

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05576

研究課題名(和文)植物由来の新規糖転移酵素の特性の解明とヒスタミン遊離抑制剤の創製への応用

研究課題名(英文)Glycosylation using plant enzymes to produce anti-histamine agent

研究代表者

浜田 博喜 (Hamada, Hiroki)

岡山理科大学・理学部・教授

研究者番号：10164914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：糖質誘導体は、医薬品への応用が期待されている。特に、糖質誘導体の中でも、ヒスタミン遊離抑制剤として有用な物質が知られている。植物培養細胞が行う反応には酵素が関与しており、有機化学合成のような過激な反応条件を必要としない。このため、副生成物が少なくグリーンケミストリーに適している。今回、植物培養細胞とその糖転移酵素を利用して、植物培養細胞に含まれない外来物質に対して、メチル化、および、糖転移などの変換を行った。なかでも、糖転移反応は植物の特徴であり、カプサイシン、スチルベノイドなどが植物培養細胞および糖転移酵素によって効率的に糖転移された。

研究成果の概要(英文)：Cultured plant cells and their enzymes are useful for studying the biosynthesis of secondary metabolites, such as flavors, pigments, and agrochemicals from view of green chemistry. To date the biotransformation of various organic compounds has been investigated for the biotechnological application of plant cultured cells and enzymes. The reactions involved in the biotransformation of organic compounds by cultured plant cells and enzymes include methylation and glycosylation. Particularly, glycosylation attracts pharmaceutical attention because many glycosides show anti-inflammatory and anti-histamine activities. In this study, capsaicin and stilbenoids were glycosylated and methylated by cultured plant cells and plant enzymes.

研究分野：酵素化学

キーワード：酵素変換

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物組織培養は、細胞の生育、代謝に必要な栄養成分を含んだ培地で、植物の組織の一部を培養し、細胞を増殖する技術である。植物、カビと微生物は二次代謝産物と呼ばれる特定の種特異的で多様な化合物群を生合成し、自らの生存戦略に利用している。これらの化合物は、その骨格形成のあとしばしば糖付加修飾(糖転移)を受けて蓄積されることが知られている。糖質誘導体は、元の化合物と比べて水に溶けやすくなる、化合物自体の安定性が增大する、などその物性が大きく変化することから、生理活性物質の機能調節や、物質の貯蔵、解毒などに寄与すると考えられている。このことから、糖質誘導体は、医薬品、化粧品や健康食品への応用が期待されている。特に、糖質誘導体の中でも、ヒスタミン遊離抑制剤として有用な物質が知られている。

(2) 植物培養細胞が行う反応には酵素が関与しており、有機化学合成のような過激な反応条件を必要としない。また、酵素の特徴として高い基質特異性や反応特異性を持つため、副生成物が少なくグリーケミストリーに適している。故に、植物培養細胞、器官および組織を *in vitro* で大量に培養することで、有用な生理活性物質を大量生産して、その活性化合物の安定供給を行う試みが、近年進められている。

植物培養細胞は、植物培養細胞に含まれない外来物質に対して、水酸化、酸化、還元、メチル化、脱メチル化、エポキシ化、縮合、異性化および糖転移などの変換を、微生物を利用したときと同様に行うことが知られている。なかでも、芳香族系の化合物を効率よく糖転移することができる。この糖転移反応は植物の特徴であり、微生物では稀にしか起こらない。外来物質として、サリチル酸、カプサイシン、ジギトキシゲニンなどが植物培養細胞によって効率的に糖転移されている。ヨウシュヤマゴボウ培養細胞は、当研究室において高い糖転移能力を有している事が見出されている。植物における糖転移反応は、糖転移酵素(glucosyltransferase (GT))が触媒となり反応が起きる。これまでに多くの植物由来の糖転移酵素の結晶解析が報告されているが、ヨウシュヤマゴボウ由来の糖転移酵素の構造は知られていない。

2. 研究の目的

本研究ではヨウシュヤマゴボウ培養細胞を生体触媒として、機能性ポリフェノール化合物の物質変換研究を行った。さらに、ヨウシュヤマゴボウ培養細胞へ基質を投与した際に発現した□RNAを単離し、糖転移酵素を精製した。次に、ヨウシュヤマゴボウ培養細胞由来の糖転移酵素を生体触媒として使用して、ポリフェノール類の糖転移を行った。

3. 研究の方法

(1) MS 基本培地に sucrose 3%、BA (6-benzyladenin) または 2, 4 - D (2, 4 - Dichlorophenoxyacetic acid) 1 ppm を添加した培地 (100 mL) に植物培養細胞を 20 g 移植し、3日間培養した。

その後、DMSO に溶解した基質を投与し、さらに3日間培養した。培養細胞をナイロンメッシュで培地部と細胞部に別し、培地部は酢酸エチルで分配抽出し、ホモジナイズした後、メタノールで静置抽出を行った。それぞれの有機層を減圧濃縮し、メタノールで 2.5 mL に定溶し、サンプルとした。変換生成物の構造解析は HPLC、NMR 及び LC/MS を用いて行った。

(2) 今回、基質として唐辛子の辛み成分であるカプサイシノイド、機能性植物ポリフェノール化合物であるスチルベン誘導体及びフラボノイド化合物を用いて物質変換を行った。

ヨウシュヤマゴボウ由来の糖転移酵素による反応では、糖供与体として、UDP-グルコースを使用して、基質と共に糖転移酵素とインキュベーションを行い、生成物を酢酸エチルで抽出した。変換生成物の構造解析は上と同様に、HPLC、NMR 及び LC/MS を用いて行った。

4. 研究成果

(1) HPLC 分析の結果から、それぞれ変換物と思われるピークを検出した。これらを単離精製し NMR で構造解析を行った結果、水酸基に糖の結合した配糖体を得ることができた。以下に今回用いた化合物の一つであるカプサイシンの構造解析結果を示す。

まず、¹H および ¹³C NMR より出発物質であるカプサイシンのシグナルと、糖のシグナルが観測された。さらに ¹H NMR からアノメリックプロトンが 4.85 ppm にダブルットシグナルとして観測され結合定数が 7.2 Hz であったことから β 結合であると決定した。さらにより詳細な解析を行うために二次元構造解析を行った。

HMQC、¹H-¹H COSY スペクトル測定によって各水素と炭素間および水素同士の相関を確認した。また、2次元 HMBC スペクトル測定の結果、カプサイシンの4位とアノメリックプロトンに相関が見られたことから、カプサイシンの4位に糖の結合した配糖体であると決定した。

さらに、糖の種類を確認するために NOESY 測定を行い、相関を確認した結果、付加した糖はグルコースであると決定した(図1)。

(2) その他の化合物についても同様に構造解析を行った結果、それぞれ水酸基にグルコースの付加した O-配糖体であると決定した。

更に、暗条件下 *P. americana* 培養細胞において、スチルベンとフラボノイドでは配糖化に加えメチル化も確認された(図2)。

(3) 糖転移酵素 PaGT2 については、ピセアタ

ンノールのみで配糖体の合成が確認できた。また、糖転移酵素 *PaGT3* に関しては今回用いた全ての基質において配糖体の合成が確認できた。

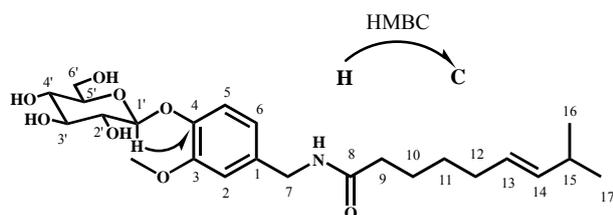


図 1. カプサイシン変換物の化学構造

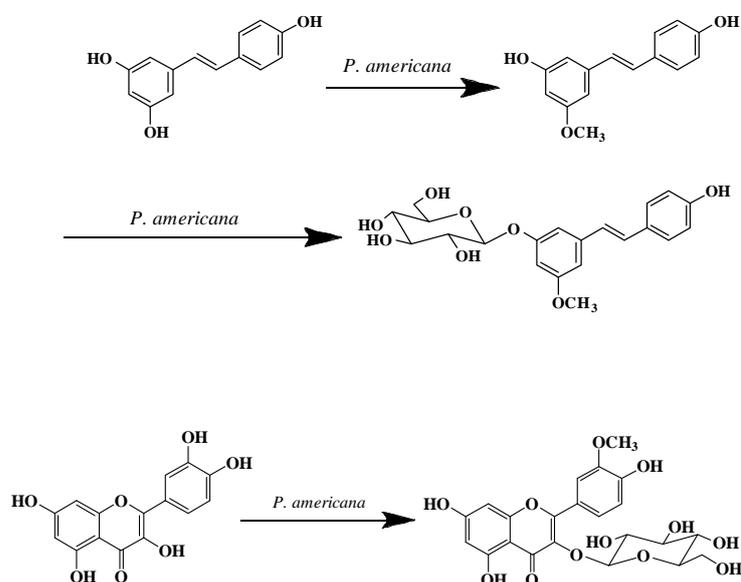


図 2. ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるメチル化と配糖化

ヨウシュヤマゴボウ培養細胞はそれぞれの化合物の水酸基を配糖化することが明らかとなった。植物培養細胞を用いた変換では室温である点、水を基本とした反応溶媒を用いる点など環境にもやさしく効率的な配糖体の合成が期待される。

糖転移酵素に関して、*PaGT2* は今回用いた基質で反応が行われなかったことから、今後さらにスクリーニングを重ねて、特異的反応を呈する物質の探索が必要である。一方で、*PaGT3* ではすべての基質で反応が行われた。このことから酵素自体の基質特異性は低く様々なものに应用できる酵素ではないかと示唆される。

結晶構造解析の結果から、基質結合型の結晶は非対称単位に3つの *PaGT2* 分子を含んでおり、全ての分子中に UDP-2F-グルコースの明瞭な電子密度が観測された。ドナー分子結合部位には PSPG モチーフと呼ばれる保存さ

れたアミノ酸残基が存在しているため、UDP-2F-グルコースの結合は既知の糖転移酵素における UDP-グルコースの結合様式とほぼ同じであった。一方、レスベラトロールの電子密度は3分子中1分子のみで明瞭に観測された。したがって、*PaGT2* とレスベラトロールとの結合の弱いことが示唆された。*PaGT2* のアクセプター分子結合部位が既知の転移酵素より広いことが、レスベラトロールと *PaGT2* の結合が弱い理由であると考えられる。レスベラトロールのフェノール部位は溶媒へ露出しており、糖が結合する水酸基酸素原子は、活性残基として保存されている His18 から 6.1 Å も離れていた。レスベラトロールと *PaGT2* の結合が弱いことと活性残基 His18 が基質から遠い位置に存在することは、*PaGT2* においてレスベラトロールへの配糖化活性が低いことと矛盾しない。また、レスベラトロールの 4' 位水酸基から 4.7 Å という比較的近い位置に His81 があり、この残基も活性に関わる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Yuya Fujitaka, Kei Shimoda, Naoji Kubota, Minami Araki, Tatsuya Onishi, Noriyuki Nakayama, Kohji Ishihara, Masato Tanigawa, Hatsuyuki Hamada, Hiroki Hamada, Glycosylation and methylation of quercetin and myricetin by cultured cells of *Phytolacca americana*. *Natural Product Communications*, 査読有, Vol. 12, No. 4, 2017, pp. 523-524.
- ② Daisuke Uesugi, Hiroki Hamada, Kei Shimoda, Naoji Kubota, Shin-ichi Ozaki, and Naoki Nagatani, Synthesis, oxygen radical absorbance capacity, and tyrosinase inhibitory activity of glycosides of resveratrol, pterostilbene, and pinostilbene. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, Vol. 81, No. 2, 2017, pp. 226-230.
- ③ K. Shimoda, N. Kubota, D. Uesugi, H. Hamada, M. Tanigawa, H. Hamada, Synthesis and pharmacological evaluation of glycosides of resveratrol, pterostilbene, and piceatannol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 査読有, Vol. 1348, 2015, pp. 141-149.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 濱田博喜, 藤高侑也, 荒木美奈実, 上杉大介, 下田恵, 小崎紳一, 井上豪 ヨウシュヤマゴボウ培養細胞由来糖転移酵素を用いたスチルベン誘導体の配糖化 第 80 回 日本植物細胞分子生物学会 (埼玉) 2017. 8 月 29 日~31 日
- ② 下田恵, 小崎紳一, 濱田博喜 植物培養細胞による N-グリコシル化 第 34 回 日本植物細胞分子生物学会 (長野) 2016. 9 月 1~3 日
- ③ Shota Okada, Daisuke Uesugi, Noriyuki

Nakayama, Shota Doi, Shogo Kawamura,
Kei Shimoda, Shinichi Ozaki, Hiroki
Hamada

Synthesis and evaluation of glycosides of
trans-resveratrol, pterostillbene, and
piceatannol

ISPSA2015 TOKUSHIMA (徳島)

2015.8.28~9.2

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜田 博喜 (HAMADA, Hiroki)

岡山理科大学・理学部・教授

研究者番号：10164914

(2) 研究分担者

下田 恵 (SHIMODA, Kei)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：40284153

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

上杉 大介 (UESUGI, Daisuke)