

植物テルペノイド代謝の多様性とコンビナトリアル生合成

福島エリオデット^{1,2}・關 光¹・村中 俊哉^{1*}

植物がつくり出す低分子化合物は、20万種類にもおよぶといわれている。なかでも炭素数5のイソプレン単位の倍数を基本骨格とするテルペノイド類は多様性に富み、それらの中には、医薬、機能性食品、香料、工業原料として利用されているものが多数ある。しかしながら、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（*Artemisia annua*）の、葉の裏のトライコームという特殊な組織でのみで蓄積する。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）は、マメ科カンゾウ属の一部の植物のみが、肥大した根、ストロン（走出茎）にのみ蓄積する。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大きな課題となっている。

テルペノイドは、一般に、直鎖の共通前駆体を基質として、環化、酸化・配糖化などの修飾反応を経て、多様な化合物群を形成する。トリテルペノイドの生合成経路においてはまず、炭素数30の直鎖状化合物である2,3-オキシドスクアレンを共通基質として、種々のオキシドスクアレン環化酵素（OSC）により、 β -アミリン、 α -アミリン、ルペオールなどの基本炭素骨格が生合成される。これらの基本骨格はほぼすべての植物に共通に存在するが、さらに、酸化、配糖化などさまざまな修飾を受けることにより、それぞれの属や種に特異的な多様な植物トリテルペノイドが生合成される（図1）。OSCについては、 β -アミリン合成酵素（bAS）遺伝子をはじめ、多くのOSC遺伝子が単離、機能同定されているのに対し、基本骨格の酸化、配糖化に関わる酵素遺伝子については、いまだ報告が少ない。これまでに私たちの研究

グループは、カンゾウが生産するグリチルリチンの生合成経路において、 β -アミリンの11位の酸化に関わるシトクロムP450；CYP88D6（ β -アミリン11位酸化酵素）¹ および、30位の酸化に関わるCYP72A154²を同定した。また、ダイズソヤサポニンの生合成に関わるCYP93E1（ β -アミリン-24位水酸化酵素）³のホモログであるカンゾウ由来のCYP93E3¹の機能も明らかにしている（図1）。

以上の知見をふまえて本稿では、 β -アミリンを基本骨格に持つ多様なサポニンを生産することが知られており、かつ、遺伝子配列/発現情報リソースが充実しているマメ科モデル植物、タルウマゴヤシ（*Medicago truncatula*）を研究材料とし、植物トリテルペノイド代謝の多様性とコンビナトリアル生合成に向けた、私たちの最近の研究を紹介する。

トリテルペノイド生合成に係わるP450遺伝子ホモログ

まず始めに、これまでに単離されたトリテルペノイド生合成関連P450（CYP88D6, CYP72A154, および、CYP93E3）に対して高い相同性を示すP450遺伝子ホモログの単離と酵素機能解析を行った。

タルウマゴヤシの公開ESTデータベースの検索、およびRACE-PCRによりCYP88D6ホモログ2分子種、CYP72A154と同じくCYP72Aサブファミリーに属するP450 7分子種、および、CYP93E3ホモログ1分子種の全長コード領域を含むcDNAを単離した。次にこれらの各P450と、シトクロムP450還元酵素（CPR：P450の酸化還元パートナー）との酵母における同時発現ベクターを作製した。ミヤコグサのbASあるいはカンゾウのルペオール合成酵素（LUS）遺伝子を導入することによりそれぞれ β -アミリンあるいはルペオールを生産するように改変した組換え酵母に、上記のP450/CPR同時発現ベクターを導入した。各酵母培養液の酢酸エチル抽出物をGC-MSにより分析し、 β -アミリンおよびルペオール酸化物の検出を行った（図2）。 β -アミリン生産酵母にタルウマゴヤシから単離したCYP88D6ホモログ2種をそれぞれ導入した。その結果 β -アミリンの酸化物と推定される化合物は検出されなかった。一方、CYP72Aサブファミリーに属するP450 7分子種のうち、CYP72A154に対して75.5%のアミノ酸配列同一性を示すCYP72A63

* 著者紹介 ¹大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻（教授）E-mail: muranaka@bio.eng.osaka-u.ac.jp

²大阪大学大学院工学研究科附属高度人材育成センター

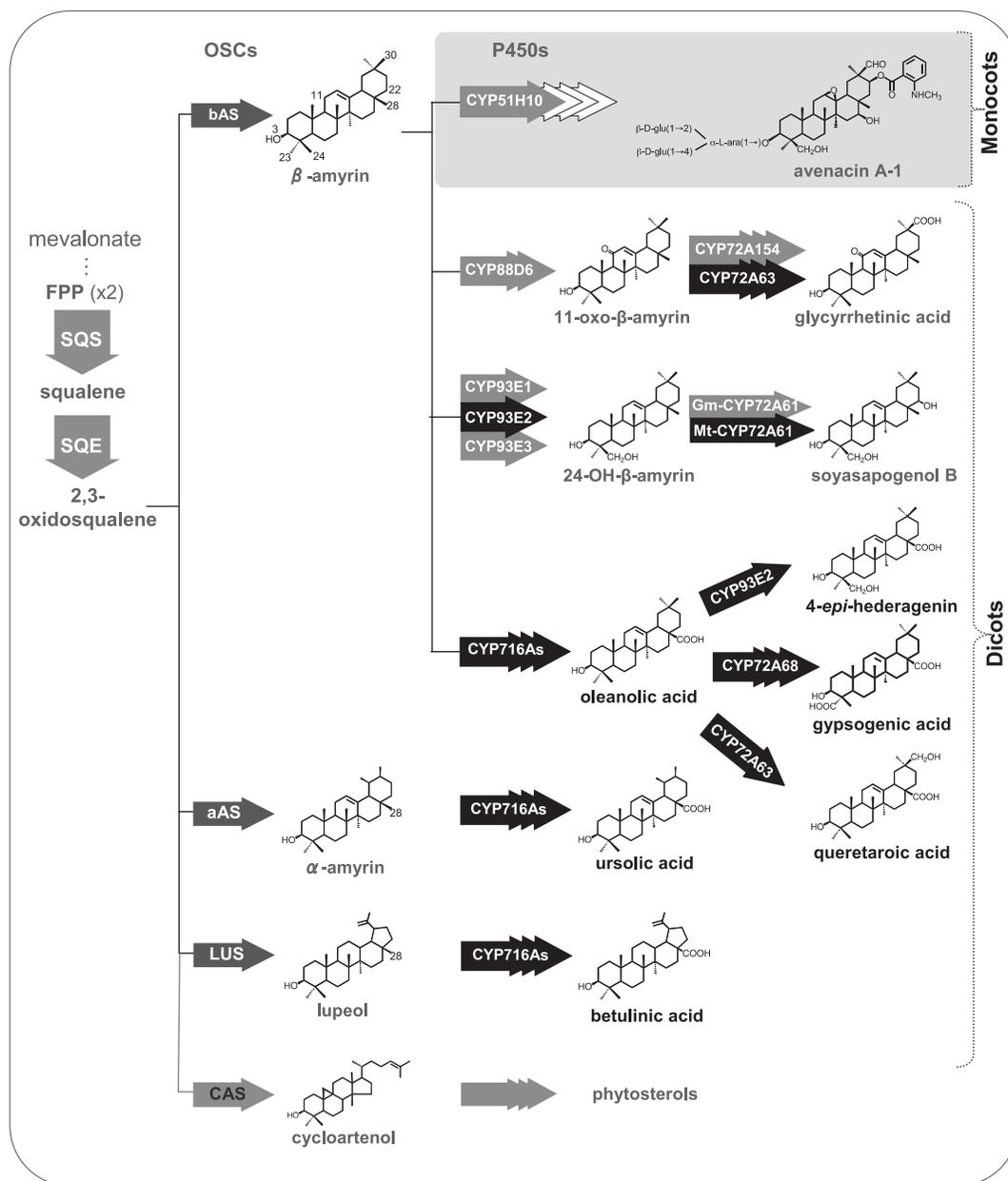


図1. トリテルペノイド生合成に関わる OSCs と P450s の機能. それぞれの反応に関与する酵素は一つの矢印で示されている. 先行研究で報告されている反応はグレー矢印で表されている. 本研究で見いだした反応は黒矢印で表されている. 酵素未同定な反応は白ぬきの矢印で表されている. FPP, farnesyl pyrophosphate; SQS, squalene synthase; SQE, squalene epoxidase; bAS, β -amyrin synthase; aAS, α -amyrin synthase; LUS, lupeol synthase; CAS, cycloartenol synthase (CAS).

を導入した酵母の抽出物からは、 β -アミリンの30位水酸化体である30-ヒドロキシ- β -アミリンおよびカルボン酸である11-デオキシ-グリチルレチン酸が検出された²⁾. また、CYP93E3ホモログであるCYP93E2を導入した酵母の抽出物からは、 β -アミリンの24位水酸化体である24-ヒドロキシ- β -アミリンおよびカルボン酸である β -アミリン24-オイック酸が検出された(図1).

遺伝子共発現データ解析による新規P450遺伝子の単離

これまでに単離されたトリテルペノイド生合成に関わるP450は、CYP93E、CYP88D、CYP72Aといずれも異なるサブファミリーに属していた. そのため、トリテルペノイド生合成に関わる新規なP450を単離するためには新たな戦略が必要であった. 私たちは、新たな候補P450を見いだすための手法として、「関連する機能を有

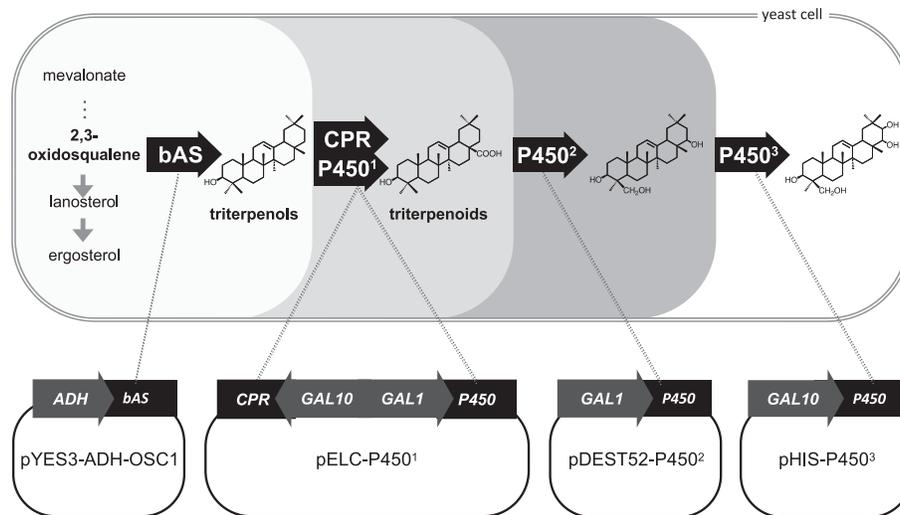


図2. 本研究で使用した酵母発現システムの原理. *bAS*は恒常的に発現する *ADH*プロモーターの制御下に導入した (pYES3-ADH-OSC1). 酵母内在のステロール合成経路の中間産物である2, 3-オキドスクアレンからβ-アミリンを酵母細胞内で合成・供給した. 次に, P450¹とCPRをそれぞれガラクトース誘導性プロモーター (*GAL10*と*GAL1*)の制御下に導入した (pELC-CPR/P450¹). さらに, P450²とP450³を *GAL1*と*GAL10*プロモーターの制御下に導入した (pDEST52-P450², pHIS-P450³).

する遺伝子は発現パターンが類似していることが多い」ことに基づく遺伝子共発現解析を行った。

タルウマゴヤシの遺伝子共発現解析ツールを用いて, *bAS*と類似した遺伝子発現パターンを示すP450を抽出し, CYP716A12を見いだした. 続いて, CYP716A12の機能を解明するため, 上記のβ-アミリン生産酵母にCYP716A12を導入し, 酵母培養液の酢酸エチル抽出物をGC-MSにより分析した. また, ルペオールおよびα-アミリンをそれぞれ生産する酵母を用いて同様の実験を行うとともに, プドウやオリーブなどからも, CYP716Aサブファミリー遺伝子を単離し, 同様の方法を用いて酵素機能解析を行った.

β-アミリン生産酵母にCYP716A12を導入した結果, この酵母が, オレアノール酸を生産することを見いだした. これにより, CYP716A12がβ-アミリンの28位の3段階の酸化反応を触媒し, オレアノール酸に変換する活性を持つことが判明した. また, α-アミリンあるいはルペオールを生産する酵母にCYP716A12を導入したところ, それぞれ, α-アミリン28位カルボン酸であるウルソール酸, および, ルペオールの28位カルボン酸であるベツリン酸を生産することを確認した. 以上の結果から, CYP716A12は複数の異なる炭素骨格を基質にするマルチファンクショナルなP450酸化酵素であることが判明した⁴⁾ (図1). さらに, プドウ⁴⁾, オリーブ, コーヒー, およびビートから見いだしたCYP716A12ホモログについても, 同様の手法を用いてβ-アミリン, α-ア

ミリンおよびルペオールに対する酸化活性の有無を調べたところ, 同様の酵素活性を持つことが判明した.

トリテルペノイドのコンビナトリアル合成

上述の通り, タルウマゴヤシにおけるCYP72Aサブファミリーに属するP450 7分子種のうち, CYP72A63のみが, β-アミリンを基質としての30位水酸化反応を示した. 一方, *bAS*との共発現データ解析により, β-アミリンの28位の3段階の酸化反応を触媒するCYP716A12を見いだすことができた. そこで, トリテルペノイド生合成に係わるP450遺伝子と類似の発現パターンを示すP450を検索することにより, 多段階の酸化に係わるP450を見いだせるのではないかと考えた.

タルウマゴヤシの遺伝子共発現解析ツールを用いて, CYP93E2と類似した遺伝子発現パターンを示すP450を検索した結果, CYP72A61v2は相関係数0.9を示すことがわかった. 同様にCYP716A12の遺伝子発現パターンはCYP72A68v2またはCYP72A67v2遺伝子の発現パターンと相関していることがわかった (それぞれ相関係数0.8, 0.7). そこで次に, a) *bAS*, CPR, CYP716A12およびCYP72A67v2またはCYP72A68v2遺伝子発現酵母と, b) *bAS*, CPR, CYP93E2およびCYP72A61v2遺伝子発現酵母を作成した. さらに, P450のさまざまな組合せによりどのようなトリテルペノイドが生成しうるか検討するため, *bAS*, CPR, CYP93E2およびCYP88D6 (または, CYP93E3, CYP716A12やCYP72A63) 遺伝

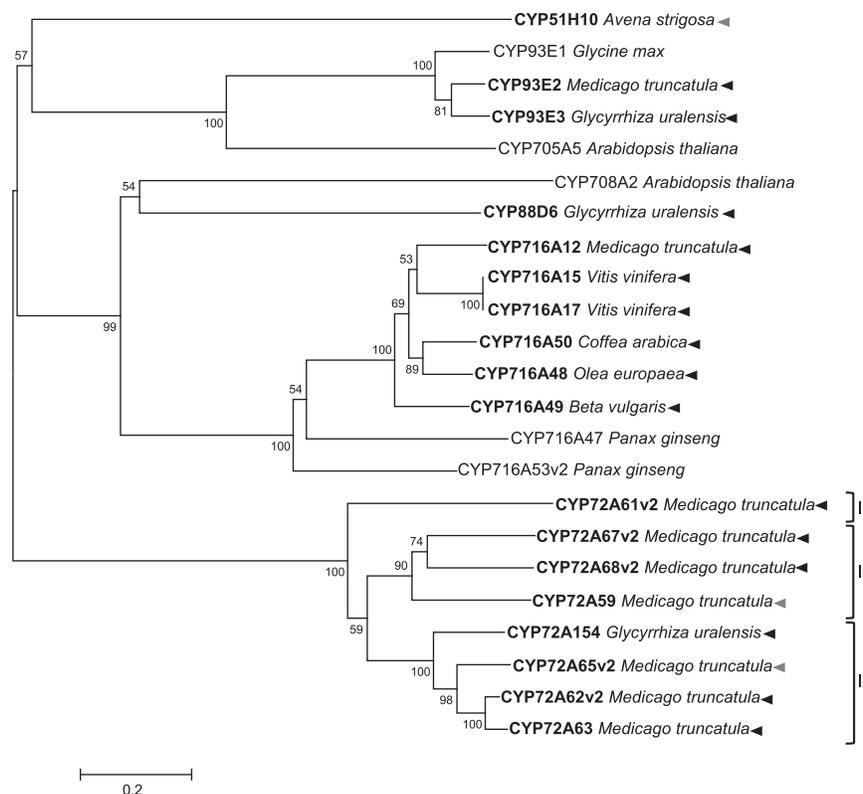


図3. トリテルペノイド生合成関連P450の分子系統樹. 現在報告されているP450のアミノ酸配列をもとにClustalWとMEGA5ソフトを用いて分子系統樹を作成した. 本研究で機能を明らかにしたP450を黒矢印で示している. 酵素活性が未同定のP450を灰色矢印で示している. ローマ数字はCYP72A サブファミリー内で提案されたサブグループを示している²⁾.

子発現酵母を, 上述のP450の酵母発現ベクターで形質転換した. 各酵母培養液の酢酸エチル抽出物をGC-MSにより分析し, β -アミリン酸化物の検出を行った.

タルウマゴヤシ溶血性・非溶血性サポゲニンの生合成⁵⁾
タルウマゴヤシサポゲニンは構造・溶血活性によって溶血性 (C-23位水酸基およびC-28位カルボキシ基を有する) と非溶血性 (C-24位水酸基を有する) に分類されている. 本研究により同定したCYP716A12とCYP93E2はそれぞれ溶血性・非溶血性サポゲニンの生合成経路の鍵酵素として機能していることが判明した (図1). さらに, CYP716A12とCYP72A68v2を組み合わせで発現させた酵母の抽出物からはギブソゲニン酸と同定されるピークが検出された. また, CYP93E2とCYP72A61v2を組み合わせで発現させた酵母の抽出物からは, ソヤサポゲノールBと同定されるピークが検出された. よって, CYP72A68v2とCYP716A12は溶血性サポゲニンの生合成に協調的に機能し, 一方, CYP72A61v2とCYP93E2は非溶血性サポゲニンの生合成に協調的に機能していることが判明した (図1).

レア・トリテルペノイドのコンビナトリアル生合成⁵⁾
Medicago 属は β -アミリンの23, 24, 28, 30位酸化体を含むことが報告されている. そこで, 上記実験で単離したP450をさまざまな組み合わせ, 特に「遺伝子発現パターンが互いに類似していないP450」を組み合わせで β -アミリン生産酵母に導入することによって, 天然にはレアなトリテルペノイドを生産できるのではないかと考え, 検証実験を行なった. その結果, CYP716A12とCYP72A63の組み合わせでは, タルウマゴヤシで検出されないケレタロ酸と推測されるピークが検出された (図1). 次に, CYP93E2とCYP716A12の組合せ実験を行ったところ, *Medicago* 属で検出されない4-エピヘデラゲニンと同定されたピークが検出された (図1). さらに, CYP93E2とCYP72A63の組合せでは, 今までいずれの植物からも報告されていない β -アミリン24, 30位酸化物が検出された.

グリチルレチン酸のコンビナトリアル生合成 11-オキソ- β -アミリンを生産するように改変した組換え酵母に, 各CYP72A 遺伝子を導入し, 11-オキソ- β -アミリンに対する反応性を調べた. その結果, 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²⁾、CYP72A62v2およびCYP72A63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。CYP72A62v2とCYP72A63は互いに93.5%のアミノ配列同一性を示す(33箇所のアミノ酸残基のみが異なる)ことから、CYP72AサブファミリーP450の反応位置選択性決定に重要な役割を果たすアミノ酸残基の特定に向けて有用な研究材料が得られたと考えられる。さらにこの結果は、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た生合成、すなわち、コンビナトリアル生合成により、生産性を向上させる可能性があることがわかった。私たちは、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、培養プロセスの検討などによる、酵母でのグリチルレチン酸の生産を目指した開発研究を実施しているところである。

マメ科のモデル植物であるタルウマゴヤシは β -アミリンの2, 16, 21, 22, 23, 24, 28位酸化体を含むことが報告されている。本研究ではこれらのうち、22, 23, 24, 28位の酸化に関わるP450を同定することに成功した。これにより、高等植物トリテルペノイドの生合成には、互いに一次構造の類似性が低いP450が協調的に機能していることが明らかとなった(図3)。

以上、トリテルペノイド生合成に関わるP450は、CYP93E, CYP88D, CYP72A, CYP716Aサブファミリーに加え、ごく最近、単子葉植物にのみ見られるCYP51Hサブファミリー(CYP51H10)の機能が明らか

かとなった⁶⁾。これらの分子種を組み合わせることで発現させることにより、目的とするトリテルペンを大量生産できる可能性がある。一方、*bAS/CYP93E2/CYP72A63*発現酵母で、今までいずれの植物からも報告されていない β -アミリン24, 30位酸化物が検出されたように、さまざまな分子種を組み合わせることで発現させることにより天然に存在しても微量にしか検出されない、あるいは天然にないトリテルペノイドライブラリーを構築できる可能性を秘めている。これによりこれまで微量であるために生理活性検索が困難であった新たなトリテルペノイド分子種の発見—創薬への応用が期待できる。

現在、私たちは、トリテルペノイドだけでなく、ジテルペノイド、セスキテルペノイド、ポリテルペノイドなども視野に入れた「テルペノイドファクトリー」を目指した研究ネットワークを構築したいと考えている。

本研究の一部は、科学技術振興機構 研究成果最適展開支援プログラム (ASTEP) 起業挑戦タイプ (検証試験)「レアプラント甘草のグリチルレチン酸関連物質の微生物製造法開発」、生物系特定産業技術研究支援センター・イノベーション創出基礎的研究推進事業「作物における有用サポニン産生制御技術の開発」および文部科学省科学研究費補助金「生合成マシナリー、生物活性物質構造多様性創出システムの解明と制御」により実施した。

文 献

- 1) Seki, H. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 14204 (2008).
- 2) Seki, H. *et al.*: *Plant Cell*, **23**, 4112 (2011).
- 3) Shibuya, M. *et al.*: *FEBS J.*, **273**, 948 (2006).
- 4) Fukushima, E. O. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **52**, 2050 (2011).
- 5) Fukushima, E. O. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **54**, 740 (2013).
- 6) Kunii, M. *et al.*: *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 801 (2012).