

## 植物遺伝資源確保に向けた有用遺伝子単離とその利用

村中 俊哉<sup>1,2\*</sup>・小森 彩<sup>2</sup>

自ら動くことのできない植物は、多種多様な化学物質を生合成し、暑さ・寒さ、紫外線、乾燥などの非生物学的ストレスや、ウイルス、バクテリア、昆虫、大型捕食者などの生物学的ストレスから身を守っている。それら化合物の数は約20万種類にもおよぶといわれている。それらの多くは生理活性をもつことから、医薬品、機能性食品、香料などに応用されている。なかでも、炭素数5のイソプレノイド単位を基本骨格とするテルペノイド類はもっとも多様性に富む物質群である。本稿では、2種類の有用テルペノイドを例に挙げ、植物遺伝資源確保に向けた有用遺伝子単離の取り組み、ならびに、それら植物遺伝子を導入した微生物による製造に向けた研究動向について解説する。

## 有用テルペノイドと抱える問題点

テルペノイドは、炭素数5のイソプレノイド単位を基本骨格とする一群の化合物である。現在までにさまざまなテルペノイドが単離、同定されその生理活性が明らかにされている。

しかしながら、このような有用テルペノイドは、(1)ごく一部の植物種に限定される、(2)植物体全体に含まれずに蓄積の場が一部の組織・細胞に限られ生産性が低い、という場合が多々ある。たとえば、抗マラリア剤として現在非常に注目されているアルテミシニン(炭素数15のセスキテルペノイド)は、キク科ヨモギ属の一種(アルテミシア・アヌア)の、葉のトライコームという特殊な組織でのみで蓄積するため植物体比の生産量は微量である。抗がん剤として利用されているパクリタキセル(炭素数20のジテルペノイド)は、タイヘイヨウイチイの樹皮でのみ産生する。また、天然の甘味成分であり、肝機能補強作用があるグリチルリチン(炭素数30のトリテルペノイドの配糖体)は、マメ科カンゾウ属の一部の植物のみの肥大した根、ストロン(走出茎)にのみ蓄積される。グリチルリチンの含量は比較的高いものの、肥大根(甘草根とよばれる)が生長するのに数年以上もかかり、乾燥地に生えているため収穫による砂漠化の進行、資源の枯渇化などの問題がある。2009年に名古屋で開催されたCOP10でも甘草根の主要原産国である中国からの輸入が減少傾向にあることが指摘された。このように有用植物資源は、ある意味、植物版レアースともいえ、いかに有用植物資源、有用植物遺伝子を確保するかが、現在大きな課題となっている。

## 酵母を用いたアルテミシニン酸の生産

先に述べたように、アルテミシア・アヌアにおけるアルテミシニンの生産量が少なく、またコスト面から全合成も難しい。そこで、微生物を用いた大量調製が注目されている。微生物は、生活サイクルが短く、容易に培養可能である。さらに、微生物内での代謝経路に関する研究は植物に比べ進んでいることから、遺伝子を導入し物質を生産させるのに適した材料といえる。また、化学合成に比べ環境に対する負荷も少ない。

カリフォルニア大学バークレイ校のKeeslingらのグループは、アルテミシニン生合成に関わる新規シクロームP450モノオキシゲナーゼ(以下、P450とする)であるCYP71AV1遺伝子の探索・単離を行うと同時に、微生物を用いたアルテミシニンの半合成を目指し、アルテミシニン酸を生産するように改変した酵母を作出した<sup>1)</sup>。図1にアルテミシニン生合成経路を示す。このうち、すべての植物に普遍的に存在するファルネシル-二リン酸を環化するアモルファ-4,11-ジエン合成酵素(ADS)遺伝子ならびにCYP71AV1遺伝子がアルテミシア・アヌアに特異的酵素遺伝子である。Keeslingらはまず、ファルネシル-二リン酸(FDP)生合成上流遺伝子の過剰発

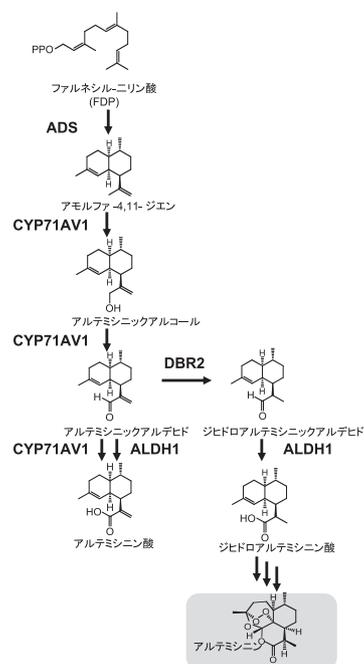


図1. アルテミシニンの生合成経路

\*著者紹介 <sup>1</sup>大阪大学大学院工学研究科(教授) E-mail: muranaka@bio.eng.osaka-u.ac.jp<sup>2</sup>横浜市立大学生命ナノシステム科学研究科

現ならびに、下流遺伝子の発現抑制を行い、ADSの基質であるFDPを酵母内でより多く生産させた。その結果、改変酵母では、未改変の酵母と比較して約500倍のアモルファ-4,11-ジエンを生産した(153 mg/l)。次に、これらの改変酵母でCYP71AV1を発現させることにより、約100 mg/lのアルテミシニン酸を生産する改変酵母を作製した。さらなる改良により、その生量は250 mg/lまで増加した<sup>2)</sup>。さらに、改変酵母で生産されたアルテミシニン酸は酵母細胞外へと排出された後、細胞表面に保持されるため、精製処理が容易であることが示された。これは工業的の面から大きな利点である。

### 酵母を用いたグリチルレチン酸の生産

レアプラントであるカンゾウに関する遺伝子情報は、私たちが研究開始するまで皆無であった。そこで、グリチルリチンを生産するストロンのcDNAライブラリーを構築し、EST解析するとともに<sup>3)</sup>、グリチルリチン生合成に関わる酵素遺伝子の絞り込みを行い、グリチルレチン酸(グリチルリチンの非糖部)生合成に関わる2種のP450, CYP88D6とCYP72A154の取得に成功した<sup>4,5)</sup>。

つぎに、出芽酵母におけるグリチルレチン酸の生産を試みた。グリチルリチンの前駆物質であるβ-アミリンは、トリテルペノイドおよびステロール類の共通前駆体である2,3-オキシドスクアレンがβ-アミリン合成酵素により閉環して生成する。酵母はエルゴステロールを生合成するが、トリテルペノイドに至る生合成経路は持っていない。そこで、酵母内在性の基質2,3-オキシドスクアレンを利用してトリテルペノイド生合成に流れを変えるべく、β-アミリン合成酵素遺伝子とともに、CYP88D6とCYP72A154を酵母に導入し同時発現させた。その結果、

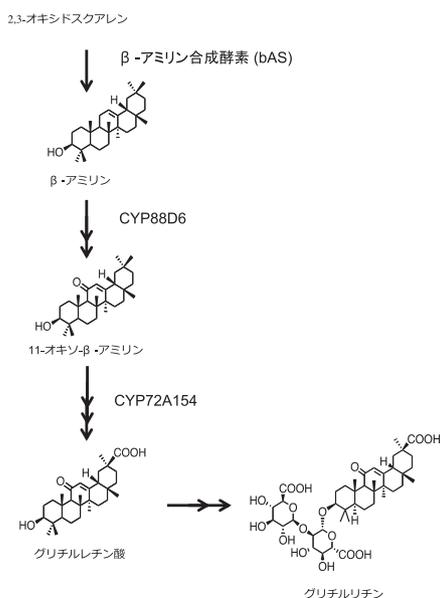


図2. グリチルリチンの生合成経路

微量ながらも、グリチルレチン酸とその類縁化合物を生産することに成功した<sup>5)</sup>(図2)。

CYP72Aサブファミリーは植物界に広く存在する。グリチルレチン酸はカンゾウでのみ検出されるが、それでは類縁の植物由来のCYP72Aサブファミリーは、本来の植物に存在しない11-オキソ-β-アミリンを基質としようか? その評価を行うため、タルウマゴヤシ由来CYP72Aサブファミリーを単離し11-オキソ-β-アミリンに対する反応性を調べた。その結果、興味深いことに、カンゾウ由来CYP72A154は11-オキソ-β-アミリンを基質とした場合、C-30位、C-21位、およびC-29位に対する酸化活性を示すため(酸化位置選択性が低い)、グリチルレチン酸のみでなくその類似化合物も生成するのに対して、タルウマゴヤシ由来の2分子種はそれぞれ、C-29位およびC-30位に特異的な酸化活性を示すことが判明した(未発表)。この結果は、ナチュラルバリエーションを検索することにより、単一の植物種によらず、複数の植物種から最適な酵素遺伝子を組み合わせ生合成させる(コンビナトリアル生合成)ことにより、生産性を向上させる可能性があることを示唆している。

グリチルレチン酸は、高い抗炎症作用を有しており、医薬品や化粧品に配合される有用なテルペノイドである。しかしながら、カンゾウ植物体中での含有量が著しく低いため、現在は、植物から抽出したグリチルリチンを加水分解することにより供給されている。本研究で明らかになったナチュラルバリエーションの利用に加え、トリテルペノイド生産に最適化した酵母株の分子育種を行い、グリチルレチン酸の生産性を向上させることは原理的に可能であると考えている。筆者らは、今年度より、酵母でのグリチルレチン酸製造に向けた開発に向けた検証試験を開始したところである。

本稿では、アルテミシニン酸ならびにグリチルレチン酸の生合成に関わる遺伝子単離、酵母での生産について述べてきた。我が国では、従来、天然物の構造解析を得意とするが、これまでは代謝工学研究がほとんど手つかずであった。後半グリチルレチン酸に関わる研究は、異分野の研究者が結集し、オールジャパンの体制で実施された。本研究をきっかけに、国内の研究者間で種々の有用物質についての、新産業につながるシーズ研究が活性化されることが望まれる。

### 文 献

- 1) Ro, D.-K. *et al.*: *Nature*, **440**, 940 (2006).
- 2) Ro, D.-K. *et al.*: *BMC Biotechnol.*, **8**, 83 (2008).
- 3) Sudo, H. *et al.*: *Plant Biotechnol.*, **26**, 105 (2009).
- 4) Seki, H. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 14204 (2008).
- 5) Seki, H. *et al.*: *Plant Cell*, **23**, 4112 (2011).