植物ポリケタイド合成酵素の構造と機能の解析

秋山　卓美

(1)

植物ポリケタイド合成酵素の構造と機能の解析

秋山　卓美

目次

序論 1

本論 4

第1章　アマチャポリケタイド合成酵素のcDNAクローニング 4

第2章　アマチャポリケタイド合成酵素の機能 27

第3章　変異酵素による反応機構の解析 45

第4章　CHSとSTSの交叉反応 56

第5章　CHSスーパーファミリーの分子進化 62

考察 66

総括と展望 71

実験の部 73

参考文献 96

謝辞 101

序論

植物二次代謝産物の中には、酢酸を構成単位とする多様な構造を持ったポリケタイドと総称される化合物群が存在している。Fig.1にいくつかの例を示した。これらの化合物は、ポリケタイド合成酵素（polyketide synthase、PKS）によって生合成される。まずmalonyl-CoA (**8**)由来のC2ユニットの縮合反応によって生成するポリケトメチレン鎖が、様々な様式により閉環し、それぞれの基本骨格が生成すると考えられている。

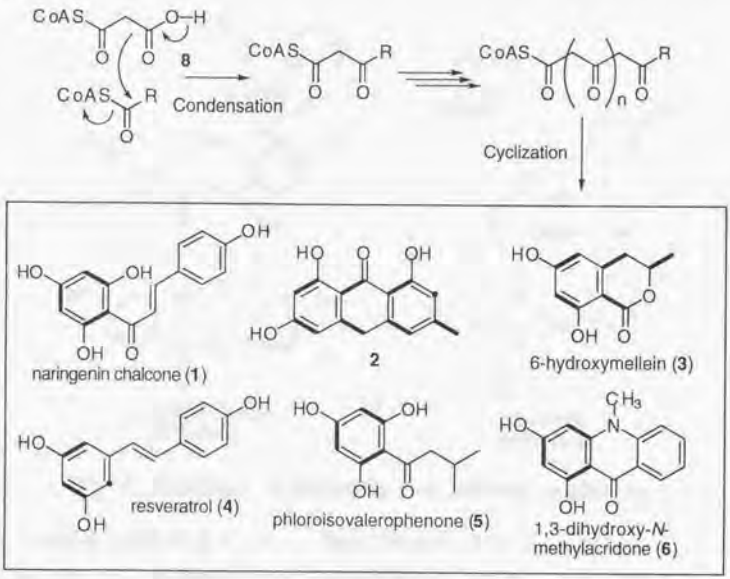


Fig. 1. Reactions of polyketide synthases.

カルコンとスチルベンもやはりポリケタイドであり、その骨格は、Fig.2のように、*p*-coumaroyl-CoA (**7**)をスターターに、malonyl-CoA (**8**)由来のC2ユニットの伸長反応を3回行い、生じたテトラケチドがそれぞれ特異的な様式で環化されることにより形成される。このような反応を触媒するのが、それぞれカルコン合成酵素（chalcone synthase、CHS）とスチルベン合成酵素（stilbene synthase、STS）である[1]。古くから、植物由来のPKSとしてCHSとSTSについて研究がすすめられており、タンパク質としての性質もある程度わかってきている。まず、いずれも41 - 47 kDaのサブユニットのホモダイマーであることが示されている[2, 3, 4, 5]。菌類のPKSは研究の進んでいる脂肪酸合成酵素（fatty acid synthase、FAS）と基本的な構造が似ており[6]、類似の反応機構で触媒作用を現していることが知られている。しかし、CHSとSTSの場合、FASと似た性質（マロニル基のCO_2交換[7]、セルレニンによる阻害[8]など）も

あるが、アシルキャリアープロテインや4'-ホスホパンテテインが関与していない[2]、配列の相同性が低い、など、構造の類似性がなく、反応機構に関して得られている知見は限られている。

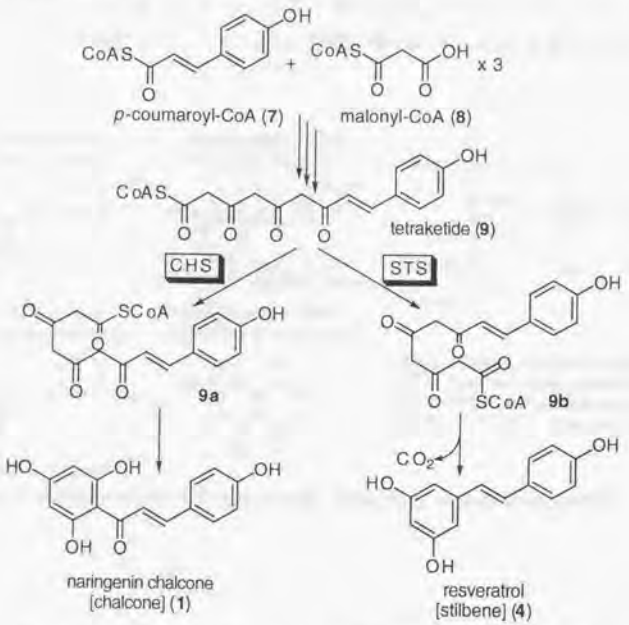


Fig. 2. Reactions of chalcone and stilbene synthases.

近年の分子生物学の進歩により、複数の植物からCHSやSTSのクローニングがなされ[9]、他にも、植物ポリケタイド合成酵素であるビベンジル合成酵素（bibenzyl synthase、BBS）[10]及びアクリドン合成酵素（acridone synthase、ACS）[11]がクローニングされている（Fig.3）。これらの酵素タンパク質は互いに高い相同性があり、CHSスーパーファミリーと総称されている。これら似て異なる酵素の配列中、相同性のある部分が共通の反応である縮合反応に、相違点が基質特異性や閉環の違いに関わっていると思われる。まだはっきりとタンパク質構造と生成物の関係を示した例はないが、これを解析することは、植物ポリケタイド合成酵素の反応機構の解明に大きく寄与するものと思われる。

アマチャ（*Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii*）には、直鎖状のテトラケタイド(**12**)から生合成されると考えられるhydramacroside B (**13**)が存在する（Fig. 4）。つまり、CHSスーパーファミリーの新たなメンバーで、中間体を閉環させず、**12**を遊離させる活性を持つPKSが存在すると考えられる。このようなPKSの配列が明らかになれば、閉環反応に関与する構造の同定に役立つと思われる。また、同じくアマチャ

に存在するthunberginol C (**15**)はスチルベンカルボン酸 **14**から生合成されると考えられる。したがって、中間体のフォールディングはSTSと同じでありながら、脱炭酸を行わない酵素の存在も考えられ、STSによる脱炭酸の機構の解明に大きなヒントを与えてくれることが期待される。そこでまず私は、アマチャよりこのようなPKSのクローニングを検討することにした。本論の第1章から第3章において詳しく述べる。

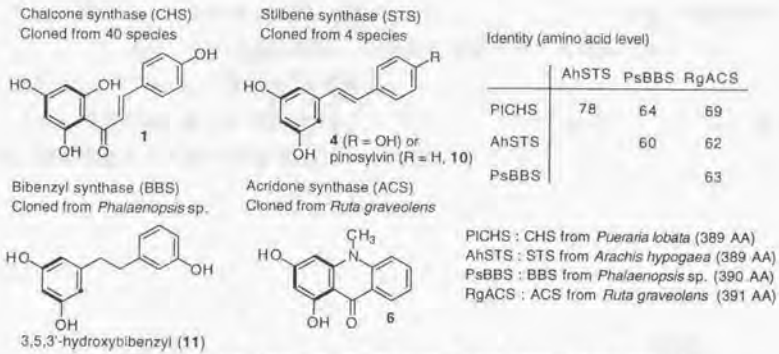


Fig. 3. Members of the CHS superfamily which have already been cloned.

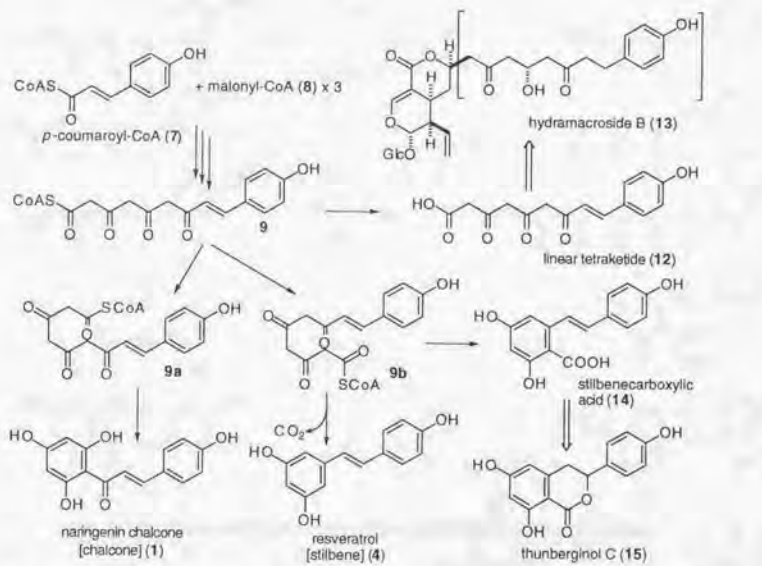


Fig. 4. Chalcone and stilbene synthases and hypothetical polyketide synthases from *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii* (Amacha)

ところで、CHSは、Fig. 5に示すような副生成物、アリルピロン **18**、ベンザルアセトン **19**、スチリルピロン **20**を生成させることが報告されている。このことは、**7**をスターターに段階的に伸長反応が起きる、という反応機構を証明するものである。私は、CHSやSTSがこのほかにも副生成物を生成させるのではないかと考えた。そしてその中には、CHSとSTSの反応機構の違いを反映したものもあると期待できる。そのような副生成物の生成量は低いことが予想されるが、すでに私達は、CHSとSTSの大腸菌での大量発現と精製に成功している。そこで、この大量の精製酵素を用いてラージスケールの反応を行い、反応副生成物を詳しく分析することにした。これについては第4章で述べることにする。

また、最後に第5章において、CHSスーパーファミリーの進化についてアミノ酸配列と酵素機能から類推される仮説について説明する。

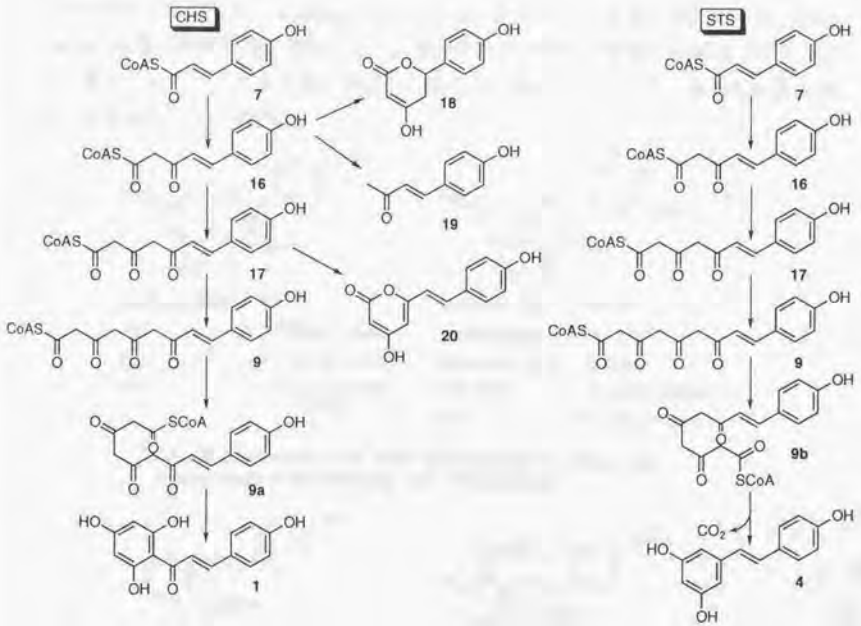


Fig. 5. Reactions of chalcone and stilbene synthases and by-products

本論

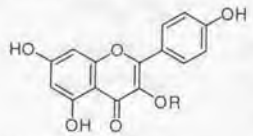
第1章　アマチャポリケタイド合成酵素のcDNAクローニング

第1節　アマチャのポリケタイド合成酵素

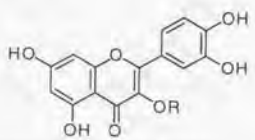
まず、アマチャに存在が期待されるポリケタイド合成酵素について述べる。

1　アマチャ葉に存在するポリケタイド成分

アマチャ（*Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii*）葉には、次のようなポリケタイドと思われる成分が含まれていることが、主にYoshikawaのグループにより明らかにされている[12, 13, 14, 15, 16]。すなわち、フラボノール**21**から**29**（Fig. 6）、スチルベンカルボン酸**30**及び二重結合に水が付加した配糖体**31**と**32**（Fig. 7）、ジヒドロイソクマリン**15**、**33**から**42**（Fig. 8）、イソクマリン**43**と**44**（Fig. 9）、フラノン**45**から**47**（Fig. 10）、及びセコイリドイド**48**と**13**（Fig. 11）である。このうち含量が特に多いのは、hydrangenol (**33**)とphyllodulcin (**35**)であり、特に**35**はショ糖の約400倍の甘さを持ち、生薬甘茶（Hydrangeae Dulcis Folium）の甘みの本体である。**33**は*Hydrangea*属に特徴的な化合物であり、**35**はアマチャ以外の植物には検出されていない。また、セコイリドイド**48**と**13**は生の葉のみに存在し、プロセスされた生薬甘茶からは検出されていない。

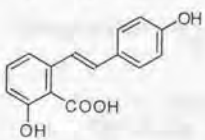


kaempferol (**21**) : R = H
22 : R = Glc-(1-2)-Glc
23 : R = Glc-(1-6)-Rha
24 : R = Glc-(1-2)-Glc
l(1-6)
Rha

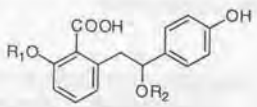


quercetin (**25**) : R = H
quercitrin (**26**) : R = Rha
isoquercitrin (**27**) : R = Glc
rutin (**28**) : R = Glc(1-6)Rha
29 : R = Glc(1-2)Glc

Fig. 6. Flavonols and their glycosides in leaves of *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii*.

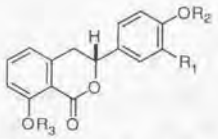


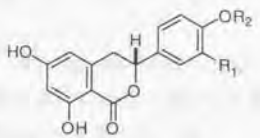
hydrangeic acid (**30**)



hydrangea glucoside A (**31**) : R_1 = Glc, R_2 = H
hydrangea glucoside B (**32**) : R_1 = H, R_2 = Glc

Fig. 7. Hydrangeic acid and hydrangea glucisides.

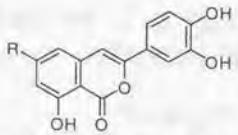




hydrangenol(**33**) : $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = H$
34 : $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = Glc$
phyllodulcin (**35**) : $R_1 = OH, R_2 = CH_3, R_3 = H$
36 : $R_1 = OH, R_2 = CH_3, R_3 = Glc$
37 : $R_1 = OGlc, R_2 = CH_3, R_3 = H$
38 : $R_1 = OCH_3, R_2 = CH_3, R_3 = H$
thunberginol G (**39**) : $R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = H$
40 : $R_1 = OGlc, R_2 = H, R_3 = H$

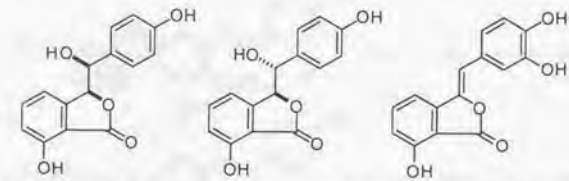
thunberginol C (**15**) : $R_1 = H, R_2 = H$
thunberginol D (**41**) : $R_1 = OH, R_2 = H$
thunberginol E (**42**) : $R_1 = OH, R_2 = CH_3$

Fig. 8. Dihydroisocoumarins in leaves of *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii*.



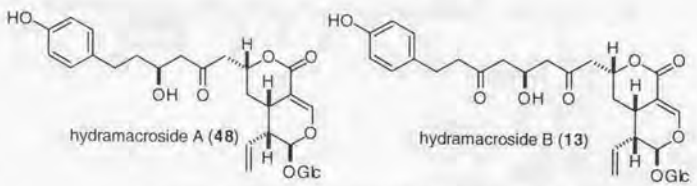
thunberginol A (**43**) : R = H
thunberginol B (**44**) : R = OH

Fig. 9. Isocoumarins in leaves of *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii*.



hydramacrophyllol A (**45**) hydramacrophyllol B (**46**) thungerginol F (**47**)

Fig. 10. Furanones in leaves of *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii*.



hydramacroside A (**48**) hydramacroside B (**13**)

Fig. 11. Secoiridoid glucosides in leaves of *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii*.

2　アマチャ葉ポリケタイドの生合成とポリケタイド合成酵素

これらの生合成とそれに関わるPKSを考えてみる。まず、**21**から**29**の前駆体が

naringenin chalcone (**1**)であることは間違いない（Fig. 12）。従って、他のあらゆる高等植物と同じくアマチャにもCHSが存在する。ジヒドロイソクマリン、イソクマリン、そしてフラノンは、 Fig. 12 のように、 hydrangeic acid (**30**) および trihydroxystilbenecarboxylic acid (**14**)から生合成されると思われる。**30**は**14**が還元されて生成すると考えることもできるが、マメ科植物における還元型カルコンの生合成[17, 18]と同様、還元は閉環より先に起きる可能性が高い。従って、*p*-coumaroyl-CoA (**7**)をスターターにmalonyl-CoA (**8**) 由来のC2単位の伸長を3回行い、閉環して**14**を生成させる酵素、polyketide synthase 1が存在すると思われる。セコイリドイド**13**は直鎖テトラケチド**12**、**48**は直鎖トリケチド**49**が2回の還元とsecologanin (**50**)とのカップリングを受けて生成すると考えられる。つまり、**7**をスターターにC2単位の伸長を3回行い、閉環を行わずに**12**を遊離するpolyketide synthase 2とC2単位の伸長を2回行って**49**を遊離するpolyketide synthase 3が存在する可能性が高い。他の*Hydrangea*属の植物にも類似のセコイリドイドの存在が知られており（Fig. 13）[19]、同様の活性を持つPKSの存在が予想される。以上より、アマチャにはCHSスーパーファミリーに属し、**7**をスターターとするPKSが4種類存在すると期待できる。

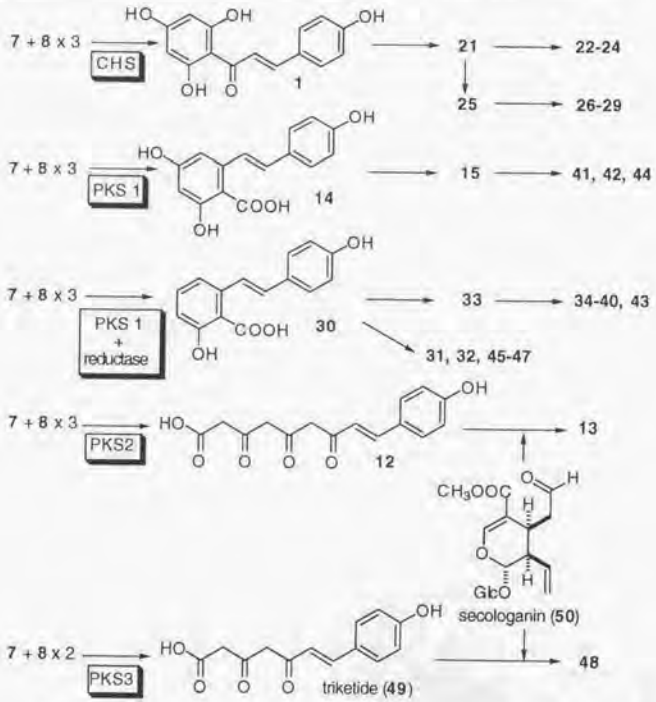


Fig. 12. Hypothetical biosynthetic pathways of polyketides in leaves of *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii*

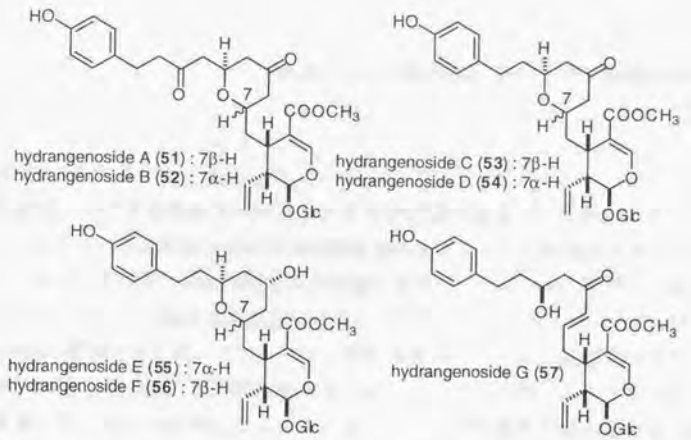
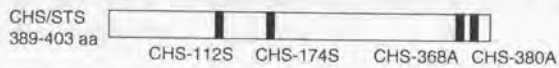


Fig. 13. Secoiridoid glucosides from other *Hydrangea* plants.
H. macrophylla SERINGE var. *macrophylla* (Ajisai) : hydrangenosides A, B, C and D;
H. scandens SERINGE (Gakuutsugi) : hydrangenosides C, D, E, F, G.

アマチャPKSのクローニングは、PCRによって行った。その方法と結果を説明する。

1　PCRプライマーのデザイン

目的の酵素はいずれもCHSスーパーファミリーに属す酵素であるから、スーパーファミリーのタンパク質のコンセンサス配列を基にデザインした縮重入りプライマーでPCRを行えば、配列の一部が増幅される可能性が高い。Fig. 14に使用した縮重入りセンスプライマー、CHS-112SとCHS-174S、アンチセンスプライマーCHS-368A及びCHS-380Aの配列を示した。プライマーに用いる配列としては、既知のCHSおよびSTSの間で8残基以上連続して相同性があり、かつ、コドンのバリエーションが少ない領域を選んだ。Fig. 14に示したように、A、B、C、Dの4通りの組み合わせでPCRを行うことができる。



(1) Combination of sense and antisense primers and expected sizes of amplified fragments

A : CHS-112S and CHS-380A, 0.80 - 0.82 kbp
B : CHS-174S and CHS-368A, 0.58 - 0.60 kbp
C : CHS-112S and CHS-368A, 0.77 - 0.79 kbp
D : CHS-174S and CHS-380A, 0.62 - 0.64 kbp

(2) Sequences of degenarated primers

```
CHS-112S : 5'-AAA GCI ITI AAA GAA TGG GGI CA-3'
             G G       C G   G
CHS/STS  :   K   A   I   K   E   W   G   Q
consensus    E       L   Q
                         V

CHS-174S : 5'-GCI AAA GAT ITI GCI GAA AAT AA-3'
               G   C               G   C
CHS/STS  :   A   K   D   L   A   E   N   N
consensus                V

CHS-380A : 3'-AAA CCI GGI CCI AAI TGI TAI CT-5'
             G               G       C
CHS/STS  :   F   G   P   G   L   T   I   E
consensus                                V

CHS-368A : 3'-TGI TGI CCI CTI CCI AAI CTI ACC CC-5'
                                 G       TA
CHS/STS  :   T   T   G   E   G   L   E   W   G
consensus                D               D   M
```

Fig. 14. Degenarated primers for amplification of core part.

2　PCRによるcore部分のクローニング

目的の酵素は葉で高発現していると考えられ、葉には目的遺伝子のmRNAが蓄積していることが期待されることから、ゲノムではなくcDNAをクローニングすることにした。また、全長クローンの取得にもRACE法が適用できる点も有利である。1996年4月24日に検見川薬用植物園にて採集したアマチャ葉約20枚、約4.6　gより、total　RNAをphenol-SDS法とLiCl沈殿法[20]により抽出した（Fig. 15）。約0.72 mgと、まずまずの収量のtotal RNAが得られた。これを鋳型に、オリゴdTプライマーとしてRACE32 (Fig. 18)を用いて逆転写反応を行い、cDNAを得た。このcDNAを鋳型に、先に述べた4種の組み合わせのプライマーで、DNAポリメラーゼとしてタカラEx-Taqを用いてPCRを行った。PCRの条件はFig. 16に示した。変性は94 ℃、アニーリングは42 ℃、伸長は72 ℃で行った。はじめはアニーリングと伸長を十分に行うため、変性1分、アニーリング2分、伸長3分という条件（Fig. 16a、PCR A0）で行ったが、後に時間を短縮してもほぼ同じ結果が得られることが判明したため、変性30秒、アニーリング30秒、伸長1分という条件（Fig. 16b、PCR A, B, C and D）に変更した。4種の組み合わせのいずれにおいても、予想された大きさ（Fig. 14 (1)）の断片が増幅された（Fig. 17）。

4.6 g of leaves
↓ Ground in mortar (Liq. N_2)
↓ Phenol extraction
↓ Phenol extraction
↓ EtOH precipitation
↓ LiCl precipitation
0.72 mg total RNA

Fig. 15. Extraction of total RNA from leaves of *Hydrangea macrophylla* var. thunbergii.

a) PCR A0

cDNA
0.2 mM dNTP
1 μg Sense primer
1 μg Antisense primer
↓ 94 ℃, 2 min
↓ ←2.5 U Ex-Taq
↓ 94 ℃, 0.5 min
↓ 94 ℃, 0.5 min
↓ 42 ℃, 0.5 min
↓ 72 ℃, 1 min　x 30 cycles
↓ 72 ℃, 10 min

b) PCR A, B, C and D

cDNA
0.2 mM dNTP
1 μg Sense primer
1 μg Antisense primer
↓ 94 ℃, 2 min
↓ ←2.5 U Ex-Taq
↓ 94 ℃, 0.5 min
↓ 94 ℃, 0.5 min
↓ 42 ℃, 0.5 min
↓ 72 ℃, 1 min　x 30 cycles
↓ 72 ℃, 10 min

Fig. 16. PCR condition for core

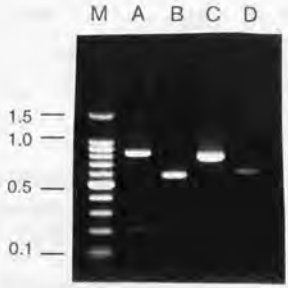


Fig. 17. Electrophoresis of amplified fragment by PCR. M : marker (kbp), A-D : PCR products. 1.2 % Agarose gel.

増幅された断片をpT7Blue(R)の*Eco*RVサイトにサブクローニングした。PCR A0の産物よりプラスミドpAKI1、pAKI2、・・・pAKI16が、PCR Aの産物よりpAKIA-01、pAKIA-02、・・・pAKIA-08が得られ、同様にpAKIB-01、pAKIB-02、・・・pAKIC-01、・・・pAKID-01、・・・pAKID-08が得られた。以上の48個のプラスミドを、制限酵素の切断パターン（*Eco*RI + *Pst*I double digest and / or *Bam*HI + *Hin*dIII double digest）またはシークエンシングにより解析した。既存のPKSと相同性のあるクローンは31個あったが、2つのグループに分類できた。これをHmC、HmSと名づけた。グループ内での相同性は98％以上である。クローンの内訳はTable 1の通り。なお、pAKI6及びpAKI11はシークエンシングをせず、制限酵素の切断パターンのみで判断した。また、pAKIA-06にはHmS断片がタンデムに2個組み込まれていた。

その他のクローンについては、pAKI2はインサートが小さすぎるのでシークエンシングせず、pAKI1及び15のインサートはPKSと相同性が無く、pAKI3、13、14、16、A-02、A-04、B-07、B-08、C-03、C-06、D-02、D-03、D-06及びD-07はインサートを持っていなかった。

Table 1. Plasmids which have putative PKS gene. * : Not sequenced, ** : pAKIA-06 has two HmS fragments.

PCR	HmC	HmS
A0	pAKI5, 12	pAKI4, 6*, 7, 8, 9, 10, 11*
A	pAKIA-05	pAKIA-01, A-03, A-06(F)**, A-06(R)**, A-07, A-08
B	pAKIB-01, B-02, B-03, B-04, B-05, B-06	-
C	pAKIC-02	C-01, C-04, C-05, C-07, C-08
D	pAKID-01, D-04, D-05, D-08	-

HmC、HmSとも、CHSやSTS との高い相同性が見られた。Table 2には例として、HmCクローンであるpAKI5、HmSクローンのpAKI7、クズ（*Pueraria lobata*）CHS[21]及びピーナツ（*Arachis hypogaea*）STS[22]の、アミノ酸レベルでの相同性を示した。

Table 2. Identity between core part (253 AA) of polyketide synthase clones in amino acid level. AhSTS : STS from *Arachis hypogaea*, PlCHS : CHS from *Pueraria lobata*.

	PlCHS	pAKI5 (HmC)	pAKI7 (HmS)
AhSTS	76	76	66
PlCHS		88	73
pAKI5			77

3　RACE法による伸長

最も長いPCR A0及びAの産物をcoreと呼び、この配列をもとに、RACE法[23]により全長クローンの取得を目指すことにした。Coreの配列を基に、HmC、HmSそれぞれに特異的なプライマーを合成し、これらを用いて5'-RACE、3'-RACEを行った。RACEに用いたプライマーの塩基配列をFig. 18に、coreフラグメントであるpAKI5及びpAKI7のインサートの塩基配列とRACE用プライマーの位置をFig. 19に示した。

(1) Oligo dT and anchor primers

```
RACE32 : 5'-GAC TCG AGT CGA CAT CGA TTT TTT TTT TTT TT-3'
RACE17 : 5'-GAC TCG AGT CGA CAT CG-3'
```

(2) Specific primers for 5'-RACE

```
HmC-139A : 5'-CCG GGC ATG TCG ACG CCA CTA-3'
HmC-146A : 5'-CTT GGT GAG CTG GTA GTC GGC-3'
HmS-139A : 5'-CCG GGC ATG TCT ACA CCC GAG-3'
HmS-146A : 5'-CCT TGT CAG CTG ATA ATC ACA-3'
```

(3) Specific primers for 3'-RACE

```
HmC-312S : 5'-CAA GTG GAG AAG AAG CTG GCC-3'
HmC-321S : 5'-CCG AGA AGC TGC GGG CCA CGA-3'
HmS-290S : 5'-ATA TTA ATG GAT AGT ATT GAC-3'
HmS-321S : 5'-AGG AGA AAC TGA GGG TGA GCC-3'
```

Fig. 18. Primers for Reverse transcription and RACE experiments



Fig. 19. Partial sequences of HmC clone pAKI-5 and HmS clone pAKI-7.
Positions of RACE primers are also shown.

cDNAクローニングのなされている他植物のCHS、STS のデータより5'及び3'非翻訳領域の長さをそれぞれ約0.1 kbp、約0.4 kbpと予想した。すると、5'-RACEにおいても3'-RACEにおいても1st PCRの産物の大きさは約0.5 kbpと考えられるので、1st PCR産物をアガロースゲル電気泳動で分離し、約0.5 kbp付近とその上下の部分をいずれも0.1 - 0.2 kbpの幅で切り出して精製し、2nd PCRの鋳型とした。2nd PCRで増幅された断片をサブクローニングし、配列を決定したところ、coreとオーバーラップしていることが判明した。HmC、HmSとも、3'-RACEにおいて2種類の大きさの断片が増幅されたが、全長ORFの増幅を優先させるため、詳しい解析は行わなかった。プライマー、増幅された断片の大きさ、解析したプラスミドなどをTable 3にまとめた。

Table 3. Results of RACE experiments.

Experiment	Primers for 1st PCR	Excised region (kbp)	Primers for 2nd PCR	Fragment size (kbp)	Sequenced plasmids
HmC 5'RACE	HmC-146A	0.6	HmC-139A	0.5	pAKI23
	RACE32	0.5	RACE32	-	
		0.4		-	
HmS 5'RACE	HmS-146A	0.6	HmS-139A	0.5	pAKI17, 18
	RACE32	0.5	RACE32	0.5	
		0.3		-	
HmC 3'RACE	HmC-312S	0.6	HmC-321S	0.5	pAKI26, 27
	RACE17	0.5	RACE32	0.5	
		0.4		0.4	pAKI28, 29
HmS 3'RACE	HmC-290S	0.6	HmC-321S	0.5	pAKI25
	RACE17	0.5	RACE32	0.5	
		0.4		0.4	

4　全長ORFの増幅

RACE産物の配列情報に基づいて全長ORFの増幅を行うことにした。PCRにより予期しない変異が発生する可能性があるため、PCR産物を直接発現ベクターに組み込み、大腸菌で発現させたタンパク質の酵素活性を検討し、活性の存在するクローンについて塩基配列を決定することにした。Fig. 20に、用いたプライマー，HmC-N2、HmC-C、HmS-N2及びHmS-Cの配列を示した。プライマーは、発現ベクターpET-32a(+)に組み込むための制限酵素認識配列を持つ。C末側プライマー、HmC-C及びHmS-Cはそれぞれ*Hin*dIII、*Eco*RIサイトを持つが、core及びRACE産物の配列から、ORF内部には存在しないと考えられたものを使用した。cDNAを鋳型にPCRを行った。アニーリング温度は60 ℃、反応時間は変性30秒、アニーリング30秒、伸長2分とした。すると、既知のCHSスーパーファミリーの配列から予想された約1.2 kbpの断片が増幅された。これを精製して、pET-32a(+)の*Eco*RV-*Hin*dIIIサイト（HmC）あるいは*Eco*RV-*Eco*RIサイト（HmS）に組み込み（Fig. 21）、HmCについては3個のプラスミドpAKI78、pAKI86及びpAKI89、HmSについては8個のプラスミドpAKI59、pAKI60、・・・pAKI66を構築した（Table 4）。

PCRアマチャポリケタイド合成酵素のクローニングの概略をFig. 22に示した。

```
HmC-N2 (pET-32a(+))
            D   I   V   T   V   E   E   V   R
5'-CG GAG GAT ATC GTG ACC GTC GAG GAA GTC CGT-3'
          EcoRV

HmS-N2 (pET-32a(+))
            D   I   A   T   K   S   V   A
5'-TA GTA GAT ATC GCA ACA AAA TCG GTA GCA-3'
          EcoRV

HmS-N (pET-22b(+))
                M   A   T   K   S   V   A
5'-TA GTA CAT ATG GCA ACA AAA TCG GTA GCA-3'
            NdeI

HmC-N3 (pYES2)
                    M   V   T   V   E   E
5'-CC ATG AAG CTT ATG GTG ACC GTC GAG GAA-3'
        HindIII

HmS-N3 (pYES2)
                    M   A   T   K   S   V   A
5'-AA ATA GAG CTC ATG GCA ACA AAA TCG GTA GCA-3'
          SacI

HmC-C

5'-AAT GGA AGC TTA AGT AGA CAC ACC ATG AAG AAC CAC-3'
         HindIII
    V   V   L   H   G   V   S   T   *
3'-CAC CAA GAA GTA CCA CAC AGA TGA ATT CGA AGG TAA-5'
                                    HindIII

HmS-C

5'-TTG TTG AAT TCA AAT GGG GAC ACT GTG CAA GAC AAT-3'
         EcoRI
    I   V   L   H   S   V   P   I   *
3'-TAA CAG AAC GTG TCA CAG GGG TAA ACT TAA GTT GTT-5'
                                  EcoRI
```

Fig. 20. Primers for amplification of ORFs.

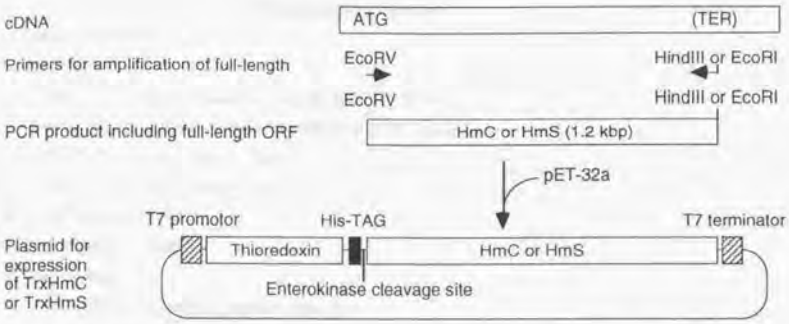


Fig. 21. Construction of plasmids for expression of thioredoxin-HmC and thioredoxin-HmS fusion proteins.

Table 4. Plasmids for expression of HmC and HmS proteins.

Gene	Vector	Primers	Plasmids
HmC	pET-32a(+)	HmC-N2 HmC-C	pAKI78, pAKI86, pAKI89
	pYES2	HmC-N3 HmC-C	pAKI296, pAKI305, pAKI306, pAKI307
HmS	pET-32a(+)	HmS-N2 HmS-C	pAKI59, pAKI60, pAKI61, pAKI62 pAKI63, pAKI64, pAKI65, pAKI66
	pET-22b(+)	HmS-N HmS-C	pAKI38, pAKI54
	pYES2	HmS-N3 HmS-C	pAKI80, pAKI81, pAKI82

1. Extraction of total RNA from *Hydrangea macrophylla* leaves
   0.72 mg of RNA from 4.6 g (fresh weight) of leaves
2. Reverse transcription
3. PCR for core fragment
4. Subcloning [Total 31 clones (A : 15, B : 6, C : 6, D : 4)]
5. Analyses by restriction enzyme digestion and DNA sequencing
   HmC : 14 clones (Identity : 99 %)
   HmS : 17 clones (Identity : 98 %)
   > Identity : 69 % (nucleotide), 77 % (amino acid)
6. 5' RACE and 3' RACE
7. Amplification of ORFs
8. DNA sequencing
   HmC ORF : 1167 bp (= 389 aa, 43 kDa)
   HmS ORF : 1197 bp (= 399 aa, 44 kDa)

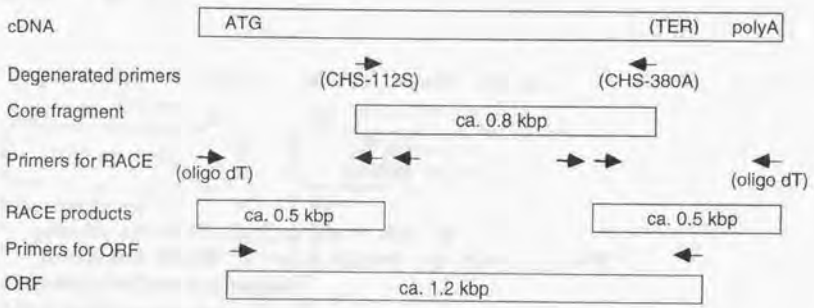
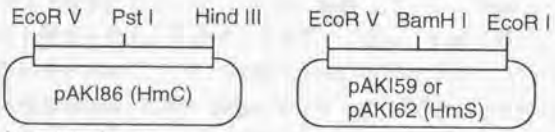


Fig. 22. cDNA cloning of polyketide synthases from *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii*.

得られたクローンの配列決定と、配列の特徴について説明する。

1　全長ORFのシークエンシング

アマチャPKS遺伝子と思われる、HmC及びHmSの全長ORFの配列を決定した。第2章で述べるように、HmCを組み込んだプラスミドのうちpAKI86、そしてHmSを組み込んだプラスミドのうちpAKI59とpAKI62で形質転換した大腸菌は活性のあるPKSを発現させた。そこで、この3クローンの塩基配列を決定することにした。Fig. 23に示すように、ORFのほぼ中央にある制限酵素サイトを利用してORFを２つの部分に分けてベクターpT7Blue(R)に組み込み、両側からシークエンシングすることにより、pAKI86、pAKI59、pAKI62のインサート（それぞれ、HmC86、HmS59、HmS62とする）の全配列を両鎖とも決定することができた。なお、pET-32aに組み込む都合上、開始コドンATGに当たる部分をATCに変異させてあるが、以後の解析ではこれをATGとして扱った。



↓ Double digest
　pAKI86 : (*Eco*R V + *Pst* I) or (*Pst* I + *Hin*d III)
　pAKI59 and pAKI62 : (*Eco*R V + *Bam*H I) or (*Bam*H I + *Eco*R I)
↓ Blunting (T4 DNA polymerase)
↓ Size fractionation (Agarose gel)
↓ Ligation with dephosphorylated pT7Blue(R)/*Eco*R V
↓ Transformation etc.
↓ Plasmids
　pAKI249 : pAKI86 *Eco*R V - *Pst* I
　pAKI251 : pAKI86 *Pst* I - *Hin*d III
　pAKI241 : pAKI59 *Eco*R V - *Bam*H I
　pAKI253 : pAKI59 *Bam*H I - *Eco*R I
　pAKI255 : pAKI62 *Eco*R V - *Bam*H I
　pAKI248 : pAKI62 *Bam*H I - *Eco*R I
↓ Sequencing (F and R)

Fig. 23. Sequencing of ORF of HmC and HmS.

2　HmCとHmSの配列の特徴

HmCの全長クローンpAKI86と、RACE産物のクローンpAKI23及びpAKI27の非翻訳領域の配列を連結したものをHmCのcDNA配列とし、DNA Data Bank of Japan (DDBJ)に登録した（accession number = AB011467）。本論文では"HmCcDNA86"と呼ぶ。同様にHmScDNAの配列を、全長クローンpAKI59とRACE産物のクローンpAKI18及びpAKI25より作成し、DDBJに登録した（accession number = AB011468）。これを"HmScDNA59"と呼ぶ。また、全長クローンpAKI62についてもRACE産物のクローンpAKI18及びpAKI25と連結し、"HmScDNA62"とした。

Figs. 24 - 26に、HmCcDNA86、HmScDNA59、HmScDNA62の塩基配列とアミノ酸配列を示した。HmC86は終始コドンを除いて1,167 bpで、389 AAをコードしていた。また、HmS59 とHmS62はともに1,197 bp、399 AAであり、両者の差異は14塩基、うち4ヶ所ではアミノ酸の変異となって現れた。2つのHmSクローンのうち、以後は主にHmS59について解析を行った。

次に、HmCとHmSのアミノ酸配列を他の植物のCHS、STSと比較した。Fig. 27に示した配列は、上からピーナツ（*Arachis hypogaea*）STS[22]、クズ（*Pueraria lobata*）CHS[21]、HmC、HmSである。HmCは、クズのCHSと86％の相同性を示し、アマチャのCHSと推測された。一方、HmSは、クズのCHSと71％の相同性を示し、関連した酵素であることが考えられた。しかし、HmSにはいくつか特徴的なアミノ酸残基が見られた。ピーナツSTSとクズCHSだけでなく、データベース上に公開されている他の植物のCHS、STSのコンセンサス配列とHmSのアミノ酸配列を比較し、コンセンサス配列と性質の異なるアミノ酸残基を持つ部分を＊で示した。例えば、His169の位置は、他のPKSではPheまたはTyrが存在し、Asn201の位置は他はThrである。このようなアミノ酸が12カ所ある。また、他のものには見られない6残基のインサーションを持っている（#で示した）。これらのことから、HmSは新たなPKSをコードしているものと推定された。

```
                9          18          27          36          45          54
5' AAG TTG TAA CGT AAC TTA CAA ACC TAT TTC TCC AAG CAG TTG GTC AGG TCG GTC

               63          72          81          90          99         108
CAG TCA GTA CTT ACC ACA AAC CTC CCA TCG GAG AAA ATG GTG ACC GTC GAG GAA
                                                    M   V   T   V   E   E

              117         126         135         144         153         162
GTC CGT AAG GCC CAA CGG GCT GAA GGC CCG GCG ACA ATC TTG GCT ATC GGA ACT
 V   R   K   A   Q   R   A   E   G   P   A   T   I   L   A   I   G   T

              171         180         189         198         207         216
GCG ACG CCA CCT AAT TAT GTG GAT CAG AGC ACG TAT CCG GAT TTT TAT TTT CGC
 A   T   P   P   N   Y   V   D   Q   S   T   Y   P   D   F   Y   F   R

              225         234         243         252         261         270
GTC ACA AAT AGC GAG CAC AAG AAG GAG CTT AAA GCA AAA TTT CAG CGC ATG TGT
 V   T   N   S   E   H   K   K   E   L   K   A   K   F   Q   R   M   C

              279         288         297         306         315         324
GAC AAT TCC CAA ATT AAG AAG CGT TAC ATG CAT CTA ACG GAG GAA ATA TTG AAA
 D   N   S   Q   I   K   K   R   Y   M   H   L   T   E   E   I   L   K

              333         342         351         360         369         378
GAA AAC CCT AAT ATT TGT GCA TAT ATG GCA CCC TCG CTG GAT GCT AGA CAA GAC
 E   N   P   N   I   C   A   Y   M   A   P   S   L   D   A   R   Q   D

              387         396         405         414         423         432
ATG GTG GTG GTA GAA ATA CCA AAG CTA GGC AAA GAA GCA GCC ACT AGG GCA ATC
 M   V   V   V   E   I   P   K   L   G   K   E   A   A   T   R   A   I

              441         450         459         468         477         486
AAG GAA TGG GGC CAA CCC AAG TCC AAG ATA ACC CAC TTG GTC TTT TGC ACC ACT
 K   E   W   G   Q   P   K   S   K   I   T   H   L   V   F   C   T   T
CHS-112S

              495         504         513         522         531         540
AGT GGC GTC GAC ATG CCC GGT GCC GAC TAC CAG CTC ACC AAG CTC CTC GGG CTG
 S   G   V   D   M   P   G   A   D   Y   Q   L   T   K   L   L   G   L

              549         558         567         576         585         594
CGT CCT TCC GTC AAA CGT CTC ATG ATG TAC CAG CAA GGT TGC TTT GCC GGT GGC
 R   P   S   V   K   R   L   M   M   Y   Q   Q   G   C   F   A   G   G

              603         612         621         630         639         648
ACG GTC CTC CGT TTA GCC AAA GAC CTA GCT GAG AAC AAC AAA GGT GCA CGT GTG
 T   V   L   R   L   A   K   D   L   A   E   N   N   K   G   A   R   V
                                CHS-174S

              657         666         675         684         693         702
CTT GTG GTT TGC TCT GAG ATC ACT GCA GTT ACT TTT CGT GGC CCT AGT GAC ACG
 L   V   V   C   S   E   I   T   A   V   T   F   R   G   P   S   D   T

              711         720         729         738         747         756
CAC CTC GAC AGT CTT GTG GGT CAA GCA CTG TTT GGT GAT GGC GCG GCT GCT GTG
 H   L   D   S   L   V   G   Q   A   L   F   G   D   G   A   A   A   V

              765         774         783         792         801         810
ATA ATT GGG TCA GAC CCG ATG CCT GAA GTT GAG AAG CCC TTG TTT GAG ATA GTT
 I   I   G   S   D   P   M   P   E   V   E   K   P   L   F   E   I   V
```

```
        819         828         837         846         855         864
TCA GCT GCC CAA ACC ATT CTC CCG GAC AGT GAT GGT GCC ATC GAT GGA CAC CTT
 S   A   A   Q   T   I   L   P   D   S   D   G   A   I   D   G   H   L

        873         882         891         900         909         918
CGG GAG GTT GGG CTT ACA TTC CAT CTA CTT AAG GAT GTA CCC GGC CTT ATA TCC
 R   E   V   G   L   T   F   H   L   L   K   D   V   P   G   L   I   S

        927         936         945         954         963         972
AAG AAC ATT GAG AAG AGT CTA GTT GAG GCA TTC CGC CCC TTG GAC ATC TCT GAT
 K   N   I   E   K   S   L   V   E   A   F   R   P   L   D   I   S   D

        981         990         999        1008        1017        1026
TGG AAC TCT ATC TTT TGG ATT GCA CAT CCG GGT GGG CCT GCC ATT TTG GAC CAA
 W   N   S   I   F   W   I   A   H   P   G   G   P   A   I   L   D   Q

       1035        1044        1053        1062        1071        1080
GTG GAG AAG AAG CTG GCC CTT AAA CCC GAG AAG CTG CGG GCC ACG AGG AAC GTG
 V   E   K   K   L   A   L   K   P   E   K   L   R   A   T   R   N   V

       1089        1098        1107        1116        1125        1134
CTT AGC GAT TAC GGC AAC ATG TCA AGC GCG TGC GTG TTG TTC ATT ATG GAT GAG
 L   S   D   Y   G   N   M   S   S   A   C   V   L   F   I   M   D   E

       1143        1152        1161        1170        1179        1188
ATG AGG AAG AAT TCG GCA GAA GAA GGG CTG ATG ACC ACC GGT GAA GGG CTC GAG
 M   R   K   N   S   A   E   E   G   L   M   T   T   G   E   G   L   E
                                                     CHS-368A

       1197        1206        1215        1224        1233        1242
TGG GGT GTG CTC TTT GGG TTT GGA CCA GGG CTC ACT GTT GAA ACT GTG GTT CTT
 W   G   V   L   F   G   F   G   P   G   L   T   V   E   T   V   V   L
                                 CHS-380A

       1251        1260        1269        1278        1287        1296
CAT GGT GTG TCT ACT TAG AGG CCC ATT GTT TAG TTG TAC TGT TTT ATT TTT ACT
 H   G   V   S   T   *

       1305        1314        1323        1332        1341        1350
TTT CCT TAA TTT ACC CTC TCG TTG TGT GAT TAA AGT TAA TTT TAA TAT TGT GGT

       1359        1368        1377        1386        1395        1404
AAG ACC ATG CTG TGT TGG TTC TAT TTT GTT GTC TCA TTG TCT GCA TAT ATA GGA

       1413        1422        1431        1440        1449        1458
CCA TGC AAC ATA AGG TAG CAA TTG GTA TTG GCA TGG TAA TAA TTA ATA AAC ATG

       1467        1476        1485        1494        1503        1512
TTT TTT TGT AAC ATT GTG ATA AAA GCA TGC AAG AAT GTT GGG TTT TTT TGT CAA

           1524
AAA AAA AAA AAA 3'
```

Fig. 24. Nucleotide and deduced amino acid sequences of HmCcDNA86. Sequences of pAKI23, pAKI86 and pAKI27 are connected. Accession number of DDBJ is AB011467. Positions of degenerate primers are underlined.

```
                9          18          27          36          45          54
5' TAA AAT ACC ATA CAG AGA GAG ATA CAA AGG CTA AAA ATA GTA AAA ATG GCA ACA
                                                                M   A   T

               63          72          81          90          99         108
AAA TCG GTA GCA GTG GAA GAG ATG TGC AAG GCA CAG AAA GCA GGT GGT CCG GCG
 K   S   V   A   V   E   E   M   C   K   A   Q   K   A   G   G   P   A

              117         126         135         144         153         162
ACC ATT CTG GCG ATC GGA ACG GCT GTA CCG TCC AAC TGC TAC TAT CAG TCG GAA
 T   I   L   A   I   G   T   A   V   P   S   N   C   Y   Y   Q   S   E

              171         180         189         198         207         216
TAT CCT GAT TTC TAT TTC CGT GTT ACC AAG TCC GAC CAC TTG ACT GAT CTT AAA
 Y   P   D   F   Y   F   R   V   T   K   S   D   H   L   T   D   L   K

              225         234         243         252         261         270
AGC AAG TTT AAG AGA ATG TGT GAG AGA TCC TCG ATA AAG AAA CGC TAT ATG CAT
 S   K   F   K   R   M   C   E   R   S   S   I   K   K   R   Y   M   H

              279         288         297         306         315         324
TTG ACG GAA GAG ATA CTG GAA GAG AAC CCA AAT ATG TGT ACT TTC GCG GCC CCA
 L   T   E   E   I   L   E   E   N   P   N   M   C   T   F   A   A   P

              333         342         351         360         369         378
TCC ATA GAT GGA CGT CAA GAC ATA GTG GTG AAG GAG ATA CCT AAA CTT GCC AAG
 S   I   D   G   R   Q   D   I   V   V   K   E   I   P   K   L   A   K

              387         396         405         414         423         432
GAA GCT GCT TCA AAG GCA ATC AAA GAG TGG GGC CAA CCC AAA TCA AAC ATC ACC
 E   A   A   S   K   A   I   K   E   W   G   Q   P   K   S   N   I   T
                                 CHS-112S

              441         450         459         468         477         486
CAC CTC GTT TTC TGC ACA ACC TCG GGT GTA GAC ATG CCC GGC TGT GAT TAT CAG
 H   L   V   F   C   T   T   S   G   V   D   M   P   G   C   D   Y   Q

              495         504         513         522         531         540
CTG ACA AGG CTC CTC GGC CTC CGT CCA TCC ATC AAG AGA CTT ATG ATG TAC CAA
 L   T   R   L   L   G   L   R   P   S   I   K   R   L   M   M   Y   Q

              549         558         567         576         585         594
CAG GGG TGC CAC GCG GGT GGA ACC GGC CTT CGT TTG GCC AAG GAT CTC GCG GAG
 Q   G   C   H   A   G   G   T   G   L   R   L   A   K   D   L   A   E
                                                             CHS-174S

              603         612         621         630         639         648
AAC AAC AAG GGC GCA CGT GTT CTT GTT GTC TGC TCC GAA ATG ACT GTC ATC AAT
 N   N   K   G   A   R   V   L   V   V   C   S   E   M   T   V   I   N

              657         666         675         684         693         702
TTT CGA GGA CCT TCC GAG GCC CAC ATG GAC TCT CTG GTG GGT CAA TCT CTT TTC
 F   R   G   P   S   E   A   H   M   D   S   L   V   G   Q   S   L   F

              711         720         729         738         747         756
GGT GAC GGT GCA TCA GCG GTG ATC GTG GGT TCG GAT CCT GAC CTG TCA ACA GAG
 G   D   G   A   S   A   V   I   V   G   S   D   P   D   L   S   T   E

              765         774         783         792         801         810
CAT CCA CTC TAT CAA ATT ATG TCT GCA TCA CAA ATT ATC GTG GCA GAC TCC GAG
 H   P   L   Y   Q   I   M   S   A   S   Q   I   I   V   A   D   S   E
```

```
        819         828         837         846         855         864
GGG GCA ATA GAT GGG CAC CTG CGA CAG GAG GGG CTC ACG TTT CAT TTG AGG AAA
 G   A   I   D   G   H   L   R   Q   E   G   L   T   F   H   L   R   K

        873         882         891         900         909         918
GAT GTA CCT TCT TTG GTC TCG GAT AAC ATA GAG AAC ACA TTG GTT GAA GCT TTC
 D   V   P   S   L   V   S   D   N   I   E   N   T   L   V   E   A   F

        927         936         945         954         963         972
ACT CCA ATA TTA ATG GAT AGT ATT GAC AGT ATT ATT GAT TGG AAC TCC ATA TTC
 T   P   I   L   M   D   S   I   D   S   I   I   D   W   N   S   I   F

        981         990         999        1008        1017        1026
TGG ATC GCT CAT CCT GGC GGG CCA GCC ATA TTA AAT CAG GTG CAG GCA AAA GTG
 W   I   A   H   P   G   G   P   A   I   L   N   Q   V   Q   A   K   V

       1035        1044        1053        1062        1071        1080
GGT CTG AAA GAG GAG AAA CTG AGG GTG AGC CGT CAC ATT TTG AGT GAG TAT GGA
 G   L   K   E   E   K   L   R   V   S   R   H   I   L   S   E   Y   G

       1089        1098        1107        1116        1125        1134
AAC ATG TCC AGC GCG TGT GTG TTT TTC ATT ATG GAC GAG ATG AGG AAG AGA TCC
 N   M   S   S   A   C   V   F   F   I   M   D   E   M   R   K   R   S

       1143        1152        1161        1170        1179        1188
ATG GAG GAA GGA AAG GGT ACC ACC GGC GAA GGG CTA GAG TGG GGT GTT CTT TTT
 M   E   E   G   K   G   T   T   G   E   G   L   E   W   G   V   L   F
                                     CHS-368A

       1197        1206        1215        1224        1233        1242
GGG TTT GGA CCT GGC TTC ACT GTT GAG ACC ATT GTC TTG CAC AGT GTC CCC ATT
 G   F   G   P   G   F   T   V   E   T   I   V   L   H   S   V   P   I
               CHS-380A

       1251        1260        1269        1278        1287        1296
TAA AAC AAA CAA AGC CTG TGT TAC TGA TTA TCT CGA CCA CTC ATT TAC TCG GTT
 *

       1305        1314        1323        1332        1341        1350
TGG GGG GAG TGG ATT CAG ATT TGG GAC TGT TTA TTT GTG TAC TTT TTT TTT TTT

       1359        1368        1377        1386        1395        1404
TTT TTT TGC CCT TGG AAT AAT TAA TTG ATC GTG TGT TAT AAT AGT TAT TAT GTA

       1413        1422        1431        1440        1449        1458
TGA TGC ATT GAT GTT GTA TAA GGT TTA GTA CGT GAA ATG CAC GGG AGA AAA TGA

       1467        1476        1485        1494        1503  1507
ATA AAG GGG TTT AGT AAT GAT TGA AAT GCT ACA AAA AAA AAA AAA AAA A 3'
```

Fig. 25. Nucleotide and deduced amino acid sequences of HmScDNA59. Sequences of pAKI18, pAKI59 and pAKI25 are connected. Accession number of DDBJ is AB011468. Positions of degenerate primers are underlined.

```
                9                  18                  27                  36                  45                  54
5'  TAA AAT ACC ATA CAG AGA GAG ATA CAA AGG CTA AAA ATA GTA AAA ATG GCA ACA
                                                                    M   A   T

               63                  72                  81                  90                  99                 108
    AAA TCG GTA GCA GTG GAA GAG ATG CTC AAG GCA CAG AAA GCA GGT GGT CCG GCG
      K   S   V   A   V   E   E   M   L   K   A   Q   K   A   G   G   P   A

              117                 126                 135                 144                 153                 162
    ACC ATT CTG GCG ATC GGA ACG GCT GTA CCG TCC AAC TGC TAC TAT CAG TCG GAA
      T   I   L   A   I   G   T   A   V   P   S   N   C   Y   Y   Q   S   E

              171                 180                 189                 198                 207                 216
    TAT CCT GAT TTC TAT TTC CGT GTT ACC AAG TCC GAC CAC TTG ACT GAT CTT AAA
      Y   P   D   F   Y   F   R   V   T   K   S   D   H   L   T   D   L   K

              225                 234                 243                 252                 261                 270
    AGC AAG TTT AAG AGA ATG TGC GAG AGA TCC TCG ATA AAG AAA CGC TAT ATG CAT
      S   K   F   K   R   M   C   E   R   S   S   I   K   K   R   Y   M   H

              279                 288                 297                 306                 315                 324
    TTG ACG GAA GAG ATA CTG GAA GAG AAC CCA AAT ATG TGT ACT TTC GCG GCC CCA
      L   T   E   E   I   L   E   E   N   P   N   M   C   T   F   A   A   P

              333                 342                 351                 360                 369                 378
    TCG ATA GAT GGA CGT CAA GAC ATA GTG GTG AAG GAG ATA CCG AGA CTT GCC AAG
      S   I   D   G   R   Q   D   I   V   V   K   E   I   P   R   L   A   K

              387                 396                 405                 414                 423                 432
    GAA GCT GCT TCA AAG GCA ATC AAA GAG TGG GGC CAA CCC AAA TCA AAC ATC ACC
      E   A   A   S   K   A   I   K   E   W   G   Q   P   K   S   N   I   T
                                  CHS-112S

              441                 450                 459                 468                 477                 486
    CAC CTC GTT TTC TGC ACA ACC TCG GGT GTA GAC ATG CCC GGA TGT GAT TAT CAG
      H   L   V   F   C   T   T   S   G   V   D   M   P   G   C   D   Y   Q

              495                 504                 513                 522                 531                 540
    CTG ACA AGG CTC CTC GGC CTC CGT CCA TCC ATC AAG AGA CTT ATG ATG TAC CAA
      L   T   R   L   L   G   L   R   P   S   I   K   R   L   M   M   Y   Q

              549                 558                 567                 576                 585                 594
    CAG GGG TGC CAC GCG GGT GGA ACC GGC CTT CGT TTG GCC AAG GAT CTC GCG GAG
      Q   G   C   H   A   G   G   T   G   L   R   L   A   K   D   L   A   E
                                                                  CHS-174S

              603                 612                 621                 630                 639                 648
    AAC AAC AAG GGC GCA CGA GTA CTT GTT GTC TGC TCC GAA ATG ACT GTC ATC AAT
      N   N   K   G   A   R   V   L   V   V   C   S   E   M   T   V   I   N

              657                 666                 675                 684                 693                 702
    TTT CGA GGA CCT TCC GAG GCC CAC ATG GAC TCT CTG GTG GGT CAA TCT CTT TTC
      F   R   G   P   S   E   A   H   M   D   S   L   V   G   Q   S   L   F

              711                 720                 729                 738                 747                 756
    GGT GAC GGT GCA TCA GCG GTG ATC GTG GGT TCG GAT CCT GAC CTG TCA ACA GAG
      G   D   G   A   S   A   V   I   V   G   S   D   P   D   L   S   T   E

              765                 774                 783                 792                 801                 810
    CAT CCA CTC TAT CAA ATT ATG TCT GCA TCA CAA ATT ATC GTG GCA GAC TCC GAG
      H   P   L   Y   Q   I   M   S   A   S   Q   I   I   V   A   D   S   E
```

```
         819          828          837          846          855          864
GGG GCA ATA GAT GGG CAC CTG CGA CAG GGG GGG CTC ACG TTT CAT TTG AGG AAA
 G   A   I   D   G   H   L   R   Q   G   G   L   T   F   H   L   R   K

         873          882          891          900          909          918
GAT GTA CCT TCT TTG GTC TCG GAT AAC ATA GAG AAC ACA TTG GTT GAA GCT TTC
 D   V   P   S   L   V   S   D   N   I   E   N   T   L   V   E   A   F

         927          936          945          954          963          972
ACT CCA ATA TTA ATG GAT AGT ATT GAC AGT GTT ATT GAT TGG AAC TCC ATA TTC
 T   P   I   L   M   D   S   I   D   S   V   I   D   W   N   S   I   F

         981          990          999         1008         1017         1026
TGG ATC GCT CAT CCT GGC GGG CCA GCC ATA TTA AAT CAG GTG CAG GCA AAA GTG
 W   I   A   H   P   G   G   P   A   I   L   N   Q   V   Q   A   K   V

        1035         1044         1053         1062         1071         1080
GGT CTG AAA GAG GAG AAA CTG AGG GTG AGC CGT CAC ATT TTG AGT GAG TAT GGA
 G   L   K   E   E   K   L   R   V   S   R   H   I   L   S   E   Y   G

        1089         1098         1107         1116         1125         1134
AAC ATG TCC AGC GCG TGT GTG TTT TTC ATT ATG GAC GAG ATG AGG AAG AGA TCC
 N   M   S   S   A   C   V   F   F   I   M   D   E   M   R   K   R   S

        1143         1152         1161         1170         1179         1188
ATG GAG GAA GGA AAG GGT ACC ACC GGT GAA GGG CTA GAG TGG GGT GTC CTT TTT
 M   E   E   G   K   G   T   T   G   E   G   L   E   W   G   V   L   F
                                    CHS-368A

        1197         1206         1215         1224         1233         1242
GGG TTT GGA CCT GGC TTC ACT GTT GAG ACC ATT GTC TTG CAC AGT GTC CCC ATT
 G   F   G   P   G   F   T   V   E   T   I   V   L   H   S   V   P   I
                 CHS-380A

        1251         1260         1269         1278         1287         1296
TAA AAC AAA CAA AGC CTG TGT TAC TGA TTA TCT CGA CCA CTC ATT TAC TCG GTT
 *

        1305         1314         1323         1332         1341         1350
TGG GGG GAG TGG ATT CAG ATT TGG GAC TGT TTA TTT GTG TAC TTT TTT TTT TTT

        1359         1368         1377         1386         1395         1404
TTT TTT TGC CCT TGG AAT AAT TAA TTG ATC GTG TGT TAT AAT AGT TAT TAT GTA

        1413         1422         1431         1440         1449         1458
TGA TGC ATT GAT GTT GTA TAA GGT TTA GTA CGT GAA ATG CAC GGG AGA AAA TGA

        1467         1476         1485         1494         1503  1507
ATA AAG GGG TTT AGT AAT GAT TGA AAT GCT ACA AAA AAA AAA AAA AAA A 3'
```

Fig. 26. Nucleotide and deduced amino acid sequences of HmScDNA62. Sequences of pAKI18, pAKI62 and pAKI25 are connected. Positions of degenerate primers are underlined. Differences from HmScDNA59 are boxed.

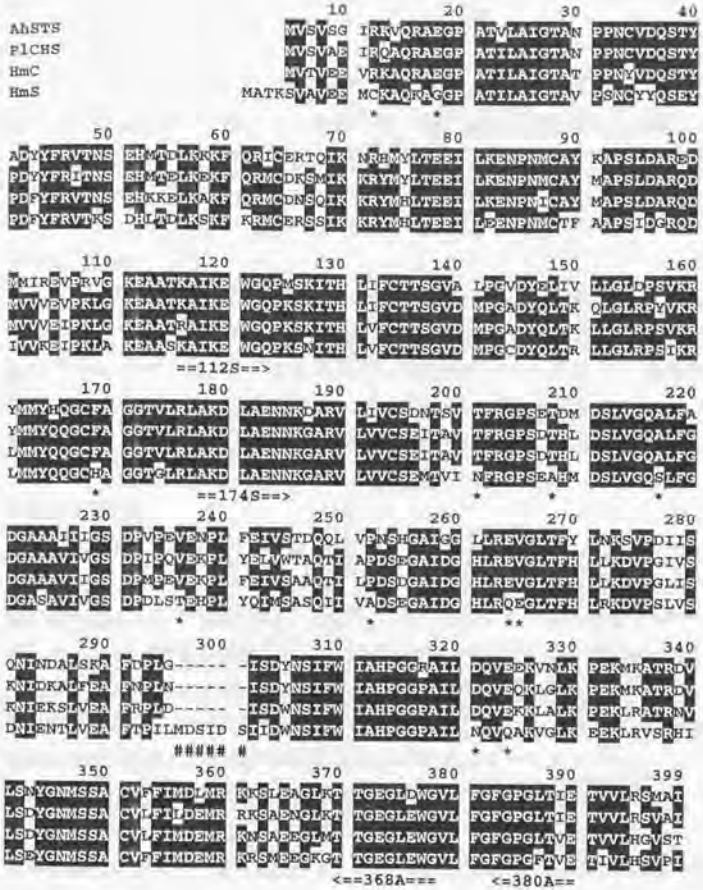


Fig. 27. Alignment of deduced amino acid sequences of STS from *Arachis hypogaea* , CHS from *Pueraria lobata*, HmC86 and HmS59

- :	Gap	Identity :		PlCHS	HmC86	HmS59
*, # :	Characteristic amino acid		AhSTS	78	75	65
	residues in HmS		PlCHS		86	71
==> :	Degenerate primers		HmC			76

HmS62 : 12(C) = L, 108(K) = T, 265(E) = G, 302(I) = V

Identity between HmC and HmS : 66 % (nucleotide)

76 % (amino acid)

第1節　大腸菌による発現

HmCとHmSの機能を明らかにするため、全長ORFを異種生物で発現させて酵素活性を検討することにした。まず、発現量の多さと扱いやすさから大腸菌の系を用いることにした。

1　発現誘導

発現ベクターとしては、ピーナツSTSとクズCHSの発現で良い結果の出ている[22, 24]pETベクターを選択した。第1章第2節で述べたように、全長を含むPCR産物を発現ベクターpET-32a(+)に組み込んだ。得られたプラスミドで発現用の宿主，BL21(DE3)pLysEを形質転換した。この大腸菌を培養し、IPTGにより、チオレドキシンとの融合タンパク質、TrxHmC78、TrxHmC86、TrxHmC89、TrxHmS59、TrxHmS60、TrxHmS61、TrxHmS62、TrxHmS63、TrxHmS64、TrxHmS65、TrxHmS66の発現を誘導した。

まずSDS-PAGEによりこれらの分子量と溶解性を検討した。TrxHmS64は分子量が約45 kDaのタンパク質として発現したが、他はすべて予想通り約60 kDaであった。IPTG添加後も37℃で培養すると発現タンパク質がインクルージョンボディを形成してしまったが、20℃で培養すると、TrxHmC86、TrxHmC89、TrxHmS59、TrxHmS60、TrxHmS62、TrxHmS63、TrxHmS65及びTrxHmS66は、発現されたタンパク質の数十%を可溶性画分に回収することができた（Fig.　28）。しかし、TrxHmC78及びTrxHmS61の場合、この条件でも発現タンパク質はすべてインクルージョンボディを形成した。TrxHmS64の分子量とTrxHmC78及びTrxHmS61の低い溶解性は、PCRによって発生した予期しない変異が原因と考えられる。そこで、これらについてはそれ以上の検討は行わず、可溶性タンパクとして得られたものについてのみ酵素活性を検討することにした。

Glycerol stock of BL21(DE3)pLysE harboring pET plasmid
↓Cultured at 37℃ overnight in LB/Amp (100 μg/ml) / Cm (34 μg/ml) with shaking
↓Centrifuge (V×0.04×0.8 / OD_{600}) ml (1000×g, 3 min)
ppt
↓Resuspended with V ml of fresh LB/Amp/Cm
↓Cultured at 37℃ with shaking till OD_{600} reach ca. 0.6
↓Put on ice and kept for 5 min
↓Added 0.1 M IPTG to final conc. 1.0 mM
↓Cultured at 20℃ for ca. 20 h
↓Extracted soluble protein fractions

Fig. 28. Expression of HmC or HmS protein in *E. coli*.

2　HmC酵素活性の検討

次に*in vitro*アッセイにより、まずHmCタンパク質の酵素活性を検討した。第I章第1節で述べたように、スターターは　*p*-coumaroyl-CoA (**7**)　と考えられるので、TrxHmC86 及びTrxHmC89を発現させた大腸菌のcrude extractを、**7**と[2-^{14}C]malonyl-CoA (**8**)とともにインキュベートし、生成物をTLCで分析した（Fig. 29）。結果をFig. 30に示す。TrxHmC86及びTrxHmC89の反応生成物中に naringenin (**58**) が検出された。これはCHSの生成物であるnaringenin chalcone (**1**) が非酵素的に異性化したものである（Fig. 31）。したがって、HmCはアマチャのCHSの遺伝子であると同定できた。また、化合物A、B、Cが検出された。ところで、ベクターを導入した32では、triacetic acid lactone (TAL, **59**)が生成した。これは脂肪酸合成酵素（FAS）がNADPH非存在下において生成させることが知られている化合物である。おそらく、宿主のFASが持つ8の脱炭酸活性によって生成したacetyl-CoA (**67**)と2分子の**8**から、再び宿主のFASの触媒作用により形成されたのであろう（Fig. 31）。

なお、アマチャPKSのアッセイは、これ以降pH、基質濃度などを変更し、数種類の条件で行った。Fig. 29に示したのはそのうち"Assay TLC1"である。アッセイ法の詳細と選択については実験の部に詳しく記載した。

(1) Reaction

0.1 M Tris pH 7.0 1 mM EDTA 0.05 mM *p*-Coumaroyl-CoA 0.02 mM Malonyl-CoA　in 50 μl

↓ Incubated at 30℃ for 1 h
↓ Added 5 μl of 50 % AcOH
↓ Extracted with EtOAc

(2) TLC
a) Normal phase :
WF, benzene-acetone-acetic acid (70 : 30 : 1)
b) Reverse phase :
RP-18, methanol-water-acetic acid (70 : 30 : 1)

Fig. 29. Assay for polyketide synthase activity.



Fig. 30. Enzyme activity of TrxHmC. TLC : reverse phase. 86, 89 : TrxHmC, 32 : vector. NG : naringenin, T : triacetic acid lactone.

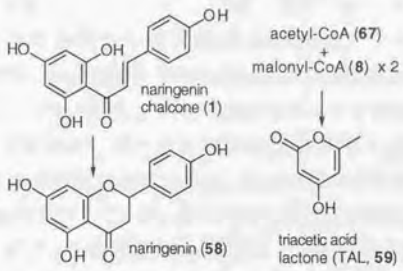


Fig. 31. Products of polyketide synthase assay.

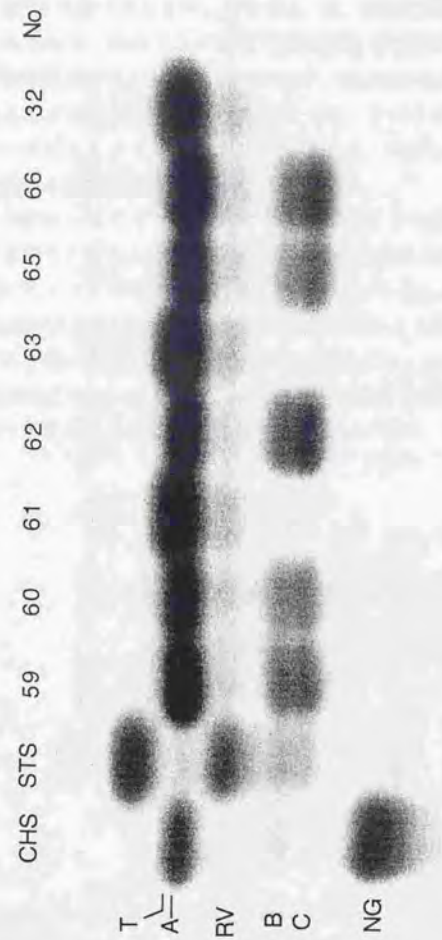


Fig. 32. Enzyme activity of TrxHmS. TLC : reverse phase. 59, 60, 61, 62, 63, 65, 66 : TrxHmS, 32 : vector, No : no enzyme, NG : naringenin, RV : resveratrol, T : triacetic acid lactone.

3　HmS酵素活性の検討

次にH mS の酵素活性を検討した。H mCと同様のアッセイを行った結果、TrxHmS59、TrxHmS60、TrxHmS62、TrxHmS65及びTrxHmS66の生成物中に化合物A、B、Cが検出された（ Fig. 32 ）。同時に反応を行ったクズ由来のCHS（pET-3dの系で発現したもの）では**58**が、ピーナツ由来のSTS（同じくpET-3dの系で発現したもの）ではresveratrol (**4**)が検出されているが、HmSではいずれも検出されなかった。TrxHmS61及びTrxHmS63ではベクターのみの32と同様、**59**だけが検出された。すべてインクルージョンボディを形成したTrxHmS61と同様、TrxHmS63もPCRによる変異を持つタンパク質なのであろう。

4　Intact HmSの活性

第3節で述べるように、化合物A、B、Cは直鎖ポリケタイドが非酵素的に閉環したものであり、HmSタンパク質は閉環活性を示さなかった。しかし、HmSタンパク質は本来閉環活性を持つタンパク質で、TrxHmSチオレドキシンとの融合タンパク質であるためにその活性を失ってしまった、という可能性がある。そこで、エンテロキナーゼによりチオレドキシンと分離させ、ほぼintactな形のHmSタンパク質を得、その活性を検討することにした（Fig. 21）。

ベクターにデザインされたヒスチジンタグを利用し、ニッケルキレートレジンによるアフィニティー精製を行って大腸菌由来の夾雑タンパク質のほとんどを除いた。続いてエンテロキナーゼによる消化を行い、intact HmSを得た。SDS-PAGEにより、HmSのORFから予想される分子量である約45 kDaのタンパク質の生成を確認した。これを用いて上記のアッセイを行ったところ、intact HmSのレーン59i、60i、62i、65i及び66iにTrxHmS59と同じ生成物のみが検出された（Fig. 33）。従って、融合タンパク質であるために本来の活性を示していない、という可能性は否定された。

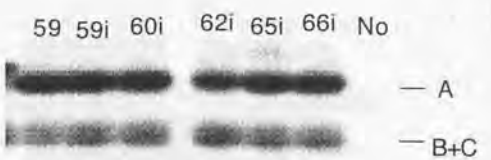


Fig. 33. Enzyme activity of TrxHmS and intact HmSs. TLC : reverse phase. 59 : TrxHmS59; 59i, 60i, 62i, 65i, 66i : intact HmS; No : no enzyme.

また、はじめからintactな形で発現させることも検討した。Fig. 20に示したプライマー、HmS-NとHmS-Cを用いて、cDNAを鋳型に増幅した断片をベクターpET-22b(+)に組み込み（Fig. 34）、プラスミドpAKI38とpAKI54（Table 4）を得た。同様に発現させてタンパク質HmS38及びHmS54を得、crude extractの酵素活性を検討した。Fig. 35に示すように、HmS54はTrsHmS66と同じ活性を示し、intactな形で発現させても融合タンパク質と全く同じ活性を持つことが示された。なお、HmS38はベクターと同じ活性であるが、SDS-PAGEにより、これは発現タンパク質がすべてインクルージョンボディを形成してしまったことが原因であることがわかった。

以上のように、intact HmSがTrxHmSと同じ活性を示したことにより、チオレドキシンとの融合タンパク質TrxHmSが本来の酵素活性を現していることが確かめられた。

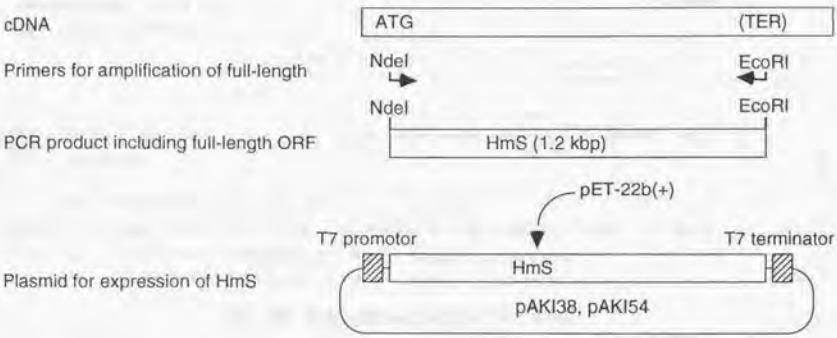


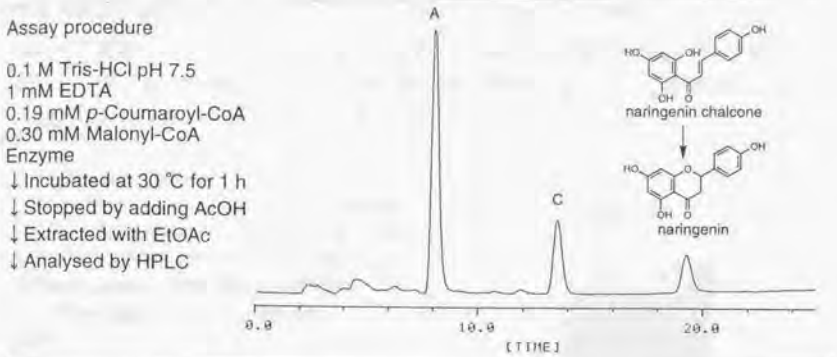
Fig. 34. Construction of plasmid for expression of intact HmS protein in *E. coli*.



Fig. 35. Enzyme activity of TrxHmS and intact HmSs. TLC : reverse phase. 66 : TrxHmS66; 38 : HmS38; 54 : HmS54; 22 : vector.

5　生成物のHPLCによる分析

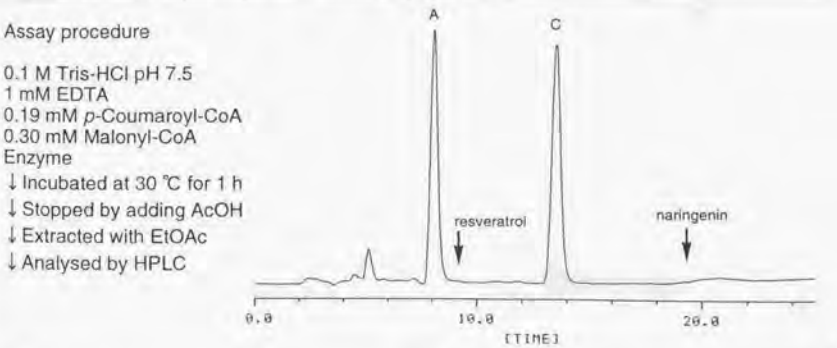
放射性同位体を用いずにアッセイを行い、生成物をHPLCで分析した。Fig. 36 、Fig. 37 にその結果を示す。[2-^{14}C]8を用いた場合と同様の結果。ただ、カラムを加熱すると化合物Bと化合物Cが重なってしまうことがわかった（図のピークC）。



HPLC condition

Column : Tosoh ODS-80Ts (4.6 mm I. D. x 150 mm)
Solvent : Linear gradient of A (H_2O, 1 % AcOH) and B (MeOH, 1 % AcOH), 45 % → 49 % B
Flow rate : 0.6 ml / min, Temperature : 40 ℃, Detection : UV254

Fig. 36. Enzyme activity of TrsHmC.



HPLC condition

Column : Tosoh ODS-80Ts (4.6 mm I. D. x 150 mm)
Solvent : Linear gradient of A (H_2O, 1 % AcOH) and B (MeOH, 1 % AcOH), 45 % → 49 % B
Flow rate : 0.6 ml / min, Temperature : 40 ℃, Detection : UV254

Fig. 37. Enzyme activity of TrsHmS.

6　アマチャ葉抽出物の酵素活性

HmSがアマチャ葉で発現しているかどうか検討するため、葉より粗酵素液を調製して同様のアッセイを行うことにした。

1997年6月9日に東京薬科大学薬用植物園にて採集したアマチャ葉のうち約 5.0 gをバッファー中でWaring Blenderを用いて破砕し、さらにゲルろ過により低分子を除いて粗酵素液を調製した（Fig. 38）。これを用いて、Fig. 29と同様のアッセイを行った。その結果、Fig. 39に示すように、化合物AがCHSの生成物である**58**より多量に生成した。従って、原植物であるアマチャ葉にもHmSと同じ活性を持つ酵素が存在し、CHSよりも高発現していることが示唆された。

5.0 g of frozen leaves
↓Mixed with 10 ml of cold 0.1 M KPB pH 7.0, 1 % glycerol, 1 mM DTT, 20 mM sodium ascorbate, 10 % Polyclar AT
↓Homogenized with Waring Blender
↓Centrifuged 12,100 x g, 30 min
sup
↓Desalted with PD-10

Fig. 38. Extraction of soluble protein from leaves of *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii*.

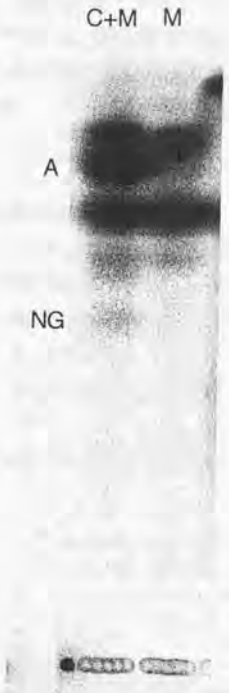


Fig. 39. Enzyme activity of crude extract of leaves of *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii*. TLC : reverse phase. C+M : *p*-coumaroyl-CoA + [^{14}C]malonyl-CoA; M : [^{14}C]malonyl-CoA only.

真核生物であり、タンパク質合成系の性質が大腸菌よりも植物に近い酵母の系でも発現させ、その活性を検討することにした。

1　発現用プラスミドの構築と発現誘導

遺伝子発現のオンオフが比較的厳密にコントロールできるガラクトースプロモーターを持つプラスミド、pYES2を使用することにした。 Fig. 20 に示したプライマー、HmC-N3、HmC-C、HmS-N3とHmS-Cを用いて、cDNAを鋳型にPCRを行った。増幅した断片を、ベクターpYES2に組み込み（ Fig. 40 ）、HmC発現プラスミドpAKI296、pAKI305、pAKI306、pAKI307及び、HmS発現プラスミドpAKI80、pAKI81、pAKI82（Table 4）を得た。LiOAc法で酵母INVSC2株を形質転換した（Fig. 41）。形質転換株を、C源としてraffinoseのみを持つ培地で培養した後、培地にgalactoseを加えることによりタンパク質発現を誘導し、グラスビーズにより菌体を破砕し、粗酵素液を得た（Fig. 42）。

2　酵素活性の検討

大腸菌抽出物と同様の[^{14}C]アッセイを行った。結果をFig. 43に示した。全タンパク質に対する発現タンパク質の量が大腸菌の場合と比較して少ないためか、多くのバンドが見られるが、ベクターのみを持つ酵母の抽出物には見られないバンドはA、B、C及びNGのみである。HmCクローンであるpAKI305とpAKI306 では58と化合物Aが、HmSクローンであるpAKI80では化合物A、B、Cが生成していることがわかる。ここには示していないが、pAKI81及びpAKI82はpAKI80と同じ結果であった。pAKI296とpAKI307にはPCRによる変異が存在するようだ。

以上のように、HmC及びHmSは酵母の系で発現させても大腸菌の系と全く同じ活性を示すことが判明した。

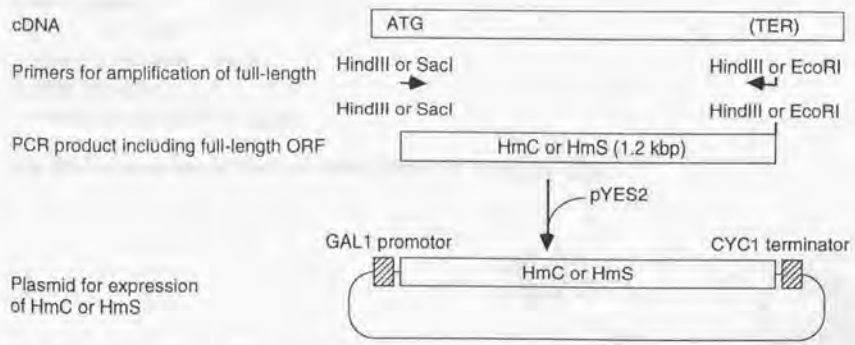


Fig. 40. Construction of plasmids for expression of HmC and HmS proteins in yeast.

↓ INVSC2 (ca. 2 x 10^7 cells / ml, OD_{600} = ca. 0.4)
↓ collect yeast
↓ wash with 1 ml of 0.1 M LiOAc TE (pH 8.0) x 2
↓ suspend in 0.6 ml of 0.1 M LiOAc TE (pH 8.0)
↓ 30 ℃ , 1 h
↓ separate into 0.1 ml each
↓ add plasmid (pYES2+insert) 20 ml
↓ 30 ℃, 30 min
↓ add 0.7 ml of 40 % PEG 0.1 M LiOAc TE (pH 8.0)
↓ 30 ℃, 1 h
↓ 42 ℃, 5 min
↓ collect yeast
↓ wash with 1 ml TE
↓ suspend in 0.1 ml TE
↓ spread on SC-U plate

Fig. 41. Transformation of yeast INVSC2 (LiOAc method).

20 ml of transformed yeast grown on SC - U - Glucose + Raffinose (2 %)
↓ 30 ℃, shake, 2 days
↓ add 2 ml of 20 % galactose
↓ 30 ℃, shake, 24 h
↓ collect yeast
↓ suspend in 0.1M KPB (pH 7.4) 450 mM sucrose, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 2 mM DTT
↓ wash once with above KPB
↓ suspend in 250 ml above KPB
↓ add glass beads up to meniscus
↓ bead-beader (3,800 rpm) 30 s x 8
↓ add 250 ml KPB
↓ collect liquid with 1 ml tip
↓ cent. 18,400 g
↓ collect sup for enzyme assay

Fig. 42. Expression of HmC or HmS protein in yeast INVSC2.

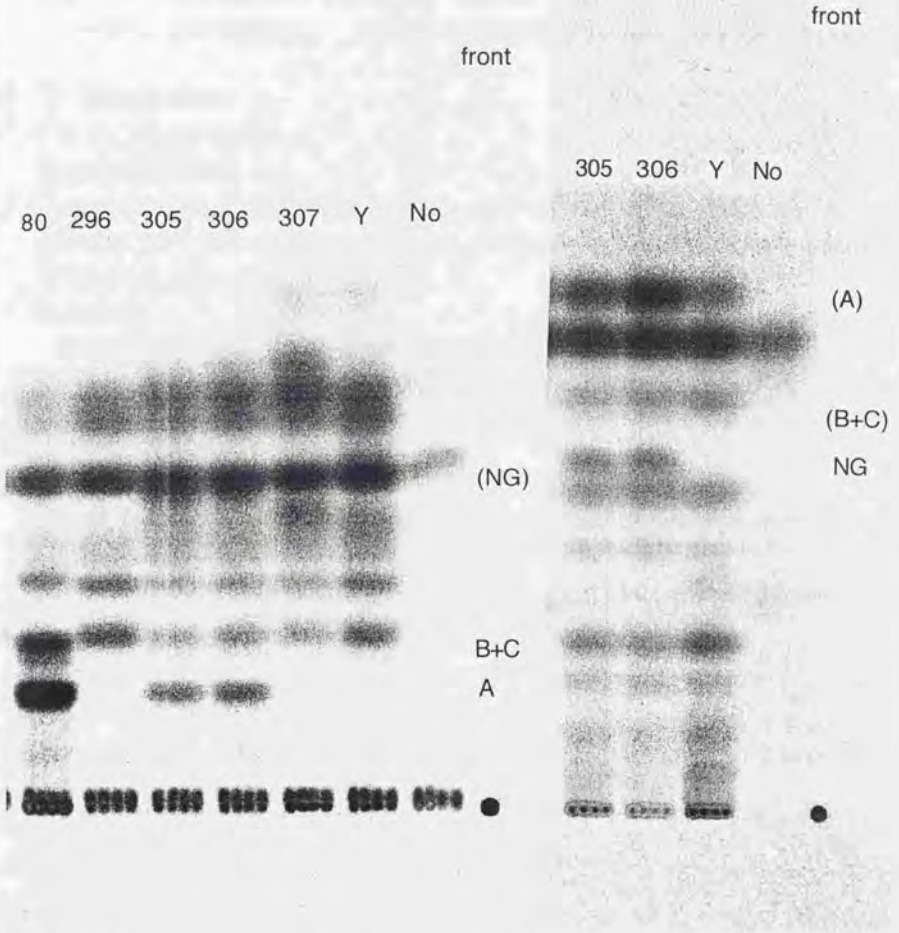


Fig. 43. Enzyme activity of HmC and HmS protein expressed in yeast. Left panel : normal phase; right panel : reverse phase. 80 : HmS; 296, 305, 306, 307 : HmC; Y : vector; No : no enzyme. NG : naringenin.

第1節、第2節で述べたように、HmSタンパク質は*p*-coumaroyl-CoA (**7**)とmalonyl-CoA (**8**)から化合物A、B、Cを合成する酵素であると結論した。次に、化合物A、B、Cの構造決定を行うことにした。なお、この3種の化合物はアマチャCHSであるHmCタンパク質の副生成物でもある。

ラージスケールの反応を行い、生成物を分取HPLCで分離、精製することにした。

1　反応条件の検討

まず、反応条件を検討した。

(1) pH及び反応時間

pH 6.5、7.0、7.5及び8.0、そして反応時間1時間と3時間を比較した。結果をTable 5に示した。pH 7.5のとき、A、B、Cの生成量の合計が多い。また、反応は1時間で十分であることも示された。

(2) 基質濃度

7の濃度を0.185 mMに固定し、**8**の濃度を0.10 mM、0.30 mM、1.00 mMとしてpH 7.5でアッセイを行い、生成物量を比較した。Table 6に示すように、0.185 mM **7**、0.3 mM **8**という条件の時、A、B、Cの生成量の合計が多い。

Table 5. Effect of pH and reaction time on enzyme activity.

		Incorporated C2 unit (nmol / assay)	
pH	Time (h)	A	B + C
6.5	1	3.535	0.506
7.0	1	3.251	0.816
7.5	1	2.943	2.718
8.0	1	2.064	3.529
6.5	3	2.676	0.410
7.0	3	2.634	0.643
7.5	3	2.271	2.170
8.0	3	1.426	2.467

Table 6. Effect of concentration of malonyl-CoA on enzyme activity.

Malonyl-CoA (mM)	Incorporated C2 unit (nmol / assay)	
	A	B + C
0.10	0.924	1.127
0.30	2.693	1.924
1.00	3.117	1.141

2　酵素、基質の大量調製

TrsHmS59を，2 lの培養液から調製した。まず、スモールスケールの場合と同様に1mM IPTG、誘導後の培養温度20 ℃、誘導後の培養時間約20時間、という条件でタンパク質発現を誘導した（Fig. 44）。次に菌体を収穫し、リゾチームによる細胞壁の消化と DNase Iによる核酸の分解を利用して可溶性タンパク質画分を調製した（Fig. 45）。次いで、ニッケルキレートレジン約 90 mlを用いたアフィニティークロマトグラフィーによりTrsHmS59を精製した。スモールスケールの実験（実験の部参照）より200 mM imidazoleでは溶出されないことがわかっていたので、この条件で夾雑タンパク質を十分除いた後、500 mM imidazoleで目的のタンパク質を一気に溶出させた（Fig. 46）。Fig. 47には、総タンパク質、可溶性タンパク質及び精製TrxHmSをSDS-PAGEで分析した結果を、スモールスケールで発現及び精製を行ったTrxHmCとともに示してある。ほぼシングルバンドになるまで精製することができた。Bradfordの方法でタンパク定量を行ったところ、ca. 4 mg / ml、total ca. 80 mgであった（Fig. 46）。

Glycerol stock of BL21(DE3)pLysE harboring pAKI59
↓ Cultured at 37℃ overnight in LB/Amp (100 μg/ml) / Cm (34 μg/ml) with shaking
↓ Centrifuge (2000×0.04×0.8 / OD_{600}) ml (1000×g, 3 min)
ppt
↓ Resuspended with 2000 ml of fresh LB/Amp/Cm
↓ Cultured at 37℃ with shaking till OD_{600} reach ca. 0.6
↓ Put on ice and kept for 5 min
↓ Added 0.1 M IPTG to final conc. 1.0 mM
↓ Cultured at 20℃ for 21h (500 ml flask, 250 rpm)
↓ Extracted total and soluble protein fractions

Fig. 44. Expression of TrxHmS in *E. coli* (2 l scale).

2000 ml of Induced culture
↓ 5,000×g, 10 min, 4 ℃ in RA-6
ppt
↓ Weighed(wet weight)
↓ Suspended in 3 ml/g Native Binding Buffer pH 7.8
↓ Added 4 ml/g 100 mM PMSF
↓ Added 80 ml/g 10 mg/ml Lysozyme
↓ Stirred for 20 min at 4 ℃
↓ Added 4mg/g Sodium deoxycholate
↓ Stirred for 10 min at 4 ℃
↓ Stirred by a microspatula in 37 ℃ water bath for 5 min
↓ When the lysate became viscous, added 1 μl/g 20 mg/ml DNase I
↓ Stood at rt until it is no longer viscous (5-10 min)
↓ Dilute with 4×vol of Native Binding Buffer pH 7.8
↓ 25,000×g, 21 min, 4 ℃ in RA-3
sup (177 ml, crude extract)

Fig. 45. Extraction of soluble protein from *E. coli* .

90 ml Resin (2.7 x 15.5 cm)
↓ Washed with 400 ml of dH_2O (4 ml / min)
↓ Equilibrated with 650 ml (> 500 ml) of Native binding buffer pH 7.8
↓ Added 177 ml of crude extract
↓ Washed with 480 ml of Native binding buffer pH 7.8
↓ Washed with 160 ml of Native wash buffer pH 6.0
↓ Washed with 1000 ml (> 500 ml) of 50 mM Imidazole elution buffer pH 6.0
↓ Washed with 600 ml (> 400 ml) of 200 mM Imidazole elution buffer pH 6.0
↓ Eluted with 600 ml (>400 ml) of 500 mM Imidazole elution buffer pH 6.0
↓ Check by SDS-PAGE
↓ Concentrated TrxHmS Frs. with Centriprep 30
20 ml TrxHmS59 soln. (ca. 4 mg / ml, total ca. 80 mg)

Fig. 46. Affinity purification of thioredoxin fusion proteins (column method).

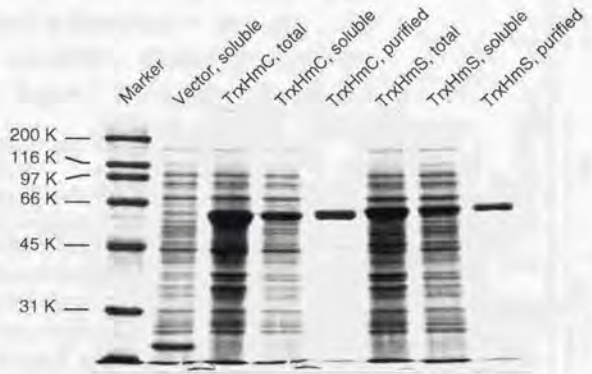
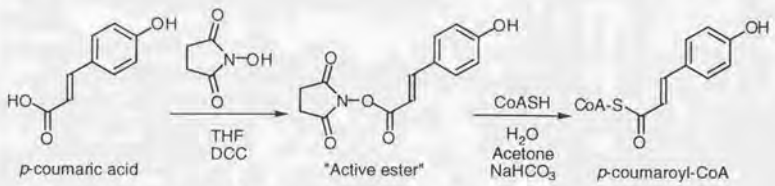


Fig. 47. SDS-PAGE of fusion proteins. 10 % Acrylamide gel.



↓ Paper chromatography (Whatman 3MM Chr, BuOH : AcOH : H_2O = 5 : 2 : 3)
↓ Eluted with H_2O
↓ Lyophilization
33.7 mg (0.0376 mmol) of yellowish fluffy powder from 0.05 mmol of CoASH

Fig. 48. Synthesis of *p*-coumaroyl-CoA

基質である*p*-coumaroyl-CoA (**7**)はFig. 48のような方法で合成した[25]。

まず、 *p*-coumaric acid を *N*-hydroxysuccinimide のエステルとした。これを"active ester"と呼ぶ。Active esterをシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、続くエステル交換反応の基質とする。この反応で生成した**7**は、ペーパークロマトグラフィーを用いてCoASHと分離した。水により溶出させ、凍結乾燥して、黄色みがかった（レモン色）fluffyな結晶を得た。エステル交換反応は数回行ったが、最も収率の良い例では50 μ molのCoASHから37.6 μ molの**7**を合成することができた。

3　ラージスケール反応と生成物の分離・精製

66 mgの精製TrxHmS、37 μ molの**7**、60 μ molの**8**を用いて200 mlスケールの反応を行った（Fig. 49）。反応生成物の一部をHPLCで分析したところ、8.8 μ molの**8**が生成物Aに、8.1 μ molの**8**が生成物BとCに取り込まれていることがわかった。この生成物を分取HPLCにかけ（Fig. 50）、化合物A、C、Bを分取し、溶媒に溶かして不溶物を除いた後、NMRサンプルとした。（Fig. 49）。

0.1 M Tris-HCl pH 7.5
1 mM EDTA
Total 66 mg TrxHmS59
0.185 mM *p*-Coumaroyl-CoA
0.3 mM Malonyl-CoA　　/ 200 ml
↓ Incubated at 30 ℃ for 1 h (gently shaking)
↓ Added HCl (final conc. 0.5 M)
↓ Extracted with EtOAc (400 ml x 3)
↓ Added Na_2SO_4 and stood overnight
↓ Removed Na_2SO_4 (filtration)
↓ Evap.
↓ Dissolved in 45 % MeOH aq., 1 % AcOH
↓ Removed insoluble materials with TOYOPAK ODS-S
↓ Separated by HPLC
　Column : ODS-PREP (Tosoh, 20 x 250 mm)
　Solvent : 45 % MeOH aq., 1 % AcOH
　Flow rate : 4.0 ml / min
　Temperature : ambient
A, C and B
↓ Evap. and lyophilization
↓ Dissolved in acetone (A) or MeOH (C and B) and filtered
NMR samples

Fig. 49. Large scale reaction and separation by preparative HPLC.

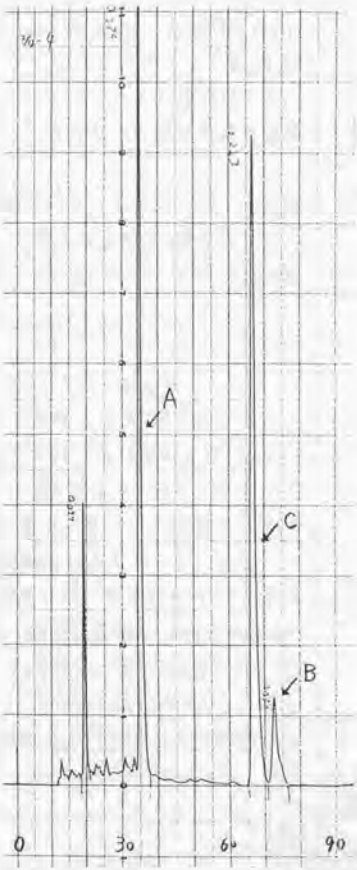


Fig. 50. Separation by preparative HPLC.

4　化合物CとBの構造

化合物Cを重メタノールに溶かし、^{1}H-NMRを測定したところ、Fig. 51のようなスペクトルを与えた。δ = 6.78 (ppm) と 7.40 (ppm) に互いに約8 Hzのカップリングを示す水素2個分のシグナルが見られたことから、パラ置換芳香環の存在が示唆された。δ = 6.56 (ppm) と 7.27 (ppm) の水素1個分のシグナルは互いに約16 Hzのカップリングを示しているので、トランスのオレフィンのシグナルと考えられる。他に見られるシグナルは、δ = 5.85 (ppm)のシングレットのみであった。一方、分離する前の酵素反応生成物のLC-APCIMSをネガティブモードで測定したところ、[M-H]$^-$ = 229という結果が得られた。また、MS/MS、MS^{3}実験により、それぞれm/z=185、143のピークが得られた。次に、trimethylsilyldiazomethaneでメチル化したところ、GC-EIMSでyangonin (**60**)と保持時間とMSが一致した（Fig. 51）。このことから、化合物Cはbis-noryangonin (BNY,**20**)と仮定すると、^{1}H-NMRをFig. 51のようにアサインでき、LC-APCIMSで得られたピークはFig.52に示したフラグメンテーションにより説明できる。α-ピロン環3位のプロトンはα-ピロンとγ-ピロンの互変異性のため溶媒中の重水素と交換されて観測されないものと思われる。

化合物Bは重メタノール中でFig. 53のような^{1}H-NMRスペクトルを与えた。化合物Cのものと似ているが、δ = 5.96 (ppm) と 6.63 (ppm) に見られる水素1個分のシグナルの間のカップリング定数が約12 Hzであることから、20のcis-アイソマー (**61**)であると結論した。

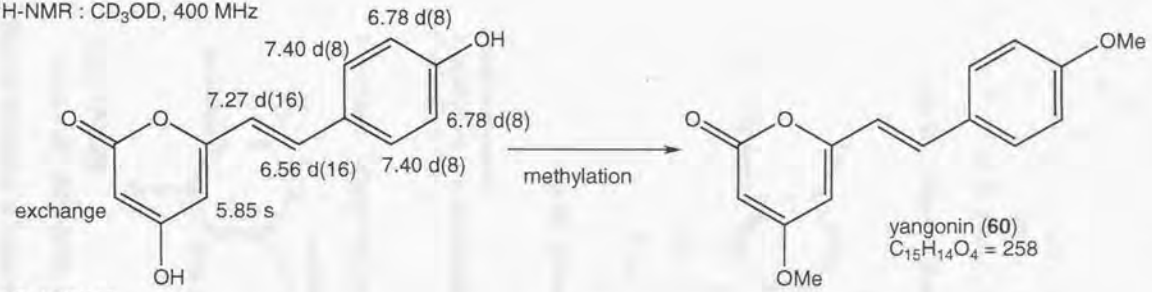
5　化合物Aの構造

化合物Aは重メタノール中でFig. 54のような^{1}H-NMRスペクトルを与えた。δ = 6.81 (ppm) と 7.52 (ppm) に互いに約8 Hzのカップリングを示す水素2個分のシグナルが見られ、δ = 6.74 (ppm) と 7.66 (ppm) の水素1個分のシグナルは互いに約16 Hzのカップリングを示しており、さらにδ = 5.85 (ppm)に水素1個分のシングレットシグナルが見られるため、化合物Cと類似の構造が示唆された。さらに、分離する前の酵素反応生成物のLC-APCIMSを測定すると、MS、MS/MS、MS^{3}において、m/z = 271([M-H]$^-$)、227、185という、化合物Cにおいて見られたピークより42ずつ大きいピークが観測された。以上のデータから、化合物Aは、新規化合物4-hydroxy-6-[4-(4-hydroxyphenyl)-2-oxo-3-butenyl]-2*H*-pyran-2-oneであると結論し、^{1}H-NMRのシグナルのアサインとLC-APCIMSにおけるフラグメンテーションをFigs. 52, 54のように考えた。ピロン環3位及びメチレンのプロトンは溶媒中の重水素との交換のため観測されないものと思われる。この化合物は新規化合物であり、*p*-coumaroyltriacetic acid lactone (CTA lactone, CTAL, **62**)と命名した。

bis-noryangonin (BNY, **20**)

$C_{13}H_{10}O_4$ = 230

1. ^{1}H-NMR : CD_3OD, 400 MHz

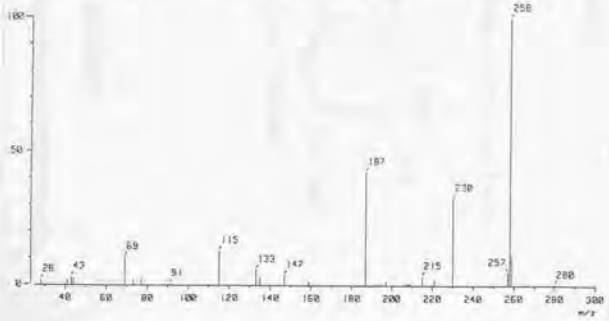


2. LC-APCIMS

m / z = 229 (MS, $[M-H]^-$), 185 (MS/MS), 143 (MS^3)

3. GC-MS

Compound c methylated by trimethylsilyldiazomethane



Authentic yangonin

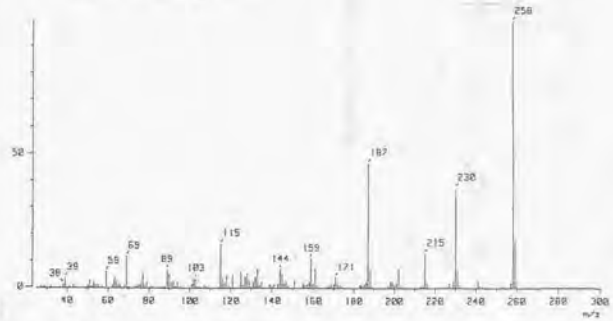


Fig. 51. Structure of compound C.

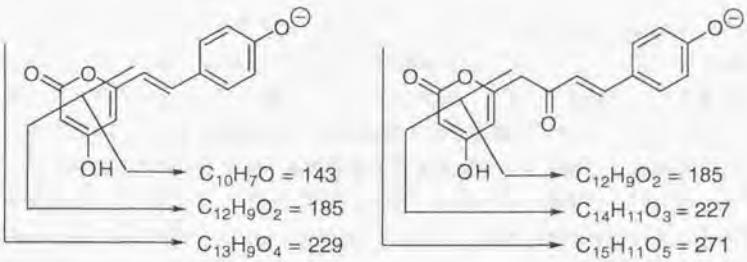


Fig. 52. Fragmentation in LC-APCIMS experiments.

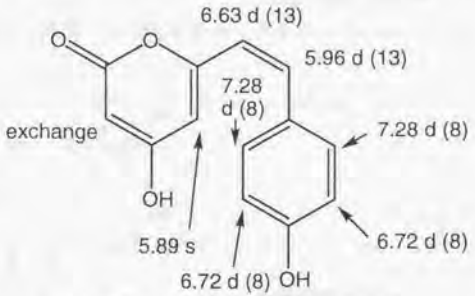
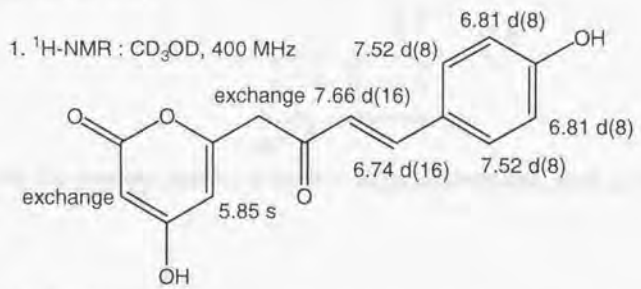


Fig. 53. Structure of compound B

novel compound

4-Hydroxy-6-[4-(4-hydroxyphenyl)-2-oxo-3-butenyl]-2*H*-pyran-2-one

$C_{15}H_{12}O_5$ = 272



2. LC-APCIMS

m / z = 271 (MS, $[M-H]^-$), 227 (MS/MS), 185 (MS^3)

Fig. 54. Structure of compound A. This compound was designated as *p*-coumaroyltriacetic acid lactone (CTAL, **62**).

6　HmSタンパク質の機能

*In vitro*アッセイで検出された**20**、**62**はそれぞれ、*p*-coumaroyltriacetic acid (CTA, **12**)、*p*-coumaroylacetoacetic acid (CAA, **49**)が非酵素的にラクトン化したもので、**61**は**20**が光による異性化を受けて生成したと考えられる。つまり、HmSタンパク質は、主生成物として**12**を、副生成物として**49**を生成させる酵素だと考えられる（Fig. 55）。よって、HmSは閉環反応を全くせず炭素鎖伸長反応のみを触媒して直鎖テトラケチドを遊離する全く新しいタイプのPKSの遺伝子である事が判明した。この酵素を、coumaroyltriacetic acid synthase、CTASと名付けた。炭素鎖伸長反応のみに限定されたPKSがクローニングされたのはこれが初めてである。第1章第1節でも述べたように、CTASはhydramacroside B (**13**)の生合成に関わっている、つまりFig. 12のPKS2であると考えられる。ところで、アマチャCHSの反応生成物中にも**20**と**62**が検出されたが、CHSに**12**を遊離する活性があることを示したのもこれが初めての例である。

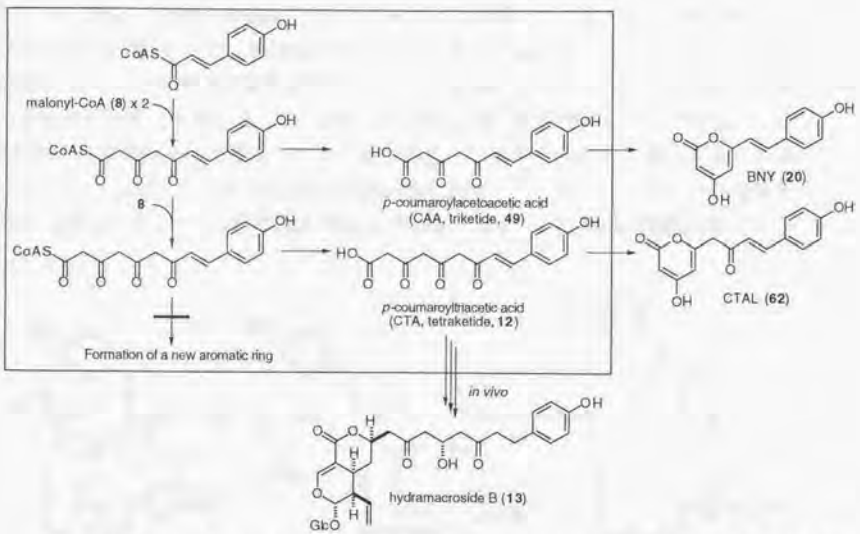


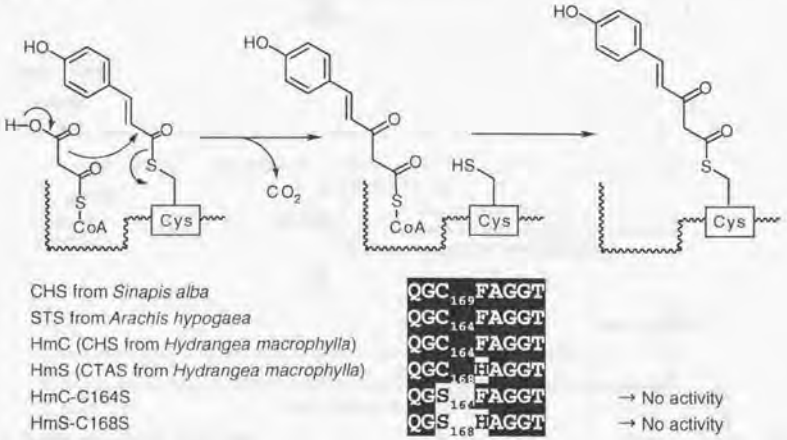
Fig. 55. Enzyme activity of HmS (= coumaroyltriacetic acid synthase, CTAS)

第1節　縮合反応の活性中心

最初の目的である新たなPKS、CTASのクローニングに成功したので、続いて酵素タンパク質の構造と機能の関係を探るべく、数種のミュータント酵素を作製し、その活性を検討した。まず、炭素鎖伸長反応について検討した。

1　縮合反応のメカニズム

Fig. 56には植物PKSの縮合反応のメカニズムについて提唱されているモデルを示す。酵素タンパク質のCysに結合したスターターあるいは伸長鎖と、malonyl-CoA (**8**) との間で、脱炭酸を伴う縮合が起きる、というものである。カラシ（*Sinapis alba*）由来CHSではCys169が、ピーナツ由来STSではCys164が、このCysにあたると考えられている[26]。これはSchröderのグループによって提唱されたモデルである。彼らはCHSとSTSで保存されているCysをすべてAlaまたはSerに交換した。すると上記のCysのミュータントのみが活性がゼロになった。Kindlのグループは、*in vitro*で反応系からスターターを除くと、このCysへのmalonyl基の転移が起きることを示している[27]が、生理的条件ではスターター結合部位として働いていると考えて良いであろう。このCysは、アマチャCTASではCys168に対応している。そこで、この位置をSerに交換したミュータント酵素を作成して活性を測定し、Cys168の役割を検討することにした。



CHS from *Sinapis alba*	QGC$_{169}$FAGGT
STS from *Arachis hypogaea*	QGC$_{164}$FAGGT
HmC (CHS from *Hydrangea macrophylla*)	QGC$_{164}$FAGGT
HmS (CTAS from *Hydrangea macrophylla*)	QGC$_{168}$HAGGT
HmC-C164S	QGS$_{164}$FAGGT → No activity
HmS-C168S	QGS$_{168}$HAGGT → No activity

CTAS catalyzes the condensation reaction in the same mechanism as that of CHS or STS.

Fig. 56. Analyses of mutant proteins. I. The role of the conserved cysteine.

2　PCRによる変異導入

点変異導入はPCRにより、Fig. 57のような手順で行った。また、第3節の実験と同時に行ったので、ここでまとめて述べる。Fig. 58 に示した変異プライマー、HmS-C168Sp及、HmC-C164Sp、HmS-H169Fp及びHmC-F165Hpを合成し、全長を含んだプラスミド、pAKI59（HmS）とpAKI86（HmC）（Table 4）を鋳型に、もう一方のプライマーとして全長のC末に対応するHmS-C、HmC-C（Fig. 20）を用いて1st PCRを行った。PCRによる意図しない変異を少なくするため、鋳型プラスミドの量を1.3 - 1.4 μg / 100 μlと非常に多くし、PCRのサイクル数は8回に抑えた。予想された約0.7 kbpのフラグメントが増幅されたので、これを精製し、2nd PCRに使用した。2nd PCRでは、このうちアンチセンス鎖がプライマーとして機能し、全長のN末に対応するセンスプライマーとともに、変異プライマーにデザインされた変異を持つ全長フラグメントを増幅するはずである。なお、条件は1st PCRと同じである。

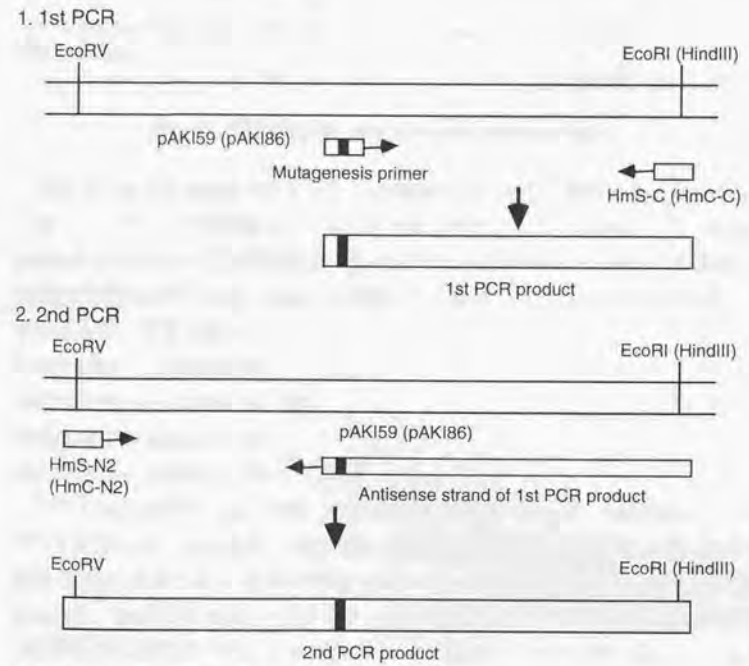


Fig. 57. Mutagenesis by PCR.

```
 481                              G   C                              522
5' CTT ATG ATG TAC CAA CAG GGG TGC CAC GCG GGT GGA ACC GGC 3'
                                 X   X
      5'-G ATG TAC CAA CAG GGA TCC CAC GCG GGT GGA AC-3'
HmS-C168Sp                      Bam HI
                                 G   S  33 mer GC:19/31 61%

 469                              G   C                              510
5' CTC ATG ATG TAC CAG CAA GGT TGC TTT GCC GGT GGC ACG GTC 3'
                                 X   X
      5'-G ATG TAC CAG CAA GGA TCC TTT GCC GGT GGC AC-3'
HmC-C164Sp                      Bam HI
                                 G   S  33 mer GC:18/31 58%

 490                  C   H   A   G                                  531
5' TAC CAA CAG GGG TGC CAC GCG GGT GGA ACC GGC CTT CGT TTG 3'
                     XX      X   X
    5'-CAA CAG GGG TGC TTC GCC GGC GGA ACC GGC CTT C-3'
HmS-H169Fp                   Nae I
                     C   F   A   G  34 mer GC:22/30 73%

 478                  C   F   A   G                                  519
5' TAC CAG CAA GGT TGC TTT GCC GGT GGC ACG GTC CTC CGT TTA 3'
                     XX      X
    5'-CAG CAA GGT TGC CAT GCC GGC GGC ACG GTC CTC-3'
HmC-F165Hp                   Nae I
                     C   H   A   G  33 mer GC:21/30 70%
```

Fig. 58. Primers for site-directed mutagenesis.

予想通り約 1.2 kbpのフラグメントが増幅されたので、精製してpT7Blue(R)にサブクローニングし、それぞれ3クローンずつ選んでプラスミドを抽出した。Mutagenesis primer中にデザインした制限酵素（HmS-C168Sp及びHmC-C164Sp：*Bam*HI、HmS-H169Fp及びHmC-F165Hp：*Nae*I）を利用して、変異の入ったインサートを持つクローンを選んだ。以下の通り。

HmS-C168Sp : pAKI363, 364

HmC-C164Sp : pAKI366, 367, 368

HmS-H169Fp : pAKI370, 371

HmC-F165Hp : pAKI372, 373

このうちpAKI363、366、370、371、372及び373についてF、R両側からシークエンシングを行った。その結果、pAKI363、366、371及び373にはプライマーに由来する変異以外の意図しない変異が存在しないことが判明した。しかし、このうちpAKI363、366及び373はN末プライマーあるいはC末プライマー部分に欠失が存在することも明らかになった。この3者については発現ベクターpET-32a(+)への組み込みが不可能なので、pAKI59やpAKI86と一部を交換することにより変異タンパク質発現プラスミドを構築することにした。Fig.59に示したように、pAKI59の*Eco*RV-*Pma*CIフラグメントをpAKI363のものに置き換えることによってpAKI387（発現タンパク質はHmS-C168S）を、pAKI86の*Eco*RV-*Eco*RIフラグメントをpAKI366とpAKI373の1.1

kbp *Eco*RV-*Eco*RIフラグメントと入れ替えることによりそれぞれpAKI381（HmC-C164S）とpAKI385（HmC-F165H）を構築した。pAKI371については、全長を含んだ1.2 kbp *Eco*RV-*Eco*RIフラグメントをpET-32a(+)の同じサイトに組み込むことによりpAKI383（HmS-H169F）を構築した。

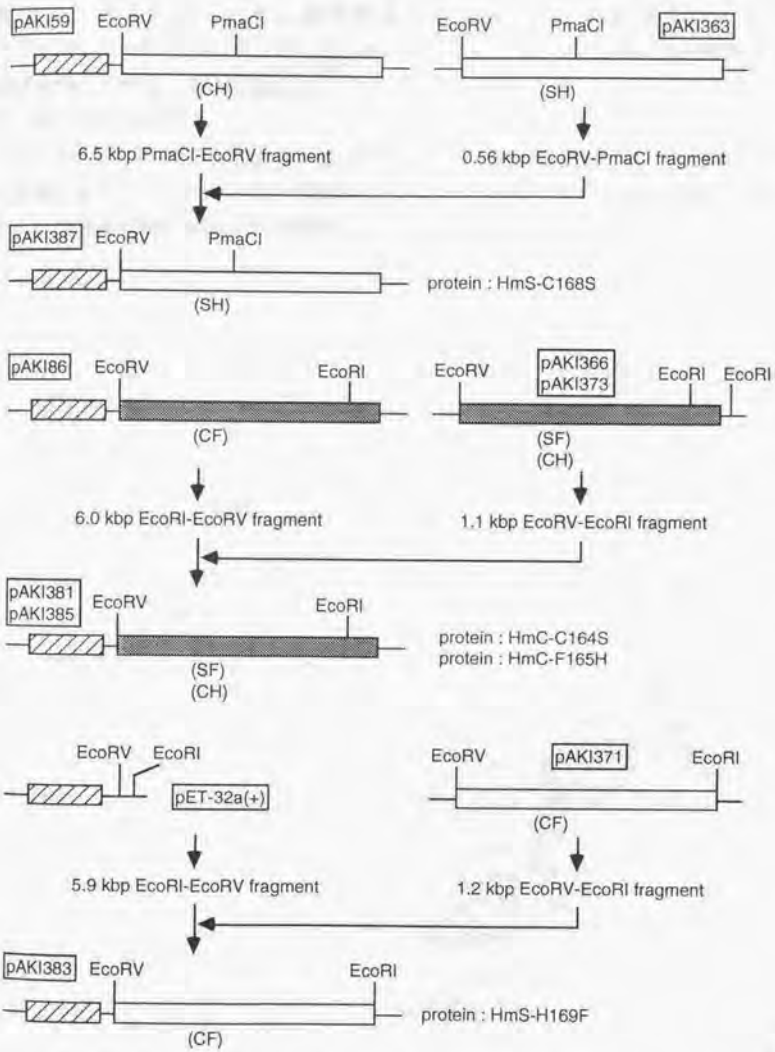


Fig. 59. Construction of plasmids for mutant protein expression.

これらのプラスミドをBL21(DE3)pLysSに導入、タンパク質発現誘導を行い、ミュータントタンパク質を含んだcrude extractを得た。十分な可溶性タンパク質を得るためには、IPTG 添加後の培養を15℃で行う必要があった。なお、第2章で用いた宿主は発現のオンオフのコントロールがより厳密に行えるBL21(DE3)pLysEであったが、HmSやHmCタンパク質は大腸菌に対する毒性が低いと思われること、及び20時間以上に及ぶ培養中の菌の安定性を考え、リゾチーム生成量の少ないBL21(DE3)pLysSを用いることにした。コントロールであるpET-32a(+)、pAKI59及びpAKI86もこの宿主に導入し直した。

3 酵素活性の検討

HmC-C164S、HmS-C168Sとも、全く活性を示さなかった（Fig. 56）。CHSやSTSと同様、新たにクローニングした酵素であるCTASにおいても、このCys168がスターターと伸長鎖の結合部位として機能していると思われる。

次に、CHS、STSにおいて閉環反応に関与する構造、あるいは、CTASにおいて閉環を妨げている構造について検討することにした。HmC（CHS）とHmS（CTAS）を比較したとき、HmCの配列のうち、HmSと異なる部分のいずれかが閉環反応に関わっているか、あるいは逆に、HmSの配列のうちHmCと異なる部分のいずれかが閉環を妨げていると思われる。特に興味深いのは、CHS/STSコンセンサスとHmSの間で相同性の無い13ヶ所（第1章第3節参照）である。

1　キメラタンパク質の作成

HmC、HmSのORFを3個のregion に分け、制限酵素を利用して組み替えてキメラタンパク質を作成し、その活性を検討することにした。キメラの活性がHmC型（CHS ）かHmS型（CTAS）かに着目すれば、閉環に関わる領域を特定できると考えた。

部位特異的変異導入により制限酵素サイトを導入し、導入したサイトを利用してキメラタンパク質を設計することにした。変異導入はUnique Site Elimination法を用いて行い、発現用プラスミドであるpAKI59（HmS）とpAKI86（HmC）に直接導入した。用いたプライマーの配列はFig. 60の通り。プライマーは5'リン酸化したものを使用する必要があったので、Mut-HmS174pとMut-HmS290pについてははじめからリン酸化したものを合成し、Mut-HmCl 74LとMut-HmC2 86Lについては T4 polynucleotide kinaseによりリン酸化した。変異導入はほぼキットのマニュアル通りに行ったが、pAKI59への*Nru*Iサイトの導入はMut-HmS174pの濃度を100倍にする必要があり、pAKI59への*Stu*Iサイトの導入は、Sel-pETpの濃度を1/10に、Mut-HmS290pの濃度を10倍にする必要があった。いずれもマニュアル通りの濃度では十数個のクローンをとってもすべてSel-pETpのみがアニールして生成したプラスミドになってしまった。上記のような条件検討の後、最終的にpAKI284（pAKI59 + *Nru*I, protein : HmS-L177F）、pAKI284（pAKI59 + *Stu*I, protein : HmS）、pAKI209（pAKI86 + *Nru*I, protein : HmC-L173F）及びpAKI198（pAKI86 + *Stu*I, protein : HmC）を得ることができた（Fig. 61）。*Nru*Iサイトの導入はアミノ酸の変異を伴うものであったので、これらのプラスミドをBL21(DE3)pLysSに導入し、変異タンパク質を発現させてその酵素活性を検討した。その結果、ミュータントタンパク質であるHmS-L177FとHmC-L173Fはともに親であるHmS、HmCの活性を維持していた。

これらの変異導入プラスミドを組み替えて、キメラ発現用プラスミドを構築した。Fig. 61に示すように、pAKI284とpAKI209の間で*Eco*RV-*Nru*Iフラグメントを交換することによりpAKI317（protein : SC178）とpAKI329（protein : CS174）を構築した。同様に、pAKI286とpAKI198からpAKI322（protein : SC290）とpAKI325（protein : CS286）を構築した。これらのプラスミドをBL21(DE3)pLysSに導入し、第1節の

ミュータントと同様、培養温度15℃の条件でIPTGによる発現誘導を行い、crude extractを調製した。

(1) Mutagenesis primers :

1) Mut-HmS178p

```
 515                      L   A   K                          555
5' GA ACC GGC CTT CGT TTG GCC AAG GAT CTC GCG GAG AAC AAC 3'
                          X   X
    5'-CC GGC CTT CGT TTC GCG AAG GAT CTC GCG GAG-3'
                         Nru I
                         F   A   K  32 mer GC:19/30 63%
```

2) Mut-HmC174L

```
 501                        L   A   K                        540
5' T GGC ACG GTC CTC CGT TTA GCC AAA GAC CTA GCT GAG AAC 3'
                           X   X
    5'-C ACG GTC CTC CGT TTC GCG AAA GAC CTA GCT GAG-3'
                          Nru I
                          F   A   K   34 mer GC:18/32 56%
```

3) Mut-HmS290p

```
 852                    Hind III                             892
5' G AAC ACA TTG GTT GAA GCT TTC ACT CCA ATA TTA ATG GAT A
                        X   X
    5'-C ACA TTG GTT GAG GCC TTC ACT CCA ATA TTA ATG G-3'
                         Stu I
                        E   A   F   35 mer GC:13/33 39%
```

4) Mut-HmC286L

```
 837                        E   A   F                        879
5' T GAG AAG AGT CTA GTT GAG GCA TTC CGC CCC TTG GAC ATC TCT 3'
                               X
    5'-G AAG AGT CTA GTT GAG GCC TTC CGC CCC TTG GAC ATC-3'
                          Stu I
                          E   A   F   37 mer GC:20/36 56%
```

(2) The selection primer :

Sel-pETp

```
1010                  Sph I                    981
5' CG CAA GGA ATG GTG CAT GCA AGG AGA TGG C 3'
                      XX
   5'-CAA GGA ATG GTG CTA GCA AGG AGA TG-3'
                     Nhe I
                        26 mer GC:13/24 54%
```

Fig. 60. Primers for site-directed mutagenesis (Unique site elimination method).

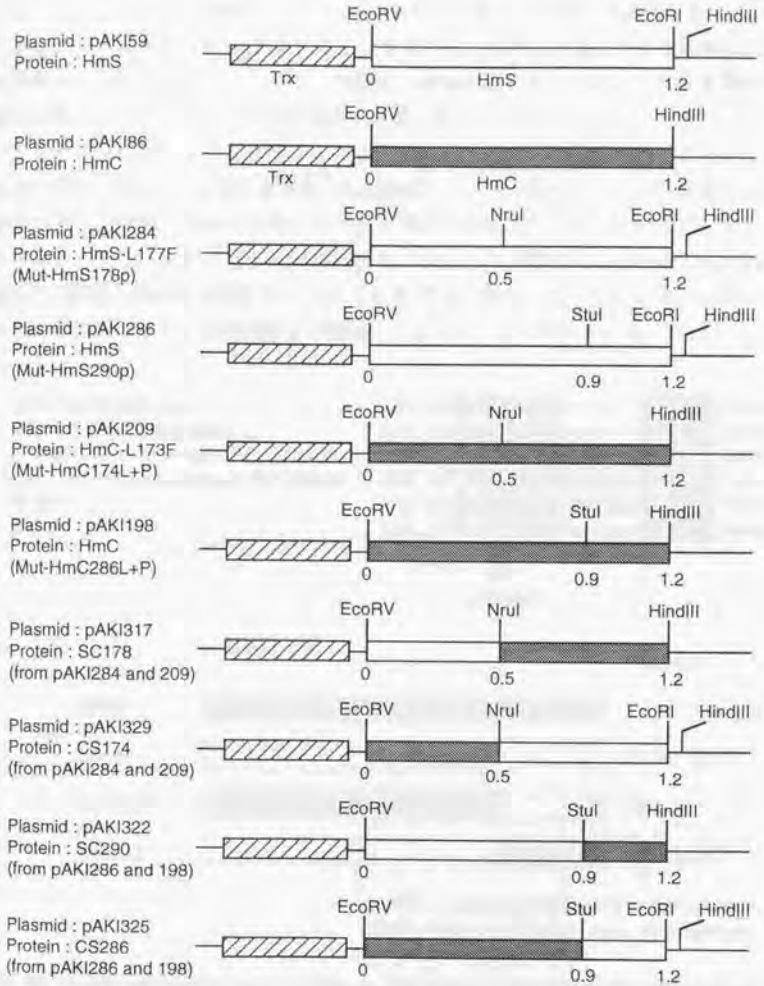


Fig. 61. Construction of plasmids for chimeric protein expression

2　キメラタンパク質の活性

アッセイの結果、CS174、SC178、CS286は全く活性を示さなかった。Schröderのグループによるカラシ CHSとピーナツSTSのキメラタンパク質も不活性であり[28]、2 基質の間の縮合反応を3回行い、さらに閉環を行うものもある、という複雑な反応を触媒するCHSスーパーファミリーの場合、活性のあるキメラタンパク質を作成するのは難しい、ということを改めて示す結果となってしまった。

キメラSC290は、CTAS活性を示した（Fig. 62）。SC290が閉環産物を生産せず、HmSと同じ活性を示したことから、Ala290よりC末の部分と、そこに含まれる、HmSの最大の特徴であるインサーションが原因で閉環が起きないわけではないと考えられる。また、このミュータントをHmC（CHS）と比較すると、HmCのAla286よりN末の部分をHmSに交換したことにより閉環活性を失ったことになり、CHSにおいて閉環に関与している構造がこの領域に存在することが明らかになった。

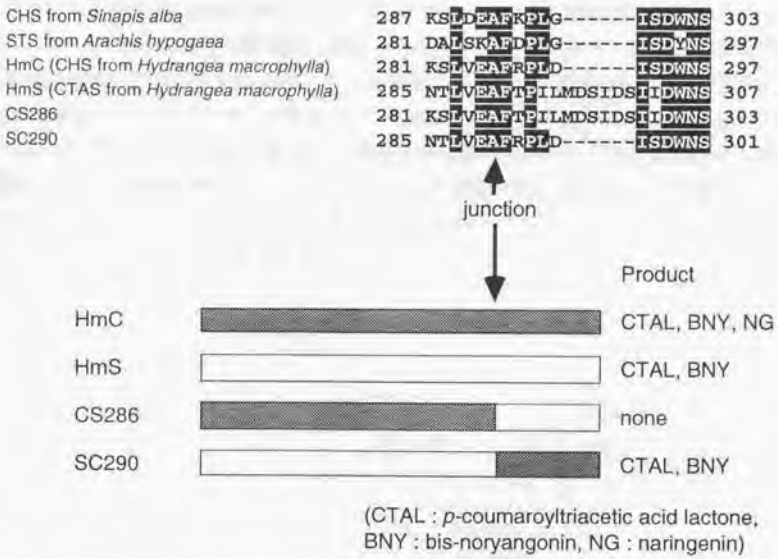


Fig. 62. Analyses of mutant proteins. II. The role of characteristic insertion of coumaroyltriacetic acid synthase.
Lack of insertion proved to be less important for cyclization.
Critical amino acid residues for cyclization exists in the N-terminal region of CHS.

1　活性中心Cysに続くアミノ酸残基

次に、活性中心Cysの周辺に注目した。このCysの直後のアミノ酸は、全てのCHSにおいてPhe、STSではPheまたはTyrであるのに対し、閉環を行わないCTASにおいてはHisである。また、*Gerbera hybrida*のCHS2クローンは、大腸菌で発現させたときにCHS活性を示さず、benzoyl-CoAを基質に未同定の生成物を合成するが、この興味深いクローンではこの位置がAlaである[29]。

2　変異導入

そこで、この位置のアミノ酸残基の酵素活性に対する役割を検討するため、部位特異的変異導入により、CHSとCTASの間でこの位置のアミノ酸を交換した、HmC-F165H、HmS-H169Fを作成した。変異導入は、第1節のミュータントと同時に行った。

3　ミュータントの活性

アッセイの結果をFig.63に示す。まず、HmC-F165Hの活性は野生型と変わらなかった。しかし、HmS-H169Fは野生型と異なる活性を示した。期待する新たな閉環産物の生成は検出されなかったものの、トリケチドであるbis-noryangonin (**20**)の生成量が2.5倍に増加し、テトラケチドであるCTA lactone (**62**)の生成量は1/4に減少した。CTASにおいては、His169が活性中心の構造維持に関与していると思われる。そして変異によりその構造が変化し、トリケチドの加水分解の反応速度が3回目の縮合の反応速度より大きくなったものと思われる。PheはHisよりも多少かさ高いので、活性中心のポケットが小さくなってしまったのかもしれない。

CHS from *Sinapis alba*
STS from *Arachis hypogaea*
STS from *Vitis vinifera*
HmC (CHS from *Hydrangea macrophylla*)
HmS (CTAS from *Hydrangea macrophylla*)
HmC-F165H
HmS-H169F



Protein	Product (pmol / assay) CTAL	BNY	NG
HmC	165	46	256
HmS	239	230	0
HmS-H169F	62	562	0

(CTAL : *p*-coumaroyltriacetic acid lactone,
BNY : bis-noryangonin, NG : naringenin)

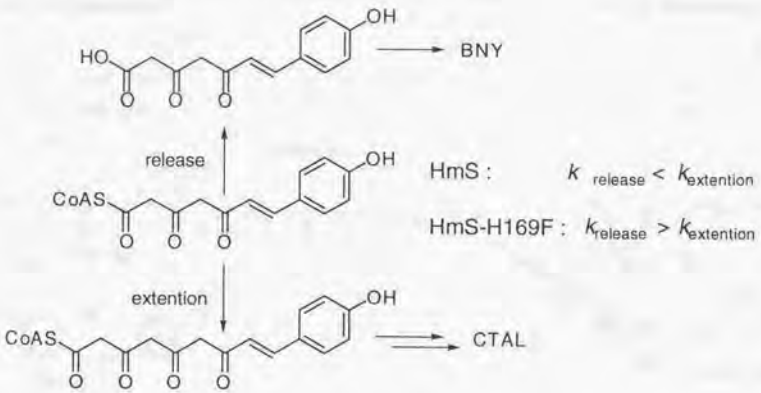


Fig. 63. Analyses of mutant proteins. III. The role of the residue next to the active site cysteine

第4章　CHSとSTSの交叉反応

1　縮合反応の副生成物

第3章で述べたように、アマチャCHSの機能を検討している過程で、副生成物としてbis-noryangonin (**20**)とCTAL (**62**)を検出した。これが植物PKSの一般的な性質なのかどうか検討するため、大腸菌で発現させたクズ由来のCHSとピーナツ由来のSTSについて検討した。その結果、いずれの酵素もこれらの副生成物を生成させることが明らかになった（Fig. 64）。Fig. 65にはピーナツSTSの結果を示した。pET-3dに組み込んで大腸菌で発現させ、イオン交換クロマトグラフィーにより部分精製[22]したSTSの反応生成物をHPLCで分析した。主生成物であるresveratrol (**4**)の他、**20**と**62**の生成が認められる。STSがstilbene以外の生成物を生成させることを示したのはこれが初めての例である。これらはいずれも縮合反応の副生成物であり、序論で述べたように、C2単位の伸長が段階的に起きることを実証する結果といえる。同様に、閉環反応のメカニズムを反映した副生成物もあるのではないかと考え、さらに反応生成物を精査し、他の副生成物の検出を試みた。

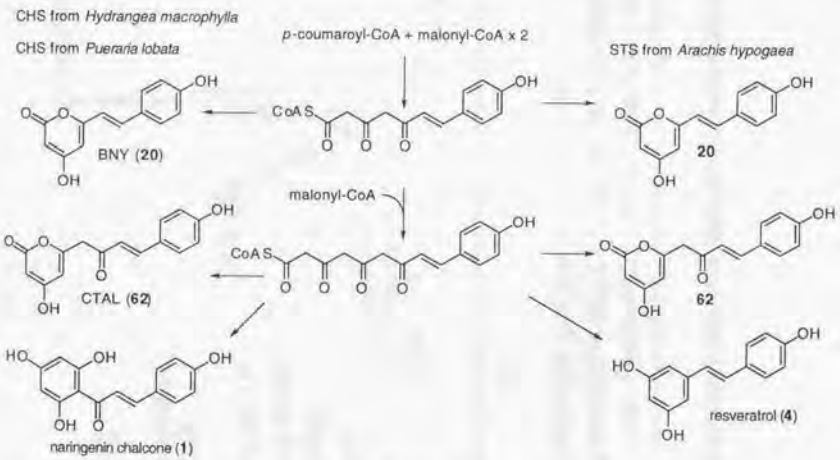
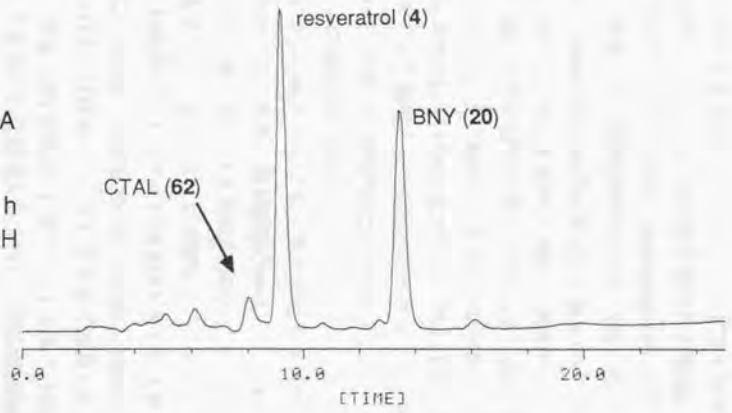


Fig. 64. Intermediates and by-products of chalcone and stilbene synthases

Assay procedure

0.1 M Tris-HCl pH 7.5
1 mM EDTA
0.19 mM *p*-Coumaroyl-CoA
0.30 mM Malonyl-CoA
Enzyme
↓ Incubated at 30 ℃ for 1 h
↓ Stopped by adding AcOH
↓ Extracted with EtOAc
↓ Analysed by HPLC



HPLC condition

Column : Tosoh ODS-80Ts (4.6 mm I. D. x 150 mm)
Solvent : Linear gradient of A (H_2O, 1 % AcOH) and B (MeOH, 1 % AcOH), 45 % → 49 % B
Flow rate : 0.6 ml / min, Temperature : 40 ℃, Detection : UV254

Fig. 65. Formation of bis-noryangonin and *p*-coumaroyltriacetic acid lactone by stilbene synthase.

2 ピーナツSTSのCHS活性

まず、ピーナツSTS反応生成物を分析した。Fig. 66には部分精製STS[22]の反応生成物をメチル化してGC-MSで分析した結果を示した。驚くべきことに、RT = 15.4 minに、naringenin (**58**)のジメチル体を検出した。標品と保持時間、MSとも良く一致している。

次に[2-^{14}C]malonyl-CoA (**8**)を基質にして反応を行い、キャリアー希釈法による生成物の確認を試みた。まず、ピーナツSTSを発現させた大腸菌よりSTSを精製した。STS発現プラスミドpET-3d-STSを持った大腸菌BL21(DS3)pLysE 300 mlより、硫安沈殿、DEAE TOYOPEARL、Hydroxyapatiteにより、SDS-PAGE上ほぼ単一バンドになるまで精製した。精製過程をまとめてTable 7に示した。精製STS 800 μlを用いて、1 mM *p*-coumaroyl-CoA (**7**) 100 μl、1.76 mM [2-^{14}C]**8** 100 μl (37.0 KBq)を基質とした酵素反応を行い、反応生成物を HPLC で解析し、naringenin (**58**)、resveratrol (**4**)のピークを分取して放射活性を測定したところ、**58** の放射活性は1441.4 dpm、**4**は63679.3 dpmであった。また**58**のフラクションを分取して用いてcarrier dilution analysis を行った。結果をFig. 60の表に示す。非活性がほぼ一定となったので、この副生成物が**58**であることを確認した。HPLCのフラクションの放射活性より、本来のSTS活性を100 %とした時、CHS活性は2.3 %であった。

3 クズCHSのSTS活性

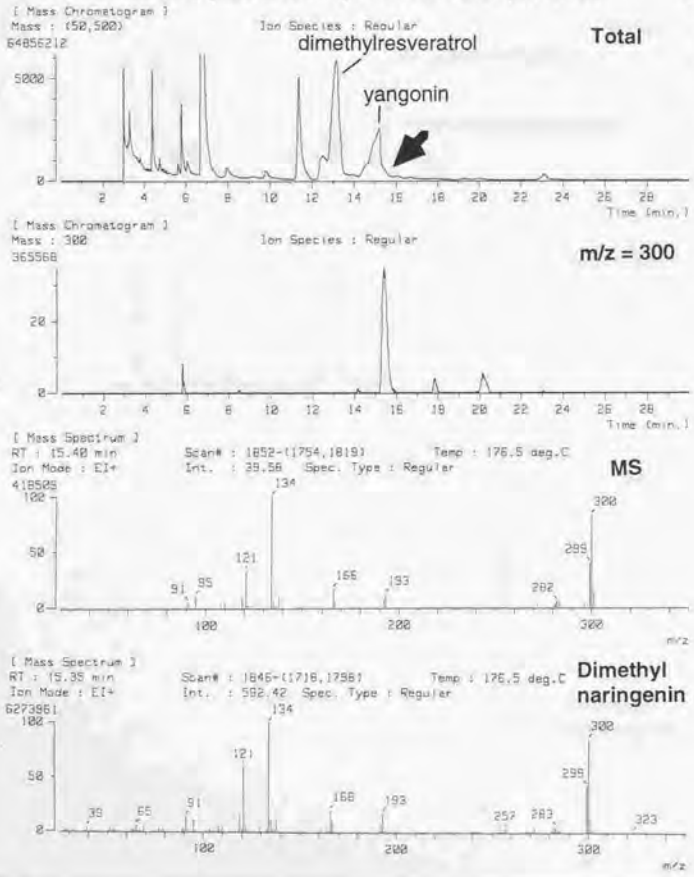
次にクズCHSについても反応生成物を精査することにした。すると、同様にSTS活性を示した。まず、部分精製CHS[22, 24]の反応生成物をメチル化してGC-MSで分析したところ、**4**のジメチル体を検出した（Fig. 67）。続いてSTS同様キャリアー希釈法を試みた。まず、STSと同様に、クズCHSを発現させた大腸菌よりSTSを精製した。STS発現プラスミドpET-3d-STSを持った大腸菌BL21(DS3)pLysE 300 mlより、硫安沈殿、DEAE TOYOPEARL、Hydroxyapatite、クロマトフォーカシングにより、SDS-PAGE上ほぼ単一バンドになるまで精製した。精製過程をまとめてTable 8に示した。精製 CHS 800μl を用いて、1 mM **7** 100μl、1.76 mM [2-^{14}C]**8** 100μl (37.0 KBq) を基質とした酵素反応を行い、反応生成物を HPLC で解析したところ、**58**のピークの放射活性は 116123.2 dpm、**4**のピークは 3124.4 dpm であった。**4** のフラクションを分取して carrier dilution analysis を行ったところ、表に示すように非活性が一定となり、生成物が**4**であることを確認した。CHSによるSTS活性は、CHS活性の2.7 %であった。

4 交叉反応とその要因

以上のように、CHSとSTSにおいて交叉反応が生じていることが初めて証明された（Fig. 68）。この交叉性が何に基づくものなのかは現段階では不明であるが、活性部位構造の柔軟さ、あるいは、タンパク質合成時にCHS型、STS型の2種のコンフォーマーが生成している可能性などが考えられる。いずれにしても、第5章で述べるように、CHSとSTSが同じ起源から進化してきたことの一つの証拠と考えられる。

Fig. 66. Formation of Naringenin Chalcone in the Stilbene Synthase Reaction

GCMS analysis of methylated reaction products



Carrier dilution analysis of [^{14}C]labeled reaction products

	solvent	radioactivity (dpm/ μ mol)
1st	MeOH	120.1
2nd	MeOH	106.5
3rd	hex-AcOEt	101.6
4th	hex-AcOEt	111.9

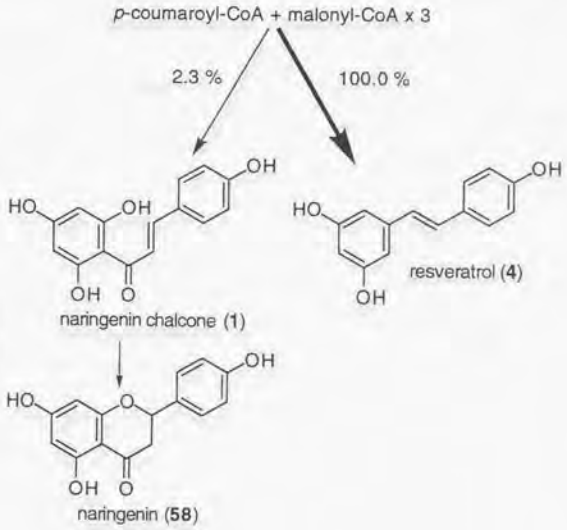
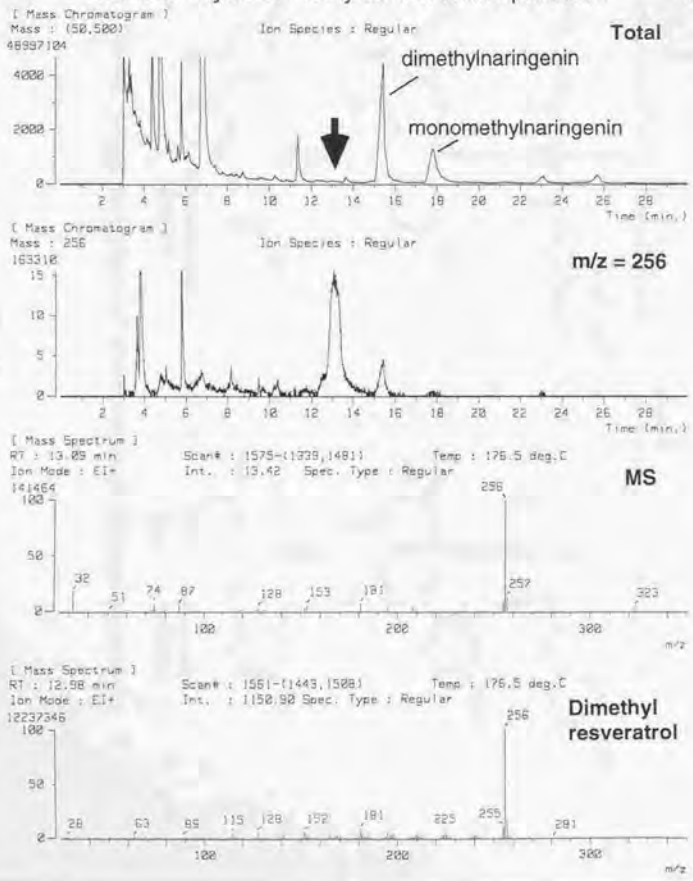


Fig. 67. Formation of Resveratrol in the Chalcone Synthase Reaction

GCMS analysis of methylated reaction products



Carrier dilution analysis of [^{14}C]labeled reaction products

	solvent	radioactivity (dpm/ μ mol)
1st	MeOH	157.3
2nd	MeOH	139.8
3rd	hex-AcOEt	134.1
4th	hex-AcOEt	128.4

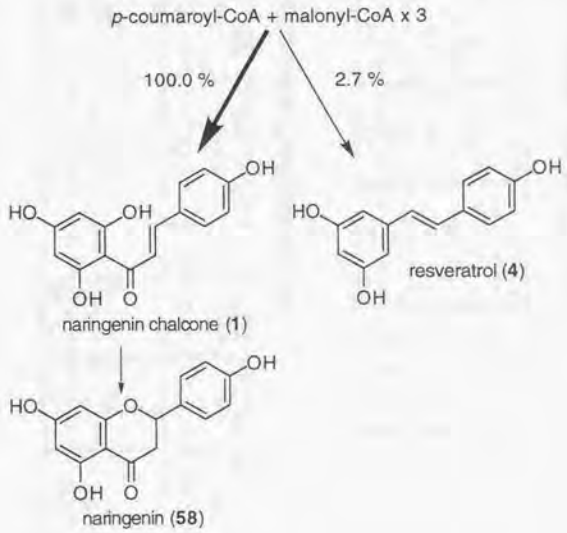


Table 7. Purification procedure of STS

	Total protein (mg)	Total activity (pkat)	Specific activity (pkat/mg protein)	Recovery (%)	Fold
Crude Ext.	9.98	35.0	3.51	100	-
Ammonium sulfate precipitation (40-80%sat.)	4.13	7.32	1.77	20.1	0.50
DEAE	1.34	13.6	10.2	38.9	2.90
Hydroxyapatite	0.31	11.6	37.3	33.0	10.6

Table 8. Purification procedure of CHS

	Total protein (mg)	Total activity (pkat)	Specific activity (pkat/mg protein)	Recovery (%)	Purification (fold)
crude ext.	28.8	35.7	1.20	100	-
Ammoniumsulfate precipitation (30-80%)	19.5	4.50	0.23	13.0	0.20
DEAE	4.50	9.10	2.00	25.0	1.70
Hydroxyapatite	1.70	6.50	3.80	18.0	3.20
Chromatofocusing	0.42	4.20	10.0	12.0	8.30

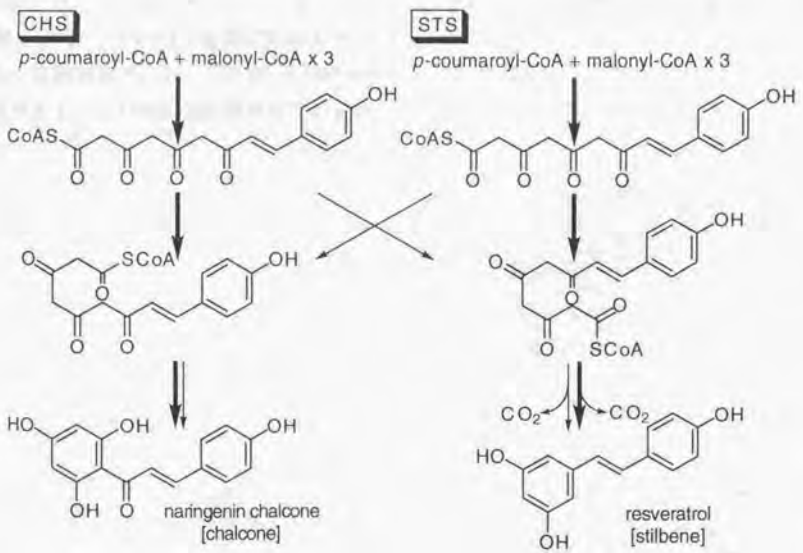


Fig. 68. Cross reactions of chalcone and stilbene synthases

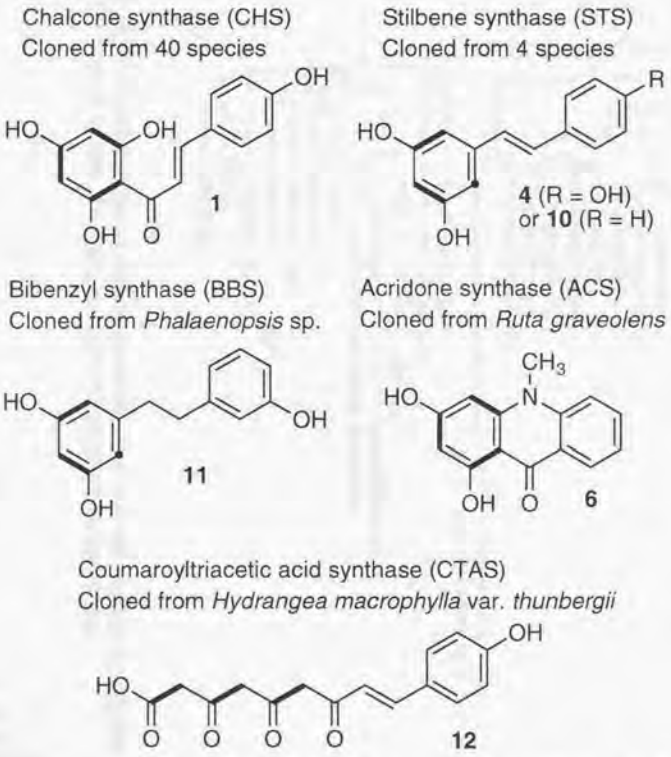
第5章　CHSスーパーファミリーの分子進化

第1、2章では、新たな酵素CTASのクローニングに成功してその特殊な一次構造を明らかにし、第2、4章ではCHS、STSにも直鎖テトラケチドを遊離させる活性があることを示し、さらにCHSとSTSの反応の交叉性を発見した。これらの知見を、分子進化の観点から考えてみる。

今回クローニングされたアマチャCTASも含めて、CHSスーパーファミリーのメンバーを整理してみる（Fig. 69）。同じクマロイルをスターターにし、閉環様式の異なるのがCHS、STS、CTASで、閉環がSTS型でジヒドロ型のスターターを用いるのがBBSで、C6-C1スターターを使ってCHS型の閉環を行うのがACSである。

スーパーファミリーのうち主なものをもとに系統樹を作成した（Fig. 70）。CHSとして報告されている配列の多くは機能が証明されていない。機能が明らかなもののみ、酵素名を記した。矢印は今回得られた配列である。この系統樹から、CTASはACSやBBSと進化的に近いことがわかる。また、STSは独立のグループを作っていないこともわかる。これらのことから、進化の道筋を次のように考えることができる（Fig. 71）。

まず、スーパーファミリーの先祖はCTASと同じく閉環能力のない酵素であったと思われる。そして、CHS、STSの直鎖テトラケチド遊離活性は、先祖の活性を完全には失っていないことを示しているのであろう。この先祖型酵素が、まず閉環活性を獲得し、C6-C1を基質にするもの、ジヒドロ型を基質にするものが現れて分化し、比較的最近になってCHSとSTSの分化が起こったと考えられる。CHSとSTSの交叉反応も、分化が完全に行われていないことの現れであると思われる。



Identity (amino acid level)

	AhSTS	PsBBS	RgACS	HmCTAS
PlCHS	78	64	69	71
AhSTS		60	62	65
PsBBS			63	61
RgACS				65

PlCHS : CHS from *Pueraria lobata* (389 AA)
AhSTS : STS from *Arachis hypogaea* (389 AA)
PsBBS : BBS from *Phalaenopsis* sp. (390 AA)
RgACS : ACS from *Ruta graveolens* (391 AA)
HmCTAS : CTAS from *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii* (399 AA)

Fig. 69. Members of the CHS superfamily which have already been cloned

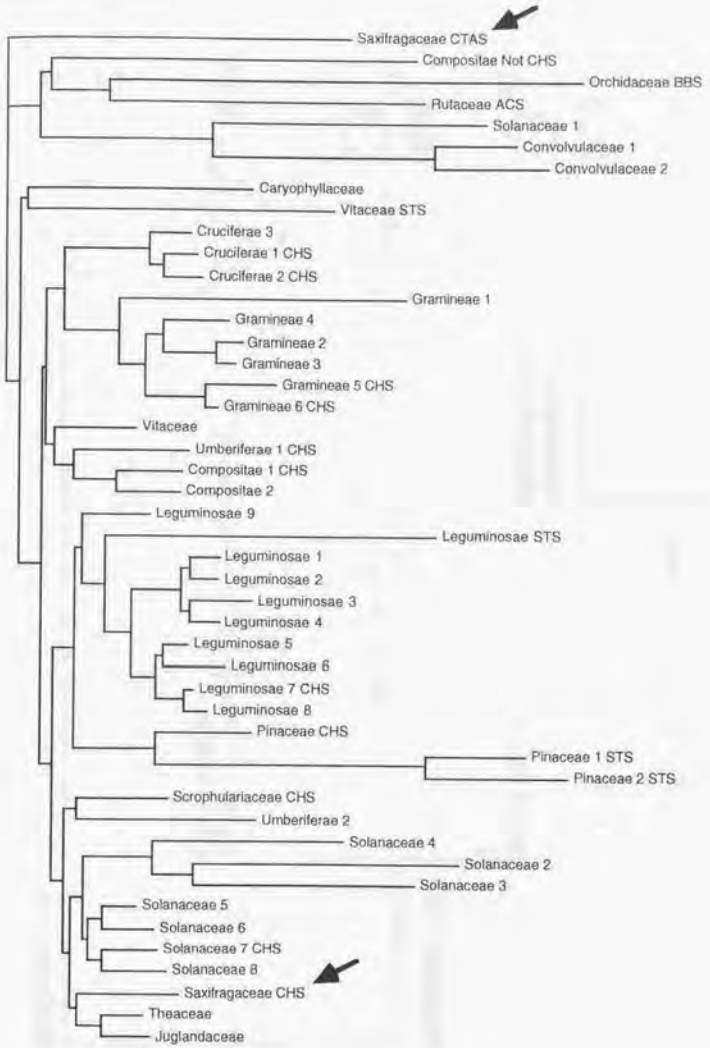


Fig. 70. Phylogenetic tree of CHS superfamily. The tree was created by neighbor-joining method. Labels are family, number and function if demonstrated.

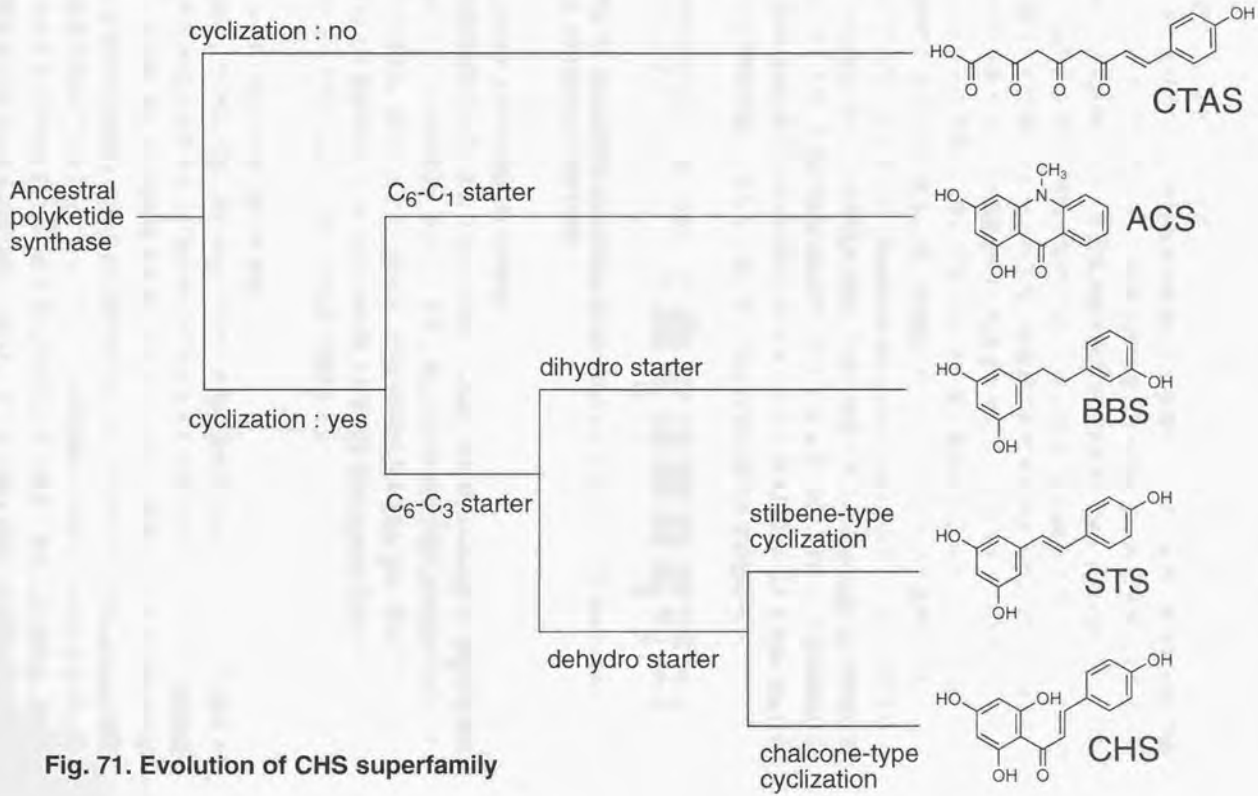


Fig. 71. Evolution of CHS superfamily

1　PCRによるクローニング

私が今回採用した、植物PKSのPCRによるクローニングの長所と短所について述べる。ハイブリダイゼーションを用いた方法と比べたとき、最大の長所はスピードである。PCR産物の大きさを電気泳動で確認できるので、false positiveのクローンを拾う可能性が少ない。実際今回のクローニングでも、core部分のクローニングにおいて選択した33個のクローンのうち、31個が「あたり」であった。そして、RNAの抽出から全長クローンの増幅まで1ヶ月あまりで行うことができた。短所は、プライマーのデザインが悪い、特にプライマーの3'末の配列が不適当だとフラグメントの増幅が起こらない点である。が、今回用いたプライマーはかなり汎用性が高く、これらを用いて、コガネバナ（*Scutellaria baicalensis*）のCHSのクローニングにも成功している[30]。また、この研究を開始した後で発表された*Phalaenopsis* sp.のBBSの配列は、プライマーCHS-174Sと3'末がマッチしておらず（Fig. 72）、（今回PCRに用いた耐熱性DNAポリメラーゼが3'エキソヌクレアーゼ活性を持つタカラEx-Taqだとは言え）増幅は難しいかもしれないが、CHS-112Sを用いれば問題はない。

```
Phalaenopsis sp. BBS :  5'-GCC AAG TGT CTT GCT GAG AGC CG-3'
CHS-174S :              5'-GCI AAA GAT TTI GCI GAA AAT AA-3'
                           G   C     C   C
```

Fig. 72. Nucleotide sequences of bibenzyl synthase from *Phalaenopsis* sp. and primer CHS-174S.

2　CTASのアマチャ細胞内での役割

第2章第3節でも述べたように、CTAS（= HmS）はhydramacroside B (**13**)の生合成に関わっているのは間違いない。つまり、Fig. 12で存在を予想したPKS2である。ただ、CTASは*in vitro*アッセイにおいて、CHSやSTSよりもCAA (**49**、検出されるのはBNY)の生成量が多い。CTA (**12**)と**49**の両方を合成するbifunctionalな酵素なのかもしれない（つまり、Fig. 12においてPKS2 = PKS3）。

3　スチルベンカルボン酸の生合成

当初は、アマチャ葉におけるポリケタイド化合物の存在比から言って、今回のクローニングによってメインに得られるクローンとしてはスチルベンカルボン酸合成酵素、つまり Fig. 12 のPKS1を予想していた。しかし、実際に得られたクローンはCHS (= HmC)とCTAS (= HmS)の２種のみであった。アマチャなどの*Hydrangea*属独特の成分であるアリルジヒドロイソクマリンの前駆体であるスチルベンカルボン酸はどのようにして生合成されるのであろうか？まず、容易に考えられるのは、PKS1に相当するクローンはあるのだが、今回は、アマチャ葉を採取した時期が悪い、あるいは用いたプライマーとマッチしない、などの理由で増幅されなかった、という

仮説である。しかし、私は次のような仮説も成立し得ると考える（Fig. 73）。

アマチャ中のPKSはもともとCHSとCTASしか存在しない。CTASにより放出された**12**が何らかの閉環酵素によって閉環を受けてスチルベンカルボン酸**14**が生成する。**12**が還元酵素により還元を受けることにより、あるいはトリケチド**17**がCTASに結合したまま還元を受け、さらに伸長が起きることにより生成した還元型テトラケチド**64**が同じ閉環酵素により閉環されて**30**が生成する。

*Hydrangea*属独特の成分であるアリルジヒドロイソクマリンの生合成は非常に興味深く、今後ぜひ明らかにしていきたい。良い材料を選び、まず植物体の粗抽出液に酵素活性を検出することから始める必要があるだろう。また、*Hydrangea*属以外の植物にも、Fig. 74に示したようなスチルベンカルボン酸が知られている[31、32、33]。これらを用いても興味深い結果が得られるのではないだろうか。

なお、スチルベンカルボン酸と同様の閉環反応によって生合成されると思われる、糸状菌*Penicillium patulum*の6-methylsalicylic acid (**68**)は、脂肪酸合成酵素と類似の構造を持つ分子量約180 kDaのmultifunctional enzyme、6-methylsalicylic acid synthase（6-MSAS）によって合成されることが明らかになっている（Fig. 75）[34]。また、植物由来のジヒドロイソクマリンである食用ニンジン（*Daucus carota*）の6-hydroxymellein (**3**)を合成する6-hydroxymellein synthaseも、推定分子量約120 kDaと、CHSとは異なる構造を持つことが明らかになっている[35]。しかし、これらはいずれもacetyl-CoA (**67**)をスターターにする酵素であり、*p*-coumaroyl-CoA (**7**)をスターターにすることが確実なアマチャPKS1はやはりCHSスーパーファミリーに属する酵素である可能性が強いと思われる。

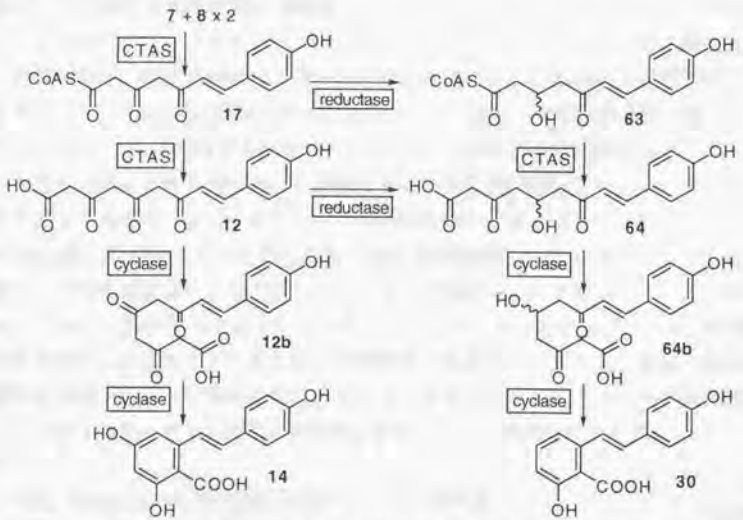
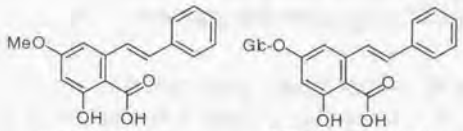


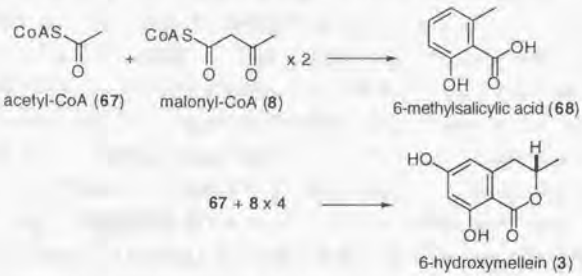
Fig. 73. Hypothetical biosynthetic pathway of stilbenecarboxylic acids.



65 from *Cajanus cajan*

66 from *Gaylussacia baccata* and *Scutellaria scandens*

Fig. 74. Stilbenecarboxylic acid from higher plants.



acetyl-CoA (**67**) malonyl-CoA (**8**) 6-methylsalicylic acid (**68**)

6-hydroxymellein (**3**)

Fig. 75. Reaction of 6-methylsalicylic acid synthase and 6-hydroxymellein synthase

4　*Hydrangea*属におけるセコイリドイドの出現

ところで、HmSタンパク質の機能を考えるとき、セコイリドイドhydramacroside B (**13**)の存在が大きなヒントになった。Secologanin (**50**)と他の化合物とのカップリングによって生成する天然有機化合物は、キョウチクトウ科やアカネ科などに存在するインドールアルカロイドや、リンドウ科などに存在するセコイリドイド配糖体が知られているが、**50**と直鎖ポリケタイドとから生成するものはFigs. 11, 13で紹介したもののみで、*Hydrangea*属以外からは見つかっていない。第2章第3節、第4章で述べたように、CHSやSTSにも直鎖テトラケタイドCTA (**12**)を遊離する活性があるから、他の植物に存在しないのは不思議である。単に見つかっていないだけ、という可能性ももちろんあるが、おそらく、**12**や**49**と**50**とのカップリングという経路が*Hydrangea*属に特異的なものなのだろう。**12**や**49**がCHSやSTSの副産物として生成する場合、その生成量はそれほど多くないので、分解系によって蓄積を防ぐことができる。しかし、先に述べたようにスチルベンカルボン酸の生合成がCTASと閉環酵素の共同作業によるものだとすれば、閉環酵素の発現量が十分でない場合、**12**や**49**の過剰な蓄積が起きる可能性がある。そのような場合の直鎖ポリケタイドの代謝系として、**50**とのカップリングという経路が発達したのではないだろうか。

5　CHS、STSにおいて閉環反応に関わるアミノ酸残基

本研究では同定することはできなかったが、CHSとSTSにおいて、CTASの持たない閉環活性に関わっている構造や、CHSとSTSのそれぞれの特異的な閉環様式を決

定している構造が存在するはずである。現在までに知られている情報から考えられる可能性について考察し、今後の部位特異的変異導入のターゲットになり得るアミノ酸残基を考えてみる。

おそらく、CHS、STSに特異的な反応を触媒するアミノ酸残基とそれぞれのタンパク質の特異的な立体構造の両方が関わっているのだろうが、立体構造に関しては今のところ有用な情報がない。結晶構造や溶液中での構造に関する知見は全く無いし、また、配列から二次構造予測を行っても、同じCHSでも、植物種によって異なる結果が得られてしまう。したがって現在は、それぞれの活性を決定しているアミノ酸を同定する、という方向でしか検討することができない。

Fig. 76に示すように、CHSにしろSTS（閉環のメカニズムは2種類考えられる）にしろ、閉環反応はタンパク質上のbaseによって開始される。CTASにはこのbaseが無いのだとすると、近いうちに同定できる可能性がある。Table 9には、HmS（= CTAS）に特徴的なアミノ酸残基とCHS/STSコンセンサスにおいて対応するアミノ酸を列挙した。この中でbaseとして働きそうなのは(i)のArg、(ii)、(ix)、(xii)、(xiii)のGlu、Aspであり、部位特異的変異導入のターゲットとして興味深い。なお、第3章第2節の結果よりHmCではAla286よりC末側に位置する(xii)のAsp（HmCのAsp311）とGlu（HmCのGlu314）は重要でないように思えるが、キメラSC290ではN末側の構造の変化によりAsp311またはGlu314と中間体との距離が広がってしまった可能性もあるので、無視できない。

また、立体構造の変化を引き起こしうるアミノ酸残基について考えてみると、Table 9に示したすべての残基に可能性があるが、第3章第2節のキメラの実験より(xi)と(xii)は重要でなく、また、HmS59とHmS62で異なる(i)、(x)も考慮に入れなくて良さそうである。特に興味深いのは(viii)のProであり、最初の選択肢として検討したい。

CHSとSTSの閉環様式を決めている構造にも大きな興味が持たれる。Schröderのグループでは、ヨーロッパアカマツ（*Pinus sylvestris*）由来のCHS、ヨーロッパアカマツ由来のSTS、ピーナツ由来のSTSの活性中心Cys付近の配列（Fig. 77）に注目し、それぞれについて、Gln-Gln、His-Gln、Gln-Hisのクローンを作製して酵素活性を検討しているが、活性の減少や基質特異性の変化などは見られたものの、閉環様式に変化はなかった[36]。

閉環はbaseによって引き起こされるのだから、それぞれに特異的なbaseを探せば良さそうだが、機能が同定されているすべてのCHSにおいて保存され、かつSTSには無いアミノ酸残基は存在しないし、逆も同じである。むしろ、第4章において明らかにした、CHSとSTSの間の交叉反応の発見から、CHSとSTSに共通して存在するアミノ酸の中から探した方が良いことがわかる。交叉反応の存在は、(a)CHSとSTSにおいて閉環反応を触媒するbaseは共通で、中間体テトラケタイド（CoAエステル **9**またはカルボン酸 **12**）のフォールディングの違いのみでコントロールされている、または、(b)それぞれにおいてbaseとして働くアミノ酸残基は異なるが、いずれもあらゆるCHSとSTSにおいて（少なくともクズCHSとピーナツSTSにおいては）保存され

ており、活性中心付近の構造によりどちらが働くかによって閉環様式が決定される
ことを示しているからである。

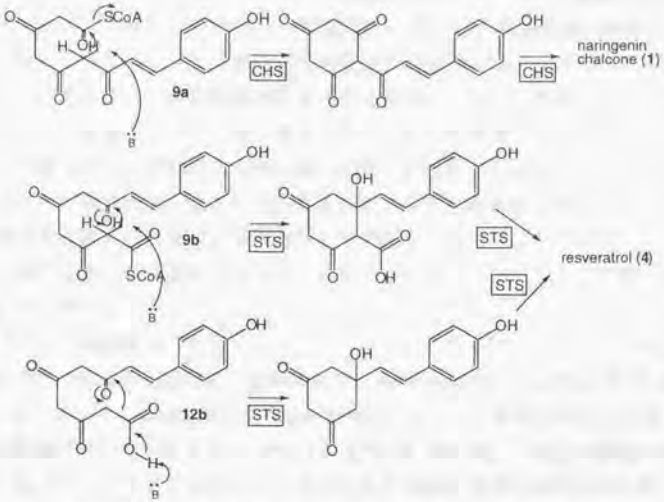


Fig. 76. Hypotheses for mechanisms of cyclization reactions by chalcone and stilbene synthases

Table 9. Characteristic amino acid residues in HmS.

	HmS59	HmS62	CHS / STS consensus
(i)	Cys12	Leu12	Arg
(ii)	Gly18	Gly18	Glu, Asp
(iii)	Cys169	Cys169	Phe, Tyr
(iv)	Asn201	Asn201	Thr
(v)	Ala208	Ala208	Thr, Ser
(vi)	Ser217	Ser217	Ala
(vii)	Thr236	Thr236	Val, Ile
(Viii)	Ala252	Ala252	Pro
(ix)	Gln264	Gln264	Glu
(x)	Glu265	Gly265	Val
(xi)	Insertion	Insertion	-
(xii)	Asn321	Asn321	Asp
(xiii)	Gln324	Gln324	Glu

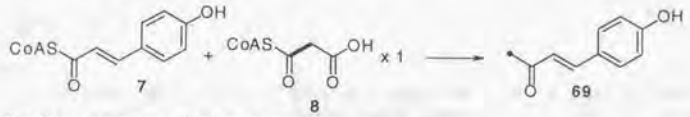
CHS from *Pinus sylvestris* VKRVMMYQQGCFAGGTVLR
STS from *Pinus sylvestris* VKRVGVFQHGCFAGGTVLR
STS from *Arachis hypogaea* VKRYMMYHQGCFAGGTVLR

Fig. 77. Alignment of partial sequences of chalcone and stilbene synthases from *Pinus sylvestris* and stilbene synthase from *Arachis hypogaea*.

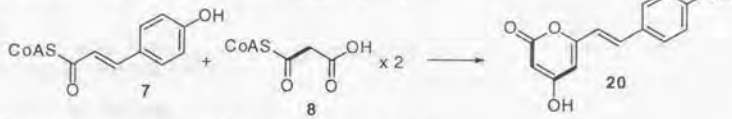
アマチャより、CHSスーパーファミリーの新たなメンバーで、炭素鎖伸長反応のみを触媒する新たなPKSのクローニングに成功し、さらに、変異酵素の解析により、酵素活性発現に関与するアミノ酸残基を同定することができた。また、CHSとSTSに直鎖テトラケタイドの遊離活性があることを発見し、さらに両者の間に反応の交叉性があることを見いだした。そしてさらに、これらの性質とCHSスーパーファミリーの一次構造から、植物PKSの分子進化に関して魅力的な仮説を示すことができた。いずれも、植物PKSの構造と反応機構を考える上で画期的な結果と言える。しかし、本研究の最大の意義は、ホモロジーを利用したPCRによりCHSスーパーファミリーの新たなメンバー遺伝子のクローニングが可能であることを、実際に証明した点にあると考える。

本論文では、CHSスーパーファミリーのメンバーとしてはクローニングがなされているもののみを取り上げたが、近年になり、単純なacetyl-CoA (**67**)以外のCoAエステルをスターターに、malonyl-CoA (**8**)由来のC2ユニットの伸長を1回から3回行う酵素活性の報告がいくつかなされた（Fig. 78）[37, 38, 39, 40]。これらの酵素がCHSと構造的に似たタンパク質であるという決定的な証拠はまだ得られていないが、CHSスーパーファミリーのメンバーである可能性は十分にある。また、Fig. 79に示した化合物も、やはりCHSスーパーファミリーのメンバーによって生合成されていてもおかしくない[1]。とすれば、これらの酵素の遺伝子を、私がデザインした縮重入りプライマーを用いたPCRによりクローニングできる可能性がある。良い材料を選んでぜひ挑戦してみたい。特に興味深いのは、縮合の回数が1回と2回の酵素である。今回私が作成したミュータント、HmS-H169Fは活性中の構造が変化し、3回目の縮合が起きにくくなったミュータントと思われる。縮合の回数の少ない酵素の配列が得られれば、その活性中心付近の配列を他の酵素と比較したり、ミュータントを作って活性を検討することなどにより、鎖長決定のメカニズムについて有用な知見が得られると思われる。また、全体の配列の相同性から、CHSスーパーファミリーの進化に関わる決定的な情報が得られる可能性が高い。いずれにしろ、本研究を足がかりに植物ポリケタイド合成酵素の研究が急速に進展するのは間違いない。

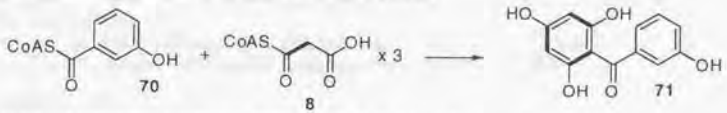
1. Benzalacetone synthase (BAS) from *Rubus idaeus*



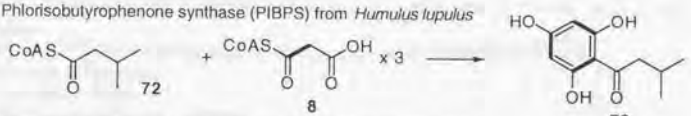
2. Styrylpyrone synthase (SPS) from *Equisetum arvense*



3. Benzophenone synthase (BPS) from *Centaurium erythraea*



4. Phlorisobutyrophenone synthase (PIBPS) from *Humulus lupulus*



5. Phlorisovalerophenone synthase (PIVPS) from *Humulus lupulus*

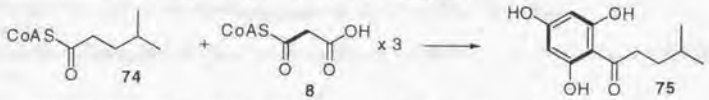


Fig. 78. Enzymes which may constitute CHS superfamily.

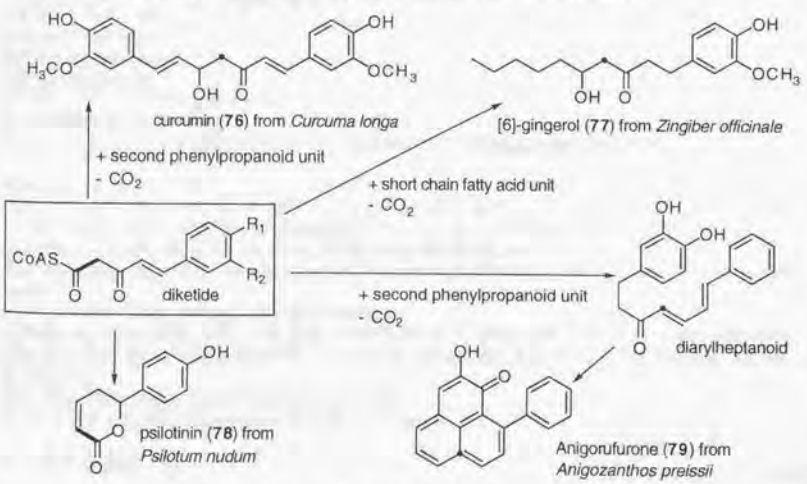


Fig. 79. Natural products whose biosyntheses may involve members of CHS superfamily.

実験の部

遺伝子操作一般

(1) 大腸菌
特に記述のある場合を除き、プラスミド構築にはNovaBlueを用いた。U. S. E.法による変異導入にはBMH71-18 *mutS*を、T7プロモーターを利用した発現（pETベクター）にはBL21(DE3)pLysE及びBL21(DE3)pLysSを用いた。

(2) PCR
本研究では、PCRはすべてEx-Taq (TaKaRa)を用いて行った。また、特に記述のない限り、Perkin Elmer社GeneAmp 2400を用いて行った。

(3) アガロースゲル電気泳動
DNAのアガロースゲル電気泳動はサブマリン方式のMupid-2 (ADVANCE)を使用し、agarose ME (FMC BioProducts)で作成したゲルを用いて1 X TAE (40 mM Tris-acetate, pH 8.0, 1 mM EDTA)、0.5 mg / l ethidium bromideの条件で行った。
ゲルからDNAを回収する際はagarose L (Nippon Gene)で作成したゲルで電気泳動を行い、剃刀で切り出したゲルより、Wizard PCR Preps Kit (Promega)を用いてDNAを回収・精製した。

(4) PCR産物のサブクローニング
精製したPCR産物は、以下の2通りの方法でプラスミドpT7Blue(R)にサブクローニングした。
1) T-Vector
pT7Blue(R) T-Vector Kit (Novagen)及びDNA Ligation Kit ver. 2(TaKaRa)を用いた。
4.0 μl Purified PCR product
1.0 μl pT7Blue T-Vector
5.0 μl DNA Ligation Kit ver. 2 solution I
↓ Incubated at 16 ℃ for > 1 h
↓ Transformed 20 μl of NovaBlue competent cells with 1 or 2 μl of ligation mixture
2) Blunt Vector
Perfectly Blunt Cloning Kitを用いた。5.0 μlのpurified PCR productを用い、キットのマニュアルに従って行った。

(5) プラスミドの抽出と精製
大腸菌からのプラスミドの抽出と精製には、以下の4種のキットを用いた。
1) スモールスケール
RPM Kit (Funakoshi)
FlexiPrep Kit (Pharmacia)
GFX Kit (Pharmacia)
2) ミドルスケール～ラージスケール
Wizard Midipreps Kit (Promega)
なお、シークエンシングに用いるプラスミドの調製はすべてMidipreps Kitを用いて行った。

(6) DNAシークエンシング
DNAシークエンシングは以下の2種のシステムで行った。また、シークエンシングに用いたプラスミドは、すべてベクターpT7Blue(R)の*Eco*RVサイトにインサートを組み込んだものである。
1) pAKI1, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 18, 23, 25 (F), 26, 27 (F), 28 (F), 29
反応：Sequenase ver. 2.0 T7 DNA polymerase (Amersham)及びDideoxyterminater-label Kit (Yuki Gousei Kogyo)
シークエンサー：DNA Sequencer SQ-3000 (Hitachi)
2) pAKIA-01, A-03, A-04, A-05, A-06, A-07, A-08, B-01, B-02, B-03, B-04, B-05, B-06, C-01, C-02, C-04, C-05, C-07, C-08, D-01, D-04, D-05, D-08, 25 (R), 27 (R), 28 (R), 241, 248, 249, 251, 253, 255, 363, 366, 370, 371, 372, 373
反応：Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (Aloka)
シークエンサー：DNA Sequencer Model 4000 (LI-COR)

タンパク質実験一般

(1) タンパク質定量（protein assay）
すべてBio-Rad Protein Assay (BIO-RAD)を用いたBradford法で行った。
(2) SDS-ポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）
すべてミニプロティアン-II（BIO-RAD）を用いて行った。

ポリケタイド合成酵素活性の測定

(1) TLCを用いた^{14}C基質を用いたアッセイ法

1) Assay TLC1

0.1 M Tris-HCl pH 7.0, 1 mM EDTA
0.05 mM *p*-Coumaroyl-CoA
0.02 mM [2-^{14}C]Malonyl-CoA in 50 μl

10.1 μl 0.5 M Tris-HCl pH 7.0 + 5 mM EDTA
x μl Enzyme
5.0 μl 0.5 nmol / μl *p*-Coumaroyl-CoA
5.6 μl 0.18 nmol / μl, 0.010 μCi / μl [2-^{14}C]Malonyl-CoA
Up to 50 μl dH_2O
↓ Covered the tube with aluminum foil
↓ Incubated at 30 ℃ for 1-2 h
↓ Added 5 μl of 50 % AcOH
↓ Extracted with EtOAc
↓ (Evaporated *in vacuo* and dissolved in EtOAc)
↓ Separated by TLC
Normal phase : WF (Art. 16484, Merck), benzene-acetone-acetic acid (70 : 30 : 1)
Reverse phase : RP-18 (Art. 15389, Merck), methanol-water-acetic acid (70 : 30 : 1)
↓ Autoradiography with Fuji Imaging Plate BAS-IIIS(Fuji Photo Film) with a standard sample for calculation
(TLC plate with 10.1 pmol of [2-^{14}C]malonyl-CoA
↓ Analyzed by Bio Imaging Analyzer BAS-1500 (Fuji Photo Film) and MacBAS (Fuji Photo Film)

2) Assay TLC2

0.1 M Tris-HCl pH 7.0, 1 mM EDTA
0.15 mM *p*-Coumaroyl-CoA
0.11 mM [2-^{14}C]Malonyl-CoA in 50 μl

10.1 μl 0.5 M Tris-HCl pH 7.0 + 5 mM EDTA
x μl Enzyme
2.6 μl 2.9 nmol / μl *p*-Coumaroyl-CoA
4.5 μl 1.0 nmol / μl Malonyl-CoA
5.6 μl 0.18 nmol / μl, 0.010 μCi / μl [2-^{14}C]Malonyl-CoA
Up to 100 μl dH_2O
↓ Covered the tube with aluminum foil
↓ Incubated at 30 ℃ for 1 h
↓ Added 5 μl of 50 % AcOH
↓ Extracted with EtOAc
↓ (Evaporated *in vacuo* and dissolved in EtOAc)
↓ TLC and autoradiography

3) Assay TLC3

0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA
0.15 mM *p*-Coumaroyl-CoA
0.12 mM [2-^{14}C]Malonyl-CoA in 50 μl

5.1 μl 1 M Tris-HCl pH 7.5 + 5 mM EDTA
x μl Enzyme
3.0 μl 2.5 nmol / μl *p*-Coumaroyl-CoA
1.0 μl 5.0 nmol / μl Malonyl-CoA
5.6 μl 0.18 nmol / μl, 0.010 μCi / μl [2-^{14}C]Malonyl-CoA
Up to 50 μl dH_2O
↓ Covered the tube with aluminum foil
↓ Incubated at 30 ℃ for 2 h
↓ Added 10 μl of 1N HCl
↓ Extracted with EtOAc
↓ (Evaporated *in vacuo* and dissolved in EtOAc)
↓ TLC and autoradiography

(2) HPLCを用いた非標識基質によるアッセイ法

Assay HPLC1

0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA
0.185 mM *p*-Coumaroyl-CoA
0.30 mM Malonyl-CoA　　in 50 μl

5.1 μl　1 M Tris-HCl pH 7.5 + 5 mM EDTA
x μl　Enzyme
3.7 μl　2.5 nmol / μl *p*-Coumaroyl-CoA
3.0 μl　5.0 nmol / μl Malonyl-CoA
Up to 50 μl　dH_2O
↓ Covered the tube with aluminum foil
↓ Incubated at 30 ℃ for 1 h
↓ Added 5 μl of 50 % AcOH
↓ Extracted with EtOAc
↓ Evaporated *in vacuo* and dissolved in MeOH
↓ Analyzed by HPLC
Column : ODS-80Ts 4.6 mm I. D. X 150 mm (Tosoh)
Solvent : Linear gradient of A (dH_2O, 1 % AcOH) and B (MeOH, 1 % AcOH)
0 - 10 min : 45 % B
10 - 22 min : 45 - 49 % B
Flow rate : 0.6 ml / min
Temperature : 40 ℃
Detection : UV254 nm

Assay TLC2の生成物をとHPLCでも分析し、放射活性から求められる^{14}Cの取り込みとピーク面積の関係がわかっているので、ピーク面積から生成量を計算することができる。

第2節　PCRによるcDNAクローニング

1　PCRプライマーのデザイン

縮重入りプライマー、CHS-112S、CHS-174S、CHS-368A及びCHS-380Aは、以下の遺伝子のアミノ酸配列をもとにデザインされた。

Stilbene synthase from *Arachis hypogaea* [22]

SWISS-PROT :

CHS1_LYCES, CHS1_MAIZE, CHS1_MEDSA, CHS1_PEA, CHS1_SINAL, CHS1_SOYBN, CHS2_LYCES, CHS2_MAIZE, CHS2_MEDSA, CHS2_PEA, CHS2_SOYBN, CHS3_PEA, CHS3_SINAL, CHS3_SOYBN, CHS4_MEDSA, CHS6_SOYBN, CHS7_SOYBN, CHS8_MEDSA, CHS9_MEDSA, CHSA_PETHY, CHSB_PETHY, CHSD_PETHY, CHSF_PETHY, CHSG_PETHY, CHSJ_PETHY, CHSY_ANTMA, CHSY_ARATH, CHSY_HORVU, CHSY_MALDO, CHSY_MATIN, CHSY_PETCR, CHSY_PINSY, CHSY_PUELO, DPSS_PINSY, THS1_ARAHY, THS2_ARAHY, THS_VITSX(=THS1_VITVI)

PIR :

S16206, S53313, S53314

2　PCRによるcore部分のクローニング

(1) アマチャ葉の収穫

1996年4月24日、検見川薬用植物園にてアマチャ葉約20枚を採集し、水を含ませたティッシュペーパーに挟んで研究室に持ち帰った。約2時間後、よく洗ったデュワー瓶中で液体窒素により凍結させた。-80℃で保存した。

(2) アマチャ葉からのRNA抽出

1. 凍結保存してあった葉約 4.6 g をすばやく秤量した。約 4.6 g (fresh weight) であった。
2. 乳鉢中、液体窒素に浸した状態で、乳棒でよくすり潰した。
3. あらかじめ氷上で冷やしておいた別の乳鉢に移した。
4. 6 ml のPhenol/Chloroform、6 ml の1 M Tris-HCl pH 9.0、1 ml の 10 % SDS を加え、乳棒で良く混ぜた。注）常法では 10 % SDS の添加量は 0.5 ml であるが、不注意で倍量加えてしまった。
5. 18本のエッペンドルフチューブに 1 ml ずつ分注した。
6. 遠心（15,000 rpm, 5 min, 0 ℃）して上清を新しいエッペンドルフチューブにとった。
7. 0.5 ml / tube のPhenol/Chloroformを加え、チューブ立てに刺して1分間良く振った。
8. 遠心（15,000 rpm, 5 min, 0 ℃）して上清を新しいエッペンドルフチューブ9本にとった。
9. 遠心（15,000 rpm, 10 min, 0 ℃）し、上清を 240 μl ずつ新しいエッペンドルフチューブ31本にとった。
10. 24 μl / tubeの 3 M Sodium acetate と 796 μl / tubeの ethanolを加え、良く混ぜた後、-80 ℃で1時間静置した。
11. 遠心（15,000 rpm, > 15 min, 0 ℃）し、上清を捨てた。
12. 沈殿を total 1 ml の dH_2Oに溶かし、0.5 ml ずつ2本のエッペンドルフチューブに移した。
13. 遠心（15,000 rpm, 0 ℃）して上清を新しいエッペンドルフチューブに移すことにより、不溶物を除いた。約3時間繰り返した。
14. 0.5 ml / tube の 4 M LiClを加え、4 ℃で一夜静置した。
15. 遠心（15,000 rpm, 10 min, 0 ℃）し、上清を捨てた。
16. 沈殿を 200 μl / tubeの 70 % ethanolで洗った後、減圧下乾燥させた。
17. 50 μl / tubeのdH_2Oに溶かした。
18. 遠心（15,000 rpm, 5 min, 0 ℃）して上清を新しいエッペンドルフチューブ1本にとった（"Amacha RNA", total 100 μl）。（保存 : -20 ℃）
19. 5.0 μlを 1 mlのdH_2Oで希釈して吸光光度計で測定した。A_{260} = 0.904 であったので、濃度は 7.2 mg / ml、収量は 0.72 mg であることが判明した。

(3) 逆転写反応によるcDNA mixtureの調製

7.0 μl　7.2 mg / ml Amacha RNA (ca. 50 μg)
3.0 μl　dH_2O
0.5 μl　1 μg / μl RACE32
↓ Incubated at 70 ℃ for 3 min
↓ Stood on ice for a while
↓ Added 4.0 μl　5 X buffer (BRL)
2.0 μl　100 mM DTT (BRL)
2.0 μl　2.5 mM each dNTP (TaKaRa)
1.0 μl　200 U / μl Superscript II (BRL)

↓ Incubated at 37 ℃ for 2 h
↓ Added 80 μl TE pH 7.5 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)
"Amacha cDNA" (Stored at -20 ℃)

(4) PCRによるcore領域の増幅（PCR A0, PCR A, PCR B, PCR C, PCR D）
1) PCR A0
77.0 μl dH_2O
10.0 μl 10 X buffer (TaKaRa)
8.0 μl 2.5 mM each dNTP (TaKaRa)
3.0 μl Amacha cDNA
1.0 μl 1 μg / μl CHS-112S
1.0 μl 1 μg / μl CHS-380A
0.5 μl 5 U / μl Ex-Taq (TaKaRa)
↓ 30 cycles of (94 ℃, 1 min → 42 ℃, 2 min → 72 ℃, 3 min)
↓ 72 ℃, 10 min
↓ 4 ℃

2) PCR A, B, C and D
77.0 μl dH_2O
10.0 μl 10 X buffer (TaKaRa)
8.0 μl 2.5 mM each dNTP (TaKaRa)
3.0 μl Amacha cDNA
1.0 μl 1 μg / μl CHS-112S or CHS-174S
1.0 μl 1 μg / μl CHS-380A or CHS-368A
↓ 94 ℃, 2 min
↓ Added 0.5 μl of 5 U / μl Ex-Taq (TaKaRa)
↓ 94 ℃, 0.5 min
↓ 30 cycles of (94 ℃, 0.5 min → 42 ℃, 0.5 min → 72 ℃, 1 min)
↓ 72 ℃, 10 min
↓ 4 ℃

3 RACE法による伸長
PCRはProgram Temp Control System PC-700 (ASTEC)を用いて行った。

(1) 5'RACE
1)逆転写及びポリA付加
10.0 μl 7.2 mg / ml Amacha RNA (ca. 72 μg)
0.5 μl 1 μg / μl HmC-146A or HmS-146A
↓ Incubated at 70 ℃ for 3 min
↓ Stood on ice for a while
↓ Added 4.0 μl 5 X buffer (BRL)
2.0 μl 100 mM DTT (BRL)
2.0 μl 2.5 mM each dNTP (TaKaRa)
1.0 μl 200 U / μl Superscript II (BRL)
↓ Incubated at 37 ℃ for 2 h
↓ Added 30 μl TE pH 7.5
50 μl Phenol/Chloroform
↓ Shook for 30 s
↓ Centrifuged (15,000 rpm, 4 ℃, 5 min)
40 μl sup
↓ Added 15 μl 10 M NH_4OAc
150 μl EtOH
↓ Stood at -80 ℃ for 1 h
↓ Centrifuged(15,000 rpm, 4 ℃, 10 min)
ppt
↓ Washed with 180 μl EtOH
↓ Centrifuged(15,000 rpm, 4 ℃, 10 min)
ppt
↓ Dried with a vacuum pump
↓ Added 26.0 μl dH_2O
1.0 μl 10 mM dATP
3.1 μl 10 x buffer (TOYOBO)

↓ Dissolved by pipetting
↓ Added 1.0 μl Terminal deoxynucleotidyl transferase (TOYOBO)
↓ Incubated at 37 ℃ for 2 h
"RTpAHmC", "RTpAHmS"

2) First PCR
79.0 μl dH_2O
10.0 μl 10 X buffer (TaKaRa)
8.0 μl 2.5 mM each dNTP (TaKaRa)
1.0 μl RTpAHmC or RTpAHmS
1.0 μl 1 μg / μl (144 pmol / μl) HmC-146A or HmS-146A
0.5 μl 5 U / μl Ex-Taq (TaKaRa)
↓ 10 cycles of (94 ℃, 1 min → 52 ℃, 2 min → 72 ℃, 3 min)
↓ 72 ℃, 10 min
↓ 4 ℃
↓ Added 1.0 μl 1 μg / μl RACE32
↓ 30 cycles of (94 ℃, 1 min → 52 ℃, 2 min → 72 ℃, 3 min)
↓ 72 ℃, 10 min
↓ 4 ℃

3) 電気泳動・ゲル切り出し・精製
First PCRの産物をEtOH沈殿した後、1.2 % アガロースゲルで電気泳動し、予想される大きさである0.5 kbp付近とその上下の部分をいずれも0.1 - 0.2 kbpの幅で切り出した。DNAの精製は「遺伝子操作一般(2)」の通り。
50 μl of "purified first PCR product"

4) Second PCR
74.0 μl dH_2O
10.0 μl 10 X buffer (TaKaRa)
8.0 μl 2.5 mM each dNTP (TaKaRa)
6.0 μl purified first PCR product
1.0 μl 1 μg / μl (144 pmol / μl) HmC-139A or HmS-139A
0.5 μl 5 U / μl Ex-Taq (TaKaRa)
↓ 10 cycles of (94 ℃, 1 min → 52 ℃, 2 min → 72 ℃, 3 min)
↓ 72 ℃, 10 min
↓ 4 ℃
↓ Added 1.0 μl 1 μg / μl RACE32
↓ 30 cycles of (94 ℃, 1 min → 52 ℃, 2 min → 72 ℃, 3 min)
↓ 72 ℃, 10 min
↓ 4 ℃

5) 電気泳動・ゲル切り出し・精製
50 μl of "purified 5'RACE product"

(2) 3'RACE
1) First PCR
77.0 μl dH_2O
10.0 μl 10 X buffer (TaKaRa)
8.0 μl 2.5 mM each dNTP (TaKaRa)
3.0 μl Amacha cDNA
1.0 μl 1 μg / μl (144 pmol / μl) HmC-312S or HmS-290S
0.5 μl 5 U / μl Ex-Taq (TaKaRa)
↓ 10 cycles of (94 ℃, 1 min → 52 ℃, 2 min → 72 ℃, 3 min)
↓ 72 ℃, 10 min
↓ 4 ℃
↓ Added 1.0 μl 1 μg / μl RACE17
↓ 30 cycles of (94 ℃, 1 min → 52 ℃, 2 min → 72 ℃, 3 min)
↓ 72 ℃, 10 min
↓ 4 ℃

2) 電気泳動・ゲル切り出し・精製
(1) 3) と同様
50 μl of "purified first PCR product"

3) Second PCR
74.0 μl dH_2O
10.0 μl 10 X buffer (TaKaRa)
8.0 μl 2.5 mM each dNTP (TaKaRa)
6.0 μl purified first PCR product"
1.0 μl 1 μg / μl (144 pmol / μl) HmC-321S or HmS-321S
0.5 μl 5 U / μl Ex-Taq (TaKaRa)
↓10 cycles of (94 ℃, 1 min → 52 ℃, 2 min → 72 ℃, 3 min)
↓72 ℃, 10 min
↓4 ℃
↓Added 1.0 μl 1 μg / μl RACE32
↓30 cycles of (94 ℃, 1 min → 52 ℃, 2 min → 72 ℃, 3 min)
↓72 ℃, 10 min
↓4 ℃

4) 電気泳動・ゲル切り出し・精製
50 μl of "purified 3'RACE product"

4 全長ORFの増幅
(1) PCR
反応はProgram Temp Control System PC-700 (ASTEC)で行った。
77.0 μl dH_2O
10.0 μl 10 X buffer (TaKaRa)
8.0 μl 2.5 mM each dNTP (TaKaRa)
3.0 μl Amacha cDNA
1.0 μl 1 μg / μl (104 pmol / μl) HmS-N2
or 1 μg / μl (95 pmol / μl) HmC-N2
1.0 μl 1 μg / μl (84 pmol / μl) HmS-C
or 1 μg / μl (84 pmol / μl) HmC-C
0.5 μl 5 U / μl Ex-Taq (TaKaRa)
↓30 cycles of (94 ℃, 0.5 min → 60 ℃, 0.5 min → 72 ℃, 2 min)
↓72 ℃, 10 min
↓4 ℃

(2) pET-32a(+)への組み込み
通常の方法で行った。

第2章の実験

第1節　大腸菌による発現

1　発現誘導

(1) BL21(DE3)pLysEの形質転換
　通常の方法で行った。

(2) スモールスケールでの発現とタンパク質抽出
1)Expression
Glycerol stock of BL21(DE3)plysE or pLysS harboring pET plasmid
↓Cultured at 37℃ overnight in LB/Amp (100 μg/ml) / Cm (34 μg/ml) with shaking
↓Centrifuged (V×0.04×0.8 / OD_{600}) ml (1000×g, 3 min)
ppt
↓Resuspended with V ml of fresh LB/Amp/Cm
↓Cultured at 37℃ with shaking till OD_{600} reach ca. 0.6
↓Put on ice and kept for > 5 min
↓Added 0.1 M IPTG to final conc. 1.0 mM
↓Cultured at 20℃ for ca. 20h

2)Extraction of total protein for SDS-PAGE
V ml culture in an Eppendorf tube
↓Centrifuged(12,000 rpm, 4 ℃, 1 min)
ppt
↓Added (OD_{600} X 150 X V) μl dH_2O
↓Added (OD_{600} X 50 X V) μl 4X Cracking buffer
↓Resuspended
↓Boiled for 3 min
Stored at -20 ℃

4X Cracking buffer :　0.24 M Tris-HCl
12 % (w/v) Sodium lauryl sulfate
40 % (w/v) Glycerol
0.04 % (w/v) Bromphenol Blue
8 % (v/v) 2-mercaptoethanol

3) Extraction of soluble protein
V ml culture in a Falcon tube
↓Centrifuged(5,000 rpm, 4 ℃, 10 min) in RA-410
ppt
↓Added (OD_{600} X 0.05 X V) ml Buffer A
↓Resuspended and transfer to an Eppendorf tube
↓Sonicated (10 s X 4) with Sonifier 250D (BRANSON)
↓Centrifuged(15,000 rpm, 4 ℃, 15 min)
sup
↓Froze with liquid nitrogen
Stored at -80 ℃

Buffer A : 0.1 M KPB pH 7.0,10 % glycerol, 1 mM DTT

2　HmC酵素活性の検討
Assay TLC1により行った。

3　HmS酵素活性の検討
Assay TLC1により行った。

4　Intact HmSの活性
(1) チオレドキシンを除去したHmSの活性
1) Crude extractの調製
　1-(2)-1)及び3)と同様。ただし、buffer Aの代りにNative Binding Bufferを用いた。
"ca. 5.5 ml Crude extract"

2) アフィニティー精製用レジンの調製

Cheleting Sepharose Fast Flowを用いた。50 ml レジンの場合の調製法を示す。

50 ml Regenerated resin
↓ Centrifuged (2,000 rpm (= 600 X g), 5 min) in RA-6
ppt
↓ Repeated procedure shown below 3 times
    ↓ Resuspended in 100 ml of dH_2O
    ↓ Centrifuged (2,000 rpm, 5 min) in RA-6
    ppt
↓ Resuspended in 100 ml of 0.3 M NiCl
↓ Stirred for 30 min
↓ Centrifuged (2,000 rpm, 3 min) in RA-6
ppt
↓ Repeated procedure shown below 5 times
    ↓ Resuspended in 150 ml of dH_2O
    ↓ Centrifuged (2,000 rpm, 3 min) in RA-6
    ppt
↓ Resuspended in 50 ml of dH_2O
"Resin-dH_2O suspension"

3) レジンの平衡化

5 ml Resin-dH_2O suspension (2.5 ml resin) in a 15 ml Falcon tube
↓ Centrifuged (2,400 rpm (= 800 X g), 2 min) in RA-410
ppt
↓ Resuspended in 7 ml dH_2O and collected resin by centrifugation
↓ Resuspended in 7 ml Native Binding Buffer and collected resin by centrifugation (3 times)

4) レジンとの結合

2.5 ml Resin in a 15 ml Falcon tube
↓ Resuspended in 5.5 ml crude extract
↓ Rocked for 10 min in ice bath
↓ Centrifuged (2,400 rpm, 2 min) in RA-410
ppt (save sup as the unbound fraction)

5) 溶出

Resin with bound proteins
↓ Repeated procedure shown below 3 times
    ↓ Resuspended in 4 ml Native Binding Buffer
    ↓ Rocked for 2 min in ice bath
    ↓ Centrifuged (2,400 rpm, 2 min) in RA-410
    ppt (save sup as the unbound fraction)
↓ Resuspended in 4 ml Native Wash Buffer
↓ Rocked for 2 min in ice bath
↓ Centrifuged (2,400 rpm, 2 min) in RA-410
ppt (save sup as Fr. 0)
↓ Repeated procedure shown below 9 times
    ↓ Resuspended in 5 ml 50 mM Imidazole Elution Buffer
    ↓ Rocked for 5 min in ice bath
    ↓ Centrifuged (2,400 rpm, 2 min) in RA-410
    ppt (save sup as Fr. 50-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9)
↓ Repeated procedure shown below 2 times
    ↓ Resuspended in 5 ml 200 mM Imidazole Elution Buffer
    ↓ Rocked for 5 min in ice bath
    ↓ Centrifuged (2,400 rpm, 2 min) in RA-410
    ppt (save sup as Fr. 200-1 and 2)
↓ Resuspended in 5 ml 350 mM Imidazole Elution Buffer
↓ Rocked for 5 min in ice bath
↓ Centrifuged (2,400 rpm, 2 min) in RA-410
ppt (save sup as Fr. 350)

↓Repeated procedure shown below 2 times
↓Resuspended in 5 ml 500 mM Imidazole Elution Buffer
↓Rocked for 5 min in ice bath
↓Centrifuged (2,400 rpm, 2 min) in RA-410
ppt (save sup as Fr. 500-1 and 2)
↓Collected Frs. 350, 500-1 and 500-2 as purified TrxHmS

6) 精製TrxHmSの濃縮とバッファー交換
Combined Frs.
↓Passed through 0.45 μm filter
↓Concentrated by CENTRIPREP-30 (Amicon)
< 1 ml of concentrated TrsHmS
↓Added 14 ml of buffer A
↓Concentrated by CENTRIPREP-30 (Amicon)
ca. 0.5 ml of buffer exchanged TrsHmS
↓Protein assay

7) エンテロキナーゼによる消化
エンテロキナーゼはInvitrogen社のEKMax (1 U / μl)を用いた。
x μl TrsHmS (20 μg)
3.0 μl 10 X EKMax buffer (Invitrogen)
2.0 μl 1 U / μl EKMax
Up to 30.0 μl dH_2O
↓Incubated at 4 ℃, 16 ℃, 37 ℃ overnight

8) アッセイ
4 ℃の反応液10 μlを用いてAssay TLC1を行った。

Native Binding Buffer :	20 mM phosphate pH 7.8, 500 mM NaCl
Native Wash Buffer :	20 mM phosphate pH 6.0, 500 mM NaCl
50 mM Imidazole Elution Buffer ;	20 mM phosphate pH 6.0, 500 mM NaCl, 50 mM imidazole
200 mM Imidazole Elution Buffer :	20 mM phosphate pH 6.0, 500 mM NaCl, 200 mM imidazole
350 mM Imidazole Elution Buffer :	20 mM phosphate pH 6.0, 500 mM NaCl, 350 mM imidazole
500 mM Imidazole Elution Buffer :	20 mM phosphate pH 6.0, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole

(2) Intact HmSの発現とその活性
1) 全長ORFの増幅
反応はProgram Temp Control System PC-700 (ASTEC)で行った。
77.0 μl dH_2O
10.0 μl 10 X buffer (TaKaRa)
8.0 μl 2.5 mM each dNTP (TaKaRa)
3.0 μl Amacha cDNA
1.0 μl 1 μg / μl (104 pmol / μl) HmS-N
1.0 μl 1 μg / μl (84 pmol / μl) HmS-C
0.5 μl 5 U / μl Ex-Taq (TaKaRa)
↓30 cycles of (94 ℃, 0.5 min → 60 ℃, 0.5 min → 72 ℃, 2 min)
↓72 ℃, 10 min
↓4 ℃
2) pET-22b(+)への組み込み
通常の方法で行った。
3) 発現誘導とタンパク質抽出
1-(2)-1)及び3)と同様。
4) アッセイ
Assay TLC1を行った。

5 生成物のHPLCによる分析
Assay HPLC1により行った。

6 アマチャ葉抽出物の酵素活性

(1) アマチャ葉の収穫
1997年6月9日、東京薬科大学薬用植物園にてアマチャ葉を採集し、ドライアイスとともに発泡スチ

ロールケースに入れ、研究室に持ち帰った。収穫から約4時間後、重量を測り、よく洗ったデュワー瓶中で液体窒素により凍結させた。-80℃で保存した。

(2) アマチャ葉粗抽出物の調製
Buffer C : 0.1 M KPB pH7.0, 10 % glycerol, 20 mM sodium ascorbate, 1 mM dithiothreitol
1. 0.1 M KPB pH7.0, 10 % glycerolにsodium ascorbate及びdithiothreitolを溶解させることによりbuffer Cを調製し、窒素ガスを約1分間バブルすることにより溶存酸素を除いた後、氷上に置いた。
2. PD-10をbuffer Cで平衡化した後、クロマトチャンバーに立てておいた。
3. -80℃で保存しておいた葉、約5.0 gをはかり取った。
4. 葉、10 mlの氷冷したbuffer C及び0.5 gのPolyclar ATをWaring Blenderに入れた。
5. 氷冷下、10秒間 X 9回（インターバル30秒）ホモジナイズした。
6. 40 ml PA tubeに移し、遠心（12,100 X g, 30 min, 4 ℃）し、上清（約8 ml）をとった。
7. この上清のうち2.5 mlを2.で平衡化したPD-10にアプライし、流出液を捨てた。
8. 1.1 mlのbuffer Cを載せ、流出液をエッペンドルフチューブにとり、粗抽出物C-1とした。
9. 8.を2回繰り返し、粗抽出物C-2、C-3を調製した。
10. C-1、C-2、C-3を液体窒素で凍結させ、-80 ℃で保存しておいた。

(3) 酵素活性の測定
基本的にはAssay TLC1。
134 μl　C-1
8.0 μl　25 mM EDTA
20.0 μl　0.5 nmol / μl *p*-Coumaroyl-CoA
22.4 μl　0.18 nmol / μl, 0.010 μCi / μl [2-^{14}C]Malonyl-CoA
Up to 200 μl　dH_2O
↓ Covered the tube with aluminum foil
↓ Incubated at 30 ℃ for 2 h
↓ Added 40 μl of 1N HCl
↓ Extracted with EtOAc
↓ Evaporated *in vacuo* and dissolved in EtOAc
↓ TLC and autoradiography

第2節　酵母による発現

1　発現用プラスミドの構築と発現誘導
(1) 全長ORFの増幅
反応はProgram Temp Control System PC-700 (ASTEC)で行った。
77.0 μl　dH_2O
10.0 μl　10 X buffer (TaKaRa)
8.0 μl　2.5 mM each dNTP (TaKaRa)
3.0 μl　Amacha cDNA
1.0 μl　1 μg / μl (95 pmol / μl) HmS-N3
1.0 μl　1 μg / μl (84 pmol / μl) HmS-C
0.5 μl　5 U / μl Ex-Taq (TaKaRa)
↓ 30 cycles of (94 ℃, 0.5 min → 60 ℃, 0.5 min → 72 ℃, 2 min)
↓ 72 ℃, 10 min
↓ 4 ℃
(2) pYES2(+)への組み込み
通常の方法で行った。
(3) 酵母INVSC2の形質転換
本文の図に示した。
(4) 発現誘導とタンパク質抽出
本文の図に示した。
(5) アッセイ
5 μlの粗酵素液を用いてAssay TLC3を行った。

第3節　酵素反応生成物の構造決定

1　反応条件の検討

(1) pH及び反応時間
pH、反応時間以外はAssay TLC2。
(2) 基質濃度

基質濃度以外はAssay HPLC1。

2　酵素、基質の大量調製

(1) 精製酵素の調製
本文及び図に示した。

(2) *p*-Coumaroyl-CoAの合成
1) *p*-Coumaroyl-*N*-hydroxysuccinimide (active ester) の合成
1. *p*-Coumaric acid 2.46 g (15 mmol)
N-Hydroxysuccinimide 1.73 g (15 mmol)
を50 mlナスフラスコにはかり取った。
2. Tetrahydrofuran (THF) 20 mlを加え、スターラーで攪拌して溶かした。
3. *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) 3.51 g (17 mmol)を加えた。
4. 器壁に付いた試薬を少量のTHFで洗い落とした。
5. 遮光し、攪拌しながら室温で一晩置いた。
6. TLC（Art. 5715, chloroform-methanol (10 : 1)）で反応の進行を確認。
7. 沈殿をろ紙でろ過して除き、THFで沈殿を洗った。
8. 溶媒を減圧下留去（40-45℃）。
9. 約60 mlのEtOAcに溶かし、ろ過して不要物を除いた。
10. 0.85 M $NaHCO_3$ aq. 20 ml X 3で洗った（分液ロート）。
11. Na_2SO_4を入れて一晩乾燥させた。
12. ろ過によりNa_2SO_4を除き、溶媒を減圧下留去。
13. Acetone 10 mlに溶かし、シリカゲル10 gを入れ、溶媒を減圧下留去することにより生成物をシリカゲルに吸着させた。
14. 4.8 cm I. D. X 57 cmのカラムに約220 mlのシリカゲルを詰めた（高さ約12 cm、溶媒：chloroform）。
15. 13.のシリカゲルを重層。
16. Chloroformを流してフラクションをとった。
17. TLC（Art. 5715, chloroform-methanol (10 : 1)）で各フラクションを分析し、active esterのフラクションを集めた。極性の低い不純物との分離が困難だったので、この不純物をほとんど含まないフラクション（"Frs. 12-44"）と多少不純物を含むフラクション（"Frs. 45-57"）に分けた。
18. 溶媒を減圧下留去した後、デシケーターで乾燥させた。
19. 秤量。
Frs. 12-44 : ca. 1.07 g (= 4.1 mmol, 27 %)
Frs. 45-57 : ca. 0.30 g (= 1.1 mmol, 7 %)

2) エステル交換反応
典型的な例を示した。
1. 使用するdH_2Oとacetoneに1分間窒素ガスをバブルして溶存酸素を除いておいた。
2. CoASH (lithium salt) 38.4 mg (50 μ mol)
$NaHCO_3$ 42.0 mg (500 μ mol)
Active ester (Frs. 12-44) 65.3 mg (250 μ l)
をはかり取った。
3. 二方フラスコにCoASHを入れる。
4. 4 mlのdH_2Oに溶かした。
5. $NaHCO_3$を加えた。
6. なるべく少量のdH_2Oを加えて溶かした（2 ml）。
7. セプタムをつけて窒素ガスを約20秒バブル。
8. 栓を閉めて風船を取り付け、栓を開けて風船を窒素で満たし，風船を押してフラスコ上部の空気を追い出した。
9. Active esterを4 mlのacetoneに溶かした。
10. このacetone溶液を少しずつ加えた。溶液が濁ったらacetoneを加えて溶かした（計3 ml）。
11. 再び風船を窒素ガスで満たし、4℃で一昼夜攪拌した。
12. TLC（フナセルSF, n-butanol-acetic acid-dH_2O (5 : 2 : 3)）で反応の進行を確認した。
13. ナスフラスコに移し、水浴（30℃）の上で溶媒を減圧留去。約9 mlの黄色不透明水溶液になった。

3) *p*-Coumaroyl-CoAの精製（ペーパークロマトグラフィー）
1. Whatman 3MM Chr (40 X 40 cm)の一方の端に約3 mlの反応液を、ドライヤーで乾かしながら塗った。
2. 完全に乾かした後、n-butanol-acetic acid-dH_2O (5 : 2 : 3)で一昼夜展開。
3. 乾燥後、356 nmのUVを当てた時、青色の蛍光を発する*p*-coumaroyl-CoAのバンドを鋏で切り取った。
4. 50 mlのcold dH_2Oで溶出させた（一昼夜）。
5. 水溶液を別のフラスコに移し、ペーパーよりさらに50 mlのcold dH_2Oで溶出。

6. 4と5の水溶液を合わせ、ろ過して500 mlのナスフラスコに入れた。
7. 液体窒素に浸け、器壁に凍結させた。
8. 1.から7.を2回繰り返した。
9. 凍結乾燥。
10. 秤量。Fluffyなレモン色の結晶。3本合わせて33.72 mg (= 37.57 μ mol, 75.1 %)。

4　化合物CとBの構造

(1) ^{1}H-NMR
GSX-400 (JEOL)を用いて測定した。

(2) APCIMS
以下の装置・条件で測定した。
1) MS
System : Ion Trap LC/MS^n System LCQ（Thermo Quest）
Mode : APCI, negative
2) LC
System : TSP（Thermo Quest）
Column : Inertsil ODS-2 2.1 mm I. D. X 150 mm（GL Science）
temperature : ambient
Solvent : MeOHaq., 0.5 % AcOH, linear gradient
Flow rate : 0.2 ml / min
Gradient : 0 - 10 min : 45 % MeOH
10 - 22 min : 45 - 49 % MeOH

5　化合物Aの構造
4と同じ。

第1節　縮合反応の活性中心

2　PCRによる変異導入

(1) 1st PCR
1) 反応
84.0 μl　dH_2O
10.0 μl　10 X buffer (TaKaRa)
1.0 μl　2.5 mM each dNTP (TaKaRa)
1.0 μl　1.4 μg / μl pAKI59 (HmS) or 1.3 μg / μl pAKI86 (HmC)
1.0 μl　20 pmol / μl Mutagenesis primer
1.0 μl　20 pmol / μl HmS-C or HmC-C
↓94 ℃, 5 min
↓Added 0.5 μl of 5 U / μl Ex-Taq (TaKaRa)
↓94 ℃, 0.5 min
↓8 cycles of (94 ℃, 0.5 min → 60 ℃, 0.5 min → 72 ℃, 0.5 min)
↓72 ℃, 5 min
↓4 ℃
これを2本ずつ行った。

2) 精製
1. 反応液2本分を合わせ、エタノール沈殿。
2. Agarose L（1.2 %）による分離、PCR Preps Kitによる精製
3. エタノール沈殿を行い、沈殿に87 μl dH_2Oと10 μl 10 X bufferを加えて溶かし、"1st PCR product"とした。

(2) 2nd PCR
1) 反応
97.0 μl　dH_2O
1.0 μl　2.5 mM each dNTP (TaKaRa)
1.0 μl　1.4 μg / μl pAKI59 (HmS) or 1.3 μg / μl pAKI86 (HmC)
1.0 μl　20 pmol / μl HmS-N2 or HmC-N2
↓94 ℃, 5 min
↓Added 0.5 μl of 5 U / μl Ex-Taq (TaKaRa)
↓94 ℃, 0.5 min
↓8 cycles of (94 ℃, 0.5 min → 60 ℃, 0.5 min → 72 ℃, 1 min)
↓72 ℃, 5 min
↓4 ℃

2) 精製
1. エタノール沈殿により濃縮。
2. Agarose L（1.2 %）による分離、PCR Preps Kitによる精製
3. エタノール沈殿を行い、沈殿を50 μl TE pH7.5に溶かし、"2nd PCR product"とした。

(3) pT7Blue(R)へのサブクローニング
Perfectly Blunt Cloning Kitを用いた。5.0 μlの2nd PCR productを用い、キットのマニュアルに従って行った。

(4) シークエンシング
反応：Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (Aloka)
シークエンサー：DNA Sequencer Model 4000 (LI-COR)

(5) 変異タンパク質発現プラスミドの構築
通常の方法で行った。

(6) BL21(DE3)pLysSの形質転換
通常の方法で行った。

(7) 変異タンパク質の発現
第2章第1節1 (2)と同様。ただし、IPTG添加後の培養温度は15 ℃。

3　酵素活性の検討
Assay TLC3により行った。

第2節　キメラタンパク質の活性

1　キメラタンパク質の作成

(1) 制限酵素サイトの導入
U. S. E. Mutagenesis Kit（Pharmacia）によって行った。プライマー濃度以外はほぼマニュアル通り。

1) 5' Phosphorylation
2.0 μl　100 pmol / μl Mut-HmC174L or Mut-HmC286L
3.0 μl　10 X One-Phor-All Buffer PLUS
3.0 μl　10 mM ATP
0.9 μl　11 U / μl T4 Polynucliotide kinase (TOYOBO)
21.1 μl　dH_2O
↓ Incubated at 37 ℃ for 30 min
↓ Incubated at 65 ℃ for 10 min
↓ Chilled to 4 ℃
↓ Transferred to a 1.5 ml Eppendorf tube
↓ Added 370 μl dH_2O
↓ Stored at -20 ℃
"0.5 pmol / μl Mut-HmC174L+P or Mut-HmC-286L+P"

2) Annealing and synthesis of mutant DNA strand
2.5 μl　10 fmol / μl pAKI59 or pAKI86
x μl　Selection primer
　2.5 μl 0.5 pmol / μl Sel-pETp
　or 2.5 μl 0.05 pmol / μl Sel-pETp
x μl　Mutagenesis primer
　1.25 μl 100 pmol / μl Mut-HmS178p
　or 2.5 μl 5 pmol / μl Mut-HmS290p
　or 2.5 μl 0.5 pmol / μl Mut-HmC174L+P
　or 2.5 μl 0.5 pmol / μl Mut-HmC286L+P
3.0 μl　10 X One-Phor-All Buffer PLUS
Up to 20.0 μl　dH_2O
↓ Incubated in a boiling water bath (95 - 100 ℃) for 5 min
↓ Placed in an ice-water bath and incubated for 5 min
↓ Flash centrifugation
↓ Stood at room temperature for 30 min
↓ Added 7.0 μl of Nucleotide Mix
↓ Added 3.0 μl of Reaction Mix
↓ Incubated at 37 ℃ for 1 h
↓ Incubated at 85 ℃ for 30 min
↓ Flash centrifugation
↓ Placed on ice
"Mutagenesis reaction mix"

3) 1st restriction enzyme selection
30 μl Mutagenesis reaction mix
↓ Added 11.4 μl of dH_2O
↓ Added 7.0 μl of 10 X One-Phor-All Buffer PLUS
↓ Added 1.6 μl of 6.0 U / μl *Sph*I (TaKaRa)
↓ Incubated at 37 ℃ for 2 h
"RE reaction mix"

4) Transformation of BMH71-18 *mut*S by electroporation
↓ Diluted 1 μl RE reaction mix with 5 μl of dH_2O
↓ Thawed 40 μl BMH71-18 *mut*S cells on ice
↓ Added 1 μl diluted RE reaction mix and mixed by gentle pipetting
↓ Placed on ice for 1 min

↓ Transferred to an ice-cold BTX electroporation cuvette
↓ Electroporated (2.45 kV, 1.29 ohm)
↓ Added 0.96 ml of LB pH 7.5 immediately
↓ Mixed and transferred to a 15 ml Falcon tube
↓ Incubated at 37 ℃ for 1 h (shake)
↓ Added 4 ml of LB pH 7.0 / Amp (62.5 μg / ml)
↓ Incubated at 37 ℃ overnight (shake)

5) Plasmid extraction
↓ Extracted plasmid from 4.2 ml culture by RPM Kit (Funakoshi)
↓ Checked the existence of mutant plasmid by restriction enzyme digestion of 5 μl plasmid solution
Mut-HmS178p and Mut-HmC174L+P : *Xba*I + *Nru*I, existence of 6.0 and 1.1 kbp bands
Mut-HmS290p and Mut-HmC286L+P : *Xba*I + *Stu*I, existence of 5.7 and 1.4 kbp bands
↓ Calculated the concentration of the plasmid solution from the intensity of bands in the agarose gel under UV light

6) 2nd restriction enzyme selection

x μl	Plasmid solution
	Mut-HmS178p : 10.0 μl (= 100 ng)
	or Mut-HmS290p : 10.0 μl (= 100 ng)
	or Mut-HmC174L+P : 15.0 μl (= 125 ng)
	or Mut-HmC286L+P : 9.3 μl (= 125 ng)
10.0 μl	10 X One-Phor-All Buffer PLUS
3.3 μl	6.0 U / μl *Sph*I
Up to 30.0 μl	dH_2O

↓ Incubated at 37 ℃ for 2 h
↓ Added 1.6 μl of 6.0 U / μl *Sph*I
↓ Incubated at 37 ℃ for 2 h
"2nd RE reaction mix"

7) Transformation of NovaBlue, plasmid extraction and restriction enzyme check
通常の方法で行った。
Transformation : 20 μl of NovaBlue competent cells (Novagen) with 1 μl of 2nd RE reaction mix
Plasmid extraction : RPM Kit or FlexiPrep Kit
Restrictiion enzyme check : Mut-HmS178p and Mut-HmC174L+P : *Xba*I + *Nru*I, 6.0 and 1.1 kbp bands
Mut-HmS290p and Mut-HmC286L+P : *Xba*I + *Stu*I, 5.7 and 1.4 kbp bands

(2) キメラタンパク質発現プラスミドの構築
通常の方法で行った。

(3) BL21(DE3)pLysSの形質転換
通常の方法で行った。

(4) 変異タンパク質の発現
第2章第1節 1 (2)と同様。ただし、IPTG添加後の培養温度は15 ℃。

2 キメラタンパク質の活性
Assay TLC3により酵素活性を検討した。

第3節 活性中心の直後のアミノ酸
すべて第1節と同様。

1 縮合反応の副生成物
ピーナツSTSの反応
Assay HPLC1に従って行った。

2 ピーナツSTSのCHS活性

(1) GCMS
1)生成物のメチル化
適量のMeOHに溶かし、trimethylsilyldiazomethaneを充分加え、遮光して室温で30分間以上放置した。窒素気流下で濃縮してGCMSに供した。
2)測定条件

GC :	Hewlet Packard 5890
MS :	JEOL JMS-SX102A
Column :	J&W DB5 (30 mm X 0.25 mm, Film thickness 0.25 mm)
Carrier gas :	He
Initial time :	0 min
Initial temperature :	200 ℃
Rate :	10 ℃ / min
Final temperature :	250 ℃
Initial time :	30 min
Accel ON time :	3 min

(2) STSの精製

1) Standard assay
各ステップにおけるSTS活性は以下の方法に準じて行った。
エッペンドルフチューブにenzyme solution 80 μl、1 mM *p*-coumaroyl-CoA 10 μl (final conc. 0.1mM)、0.1mM [^{14}C] malonyl-CoA 10 μl (0.37 KBq , final conc. 0.01mM)を混合し、voltexした後チューブ壁についた試薬を軽く遠心して落とし、37℃ で 15 min インキュベートした。50 μl の 50 % AcOH を加えて反応を停止後、200 μl の AcOEt で抽出し、遠心分離 (15,000 rpm×1 min) した。上清 (AcOEt 層) の150 μl をTLC プレートに標品 (resveratrol)と共にスポットし、benzene : acetone : AcOH = 60 : 40 : 1 で展開した。標品のスポットを UV (254 nm) で確認後かきとりシンチレーター (ACS-II、Amersham)に懸濁してシンチレーションカウンターでカウントした。

2)培養
STS 発現プラスミド pET-3d-STSを保持する*E.coli* を glycerol stock から白金耳で LB 培地 (Amp. 100 μg/ml 、Cm. 25 μg/ml) 5 ml 植菌し、37 ℃ で 1 晩振とう培養した (以後pre-cultureと呼ぶ) 。LB培地 100 ml (Amp. 100 μg/ml、Cm. 25 μg/ml) 3 本にpre-culture をそれぞれ1 ml ずつ入れ、37 ℃ で 2 h 振とう培養した。IPTG (isopropyl-β-thiogalactopyranoside、和光純薬) を最終濃度が 0.4 mM になるように加え、37℃で 2 h 振とう培養した。

3)収穫
300 ml のculture を 2 本に分け、遠心(6,000 rpm × 15 min)によって培地を除去し菌体を集めた。さらに dist. water に懸濁して遠心により菌体を洗浄した後、菌体を buffer A (10 mM KH_2PO_4 , 2 mM DTT , pH 7.5) 20 ml に懸濁した。

4)ホモジナイズ
上記の懸濁液をソニケーターでホモジナイズした (10 s × 15 回) 。この際、温度が上昇しないように氷中で菌液を冷やしながら操作を行った。遠心 (12,000 rpm × 20 min) により菌壁や破砕されなかった菌体を沈澱させ、上清を crude ext. とした。

これ以降は4℃で作業を行った。

5)硫安分画

crude ext.の全量は19 mlであった。うち、1 mlをtotal assay及びSDS-PAGE用にサンプリングし、残りの18 mlに40 % sat.となるように5.85 gの$(NH_4)_2SO_4$を粉末のまま加え、30 min撹拌した。遠心(12,000 rpm × 20 min)して上清をとり、さらに80 % sat.となるように5.85 gを加え遠心して上清を除いた。沈殿をbuffer A 5 mlに溶解し、buffer Aに対して透析した。透析後の全量は8.6 mlであり、そのうち1 mlをサンプリングし、残りの7.6 mlをDEAEイオン交換カラムクロマトグラフィーにかけた。

6) DEAE TOYOPERALによる陰イオン交換カラムクロマトグラフィー

透析の終わった蛋白溶液7.6 mlをbuffer Aであらかじめ平衡化したカラム(2.5 φcm × 4.0 cm)に吸着させた後、100 mlのbuffer Aで洗い、NaCl濃度0 - 0.5 Mのliner gradientで蛋白を溶出させ(buffer A及びbuffer B:,10 mM KH_2PO_4 2 mM DTT, 0.5 M NaCl, pH 7.5を用いた)、グラジエントの開始から7.2 mlずつグラジエントが終わるまで集めた。さらに150 mlのbuffer C (10 mM Na-Pi, 2 mM DTT, 1 M NaCl, pH 7.5)で洗った。溶出曲線をFig. 80に示した。このうち7 - 14本めを集めて硫安を90 % sat.になるように加え、30分撹拌した後、遠心により沈殿を集めた。沈殿をbuffer A 5 mlに溶解した後、buffer Aに対して透析し、次のステップに進んだ。

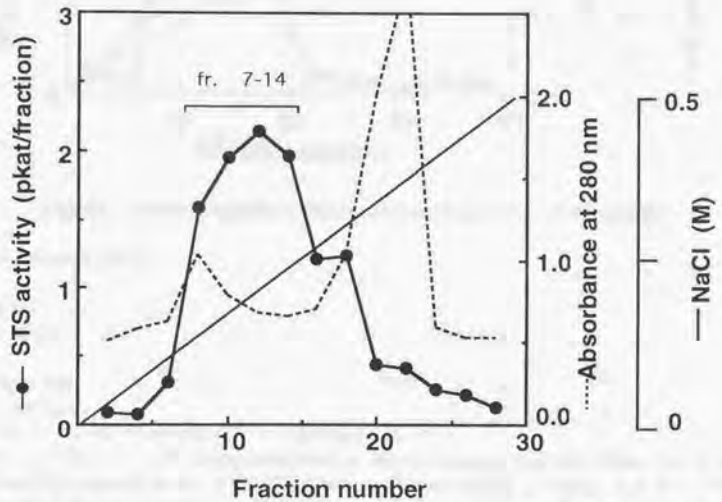


Fig. 80. DEAE ion exchange choromatography on DEAE TOYOPERAL.

7) Hydroxyapatite によるカラムクロマトグフィー

透析の終了したフラクション（9.5 ml, うち1 ml をサンプリングしたので残り 8.5 ml ）を buffer A であらかじめ平衡化したカラム（2.5 ϕ cm × 6.0 cm ）に吸着させ、100 ml の buffer A で洗い、K-Pi 濃度 10-300 mM の liner gradient で溶出させ（buffer A 及び buffer C ; 300 mM KH_2PO_4 , 2 mM DTT , pH 7.5 ）、グラジエント開始から7.2 ml ずつ終了まで集めた。さらにカラムを 150 ml の buffer C で洗った。溶出曲線を Fig. 81 に示した。10 - 16 本めを集め、限外濾過（YM-5 , ϕ 43mm , amicon , N_2気流下 ; 2次圧 3.5 kg/cm^2)により 6 ml まで濃縮してこれを精製酵素溶液とした。

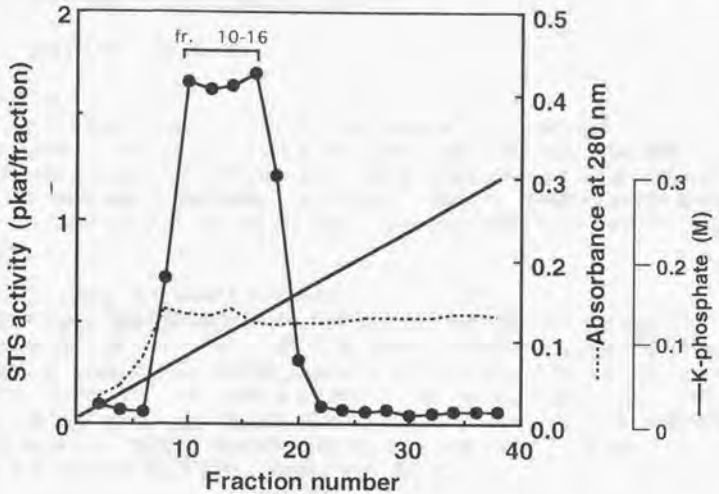


Fig. 81. Hydroxyapatite column chromatography on Biogel HT.

3　クズCHSのSTS活性

(1) GCMS

2 と同様に行った。

(2) CHSの精製

1) Standard assay

各ステップにおけるCHS活性は以下の方法に準じて行った。

エッペンドルフチューブにenzyme solution 80 μ l、1 mM *p*-coumaroyl-CoA 10 μ l (final conc. 0.1mM) 、0.1mM [^{14}C] malonyl-CoA 10 μ l (0.37 KBq , final conc. 0.01mM)を混合し、voltexした後チューブ壁についた試薬を軽く遠心して落とし、37℃ で 15 min. インキュベートした。50 μ l の 50 % AcOH を加えて反応を停止後、200 μ l の AcOEt で抽出し、遠心分離 (15,000 rpm.×1 min.) した。上清（AcOEt 層）の150 μ l をTLC プレートに標品（naringenin)と共にスポットし、benzen : acetone : AcOH = 80 : 20 : 1 で展開した。標品のスポットを UV (254 nm) で確認後かきとってシンチレーター（ Amarsham ACS-II) に懸濁してシンチレーションカウンターでカウントした。

2) 培養

CHS 発現プラスミド pET 3d-CHSを保持する*E.coli* を glycerol stock から白金耳で LB 培地 (Amp. 100 μ g/ml 、Cm. 25 μ g/ml) 5 ml 植菌し、37 ℃ で 1 晩振とう培養した（以後pre-cultureと呼ぶ）。LB 培地 100 ml （Amp. 100 μ g/ml、Cm. 25 μ g/ml ）3 本にpre-culture をそれぞれ1 ml ずつ入れ、37 ℃ で 2 h 振とう培養した。IPTG (isopropyl-β-thiogalactopyranoside、和光純薬) を最終濃度が 0.4 mM になるように加え、37℃で 4 hr 振とう培養した。

3) 収穫

300 ml のculture を 2 本に分け、遠心(6,000 rpm × 15 min)によって培地を除去し菌体を集めた。さらに dist. water に懸濁して遠心により菌体を洗浄した後、菌体を buffer A (10 mM KH_2PO_4 , 2 mM DTT , pH 7.5) 20 ml に懸濁した。

4) ホモジナイズ

上記の懸濁液をソニケーターでホモジナイズした（10 s × 15 回）。この際、温度が上昇しないように氷中で菌液を冷やしながら操作を行った。遠心（12,000 rpm × 20 min ）により菌壁や破砕されなかった菌体を沈澱させ、上清を crude ext. とした。

これ以降は 4 ℃ で作業を行った。

5) 硫安分画

Crude ext. の全量は 16 ml であった。うち、1 ml を total assay 及び SDS-PAGE 用にサンプリングし、残りの18 ml に30 % sat. となるように 3.46 gの $(NH_4)_2SO_4$ を粉末のまま加え、30 min 撹拌した。遠心 (12,000 rpm × 20 min) して上清をとり、さらに80 % sat. となるように 5.77 g を加え遠心して上清を除いた。沈殿を buffer A 5 ml に溶解し、buffer A に対して透析した。透析後の全量は 7.6 ml であり、そのうち 1 ml をサンプリングし、残りの6.6 ml を DEAE イオン交換カラムクロマトグラフィー にかけた。

6) DEAE TOYOPERAL による陰イオン交換カラムクロマトグラフィー

透析の終わった蛋白溶液 6.6 ml を buffer A であらかじめ平衡化したカラム（2.5 φ cm × 4.0 cm）に吸着させた後、100 ml の buffer A で洗い、NaCl 濃度 0 - 0.5 M の liner gradient で蛋白を溶出させ (buffer A 及び buffer B : ,10 mM KH_2PO_4 2 mM DTT , 0.5 M NaCl , pH 7.5 を用いた)、グラジエントの開始から 5.8 mlずつグラジエントが終わるまで集めた。さらに150 ml の buffer C (10 mM Na-Pi, 2 mM DTT, 1 M NaCl , pH 7.5) で洗った。溶出曲線を Fig. 82に示した。このうち 5 - 12 本めを集めて硫安を 90 % sat. になるように加え、30分撹拌した後、遠心により沈澱を集めた。沈澱をbuffer A 5 ml に溶解した後、buffer A に対して透析し、次のステップに進んだ。

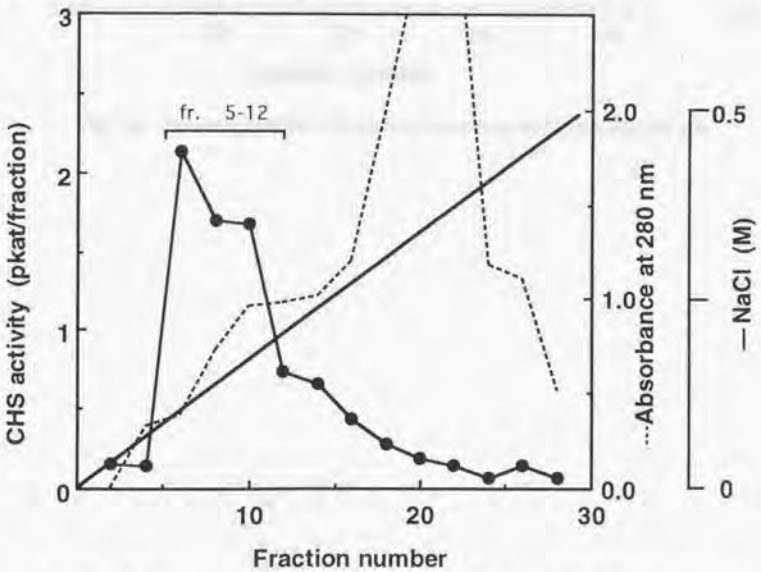


Fig. 82. DEAE ion exchange choromatography on DEAE TOYOPERAL.

7) Hydroxyapatite によるカラムクロマトグフィー

透析の終了したフラクション（8.0 ml, うち1 ml をサンプリングしたので残り 7.0 ml)を buffer A であらかじめ平衡化したカラム (2.5 ϕ cm × 6.0 cm) に吸着させ、100 ml の buffer A で洗い、K-Pi 濃度 10-300 mM の liner gradient で溶出させ（buffer A 及び buffer C : 300 mM KH_2PO_4 , 2 mM DTT , pH 7.5) 、グラジエント開始から6.0 ml ずつ終了まで集めた。さらにカラムを 150 ml の buffer C で洗った。溶出曲線を Fig. 83 に示した。15 - 25 本めを集め、限外濾過（YM-5 , ϕ 43mm , amicon , N_2気流下：2次圧 3.5 kg/cm^2)により 7.2 ml まで濃縮した。buffer D （ 25 mM imidazole - HCl , 2 mM DTT , pH 7.4）に対して透析後、1 ml をサンプリングし残りをクロマトフォーカシングにかけた。

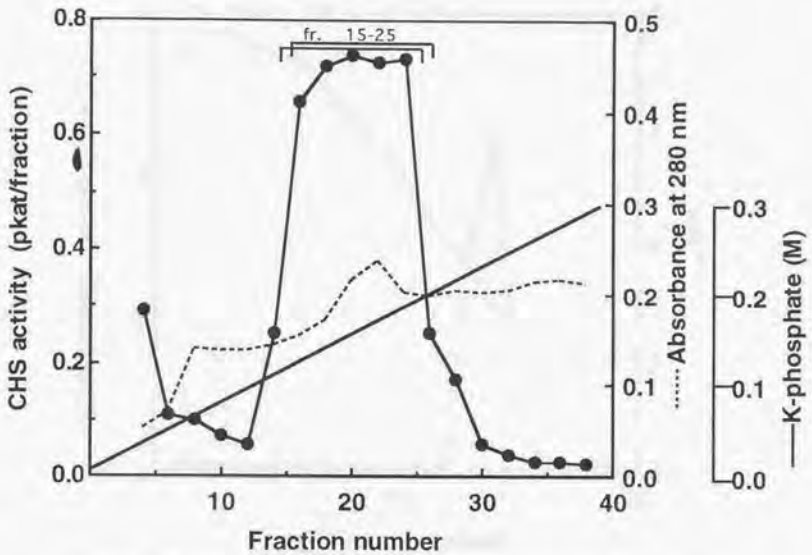


Fig. 83. Hydroxyapatite column chromatography on Biogel HT.

8) クロマトフォーカシング

方法はファルマシア社のプロトコールに従った。

Buffer D であらかじめ平衡化したPBE 94 を詰めたカラム（1.2 ϕ cm × 18 cm）に試料6.2 ml を吸着させた後、buffer E (Polybuffer 74-HCl、2 mM DTT 、pH 5.0) 225 ml で溶出させた。溶出曲線を Fig. 84 に示した。13-15本目を集め、80%sat. 硫安溶液にした後 、あらかじめbuffer F (10 mM KH_2PO_4 , 2 mM DTT , 80% sat. $(NH_4)_2SO_4$, pH 7.5)で平衡化したButyl-Toyopearl カラム（1.2 ϕ cm × 4.4 cm）に吸着させた。カラムを 20 ml のbuffer F で洗った後、80 ml のbuffer A で蛋白を溶出させ、この画分 80 ml を限外濾過により濃縮して精製酵素溶液とした。

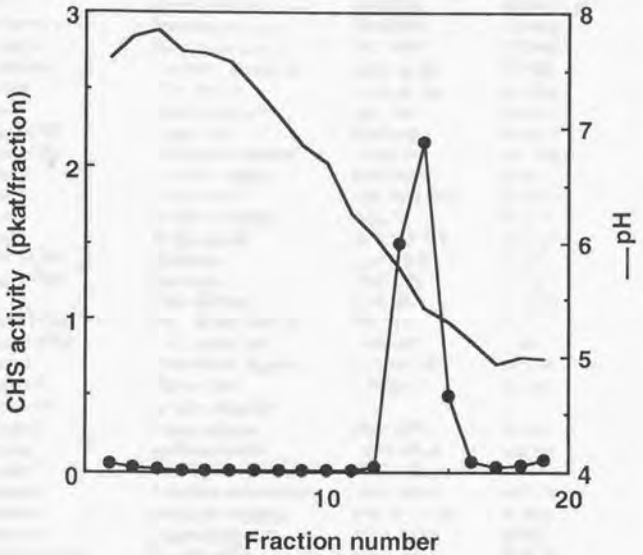


Fig. 84 Chromatoforcusing on PBE 94.

(1) PKSの配列データ

系統樹作成に使用した配列は以下の通り。

Label (family and function)	Species	Genbank locus	Accession	Comment
Saxifragaceae CTAS	*Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii*	AB011468	AB011468	This study
Compositae Not CHS	*Gerbera hybrida*	GHCHS2	Z38097	
Orchidaceae BBS	*Phalaenopsis* sp.	PSBSY	X79903	
Rutaceae ACS	*Ruta graveolens*	RGACRSYN	Z34088	
Solanaceae 1	*Petunia hybrida*	PHCHSB	X14592	
Convolvulaceae 1	*Ipomoea purpurea*	IPU15946	U15946	
Convolvulaceae 2	*Ipomoea purpurea*	IPU15947	U15947	
Caryophyllaceae	*Dianthus caryophyllus*	DCCHSMR	Z67982	
Vitaceae STS	*Vitis vinifera*	VVSTSYM	X76892	
Cruciferae 3	*Matthiola incana*	MICHSY	X17577	
Cruciferae 1 CHS	*Sinapis alba*	SASCHS3	X14314	
Cruciferae 2 CHS	*Arabidopsis thaliana*	ATHCHS	M20308	
Gramineae 1	*Hordeum vulgare*	HVCHS2	Y09233	
Gramineae 4	*Oryza sativa*	OSCHALSYN	X89859	
Gramineae 2	*Hordeum vulgare*	X58339	X58339	
Gramineae 3	*Secale cereale*	SCRNACHS	X92547	
Gramineae 5 CHS	*Zea mays*	ZMWHPCS	X60204	
Gramineae 6 CHS	*Zea mays*	ZMC2CS	X60205	
Vitaceae	*Vitis vinifera*	VVCHS	X75969	
Umberiferae 1 CHS	*Petroselinum crispum*	PHCHAL	V01538	
Compositae 1 CHS	*Gerbera hybrida*	GHCHS1	Z38096	
Compositae 2	*Callistephus chinensis*	CCCHSMR	Z67988	
Leguminosae 9	*Glycine max*	GMCHS1	X54644	
Leguminosae STS	*Arachis hypogaea*	-	-	[22]
Leguminosae 1	*Pisum sativum*	PEACHS1	D10661	
Leguminosae 2	*Medicago sativa*	ALFCHS2A	L02902	
Leguminosae 3	*Medicago sativa*	ALFCHS1A	L02901	
Leguminosae 4	*Trifolium subterraneum*	TFRCHS1A	M91193	
Leguminosae 5	*Phaseolus vulgaris*	PVCHALCSN	X06411	
Leguminosae 6	*Vigna unguiculata*	VUCHSCH	X74821	
Leguminosae 7 CHS	*Pueraria lobata*	PUECHS	D10223	
Leguminosae 8	*Glycine max*	SOYCHS7A	M98871	
Pinaceae CHS	*Pinus sylvestris*	PSCHS	X60754	
Pinaceae 1 STS	*Pinus strobus*	PSSTS2	Z46915	
Pinaceae 2 STS	*Pinus sylvestris*	PSBBS	X60753	
Scrophulariaceae CHS	*Antirrhinum majus*	AMCHS	X03710	
Umberiferae 2	*Daucus carota*	DARCHS9	D16256	
Solanaceae 4	*Petunia hybrida*	PHCHSD	X14593	
Solanaceae 2	*Petunia hybrida*	PHCHSG	X14595	
Solanaceae 3	*Petunia hybrida*	PHCHSF	X14594	
Solanaceae 5	*Petunia hybrida*	PHCHSJ	X14597	
Solanaceae 6	*Lycopersicon esculentum*	LETCHS2	X55195	
Solanaceae 7 CHS	*Petunia hybrida*	PHCHSA	X14591	
Solanaceae 8	*Solanum tuberosum*	STU47739	U47739	
Saxifragaceae CHS	*Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii*	AB011467	AB011467	This study
Theaceae	*Camellia sinensis*	CMAVEG13A	D26593	
Juglandaceae	*Juglans* sp.	JSPCHS1	X94995	

(2) アラインメントと系統樹の作成

DNA Data Bank of Japan (DDBJ)のインターネットサービス (http://www.ddbj.nig.ac.jp/htmls/E-mail/clustalw-j.html) によって行った。このサービスでは、配列のアラインメントはCLUSTAL W [41] によって、系統樹の作成も同じプログラムによって近隣結合法[42]により行われる。

(3) 系統樹の描画

(2)で得られたデータをもとに、TreeView PPC ver. 1.4 (http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.htmlよりダウンロード) [43]を用いて行った。

参考文献

1.
Schröder, J. (1997) *Trends Plant Sci.* **2,** 373-378.
A Family of Plant-Specific Polyketide Synthases: Facts and Predictions
2.
Kreuzaler, F., Ragg, H., Heller, W. Tesch, R., Witt, I., Hammer, D. & Hahlbrock, K. (1979) *Eur. J. Biochem.* **99,** 89-96.
Flavanone Synthase from *Petroselinum hortense* : Moleculer Weight, Subunit Composition, Size of Messenger RNA, and Absense of Pantetheinyl Residue
3.
Schöppner, A. & Kindl, H. (1984) *J. Biol. Chem.* **259,** 6806-6811.
Purification and Properties of a Stilbene Synthase from Induced Cell Suspension Cultures of Peanut
4.
Welle, R. & Griesebach, H. (1987) *Z. Naturforsch.* **42c,** 1200-1206.
Purification and Properties of Chalcone Synthase from Cell Suspension Cultures of Soybean
5.
Tropf, S., Kaelcher, B., Schröder, G. & Schröder, J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270,** 7922-7928.
Reaction Mechanisms of Homodimeric Plant Polyketide Synthases (Stilbene and Chalcone Synthase) : A Single Active Site for The Condensing Reaction Is Sufficient for Synthesis of Stilbenes, Chalcones, and 6'-Deoxychalcones
6.
Hopwood, D. A. (1997) *Chem. Rev.* **97,** 2465-2497.
Genetic Contribution to Understanding Polyketide Synthases
7.
Kreuzaler, F., Light, R. A. & Hahlbrock, K. (1978) *FEBS Lett.* **94,** 175-178.
Flavanone Synthase Catalyzes CO_2 Exchange and Decarboxylation of Malonyl-CoA
8.
Kreuzaler, F. & Hahlbrock, K. (1975) *Eur. J. Biochem.* **56,** 205-213.
Enzymatic Synthesis of an Aromatic Ring from Acetate Units : Partial Purification and some Properties of Flavanone Synthase from Cell-Suspension Cultures of Petroselinum hortense
9.
Martin, C. R. (1993) *Int. Rev. Cytol.* **147,** 233-284.
Structure, Function, and Regulation of the Chalcone Synthase
10.
Preisig-Müller, R., Gnau, P. & Kindl, H. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* **317,** 201-207.
The Inducible 9, 10-Dihydrophenanthrene Pathway : Characterization and Expression of Bibenzyl Synthase and S-Adenosylhomocysteine Hydrolase
11.
Junghanns, K. T., Kneusel, R. E., Baumert, A., Maier, W., Gröger, D. & Matern, U. (1995) *Plant Mol. Biol.* **27,** 681-692.
Molecular Cloning and Heterologous Exprission of Acridone Synthase from Elicited *Ruta graveolens* L. Cell Suspension Cultures
12.
Yoshikawa, M., Uchida, E., Chatani, N., Murakami, N. & Yamahara, J. (1992) *Chem. Pharm. Bull.* **40,** 3121-3123.
Thunberginols A, B, and F, New Antiallergic and Antimicrobial Principles from Hydrangeae Dulcis Folium
13.
Yoshikawa, M., Uchida, E., Chatani, N., Kobayashi, H., Naitoh, Y., Okuno, Y., Matsuda, H., Yamahara, J. & Murakami, N. (1992) *Chem. Pharm. Bull.* **40,** 3352-3354.
Thunberginols C, D, and E, New Antiallergic and Antimicrobial Dihydroisocoumarins, and

Thunberginol G 3'-O-Glucoside and (-)-Hydrangenol 4'-O-Glucoside, New Dihydroisocoumarin Glucosides, from Hydrangeae Dulcis Folium
14.
Yoshikawa, M., Ueda, T., Matsuda, H., Yamahara, J. & Murakami, N. (1994) *Chem. Pharm. Bull.* **42,** 1691-1693.
Absolute Stereostructures of Hydramacrosides A and B, New Bioactive Secoiridoid Gluciside Complexes from the Leaves of *Hydrangea macrophylla* SERINGE var. *thunbergii* MAKINO
15.
Yoshikawa, M., Harada (nee Uchida), E., Naitoh, Y., Inoue, K., Matsuda, H., Shimoda, H., Yamahara, J. & Murakami, N. (1994) *Chem. Pharm. Bull.* **42,** 2225-2230.
Development of Bioactive Functions in Hydrangeae Dulcis Folium. III. On the Antiallergic and Antimicrobial Principles of Hydrangeae Dulcis Folium. (1). Thunberginols A, B, and F
16.
Yoshikawa, M., Matsuda, H., Shimoda, H., Shimada, H., Harada, E., Naitoh, Y., Miki, A., Yamahara, J. & Murakami, N. (1996) *Chem. Pharm. Bull.* **44,** 1890-1898.
Development of Bioactive Functions in Hydrangeae Dulcis Folium. V. On the Antiallergic and Antimicrobial Principles of Hydrangeae Dulcis Folium. (2). Thunberginols C, D, and E, Thunberginol G 3'-O-Glucoside, (-)-Hydrangenol 4'-O-Glucoside and (+)-Hydrangenol 4'-O-Glucoside
17.
Ayabe, S., Udagawa, A. & Furuya, T. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* **261,** 458-462.
NAD(P)H Dependent 6'-Deoxychalcone Synthase Activity in *Glycyrrhiza echinata* Cells Induces by Yeast Extract
18.
Welle, R. & Grisebach, H. (1988) *FEBS Lett.* **236,** 221-225.
Isolation of a Novel NADPH-Dependent Reductase which Coacts with Chalcone Synthase in the Biosynthesis of 6'-Deoxychalcone
19.
Uesato, S., Takeda, Y., Hashimoto, T., Uobe, K., Inouye, H., Taguchi, H. & Endo, T. (1984) *Helv. Chim. Acta* **67,** 2111-2127.
Studies on Monoterpene Glucosides and Related Natural Products: Absolute Structures of Hydrangenosides A, B, C, D, E, F, and G. Novel Type Secoiridoid Glucosides from Two *Hydrangea* Plants
20.
Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. eds. Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, NY) (1987).
21.
Nakajima, O., Akiyama, T., Hakamatsuka, T., Shibuya, M., Noguchi, H., Ebizuka, Y. & Sankawa, U. (1993) *Chem. Pharm. Bull.* **39,** 1911-1913.
Isolation, Sequence and Bacterial Expression of a cDNA for Chalcone Synthase from the Cultured Cells of *Pueraria lobata*
22.
西岡瑞枝 (1996) 東京大学大学院薬学系研究科修士論文「スチルベン合成酵素の反応機構の研究」
23.
Frohman, M. A., Dush, M. K. & Martin, G. R. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85,** 8998-9002.
Rapid Production of Full-length cDNAs from Rare Transcripts: Amplification Using a Single Gene-specific Oligonucleotide Primer
24.
秋山卓美 (1993) 東京大学大学院薬学系研究科修士論文「カルコン合成酵素の反応機構・閉環反応における立体化学の解明」
25.

Stöckigt, J. & M. H. Zenk, M. H. (1975) *Z. Naturforsch.* **30c**,352-358 (1975)
Chemical Syntheses and Properties of Hydroxycinnamoyl-coenzyme A Derivatives
26.
Lanz, T., Tropf, S., Marner, F.-J., Schröder, J. & Schröder, G. (1991) *J. Biol. Chem.* **266,** 9971-9976.
The Role of Cysteines in Polyketide Synthases : Site-Directed Mutagenesis of Resveratrol and Chalcone Synthases, Two Key Enzymes in Different Plant-Specific Pathways
27.
Preisig-Müller, R., Gehlert, R., Melchior, F., Stietz, U. & Kindl, H. (1997) *Biochemistry* **36,** 8349-8358.
Plant Polyketide Synthase Leading to Stilbenoids Have a Domain Catalyzing Malonyl-CoA:CO_2 Exchange, Malonyl-CoA Decarboxylation, and Covalent Enzyme Modification and a Site for Chain Lengthening
28.
Tropf, S., Lanz, T., Rensing, S. A., Schröder, J. & Schröder, G. (1994) *J. Mol. Evol.* **38,** 610-618.
Evidence That Stilbene Synthase Have Developed from Chalcone Synthases Several Times in the Course of Evolution
29.
Helariutta, Y., Elomaa, P., Kotilainen, M., Griesbach, R. J., Schröder, J. & Teeri, T. H. (1995) *Plant Mol. Biol.* **28,** 47-60.
Chalcone Synthase-Like Genes Active during Corolla Development Are Differntially Expressed and Encode Enzymes with Different Catalytic Properties in *Gerbera hybrida* (Asteraceae)
30.
Morita, H., Noguchi, H., Akiyama, T., Shibuya, M. & Ebizuka, Y. (1998) *Proceedings of the International Synposium on Natural Medicines,* in press.
Chalcone Synthase from *Scutellaria baicalensis*
31.
Ohwaki, Y., Ogino, J. & Shibano, K. (1993) *Soil Sci. Plant Nutr.* **39,** 55-61.
3-Hydroxy-5-Methoxystilbene-2 Carboxylic Acid, a Phytotoxic Compound Isolated from Methanolic Extracts of Pigeonpea (*Cajanus cajan* Millsp.) Leaves
32.
Askari, A., Worthen, L. R. & Shimizu, Y. (1972) *Lloydia* **35,** 49-54.
Gaylussacin, a New Stilbene Derivatives from Species of *Gaylussacia*
33.
Miyaichi, Y., Imoto, Y., Kizu, H. & Tomimori, T. (1988) *Shoyakugaku Zasshi* **42,** 204-207.
Studies on thr Nepalese Crude Drugs (X): On the Flavonoid and the Stilbene Constituents of the Leaves of *Scutellaria scandens* BUCH. -HAM. ex D. DON
34.
Beck, J., Ripka, S., Siegner, A., Schiltz, E. & Schweizer, E. (1990) *Eur. J. Biochem.* **192,** 487-498.
The Multifunctional 6-methylsalicylic Acid Synthase Gene of *Penicillium patulum*: Its Gene Structure Relative to That of Other Polyketide Synthases
35.
Kurosaki, F. (1995) *Phytochemistry* **39,** 515-519.
Dimer as the Active Form of a Polyketide Biosynthetic Enzyme 6-Hydroxymellein Synthase
36.
Schröder, G. & Schröder, J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 20558-20560.
A Single Change of Histidine to Glutamine Alters the Substrate Preference of a Stilbene Synthase
37.
Beerhues, L. (1996) *FEBS Lett.* **383,** 264-266.
Benzophenone Synthase from Cultured Cells of *Centaurium erythraea*

38.
Zuurbier, K. W. M., Fung, S.-Y., Scheffer, J. J. C. & Verpoorte, R. (1995) *Phytochemistry* **38,** 77-82.
Formation of Aromatic Intermediates in the Biosynthesis of Bitter Acids in *Humulus lupulus*
39.
Borejsza-Wysocki, W. & Hrazdina, G. (1996) Plant Physiol. 110, 791-799.
Aromatic Polyketide Synthases: Purification, Characterization and Antibody Development to Benzalacetone Synthase from Raspberry Fruits
40.
Beckert, C., Horn, C., Schnitzler, J. P., Lehning, A., Heller, W. & Veit, M. (1997) *Phytochemistry* **44,** 275-283
Styrylpyrone Biosynthesis in *Equisetum arvense*
41.
Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994) *Nucl. Acids Res.* **22,** 4673-4680.
CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice
42.
Saitou, N. & Nei, M. (1987) *Mol. Biol. Evol.* **4,** 406-425.
The Neighbor-joining Method: a New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees
43.
Page, R. D. M. (1996) *Comput. Applic. Biosci.* **12,** 357-358.
TreeView: an Application to Display Phylogenetic Trees on Personal Computers

本研究の成果は、以下の場において発表された（もしくは、発表の予定である）。

学会発表

1. 秋山卓美、渋谷雅明、海老塚豊　日本薬学会第117年会（1997年3月　東京、講演要旨集2、p178）

アマチャpolyketide synthaseのcDNAクローニング

2. Akiyama, T., Shibuya, M. & Ebizuka, Y. International Synposium on Natural Medicines (1997. 10, Kyoto, Abstracts of papers p66)

cloning of polyketide synthases from *Hydrangea macrophylla* SERINGE var. *thunbergii* MAKINO

3. 秋山卓美、渋谷雅明、海老塚豊　日本薬学会第118年会（1998年3月　京都）

アマチャpolyketide synthaseのcDNAクローニング (3) ミュータント酵素の活性と反応機構

4. 山口利男、梅澤早織、黒崎文也、三川潮、西岡瑞枝、劉宏民、渋谷雅明、中島治、秋山卓美、袴塚高志、海老塚豊　日本薬学会第117年会（1997年3月　東京、講演要旨集2、p178）

スチルベン及びカルコン合成酵素の反応生成物の解析

5. Yamaguchi, T., Kurosaki, F., Sankawa, U., Nishioka, M., Akiyama, T., Nakajima, O., Noguchi, H., Shibuya, M. & Ebizuka International Synposium on Natural Medicines (1997. 10, Kyoto, Abstracts of papers p64)

Cross reactions of chalcone and stilbene synthases

印刷公表

1. Akiyama, T., Shibuya, M. & Ebizuka, Y. cDNA cloning of polyketide synthases from *Hydrangea macrophylla* SERINGE var. *thunbergii* MAKINO, *Proceedings of the International Synposium on Natural Medicines*, in press.

2. Akiyama, T., Shibuya, M. & Ebizuka, Y. A new type of plant polyketide synthases: cDNA cloning and analysis of enzyme activity. in preparation.

3. Yamaguchi, T., Kurosaki, F., Sankawa, U., Nishioka, M., Akiyama, T., Nakajima, O., Noguchi, H., Shibuya, M. & Ebizuka, Y. Cross reactions of chalcone and stilbene synthases, in preparation.

謝辞

本研究を行うにあたり、終始懇切な御指導を賜りました東京大学大学院薬学系研究科教授　海老塚豊先生に心から感謝いたします。

長い間、直接指導して下さった天然物化学教室の渋谷雅明先生に深く感謝いたします。

東京大学在任中の親切な御指導はもとより、現職に就かれてからもたびたび貴重な御助言を頂きました富山医科薬科大学教授　三川潮先生に厚く御礼を申し上げます。

小林重雄先生、野口博司先生（現静岡県立大学教授）、藤井勲先生、折原裕先生、袴塚高志先生（現東京理科大学講師）、市瀬浩志先生をはじめとする天然物化学教室（旧生薬学・植物化学教室）および附属薬用植物園の皆様には、多くの御助言、御教示を頂きました。深く感謝いたします。

実験の面で御協力を頂いた、富山医科薬科大学薬学部生薬学教室の皆様に感謝いたします。

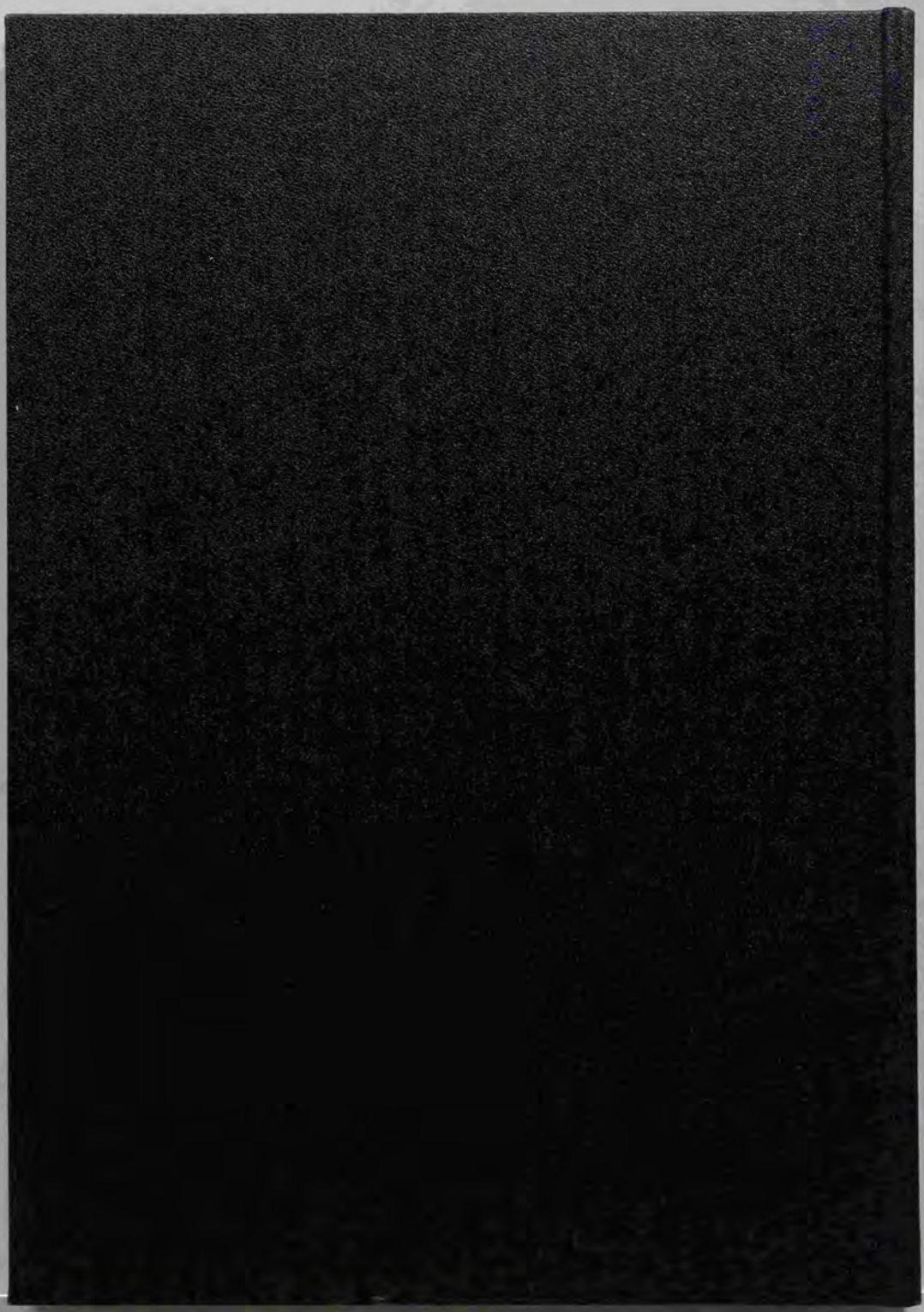
LC-APCIMSの測定をして下さいましたサーモクエスト（株）の皆様に感謝いたします。

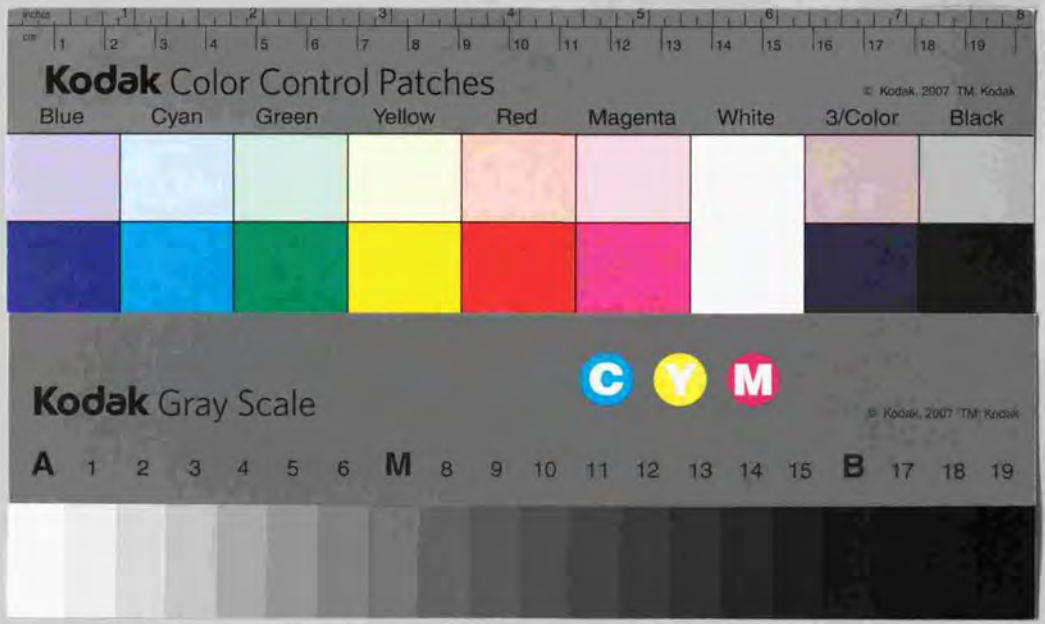
そして最後になりましたが、通常の年限を超えて博士課程に在学して研究を続けることを許してくれた両親に、心から感謝いたします。

平成十年二月

秋山 卓美

秋山　卓美




inches
cm
Kodak Color Control Patches
© Kodak, 2007 TM Kodak
Blue
Cyan
Green
Yellow
Red
Magenta
White
3/Color
Black
Kodak Gray Scale
C
Y
M
© Kodak, 2007 TM Kodak
A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19