

二国間交流事業 共同研究報告書

平成23年3月30日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

共同研究代表者所属・部局 神戸大学・大学院農学研究科

職・氏名 (ふりがな) 准教授・水谷正治 (みず たに まさ はる)

1. 事業名 相手国（フランス）との共同研究 振興会対応機関（ INRA ）

2. 研究課題名 植物におけるクマリン類及びフラノクマリン類生合成の解明

3. 全採用期間

平成21年4月1日～平成23年3月31日（2年0ヶ月）

4. 研究経費総額

(1) 本事業により交付された研究経費総額 5000千円

初年度経費2500千円、 2年度経費2500千円、 3年度経費0千円

(2) 本事業による経費以外の国内研究経費総額 0千円

5. 研究組織

(1) 日本側参加者

氏名 <small>(ふりがな)</small>	所属・職名	研究協力テーマ
○水谷正治 <small>(みずたに まさはる)</small>	神戸大学大学院農学研究科・准教授	研究総括
清水文一 <small>(しみず ぶんいち)</small>	東洋大学生命科学部・准教授	基質の調製、生成物の同定
杉本幸裕 <small>(すぎもと ゆきひろ)</small>	神戸大学大学院農学研究科・教授	酵素生成物の構造解析
山内靖雄 <small>(やまうち やすお)</small>	神戸大学大学院農学研究科・助教	組換え酵素の作製
太田大策 <small>(いとう きょうご)</small>	大阪府立大学大学院生命環境科学研究科・教授	植物試料の網羅的分析
伊藤杏子 <small>(いしがき なおと)</small>	神戸大学大学院農学研究科・大学院生(修士課程)	20GD 遺伝子クローニング
西垣直人 <small>(うらかわ しんご)</small>	神戸大学大学院農学研究科・大学院生(修士課程)	P450 遺伝子クローニング
浦川晋吾 <small>(ひらかきうち まさき)</small>	神戸大学大学院農学研究科・大学院生(修士課程)	組換え酵素の作製
平垣内雅規	神戸大学大学院農学研究科・大学院生(修士課程)	酵素生成物の同定

(2) 相手国側研究代表者

所属・職名・氏名 ナンシー大学環境農学研究所・教授・Bourgaud Frederic

(3) 相手国参加者（代表者の氏名の前に○印を付すこと）

氏名	所属・職名（国名）	研究協力テーマ
○FREDERIC, Bourgaud	ナンシー大学・教授（フランス）	研究総括
HEHN, Alain	ナンシー大学・准教授（フランス）	組換え酵素の作製
OLRY, Alexandre	ナンシー大学・研究員（フランス）	酵素機能の解析
CALLIER, Martine	ナンシー大学・研究員（フランス）	組換え植物の作製
VIALART, Guilhem	ナンシー大学・博士課程大学院生 （フランス）	P450, 20GD 遺伝子クローニング

6. 研究概要（研究の目的・内容・成果等の概要を簡潔に記載してください。）

研究目的および研究内容

クマリン化合物は植物界に広く分布し、異なる化学構造をもつ化合物が 700 種以上知られている。クマリン化合物は植物の生体防御物質として機能しているが、多くの食用植物にも含まれるため、ヒトに対する薬理活性や毒性が多数報告されている。このように、クマリン化合物は食品安全性や薬理学、植物防疫上重要な成分であるが、植物体内でのクマリン化合物の生合成の詳細は未だ明らかではない。これまでに、日仏の両グループはそれぞれ独自に植物クマリン化合物の生合成に関する重要な成果を上げた。そこで本研究では、両グループが共同研究と相互交流を行なうことによって、これまでの研究成果をさらに拡大し、高等植物に広く見られるクマリン化合物の生合成を明らかにすることを目指した。

研究成果

（1）さまざまな植物種からの新規オルト位水酸化酵素の単離と酵素機能の解析

我々は、これまでにシロイヌナズナにおけるスコポレチン生合成の鍵酵素で 2-オキシグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼであるオルト位水酸化酵素（以下 C2H）の cDNA のクローニングに成功していた。そこで、シロイヌナズナ C2H をプローブとしてさまざまな植物種のスクリーニングを行なった。神戸大学研究室では、マメ科植物（*Medicago* および *ミヤコグサ*）および *サツマイモ*、*グレープフルーツ* から C2H cDNA のクローニングに成功した。一方、Bourgaud 研究室の博士課程学生（Vialart）は神戸大学に 2 ヶ月間×2 回の短期留学を行ない、*フラノクマリン*を生産する植物 *Ruta graveolens*（*ヘンルーダ*、*カンキツ植物の仲間*）の cDNA ライブラリーから C2H のクローニングに成功した。各植物由来の C2H cDNA クロンを用いて大腸菌で組換え酵素を発現させ、酵素活性の解析を行なった。その結果、シロイヌナズナ C2H がスコポレチンを特異的に生成するのに対して、*サツマイモ*、*グレープフルーツ* および *ヘンルーダ* 由来の C2H はスコポレチンと *ウンベリフェロン* を、*ミヤコグサ* C2H はスコポレチンと *エスクレチン* を生成する活性を示した（神戸大／伊藤、Vialart）。一方、*サツマイモ塊茎*には *ウンベリフェロン* が蓄積しており、また *柑橘類*にも *ウンベリフェロン* を前駆体として生合成される *フラノクマリン類*が蓄積している。

以上のように、様々な植物種において生合成されるクマリン類の基本骨格の多様性は、桂皮酸類オルト位水酸化酵素の基質特異性によって決定されることが明らかとなった。

（2）組換え大腸菌によるクマリン類の生産

C2H は桂皮酸類 CoA チオエステルを基質とするが、市販されていないためチオエステル基質は有機合成して酵素活性を解析する必要があった。そこで、桂皮酸類 CoA チオエステルを生成する活性をもつ 4-coumaroyl-CoA 合成酵素を大腸菌内で C2H と同時に発現させることにより、大腸菌発現系を *in vivo* で用いて C2H 酵素活性を解析する実験系の構築を行なった。その結果、桂皮酸類を直接大腸菌に投与することにより大腸菌内でクマリン類を生成させることに成功した（神戸大学／伊藤、水谷）。また、本アッセイ系を Bourgaud 研究室へ移譲し、フランス側でのクマリン生合成研究の効率化を進めた（ナンシー大／Hehn、Vialart）。

（3）フラノクマリン生合成に関わる P450 の解析

Bourgaud 教授らのグループでは、*フラノクマリン*生合成に関わると推定される 3 種の P450 cDNA を *ヘンルーダ* から単離し、酵母発現系を用いて酵素活性の解析を試みたがうまくいかなかった。そこで、神戸大学研究室において各 cDNA をバキュロウイルス昆虫細胞により発現させた結果、各 P450 の組換え酵素の作製に成功した（神戸大／水谷、Vialart）。