学的レベルで理解すること」である。この目的のために、ジテルペン合成酵素をコードする一連の遺伝子群が JA 等の外部刺激に対して大きく異なる応答性を示すことを利用し、それぞれの P450 遺伝子がどのジテルペン骨格の天然物生合成に関与するホモログであるかを解明すること試みる。

一方、P450 の活性発現には CPR による NADPH からの電子伝達が必要であるが、目的 P450 タンパク質を短時間に、且つ簡便・安価に調製できる大腸菌発現系には CPR は存在しない。そこで本研究では、スコパリアから単離した CPR の解析も進め、簡便かつ効率的な大腸菌発現系を用いた植物の機能型 P450 の再構成を行う技術の確立も目指す。

3. 研究の方法

(1) P450 クローンの機能解析

すでに単離されているエリシター誘導性 P450 分子種 (既知の P450 と高い類似性をもつものが 65 クローン、新規の P450 と考えられるものが 2 クローン) の得られたアミノ酸の情報に基づき、P450 ファミリーの分類を行い機能の推測を行った。我々が標的としている水酸化・環化反応に参与していると予測される P450 クローン (CYP71、CYP701A、CYP88A、CYP707A、および、ジテルペンを産生するカビの CYP と相同性の高いもの等) の候補を挙げた。それぞれの遺伝子ファミリーを代表する最低 1 種以上の全長 cDNA クローンを取得し、ORF を決定した。クローンの全長が取得できたものから順に JA 処理、ストレス応答、gibberellin 阻害の葉細胞を用いて遺伝子発現を観察し、サザンプロット等の遺伝子解析も行った。以上の結果から、スコパリアにおいて、各種 P450 クローンの発現とジテルペン生合成と密接に結びついているクローンを特定した。同様に、スコパリア CPR (SdCPR) についても分子生物学的特徴付け (サザンプロット、遺伝子発現解析) を行った。

続いて、クローニングしたスコパリアの P450 の ORF 部分をそれぞれ大腸菌発現ベクターに組み込み、発現用大腸菌株に導入した。対応するタンパク質の蓄積を確認した後、酵素タンパクの精製を行った。

(2) 環化酵素 *syn*-CPS の全長 cDNA のクローニング

JA 処理してジテルペン生合成経路を活性化させたスコパリアの葉 (処理後 24 時間後) から cDNA を作製した。2007 年にゲノム解析が終了している *Vitis vinifera* (ヨーロッパブドウ) のゲノム情報 (シロイヌナズナやイネに比べ 2 倍以上となる 89 個のテルペンの合成関連遺伝子が検出されている) を基に、

候補となりうる環化酵素のモチーフ部位の縮重プライマーを設計し、作製した cDNA から *syn*-CPS をコードする候補遺伝子の単離を試みた。

(3)スコパリア CPR を用いた大腸菌発現系の再構築

スコパリア CPR (SdCPR) および cinnamic acid 4-hydroxylase 遺伝子 (SdC4H ; CYP73A ファミリー) の ORF 部分を大腸菌発現ベクターに組み込み、発現用大腸菌に導入した。組み換えタンパク質を精製後、NADPH 存在下で反応させ、C4H 活性を HPLC で検出した。

4. 研究成果

(1)エリシター誘導性の P450 候補遺伝子として単離した SdCYP5 および SdCYP6 は、CYP71 ファミリーに分類された。続いて、SdCYP5 のアイソフォームの単離も行い、SdCYP7 および SdCYP8 を得た。SdCYP5 および SdCYP8 の遺伝子発現はスコパリア葉における SDB 生合成活性と密接な関係を有していた。さらに、ジテルペン生合成関連酵素群のクローニングを行ったところ、*ent*-kaurene oxidase (SdKO1; CYP701A) や *ent*-kaurene oxidase (SdKAO1, SdKAO2; CYP88A) をコードする遺伝子の単離にも成功した。次いで、SdKO1 のアイソフォーム (SdKO2) も同時に取得した。得られた P450 分子種を大腸菌で組み換えタンパク質を発現させるため、得られたクローンの ORF 部位を大腸菌発現ベクターに導入し、発現誘導を行ったところ、予想サイズの各組み換えタンパク質を得ることが出来た。今後は、SdCPR の共発現を用いた触媒反応機構を詳細に解析していく予定である。

(2)環化酵素 *syn*-CPS の cDNA のクローニングを行ったが、本研究期間内に取得することが出来なかった。これは、本環化酵素は種間での保存配列が非常に少ないため、縮重プライマーを用いた RT-PCR からのアプローチでは単離することが出来なかったと考えられる。今後は、*de novo* RNA-seq 法による次世代シーケンサーを用いたランスク립トーム解析を行い、引き続き環化酵素 *syn*-CPS の候補遺伝子の情報を取得する予定である。

(3)スコパリアから単離した SdC4H を用いた P450 モノオキシゲナーゼ活性 (*trans*-cinnamic acid から *p*-coumaric acid への水酸化反応) を HPLC で確認することができた。植物 P450 反応は、その反応や基質の多様性などから創薬をはじめとする応用研究、更に工業的利用への期待が高まっており、今回得られた SdCPR も、このような改良システム開発の有用なツールとなると期待される。

本研究で実施した生合成遺伝子のクローニングおよびエリシター添加による変動の解

析は、エリシター制御機構の解明には必要不可欠であり、総合的な解析の基礎となる知見である。植物 P450 酵素の機能を、化学物質を使って可逆的選択的に制御できれば、種や生育ステージ、期間や強度を選ばずに、生長分化やストレス応答、有用物質の生産等の制御を自在に行えるようになる。本研究は、その試みの一例であり、新たな創薬ターゲットとしての植物 P450 の可能性を提示するものである。

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 0 件)

[学会発表](計 6 件)

1) Yamamura Y, Mabuchi A, Kurosaki F. Functional characterization of an inducible NADPH:cytochrome P450 reductase from a tropical medicinal plant *Scoparia dulcis*. Plant Biology Meeting (Annual Scientific Meeting of the American Society of Plant Biologists); 2014 Jun 12-16; Portland, U.S.A.

2) Yamamura Y, Mabuchi A, Kurosaki F. Cloning, *E. coli* expression, and characterization of cinnamic acid 4-hydroxylase from *Scoparia dulcis*. 12th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology; 2014 Sep 24-28; Kyoto, Japan.

3) 大下 絢子, 山村良美, 黒崎文也. 薬用植物スコパリア由来の環化酵素 *ent*-kaurene synthase の機能解析. 第 55 回日本植物生理学会年会; 2014 Mar 18-20; 富山.

4) 市谷 圭, 馬淵彩香, 山村良美, 黒崎文也. 薬用植物スコパリア由来の 2 種の *ent*-kaurene oxidase の単離と発現解析. 第 55 回日本植物生理学会年会; 2014 Mar 18-20; 富山.

5) Yamamura Y, Mabuchi A., Kurosaki F.: Molecular cloning and functional characterization of an NADPH: cytochrome P450 reductase from a tropical medicinal plant *Scoparia dulcis*. 61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA), 2013, 9, 1-5, Münster, Germany.

6) 馬淵彩香, 山村良美, 黒崎文也: 薬用植物スコパリア由来の NADPH: シトクローム P450 還元酵素の単離と解析. 第 31 回日本植物細胞分子生物学会 (札幌) 大会, 2013, 9, 10-12, 札幌.

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山村 良美 (Yamamura, Yoshimi)
富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・
助教
研究者番号：30464027

(2) 研究分担者

()

研究者番号：