

令和元年6月12日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08297

研究課題名(和文) 基質特異性と配列相同性の相関による機能未知二次代謝糖転移酵素の同定と応用

研究課題名(英文) Identification of plant secondary product glycosyltransferases by functional and informatics analysis

研究代表者

寺坂 和祥 (TERASAKA, Kazuyoshi)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号：60405214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：植物二次代謝産物の生合成において、未知のアントラキノン特異的配糖化酵素を単離することを目的として研究を実施した。シークエンス解析とデータベース情報の双方を利用して、Rheum属植物から植物二次代謝糖転移酵素の遺伝子配列を網羅的に取得した。組換え酵素を用いた触媒機能解析により、アントラキノンに対して高い活性を有する植物二次代謝糖転移酵素を複数見出した。これらは、アントラキノン配糖体の生合成において重要な役割を果たしている可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の遺伝子配列情報の中には非常に多くの植物二次代謝糖転移酵素が存在しているが、その大半の機能は未だ不明であり、本研究で得られたアントラキノン配糖化酵素の配列情報が、機能未知の配糖化酵素の機能同定に有益な情報をもたらすことが期待できる。また、薬用植物において含量が少なく、薬理活性解析が十分ではないアントラキノン配糖体を効率良く得るためのツールとして、本研究で見出された配糖化酵素を利用していくことが可能である。

研究成果の概要(英文)：Plant secondary product glycosyltransferases in the anthraquinone glucoside biosynthetic pathway have yet to be characterized. In this study, we isolated cDNAs encoding plant secondary product glycosyltransferases from Rheum species by next-generation sequencing technology and informatics approach. Several recombinant enzymes of these glycosyltransferases had glucosylation activity toward anthraquinone aglycones. These results suggest that these glycosyltransferases might be UDP-glucose: anthraquinone glycosyltransferase in Rheum species.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：植物二次代謝糖転移酵素 アントラキノン 薬用植物 配糖体 機能性化合物 Rheum属植物

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物由来の二次代謝産物の有する多彩な機能性は、その構造の多様さによりもたらされるものである。基本骨格の多様性に加えて、水酸化、メチル化、配糖化(糖転移)などの多くの位置選択的な修飾反応が大きく寄与することで、無限の構造多様性が創出される。これらのうち特に配糖化は、植物の二次代謝糖転移酵素により行われ、複雑な糖鎖構造を創出する。それだけでなく、化合物の生理活性や物理化学的性質などを決定する最も重要なステップの一つである。植物二次代謝糖転移酵素の配列情報は植物の大規模シーケンス解析とともに急速に増加し、組換え酵素や変異体の解析により機能も報告されているが、その機能が明らかなものは限られたごく一部の分子種だけである。

これまでわれわれは、様々な薬用植物の生理活性を担う配糖体の生合成経路上で未知であった配糖化酵素を多数単離してきた。この研究成果をふまえると、植物の配糖体生合成に必須な特異的配糖化酵素が、植物ゲノムの中に未だ埋もれたままであり、特に薬用植物では多様性に富んだ配糖体が生合成されることから、よりユニークな活性をもつ配糖化酵素が存在していると推定できる。現在、一部の植物由来の配糖化酵素では、その立体構造と基質認識のメカニズムが解析されているものの、基質特異性の異なる別の配糖化酵素の機能推定に適用できるまでには至っていない。つまり、新しいユニークな基質特異性をもつ配糖化酵素を見出すには、大量の配列情報からのランダムスクリーニングに依存せざるを得ない。そこで、われわれのもつ多数の植物由来の配糖化酵素ライブラリーを天然の基質認識ポケットライブラリーとして利用して、アグリコンに対する配糖化活性の新規の基質特異性や位置選択性を見出し、その配糖化酵素の配列相同性に着目するファンクショナルスクリーニングを導入することが、大量の配列情報の中から目的の配糖化酵素を効率的な単離に至る方法ではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

アントラキノン類は天然有機化合物の中で大きなグループを占めており、薬用植物では、ダイオウ属植物に含有され、ダイオウを始めとした生薬の指標成分としても知られている。植物中では異なる位置の水酸基が配糖化された配糖体として存在することが多いものの、その生合成を担う配糖化酵素については未だ不明である。また、その薬理活性については、アグリコンの抗菌活性や emodin 配糖体の一部についての神経細胞保護作用などが報告されているのみである。

本研究では、このアントラキノンモデル化合物として、薬用植物のゲノムに多数コードされている植物二次代謝糖転移酵素の中から、われわれが蓄積してきた配糖化酵素ライブラリーと次世代シーケンス技術を効果的に組み合わせることで、分子実体が未知である、アントラキノン生合成系の特異的配糖化酵素を明らかにすることを目的とした。

具体的には、以下の3点から研究を進めることとした。

- (1) RNA シークエンシングと homology-based PCR により、ダイオウ属植物から配糖化酵素遺伝子を網羅的に取得する。
- (2) 配糖化酵素ライブラリーを利用してアントラキノン配糖化能のスクリーニングを行う。  
(1)の結果と組み合わせてアントラキノン特異的配糖化酵素を得る。
- (3) 植物体における機能解析を行うとともに、アントラキノン配糖体合成系の確立を行い、アントラキノン配糖体の効率的生産系を創出する。

### 3. 研究の方法

#### (1) ダイオウ属植物からの配糖化酵素遺伝子の網羅的取得

アントラキノン特異的配糖化酵素単離の植物材料として、モミジバダイオウ(*Rheum palmatum*)を用いて遺伝子配列情報取得を行った。特にモミジバダイオウの生薬としての用部である根茎と用部にはならない葉を用いて、mRNA を単離し、RNA シークエンシングを行った。そのデータからアセンブリーとアノテーション、発現解析を行った。

また、モミジバダイオウ根茎の mRNA から調製した cDNA を用いて、植物二次代謝糖転移酵素に高度に保存されたアミノ酸配列に基づいた degenerate primer を用いた PCR により、全長 cDNA の単離を行った。さらに、モミジバダイオウの類縁植物であり、食用ダイオウとしても知られるカラダイオウ(*Rheum rhabarbarum*)のデータベース情報を利用して、カラダイオウに含まれる配糖化酵素遺伝子の探索と単離を行った。

#### (2) 配糖化酵素活性の測定

これまでわれわれが蓄積してきた植物糖転移酵素ライブラリーから、複数の酵素を大腸菌を用いて組換え酵素として発現させ、その粗酵素とダイオウ属植物に配糖体として含まれるアントラキノンである emodin や aloe-emodin を基質とした配糖化反応を行い、生成物を HPLC で分析することで位置選択的な配糖化能を検定した。

### (3) アントラキノン配糖化酵素の機能解析

アントラキノン配糖化酵素の候補遺伝子を組換え酵素として発現させ、これを用いて、基質特異性をはじめとするその触媒機能を解析した。また、候補遺伝子の植物体の器官における遺伝子発現を RT-PCR 法や qRT-PCR 法により解析した。さらに、植物体内でのアントラキノンアグリコンや配糖体の蓄積量の解析は、各器官の抽出液を HPLC や LC-MS/MS で分析することで行った。

## 4. 研究成果

(1) モミジバダイオウの根茎および葉を用いた RNA シークエンシングにより、網羅的な遺伝子配列情報と根茎と葉における遺伝子発現情報を得た。植物二次代謝糖転移酵素遺伝子の配列も多数含まれており、アントラキノン特異的な配糖化酵素が含まれていることが期待できる。また、モミジバダイオウの根茎由来の cDNA を用いて、homology-based PCR 法により、配糖化酵素遺伝子の単離を試みた結果、3 分子種のクローニングに成功した。さらに、カラダイオウ (*Rheum rhabarbarum*) のデータベース情報を利用した配糖化酵素遺伝子の単離により、9 分子種を単離した。

(2) 様々な植物由来の植物配糖化酵素ライブラリーから複数の配糖化酵素を選択し、emodin や aloe-emodin を基質とした配糖化反応を行った結果、配糖化酵素によって配糖化される水酸基について位置選択性が見られた。しかしながら、用いた配糖化酵素の配列相同性と配糖化されるアントラキノンの構造や水酸基の位置に関して、明確な相関は見出せなかった。また、植物配糖化酵素ライブラリーの拡充のため、既に単離していたイチゴ由来の香り成分に対する特異性の高い配糖化酵素 UGT85K16 の詳細な機能解析を行い、香り成分の配糖化による植物細胞内での蓄積への寄与について明らかにした。

モミジバダイオウの根茎由来の 3 種の配糖化酵素について、アントラキノンに対する配糖化活性をスクリーニングした結果、1 分子種に emodin 配糖化活性を見出した。また、カラダイオウから単離した 9 種の配糖化酵素について、同様にアントラキノンに対する配糖化活性を検討した結果、2 分子種がアントラキノン配糖化活性を有していることを見出した。

(3) モミジバダイオウの根茎由来の emodin 配糖化酵素について、機能解析を進めた結果、この配糖化酵素は、モミジバダイオウにも含まれるスチルベンに対しても配糖化活性を有していた。また、遺伝子発現について解析した結果、植物体の各器官で発現していた (manuscript in preparation)。さらに、植物体各器官でのアントラキノンアグリコンや配糖体の蓄積について分析を行った結果、化合物によって植物体内での分布が異なっていた。このことから、アントラキノン配糖化酵素の発現分布も分子種によっては偏りがあることが推定された。

以上の結果から、アントラキノン骨格を特異的に認識し、配糖化する配糖化酵素の同定には至っていないものの、本研究で得られた新規の配糖化酵素の中にアントラキノン特異的配糖化酵素が含まれていることが期待される。また、モミジバダイオウの RNA シークエンシングデータには、アントラキノン類の生合成において未同定の酵素の情報が含まれていることが期待され、今後、様々な遺伝子の探索に幅広く応用できるものと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yamada A, Ishiuchi K, Makino T, Mizukami H, Terasaka K. A glucosyltransferase specific for 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone in strawberry. *Biosci Biotech Biochem*, 83, 106-113, 2019. DOI: 10.1080/09168451.2018.1524706

〔学会発表〕(計 3 件)

近藤 未来、寺坂 和祥、牧野 利明 . モミジバダイオウからのアントラキノン配糖化酵素候補遺伝子のクローニング、日本薬学会第 137 年会 (仙台)、2017 年 .

近藤 未来、政田 さやか、寺坂 和祥、牧野 利明 . モミジバダイオウ由来アントラキノン配糖化酵素候補遺伝子の単離と機能解析、第 35 回日本植物細胞分子生物学会 (さいたま) 大会、2017 年

山田 和輝、木村 雪乃、鮎川 美奈子、永利 麻衣、牧野 利明、寺坂 和祥 . 組換え大腸菌を

用いた crocin 及び前駆体の生産、第 36 回日本植物細胞分子生物学会(金沢)大会、2018 年 .

浅井 恒志、牧野 利明、寺坂 和祥 .カラダイオウからのアントラキノン配糖化酵素の探索、  
日本薬学会第 139 年会(千葉)、2019 年 .

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

なし

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：石内 勘一郎(名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師)

ローマ字氏名：(ISHIUCHI, Kan'ichiro)

研究協力者氏名：政田 さやか(国立医薬品食品衛生研究所・主任研究官)

ローマ字氏名：(MASADA, Sayaka)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。