

白芷 Cinnamate 4-hydroxylase 基因之選殖、功能性分析及 8-氫化佛手柑內酯美白物質產之研究

羅淑卿^{1,*} 鍾佩恩²

摘要

羅淑卿、鍾佩恩。2014。白芷 Cinnamate 4-hydroxylase 基因之選殖、功能性分析及 8-氫化佛手柑內酯美白物質產之研究。台灣農業研究 63(3):205–215。

Cinnamate 4-hydroxylase (C4H) 為苯基丙烷類代謝路徑 (phenylpropanoids) 之酵素，合成許多植物重要二級代謝產物，包括白芷藥性成分呋喃香豆素 (furanocoumarins)。為探討白芷 C4H 基因及酵素特性，由其它物種 C4H 高保守性區域序列中，設計退化性引子，從白芷根中選殖出單一的 AdC4H cDNA 部分片段。利用 5'-與 3'-RACE-PCR 對此白芷 AdC4H 片段進行聚合酶連鎖增幅反應以取得全長 cDNA 序列 (accession no. KJ453107)。此 AdC4H cDNA 之可編譯區含 1,518 個核苷酸，可轉譯為 505 個胺基酸，分子量預估為 57.9 kDa。AdC4H 經胺基酸序列分析比對顯示和其它植物 C4H 有 74% 以上的相同度，具 cytochrome P450 特有的 A-F 保守性區域及 6 個受質辨識區。將 AdC4H 可編譯區 cDNA 建構在 pYES2/NT 載體，另外選殖阿拉伯芥 cytochrome P450 reductase ATR1 cDNA 全長並建構於 pYES3/CT 載體，以缺乏色胺酸及尿嘧啶之培養基篩選，取得併存二載體 (pYES-C4H 及 pYES3-ATR1) 之轉形酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*)，大量表現融合蛋白質後，進一步純化融合蛋白以探討酵素特性。酵素生化特性研究顯示 AdC4H 於 25°C、pH 6.0 之磷酸鉀緩衝液具最佳活性。AdC4H 在 ATR1 存在下，催化 cinnamate 羥基化效率明顯增加，產物 *p*-coumaric acid 含量由偵測不到提升至 62.9 μM 。具備二載體之轉形酵母菌亦可催化 bergapten 為 8-hydroxybergapten，培養液具抗酪胺酸酶活性， IC_{50} 為 1.35 mg mL^{-1} 。本研究證實 AdC4H 屬 cytochrome P450 第二群家族成員，可能為膜蛋白，酵素活性在不同物種之還原酶存在下依然可以顯現。

關鍵詞：白芷、Cinnamate 4-hydroxylase、細胞色素 P450。

前言

Cinnamate 4-hydroxylase (C4H)，催化 *trans*-cinnamic acid 之 *para*-hydroxylation 生成 *p*-coumaric acid (supplemental figure)，為 phenylpropanoid 代謝路徑的第二個酵素。C4H 和 PAL (phenylalanine ammonia-lyase) 及 4CL (4-coumarate CoA ligase) 三酵素組成代謝路徑核心反應之重要酵素，合成許多植物生長所需的二級代謝物質，如木質素 (Ehltling *et al.* 2006)。這三酵素在生合成反應中為連動

的，當植物受到外界刺激誘導時，可同時增加活性，其中以 C4H 為主控角色 (Mizutani *et al.* 1997)。C4H 所合成的重要二級代謝物質除木質素外，亦合成其它對人體健康有益的物質，如色素 (類黃酮, flavonoids)、紫外線保護劑 (香豆素, coumarin's) 及植物防禦物質 (異黃酮, isoflavonoids)。C4H 屬 cytochrome P450-dependent enzymes (Cyt P450) 之一員 (Bak *et al.* 1998)。

許多文獻亦稱 Cyt P450 為 CYPs, Nel-

投稿日期：2014 年 5 月 5 日；接受日期：2014 年 6 月 26 日。

* 通訊作者：shuchin@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所農業化學組助理研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所農業化學組助理。台灣 台中市。

son *et al.* (2004) 依據胺基酸序列的相似度將 CYPs 區分為數個族 (family) 及亞族 (subfamily)。C4H 歸屬於 CYP73 家族 (Ehltling *et al.* 2006)。Cyt P450 酵素活性可因植物受傷、光線或 UV 照射、金屬離子 (鎂或錳) 或病菌侵害而使 mRNA 表現量改變 (Teutsch *et al.* 1993; Chapple 1998)。Cyt P450 除了合成植物體許多特有物質外，亦參與生物體解毒功能，如代謝固醇類、xenobiotics 和除草劑 (Singh *et al.* 2009)。因此，Cyt P450 對於保護植物機制上扮演重要角色 (Ehltling *et al.* 2006)，決定生物體對藥物之耐受性或除草劑之代謝能力，與醫藥業及農業關係極大。

藉由操控 C4H 可滿足人類商業化之需求，使 C4H 基因大量表現，可以改變植物的代謝路徑，讓植物大量生產對人類有經濟價值的植物二級代謝產物類黃酮 (Yan *et al.* 2005)。相反的，弱化 C4H 基因以降低木質素之生合成，可降低造紙工業的成本 (Baucher *et al.* 2003)，同時作為生質能源之利用 (Hisano *et al.* 2009)，對畜牧業來說，也可使飼料較易消化 (Hu *et al.* 1999)。

白芷之藥性成分為香豆素，由 phenylpropanoid 代謝路徑所合成。本研究擬選殖出白芷 C4H 基因 (*AdC4H*)，希望能對此基因特性有所了解，並轉殖此基因至酵母菌生產白芷美白物質 8-hydroxybergapten (8-HB) (Piao *et al.* 2004)，期可改善白芷藥性物質之量產，提升白芷之經濟價值。

材料與方法

專一性片段及全長 cDNA 之選殖

白芷試驗藥材、5'-rapid amplification of cDNA ends (5'-RACE) cDNA 及 3'-RACE cDNA 之取得及基因選殖方法參考 Lo *et al.* (2012)。參考已發表之 *C4H* 序列 (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)，在具高保守性的區域中設計一退化性引子 (degenerate primer) 5'-GGTC (A/T/C) AT (C/T) GA (A/G) TGGGG (A/C) (A/G) TTGC (A/G) GA-3' (P1) 對 3'-RACE cDNA 進行專一性片段選殖。後

續 cDNA 全長之選殖則以 P2 (5'-CCCCAAGCA-CAGTGTCCATCTCATT-3') 及 P3 (5'-GCCCAA-CAGGGCCTTCTCCAACAACA-3') 二引子對 5'-RACE cDNA 進行專一性片段選殖。選殖方法依照 SMARTTM RACE cDNA amplification kit 操作手冊進行 (CLONTECH)。ATR1 (*Arabidopsis thaliana* NADPH Cyt P450 reductase 1) 全長序列片段之選殖則以 ATR1-F (5'-CCG-GAATTCATGACTTCTGCTTTGTAT-3') 及 ATR1-R (5'-GCGGCCGCCAGACATCTCTGAGG-TAT-3') 對阿拉伯芥 Columbia wild type cDNA 鈎取 ATR1 全長 (Urban *et al.* 1997)。

基因序列特性分析

序列比對利用 NCBI Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。預測訊息肽 (signal peptide) 及可能切位則利用 Kyte-Doolittle Hydrophathy Profile 軟體 (hydrophathy plot) 與 ExPASy Proteomics tools 的 signal P 軟體。蛋白質預測分子量及等電點以 Vector NTI Suite 8 軟體 (Informax, USA) 進行。

AdC4H 融合蛋白的表現與純化

表現載體之建構與轉形：以全長 AdC4H cDNA 作為模版。以 AdC4H-F (5'-CGCG-GATCCGATGGATTTTCTGTTGTT-3'；底線為 *Bam*HI 限制酶切位) 及 AdC4H-R (5'-TGCTCTAGATTATGATCTTGGCTTGC-3'；底線為 *Xba*I 限制酶切位) 兩引子進行 PCR 增幅，選殖 1,569 鹼基對之片段。將其接合至 *Bam*HI/*Xba*I 截切之 pYES2/NT (B) 載體，所得載體命名為 pYES-C4H。另建構 pYES3-ATR1 載體，利用阿拉伯芥 ATR1 cDNA，經 *Eco*RI 及 *Not*I 兩個限制酵素剪切後，接合至 *Eco*RI/*Not*I 截切之 pYES3/CT 載體，將建構之載體命名為 pYES3-ATR1。將 pYES-C4H 及 pYES3-ATR1 二載體同時轉形至酵母菌 INVS-cI 勝任細胞，轉形、培養及誘導方法參照 Invitrogen 公司所附贈使用說明書。為篩選出併存二載體的轉形酵母菌，選用缺乏 tryptophan 及 uracil 之 SC 固態培養基 [0.17% yeast nitrogen base、0.5% ammonium sulfate、0.115% HSM (adenine、arginine、cysteine、leucine、

lysine、threonine : aspartic acid、histidine、isoleucine、methionine、phenylalanine、proline、serine、tyrosine、valine = 2 : 1 w/w)、2% agar、10% glucose]，30°C 培養 3 d。誘導後之菌體經離心收集，進行下述 *in vivo* 受質轉化能力檢測及融合酵素活性檢測，或破菌萃取融合酵素進行西方墨跡法檢測 AdC4H 蛋白質產出情形 (Lo *et al.* 2012)。

in vivo 受質轉化能力檢測：取上述經 galactose 誘導之菌體，以含 10% galactose 及 100 μM *trans*-cinnamic acid 的 SC 液體培養基回溶，30°C 培養 20 h。所得菌液，添加 ethyl acetate 萃取產物 ρ -coumaric acid，以 UPLC 進行定量分析。

融合酵素 AdC4H 活性檢測：取上述經 galactose 誘導之菌體，參照 Pompon *et al.* (1996) 方法萃取酵素，取得 20 μg 濃縮酵素，加入 200 μL 之 200 mM phosphate buffer (pH 4.5–8.5) 內含 0.5 mM *trans*-cinnamic acid 及 1.2 mM NADPH，於 25°C 反應 2 h，再加入 ethyl acetate 終止反應並萃取產物。將 ethyl acetate 有機溶劑層取出後蒸發，再以甲醇回溶過濾，進行產物 (ρ -coumaric acid) 濃度分析定量。

西方墨跡法：蛋白質萃取、濃度檢測、蛋白質電泳 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) 及轉漬方法依照 Lo *et al.* (2012)。免疫抗體反應使用 anti-His tag 抗體進行偵測。

美白發酵液產製與抑制酪胺酸酶活性能力檢測

將經 galactose 誘導之菌體以含 10% galactose 及 100 μM bergapten 的 SC 液體培養基回溶，30°C 培養 20 h。所得菌液，添加 ethyl acetate 萃取產物，將 ethyl acetate 有機溶劑層取出蒸乾後，以甲醇回溶過濾，利用超高壓液相層析儀 (Ultra Performance Liquid Chromatography; UPLC) 分析 bergapten 與 8-HB 產物濃度。美白能力檢測以 Tyrosinase Assay 之方法 (Piao *et al.* 2004) 稍加以修改。將上述以甲醇回溶之物質，以 80°C 水浴蒸乾，再加入 5% DMSO 回溶。取 40 μL ，加入 120 μL 之

0.3 mg mL^{-1} tyrosine (溶於 66.7 mM phosphate buffer, pH6.8)，混合均勻後，再加 40 μL tyrosinase solution (87.5 units mL^{-1}) 混合反應後，立即測定 475 nm 吸光值，再於 37°C 靜置反應 30 min，再次測定 475 nm 吸光值。以 5% DMSO 取代檢液當空白組，同上述方法測吸光值，所得數值以下方程式計算酪胺酸酶之抑制能力。其中 A 值為反應後空白組吸光值，B 為反應前空白組吸光值，C 值為反應後試驗組吸光值，D 為反應前試驗組吸光值。

$$\begin{aligned} \% \text{ inhibition} \\ = [(A - B) - (C - D)] / (A - B) \times 100 \end{aligned}$$

化合物濃度定量分析

化合物濃度定量分析以 UPLC 進行，機型為 Waters ACQUITY™ UPLC system 機型 (Waters Corp., Milford, MA, USA)，分析管柱為 BEH C18 column (reverse-phase chromatographic column, 150 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm)、檢出器為光電二極體陣列 e λ 偵測器 (Photodiode Array Detector; PDA)，檢測波長 270 nm，管柱溫度 40°C，採梯度流洗 (gradient elution)，在 0 min 時，移動相為酸化水：氬甲烷 = 85 : 15 (v/v)，5 min 時，為酸化水：氬甲烷 = 60 : 40 (v/v)，7 min 時，為酸化水：氬甲烷 = 5 : 95 (v/v)，9 min 時，為酸化水：氬甲烷 = 85 : 15 (v/v)，流速皆為 0.25 mL min^{-1} ，樣品注射量 5 μL 。酸化水之配製以甲酸滴定去離子水至 pH 3.0，再以 0.2 μm 膜過濾備用。標準品 *trans*-cinnamic acid、 ρ -coumaric acid、bergapten 純度 99%，購自 Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, USA)。8-HB 購自 Herbo-real Ltd. (Edimburg, UK)，純度 99%。

結果

白芷 AdC4H 全長基因序列之選殖與特性分析

為了取得 AdC4H 可編譯區之全長序列，由其它植物的 C4H 基因設計出一退化性引子 P1 (圖 1)。以 P1 直接對 3'-RACE cDNA 進行

3'-RACE PCR 反應，可選殖出 708 個鹼基對的序列片段，經與其它物種之 *C4H* 比對後，確實具有高相同性。續以此片段設計二引子 P2 及 P3 對 5'-RACE cDNA PCR 增殖反應後，可得 *AdC4H* cDNA 全長序列，含 poly (A) 之 1,760 個鹼基對，可編譯區有 1,518 個鹼基對。

預測可轉譯為 505 個胺基酸，分子量為 57.9 kDa，等電點 pI 為 9.05。*AdC4H* 核酸起始序列周圍呈現 Kozak consensus sequence 特性：在 ATG 上游 -3 為 A、+4 為 G。序列在

5' 端非轉譯區呈現 A + T rich，確實如文獻所提具植物 Cyt P450 之酵素特質 (Joshi 1987)。以軟體預測發現 *AdC4H* 之 N- 端有訊息胜肽 (signal peptide)。訊息胜肽之切位點 (signal peptide cleavage sites) 預測有 2 個：第 1 個切位點在第 20 個胺基酸 alanine 和第 21 個胺基酸 isoleucine 之間，第 2 個切位點在第 28 個胺基酸 glycine 和第 29 個胺基酸 lysine 之間 (圖 1)。

胺基酸序列比對結果，*AdC4H* 和其它的 CYP 相比對有 21%–99% 的相同度，和人

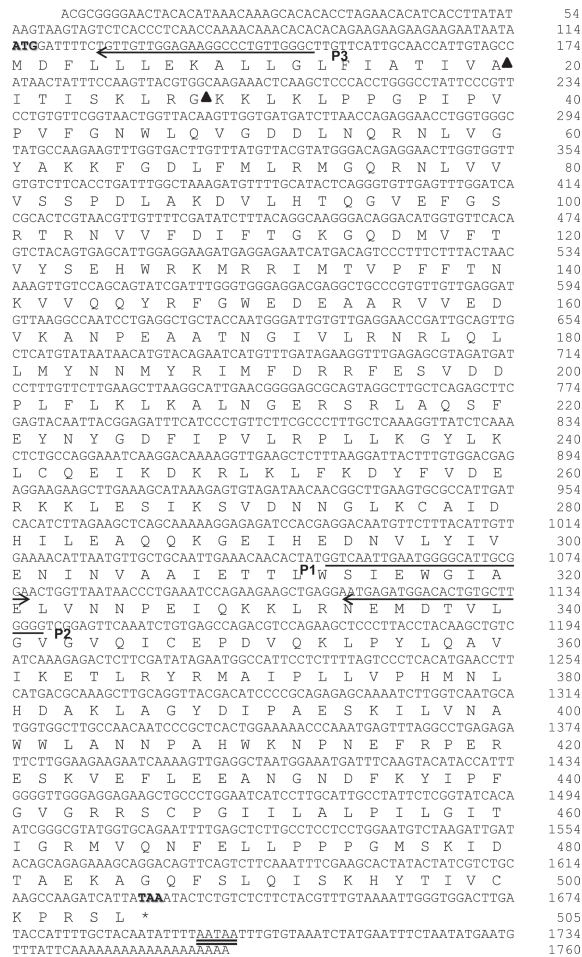


圖 1. 白芷 *AdC4H* cDNA 與預測之胺基酸序列。核苷酸及胺基酸數目標示於右方，粗體表示核苷酸序列之轉譯起始點及停止密碼，星號表示轉譯終止點，箭頭表示引子，雙底線為 polyadenylation signal。三角形指預測之訊息胜肽切位點。

Fig. 1. Nucleotide and predicted amino acid sequences of *AdC4H* cDNA from *A. dahurica*. The numbers of the nucleotide sequence and amino acid sequence are indicated on the right. The bold letters in the nucleotide sequence indicate start and stop codons. The primers are indicated by arrows. The polyadenylation signal is double underlined. The translation end is marked with an asterisk. The triangle indicates predict cleavage site.

類 *Homo sapiens* 之 CYP3A4 (BAG97065.1) 為最低，只有 21% 相同度 (圖 2)。AdC4H 依 Gotoh (1992) 及 Teutsch *et al.* (1993) 所提可標示 6 個保守性區域 (A-F region) 及 6 個受質辨識區 (圖 2)。Cyt P450 單加氧酶 (monooxygenase) 之重要特性序列，如 N 端具有富含 proline 之 region B (PPGPIPVP)、存在於所有 CYP73A 之酵素中之 Region C (AAIETT) 雙 Ala-Ala 特性 (Ehltng *et al.* 2006) 皆出現於 AdC4H。另一 Cyt P450 重要結構為 region F (PFGVGRRC)PG，此區的胺基酸 cysteine

供作和 heme 第五配位基結合，因此和其它 CytP450 比對，cyteine 位置相同、完全保留，沒有因親緣遠近或演化而改變為其它胺基酸，此特點在所有生物之 CytP450 皆同 (Werck-Reichhart and Feyereisen 2000)。

AdC4H 融合酵素之功能性表達及特性分析

由於 AdC4H 需要 Cyt P450 reductase 存在才具催化活性，因此，以易取得之阿拉伯芥 cDNA 選殖出 ATR1 完整 cDNA 全長，建

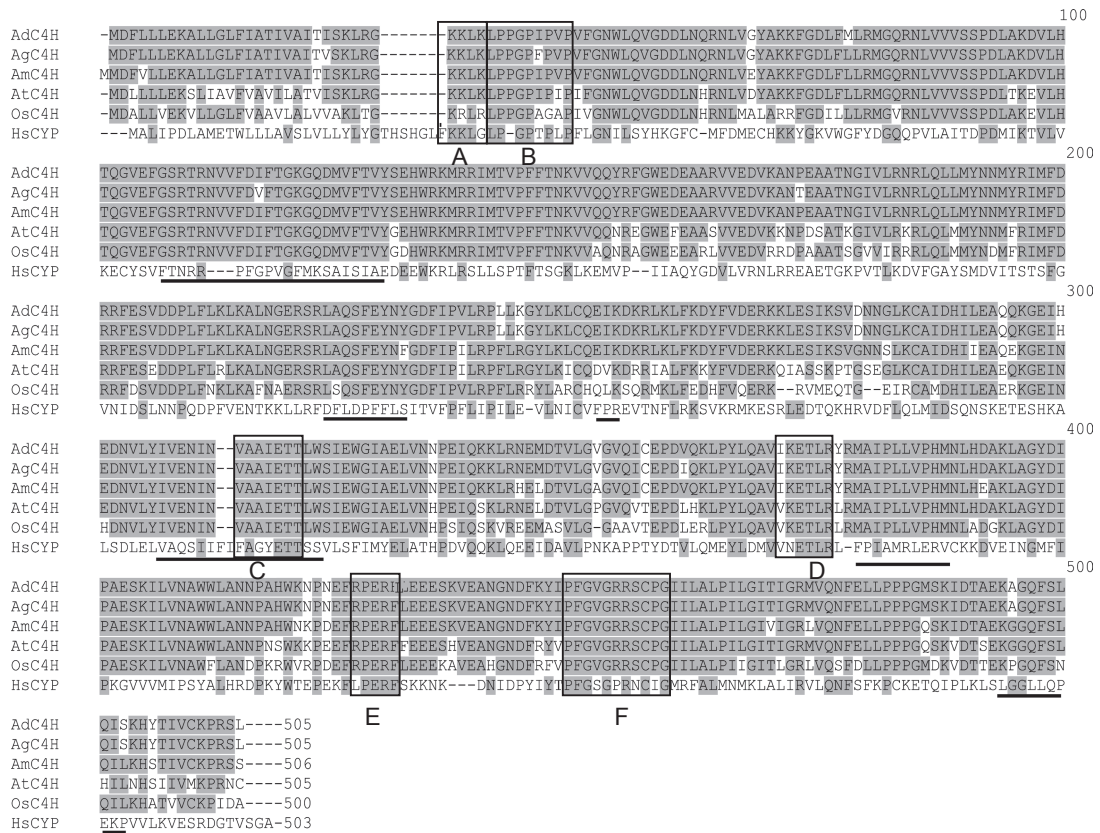


圖 2. 白芷 AdC4H 與其他物種之 C4H 和 CYP 之胺基酸序列比對。序列中以短線填入序列的空隙以得最佳之比對結果。框線為保守性區域，實底線為受質辨識區。其他物種之 C4H 為韓國當歸 (AgC4H, AEA72281.1)、雪珠花 (AmC4H, AAO62904)、阿拉伯芥 (AtC4H, CAP08845.1) 及水稻 (OsC4H, BAG97065.1)。另一為人類 CYP3A4 (HsCYP, BAG97065.1)。

Fig. 2. Amino acid sequences alignment of the AdC4H protein and other C4H and CYP proteins. A dash in the sequence indicates a gap introduced to maintain good alignment. The six highly conserved regions (regions A-F) are indicated by a box. The SRSs are indicated by an underline. The five C4Hs are cinnamate 4-hydroxylase of *A. dahurica* (AdC4H), *A. gigas* (AgC4H, AEA72281.1), *Ammi majus* (AmC4H, AAO62904.1), *Arabidopsis thaliana* (AtC4H, CAP08845.1) and *Oryza sativa* (OsC4H, BAG97065.1). The HsCYP indicated CYP3A4 of *Homo sapiens* (BAG97065.1).

構 pYES3-ATR1 載體，而 AdC4H 全長可編譯區接合至表現載體 pYES2/NT(B)。二載體 pYES-C4H 及 pYES3-ATR1 共同轉形至酵母菌中，經誘導後，培養於含 *trans*-cinnamic acid 之液體培養基。經 30°C 培養 20 h 後，可於培養液中檢測得 *trans*-cinnamic acid 及產物 *p*-coumaric acid (圖 3)。經定量分析結果顯示，受質濃度由 100 μM 降低為 38 μM ，而產物生成量在三重複試驗後，平均值為 62.9 μM ，約為 0.57 mg g^{-1} 細胞重，表示 AdC4H 融合酵素確實在酵母菌中有活性。而對照組 (空載體或只含單一載體之酵母菌) 皆未偵測到產物含量。

為進一步證實酵母菌體中融合 AdC4H 之存在，破菌純化酵母菌體之蛋白質，進行 SDS-PAGE 電泳分離，發現實驗組於 57 kDa 左右有一條帶 (圖 4A)，是控制組所沒有的。接續將膠片轉漬至硝化纖維膜上，以 anti-His-tag 抗體作免疫辨識偵測，可以得到分子量大約為 57 kDa 的蛋白質，和 AdC4H 融合蛋白質預測的大小相近，顯示 AdC4H 確實已成功

的在酵母菌表達 (圖 4B)。

為探討 AdC4H 融合酵素之最適 pH，在 25°C 下以 potassium phosphate 緩衝液涵蓋 pH 4.5–8.5 值作測試，結果顯示 AdC4H 在 pH 5.5 即有活性，過了 pH 6.0 活性急速下降，至 pH 8.0 即檢測不到活性 (圖 5)，活性最高之 pH 值位於 pH 6.0。

AdC4H 轉化 bergapten 為 8-HB 之能力與美白能力檢測

為了測試 AdC4H 是否可接受 bergapten 為受質，並將它羥基化為 8-HB (附錄)。經誘導之轉形酵母菌，培養於含 100 μM bergapten 之液體培養基。經 30°C、20 h 培養後，可於培養液中檢測得產物 8-HB，含量為 $16.9 \pm 2.6 \mu\text{M}$ ，約為 $0.44 \pm 0.06 \text{ mg g}^{-1}$ 細胞重，表示 AdC4H 融合酵素確實可接受 bergapten 為受質並轉化生成 8-HB。培養液經萃取進行美白測試，發現具抗酪胺酸酶活性， IC_{50} 為 1.35 mg mL^{-1} 。

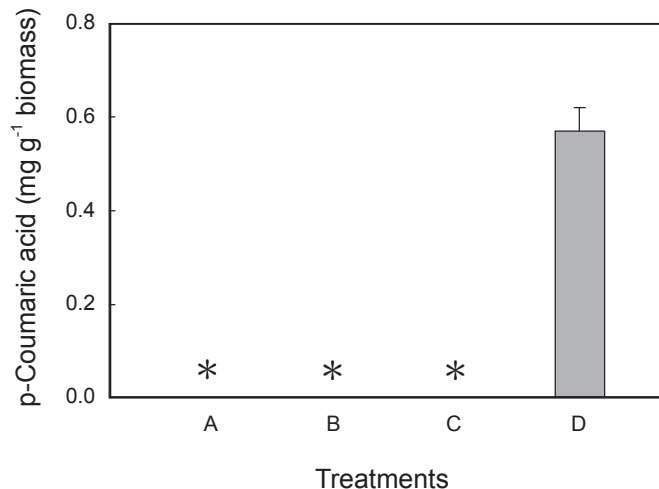


圖 3. 酵母菌轉入不同載體誘導後，以 UPLC 檢測培養液產物 *p*-coumaric acid 之含量。(A) 未接任何基因之 pYES2 空載體；(B) 只轉入 pYES-C4H 一個載體；(C) 只轉入 pYES3-ATR1 一個載體；(D) 轉入 pYES-C4H 及 pYES3-ATR1 二載體。星號表示未檢出。Error bars 指標準差。

Fig. 3. Content of *p*-coumaric acid in the culture of *S. cerevisiae* INVSc1 containing different vectors. The cells with empty vector pYES2 (A), harboring only pYES-C4H (B), harboring only pYES3-ATR1 (C), or harboring with both pYES-C4H and pYES3-ATR1 (D) were expressed in the presence of substrate. Asterisks mean undetected. The error bars represent standard deviation (SD).

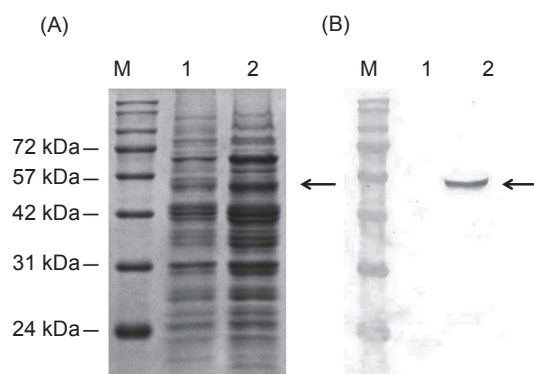


圖 4. 以酵母菌表達 AdC4H 之蛋白質電泳，以 Coomassie blue 染色 (A) 和免疫轉漬圖 (B)。空載體 pYES 之酵母菌 (1) 或接基因 pYES-C4H 之酵母菌 (2)。M：蛋白質標準品，箭頭指 AdC4H 訊號。

Fig. 4. AdC4H was overexpressed in yeast and its separation by electrophoresis (A) and detection by Western blot (B). The yeast cells were harboring empty pYES (1) or pYES-C4H (2) plasmid. M indicates marker proteins. The arrows indicate the overexpressed AdC4H. A signal corresponding to AdC4H was detected with an anti-His tag antibody.

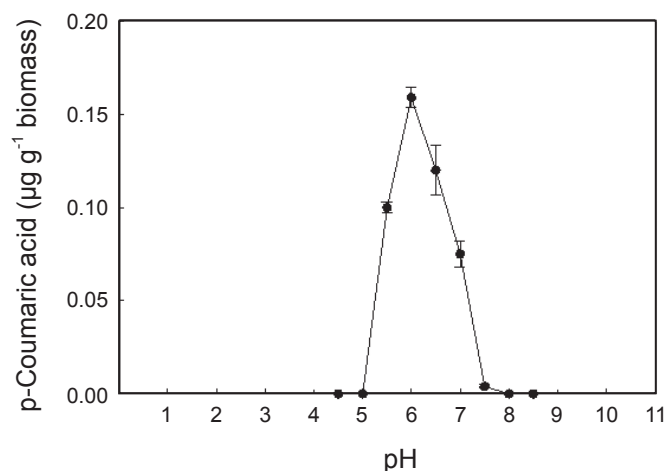


圖 5. 不同酸鹼值之磷酸鉀緩衝液對 AdC4H 融合酵素活性之影響。p-coumaric acid 生成量以相同量的酵母菌細胞重為基準比較。每組分析均 3 重複。Error bars 指標準差。

Fig. 5. Effect of different pHs of potassium phosphate buffer on the recombinant AdC4H activity. p-coumaric acid is normalized on the basis of an equal amount of yeast cells. Three independent experiments in duplicate were carried out for each analysis. The error bars represent standard deviation (SD).

討論

利用已知它種 *C4H* 序列，本研究成功地取得白芷 *AdC4H* cDNA 全長 1,760 個鹼基對之基因序列。*AdC4H* 胺基酸保守性區域序列具有 Cyt P450 之特性，和其它物種比對下呈現高相同度。在功能性表達顯示需要 CytP 450 reductase，證實屬 Cyt P450 第二群家族之 A-type 一員。

本研究曾嘗試以大腸桿菌為宿主量產融合 AdC4H，但產出之融合 AdC4H 未能偵測得酵素活性，因此依文獻改以酵母菌為宿主，進行融合 AdC4H 之特性研究。由於 C4H 不能自行利用 NADPH 之電子，需要 Cyt P450 reductase 催化 NADPH/NADH 轉移二個電子給 Cyt P450，催化反應方能完成 (Koopmann *et al.* 1999)，因此只含單一載體 pYES-C4H 之

轉形酵母菌，確實未能在含受質之培養基內，檢測得轉化後之產物 p -coumaric acid。雖然酵母菌本身就具有 reductase，但對酵素活性試驗分析來說，是不足夠的 (Truan *et al.* 1993；Werck-Reichhart & Feyereisen 2000)。為解決 reductase 不足之問題，本研究採用易取得之 Columbia wild type 阿拉伯芥之 ATR1 reductase 基因，藉由營養篩選培養基，取得具備 pYES-C4H 及 pYES3-ATR1 二載體之轉形酵母菌。誘導後確實成功的檢測得產物 p -coumaric acid，含量 $62.9 \mu\text{M}$ ，亦證實來自不同物種之酵素，也可協同進行羥基化反應 (Koopmann *et al.* 1999; Osakabe *et al.* 1999; Chen *et al.* 2007)。

本研究確認所建構的轉形酵母菌具 hydroxylase 活性後，續探討此轉形酵母菌是否可將 bergapten 轉化為 8-HB。此構想來自文獻指出，有些 C4H 可催化 *trans*-cinnamic acid 外的其它小分子物質 (如除草劑) (Chen *et al.* 2007)。而白芷的美白成分物質 8-HB，為 bergapten 經 hydroxylase 轉化而來 (附錄)。試驗結果確實在培養液中測得轉化後的目標物，含量 $16.9 \mu\text{M}$ 之 8-HB，美白測試結果亦發現培養液可抑制酪胺酸酶，由此證明融合 AdC4H 可接受 bergapten 為受質。由比對 5 種植物 C4H 胺基酸序列結果發現，所有 C4H 受質辨識區胺基酸組成並非完全一致，序列具多樣性。此多樣性是否和 C4H 可氧化其它分子有所關連，由於酵素結構和其催化活性之關係仍未建立，需進一步探討。發酵所生成的 8-HB 抑制酪胺酸酶能力較學者 Piao *et al.* (2004) 為低，或許可由進一步純化 8-HB 來提高其抑制酪胺酸酶能力。

由 AdC4H 胺基酸序列分析亦可見呈現膜蛋白之特點 (Achnine *et al.* 2004)。首先在 AdC4H 的 N 端，具有疏水性胺基酸佔多數之 membrane anchor 片段，其次為膜蛋白之必要結構-帶正電荷鹼性胺基酸 KKLK 區域 region A (Chapple 1998)。第三為富含 proline (proline-rich) 之 region B (Song *et al.* 1993)。A 與 B 兩區稱為 Hinge，意指形同絞鏈般插在膜上。此些特性因內質網膜之結構為二層帶負

電荷之磷脂質所組成，C4H 酵素需靠疏水性胺基酸及帶正電荷之鹼性胺基酸片段插入膜內以牢固結合於膜上，穩定呈現活性以維持正常生理功能運作。另外，文獻指出若將此區域刪除則會使 heme 併入受阻，酵素亦會失去功能 (Koopmann *et al.* 1999)。A 與 B 兩區在動植物之 CytP450 皆存在，可見保留二區域對 C4H 酵素活性之極為重要性 (Yamazaki *et al.* 1993)。

由文獻列舉數種植物之 C4H，如綠豆 (*Phaseolus aureus*)、苜蓿 (*Medicago sativa*)、豌豆 (*Pisum sativum*) 及黃豆 (*Glycine max*)，胺基酸數目介於 503–506 個，分子量亦在 50–60 kDa 之間，和 AdC4H 預測可編譯出胺基酸數 505 個及分子量 57.9 kDa 相當。Cyt P450 的 6 個受質辨識區各司其職，SRS1、SRS2 及 SRS4 之 N 端部份胺基酸負責和受質之 aliphatic 區交互作用，而 SRS4 之 C 端部份胺基酸和 SRS5、SRS6 負責與受質之芳香環 (aromatic ring) 接合，而序列中個別胺基酸 N310、I381 及 K494 負責受質之接合和方向定位 (Pina *et al.* 2012)，6 個受質辨識區皆可於 AdC4H 分別標定出，可見不同物種間之 C4H 酵素大小或結構差異性不大 (Kawai *et al.* 1996)。

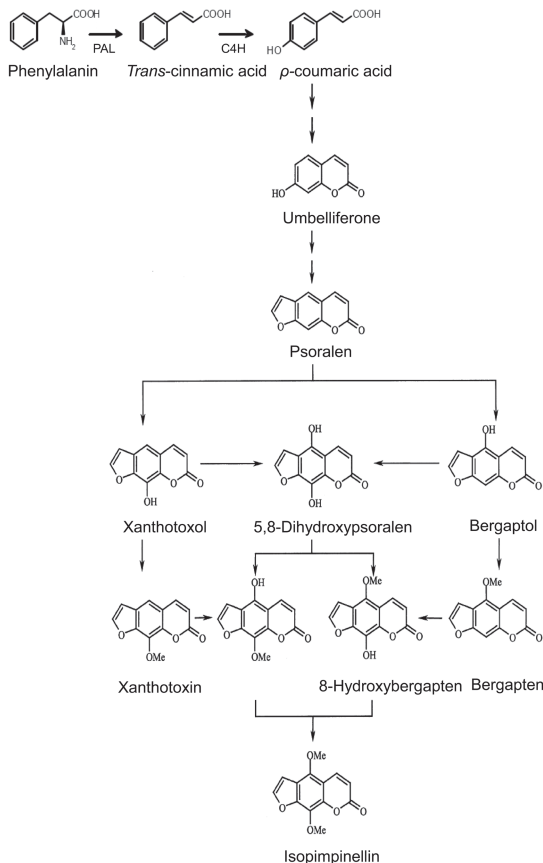
Cyt P450 依電子傳遞系統之不同分為四群，其中第二群 Cyt P450 之電子傳遞系統需要 Cyt P450 reductase (Rupasinghe *et al.* 2003)。依本研究證實 AdC4H 活性需要 reductase 之結果，將 AdC4H 歸屬於 Cyt P450 第二群家族之一員。另植物 Cyt P450 又分為 A-type 及 non A-type 二種，其中被許多學者用來選殖 A-type 此類基因的三個主要保守區：(V/I) KEx (L/F) R、FxPERF、PFGxGRRxCxG，分別出現在 AdC4H 胺基酸序列之 region D–F，因此將 AdC4H 歸屬於植物 Cyt P450 之 A-type (Bak *et al.* 1998)。依 Ehrling *et al.* (2006) 所提分類，C4H 可依胺基酸的相似度又被細分為被子植物 (angiosperms) 之 Class I 及 Class II (A 和 B)、裸子植物 (gymnosperms) 及苔蘚植物類 (bryophytes)。由本研究結果顯示 AdC4H 可歸於被子植物之 Class I。

C4H 為許多植物二級代謝產物之核心關鍵酵素，代謝衍生出的物質，對人類有重要的經濟價值，藉由了解 AdC4H 基因特性可進一步操控其表現，期未來在工業上可作有效應用。

誌謝

本研究報告承中興大學生物科技學研究所王國祥教授指導及行政院農委會農業試驗所應用動物組張淑貞小姐協助校稿得以完成本文，特申謝忱。

附錄



附錄 呋喃香豆素合成路徑圖。

Appendix Supplemental figure. Biosynthesis of linear furanocoumarins (Lo 2013).

引用文獻

- Achnine, L., E. B. Blancaflor, S. Rasmussen, and R. A. Dixon. 2004. Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* 16:3098–3109.
- Bak, S., R. A. Kahn, H. L. Nielsen, B. L. Møller, and B. A. Halkier. 1998. Cloning of three A-type cytochromes P450, CYP71E1, CYP98, and CYP99 from *Sorghum bicolor* (L.) Moench by a PCR approach and identification by expression in *Escherichia coli* of CYP71E1 as a multifunctional cytochrome P450 in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin. *Plant Mol. Biol.* 36:393–405.
- Baucher, M., C. Halpin, M. Petit-Conil, and W. Boerjan. 2003. Lignin: Genetic engineering and impact on pulping. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 38:305–350.
- Chapple, C. 1998. Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:311–343.
- Chen, H., H. Jiang, and J. A. Morgan. 2007. Non-natural cinnamic acid derivatives as substrates of cinnamate 4-hydroxylase. *Phytochemistry* 68:306–311.
- Ehrling, J., B. Hamberger, R. Million-Rousseau, and D. Werck-Reichhart. 2006. Cytochromes P450 in phenolic metabolism. *Phytochem. Rev.* 5:239–270.
- Gotoh, O. 1992. Substrate recognition sites in Cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J. Biol. Chem.* 267:83–90.
- Hisano, H., R. Nandakumar, and Z. Y. Wang. 2009. Genetic modification of lignin biosynthesis for improved biofuel production. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 45:306–313.
- Hu, W. J., S. A. Harding, J. Lung, J. L. Popko, J. Ralph, D. D. Stokke, C. J. Tsai, and V. L. Chiang. 1999. Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. *Nat. Biotechnol.* 17:808–812.
- Joshi, C. P. 1987. An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes. *Nucleic Acids Res.* 15:6643–6653.
- Kawai, S., A. Mori, T. Shiokawa, S. Kajita, Y. Katayama, and N. Morohoshi. 1996. Isolation and analysis of cinnamic acid 4-hydroxylase homologous genes from a hybrid aspen, *Populus kitakamiensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60:1586–1597.
- Koopmann, E., E. Logemann, and K. Hahlbrock. 1999. Regulation and functional expression of cinnamate 4-hydroxylase from parsley. *Plant Physiol.* 119:49–55.

- Lo, S. C. 2013. Functionalities of coumarins. *Taiwanese J. of Agric. Chem. Food Sci.* 51:109–119. (in Chinese with English abstract)
- Lo, S. C., P. E. Chung, and C. S. Wang. 2012. Molecular cloning and functional analysis of bergaptol-O-methyltransferase from *Angelica dahurica* (Bai Zhi) and using it to efficiently produce bergapten in *E. coli*. *Bot. Stud.* 53:197–206.
- Mizutani, M., D. Ohta, and R. Sato. 1997. Isolation of a cDNA and a genomic clone encoding cinnamate 4-hydroxylase from *Arabidopsis* and its expression manner in planta. *Plant Physiol.* 113:755–763.
- Nelson, D. R., D. C. Zeldin, S. M. Hoffman, L. J. Maltais, H. M. Wain, and D. W. Nebert. 2004. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics* 14:1–18.
- Osakabe, K., C. C. Tsao, L. Li, J. L. Popko, T. Umezawa, D. T. Carrqway, R. H. Smeltzer, C. P. Joshi, and V. L. Chiang. 1999. Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:8955–8960.
- Piao, X. L., S. H. Baek, M. K. Park, and J. H. Park. 2004. Tyrosinase-inhibitory furanocoumarin from *Angelica dahurica*. *Biol. Pharm. Bull.* 27:1144–1146.
- Pina, A., T. Zhebentyayeva, P. Errea, and A. Abbott. 2012. Isolation and molecular characterization of cinnamate 4-hydroxylase from apricot and plum. *Biol. Plant.* 56:441–450.
- Pompon, D., B. Louerat, A. Bronine, and P. Urban. 1996. Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods Enzymol.* 272:51–64.
- Rupasinghe, S., J. Baudry, and M. A. Schuler. 2003. Common active site architecture and binding strategy of four phenylpropanoid P450s from *Arabidopsis thaliana* as revealed by molecular modeling. *Protein Eng.* 16:721–731.
- Singh, K., S. Kumar, A. Rani, A. Gulati, and P. Ahuja. 2009. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and cinnamate 4-hydroxylase (C4H) and catechins (flavan-3-ols) accumulation in tea. *Funct. Integr. Genomics* 9:125–134.
- Song, W. C., C. D. Funk, and A. R. Brash. 1993. Molecular cloning of an allene oxide synthase: A cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8519–8523.
- Teutsch, H. G., M. P. Hasenfratz, A. Lesot, C. Stoltz, J. M. Garnier, J. M. Jeltsch, F. Durst, and D. Werck-Reichhart. 1993. Isolation and sequence of a cDNA encoding the Jerusalem artichoke cinnamate 4-hydroxylase, a major plant cytochrome P450 involved in the general phenylpropanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:4102–4106.
- Truan, G., C. Cullin, P. Reisdorf, P. Urban, and D. Pompon. 1993. Enhanced in vivo monooxygenase activities of mammalian P450s in engineered yeast cells producing high levels of NADPH-P450 reductase and human cytochrome b5. *Gene* 125:49–55.
- Urban, P., C. Mignotte, M. Kazmeier, F. Delorme, and D. Pompon. 1997. Cloning, yeast expression, and characterization of the coupling of two distantly related *Arabidopsis thaliana* NADPH-cytochrome P450 reductases with P450 CYP73A5. *J. Biol. Chem.* 272:19176–19186.
- Werck-Reichhart, D. and R. Feyereisen. 2000. Cytochrome P450: A success story. *Genome Biol.* 1:1–9.
- Yamazaki, S., K. Sato, K. Sahara, M. Sakaguchi, K. Mihara, and T. Omura. 1993. Importance of the proline-rich region following signal-Anchor sequence in the formation of correct conformation of microsomal cytochrome P-450s. *J. Biochem.* 114:652–657.
- Yan, Y., A. Kohli, and M. A. G. Koffas. 2005. Biosynthesis of natural flavanones in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5610–5613.

Cloning and Functional Expression of Cinnamate 4-hydroxylase Gene from *Angelica dahurica* (Bai Zhi) and Producing 8-hydroxybergapten in *Yesat*

Shu-Chin Lo^{1,*} and Pei-En Chung²

Abstract

Lo, S. C. and P. E. Chung. 2014. Cloning and functional expression of cinnamate 4-hydroxylase gene from *Angelica dahurica* (Bai Zhi) and producing 8-hydroxybergapten in *yesat*. *J. Taiwan Agric. Res.* 63(3):205–215.

Cinnamate 4-hydroxylase (C4H) is an enzyme of phenylpropanoids pathway, which can synthesize plant secondary metabolites, including furanocoumarin, a type of pharmaceutical components in Bai Zhi. To characterize *C4H* gene, the complementary DNA of *AdC4H* was cloned from Bai Zhi root using degenerate primers designed from the highly conserved regions of other plant *C4H*. The tandem 5'- and 3'-rapid amplification of cDNA ends via polymerase chain reaction was used to obtain the full-length *AdC4H* cDNA sequences (accession no. KJ453107). The *AdC4H* cDNA contains an open reading frame of 1,518 bp encoding a polypeptide of 505 amino acids with a molecular mass of 57.9 kDa. Amino acid sequence alignment demonstrated over 74% identities on protein level between AdC4H and its homologous proteins among plant species. They possess all cytochrome P450-featured conserved region A–F and six substrate recognition sites. The full length of *AdC4H* coding region was introduced into pYES2/NT vector. Besides, the full length of cytochrome P450 reductase *ATR1* cloned from *Arabidopsis thaliana* was introduced into pYES3/CT vector. The transformed yeast cell (*Saccharomyces cerevisiae*) harboring two different plasmids (pYES-C4H and pYES3-ATR1) were obtained by growing in the medium without containing tryptophan and uracil. The recombinant AdC4H protein was overexpressed in yeast and partially purified. The recombinant AdC4H revealed optimum activity in pH 6.0 potassium phosphate buffer at 25°C. It suggested that AdC4H together with ATR1 overexpression showed highly efficient catalysis of 4-hydroxylation of cinnamate, the ρ -coumaric acid was increased from undetectable to 62.9 μ M. The yeast harboring two plasmids also catalyzed bergapten to 8-hydroxybergapten. The IC_{50} value of tyrosinase inhibition in the medium was 1.35 mg mL⁻¹. The AdC4H enzyme that belongs to a member of cytochrome P450 ClassII family may be a transmembrane protein and its enzyme activity can be detected with reductase from different plant species.

Key words: *Angelica dahurica*, Cinnamate 4-hydroxylase, Cytochrome P450.

Received: May 5, 2014; Accepted: June 26, 2014.

* Corresponding author, e-mail: shuchin@tari.gov.tw

¹ Assistance Research Fellow, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

² Research Assistant, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.