

触媒活性をもとに植物の酵素遺伝子を捉える

明石 智義*・青木 俊夫

遺伝子組換え技術を用いた有用物質の生産には、酵素遺伝子の同定が必須である。放線菌などでは、二次代謝産物の生合成に関わる一連の酵素遺伝子は染色体上でクラスターを形成していることが多く、クラスター内の遺伝子を解析すれば同じ代謝経路に含まれるすべての酵素遺伝子を一挙に同定することが可能である。しかし植物ではほとんどの場合、酵素遺伝子は染色体上に散在しているため、個別に遺伝子をスクリーニングして機能を同定する必要がある。

近年新世代のシーケンサーを用いた解析技術が進展し、モデル植物以外でもゲノムやトランスクリプトーム解析が行われ、データベースなどの各種ウェブツールが充実してきた。また自前でトランスクリプトーム解析することも容易になった。このため酵素遺伝子の同定を行うときは、まず遺伝子からのアプローチを考えるのではないだろうか？一般に植物の二次代謝系では、同じ反応を行う酵素は植物種が違っていてもその塩基・アミノ酸配列は高度に保存されている。つまりこれらは共通の祖先遺伝子から種分化に伴って生じた相同な遺伝子で、オルソログな関係にある。このためすでに別の植物で酵素遺伝子が同定されている場合、配列が類似したオルソログと予想されるものを選抜し、異種発現系で触媒機能を確認すれば迅速な同定が可能なが多い。また酵素遺伝子の発現は代謝産物の蓄積と対応していること、生合成系の遺伝子は協調的に制御され発現の挙動が同じであることが多いので、新規の酵素遺伝子の場合でもターゲットとなる酵素の種類が明らかな場合、そのファミリーの遺伝子を選抜し、発現の特異性から絞り込むことが多い。またメタボロームとトランスクリプトームを統合した遺伝子共発現解析による酵素遺伝子の予測も可能であり、シロイヌナズナではグルコシノレートやアントシアニン生合成系の新規の酵素遺伝子が同定されている¹⁾。

しかしこうした方法にも限界がある。生合成酵素はそれぞれスーパーファミリーを形成しており、多数の分子種の中には、類似の配列を持ちながら触媒機能や基質特異性が異なる場合がある。また、後述する脱水酵素のように、所属するスーパーファミリーからは機能が予測不可能な場合もある。さらに、遺伝子からのアプローチでは、最終的に機能の生化学的確認が必要となるが、候補遺伝子の数があまりにも多い場合は、「アタリ」を選抜するまで多大な労力と時間が必要になる。

酵素にとって「触媒活性」が重要であるなら、活性を指標にして遺伝子を取得できれば確実ではないだろうか？酵素タンパク質を精製し、アミノ酸配列情報をもと

に遺伝子をクローニングする手法はもっとも確実であるが、時間がかかることやある程度のテクニックが必要なこともあり、これを試みる研究者はほとんどいなくなってしまう。土壌細菌 *Erwinia* では、カロテノイド生合成酵素遺伝子群が「酵素の機能」を利用してクローニングされている²⁾。その手法は、*Erwinia* の染色体断片を大腸菌に導入し、この中からカロテノイドを蓄積して黄色くなった大腸菌を単離して原因遺伝子を同定するという画期的なものであった。

植物では、染色体断片を大腸菌に導入してもその遺伝子は機能しない。そこでcDNAライブラリーを大腸菌発現ベクターで作製すれば、一つの大腸菌あたり一つの植物cDNAを発現した大腸菌のプールができる。その中から目的の触媒活性を持つクローンを選抜すれば、原因遺伝子を同定できるはずである。実際「機能発現分画スクリーニング法」と名付けた手法でマメ科植物のイソフラボノイド生合成に関わる2種の脱水酵素遺伝子が取得された^{3,4)}。この手法では、数十万の大腸菌をスクリーニングする場合でも、大腸菌プールの分画と触媒活性の測定を数回繰り返せば目的活性を持つシングルクローンの単離が可能である。また活性を指標とするため、配列情報は必要なく、予想外の遺伝子が取得できる可能性がある。実際二つの脱水酵素のうち一つはカルボキシエステラーゼ様のモチーフをもち、残りの一つはリグナンの立体化学を決定づけるディリジェントタンパク質様のモチーフを持つことがわかった。これまでにこれらのタンパク質が脱水反応を触媒することは知られておらず、両ファミリータンパク質の新しい機能が明らかになった。

タンパク質をコードする遺伝子は、一つの植物に2万種以上あると考えられており、遺伝子クローニングは漁船に乗って「狙った魚」を釣り上げるようなイメージかもしれない。一方組換え技術を用いた物質生産は、アルテミスニン前駆体やケシ科アルカロイドの微生物での発酵生産のように、釣り上げた魚を使ってエレガントに調理する三つ星シェフのようなものであろう。「釣り」にもいろいろな方法があるが、いろいろ工夫して「生きが良くて、(いろいろな意味で)美味しい」酵素の遺伝子を捕まえて調理に使うことが、遺伝子クローニングの醍醐味である。

- 1) 平井優美：植物の生長調節, **44**, 67 (2009).
- 2) 三沢典彦：蛋白質核酸酵素, **41**, 337 (1996).
- 3) Akashi, T. *et al.*: *Plant Physiol.*, **137**, 882 (2005).
- 4) Uchida, K. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **58**, 398 (2017).