

- 1) 吉松嘉代：植物バイオテクノロジーによる新しい薬用植物資源の開発  
薬用植物フォーラム2005（つくば）  
（2005.7）
- 2) 河野徳昭、吉松嘉代、木内文之：ケシの *Agrobacterium* 形質転換体における形質変異原因遺伝子の探索  
第23回日本植物細胞分子生物学会京都大会・シンポジウム（2005.8）
- 3) Yoshimatsu K: Tissue culture of medicinal plants: micropropagation, transformation and production of useful secondary metabolites  
2005 Annual Autumn Meeting of Korean Society for Plant Biotechnology and Korea-Japan joint Symposium on Platform Technology for Plant Bioproducts (Jeju, Korea, 2005. 11)
- 4) Kawano N, Yoshimatsu K, Kiuchi F: Approach Toward the Creation of Nonnarcotic Opium Poppy-Morphological and Genetical Analysis on 'Thebaine Poppy'  
2005 Annual Autumn Meeting of Korean Society for Plant Biotechnology and Korea-Japan joint Symposium on Platform Technology for Plant Bioproducts (Jeju, Korea, 2005. 11), Best Poster Award
- 5) Yoshimatsu K, Kawano N, Inui T, Sato F, Kiuchi F: Isoquinoline alkaloids in *Papaver somniferum* L. and *Papaver orientale* L. cultivated plants and their tissue cultures  
International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Honolulu, Hawaii, U.S.A., 2005.12)
- 6) Kawano N, Yoshimatsu K, Kiuchi F: Investigation of genes involved in altered opium alkaloid composition in *Agrobacterium* transformed *Papaver somniferum*  
International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Honolulu, Hawaii, U.S.A., 2005.12)
- 7) Akiyama T, Arai T, Liu H-M, Yoshimatsu K, Kunugi A, Shibuya M, Ebizuka Y, Yamazaki T, Tanamoto K: Biosynthesis of phyllodulcin in *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii*  
International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Honolulu, Hawaii, U.S.A., 2005.12)
- 8) 河野徳昭、吉松嘉代、木内文之：ケシの *Agrobacterium* 形質転換体における形質変異原因遺伝子の探索  
日本農芸化学会2006年度大会（京都）  
（2006.3）
- 9) 吉松嘉代、河野徳昭、北澤尚、根本泰行、井上修、飯田修、木内文之  
「新規外国導入系統ケシの生育特性とアルカロイド組成・含量」  
日本農芸化学会2006年度大会（京都）  
（2006.3）

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

(図表)

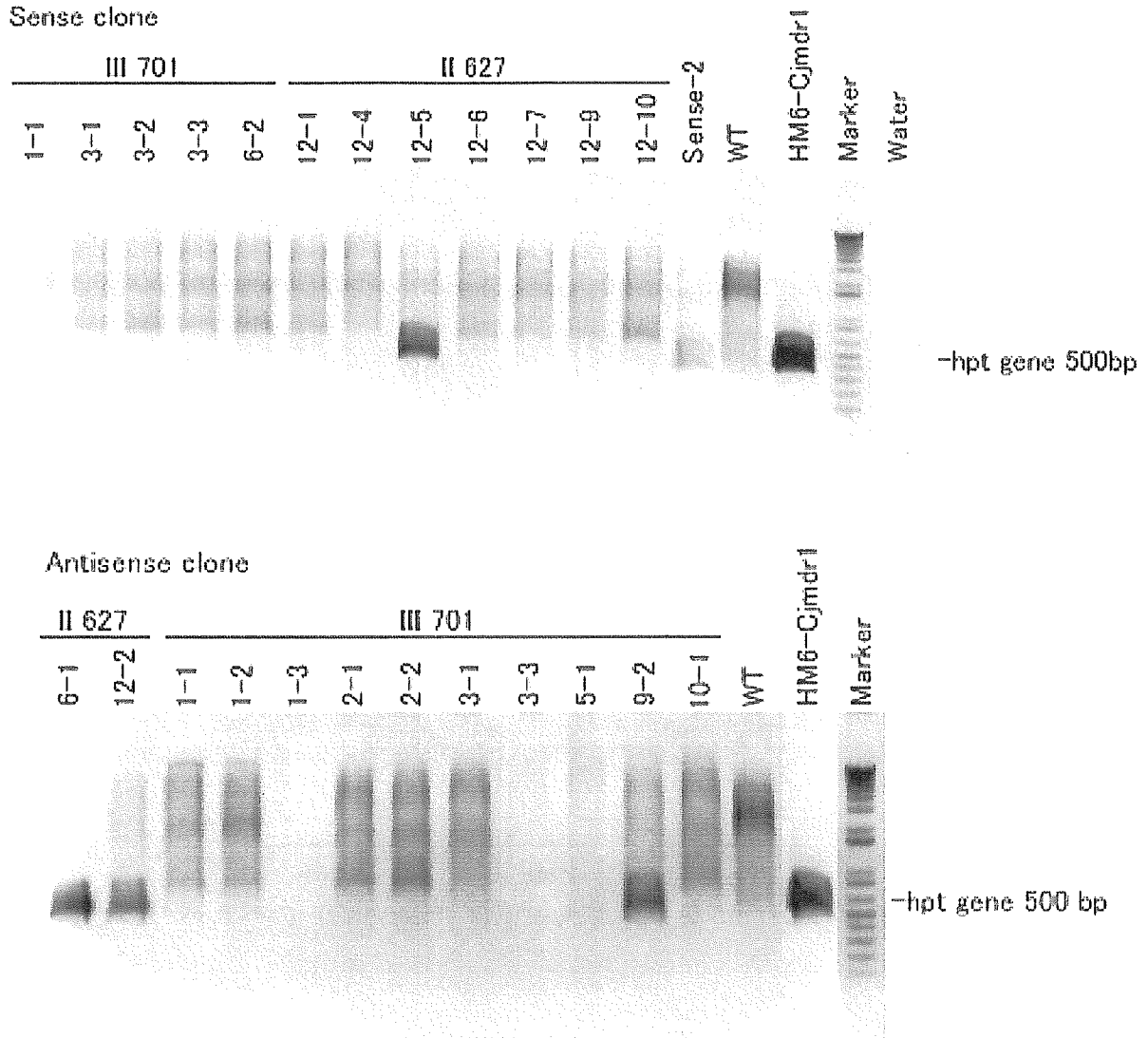


図1-1. Cjmdr1センス（上）およびアンチセンスクローン（下）のゲノムPCRによる hpt遺伝子の検出

II627、III701：ハイグロマイシン耐性カルスクローン；Sense-2：前年度報告のCjmdr1センスクローン；WT:野生株；HM6-Cjmdr1:プラスミドベクター（ポジティブコントロール）

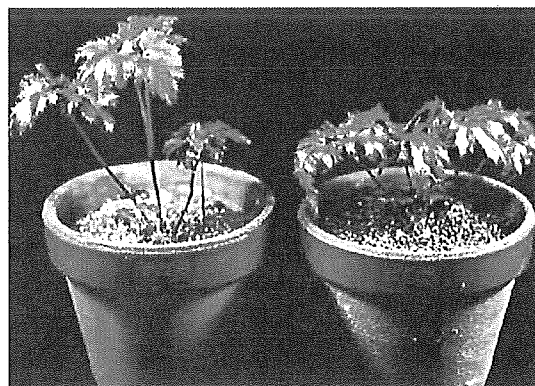


図1-2. 栽培3ヶ月後の野生株（左）とCjmdr1センス導入植物体（右：クローンSense2）

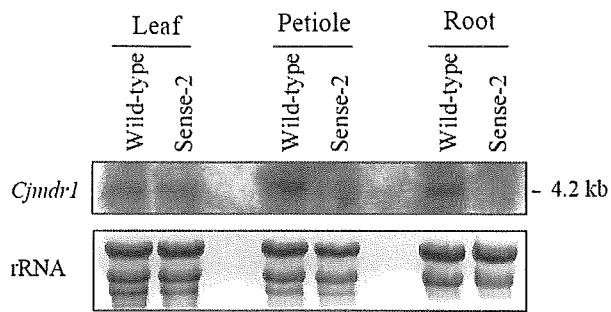


図1-3.ノーザン法による*Cjmdr1*センス導入植物体(Sense2)の*Cjmdr1* mRNA発現解析

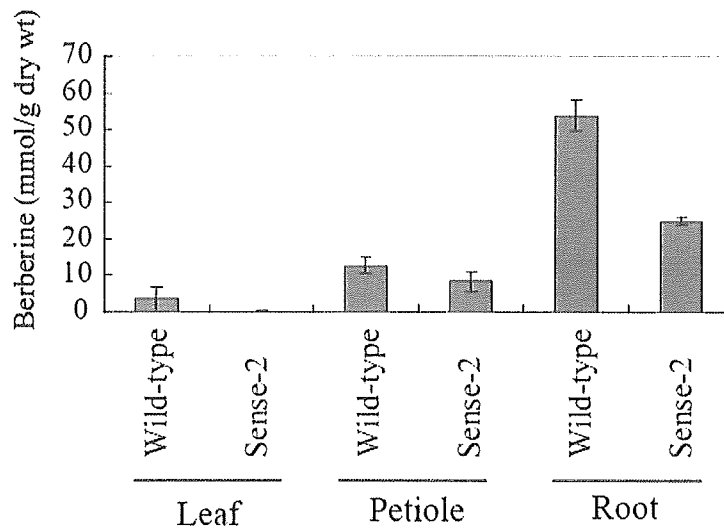


図1-4. 野生株および*Cjmdr1*センス導入植物体 (Sense2) のベルベリン含量

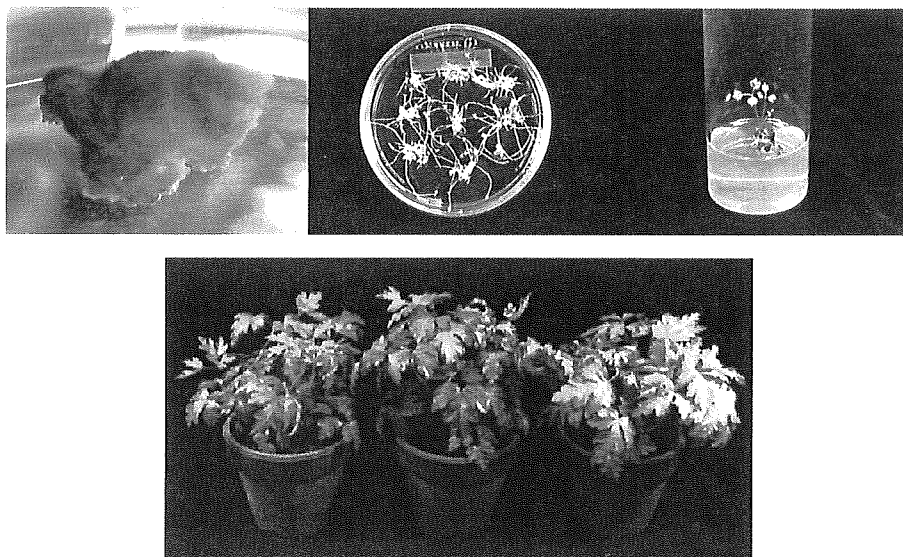
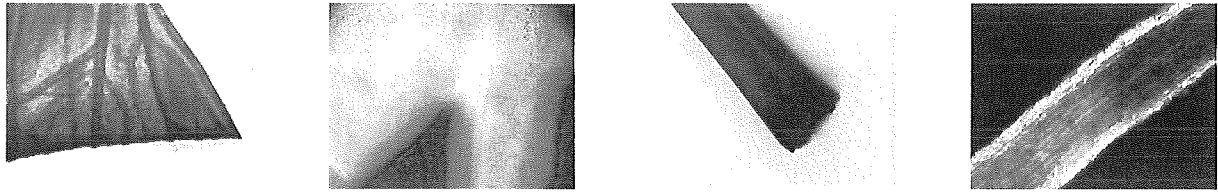


図1-5. *gus*導入体 (II627-7-1) 左上：カルスのGUS活性染色、中上：不定胚分化と植物体再生、右上：弱光下で育成した再生植物体、下：栽培7ヶ月後の植物体



Leaf

Petiole

Root

図1-6. *gus*導入体 (II627-7-1) の各部位におけるGUS活性

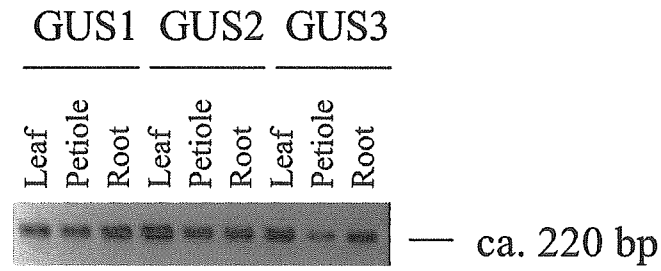


図1-7. RT-PCR法による*gus*導入体 (II627-7-1) における*gus* mRNAの発現確認

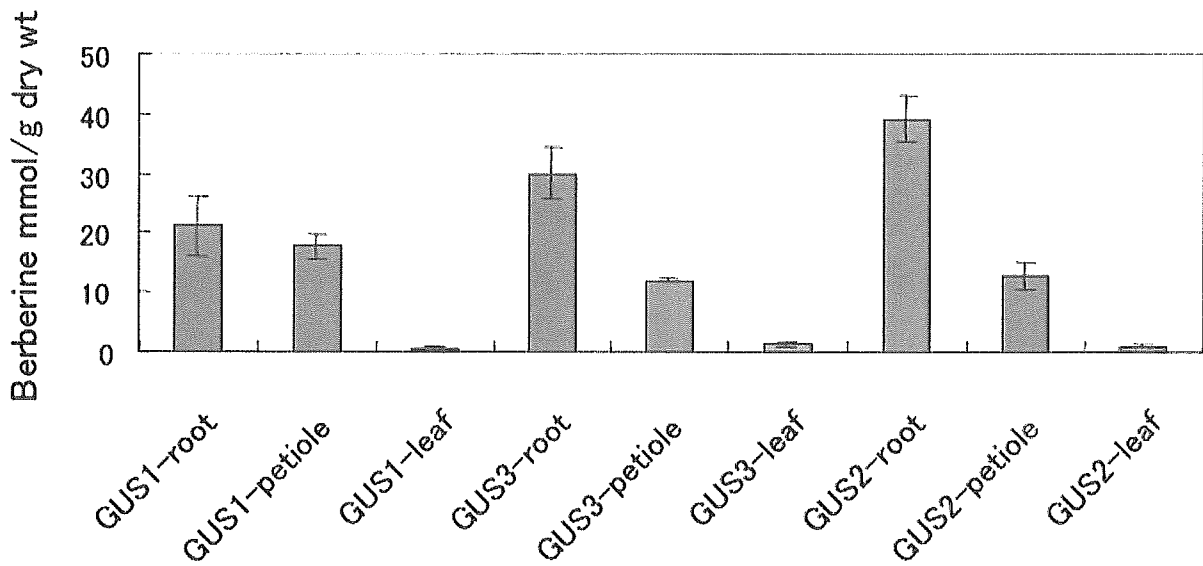


図1-8. *gus*導入体 (II627-7-1) のベルベリン含量



図1-9. gus導入体 (II627-7-1) の開花

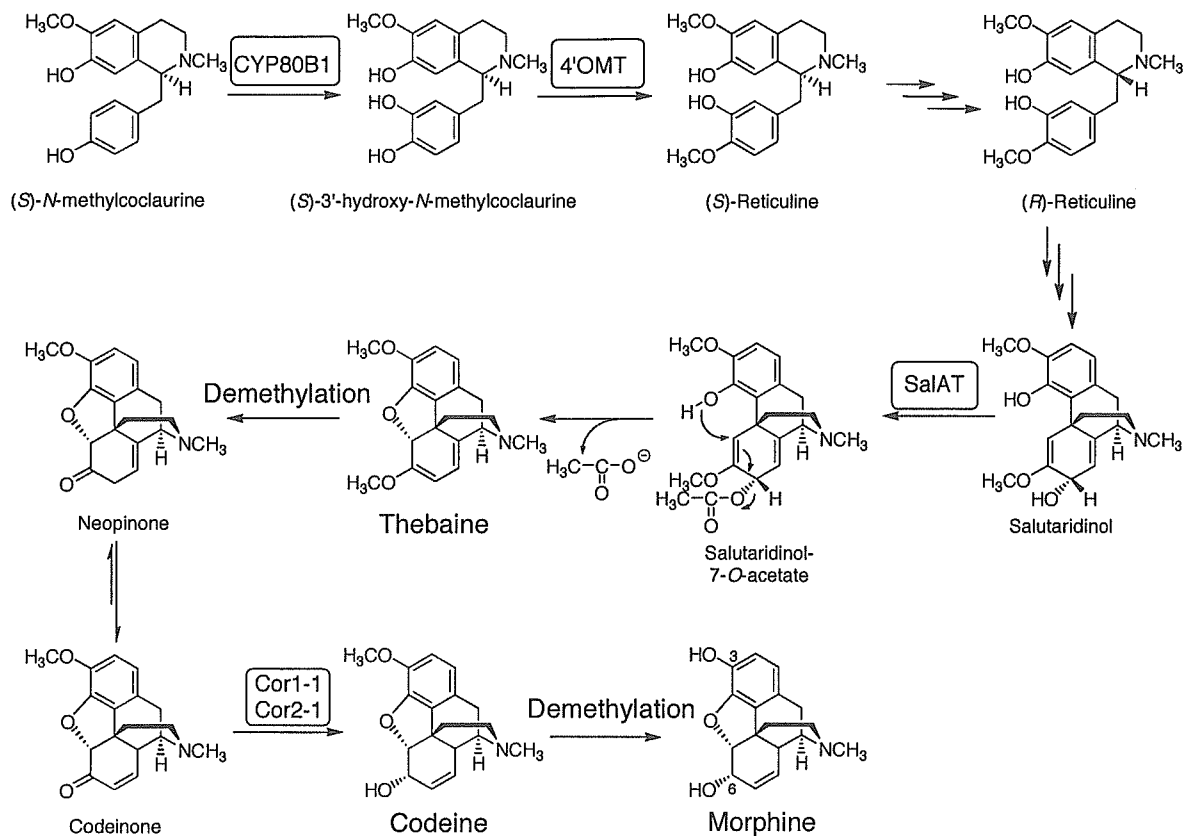


図2-1. モルヒネ合成経路および発現解析を行った遺伝子群

TarGet Gene	Accession No.	Primer name	LenGth (mer)	Sequence (5' to 3')	Expected product size (bp)
oliGo-d(T) primer		RACE32	32	GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	
CYP80B1	AF134590	PsCYP80B1-878S	21	CAATAGAATGGGCGTTGTCTG	500
		PsCYP80B1-1377A	21	ATGATCAGTTGGCTAGGATCC	
4'OMT	AY217333	Ps4'OMT-552S	24	AGATTGTAGAGATACTTTTCAAGG	470
		Ps4'OMT-1021A	21	TGATCTTATGAGACCGAAAGC	
SalAT	AF339913	PsSalAT-832S	21	TCTCTAATATGGAAGTCCGTG	558
		PsSalAT-1389A	21	GAACCTTAGCCATATCATCCTC	
Cor1-1	AF108432	PsCor1-467S	21	TTGGCTTCACTAGGGCAATCG	492
		PsCor1-958A	21	CTCATCCAGAACTCTTCTTC	
Cor2-1	AF108438	PsCor2-463S	21	ATGCTTGGATTAACCAAGTCG	425
		PsCor2-887A	21	AAGGATCACCGGTTGACACTC	
PsWRKY1		PsWRKY1-992S	21	GGATTCTTGAATGGGTTTCGC	531
		PsWRKY1-1522A	21	CGCTGTTCCCAAAGTCTATCC	
PsACTv		PsACTv-145S	21	CACACTGTGCCAATCTATGAG	344
		PsACTv-488A	21	TGGATACCAGCAGCTTCCATC	

表2-1. 発現解析に用いたプライマー配列およびその標的遺伝子

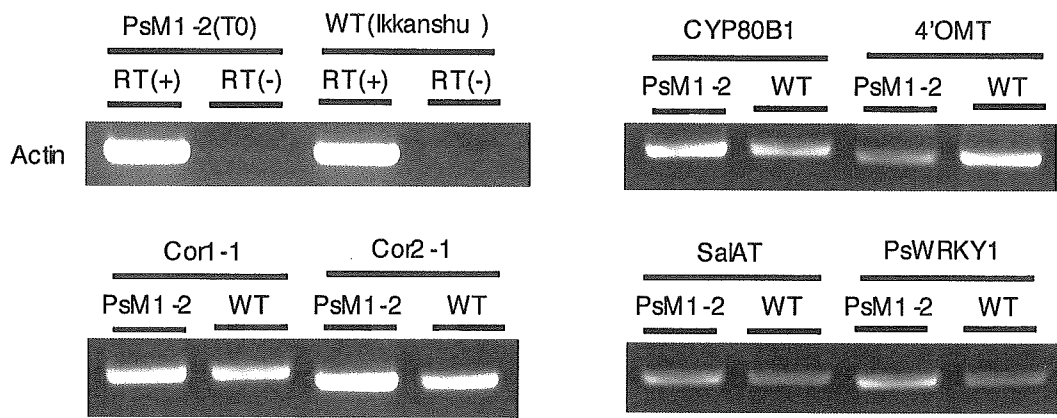
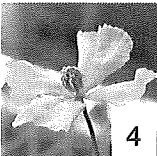

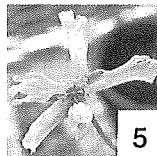


図2-2. モルヒネ合成経路関連遺伝子群の定性的発現解析結果

Line	WT (n=6)	PsM1-2 (T <sub>0</sub> )	PsM1-2 (T <sub>1</sub> ) #1 (n=33)	PsM1-2 (T <sub>1</sub> ) #2 (n=27)
Number of Petals			<ul style="list-style-type: none"> <li>3: 1</li> <li>4: 15</li> <li>5: 8</li> <li>6: 6</li> <li>7: 2</li> <li>8: 1</li> </ul>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>4: 10</li> <li>5: 13</li> <li>6: 4</li> </ul>
Splits on Petals	No	Yes	Yes: 16 No: 17	Yes: 11 No: 16
Days to Flowering	53.5 ± 4.8	71*	98.0 ± 14.3	105.0 ± 14.9
Plant height (cm)	42.4 ± 5.8	38*	54.5 ± 7.8	49.2 ± 8.6

\*: *in vitro* plantlet transplanted to soil

表2-2. PsM1-2 T1世代植物の形態学的特長

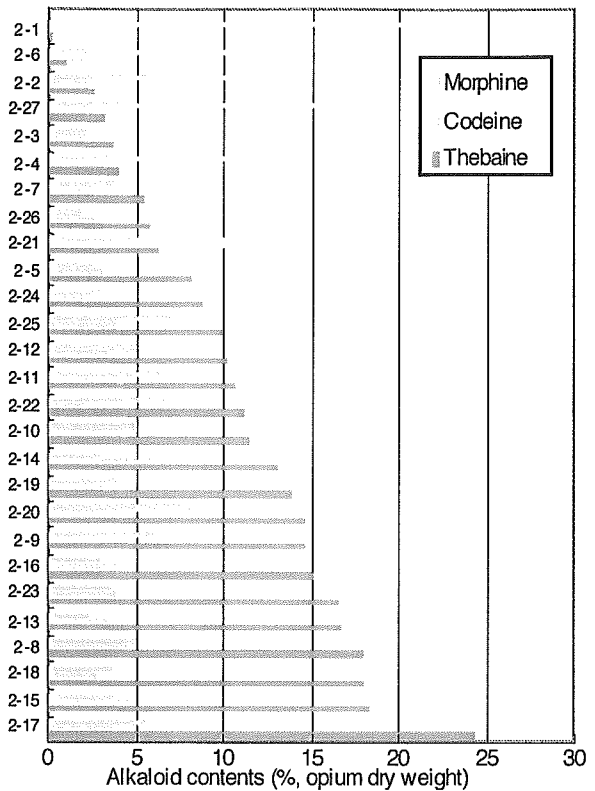
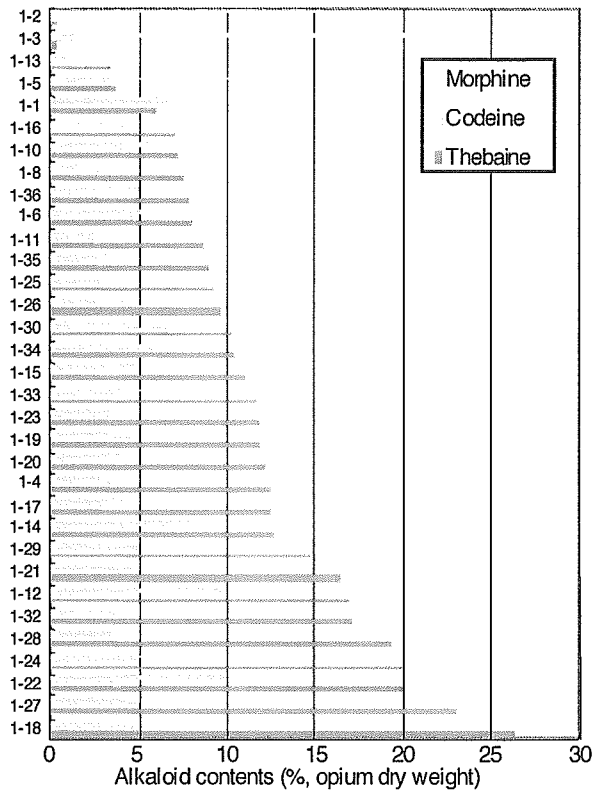


図2-3. PsM1-2 T1世代植物60系統の主アヘンアルカロイド含有量

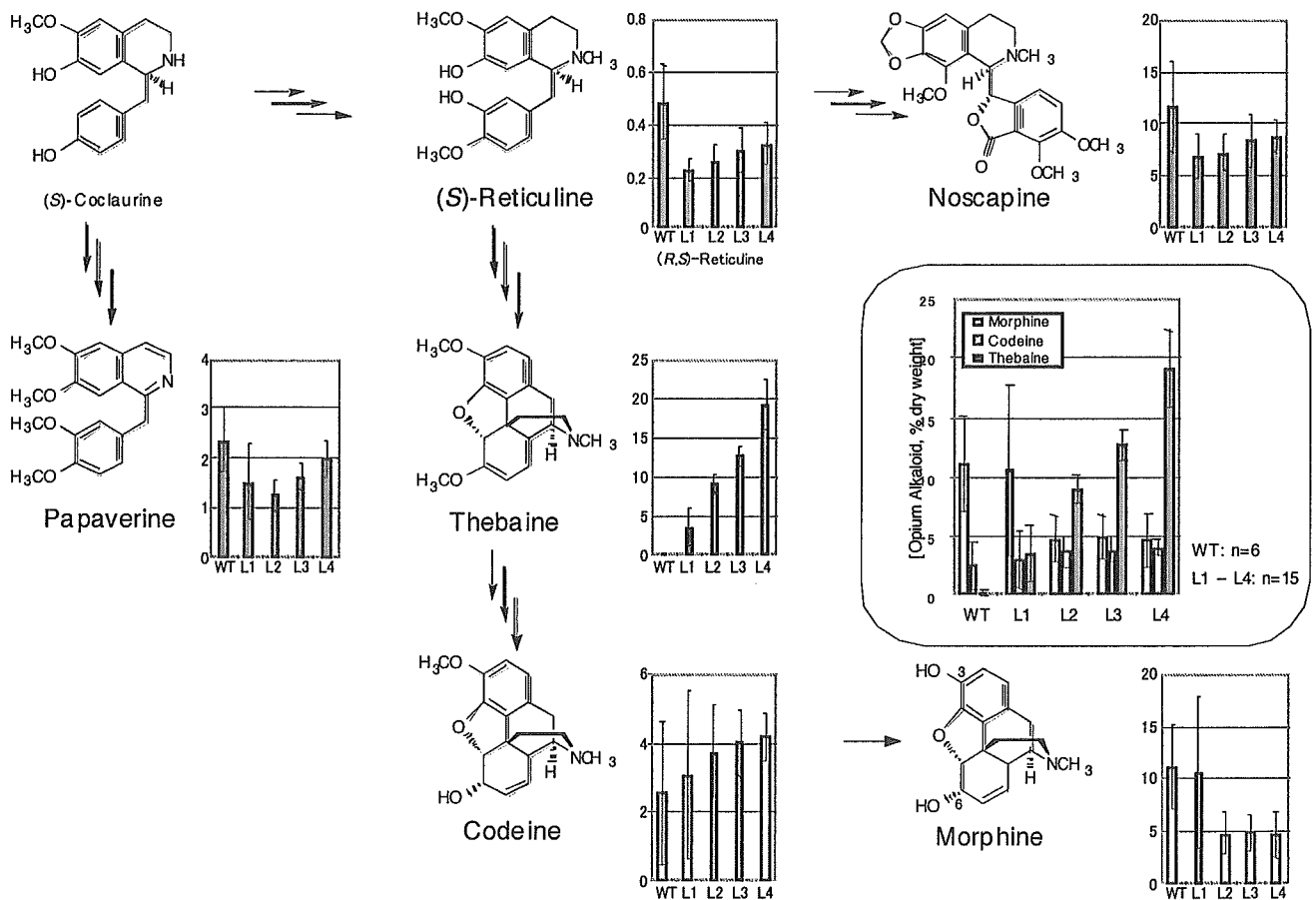
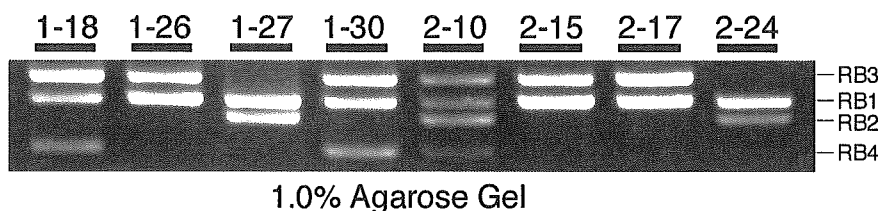


図2-4. PsM1-2 T1世代植物における主アルカロイドの成分含有量



Primer Name	Length	Sequence (from 5' to 3')	Expected Product Size
MAFF-14963S	21mer	AGCCGACAACGTGCAATTTGC	-
RB1-460A	21mer	AGAACCTTCGTATGGCAGATG	573 bp
RB2-393A	21mer	CAATCCTGCCTCCTACAATTC	493 bp
RB3-588A	21mer	GGTCCATTGATATGGCTACTC	691 bp
RB4-261A	21mer	TCGAATCGACGTAAACTCTCC	375 bp

表2-3. Multiplex-PCRに使用したプライマー配列



1.0% Agarose Gel

図2-5. Multiplex-PCRによるT-DNA挿入パターン解析結果 (例)

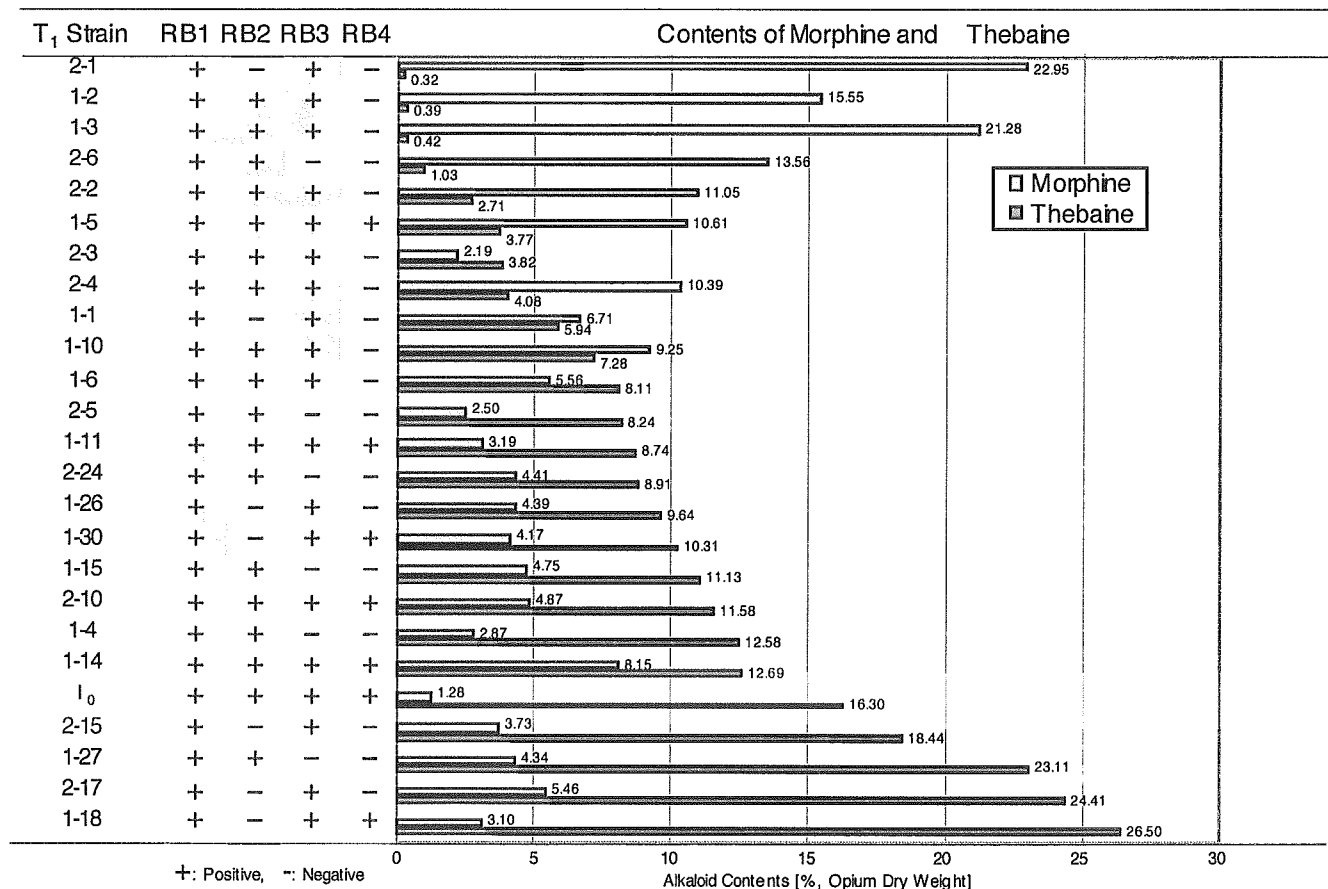


図2-6. PsM1-2 T1世代植物におけるアヘンアルカロイド成分含有量とT-DNA挿入パターン

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

酵母プロテインジスルフィドイソメラーゼ遺伝子を組み込んだ  
薬用植物ベラドンナの作成

分担研究者 大塚 譲 お茶の水女子大学生活環境研究センター・教授

本研究では、薬用植物組換え体の環境に与える影響を検討するため *Agrobacterium rhizogenes* AR10 を用いて、PDI の大量発現とトランスジェニックベラドンナの作製を目的として、遺伝子組換え実験を行った。方法として、バイナリーベクター法を採用した。まず、奈良先端大学の島本先生から入手した、大腸菌と *A. rhizogenes* の両方の複製開始点を持つプラスミド pIG' -Hm ベクターに PDI 全長遺伝子を組み込んだ。得られた形質転換体をエレクトロポレーション (electroporation, electro-transformation) 法で *A. rhizogenes* AR10 に導入した。leaf-disk 法で *Agrobacterium rhizogene* AR10 をベラドンナに感染した。感染した leaf disk を植物ホルモン添加培地で培養し、カルスを誘導した。さらに無添加培地でカルスからベラドンナ植物体 (plant) と毛状根を作製した。

#### A. 研究目的

薬用植物組換え体の環境に与える影響を検討するため、酵母プロテインジスルフィドイソメラーゼ遺伝子を組み込んだ遺伝子組換え薬用植物ベラドンナを作成し、組換えベラドンナの性質がどのように変化するかを明らかにする。組換えベラドンナはすでに千葉大学のグループにより作成されているが、酵母の遺伝子を組み込んだものは未だ作成されていない。またプロテインジスルフィドイソメラーゼは大腸菌などで組換えタンパク質が作成されている例はあるが、植物に組み込んで発現させ、植物の性質にどのような影響を及ぼすかを調べた例はない。プロテインジスルフィドイソメラーゼは小胞体に存在しタンパク質の SS 結合を生成したり組換えたりする酵素であるので不活性型の酵素を活性型に代えることのできる酵素なので今までにない変化を植物に起こす可能性もあり、組換え植物の性質を明らかにする必要

がある。

#### B. 研究方法

##### 1) プラスミド単離

LB寒天培地に現れたコロニーを釣菌し、LBアンピシリン液体培地 2 ml 中にて 37°C で一晚振とう培養し、キット (QIAprep Spin Miniprep Kit) をもちいて、プラスミドを単離した。操作は添付のプロトコール通りに行った。

##### 2) PCR によるの確認

Genomic DNA は、プラスミドに比べて PCR をかけにくいいため、サンプルの濃度、サイクル数などを増やして PCR を行い、インサートの有無を確認した。

##### 3) タンパク質抽出

1. 50 ml チューブに、10 ml Tris-HCl (0.1M・pH7.5)、10mM MgSO<sub>4</sub>、1/100 PIC、1mM PMSF、適量のガラスビーズを入れて混合し、-20°Cで15min冷却した。
2. 液体窒素で凍結粉碎した植物を溶かさぬよう速やかに1. のチューブに入れた。
3. 温度が上がらぬよう注意しながら Vortex (15sec×3回・1回ごとに氷で冷却)。
4. 遠心分離 (4°C・3500rpm・15min)。
5. 上清を 15ml チューブに移し、4度または -80°Cに保存した。
6. キットを用いて総タンパク質の濃度を測定した。

#### 4) SDS-PAGE 電気泳動・ウェスタンブロッティング

抽出したタンパク質濃度をキットを用いて測定し、60 μg/12 μl になるように濃度調製した。濃度測定は添付のプロトコルに従った。スタンダードは 0、0.4、0.8、1.2 μg/μl に調製した BSA 溶液を使用した。この、総タンパク質量が等しいものをそれぞれサンプルとして以下の操作を行い、目的タンパク質発現の確認を試みた。

1. 濃度調製を終えたサンプルと 5× SDS-PAGE Sample buffer を 4:1 の割合で混合し、95°C・3min ボイルして変性した。
2. ATTO 電気泳動装置 AE-6530M を用い、7.5%アクリルアミドゲルで、1枚あたり 20mA の定電流で、BPB マーカーがゲル下端から約 1cm になるまで泳動。サンプルは1ウェルあたり 15 μl ずつアプライし、泳動終了後 Western blotting を行うものとそのまま染色して比較に使用するものと、2枚同じ泳動操作を、同じ装置の表裏で行った。
3. 泳動終了後速やかにそれぞれのゲルを Western Blotting し、その後 Fair Banks 染色、または、Western blotting を行わずそのまま Fair Banks 染色した。ここで Stacking gel は除き、以後の操作は Separating gel のみで行った。Western

Blotting は ATTO ホライズブロット AE-6677 で行い、操作は添付のプロトコルに従った。複数枚のゲルを一度に Blotting する際は、装置添付のプロトコル通り、間にセロハンを挟んだ。電圧は 200mA 前後となるよう留意し、45分程度 blotting した Fair Banks 染色は染色液 I に浸して o/n 振とう後、染色液 II で 30min・染色液 III で数 h 以上順に振とうし、ろ紙の上に置いて Gel dryer で乾燥させた。

4. Blotting が終了したニトロセルロースメンブレンに Ponceau S solution をかけ、5分染色した。
5. 脱イオン水で洗浄し、乾燥させる。タンパク質が写し取られていることを確認して、マーカー部を油性ペンなどでチェックした。
6. TBS で 5min 振とうした。
7. 5% Skim milk 入り TTBS で Blocking 1h
8. TBS で洗浄 (10min 振とう) した。
9. 0.2% Skim milk 入り TBS で一次抗体を希釈し、室温で 1h 振とうさせて反応した。
10. TTBS で 2回洗浄 (10min 振とう) した。
11. 0.2% Skim milk 入り TBS で二次抗体を希釈し、室温で 1h 振とうさせて反応した。
12. TTBS で 2回洗浄 (10min 振とう) した。
13. 乾燥したメンブレンをキットを用いて染色し、スキャナで画像を取り込んだ。

## C. 研究結果

### 1) 毛状根の液体培養

カルスから出てきた毛状根を一本ずつ MS 寒天培地で育成し、クローン化し、MS液体培地に6-10本程度 (2cmぐらい長さ) を入れて培養した。カルスの大きさや誘発された毛状根の本数も違うため、各カルスから、違う数のサンプルを採集した (表1、写真1)。

### 2) ゲノム DNA の確認

液体培養の毛状根がフラスコにいっぱいになると、培地交換した。毛状根をある程度集めて、液体窒素でつぶした。得られた凍結粉（一つサンプルにつき約10mg）から genomic DNA を抽出した。Sigma の GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit を用いて抽出したが収率が低くて、PCR がほとんどかからなかった。このキットでも抽出できたサンプルは1-3, 1-4 と1-6 である。PCR 反応でこの三つの毛状根サンプルに yPDI が組み込まれていることがわかった。

### 3) タンパク質の確認

ほかのサンプルについてはゲノム DNA の確認は未確認のまま、タンパク質を抽出し、SDS-PAGE, ウエスタンブロッティングで確認することにした。

各サンプルの成長速度が違うため、タンパク質抽出に必要な量が得られた培養時間は異なっていた。

一回目の実験でタンパク質の抽出ができたサンプル：1-4、3-1、4-1

二回目の実験でタンパク質の抽出ができたサンプル：1-1、1-2、1-3、1-7、3-2、4-2、5-2 であった。

これらを用いて抗体反応をおこなった。

### 4) トランスジェニックベラドンナ植物体の作製

誘発されたカルスから植物体を得て、一年間にわたって育てた結果、トランスジェニックベラドンナの再生ができた(写真 2-5)。葉100mg から Sigma の RedExtract-N-Amp キットを用いて DNA を抽出し、PCR を行い、酵母 PDI 遺伝子が導入されていることを確認した。

### D. 考察

酵母 PDI 遺伝子をもった薬用植物ベラドンナが作成できた。しかしながら外見上は花の色などの変化は見られてない。今後アトロピンなどの生理活性物質の量の変化などを検討する必要がある。また毛状根でどれくらい

PDI が生産できるのか生産効率の上昇法等検討すべきである。

### E. 結論

酵母 PDI 遺伝子を組み込んだベラドンナを作製できた。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

投稿準備中

#### 2. 学会発表

1. 王麗雲、大塚 譲 他 2005年 分子生物学会大会(福岡) 「酵母 PDI の生産」
2. 王麗雲 大塚 譲 他 2004年 日本農芸化学会(広島)

### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

謝辞 植物体の実験に関して木内先生、吉松先生、河野先生、山本先生にお世話になりました。感謝いたします。

写真1 毛状根の液体培養

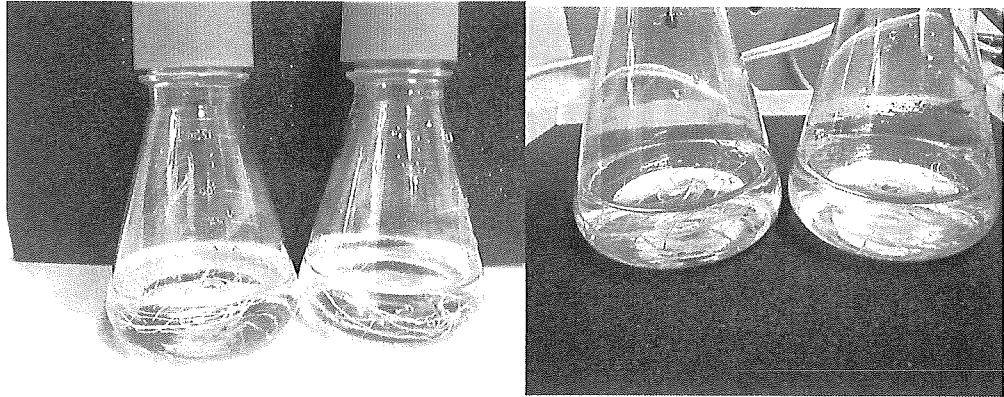


Table.1 sample of hairy roots

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	1-1	1-2	1-3	1-4	コンタミ	1-6	1-7	1-8
2	コンタミ	コンタミ	コンタミ	コンタミ	コンタミ			
3	3-1	3-2	コンタミ	中止		サンプル 未採集		
4	4-1	4-2	4-3	4-4				
5	コンタミ	5-2	中止	中止	中止			

タンパク質レベルで確認できたもの

中止 毛状根の成長は培養の途中で停止したもの  
(原因:成長点を含んでない毛状根を切り取った)

コンタミ 無菌操作の不注意でコンタミを起こしたもの

液体培養条件:100rpm/min振とう、25℃暗所培養

サンプル1-4、3-1、4-1のタンパク質を抽出し、SDS-PAGE電気泳動した(Fig.1)。同じサンプルをウエスタンブロッティングを行った(Fig.2)。また、同時にWako Pure systemfで合成したyPDIタンパク質も電気泳動した。

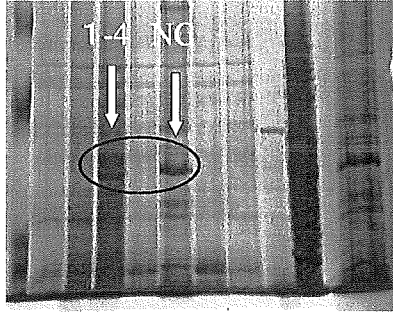


Fig. 1 SDS-PAGE写真  
三つのサンプルの中に、一番濃く出るのは1-4である。NC(negative control)に比べると出たバンドの位置明らかに違うことが分かった

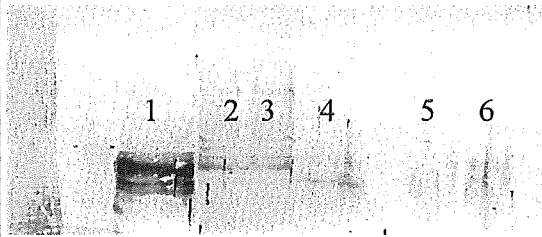


Fig.2 抗体反応  
Lane 1:Wako Pure systemを用いて、発現されたyPDI(タンパク質糖鎖が付加しない)  
Lane 2、lane3:コウジカビ発現系を用いて、発現されたyPDI  
Lane 4,lane5,lane 6:毛状根1-4、3-1、4-1から発現できたタンパク質

二回目タンパク質抽出ができたサンプル:1-1、1-2、1-3、1-7、3-2、4-2、5-2  
抗体反応をおこなった。

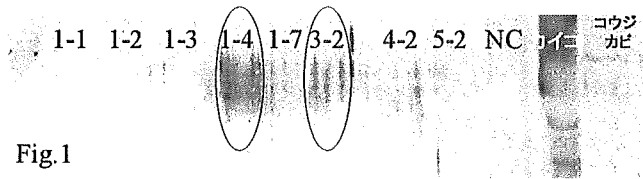


Fig.1

negative control(野生型ベラドンナ)に比べることによる、1-3、1-4、1-7、3-1、3-24-1、4-2毛状根サンプルにyPDIが組み込まれたことが分かった(fig.1)。この中1-4と3-2のタンパク質の発現量が一番多いことが分かった(fig.3)。

また、Wako pure systemで発現されたyPDIの分子量と比べると、毛状根で発現されたyPDIは糖鎖が付加しないことを考えられる(fig.2)。

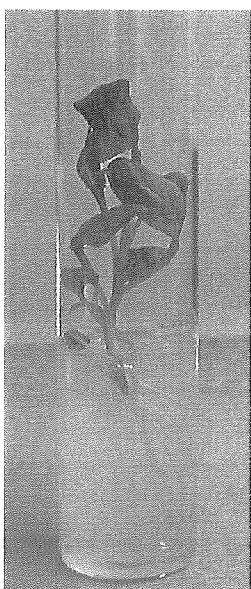


写真2



写真3



写真4



写真5

薬用植物の有用成分生合成酵素遺伝子解析に関する研究

ダイオウ由来ポリケチド生合成酵素遺伝子群の解析と

その異種同種植物への導入・発現について

分担研究者 野口博司 静岡県立大学薬学部 教授

薬用植物ダイオウ (*Rheum palmatum*) の抗炎症活性本体と目されてきたリンドレインのジケタイド部分を生合成すると考えられる、ベンザルアセトン合成酵素 (BAS) 遺伝子を他の植物内で恒常的に発現させるようにベクターを構築した。 *Agrobacterium* を用いた形質転換系によってこれをシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) に導入し、組換え植物体を選別し、ホモ転換系の種子を確保した。

ダイオウ由来へプタケタイド、アロエソン (Aloesone) 合成酵素遺伝子の機能解析を行い、植物ポリケチド合成酵素の開始基質、並びに縮合炭素鎖長を特定するアミノ酸残基を特定し、組換え酵素による活性の変換に成功した。

ダイオウより初めて典型的植物ポリケチド合成酵素であるカルコン合成酵素をコードする遺伝子の単離に成功した。

A. 研究目的

1) ベンザルアセトン合成酵素 (BAS) 遺伝子の、高等植物におけるモデル系であるシロイヌナズナ

(*Arabidopsis thaliana* Columbia) へのホモ変換体の確保。 2) アロエソン (Aloesone) 合成酵素 (ALS) 遺伝子のコードする酵素タンパクの機能解析。

3) ダイオウの植物ポリケチド合成酵素遺伝子検索、を目的とした。

研究の背景： 1) BA (phenyl butanone) 型のポリフェノールを生合成する高等植物は限られており、ダイオウの他にはラズベリー、生薬基源植物としては生姜やウコンなど限られた単子葉植物が中心である<sup>1)</sup>。シロイヌナズナではこれまで知られている限り BA 型の、即ち C6-C4 型の化合物を生産することは知られていない。一方ダイオウ (*Rheum palmatum*) 由来の BAS 遺伝子 (*bas*) が導入され発現した場合、i) 本酵素の基質は *p*-coumaroyl CoA、malonyl CoA でありシロイヌナズナに常在するフラボノイド類生合成に係るカルコン合成酵素 (CHS) 基質と同一である、ii) *bas* は約 1.4Kb の大きさで、*chs* スーパーファミリーとしては平均的なものである。同一ファミリー内の酵素のフォールディング形状は一般的に類似しており、補酵素等の要求性もない、iii) 通常細胞質で機能する。iv) 知られている限り BA の蓄積は直接細胞の生存を脅かすことはない。v) BAS は単一酵素で抗炎症作用

本体とされ、もしくはラズベリーの香気成分となる骨格を構築できる—これらの点から、BAS が細胞中で生成すれば、細胞内に BA が蓄積される可能性が極めて高く、しかもそれが導入遺伝子によるものであることが容易に判別されるという利点がある。シロイヌナズナは多くの蔬菜となる植物を含むアブラナ科に属し、その知見を広範な農業分野に応用できる可能性が高い。またシロイヌナズナを用いれば年 4 回程度の経代が可能であり、短期間に遺伝的変化を追跡することができる。そこでダイオウより単離した *bas* をシロイヌナズナに導入し、その発現によって招来されるシロイヌナズナ個体及びその遺伝的・生理的変化並びにその土壌への影響を調査研究することとした。昨年は BAS 遺伝子組換えシロイヌナズナを方法の項に記した通り実施しヘテロ植物体を選抜した。本年はホモ形質転換シロイヌナズナを目指した。 2) 昨年はダイオウの根よりクローニングされた遺伝子 (*root 5*) がアロエの成分として知られているアロエソンを生合成する酵素をコードする遺伝子であることを示し、その ALS は *p*-coumaroyl CoA、benzoyl CoA、acetoacetyl CoA、succinyl CoA 等を開始基質として受容せず、一方 *p*-dihydrocoumaroyl CoA と cinnamoyl CoA のように側鎖の自由度の C6C3 化合物は受容して 2 乃至 3 個の malonyl CoA を縮合・脱炭酸してポリケトメ



チレン鎖を生成することを明らかにした。ALS は他にも多種多様な基質を受け入れ、脂肪酸 CoA エステルに至っては炭素鎖 18 の stearoyl CoA までも基質として受け入れた。本年はこの ALS の基質受容性を決定しているアミノ酸残基とその影響について明らかにした。

3) ダイオウにはカテキンや複数のラタンニンと呼ばれるプロシアニジンが存在することから、典型的植物ポリケタイド合成酵素である、カルコン合成酵素 (CHS) が存在し、その酵素をコードする遺伝子 (*chs*) がなくてはならないが、これまで *chs* は見いだされなかった。今回これまで得られているクローンについて *chs* が存在しないか検討した。

## B. 研究方法

本学薬用植物園で栽培されているダイオウ *Rheum palmatum* 苗の葉及び根より、夫々 AGPC 法を用いて total RNA を抽出し、逆転写反応により 1st strand cDNA を作成した。渋谷の開発した縮重入りのプライマー CHS-112S, CHS-380A を用いて第一 PCR を、次にこの反応液を鋳型として、CHS174S, CHS-368A を用いて nested PCR を行った。予想された約 600 bp のバンドが出現したのでこれを精製し、pT7Blue にサブクローニングし、塩基配列の解析を行い、葉より二種、根より三種計 5 種の cDNA コア配列を得、順に leaf 1, leaf 2, root 3, root 4, root 5 と名付け、3'-RACE、5'-RACE 法により配列の解析を行った。

夫々の全長 ORF の C 末端にヒスチジンタグを付加した融合タンパクとして大腸菌内で異種発現を行い、Ni キレートカラムを通過させた分画を精製酵素として酵素反応に用いた。Bio-Rad Protein Assay Kit (BIO-RAD) を用いて定量、SDS-PAGE により発現の確認をおこなった。酵素反応は、acetyl CoA、*p*-coumaroyl CoA あるいは別表に記した各種 acyl CoA を開始基質とし、ポリケタイド鎖伸長基質として malonyl CoA あるいは methylmalonyl CoA を精製酵素と共に 30 °C、20 分以上インキュベートすることにより行い、塩酸の添加により反応を停止し、酢酸エチルで反応生成物を抽出し、Tosoh ODS-80Ts を用い、MeOH (0.1% TFA) 30~70% のグラジエントを用い HPLC による分析を行った。

酵素反応生成物の物理分光法による構造決定に際しては下記の反応条件によった。

20 mg Enzyme

280.8  $\mu$  M malonyl CoA

Reaction buffer total 100 mL

↓ 20% HCl 10 mL、反応停止。

↓ 200 mL EtOAc で抽出 (3 回)。

↓ EtOAc 層を等量の H<sub>2</sub>O で洗浄。

↓ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で EtOAc 層を乾燥、EtOAc を留去。

↓ MeOHsol、分取 (HPLC)、画分を凍結乾燥。

↓ 溶媒留去。

↓ 比較的大きなピークを LC-ESIMS で確認。

↓ HPLC の条件を変更、分取、精製。

↓ <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD)。

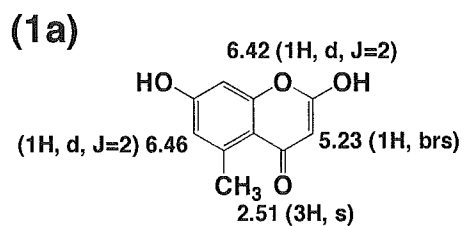
Aloesone, Sek4, Sek4b, *p*-Coumaroyl Triacetic Acid Lactone derivatives, 2,7-Dihydroxy-5-methyl chromone Bisnoryangonin 誘導体等。

Aloesone の生合成に関与するアミノ酸残基及び III 型 PKS の構造機能相関を検討するために X 線結晶解析の完了しているムラサキウマゴヤシのカルコン合成酵素 (*M. sativa* CHS II) の対応するアミノ酸残基番号、例えば 197 番目の Ala 等、6 つのアミノ酸 Thr<sup>133</sup>, Val<sup>194</sup>, Ala<sup>197</sup>, Met<sup>254</sup>, Leu<sup>256</sup>, Thr<sup>338</sup> に焦点を絞り、T133S, V194C, V194T, A197T, A197L, M254I, L257G, L257Y, T339S, T339I, T339A 合計 11 個の部位特異的変異酵素を作成した。作成にはダイオウ由来 ALS の ORF を組み込んだ大腸菌発現用ベクター pET22b を鋳型とし、QuikChange™ XL Site Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE) を用いた。11 個の変異酵素のうち、発現が確認できた計 10 個の変異酵素を用いて酵素反応をおこない、HPLC により生成物の解析をおこなった。同様にしてダブル・トリプルミュータントの作成を以下のように行った。A197T 変異酵素のプラスミドを鋳型とし、A197T/L256G, A197T/T338S 変異導入を、L256G 変異酵素のプラスミドを鋳型とし、L256G/T338S 変異導入を、A197T/L256G 変異酵素のプラスミドを鋳型とし、A197T/L256G/T338S 変異導入を QuikChange™ Kit を用いて行った。

シロイヌナズナに *bas* を導入するにはベクターシロイヌナズナ野生系統 Columbia 種の開花直前の蕾が出てきた頃の株を用いた。直接懸濁液に浸して 3 分おき、感染させ、形質転換を行った。種子を収穫しグルホシネート耐性となった個体を選抜した。ダイオウ由来ベンザルアセトン合成酵素 (BAS) 遺伝子 (*bas*) も含め詳細は昨年の方法の項参照

## C. 研究結果

A197T, A197L 変異酵素では Rt 23.1 min に、これまで見られなかった [M+H]<sup>+</sup> = 193 の単一ピークが見られた。<sup>1</sup>H-NMR データの解析から 2,7-dihydroxy-5-methyl chromone (1a) と推定され、同定した。



2,7-dihydroxy-5-methylchromone  
 RT = 23.1 min [M+H]<sup>+</sup> = 193.2 λ max 308 nm

T133S, V194C, V194T変異酵素においては活性が減弱したが、野生型と同様の生成物を得た。254番目のMet、256番目のLeu、338番目のThrに変異を導入したM254I, L256G, L256Y, T338A, では、T338S変異酵素がアロエソンの合成能を失い、副産物のトリケタイドラクトン (TAL)やテトラケタイドラクトンのみを生成した。更に見ると、野生型では

-coumaroyl CoAを基質として受け入れなかったことに対してL256G変異酵素においては2分子のmalonyl CoAを縮合したトリケタイドラクトン bisnoryangonin (BNY)、3分子のmalonyl CoAを縮合したテトラケタイドラクトン *p*-coumaroyltriacetic acid lactone (CTAL)を産物として得た。T133S, V194C, V194T, M254I, L256Yにおいては両産物を得たものの、生成量はわずかであった。また、A197L, A197T, T338A, T338S, T338Iでは野生型と同様、酵素反応は進行しなかった。

ダブル、トリプルミュータントを作成し、酵素活性を検討した。前項での、A197T変異酵素のプラスミドを鋳型とし、A197T/L256G, A197T/T338S変異導入を、L256G変異酵素のプラスミドを鋳型とし、L256G/T338S変異導入を、A197T/L256G変異酵素のプラスミドを鋳型とし、A197T/L256G/T338S変異導入を行った。するとALSでは基質とならなかった

-coumaroyl CoAとmalonyl CoAを適用した場合、点変異体であるL256G 変異酵素においてトリケタイドラクトン (BNY)、テトラケタイドラクトン (CTAL)を生成した場合と同様に、ダブル、トリプルミュータントにおいてもL256Gに変異を入れた変異酵素全てに両生成物の活性が見られた。一方、L256G/T338S変異酵素においては生成量に変化はなかったもののA197T/L256G変異酵素においてはCTAL, BNY共に生成量が増大し、特にBNYにおいて著名な活性が見られた。5-メチルクロモンの生成についてはA197T変異酵素が最もkcat/Kmの値が大きく、変異を入れる毎に低下し、特にT338Sに同時に変異導入したものではkcatの値が劇的に低下した。

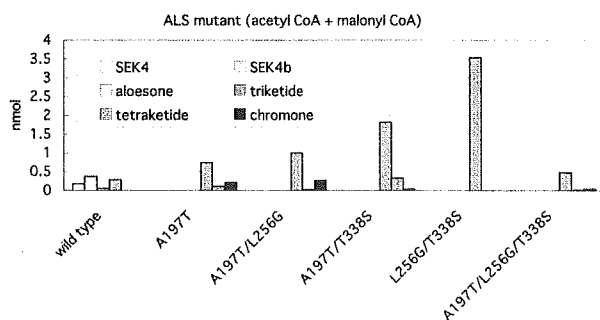
197番目のアミノ酸残基は長鎖ポリケタイド鎖

の伸長に参与しているのではないかと考えられるが、開始基質がacetyl CoAと

-coumaroyl CoAの両者の場合では197番目のアミノ酸残基は伸長反応を制御しているように思われる。NoelらのX線解析の結果から、活性キャビティの構造を見ると197番目のアミノ酸残基はacetyl CoAをスターター基質とした場合は長鎖ポケットの入り口を形成し、*p*-coumaroyl CoAをスターター基質とした場合は197番目のアミノ酸の側鎖がポリケタイド鎖の先端がクマロイルポケットに進む途中に位置すると考えられる。恐らく197番目のアミノ酸残基は、長鎖ポリケタイド化合物の場合では長鎖ポケットにポリケタイド鎖が入るかを、カルコンのような芳香環を有し嵩高い開始基質の場合ではThr<sup>197</sup>のOH基によってポリケタイド鎖のフォールディング形成とそのことによるmalonyl CoAの縮合数の制御に寄与しているように思われる。さらにT338Sの変異を導入することでキャビティの形がCHSに近づき、カルコンの構造異性体であるCTAL生成が増大したと考えられる。

ここでキャビティを形成するアミノ酸残基のうちVal<sup>195</sup>, Asp<sup>218</sup>, Met<sup>254</sup>の CHSに対応するアミノ酸をトリプルミュータントに導入したが、活性に変化は見られなかった。一方コガネバナ (*Scutellaria baicalensis*)由来カルコン合成酵素 (CHS-P)は我々が植物ポリケタイド合成酵素として最初に取り上げた「典型的(prototype)」カルコン合成酵素であるがアロエソンのアミノ酸配置であるT197A/G256L/S338V組換え体を作成し、生成物を検討したがアロエソンの生成が見られなかった。

T339Iではタンパク質全体のフォールディングの問題か、異種発現は成功しなかった。



ダイオウからは何故かこれまで典型的カルコン合成酵素(CHS)は単離されてこなかった。前回から得られていたroot3, root4 (CHS1, CHS2)の遺伝子の機能を解析した結果これらがCHSであることが判明した。夫々1,176-bp, 391アミノ酸、1,179-bp 392アミ

ノ酸よりなり、夫々90%の相同性があり、他の植物由来III型ポリケタイド合成酵素との間には概ね60-80%の相同性が見られた。これまで述べてきたBAS<sup>3)</sup>とは70% ALSとは60%の相同性が見られた。*Rheum tataricum*<sup>5)</sup>のスチルベン合成酵素(STS)とは70% 相同性が見られた。どちらのCHSもほとんど全てのPKS IIIで保存されている3アミノ酸Cys164, His303, Asn336は存在し、その他Met137, Gly211, Gly216, Ile254, Gly256, Phe265, Ser338, Pro375, Phe215も保存されていた。興味深いことには、典型的CHSであるコガネバナのCHSでもこれらは保存されているが、コガネバナで受容されたC4~C12の鎖長、あるいはピーナッツのSTSでは鎖長~C14の脂肪酸CoAエステルを越え、C20までを受容シテトラケタイドラクトンを生成することが分った。なおキネティクスはCHS1 ( $K_M = 61.1 \text{ mM}$  and  $k_{cat} = 1.12 \text{ min}^{-1}$  for 4-coumaroyl-CoA)、CHS2 ( $K_M = 36.1 \text{ mM}$  and  $k_{cat} = 0.79 \text{ min}^{-1}$  for 4-coumaroyl-CoA)であった。

#### D. 考察

昨年はALSがアセチルCoAを直接基質として受入れるのではないかと考察したが、本年はこの酵素のアミノ酸残基の役割について簡単に論じたい。256番目のアミノ酸はスターター基質の特異性を決定する重要なファクターの一つであり、この部分がGlyのように立体的に小さいCHSやSTSでは芳香環を含む基質を取り込んで伸長反応をおこなうことができる。しかしLeuのように立体的に大きいALSやOKSでは芳香環を含むCoAエステルは取り込みにくく、acetyl CoA等の側鎖が小さいCoAエステルを取り込んで伸長反応をおこなう。

スターター基質が取り込まれるとmalonyl CoAを基質としてポリケタイド鎖の伸長反応が起こるがこの伸長数を制御しているアミノ酸の一つが197番目である。芳香環を含む基質はクマロイルポケットと呼ばれる部分へ、acetyl CoAの場合は長鎖ポケットと呼ばれる部分へ向かって伸長させると考えられるが、197番目のアミノ酸は両者の場合も伸長途中に位置し、その立体的形状およびその大きさから伸長数を制御していると考えられる。

またその時、ポリケタイド鎖が長鎖ポケット、クマロイルポケットのどちらに向かうかを決定しているのが338番目のアミノ酸であると考えられる。CHSなどクマロイルポケットの方向にポリケタイド鎖を伸長させる場合はSerとなっており、おそらく活性中心近傍に位置するOH基の静電的影響からポリケタイド鎖の進行方向を決めていると思われる。また、ALSなど長鎖ポケットに伸長させる場合にはOH基は存在せず、256番目のアミノ酸残基の立体的大きさの影響もあり、

長鎖ポケットの方向に向かうと考えられる。ポリケタイド鎖の伸長が終了すると閉環反応の違いにより、生成物の多様性が生まれる。CHSではC1位とC6位がクライゼン縮合することでカルコンを生成し、STSの場合では134番目のThrの影響により脱炭酸を伴うC2位とC7位のアルドール縮合によってレスベラトロールが生成される。長鎖ポリケタイド化合物の場合は5,7-dihydroxy-2-methyl chromoneと2,7-dihydroxy-5-methyl chromoneの特異的な作り分け論文発表：I. Abe, T. Watanabe, W. Lou, H.がおこなわれているがその詳細は未だ不明である。今後、閉環反応の違いを探ることで本酵素の特異性と広範な触媒活性を生かしたIII型PKSによるコンビナトリアルケミストリーの発展、非天然型化合物ライブラリーの構築が期待される。

形質転換シロイヌナズナについては、現在のところ抗生物質耐性と農薬耐性について検討したところであって、酵素タンパク質の発現の有無までは検討していないものの、一応basの導入されたホモ変異体の作出の作出には成功したと考えている。

#### 参考文献

- 1) I. Abe, Y. Takahashi, H. Morita, and H. Noguchi ; *Eur. J. of Biochem.*, **268**, 3354-3359 (2001)
- 2) Abe, I., Morita, H., Nomura, A., Noguchi, H. : *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 11242-11243 (2000)
- 3) Abe, I., Takahashi, Y., Lou, W., Noguchi, H. : *Org. Lett.* **5**, 1277-1280 (2003)
- 4) Abe, I., Watanabe, T., Noguchi, H. : *Phytochemistry*. **65**, 2447-2453 (2004)
- 5) Fu, H., Hopwood, D. A., Khosla, C. : *Chemistry & Biology*. **1**, 205-210 (1994)
- 6) Fu, H., Ebert-Khosla, S., Hopwood, D. A., Khosla, C. : *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 4166-4170 (1994)
- 7) Samappito, S., Page, J. E., Schmidt, J., De-Eknamkul, W., Kutchan, T. M. (2003) *Phytochemistry* **62**, 313-323.

#### E. 研究発表

1. Noguchi; Active site residues governing substrate selectivity and polyketide chain length in aloesone synthase, *FEBS Journal (EUR. J. BIOCHEM.)*, **273**, 208- 218 (2006)
2. I. Abe, T. Watanabe and H. Noguchi; Chalcone Synthase Superfamily of Type III Polyketide Synthases from Rhubarb (*Rheum palmatum*), *Proc. Japan Acad.*, **81**, Ser. B 434- 440, (2005)
3. I. Abe, T. Watanabe, H. Morita, T. Kohno and H. Noguchi; Engineered Biosynthesis of Plant Polyketides: Manipulation of Chalcone Synthase, *Org. Lett.*, **8**(3), 499-502 (2006)

## 2)学会発表

1. 阿部郁朗、渡辺達也、Lou Weiwei、野口博司:芳香族ヘプタケタイドの骨格を構築する大黃由来新規III型ポリケ タイド合成酵素の構造機能解析 第125回 日本薬学会年会(東京)、要旨集4、p.173、2005年3月31日
2. 渡辺達也、野口博司、阿部郁朗:植物ポリケタイドの生合成工学:カルコン合成酵素への点変異導入によるオクタケタイドの生成 日本生薬学会第52回年会(金沢)、要旨集、p. 49、2005年9月16日.
3. 安部剛史、渡辺達也、小黑聡史、阿部郁朗、野口博司:植物ポリケタイドの生合成工学:ベンザルアセトン合成酵素の構造機能解析 日本生薬学会第52回年会(金沢)、要旨集、p. 50、2005年9月16日

F. 知的財産権の取得状況  
なし