

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07754

研究課題名（和文）ゲノム情報を駆使した甘草トリテルペノイド生合成制御の包括的理解

研究課題名（英文）Comprehensive understanding of the regulatory mechanisms underlying triterpenoid biosynthesis in licorice

研究代表者

関 光 (SEKI, HIKARU)

大阪大学・工学研究科・准教授

研究者番号：30392004

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）：トリテルペノイドサポニンはいくつかの生薬の活性成分や天然甘味成分として知られる植物成分の一グループである。マメ科の薬用植物カンゾウ（甘草）は肝庇護薬、抗炎症剤、甘味料原料として用いられるサポニンであるグリチルリチンのほか、マメ科植物が共通して生産するソヤサポニンを生合成するがその制御機構は不明である。本研究では、カンゾウにおけるソヤサポニン生合成酵素の転写を活性化するbHLH型転写因子（GubHLH3）の同定に成功した。また、チルリチン生合成酵素遺伝子の発現を活性化する転写因子の候補としてGubHLH3とは異なる5種の転写因子を新たに選抜し解析を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物は多様な有用低分子化合物（植物二次代謝産物）を生産する。トリテルペノイドサポニン（サポニン）はいくつかの生薬の活性成分や天然甘味成分として知られる植物成分の一グループである。肝庇護薬、抗炎症剤、甘味料原料として用いられるサポニンであるグリチルリチンを生産する薬用植物カンゾウ（甘草）の根は漢方処方箋の7割以上に配合されている。本研究で得られた、サポニン生合成の制御機構に関する知見は有効成分含量が高い植物系統の作出や栽培条件の確立において有用な情報である。

研究成果の概要（英文）：Plants produce a vast array of useful small molecules called secondary metabolites. Glycyrrhizin is a triterpenoid saponin produced only in roots and stolons of *Glycyrrhiza* species (licorice) in the legume family. It is widely used as medicines and natural sweetener. Besides glycyrrhizin, licorice also produces soyasaponins. Biosynthesis of saponins is strictly regulated as it is often limited in the specific organs or tissues, or induced in response to external or internal stimuli. However regulatory mechanism of triterpenoid biosynthesis is largely unknown. The objective of this research is to identify transcription factors (TFs) regulating saponins biosynthesis in licorice. We identified a bHLH-type TF able to activate transcription of soyasaponin biosynthetic genes. We also identified some candidate TFs potentially regulate glycyrrhizin biosynthetic genes.

研究分野：植物二次代謝

キーワード：トリテルペノイドサポニン 生合成 転写制御因子 シトクロムP450 bHLH

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物が生産する多様なトリテルペン関連化合物(トリテルペノイド:6個のイソプレン単位からなる炭素数30の鎖状化合物、2,3-オキドスクアレンを共通前駆体とする化合物群)は、様々な生薬の主活性成分として知られている他、医薬品原料、化粧品原料、天然甘味料原料等として多用されている。トリテルペノイドの生合成は、器官・組織特異的に、あるいは種々の環境要因にตอบสนองして緻密に制御されている。しかしながら、その生合成制御機構に関する知見は少ない。そこで本研究では、植物有用トリテルペノイドの代表格である「グリチルリチン」を生産するマメ科薬用植物カンゾウを主な研究材料として、トリテルペノイド生合成酵素遺伝子の発現制御に関わるシス因子および転写制御因子の同定を目指した。

### 2. 研究の目的

植物におけるトリテルペノイドの生合成制御機構を、生合成酵素遺伝子の転写制御のレベルで明らかにする。特に、日本国内で最も使用量が多い生薬である甘草の基原植物であるマメ科カンゾウに着目し、カンゾウが特異的に生産するグリチルリチンやマメ科植物全般が共通して生産するソヤサポニンといった異なるトリテルペノイドの生合成が各器官・組織によってどのように制御(作り分け)されているのかを明らかにすべく、先に同定したグリチルリチンおよびソヤサポニン生合成酵素遺伝子の発現制御に関わるシス因子および転写制御因子を同定する。これにより、植物トリテルペノイド生合成制御の分子機構を解明するとともに、同定した転写制御因子を高発現する形質転換カンゾウ毛状根を作出し、転写因子を利用した植物トリテルペノイド代謝工学・物質生産への応用につながる基礎的知見を得ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) トリテルペノイド生合成酵素遺伝子のプロモーター単離と候補転写因子の機能解析

薬用植物カンゾウにおいて各種トリテルペノイド(グリチルリチン、ソヤサポニン、オレアノール酸、ベツリン酸)の生合成に関わるオキドスクアレン環化酵素( $\beta$ -アミリン合成酵素、ルペオール合成酵素)およびシトクロム P450 酸化酵素(CYP88D6、CYP72A154、CYP93E3、CYP72A566、CYP716A179) 遺伝子のプロモーター領域の単離と GUS レポーターコンストラクトの作成を行った。同時に、カンゾウのトランスクリプトームデータから、トリテルペノイド生合成制御に関与する転写因子の候補を選抜し、遺伝子クローニングならびにエフェクターコンストラクトの作成を行った。これらの候補転写因子の各酵素遺伝子プロモーターに対する転写活性化能をタバコ BY2 プロトプラストを用いたトランジェントアッセイ法により解析する。

#### (2) 転写因子を高発現する形質転換毛状根の作出と遺伝子発現解析

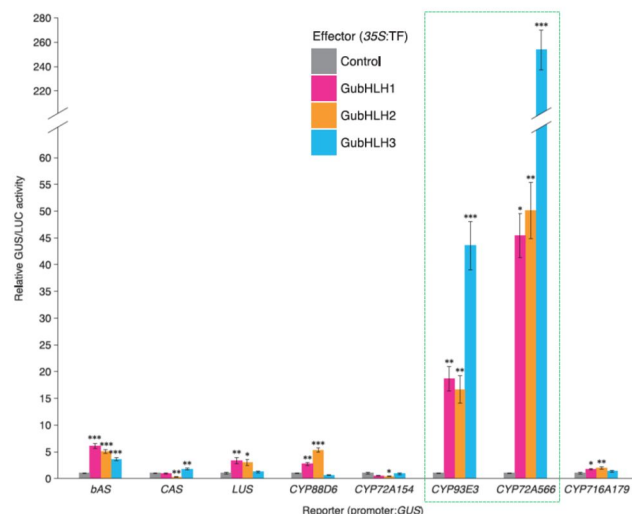
トリテルペノイド生合成酵素遺伝子の転写を活性化する転写因子を高発現するカンゾウおよびミヤコグサ形質転換毛状根を作出しトランスクリプトームおよびトリテルペノイド含量におよぼす効果を解析する。これにより、トリテルペノイド生合成と同時に制御されている遺伝子群を網羅的に解析する。

### 4. 研究成果

#### (1) トリテルペノイド生合成酵素遺伝子のプロモーター単離と候補転写因子の機能解析

これまでに整備したカンゾウの組織・器官別トランスクリプトームデータからトリテルペノイド生合成酵素遺伝子の発現制御に関わる候補転写因子のマイニングを行った。具体的には、グリチルリチン生合成に関わる *bAS* および *CYP88D6* に加え、ソヤサポニン生合成に関わる  $\beta$ -アミリン 24 位水酸化酵素(*CYP93E3*)をコードする遺伝子と発現パターンが類似する計9種の転写因子遺伝子を選抜し、全長コード領域を含む cDNA 断片を単離した。各候補転写因子 cDNA を構成的プロモーターである CaMV35S プロモーターの下流に連結したエフェクターコンストラクトを構築し、上記トリテルペノイド生合成酵素遺伝子プロモーター::GUS レポーター遺伝子に対する転写活性化能をタバコ BY-2 培養細胞由来プロトプラストへのレポーター/エフェクターコンストラクトのコ・トランスフェクションによって解析した。その結果、1種の bHLH 転写因子(GubHLH3)が、ソヤサポニン生合成に関わる *CYP93E3* および *CYP72A566* 遺伝子プロモーターからの転写を顕著に活性化することが判明した(図1)。さらに、*CYP93E3* 遺伝子プロモーターを5'上流側から段階的に欠失させたディレクションコンストラクトならびに bHLH ファミリーの結合モチーフに変異を導入した変異プ

図1. GubHLH3の転写活性化転写活性化能



ロモーターを用いた実験では転写活性化が起こらないことから、GubHLH3 はこれらのプロモーターへのダイレクトな結合を介して転写を活性化しているものと推察された (Tamura et al., 2018)。

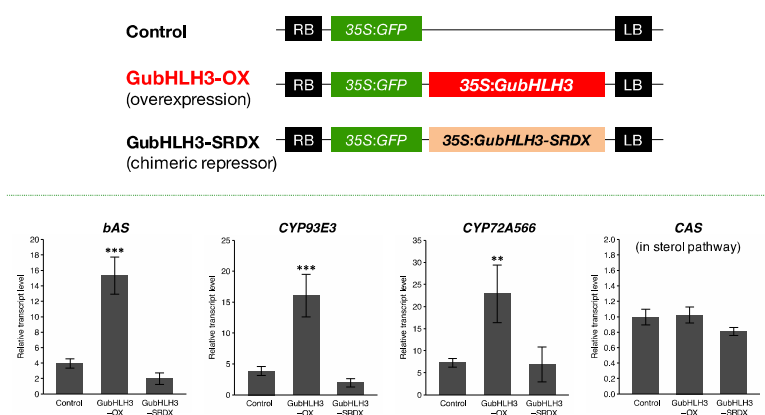
## (2) 転写因子を高発現する形質転換毛状根の作出と遺伝子発現解析

GubHLH3 を高発現するカンゾウの形質転換毛状根を作出したところ、コントロールの毛状根よりもソヤサポニン生成に関わる3種の酵素遺伝子 (*bAS*, *CYP93E3*, *CYP72A566*) の発現が有意に増高していることが判明した (図2)。また、GubHLH3 を高発現するカンゾウの形質転換毛状根はソヤサポニン生成中間体をより多く蓄積していることが判明した。以上の結果から、本bHLH型転写因子がカンゾウにおいてソヤサポニン生成を正に制御する因子であることが強く示唆された (Tamura et al., 2018)。

さらに、GubHLH3 の機能がマメ科において保存されたものかを調べるため、GubHLH3 を高発現するマメ科モデル植物ミヤコグサの毛状根も作出した。その結果、ソヤサポニン生成に関わる3種の酵素 (-アミリン合成酵素、*CYP93E3* オルソログ、*CYP72A566* オルソログ) 遺伝子の発現量が増高していること、すなわち GubHLH3 が別のマメ科植物においても同様にソヤサポニン生成を活性化する機能を発揮していることが判明した。

さらに、GubHLH3 を高発現するカンゾウおよびミヤコグサ毛状根のトランスクリプトーム (RNA-seq) 解析を行った。これにより、GubHLH3 の制御下で発現が活性化あるいは抑制される多数の機能未知遺伝子を発見した。これらの中には、機能未知の糖転移酵素やABCトランスポーター、根粒形成時に発現量が上昇する転写因子などが含まれていた。これによりトリテルペノイド生成に関わる未知酵素、トリテルペノイドの細胞外輸送に関わるトランスポーターの候補やソヤサポニンの生物学的機能を推察するうえで重要な情報が得られた。

図2、GubHLH3高発現毛状根における遺伝子発現



## < 引用文献 >

Tamura K, Yoshida K, Hiraoka Y, Sakaguchi, D, Chikugo A, Mochida K, Kojoma M, Mitsuda N, Saito K, Muranaka T, Seki H: The basic helix-loop-helix transcription factor GubHLH3 positively regulates soyasaponin biosynthetic genes in *Glycyrrhiza uralensis*. *Plant Cell Physiol.* 59(4): 783-796 (2018).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Nakamura M, Tran ML, Le QL, Suzuki H, Nguyen CM, Vu HG, Tamura K, Nguyen VT, Suzuki H, Misaki R, Muranaka T, Ninh KB, Fujiyama K, Seki H*                                    | 4. 巻<br>35            |
| 2. 論文標題<br>Transcriptome sequencing and identification of cytochrome P450 monooxygenases involved in the biosynthesis of maslinic acid and corosolic acid in <i>Avicennia marina</i> . | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>Plant Biotechnology  | 6. 最初と最後の頁<br>341-348 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>doi:10.5511/plantbiotechnology.18.0810a  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>該当する          |
| 1. 著者名<br>Takagi K, Yano R, Tochigi S, Fujisawa Y, Tsuchinaga H, Takahashi Y, Takada Y, Kaga A, Anai T, Tsukamoto C, Seki H, Muranaka T, Ishimoto M                                    | 4. 巻<br>156           |
| 2. 論文標題<br>Genetic and functional characterization of Sg-4 glycosyltransferase involved in the formation of sugar chain structure at the C-3 position of soybean saponins.             | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>Phytochemistry   | 6. 最初と最後の頁<br>96-105  |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.09.002  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-             |
| 1. 著者名<br>Suzuki H, Fukushima E.O, Umemoto N, Ohyama K, Seki H, Muranaka T   | 4. 巻<br>35            |
| 2. 論文標題<br>Comparative analysis of CYP716A subfamily enzymes for the heterologous production of C-28 oxidized triterpenoids in transgenic yeast.                                       | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>Plant Biotechnology  | 6. 最初と最後の頁<br>131-139 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>doi: 10.5511/plantbiotechnology.18.0416a   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-             |
| 1. 著者名<br>Seki Hikaru, Tamura Keita, Muranaka Toshiya  | 4. 巻<br>82            |
| 2. 論文標題<br>Plant-derived isoprenoid sweeteners: recent progress in biosynthetic gene discovery and perspectives on microbial production  | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry  | 6. 最初と最後の頁<br>927-934 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>doi.org/10.1080/09168451.2017.1387514  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-             |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Tamura Keita, Yoshida Koki, Hiraoka Yasuko, Sakaguchi Daiki, Chikugo Ayaka, Mochida Keiichi, Kojoma Mareshige, Mitsuda Nobutaka, Saito Kazuki, Muranaka Toshiya, Seki Hikaru | 4. 巻<br>59            |
| 2. 論文標題<br>The Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor GubHLH3 Positively Regulates Soyasaponin Biosynthetic Genes in Glycyrrhiza uralensis  | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>Plant and Cell Physiology  | 6. 最初と最後の頁<br>778-791 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>doi.org/10.1093/pcp/pcy046   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-             |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Yano Ryoichi, Takagi Kyoko, Tochigi Saeko, Fujisawa Yukiko, Nomura Yuhta, Tsuchinaga Hiroki, Takahashi Yuya, Takada Yoshitake, Kaga Akito, Anai Toyooki, Tsukamoto Chigen, Seki Hikaru, Muranaka Toshiya, Ishimoto Masao | 4. 巻<br>59            |
| 2. 論文標題<br>Isolation and Characterization of the Soybean Sg-3 Gene that is Involved in Genetic Variation in Sugar Chain Composition at the C-3 Position in Soyasaponins  | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>Plant and Cell Physiology  | 6. 最初と最後の頁<br>792-805 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>doi: 10.1093/pcp/pcy019  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-             |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Suzuki Hayato, Fukushima Ery Odette, Shimizu Yuko, Seki Hikaru, Fujisawa Yukiko, Ishimoto Masao, Osakabe Keishi, Osakabe Yuriko, Muranaka Toshiya | 4. 巻<br>60              |
| 2. 論文標題<br>Lotus japonicus Triterpenoid Profile and Characterization of the CYP716A51 and LjCYP93E1 Genes Involved in Their Biosynthesis In Planta          | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Plant and Cell Physiology   | 6. 最初と最後の頁<br>2469-2509 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>doi:10.1093/pcp/pcz145  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Nomura Yuhta, Seki Hikaru, Suzuki Tomonori, Ohyama Kiyoshi, Mizutani Masaharu, Kaku Tomomi, Tamura Keita, Ono Eiichiro, Horikawa Manabu, Sudo Hiroshi, Hayashi Hiroaki, Saito Kazuki, Muranaka Toshiya | 4. 巻<br>99              |
| 2. 論文標題<br>Functional specialization of UDP glycosyltransferase 73P12 in licorice to produce a sweet triterpenoid saponin, glycyrrhizin  | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>The Plant Journal  | 6. 最初と最後の頁<br>1127-1143 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>doi:10.1111/tpj.14409  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-               |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>關 光、高上馬希重、村中俊哉               | 4. 巻<br>3               |
| 2. 論文標題<br>グリチルリチン酸生成制御の理解に向けて         | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>アグリバイオ                       | 6. 最初と最後の頁<br>1038-1041 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし         | 査読の有無<br>無              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>關 光                              |
| 2. 発表標題<br>植物におけるトリテルペンサポニンの代謝および機能多様性の分子基盤 |
| 3. 学会等名<br>第 61 回日本植物生理学会年会 (招待講演)          |
| 4. 発表年<br>2020年                             |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Hikaru Seki  |
| 2. 発表標題<br>Investigating biosynthesis and regulation of plant triterpenoids: towards the elucidation of their biological functions. |
| 3. 学会等名<br>第 60 回日本植物生理学会年会 (招待講演)  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>關 光  |
| 2. 発表標題<br>植物由来有用化合物の組換え酵母での生産 - 植物科学者が思う「こんな酵母があったらな、」 |
| 3. 学会等名<br>第 86 回酵母研究会 (招待講演)                           |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>關 光  |
| 2. 発表標題<br>マメ科薬用植物カンゾウのトリテルペノイド生合成制御に関わる転写因子の探索とトリテルペノイドの生物学的機能解明に向けた研究展開 |
| 3. 学会等名<br>第 36 回日本植物細胞分子生物学会大会（招待講演）                                     |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>關 光                                |
| 2. 発表標題<br>甘草のゲノム解読-甘味成分をつくる遺伝子を探す            |
| 3. 学会等名<br>北海道医療大学生涯学習事業「第 32 回薬草園を見る会」（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2018年                               |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|  |                           |                       |    |