

# リグノスチルベンジオキシゲナーゼアイソザイム 遺伝子群の解析

鴨田重裕\*1・井上広喜\*2・寺田珠実\*3

## Analysis of the genes of Lignostilbenedioxygenase isozymes.

Shigehiro KAMODA\*1, Hiroki INOUE\*2, and Tamami TERADA\*3

### はじめに

スチルベンとカルコンは共にポリケチド合成酵素によって合成され、カルコン合成酵素は植物に普遍的に分布し、スチルベン合成酵素は偏在することが知られている<sup>1)</sup>。スチルベンにはファイトアレキシンとして有名であるが<sup>2-5)</sup>、マツ属の心材スチルベン<sup>6)</sup>やトウヒ属の樹皮スチルベン<sup>7)</sup>などマツ科樹木では構成的に存在するスチルベンが知られている。それらはいずれも防御物質と考えられる。一方、本研究で取り上げた *Sphingomonas paucimobilis* TMY1009 はそれらを分解する酵素を持つ<sup>8-10)</sup> 攻撃者と考えられる。著者らはスチルベンを介した、植物と植物を取りまく生物間の相互関係を詳らかにして行こうと考えている。*S. paucimobilis* TMY1009 は、4 位に水酸基を持つ *trans*-スチルベンを分解するリグノスチルベンジオキシゲナーゼ (LSD) アイソザイム群を産する<sup>8)</sup>。LSD には4つのアイソザイムが確認されており、それらは全て2量体酵素で $\alpha\alpha$ 、 $\alpha\beta$ 、 $\beta\beta$ そして $\gamma\gamma$ という構成を取ることが分かっている<sup>9,10)</sup>。これまでに $\alpha$ および $\beta$ サブユニットの遺伝子をクローニングし<sup>11,12)</sup>、大腸菌内で両遺伝子を同時に発現させることで $\alpha\beta$ ヘテロ2量体が産生されることも確認された<sup>13)</sup>。一方、酵素精製の過程では $\alpha\gamma$ および $\beta\gamma$ ヘテロ2量体は認められなかった<sup>9,10)</sup>。この様に $\gamma$ サブユニットは他のサブユニットと混成して2量体を構成しない可能性が高く、この点で特異的な存在と考えられた。LSDの4次構造と酵素機能との相関を探る観点からも、 $\gamma$ サブユニットが $\alpha$ ないし $\beta$ サブユニットとヘテロ2量体を形成するか否かは、大変興味深い重要なポイントである。本研究では $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ の各サブユニット遺伝子を特異的に検出するPCR primerを作製し、LSD遺伝子群の解析を行ったので報告する。

### 材料および実験方法

#### 1. $\gamma$ サブユニットのアミノ酸情報の取得

先ず、既報<sup>10)</sup>に従い *S. paucimobilis* TMY1009 を培養し、収集した菌体を超音波破碎し、ラムクロマトグラフィーにより LSD-IV ( $\gamma\gamma$ ) を電気泳動的に単一に精製した。更に RP-HPLC 精製を行い、収集した $\gamma$ サブユニットをリシルエンドペプチダーゼで消化し、その処理断片を RP-

\*1 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, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

\*2 理化学研究所植物科学研究センター  
RIKEN Plant Science Center

\*3 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 Science, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

HPLCにより単離した。未消化の $\gamma$ サブユニットおよび単離したペプチド p21 のN末端アミノ酸配列を分析した。

## 2. $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ サブユニット遺伝子検出プライマーの設計

ペプチド p21 のN末端アミノ酸配列中で $\alpha$ および $\beta$ と相同性が低い部分に対応する塩基配列を基に18merのアンチセンス方向のミックスプライマーを作製した (primer lsdC309r)。既知の $\alpha$ サブユニット遺伝子 (*lsdA*) の開始コドンを含むセンス方向20merを primer lsdA-N, 終止コドンを含むアンチセンス方向18merを primer lsdA-C, 全く同様に $\beta$ サブユニット遺伝子 (*lsdB*) の開始コドンを含むセンス方向20merを primer lsdB-N, 終止コドンを含むアンチセンス方向18merを primer lsdB-C Nとした。 $\gamma$ サブユニットのN末端1番目のアミノ酸残基Alaより6番目のThrまでのアミノ酸配列は $\beta$ サブユニットの配列に一致したので, primer lsdB-Nを $\gamma$ サブユニットのN末端側 primer に流用した。primer lsdA-N と primer lsdA-C を合わせて primer A set, primer lsdB-N と primer lsdB-C を合わせて primer B set, primer lsdB-N と primer lsdC309r を合わせて primer C set とした。

## 3. PCRの条件

Primer AおよびB setでは98°C1', (98°C20", 72°C2') $\times$ 30, primer C setでは98°C1', (98°C20", 45°C30", 72°C2') $\times$ 35でPCRを行った。DNAポリメラーゼは3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有するEx Taq (Takara社)を用いた。

## 4. PCR産物の確認と産物のTAクローニングと塩基配列の解析

*S. paucimobilis* TMY1009の全DNAに対して各primer setでPCRを行い, それらのPCR産物はアガロースゲル電気泳動によりサイズの確認を行った。次にその産物をpGEM-T Easy Vector System I (promega社)を用いてTAクローニングした。コンピテントセルは自作した*E. coli* DH5 $\alpha$ を用い, 培養はアンピシリン(100 $\mu$ g/ml)入りのLB培地で行った。

コロニーからボイル法でDNAを調製し, pGEM-T Easy Vectorのクローニングサイトの両側にあるT7プロモーターおよびSP6プロモーター配列のprimerを用いたPCRにより挿入断片のサイズ確認を行い, 陽性クローンの絞込みを行った。陽性クローンではPCR primer直後の塩基配列を解析した。解析にはアプライドバイオシステム社ABIプリズム310DNA解析装置を用いた。

## 結果と考察

$\gamma$ サブユニットをリシルエンドペプチダーゼで消化したペプチドのRP-HPLC解析の結果をFig.1に示した。矢印で示したペプチド p21 を単離し, 未消化の $\gamma$ サブユニットと共にN末端アミノ酸配列を分析し, 既知の $\alpha$ ,  $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列と比較した (Fig.2)。それらの情報を基に設計したprimerをFig.3に示した。そのprimer A, B, C setによる*lsd*遺伝子の検出状況をFig.4に示した。primer A setでは*S. paucimobilis* TMY1009の全DNA 或いは*lsdA* 遺伝子を含むプラスミド pKHN2590<sup>11)</sup>をテンプレートとした場合に1.5kbのPCR産物が認められ, *lsdB* 遺伝子を含むプラスミド pKHE1700<sup>12)</sup>をテンプレートとした場合にはPCR産物は認められなかった。同様に, primer B set では *S. paucimobilis* TMY1009 の全 DNA 或いは *lsdB* 遺伝子を含む

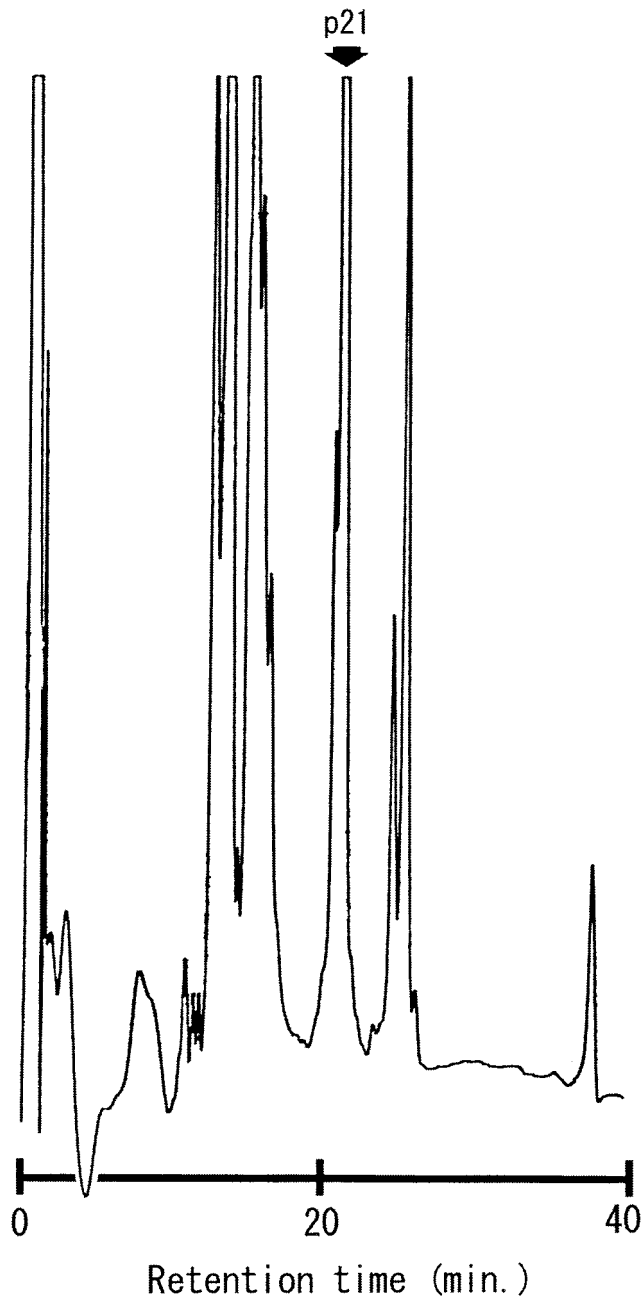


Fig. 1. RP-HPLC analysis of peptidase-digested  $\gamma$  subunits.

pKHE1700 をテンプレートとした場合に 1.5kb の PCR 産物が認められ、*lsdA* 遺伝子を含む pKHN2590 をテンプレートとした場合には PCR 産物は認められなかった。一方、primer C set で

```

1
A MAHFPQTPGFSGLRPLRIEGDILDIEIEGEVPPQLNGTFHRVHPDAQFPPRFEDDQFFNG
B MAHFPDTSGMTGVLRLRIEGDILDLEVEGEIPAQLDGTFRVHPDAQFPPRFEDDQFFNG
C AHFPDTPAFTGFNAPSRIE?DIPNL
61
A DGMVSLFRFHDGKIDFRQRYAQTDKWKVERKAGKSLFGAYRNPLTDDASVQGMIRGTANT
B DGMVSLFRFHDGKIDFRQRYAQTDKWKVERKAGKSLFGAYRNPLTDDASVQGMIRGTANT
121
A NVMVHAGKLYAMKEDSPCLIMDPLTLETEGYTNFDGKLQSQTFC AHPKIDPVTGNLCAFA
B NVMVHAGKLYAMKEDSPCLIMDPLTLETEGYTNFDGKLKNQTFSAHAKIDPVTGNFCNFG
181
A YGAKGLMTLDMAYIEISPTGKLLKEIPFQNPYYCMMHDFGVTEYAVFAVMPLLSWDRL
B YAATGLLTTDCSYFEIDPAGNLLFETEFQVPYYCMMHDYGLTEHYAIFHIVPCSPNWDRL
241
A EQRLPFFGFDTTLPCYLGI LPRN--GDARDLRWFKTGNCFVG-HVMNAFNDGTKVHIDMP
B KAGLPHFGFDTTLPVWLGVVPRGPGVTNKDVRWFKAPKTI FASHVMNAFEEGSKIHFDTF
p21
301
A VSRNNSFPFF-DVHGAPFDPVAGQGFLTRWTVDMASNGDSFEKTERLFDRPDEFPRIDER
B QAENNAFPFFPDIHGAPFDPVAARPYLHRWTVDLGSNSEDFAEVRQLTSWIDEFPRVDAR
p21 EAENNMFPFFPDVHGAGFN
361
A YATRAYRHGWMLILDTEKPYEAPGGAFYALT-NTLGHIDLATGKSSSWAGPRCAIQEPC
B YVGQPYRHGWGLVMDPEMEMEFARGRASGFKMNRIGHWDHATGKEDSWWCGPQSIQEPC
421
A FIPRSPDAPEGDGYVIALVDDHVANYSDLAIFDAQHVDQGP IARAKLPVRI RQGLHGNWA
B FVPRMADSAEGDGYI IALVDNLI TNYSDLVVLDALNLKDGPI GRAKLP IRLRSGLHGNWA
481
A DASRLAVAA
B DASKLPIAA

```

Fig. 2. Comparison of amino acid sequences of LSD subunits.

A; deduced from *lsdA*. B; deduced from *lsdB*. C; intact  $\gamma$  subunit. p21; peptide digested by peptidase.

The number shows amino acids sequence numbers.

The under lines show the primer positions.

は *S. paucimobilis* TMY1009 の全 DNA をテンプレートとした場合のみ 0.9kb の PCR 産物が認められ、*lsdA* 遺伝子を含む pKHN2590 ないしは *lsdB* 遺伝子を含む pKHE1700 をテンプレートとし

```

primer lsdA-N    ATGGCCCATTTCCCGCAGAC
primer lsdA-C    TCAGGCGGCGACGGCCAG
primer lsdB-N    ATGGCCCACTTCCCCGACAC
primer lsdB-C    TCAGGCGGCGATCGGCAG
primer lsdC-N    =    primer lsdB-N
primer lsdC309r  AASGGRAACATRTTTRTTYTC

```

Fig. 3. Primers specific for LSD subunits.  
S=G+C, R=A+G, Y=C+T

た場合には PCR 産物は認められなかった。このことから primer C set で検出されたものは *lsdA* および *lsdB* のいずれでもないと考えられた。

更に各 primer set による PCR 産物を TA クローニングし、それらの塩基配列解析を行った。まず、primer C set での結果について述べる。primer lsdB-N 直後の塩基配列は CCT-GCC-TTC-ACC-GGC-TTC-AAC-GCC-CCT-TCG-CGC-ATC-GAG-TGC-GAC-ATT-CCG-AAC-CTG であり、アミノ酸に翻訳すると PAFTGFNAPSRIECDIPNL となり、Fig.2 に示したインタクトな  $\gamma$  サブユニットの N 末端アミノ酸配列と一致した。また、primer lsdC309r 直後の塩基配列は CGC-TTC-GGG-CAC-GTC-GAC-ATG-GAC であり、相補鎖をアミノ酸に翻訳すると VHVDVPEA となり Fig.2 に示したペプチダーゼ消化したペプチド p21 の N 末端アミノ酸配列と一致した。このことから、primer C set を用い検出されたものは  $\gamma$  サブユニット遺伝子 (*lsdC*) であると考えられた。次に primer A, B set での結果について述べる。各クローンの primer 直後の塩基配列は、既知の *lsdA, B* の塩基配列と一致した。このことから、primer A, B set では *lsdA, B* 遺伝子がそれぞれ検出されることが確認された。以上のことから、primer A, B, C set により、*lsdA, B, C* 遺伝子を特異的に検出可能と考えられた。

TA クローニングでは陽性クローンが複数得られたので、それらの塩基配列を更に詳細に比較した。primer A set では 5 クローン、primer B set では 6 クローン、C set では 3 クローンをを用いた。解析は各クローンの N 末端側の 360 塩基と C 末端側の 360 塩基を用いて行った。Fig.5 に示したように primer A set では 5 クローン全てが互いに異なる配列を示し、既知の *lsdA* と一致するものは観察されなかった。それらはアミノ酸残基にして 8 箇所既知の *lsdA* の塩基配列と 1 ないし 2 塩基異なった。Fig.6 に示したように primer B set では 6 クローン中 4 クローンは既知の *lsdB* の塩基配列と一致した。残り 2 クローンは異なる箇所既知の *lsdB* の塩基配列と 1 塩基異なった。primer C set では 3 クローン全ての塩基配列は一致した。DNA ポリメラーゼによる転写ミスはどの場合にもほぼ同程度の確率で起こるものと考えられる。ところが *lsdA* では一塩基の置換が他に比べて多く観察された。想像の域を出ないが、このバリエーションの出現頻度はサブユニットをコードする遺伝子のコピー数を反映しているのではないかと思われた。LSD アイソザイムの中で LSD-I( $\alpha\alpha$ ) が最も多い<sup>9)</sup> のは、*S. paucimobilis* TMY1009 が *lsdA* 遺伝子を複数持つからで、*lsdB* 遺伝子は複数あるが *lsdA* 遺伝子より少なく、 $\gamma\gamma$  体が少ないのは *lsdC* 遺伝子が 1 つしか存在しないから、と説明できるのかも知れない。なお、現時点では *lsdA* 遺伝子群や *lsdB* 遺伝

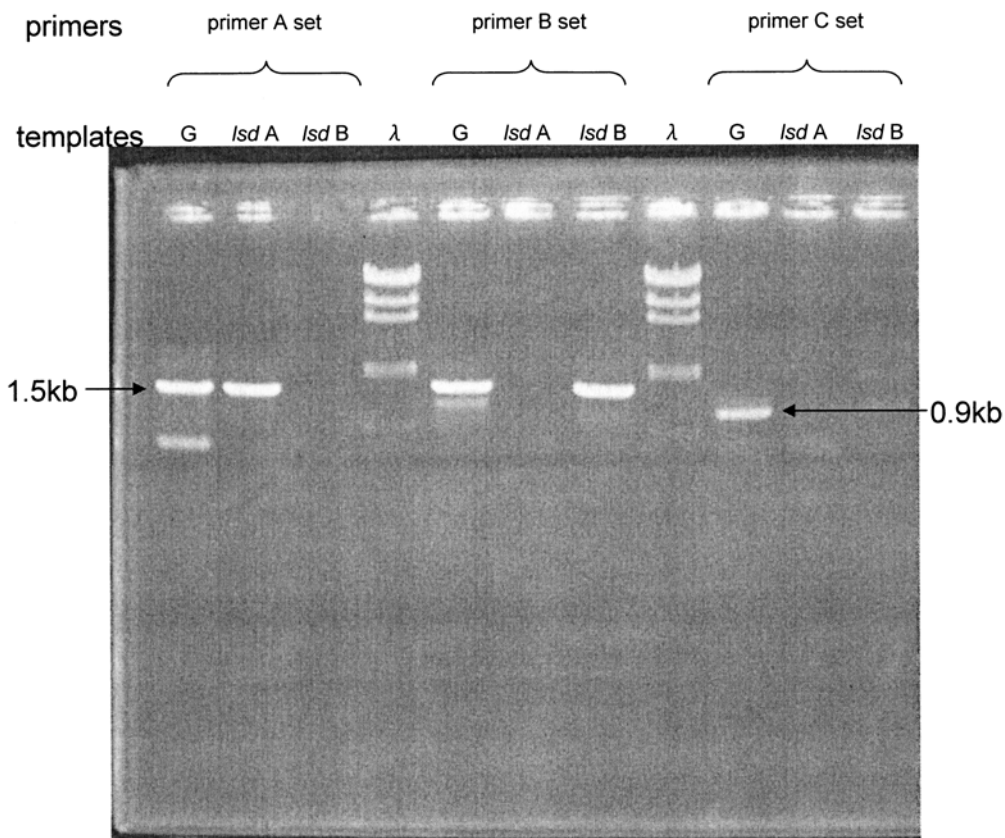


Fig. 4. What *lsd* gene is detected by PCR with primer A, B, and C set ?  
 template G; genomic DNA of *S. paucimobilis* TMY1009  
 template *lsdA*; *lsdA* gene on plasmid pKHN2590  
 template *lsdB*; *lsdB* gene on plasmid pKHE1700  
 λ; λ DNA digested with *Hind*III  
 Arrows indicate size of DNA fragments

amino acid No.	14	30	52	68	86	454	430	413
ladA	CGA	GAA	TTC	CGC	TGG	CAG	GTG	GAG
ladAset No1	CAA	GAG	TTC	CGC	TGG	CAG	GTG	GAG
ladAset No3	CGA	GAA	TTC	CGC	TGG	TAG	GTG	GAG
ladAset No4	CGA	GAA	TTC	TGC	TGG	CAG	GTT	GGG
ladAset No5	CGA	GAA	TTC	CGC	CGG	CAG	GTG	GAG
ladAset No6	CGA	GAA	CTC	CGC	TGG	CAG	GTG	GAG

Fig. 5. Comparison of the sequences of TA cloned *lsdA* gene.

amino acid No.	91	415
ladB	AAG	ATC
ladBset No13	AAG	ATC
ladBset No14	ATG	ATC
ladBset No15	AAG	ATC
ladBset No16	AAG	ATC
ladBset No17	AAG	ATC
ladBset No18	AAG	CTC

Fig. 6. Comparison of the sequences of TA cloned *ladB* gene.

子群という括り方ができるかどうかについて議論するには十分なデータがない。今後、十分に検証されなくてはならない。

## 要 旨

スチルベンは有名なファイトアレキシンの一つである。この研究ではそのスチルベンを分解する能力を持つ細菌 *Sphingomonas paucimobilis* TMY1009 を取り上げる。スチルベン型ファイトアレキシンの分解する菌の産生する酵素リグノスチルベンジオキシゲナーゼの関係は、ファイトアレキシンを生産する植物とそれを攻撃する微生物との攻防を探るモデルケースである。リグノスチルベンジオキシゲナーゼは $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットからなる二量体酵素で $\alpha\alpha$ 、 $\alpha\beta$ 、 $\beta\beta$ 、 $\gamma\gamma$ の4種のアイソザイムが確認されている。

第三の $\gamma$ サブユニットをペプチダーゼで分解し、分解産物のN末端アミノ酸配列情報を得、それを基に未知の $\gamma$ サブユニット遺伝子を検出するプライマーセットを開発した。それにより既知の*lsdA,B*と異なる*lsd*遺伝子の検出が確認された。それは $\gamma$ サブユニット(*lsdC*)遺伝子と思われた。

**キーワード：** リグノスチルベン・リグノスチルベンジオキシゲナーゼ・サブユニット・遺伝子・検出プライマー

## 引 用 文 献

- 1) AUSTIN, M.B. and NOEL, J.P. (2003) The Chalcone Synthase Superfamily of Type III Polyketide Synthases. *Nat. Prod. Rep.* **20**: 79-110.
- 2) PRYCE, R. J. and LANGCAKE, P. (1977)  $\alpha$ -Viniferin: An Antifungal Resveratrol Trimer from Grapevines. *Phytochemistry* **16**: 1452-1454.
- 3) LANGCAKE, P., CORNORD, C. A. and PRYCE, R. J. (1979) Identification of Pterostilbene as a Phytoalexin from *Vitis vinifera* Leaves. *Phytochemistry* **18**: 1025-1027.
- 4) INGHAM, J. L. (1976) 3,5,4'-Trihydroxystilbene as a Phytoalexin from Groundnuts (*Arachis hypogaea*). *Phytochemistry* **15**: 1791-1793.
- 5) KEEN, N. T. and INGHAM, J. L. (1976) New Stilbene Phytoalexins from American Cultivars of *Arachis hypogaea*. *Phytochemistry* **15**: 1794-1795.
- 6) FANG, J., SU, M. W. C., CHENG, Y. S. (1998) Flavonoids and Stilbenes from Armand pine. *Phytochemistry* **27**: 1395-1398.

- 7) ARITOMI, M. and DONNELLY, D.M.X. (1976) Stilbene Glucosides in Bark of *Picea sitchensis*. *Phytochemistry* **15**: 2006-2008.
- 8) KAMODA, S., TERADA, T. and SABURI, Y. (2003) A Common Structure of Substrate Shared by Lignostilbenedioxygenase Isozymes from *Sphingomonas paucimobilis* TMY1009. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**: 1394-1396.
- 9) KAMODA, S. and SABURI, Y. (1993) Structural and Enzymatical Comparison of a Lignostilbene- $\alpha,\beta$ -Dioxygenase Isozymes I, II, and III, from *Pseudomonas paucimobilis* TMY1009. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**: 931-934.
- 10) KAMODA, S., TERADA, T. and SABURI, Y. (1997) Purification and Some Properties of Lignostilbene- $\alpha,\beta$ -Dioxygenase Isozyme IV from *Pseudomonas paucimobilis* TMY1009. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**: 1575-1576.
- 11) KAMODA, S. and SABURI, Y. (1993) Cloning, Expression, and Sequence Analysis of a Lignostilbene- $\alpha,\beta$ -Dioxygenase Gene from *Pseudomonas paucimobilis* TMY1009. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**: 926-930.
- 12) KAMODA, S. and SABURI, Y. (1995) Cloning of a Lignostilbene- $\alpha,\beta$ -Dioxygenase Isozyme Gene from *Pseudomonas paucimobilis* TMY1009. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**: 1866-1868.
- 13) KAMODA, S., TERADA, T. and SABURI, Y. (2005) Production of Heterogeneous Dimer Lignostilbenedioxygenase II from *lsdA* and *lsdB* in *Escherichia coli* Cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**: 635-637.

(2006年4月28日受付)

(2006年7月10日受理)

### Summary

We wished to gain a better understanding of the interaction between plants and the microorganisms around plants through chemical interaction. Our study was designed to understand the offensive and defensive battle between plants armed with stilbenoid and microorganisms armed with stilbenoid detoxication enzyme. Stilbenoid is one of the most well-known phytoalexins. We focused on *Sphingomonas paucimobilis* TMY1009 that produced four lignostilbenedioxygenase (LSD) isozymes, degrading stilbenoid type phytoalexin. LSD isozymes I, II, III, and IV were composed of  $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$ ,  $\beta\beta$  and  $\gamma\gamma$  subunits, respectively, and showed different substrate specificities. The genes of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of LSDs have already been cloned and sequenced.

The peptides of  $\gamma$  subunits digested by peptidase were analyzed for their N terminal amino acids. The deduced primers for the  $\gamma$  subunit made it possible to detect an unknown *lsd* gene that was thought to be the gene of the  $\gamma$  subunit (*lsdC*).

**Key words:** Lignostilbene, lignostilbenedioxygenase, subunit, gene, detection primers