

Cryptomeria japonicaゲノム情報を用いたテルペン シンターゼ遺伝子のクローニングと機能解析

久住呂, 幸
九州大学大学院生物資源環境科学府

藤田, 弘毅
九州大学大学院農学研究院

堤, 祐司
九州大学大学院農学研究院

<https://hdl.handle.net/2324/7430225>

出版情報 : 2026. The Japan Wood Research Society
バージョン :
権利関係 :



Cryptomeria japonica ゲノム情報を用いたテルペンシンターゼ遺
伝子のクローニングと機能解析
Cloning and characterization of Terpen Synthase Genes Using *Cryptomeria*
Japonica Genome Information

(九大農) 久住呂幸、○藤田弘毅、堤祐司
(Kyushu univ.) Miyuki Kujuro, ○Koki Fujita, Yuji Tsutsumi

【緒言】

スギ (*Cryptomeria japonica*) は日本を代表する針葉樹であり、スギ精油に含まれるテルペノイド類は抗菌作用や抗酸化作用などの機能性を示し、医薬品・化粧品・香料への応用が期待されている。これらの生合成機構の解明は基礎・応用両面で重要である。2023年にはスギの全染色体をカバーする高精度な参照ゲノム配列が構築され、配列情報から遺伝子探索が可能となった。テルペンシンターゼ (TPS) 遺伝子は相同性検索により候補を絞りこめるが、配列情報のみから生成物を予測することは困難である。そこで本研究では、エリシター投与により発現が誘導されたスギカサの TPS 遺伝子を対象にクローニングと異種発現を実施し、酵素アッセイと GC-MS 分析により生成物同定を試みた。

【実験方法】

国立研究開発法人森林研究・整備機構のスギ参照ゲノム配列データベースから BLAST 検索により TPS 候補遺伝子を選定し、20種の nested PCR プライマーを設計した。エリシター処理したスギカサ cDNA をテンプレートに nested PCR を行い、7種の増幅産物を得た。配列解析で TPS であることを確認した4種をそれぞれ pET22 b (+) vector に組み込み、*E. coli* BL21 Star(DE3)株で発現させた。In vivo アッセイでは IPTG 誘導後 18°C、24時間培養し、培養液から SPME 法で揮発性成分を捕集し GC-MS 分析を実施した。In vitro 酵素アッセイでは 18°C、18時間培養し、粗酵素液または精製タンパク質に FPP を基質として反応させ、ペンタン抽出物を GC-MS 分析した。

【結果および考察】

TPS であることを確認した4種の配列を TPS1~4 と命名した。TPS1, TPS2 では TPS に特徴的な RRx8W、RxR、DDxxD、NSE/DSE の4モチーフが存在したが、TPS3, TPS4 では RRx8W のみ欠失し、他の3モチーフは確認された。In vivo, in vitro アッセイ両方において TPS3 でセドロールのピーク (Fig. 1、RT22.1min) が検出され、標品との比較で同定された。TPS3 はモチーフが欠失しているにもかかわらず活性を示した点は構造機能解析の観点から興味深い。一方、TPS1, TPS2, TPS4 ではテルペンと思われるピークは検出されなかった。今後、これらについては発現条件の検討を行う予定である。

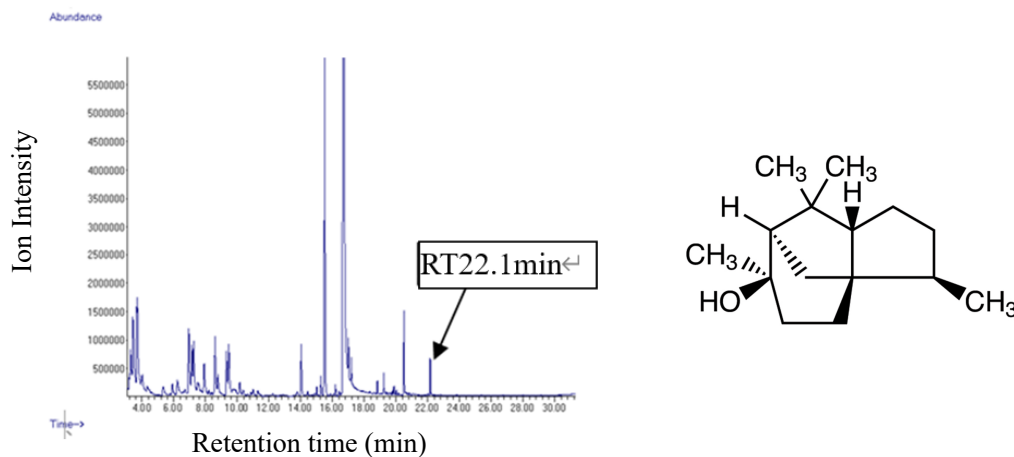


Fig. 1 TPS3 の In vivo アッセイの GC クロマトグラフおよびセドロールの構造