

イチョウにおけるフラボノイドの 生成と制御機構

会沢栄志 * ** · 兼行民治郎 * ** · 寺田珠実 * · 鮫島正浩 * · 鴨田重裕 ****

Production and Regulation of Flavonoids in *Ginkgo biloba*.

Eishi AIZAWA* **, Tamijiro KANEYUKI* **, Tamami TERADA* ,
Masahiro SAMEJIMA* , Shigehiro KAMODA****

1. はじめに

植物は膨大な数のフェノール性化合物を有しているが、その中で最も広範なグループはフラボノイドと総称される。フラボノイドとして、フラボン・フラバノン・イソフラボン・フラボノール・アントシアンなどが挙げられるが、いずれもカルコンシンターゼ (CHS) の働きにより生合成されるカルコンが出発物質となる。フラボノイド類は植物体内で抗生物作用、共生生物との相互作用という機能を持ち、また花の色素、光傷害保護物質などとして働くと言われている¹⁾。例えば、根粒菌の体内で根粒形成に必要な遺伝子の発現を開始させるため、マメ科植物の根からフラボンやフラボノールがシグナル物質として送り出されるということが報告されている²⁾。

イチョウ (*Ginkgo biloba*) はイチョウ綱、イチョウ科、イチョウ属に分類される雌雄異株の裸子植物であり、イチョウ綱に属する唯一の生存種である³⁾。イチョウ以外のイチョウ綱に属する植物はすべて化石として見つかったのみで、そのためイチョウは生きた化石ともいわれる。イチョウは有用な薬理活性を持ち、ギンナンと呼ばれる種子や葉の抽出物が喘息、気管支炎等の治療に効果があるとされ、古くから漢方薬として用いられてきた。現在ではドイツやフランスで脳機能障害や痴呆症への効果が臨床的に認められ、医薬品として欧米を中心に大きな需要がある⁴⁾。医薬品として世界 30 ヶ国以上で広く使用されているものは、シュワーベ製薬 (Dr. Willmar Schwabe Arzneimittel: ドイツ) とイプセン社 (Ipsen: フランス) が共同開発した EGb761 (Extractum Ginkgo bilobae 761) といわれるイチョウ葉エキスであり、薬効成分としてフラボノールとその配糖体を主とするフラボノイドを 24%、ギンコライド等のテルペノイドを 6% 含むものとして規格化されたものである⁵⁾。これらの成分は抗酸化作用を有し、末梢神経に対する損傷や酸欠、虚血などの条件下で神経保護作用を持つ事が報告されている⁶⁾。イチョウのテルペノイドについては詳細に研究されている^{7, 8)} 一方、フラボノイドについては、イチョウ培養細胞で菌由来のエリシターや重金属の添加によりフラボノールの量が急増するという報

* 東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学専攻
Department of Biomaterial Sciences, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

** 独立行政法人国際協力機構
Japan International Cooperation Agency

** * 日本製紙株式会社
Nippon Paper Industries Co., Ltd.

** * * 東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林樹芸研究所
Arboricultural Research Institute, The University of Tokyo Forests, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

告⁹⁾があるものの極めて少ないのが現状である。

フラボノイドがイチョウの植物体内でどのような役割を果たしているのかを知ることは非常に重要である。イチョウの CHS については、UV 照射および傷処理を行った各部位（根、茎、葉）より発現が確認され、オープンリーディングフレーム部位の DNA 塩基配列が決定されている¹⁰⁾が、CHS の発現挙動とイチョウのフラボノイドの生成との関連については調べられていない。そこで本研究では、イチョウの有用成分であるフラボノイドに着目し、その生成と制御機構について探ることとした。

2. 試料と実験方法

2.1 試料

東京大学農学部構内のイチョウから採取した葉および胚を本実験に用いた。なお、葉については、時系列に沿って4種類の葉（つぼみ状の葉、つぼみ状から開き始めた葉、つぼみ状から開き終えた葉、つぼみ状から開き終えて約30日後の葉）をそれぞれ採取した（Fig.1）。

2.2 フェノール性成分の分析

イチョウの葉を液体窒素下ですりつぶし絶乾重量を測定後、終濃度80%となるようにメタノールを加えて1ヶ月間室温で抽出して、以下の全フェノール、フラボノール分析用サンプルとした。

80%メタノール抽出液を適量に希釈したのち、Folin-Denis 法¹¹⁾で全フェノール量の定量を行った。なお、この際に測定した吸光度は700nmであり、検量線はカテキンを用いて作成した。

検出器を分光光度計とした高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によりフラボノイド類の検出ならびに定量を試みた。278nmの波長でフェノール性成分全体の、365nmの波長でフラボノールの検出を行った。また、主要フラボノールであるケルセチン、ケンフェロール、イソラムネ

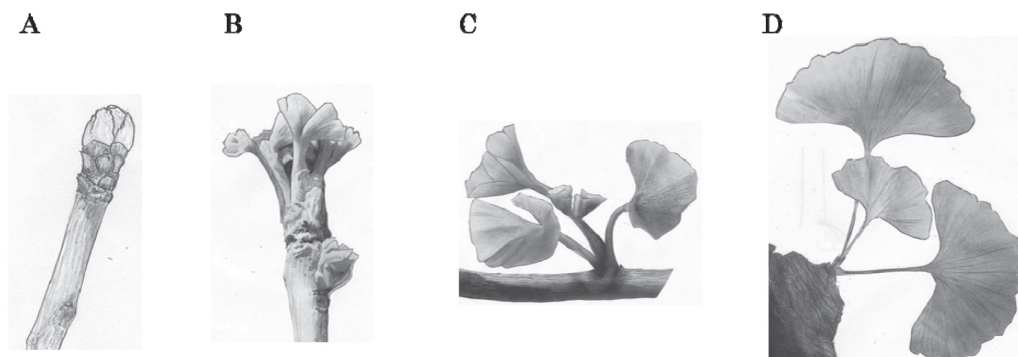


Fig.1 採取したイチョウの葉の絵。A: つぼみ状の葉, B: つぼみ状から開き始めた葉, C: つぼみ状から開き終えた葉, D: つぼみ状から開き終えて30日後の葉。

Fig.1 Illustration of sampled ginkgo leaves. A: Buds; B: Breaking buds; C: Leaves after bud-break; D: 30 days-after bud-break.

チンの3つの成分の定量を行い、その合計をフラボノール量とした。HPLCの使用条件は以下の通りである。

機種:LC-10A (島津製作所)

カラム:Phenomenex Luna C18 (2) 150mm x ϕ 4.6mm
(島津ジーエルシー)

溶離液:メタノール・0.005% TFA 水

グラディエント:20-100% / 20min

流速:1.0ml/min

検出波長:UV365nm, 278nm

2.3 ゲノムライブラリーの作成

2.3.1 DNAの抽出

DNA Extraction Kit PHYTOPURE (GEヘルスケア)を用いて、付属のプロトコールに従いイチョウの胚からDNAを抽出した。

2.3.2 制限酵素 *Sau3A I* による部分分解

約 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ に希釈したDNA溶液 $300 \mu\text{l}$ に、 $1\text{U}/\mu\text{l}$ の制限酵素 *Sau3A I* を $0.9 \mu\text{l}$ 加えて、 37°C の恒温槽においた。15分毎に最大120分までサンプリングを行った。それぞれのサンプルをフェノール・クロロホルムによる処理およびエタノールによる沈殿を行い、 $4.5 \mu\text{l}$ のTEバッファーに溶かした。なお、フェノール・クロロホルムによる処理後に電気泳動(0.4%アガロースゲル, 50V, 1.5hour)を行い、レーン4のDNA断片を以降の実験に用いた (Fig.2, 3)。

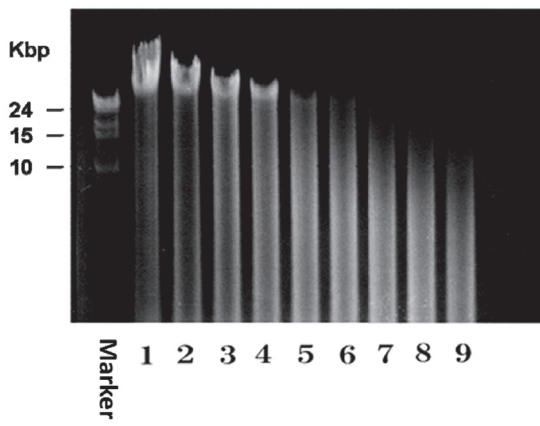


Fig.2 *Sau3A I* による部分分解の電気泳動写真。

1: コントロール, 2~9: 分解時間 15分~120分, マーカー:Lamda DNA Mixed Digest (Sigma-Aldrich)。

Fig.2 Electrophoresis image of restriction enzyme digestion. 1: Control; 2-9: Digestion time 15-120 min.; Marker: Lamda DNA Mixed Digest (Sigma-Aldrich).

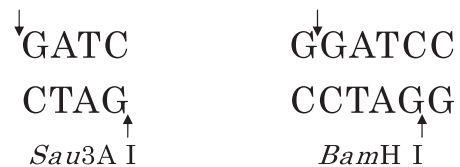


Fig.3 *Sau3A I* と *BamH I* の認識領域。

Fig.3 Restriction site of *Sau3A I* and *BamH I*.

2.3.3 ライゲーションおよび形質転換

あらかじめ制限酵素 *Bam*H I (TAKARA) で切断してアルカリフォスファターゼ処理した pWE15 コスミドベクターを用いて、Ligation kit (TAKARA) により、付属のプロトコールに従ってライゲーションを行った。ベクターに組み込まれた DNA を、Gigapack III XL Packaging Extracts (STRATAGENE) を用いて付属のプロトコールに従いパッケージングし、大腸菌 XL1blueMR に導入した。

2.4 カルコンシンターゼ遺伝子の解析

2.4.1 ゲノムライブラリーからのスクリーニング

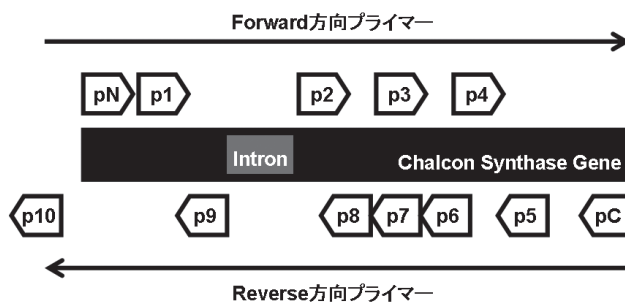
アンピシリンを含む LB 培地にて大腸菌を培養し、アルカリプレップ法によりプラスミドを抽出した。抽出したプラスミドをテンプレートとして、プライマー-p1 および p7 を用いて PCR を行った。PCR は、PCR Thermal Cycler Dice Model TP600 (TAKARA) を使用し、94℃ :1 分、(94℃ :20 秒, 60℃ :20 秒, 72℃ :90 秒) × 30cycle, 72℃ :4 分の反応条件とした。PCR 反応産物の 100 倍希釈したものをテンプレートとして、プライマー-p1 および p8 を用い、同様条件のもと再度 PCR を行った。当該反応産物を、p1, p8 それぞれのプライマーおよび DNA Sequencing Kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (APPLIED BIOSYSTEMS) を用いてシーケンス反応を行い、シーケンサー (ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer) (APPLIED BIOSYSTEMS) により配列の特定を行った。CHS 遺伝子と思われる配列を含む大腸菌を培養してボイルプレップを行い、これまでと同様に PCR による検出を行い、大腸菌コロニーを 1 つに特定した。なお、プライマー-p1, p7, p8 は複数のマツ属とブドウとピーナッツの CHS 遺伝子およびスチルベン合成酵素遺伝子の共通配列より設計した。プライマーの配列を Fig.4 に示した。

2.4.2 サブクローニング

コスミドゲノムライブラリーに含まれるプラスミドはおよそ 50kbp の長さであり、直接テンプレートとして塩基配列を読むには長過ぎる。そのため、*Eco*R I (TAKARA) と *Hind* III (TAKARA) を用いて部分分解を行った後に、電気泳動およびサザンハイブリダイゼーションを行い、CHS 遺伝子と思われる配列を含む 6kbp 程度の断片を特定した。この断片を含むゲルを切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) により DNA を抽出し、DNA Ligation Kit ver2 (TAKARA) を用いて pUC119 ベクターにつないだ。その後、Competent High JM109 (TOYOBO) に形質転換した。培養した大腸菌コロニーに対して、ゲノムライブラリーからのスクリーニングと同様に 2 段階の PCR でのスクリーニングを行い、CHS 遺伝子と思われる配列を含む大腸菌コロニーを特定した。

2.4.3 シーケンスによる塩基配列の決定

特定したコロニーを大量培養した後、アルカリプレップ法によりプラスミドを抽出し、さらに LEG 法¹²⁾ による精製を行った。精製したプラスミドをテンプレートとして、プライマーに p1, p7, p8 を用いてシーケンス反応を行い、CHS 遺伝子と思われる配列を決定した。その配列の中から新しいプライマー (p2, p3, p4, p5, p6, p9, p10) を設計し (Fig.4), それを用いてさらに塩基配列を読み進めた。この作業を繰り返すことによって、CHS 遺伝子と思われる配列全てを決定した。



pN: ATGCCTGCAGGAGCGATG
p1: GCTTCGATCCTTGC(CT)ATYGG(AC)AC
p2: CAGGACATGGTGGTGGTGGA
p3: GTTCTCGTGGTTTGCAGTGA
p4: GAGTCCAAGCTCAACCTCAA
pC: TTAATTGTTGCAGGGAACGCT
p5: TTGCGCATTTGTCGAGGAT
p6: GGAACGTCACCGCCGTTAT
p7: AGAACGGT(TG)CC(AT)CCGGC(AG)AAGCA(CAG)CC
p8: CTTAGACTTGGGCTGTCCCA
p9: ATCGGGATAATTGCTCTGCTCG
p10: TGAGAATTCATGGTCATGCC

Fig.4 プライマーの塩基配列と位置。

Fig.4 Base sequences and location of primers.

2.4.4 mRNA の抽出

イチョウの種子（ギンナン）から胚を取り出し、その胚に光を5分間照射したものと、光を照射していないものを準備した。RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて、付属のプロトコールに従い全RNAを抽出した。また、BioMag mRNA Purification Kit (PERSEPTIVE BIOSYSTEMS) を用い、付属のプロトコールに基づいてmRNAを精製した。抽出されたmRNAを対象として、実験2.4.3で決定した塩基配列の5'末端および3'末端より設計したプライマーpN, pC (Fig.4) を用いてRT-PCRを行った。その際、mRNA Selective PCR Kit (TAKARA) を用いて、30℃:10分、42℃:30分、5℃:5分、PCR反応では(85℃:50秒、55℃:1分、72℃:2分)×30サイクルによるRT-PCRを行った。得られたPCR産物を電気泳動で確認したのち、ゲノム配列の決定時に使用したプライマーを用いてシーケンス反応を行い、CHS遺伝子であることを確認した。

3. 結果と考察

3.1 成分分析

イチョウ葉のメタノール抽出物をHPLC分析に供したところ、278nmでは非常に多くのピークが検出された（データ未発表）が、フェノール性化合物すべてを帰属させ同定することはできなかった。そこで今回は、フェノール性成分については、Folin-Denis法に基づく全フェノール

量として定量することに、また HPLC にて同定することのできたフラボノールについては、その含有量を調べることにした。Fig.5 に 365nm で検出されたクロマトグラムを示した。酸加水分解するとこれらのピークは3本に集約され、標品とのスパイキングならびにスペクトルの一致（データ未発表）からそれぞれケルセチン、ケンフェロール、イソラムネチンと同定された。イチョウにおいて多くのフラボノールが配糖体の形で存在していることがわかった。

葉のステージ毎に、全フェノール量およびフラボノールの含有量について調べたものを Fig.6 に示した。フラボノール量については、つぼみ状の葉は微量しか有しておらず、つぼみ状から開き始めた葉には多く含まれていることがわかった。また、つぼみ状から開き終えた葉は、生長とともにフラボノール量が減少することがわかった。なお、つぼみ状から開き始める前後の葉については、フェノール量はほとんど変化がないにもかかわらず、このうち含まれるフラボノール量が劇的に増加していることがわかった。これらのことから、フラボノールの前駆体となるフェノ

A. 酸加水分解前

B. 酸加水分解後

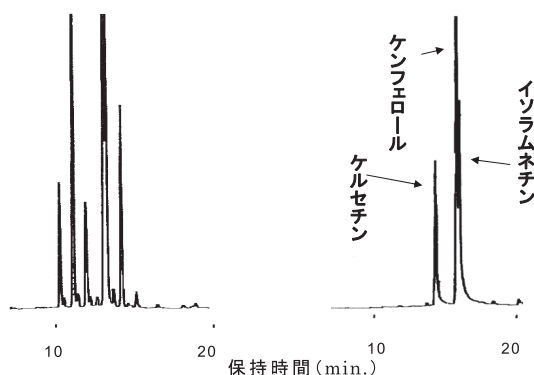


Fig.5 イチョウの葉における 80%メタノール抽出物の HPLC クロマトグラム。

Fig.5 HPLC-chromatogram of 80% methanol extract of ginkgo leaves.

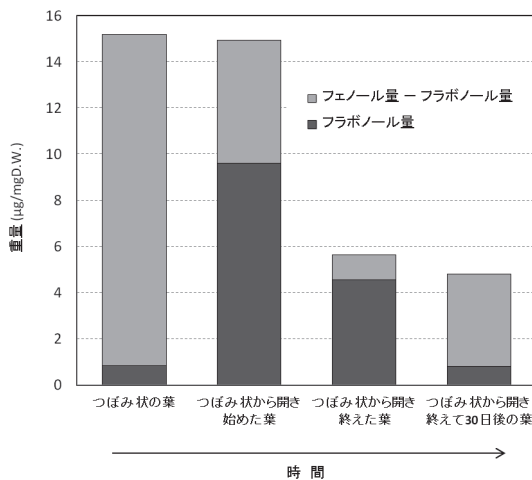


Fig.6 イチョウの葉におけるフェノール量およびフラボノール量の時系列変化。

Fig.6 Time series variation for amounts of phenol and flavonol in ginkgo leaves.

ール性化合物が、葉の展開とともにフラボノールに代謝されたことが見込まれる。また、フラボノール代謝に関わる酵素が葉の展開とともに働きだしたことが、葉の生長に伴いフラボノールが生成されなくなることが推測できる。フラボノールは光吸収極大が紫外光領域にあり、UV 遮光色素として植物を紫外線による傷害作用から防護するという働きを持つ²⁾とされている。また、イチョウ培養細胞では、UV 照射によりフラボノールであるケルセチンおよびケンフェロールの細胞中の含有量が増加するという報告がされている¹³⁾。そのため、葉が展開することにより光の刺激を受け、その防護策としてフラボノールを一気に生成したということが見込まれる。そこで、このフラボノールの生成が実際に遺伝子レベルでコントロールされているのかを調べるために、フラボノイド代謝のキーエンザイムである CHS 遺伝子について、上流の情報を含めた解析を行っていくことにした。

3.2 カルコンシンターゼ遺伝子の解析

今回配列を決定したイチョウの CHS 遺伝子は、既に報告されているイチョウの CHS の配列とは 96% の相同性を有するものの、異なるものであった (Fig.7)。また、既に報告されている

```

1 AGATTGTTAA TGGATCTACG GAAGCCACAA CAAACGTTCC TATTAACCAC ATATATGGCA
61 TGACCATGAA ATTCTCAACG ACAAGACGAG ACACCTTTAC GTCTTCACCT TTCCTTCCAT
121 GACGTGATT TCCAAC TAAC CCTCGACTC CCACCTACTC AGGATTCCCC AGTATAAACA
181 TGGCAACAAC ATCCATTCTT ACTCAAAGCC TCGCCTCATT CCCTTCCACG AGCTTGGTTC
241 TCTCGCCTCT GATCTCGTTC AGCAGATTGT AGTCCAGAAT GCCTGCAGGA GCGATGGAGG
301 ATTTGGAGGC ATTCAGAAAG GCACAGAGAT CGGATGGTCC AGCCACTATA CTGGCAATCG
361 GCACTGCTAC TCCTCCCAAT GCGGTCGAGC AGAGCAATTA TCCCGATTAC TACTCCGAA
421 TTACCAACAG CGAGCACAAG ACGGAGCTCA AGGAGAAATT CAAGCGCATG TGTAACTGT
481 GTTTATGTTT TATTTGTG TCAATTGAAT TGATTATATG TGTATGGATA GTTATAAGAA
541 TATGGGGAAT CGATGGTGAG ATCTAATTGT AAATATGGCC GGTCGTGCAG GCGACAAGTC
601 ATCGATAAAG AAAAGATACA TGTACTTGAC GGAGGAGATA CTGAAGGAGA AGCCGGAGGT
661 GTGGCAGTAC ATGGCGCCTT CGCTTGACGC ACGGCAGGAC ATGGTGGTGG TGGAGGTGCC
721 CCGGCTGGGA AAAGAAGCGG CGGCCAAGGC GATAAAGGAG TGGGGGCAGC CAAAGTCGAA
781 GATAACTCAC CTCATATTCT GCACAACAAG CGGGGTGGAC ATGCCGGGGG CCGACTACCA
841 GCTGACGAAG CTGCTGGGGC TTCGACCGGG CGTGAAGAGA GTTATGATGT ACCAGCAAGG
901 CTGCTTCGCG GGAGGCACCG TCCTGAGAGT GGCAAAGGAT CTCGCCGAGA ACAACAGAGG
961 AGCGCGCGTT CTCGTGGTTT GCAGTGAAAT AACGGCGGTG ACGTTCGGGG GCGCAGCGA
1021 CACTCATTGG GACAGTCTGG TGGGGCAGGC GCTATTTGGA GACGGGGCAG CCGCGGTGAT
1081 AGTGGGAGCC AATCCCATCG CAGATGTGGA GAAGCCGTCC TTCCAACCTC TCTGGACCGG
1141 CCAGACCATT CTCCCGACA GCGACGGTGC CATCGACGGG CACCTGCGAG AGGTCCGGCT
1201 AACCTTCCAC CTCCTCAAGG ACGTCCCGG CCTCATCTCC AATAACATTG AGAAGAGCCT
1261 TGTGGAGGCC TTCCATCAGT TCGGCATCTC CGATTGGAAT GAGCTCTTCT GGATCGCTCA
1321 TCCTGGTGGC CCCGCCATTC TCGACCAGGT CGAGTCCAAG CTCAACCTCA ACCCTCTCAA
1381 GATGAAGGCC ACCAGGCAGC TTCTCAGCGA GTACGGCAAC ATGTCCAGCG CCTGCGTTCT
1441 CTTATCCTC GACGAAATGC GCAAATCCTC TATCAAAAAC GGTTGTTCAA CGACGGGCGA
1501 AGGACTCGAC TGGGGTGTCC TATTTGGCTT CGGCCCTGGC CTCACCGTCG AGACTGTCTG
1561 CCTAAGAAGC GTTCCCTGCA ACAATTAATA TAAGTACATG TAGAGCCAGT GAGTGACTTC
1621 AAAGTATTCT TCAGCAGGTT TTTGAGTGTG GCCGGGAGCA TAAATTTCTA GCTGTGACGC
1681 AAGGGCTTAG ATCTACACTA TATAAATCC ATAAATTGGC AGTTAATTTG TCGTATAATC
1741 AAATAATACG AGCATATTTT AAGGGCAATT CGTTTCTCCC TCATA

```

Fig.7 イチョウ CHS 遺伝子の全塩基配列。

CACGTG (灰色) :G-ボックス, TATA (灰色) :TATAボックス, ATG から TAA まで (下線) :オープンリーディングフレーム, GTA から CAG まで (灰色) :イントロン, AATAAA (灰色) :ポリA付加信号。

Fig.7 Entire base sequences of Ginkgo CHS gene.

GACGTG (gray) : G-box; TATA (gray) : TATA-box; ATG-TAA (underline) : open reading frame; GTA-CAG (gray) : intron; AATAAA (gray) : Polyadenylation signal.

配列はオープンリーディングフレームのみが確認されていたが、今回の実験によりオープンリーディングフレームに加えて上流の 278 塩基および下流の 197 塩基の全遺伝子の配列を決定することができた。

今回決定した配列を見ると、プロモーター領域には TATA ボックスと思われる配列が見られ、また TATA ボックスよりもさらに上流には CACGTG (G-ボックス) が見られた。G-ボックスは、光誘導性遺伝子のプロモーター部位によく見られる配列として知られている¹⁴⁾。また、下流配列にはポリ A 付加信号が確認された。

今回決定した DNA 配列をアミノ酸配列に変換し、裸子植物（ドイツウヒ、ヨーロッパモミ、オニマツ）の既知の CHS アミノ酸配列と比較したものを Fig.8 に示した。これら 4 種類のアミノ酸配列は、活性中心部位の他に、カルコンが生合成される際のサイクリゼーションに関わるとされる部位を共通して有することが確認された^{15, 16)}。この遺伝子の CHS としての活性等の有無について確認は行っていないが、これら共通の領域と上流に G-ボックスが存在することを考え合わせると、光刺激に応答して発現する CHS 遺伝子ではないかと思われた。

そこで胚を用いて光刺激が CHS 遺伝子を誘導するかどうかを調べることにした。光非照射胚と光照射胚のそれぞれで mRNA の比較を行った結果を Fig.9 に示した。光非照射胚と光照射胚の両方において CHS の mRNA 配列が確認された。先の実験でゲノムライブラリーより決定した塩基配列と、光非照射胚では同じ配列のみ、光照射胚では同じ配列に加え異なる配列も検出された。そのため、先のゲノムライブラリーより決定した CHS 様塩基配列は、上流配列に光誘導

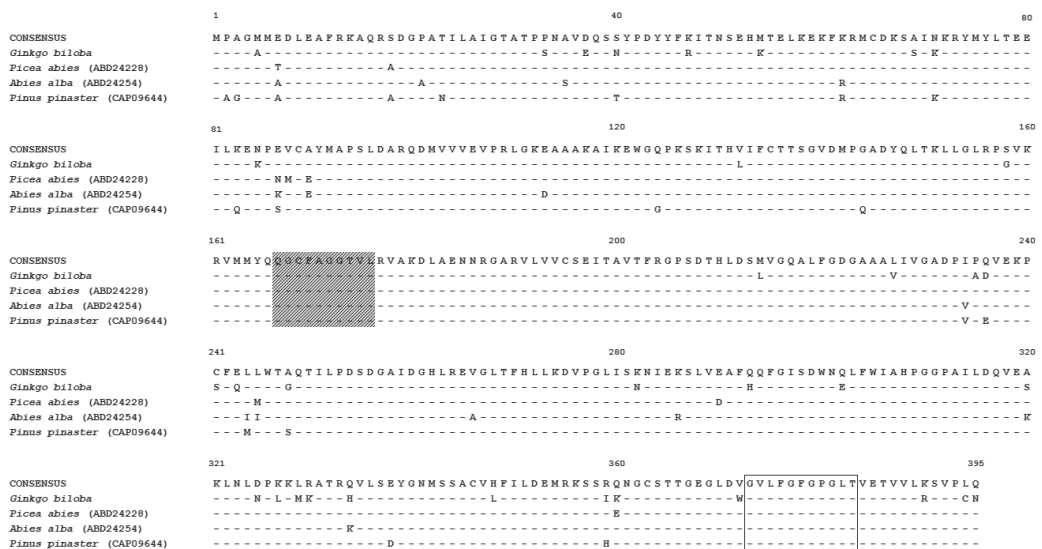


Fig.8 イチョウ、ドイツウヒ、ヨーロッパモミ、オニマツにおける CHS のアミノ酸配列の比較。QGCFAGGTVL (網掛け部分) : 活性中心, GVLF GFGPGLT (囲み部分) : サイクリゼーションの関連部位。コンセンサスと同じアミノ酸をハイフン (-) で示し、異なるアミノ酸を一文字表記で示す。

Fig.8 A comparison of amino acid sequences of CHS in *Ginkgo biloba*, *Picea abies*, *Abies alba* and *Pinus pinaster*. QGCFAGGTVL (shaded sequences) : an active center; GVLF GFGPGLT (boxed sequences) : a part relative to cyclization. Identity with consensus is denoted by dashes and differences are indicated by the amino acid designation.

要 旨

イチョウ (*Ginkgo biloba* L.) は、葉の抽出エキスが医薬品として欧米を中心に広く利用されている。今回、イチョウ葉エキスの主要成分であるフラボノイドに着目し、その生成と制御機構について調べた。その結果、イチョウの葉に含まれるフラボノールの量は、葉がつぼみ状から開く際に劇的に増加し、その後、生長とともに減少することが確認された。また、フラボノイド合成の出発酵素であるカルコンシンターゼ (CHS) の全塩基配列が決定され、その中には光誘導性遺伝子のプロモーター部位によく見られる G-ボックス配列が確認された。そこで光照射・非照射胚より調製した mRNA の配列を比較したところ、両者から先のゲノムライブラリーから決定したのと同じ配列が、さらに光照射胚からは異なる配列も確認された。イチョウの持つ CHS 遺伝子には、光刺激に対して応答するもの、しないものと、複数存在することがわかった。イチョウの葉におけるフラボノールの生合成については、光によって誘導され、その制御は CHS を含むフラボノイド生成に関わる酵素により行われていることが示唆された。

キーワード

イチョウ, 葉エキス, フラボノイド, カルコンシンターゼ (CHS), 光照射

引用文献

- 1) Buchanan, B.B., Grisseem, W., and Jones, R.L. (杉山達夫翻訳監修) (2005) 植物の生化学・分子生物学. 1180-1185pp., 学会出版センター.
- 2) Heldt, H.W. (金井龍二訳) (2000) 植物生化学. 353-355pp., シュプリンガー・フェアラーク東京, 東京.
- 3) 湯浅明 (1981) イチョウの植物学. 植物と自然 15 (11) :4-10.
- 4) Sticher, O. (1993) Quality of ginkgo preparations. *Planta. Med.* 59:2-11.
- 5) Smith, P.F., Macleannan, K., and Darlington, C.L. (1996) The neuroprotective properties of the *Ginkgo biloba* leaf: a review of the possible relationship to plateletactivating factor. *J. Ethnopharmacol.* 50: 131-139.
- 6) Arora, A., Nair, M. G., and Strasburg, G. M. (1997) Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radical Biol. Medicine* 24:1355-1363.
- 7) van Beek, T.A. (2005) Ginkgolides and bilobalide: Their physical, chromatographic and spectroscopic properties. *Bioorg. Medici. Chemistry* 13:5001-5012.
- 8) Inoue, H., Kamoda, S., Terada, T., and Saburi, Y. (1998) Ginkgolide production in relation to organogenesis in *Ginkgo biloba*. *J. Wood Science* 44:375-378.
- 9) Kim, M.S., Kim, C., Jo, D.H., and Ryu, Y. W. (1999) Effect of fungal elicitor and heavy metals on the production of flavonol glycosides in cell cultures of *Ginkgo biloba*. *J. Microbial. Biotechnol.* 9: 661-667.
- 10) Pang, Y., Shen, G., Wu, W., Liu, X., Lin, J., Tan, F., Sun, X., and Tang, K. (2005) Characterization and expression of chalcone synthase gene from *Ginkgo biloba*. *Plant Science* 168:1525-1531.
- 11) Folin, O., and Denis, W. (1912) On phosphotungstic phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* 12:239-243.
- 12) 近藤寿彦・向正則・池田哲也 (1991) 塩化リチウムと臭化エチジウムを併用する高純度プラスミド DNA の迅速分離法. *細胞工学* 10:473-476.
- 13) Kim, M.S., Lee, W.K., Kim, H.Y., Kim, C., and Ryu, Y.W. (1998) Effect of environmental factors on flavonol glycoside production and phenylalanine ammonia-lyase activity in cell suspension cultures of *Ginkgo biloba*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 8: 237-244.

- 14) 岩淵雅樹・篠崎一雄 (2001) 植物ゲノム機能のダイナミズム . 147-159pp., シュプリンガー・フェアラーク東京, 東京 .
- 15) Ferrer, J.L., Jez, J. M., Bowman, M. E., Dixon, R. A., and Noel J. P. (1999) Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nature structural biology* 6:775-783.
- 16) Suh, D.Y., Fukuyama, K., Kagami, J., Yamazaki, Y., Shibuya, M., and Ebizuka, Y. (2000) Identification of amino acid residues important in the cyclization reactions of chalcone and stilbene synthases. *Biochem. J.* 350:229-235.
- 17) Totte, N., Charon, L., Rohmer, M., Compagnol, F., Baboeuf, I., and Geuns, J.M.C. (2000) Biosynthesis of the diterpenoid steviol, an ent-kaurene derivative from *Stevia rebaudiana* Bertoni, via the methylerythritol phosphate pathway. *Tetrahedron Letters* 41: 6407-6410.

(2012月8月29日受付)

(2012月11月21日受理)

Summary

Extracts of ginkgo leaves are widely used for medicine, mainly in the West. We focused on flavonoids, which are the chief compounds of the extracts, and studied mechanisms for their preparation and control. It was confirmed that the amounts of flavonol in ginkgo leaves rapidly increased when leaves opened and then gradually reduced after opening. Furthermore, entire base sequences of a chalcone synthase (CHS), which is a commencing compound for flavonoid, were determined using the genomic library. The sequences had G-box, seen frequently in light inducibility genes. Then, the sequences of mRNA prepared from embryos in light irradiation and in the dark were compared. While both embryos had the same sequences, determined from the genomic library, the different sequences were checked from embryos in light irradiation. Ginkgo trees seem to have two or more CHS genes reacting or not to a light stimulus. These results indicate that flavonol biosynthesis in ginkgo leaves is induced by light irradiation and is controlled by enzymes, including CHS, for flavonoids biosynthesis.

Key words

ginkgo, leaf extract, flavonoid, chalcon synthase (CHS), light irradiation