

## 機能性低分子プレニル化ポリフェノールとその生合成工学

矢崎 一史

植物の生産する機能性低分子化合物はあまたあるが、ポリフェノールはもっとも広く認識されているグループの1つである。そのポリフェノールに、さらに「プレニル基」と総称されるイソプレノイド鎖が結合したものがプレニル化ポリフェノールであるが、その数は天然に約1000種類が知られている。プレニル化されるポリフェノールは、フラボノイド類が最も多く、クマリン類、フロログシノール類、キサントン類などがそれに次ぐ。これらの多くは、抗菌活性、抗腫瘍活性、エストロゲン様活性、抗NO産生活性、抗チロシナーゼ活性など、それぞれの生理活性を指標に、さまざまな薬用植物や作物類から活性本体として単離同定された<sup>1)</sup>。身近な例としては、ビールに含まれる苦味成分 ( $\alpha$ -酸、 $\beta$ -酸) や、ダイズの根が感染防御物質として生産するグリセオリンなどが挙げられる。

上記の多様な生理機能はポリフェノール分子中のプレニル基の存在に依存することが知られるが、その一方でプレニル基をポリフェノールに結合させる植物酵素「プレニル基転移酵素」は、最近になるまでその実体が解明されてこなかった。2008年に筆者らが最初のフラボノイド特異的プレニル基転移酵素N8DTのcDNAを同定し<sup>2)</sup>、これを皮切りに本研究分野でも分子生物学の応用研究が可能となった。本稿では、プレニル化酵素遺伝子を用いた植物の生合成工学と、その過程で見いだされた興味深い現象について解説する。

## ミヤコグサを用いた代謝工学デザインの検討

植物のポリフェノールをプレニル化できる酵素遺伝子としては、先に放線菌において可溶型のプレニル基転移酵素遺伝子が同定されていた<sup>3)</sup>。Orf2およびHypScと呼ばれるこれらの酵素がフラボノイドを基質にできる点に着目し<sup>4,5)</sup>、比較的フラボノイドレベルが高く、なおかつ形質転換可能であるという理由で宿主植物にミヤコグサを選択し、代謝工学によるプレニル化ポリフェノールの生産を試みた。放線菌の可溶性タンパク質であるOrf2およびHypScは、いずれも芳香族基質の特異性が広いのが特徴で、フラバノタイプ、イソフラボノタイプどちらの骨格もプレニルアクセプタとして認識できることがリコンビナントタンパク質を用いた実験で明らかになっていたため、さまざまなフラボノイド類がプレニル化されることを期待した。なお、ミヤコグサを宿主にした実験では、構成的発現をさせるためCaMV35Sプロモータを用いた。

**プレニル基転移酵素の細胞内局在性** 植物はさまざまな細胞内小器官を持つが、生合成酵素もそれぞれ native な状態でどの細胞内コンパートメントに局在するかが決まっている。植物のプレニル基転移酵素の場合、例は多くないが、生化学的解析からプラスチド局在であることが報告されていた。実際、筆者らが最初にクローニングした植物由来のフラボノイドプレニル基転移酵素もプラスチド局在性のタンパク質であった<sup>2)</sup>。一方、プレニル化ベンゾキノンであるコエンザイムQは、真核生物の場合ミトコンドリアに局在する<sup>6,7)</sup>。そこで、細胞質も含め、これら3つの細胞内コンパートメントのうちプレニル化フラボノイドの生産にもっとも向いているのはどこか、放線菌の酵素遺伝子に植物由来のターゲティングシグナルを融合して調べた(図1)。なお、前述のN8DT(フラバノン特異的)、および同じく植物(クララ)起源でイソフラボン特異的なプレニル化酵素G6DTも同様に代謝工学に用いた<sup>8)</sup>。

ウエスタン解析による酵素タンパク質の蓄積量を比較した結果、導入発現させた酵素の種類にもよるが、ミトコンドリアにターゲティングさせた場合には酵素タンパク質自身が検出されない傾向が強かったこと、また細胞質よりはプラスチドに局在させた方がタンパク質の蓄積が高いという傾向が認められた<sup>9)</sup>(表1)。なお、植物由来のプレニル化酵素はいずれも膜結合性であるが、そのプラスチド局在シグナルを除いて発現させる実験はN8DTのみで試みた。しかしながら、タンパク質の発現

- PT蛋白のターゲティング 1) 細胞質 (WT)
- 2) プラスチド (RbcLS)
- 3) ミトコンドリア (OsCOQ2)

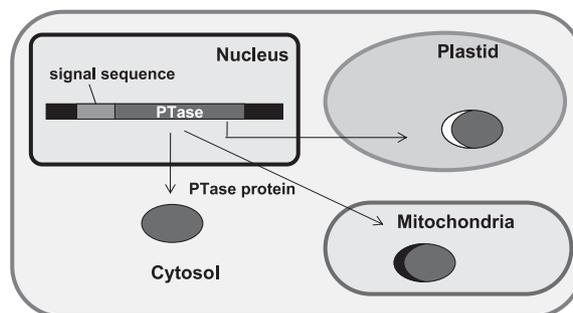


図1. プレニル基転移酵素 (PT) の細胞内局在性改変。RbcLS, RuBisCO大サブユニット (タバコ); OsCOQ2, PHB: polyprenyltransferase (イネ) のシグナル配列を用いた。

表1. 各PT形質転換体におけるプレニル化合物の検出

	細胞質	プラスチド	ミトコンドリア
HypSc	タンパク質 (-)	6-DN	タンパク質 (+)
	代謝産物 (-)	6-DG	代謝産物 (-)
Orf2	タンパク質 (+)	7-O-GG	タンパク質 (+)
	代謝産物 (-)	(1.4 ng/g DW)	代謝産物 (-)
NovQ	タンパク質 (+)	タンパク質 (+)	タンパク質 (+)
	代謝産物 (-)	代謝産物 (-)	代謝産物 (-)
NovQ(M)	6-DN	6-DN	—
	6-DG	6-DG	—
N8DT	タンパク質 (-)	8-DN	—
	代謝産物 (-)	(5.9 μg/g DW)	—
G6DT	—	6-DG	—
	—	(101 μg/g DW)	—

PT, prenyltransferase; 6-DN, 6-dimethylallyl naringenin; 6-DG, 6-dimethylallyl genistein; 8-DN, 8-dimethylallyl naringenin; 7-O-GG, 7-O-geranyl genistein; DW, dry weight.

そのものが検出できなかった。おそらく小胞体の quality control 機構により、分解されているのがその理由ではないかと推察している。

**芳香族基質の供給による物質生産** これら3つのコンパートメントにプレニル化酵素を局在させた形質転換ミヤコグサの葉を用いて、プレニル化合物が実際に生産されているか調べたが、残念ながら明確なプレニル化フラボノイドの検出ができなかった。その理由の一つとして、ミヤコグサ植物体内でのフラボノイド供給が十分ではないことが予想されたため、フラボノイドの中で最も基本的でさまざまなフラボノイドの前駆体でもあるナリンゲニン（フラバノンの1種）を葉に投与した。その結果、6-ジメチルアリルナリンゲニン（6-DN）、イソフラボンの6-ジメチルアリルゲニステイン（6-DG）、およびGPP特異的な酵素であるOrf2を用いたときのみ7-O-ゲラニルゲニステインが検出された<sup>9)</sup>。その結果を表1にまとめる（表1, 図2）。

芳香族基質に対して広い特異性を示す放線菌のプレニル化酵素では、一般にナリンゲニン投与でそのプレニル体が検出されただけでなく、マメ科に特徴的なイソフラボンのゲニステインのプレニル化体も検出された。これは投与されたナリンゲニンが他のフラボノイド類の前駆体でもあることから、イソフラボンに変換された後にプレニル化されたものと予想される。全体の傾向として明確だったのは、コドンユースージを植物用に改変した変異酵素NovQ(M)の場合を除き、プレニル化合物が検出されたのはプレニル化酵素をプラスチドに局在させた形質転換体のみであった点である。量的にはG6DT発現株において最も高い生産レベルを得たが、逆にOrf2発現株ではプレニル化合物の生産量はきわめてわずかだった。前者については後に改めて述べるが、後者のお

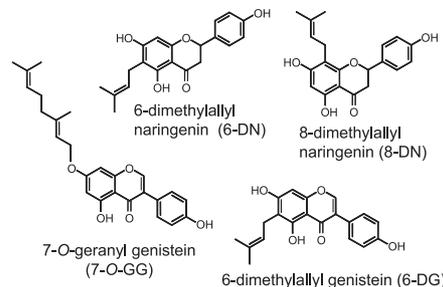


図2. 生産が認められた化合物

もな理由は、Orf2がプレニル基質としてGPPに特異的な酵素であるため、もともとモノテルペン系化合物を生産しないミヤコグサではGPP供給能が高くないためであると考えられる。なお、NovQで行ったコドンユースージの改変は、タンパク質の蓄積で明確な改善効果が認められただけでなく、プレニル化合物の生産においても明らかなメリットがあった。プレニル化酵素のミトコンドリア局在に関しては、いずれの酵素遺伝子を用いた場合においても、タンパク質は検出されてもプレニル化合物は、基質投与の有無に関わらず一切検出されなかった。

一方、植物起源のプラスチド局在型プレニル化酵素を発現させたミヤコグサでは、基質特異性が高い性質を反映して、フラバノン特異的なN8DTの形質転換体からは6-DNが、イソフラボン特異的なG6DT発現体からは6-DGが検出された。いずれもナリンゲニンを投与しての結果であることから、後者では内在性酵素によりマメ科植物で多く生産されるイソフラボンに変換された後にG6DTにより6位がプレニル化されたものと考えている。結果として、植物由来の酵素を用いた場合には、その基質特異性のため、1種類の生産物のみが新たに生産されていたということになった（表1）。

プレニル化合物生産に適した細胞内コンパートメントの総合的評価としては、プラスチドが最も適しているという結論が得られた。この理由については、おそらくはプラスチドが短鎖のイソプレニル基質であるDMAPPの供給に適しているためではないかと考えている。サイトゾル局在のメバロン酸経路に由来するイソプレニル側鎖を有する内在性化合物を考えた場合、多くのものがC15（セスキテルペン）、C30（トリテルペン）あるいはC40以上の化合物（e.g. Coenzyme Q）であるとの事実もあり、細胞質においては最小のC5ユニットであるDMAPPの形での供給には適していないのかもしれない。

### トマトを宿主にした果実での物質生産

前述の実験ではマメ科のモデルとしてミヤコグサを用いたが、ナス科のモデル植物としてトマトを用いた同様の実験も行った。より形質転換の容易なタバコを用いな

かったのは、最終的な応用形態に経口での利用が想定されていたため、有毒な内在性アルカロイドのニコチンを含有するホストを避けたためである。またトマトのメリットとして、多くの品種で果皮の下部細胞層にナリングエンカルコンがアグリコンとして蓄積している点が挙げられ、インビボでの基質供給が期待されたのもトマトをホストに用いた理由である。

トマトに種々のプレニル化酵素を発現させるに当たり、ミヤコグサで得られた知見を元にして、細胞内局在をプラスチドに改変した放線菌のHypSc (TP-HypSc) と、植物起源のN8DTの2種のみをプレニル化酵素として実験に用いた。発現プロモータには、植物全体で構成的に発現するCaMV35Sプロモータ以外に、果実特異的に発現するE8プロモータを用い、上記の組み合わせにより4種のコンストラクトを作成した。ホスト品種には、植物工場により適したトマトの矮性品種であるMicro-Tomを選び形質転換を行ったが、本稿ではE8プロモータを用いた組換えトマトの解析結果について紹介する<sup>10)</sup>。

果実のプレニル化化合物を分析した結果、特に基質を外部から供給することなく、TP-HypSc発現トマトの果皮の部分において3'-プレニルナリングエンが生産されていることが認められた(図3)。この結果が筆者らにとって驚きだったのは、大腸菌で発現させたりコンビナント酵素を使った解析ではHypScによるゲニステインのプレニル化位置が6位であることであった。このことは、同じゲニステインとDMAPPを基質にしたプレニル化反応において、ホスト生物種に依存してHypScのもつ生産物特異性が変わってしまったことを示唆している。一方、N8DTに関しては理論通り、組換え酵素を使ったインビトロ解析と同じ8-DNがトマトの果皮部分で生産されていることが分かった<sup>10)</sup>。なおプレニル化酵素を発現させたことで、トマトの形態や稔性などに変化は認められなかった。

### 酵素機能のホスト生物依存性と物質集積

ホスト依存的に酵素機能の特異性が影響を受けるという現象をもう一度整理してみると、HypScを大腸菌で発現させてインビトロでナリングエンのプレニル化活性を見ると、主たる生産物は6位にプレニル基の導入された6-DNであるが、この酵素をトマトに発現させると主たる生産物は3'-DNであったということである。一般的にプレニル化酵素を発現させた大腸菌にフラボノイドを供給してプレニル化体を生産させることができるが、その場合できる生産物は*in vitro*で生産されるものと同一である。従って、これは*in vitro*と*in vivo*の違いを見ているのではなく、ホスト依存的に酵素機能、この場合は生産物特異性が変化してしまったと考えることができる。これはバクテリアと植物というホスト生物の種間差の大きさに由来するのであろうか。興味深いことに、植物酵素であるN8DTを発現させたシロイヌナズナでは、や

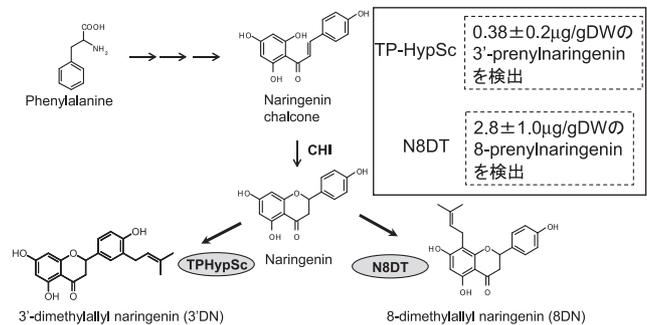


図3. プレニル化酵素発現トマトの解析

はり *in vitro* では基質としなかったケンフェロールの8-プレニル体が *in vivo* で検出されている<sup>2)</sup>。こちらの場合は、プレニル化後にナリングエンが内在性酵素でケンフェロールに変換された可能性が高いが、ヘテロなホスト種で基質特異性が広がってN8DTがケンフェロールを認識できるようになった可能性も否定できない。いずれにしても、この現象は今後生化学的に検証する必要がある。

今回行った一連のプレニル化酵素の代謝工学で、基質投与は行ったものの、もっとも蓄積量が高かったのがイソフラボンのプレニル基転移酵素G6DTを発現させたミヤコグサにおける6-DGであった(101 μg/g fresh wt)。その理由について筆者は以下のように推測している。すなわち、植物はそれぞれの種特異的に、デフォルトとしてもっとも蓄積しやすい化合物の「好み」を持っていて、代謝工学により人為的にプレニル化など新たな代謝酵素を導入されても、可能な限りその「好み」の化合物まで変換して貯めるのではないか。その最終産物は植物種によりそれぞれ異なり、たとえばマメ科植物ではイソフラボン類のゲニステインであり、シロイヌナズナではフラボン類のケンフェロールではなからうか。上記のホスト依存的な酵素機能の変化(基質ならびに生産物特異性)も含め、今後さらに代謝工学を成功させるためには、ホストと遺伝子の組合せだけでなく、植物細胞の可塑性や化合物の集積機構など、基礎的な部分をもっと詳しくしていく必要があると感じている。

### 文 献

- 1) Yazaki, K. *et al.*: *Phytochemistry*, **70**, 1739 (2009).
- 2) Sasaki, K. *et al.*: *Plant Physiol.*, **146**, 1075 (2008).
- 3) Kuzuyama, T. *et al.*: *Nature*, **435**, 983 (2005).
- 4) Kumano, T. *et al.*: *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 8117 (2008).
- 5) Ozaki, T. *et al.*: *J. Antibiot.*, **62**, 385 (2009).
- 6) Ohara, K. *et al.*: *Plant J.*, **40**, 734 (2004).
- 7) Ohara, K. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **47**, 581 (2006).
- 8) Sasaki, K. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **286**, 24125 (2011).
- 9) Sugiyama, A. *et al.*: *Metab. Eng.* (in press)
- 10) Koeduka, T. *et al.*: *Plant Biol.*, **13**, 411 (2011).