

植物の芳香族基質プレニル化酵素の触媒機構に関する酵素学的研究

韓 俊文

2023

序論

プレニル化フェノール類は植物二次代謝産物の一グループであり、これまでに約 1,000 種に及ぶ化合物が構造決定されてきた。これらの中には、病害虫に対する化学防御など、植物にとって重要な生理機能を担うものや、人の健康の維持向上に資する生理活性物質も多く含まれている。代表的なものとして、ムラサキ科植物の根から得られる抗炎症活性のシコニン、キク科植物特有の成分で抗肥満活性があるアルテピリン C、オトギリソウ科植物の抗うつ並びに消炎鎮痛作用の活性成分であるハイパーフォリンなどが報告されている。

これら多彩な生理活性の発現には、フェノール母核上のプレニル基の存在が重要であることが知られ、その生合成においてフェノール骨格にプレニル基を転移させる鍵酵素が、プレニル基転移酵素(PT)である。植物 PT の大きな特徴の一つとして、植物由来の PT は基質認識及びプレニル化位置に対して非常に高い特異性を示すことが挙げられる。本酵素特異性は、植物が種特異的な化学防御壁を確立する上での基礎となっている。しかし、植物 PT がいかにして特異性の高いプレニル化反応を触媒できるのかは不明であった。

2008 年に当研究室から世界初のフラボノイド特異的 PT 遺伝子 *SfN8DT-1* が薬用植物クララから単離された。これを皮切りに、当研究室では PT の特異的な触媒機構に着目し、活性が異なる PT 同士のキメラ酵素を作製し、反応特異性に重要なアミノ酸部位の同定を試みた。しかし、従前は活性既知の PT の数自体がごく限られていたため、キメラを作成するための良い酵素ペアがなく、得られたキメラ酵素も出芽酵母を宿主とした系では多くが活性を示さず、目的を達成するには至っていなかった。

近年、本研究領域の世界的な発展に伴い、豊富になってきた PT リソースを活用することで、改めてキメラ酵素ライブラリーの作製に適した植物 PT ペアを設定できると考えた。加えて、人工知能ベースの新規な構造予測プログラムの Alphafold2 は、現在タンパク質の構造解析に大きな可能性を提供している。そこで、本研究ではこれらを組み合わせ、植物 PT の特異性を担う触媒機構解明のための最適な PT ペアを選定し、種々のキメラ酵素を利用した生化学的解析と、タンパク質 3D 構造予測とを結合して、総合的な酵素機能解析に取り組んだ。

第 1 章 クマリン基質プレニル化酵素におけるプレニル化部位特異性の制御機構

クララのフラボノイド特異的 PT の発見以来、様々な植物系統から多数の PT 遺伝子が同

定されてきた。本章では、豊富になった PT リソースから、セリ科パースニップ (*Pastinaca sativa*) 由来のクマリン基質プレニル化酵素である PsPT1 と PsPT2 を選定した。PsPT1 と PsPT2 は共に、DMAPP とクマリン類のウンベリフェロンを基質とするが、両者はプレニル化部位の特異性が異なり、PsPT1 は 6 位 (U6DT 活性)、PsPT2 は 8 位 (U8DT 活性) 優先的にプレニル基を転移させる (Fig. 1)。そこで、両酵素のドメインレベル、アミノ酸残基レベルの置換によって作成したキメラ酵素群を生化学的に解析し、3D モデリングの解析データを加えて、プレニル化部位特異性の解明を行った。

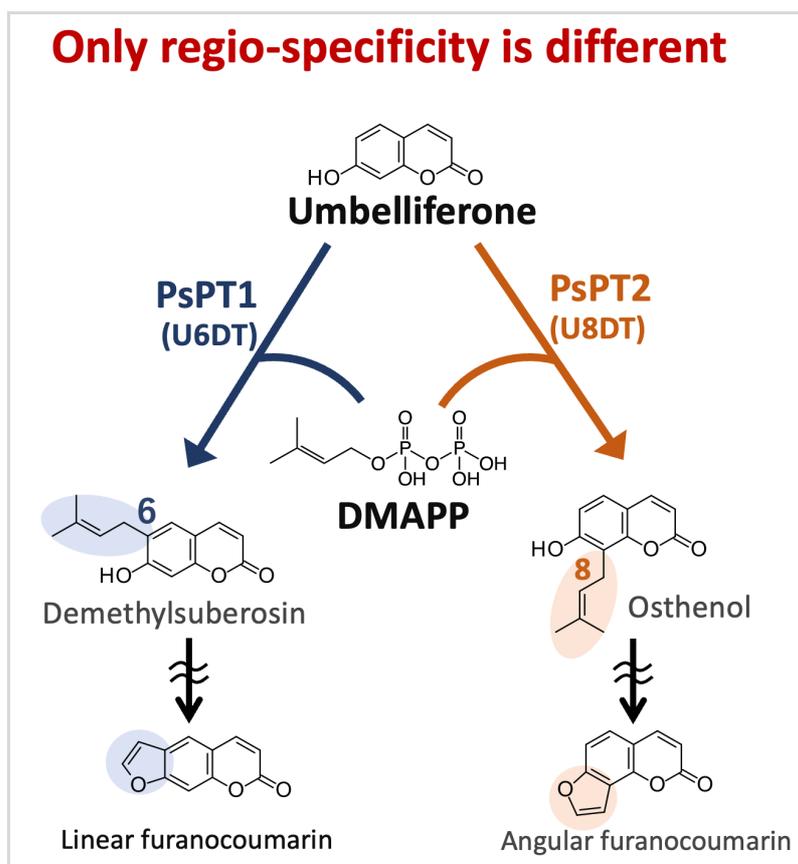


Fig. 1. PsPT1 と PsPT2 のプレニル化部位特異性

第2章 セリ科植物におけるクマリン基質プレニル化酵素の触媒特性の解析

フラノクマリン類は、フラン環のクマリン骨格に対する結合様式から、リニア型とアンギュラー型に大きく分けられる。この化学構造の多様化はセリ科植物の天敵昆虫に対する防御に貢献しているとされ、その生合成上の分岐点となるのが、第1章で解析したウンベリフェロンに対するプレニル化部位の差異である (図1)。よって、セリ科植物のクマリン基質 PT のプレニル化部位特異性の解明は、セリ科植物と天敵昆虫との共進化においても重要な知見になると考えられる。そこで、第1章で得られたクマリンのプレニル化部位特

異性に関する知見が、パースニップのみならず広くセリ科植物において普遍的に適用されるのかを検証するため、様々なセリ科植物種から *PsPT1* や *PsPT2* のホモログを単離し、変異酵素の生化学的な解析を通じて、部位特性を決定するアミノ酸の共通性を示した。

第3章 フラボノイド基質プレニル化酵素を用いた部位特異性制御機構の普遍性

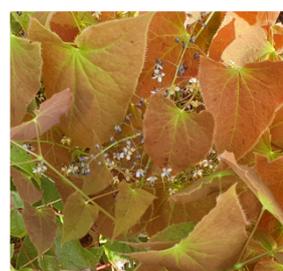
第1章及び第2章で得られたセリ科におけるプレニル化部位特異性の制御機構について、さらに広く普遍性の検証を行うため、セリ科とは独立に二次代謝系のプレニル化酵素遺伝子を獲得したと考えられるメギ科植物イカリソウ属(*Epimedium*)に注目した。イカリソウ属においては、フラボノイドの一種ケンフェロールの 8-プレニル化体由来するイカリインが主な薬効成分として知られている。この他、ケンフェロールの他の部位がプレニル化された化合物の報告もなされているため、イカリソウ属には多様なフラボノイド基質 PT が存在すると考えられた。そこで本章では、イカリソウ属植物からフラボノイド類の PT 遺伝子を単離し、生化学的解析および 3D モデリング解析を通じて、プレニル化部位特異性に関する共通ルールを見出した。



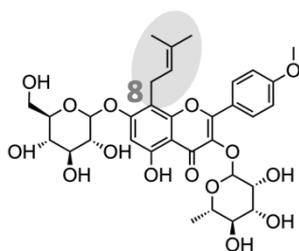
Epimedium grandiflorum



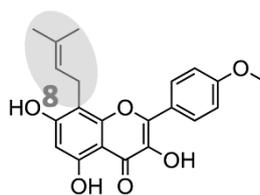
Epimedium koreanum



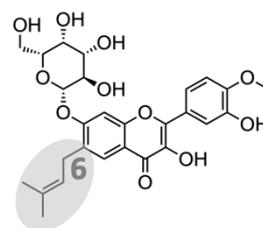
Epimedium sagittatum



Icariin



Icaritin



Wushanicariin

Fig. 2. メギ科イカリソウ属の植物と代表的プレニル化フェノール類