

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02255

研究課題名(和文)植物由来抗腫瘍性リグナン生合成系の微生物における新規構築

研究課題名(英文)Synthetic biology for antitumor lignan biosynthesis

研究代表者

梅澤 俊明(Umezawa, Toshiaki)

京都大学・生存圏研究所・教授

研究者番号：80151926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ポドフィロトキシンは抗腫瘍性リグナンであり、その生物工学的生産が希求されている。本研究では、各種植物における独立したポドフィロトキシン合成系の酵素遺伝子を取得し、強力なポドフィロトキシン生産系構築を目指して研究を進めた。まず、ポドフィロトキシン産生の合成生物学系を構築する基盤として、ポドフィロトキシン合成経路におけるリグナンのO-メチル化段階を触媒するO-メチル基転移酵素(リグナンOMT)の種間多様性評価、フロフラン環形成酵素の遺伝子取得と機能解析及びヒドロキシ化を触媒する酵素の遺伝子取得を進めた。さらに、合成生物学的な代謝経路の構築に向け、これらの遺伝子の微生物における機能発現を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、同じ反応を触媒するにもかかわらず、アミノ酸配列相同性の低いOMTが異なる植物種から見出され、リグナン合成の収斂進化特性の詳細に関する種々の新知見が得られた。この成果は、研究代表者らが独自に見出した知見であり、学術的独自性が高いものである。さらに本研究は、樹木抽出成分合成酵素遺伝子の産業利用と心材形成機構解明への展開性を有する点で、森林科学分野での創造性を有すると考えている。加えて、植物二次代謝の進化機構解明や希少有用植物の絶滅回避と生物多様性保全の一助となる点も森林科学分野のみならず自然科学の学術一般における創造性という観点から重要である。

研究成果の概要(英文)：Podophyllotoxin is an antitumor lignan, and its biotechnological production has been striven after. In this study, we obtained enzyme genes for independent podophyllotoxin synthesis systems in various plants, and conducted research aimed at establishing a synthetic biological system for podophyllotoxin production. First, we evaluated the diversity of O-methyltransferases (lignan OMTs) that catalyze the O-methylation of lignans in the podophyllotoxin biosynthetic pathway, identified a gene of the furan ring-forming enzyme, and analyzed their functions. We also obtained the candidate genes for enzymes that catalyze hydroxylation. In addition, we introduced these enzyme genes into *E. coli* and yeast to establish metabolic pathways.

研究分野：植物代謝機能化学

キーワード：リグナン ポドフィロトキシン OMT 20DD 抗腫瘍性 生合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗腫瘍性リグナンである podophyllotoxin (以下、PD) は、代表的な樹木抽出成分或いは植物二次代謝産物であり、アオモリヒバ (ヒノキアスナロ、*Thujopsis dolabrata*) 等のヒノキ科樹木やヒマラヤハッカクレン (*Podophyllum hexandrum*) 等メギ科の多年草、シャク (*Anthriscus sylvestris*、セリ科多年草) 等により生合成されている。また、PD 合成前駆体であるヤテインは代表的な樹木心材成分であり、PD 合成系は心材成分生合成とも共通する。抗がん薬生産用の PD は、本化合物を高含量で含む天然産ヒマラヤハッカクレンから取得されているが、同植物は栽培が難しく希少で絶滅危惧種となっている。さらに、PD の有機合成は経済的に成立しないことから、その生物工学的生産が希求されている。そこで、PD 合成系の酵素遺伝子の取得と機能解析が必須となっている。本研究開始までに、研究代表者らは異なる植物種において PD の生合成経路が独自に収斂進化し、自然界には複数の並行する PD 合成経路が存在することを明らかにした。そこで次に、PD の生物工学的生産、植物二次代謝の進化機構解明、心材リグナン生合成機構の解明、心材形成機構の解明などへ展開するために、PD 合成並行経路の酵素遺伝子の取得、酵素機能 (反応特性) の解析、生合成系の制御機構の解明などが必要となっていた。

2. 研究の目的

本研究では、各種植物の独立した複数の PD 生合成系の酵素につき、遺伝子を網羅的に取得し、酵素の生化学的機能解析を行うと共に、これらの酵素遺伝子を微生物で発現させ、PD の微生物生産に向けたシステムの基盤構築を図ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 各種植物からの PD 生合成系の酵素遺伝子取得

シャクの未取得酵素遺伝子の取得

京都大学芦生研究林より入手し生存圏研究所で栽培中のシャクを用い、異なる生育時期及び異なる組織・器官の合計 10 試料につき、標的酵素の活性の変動パターンを測定する。次いで、同じ試料について、全発現遺伝子の網羅解析データを取得する。

発現遺伝子の中から、酵素活性変動パターンと同じ発現変動パターンを示す遺伝子を絞り込む。

各酵素の機能 (例えば、酸素添加、メチル化等) に対応する特有の共通 DNA 配列の有無を指標に、絞り込まれた候補遺伝子について、候補遺伝子を数個まで絞り込む。

絞り込まれた候補遺伝子につき、大腸菌もしくは酵母で発現させ、組換え酵素を得る。

得られた組換え酵素につき、標的酵素活性の有無を生化学的に検証する。ここで、標的酵素活性を示した組換え酵素に対応する遺伝子が、目的の酵素遺伝子である。

アオモリヒバの未取得酵素遺伝子の取得

青森県林業研究所より入手し京大生存圏研究所で栽培中のアオモリヒバを用い、と同様に未取得酵素遺伝子を取得する。

(2) 各種植物の PD 生合成系酵素の生化学的機能解析・評価

ヒマラヤハッカクレンの PD 合成酵素遺伝子の入手

ヒマラヤハッカクレンの PD 合成酵素遺伝子を、公開遺伝子情報を用い外注合成する。

PD 合成酵素の機能解析

取得済みの遺伝子、(1) で取得した遺伝子、及び外注合成した *Podophyllum* 遺伝子につき、大腸菌もしくは酵母で大量に発現させ、組換え酵素を得る。

次に、得られた組換え酵素につき触媒する反応の評価 (基質特異性及び速度論解析) を行う。

(3) 取得酵素遺伝子を用いた PD 生合成系の微生物における構築

PD 生合成系モジュール構築

(2) で得た各酵素の機能情報に基づき、微生物における反応系 (活性発現系) を設定・構築する。

4. 研究成果

(1) 各種植物からのポドフィロトキシン (PD) 生合成系の酵素遺伝子取得

PD 合成経路におけるジベンジルブチロラクトン型リグナンの O-メチル化を触媒する O-メチル基転移酵素 (ジベンジルブチロラクトンリグナン OMT)、ヤテインの環化を触媒する酵素、リグナンのヒドロキシ化及びメチレンジオキシ環形成を触媒する酵素につき遺伝子取得を進めた。

まず、シャクとアオモリヒバから yatein の前駆体であるリグナン、5-O-methylthujaplicatin と 4-O-demethylatein、のメチル化を触媒する酵素遺伝子の候補を得、次いで大腸菌にて対応する組換え酵素を調製した。この組換え酵素につき活性を検証することにより目的酵素遺伝子を同定した。

さらに、ヤテインの環化によるテトラリン環形成を触媒する 2-oxoglutarate-dependent

dioxygenase (2ODD) 型酵素の候補遺伝子をシャクより取得し、次いで大腸菌にて対応する組換え酵素を調製した。この組換え酵素につき活性を検証することにより目的酵素遺伝子を同定した。

リグナンのヒドロキシ化及びメチレンジオキシ環形成を触媒する酵素遺伝子については、遺伝子発現とリグナン生成のスパシオテンポラルな相関解析により候補遺伝子を絞り込み、対応する組換え酵素の活性検証を進めた。

(2) 各種植物のポドフィロトキシン (PD) 生合成系酵素の生化学的機能解析・評価

OMT の機能解析

PD 産生の合成生物学系を構築する基盤として、リグナン OMT の機能解析を進めた。まず、5-*O*-methylthujaplicatin と 4-*O*-demethylatein などのジベンジルブチロラクトン型リグナンのメチル化を触媒する OMT に特徴的なアミノ酸残基を絞り込み、ジベンジルブチロラクトンリグナン OMT 活性発現に寄与するか否かについて検証した。すなわち、revolutionary trace 法によって、ジベンジルブチロラクトンリグナン OMT に特異的な 4 種のアミノ酸残基を絞り込んだのうち、シャクの 5-*O*-methylthujaplicatin と 4-*O*-demethylatein のメチル化を触媒する OMT のアミノ酸配列をベースに、これら 4 種のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基にそれぞれ置換した組換え変異タンパク質を調製し、5-*O*-methylthujaplicatin に対する OMT 比活性をそれぞれ測定した。その結果、2 種の組換え変異タンパク質につき、比活性が 5.6~23.0%にまで低下することが示され、これら 2 種のアミノ酸残基はジベンジルブチロラクトンリグナン OMT 活性の発現に寄与している可能性が強く示唆された。

次いで、シャクとアオモリヒバの OMT について、比較解析を行った。その結果、両者は共に 5-*O*-methylthujaplicatin と 4-*O*-demethylatein を基質とし、且つ反応特性も類似しているにもかかわらず、配列相同性が低く、両者は平行進化によって獲得されてきたことが示された。そして、複数の基質を用いた活性測定結果や、既に報告した合成経路に関する知見などを総合的に判断して、シャクの OMT (AsSNYOMY) は 5-*O*-methylthujaplicatin として、またアオモリヒバの OMT (TdSNYOMT) は 4-*O*-demethylatein OMT として生理的に機能している、すなわち両植物における yatein 合成経路は異なっていることが強く示唆された。

2ODD の機能解析

さらに、yatein からの deoxypodophyllotoxin の生成を触媒する 2-oxogultarate-dependent dioxygenase (2ODD) 型のヤテイン環化酵素遺伝子の特性解析を進めた。その結果、本酵素は基質のエナンチオマーに関する選択性を示し(-)-yatein のみを基質として受け入れ、対応する (-)-deoxypodophyllotoxin へ変換することを見出した。さらに、AlphaFold2 を用いたタンパク構造解析に基づき、活性発現に関与するアミノ酸残基を推定し、部位特異的変異導入による当該アミノ酸残基の活性発現に対する寄与の検証を進めている。

PLR の機能解析

ヒマラヤハッカクレンの PD 合成系の上流段階を触媒する pinoresinol/lariciresinol reductase (PLR) 遺伝子の配列を、公開遺伝子情報から入手し、対応する cDNA を外注合成した。次いで、これを大腸菌にて発現させ反応の解析を進めた。

(3) 取得酵素遺伝子を用いたポドフィロトキシン (PD) 生合成系の微生物における構築

(1)で得た各酵素の遺伝子情報に基づき、微生物における反応系(活性発現系)の設定を進めている。

(4) 考察

本研究では、PD 生合成系が各種植物で収斂進化したと言う、先に研究代表者らが独自に見出した知見の発展として、並行する合成経路上で同じ反応を触媒するにもかかわらず、アミノ酸配列相同性が低い OMT が、系統分類上遠縁の植物種から見出された。さらに、通常の植物 OMT では保存されておらず、ジベンジルブチロラクトン型リグナンの OMT において保存されているアミノ酸残基が特定された。そして、これらの OMT は平行進化によって獲得されたことが示され、リグナン合成の収斂進化特性の詳細に関する種々の新知見が得られた。現在、シャクの PD 生合成系における未解明遺伝子の取得を進めるとともに、既取得酵素遺伝子を用いた PD 生合成系の微生物における構築を進めている。これらの成果については、現在投稿準備中である。また、ジベンジルブチロラクトン OMT については、AsSNYOMY、TdSNYOMT 以外に当研究室から 3 種 [*Carthamus tinctorius* (ベニバナ、キク科) matairesinol OMT], *A. sylvestris* matairesinol OMT, *A. sylvestris* thujaplicatin OMT, *Forsythia koreana* (チョウセンレンギョウ、モクセイ科) matairesinol OMT]、他グループから 2 種の報告がある。AsSNYOMY、TdSNYOMT に加え、これらを含めたジベンジルブチロラクトン OMT 群の進化に関する検討を現在進めている。

なお、本課題を一層進展させるためには、PD 類縁体産生植物のゲノム解析が必須となることから、新学術領域先進ゲノム解析研究プラットフォーム事業(先進ゲノム支援)に於いてシャク及びその栽培品種であるチャービルのゲノム解析を推進している。

<引用文献>

梅澤 俊明, 山村 正臣, 小埜 栄一郎, 白石 慧, サフェンドリ コマーラ ラガムスタリ, リ

グナンOMTに関する最新研究動向, 木材学会誌, 65, 1-12 (2019)

Sakakibara, N., Suzuki, S., Umezawa, T. and Shimada, M., Biosynthesis of yatein in *Anthriscus sylvestris*, Org. Biomol. Chem., 1, 2474 - 2485 (2003)

Ragamustari, S.K., Nakatsubo, T., Hattori, T., Ono, E., Kitamura, Y., Suzuki, S., Yamamura, M., Umezawa, T., A novel *O*-methyltransferase involved in the first methylation step of yatein biosynthesis in *Anthriscus sylvestris*, Plant Biotechnol., 30, 375-384 (2013)

Ragamustari, S.K., Nakatsubo, T., Hattori, T., Ono, E., Kitamura, Y., Suzuki, S., Yamamura, M., Umezawa, T., A novel *O*-methyltransferase involved in the first methylation step of yatein biosynthesis in *Anthriscus sylvestris*, Plant Biotechnol., 30, 375-384 (2013)

Lau, W., Sattely, E.S. Six enzymes from mayapple that complete the biosynthetic pathway to the etoposide aglycone. Science, 349, 1224-1228 (2015).

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 梅澤 俊明, 山村 正臣, 小埜 栄一郎, 白石 慧, サフェンドリ・コマーラ・ラガムスタリ	4. 巻 65
2. 論文標題 リグナンOMTに関する最新研究動向	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 木材学会誌	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2488/jwrs.65.1	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小林慶亮, 山村正臣, 熊谷真聡, 小埜栄一郎, 白石慧, 佐竹炎, 梅澤俊明
2. 発表標題 Yateinの環化を触媒するシャク由来の新規の2-oxoglutarate-dependent dioxygenaseの同定
3. 学会等名 第38回日本植物バイオテクノロジー学会（つくば大会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林慶亮, 山村正臣, 熊谷真聡, 小埜栄一郎, 白石慧, 梅澤俊明
2. 発表標題 シャクにおけるyateinの環化に関与する新規の2-oxoglutarate-dependent dioxygenaseの同定
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会（東京大会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松浦悠, 山村正臣, 河合真吾, 梅澤俊明
2. 発表標題 アオモリヒバにおける抗腫瘍性リグナン生合成に関わるO-メチル基転移酵素の機能解析
3. 学会等名 第70回日本木材学会大会（鳥取大会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keisuke Kobayashi, Masaomi Yamamura, Akira Shiraishi, Eiichiro Ono, Safendri Komara Ragamustari, Masato Kumatani, Honoo Satake, and Toshiaki Umezawa
2. 発表標題 Characterization of lignan O-methyltransferases involved in antitumor biosynthesis in <i>Anthriscus sylvestris</i>
3. 学会等名 The 4th Asia Research Node Symposium on Humanosphere Science -Present and Future of Humanosphere Science- (Nanjing, China) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林慶亮、山村正臣、白石慧、小埜栄一郎、Ragamustari S. K.、熊谷真聡、佐竹炎、梅澤俊明
2. 発表標題 シヤクにおける機能性リグナンOMTの機能解析
3. 学会等名 第36回日本植物細胞分子生物学会(金沢)大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaomi Yamamura, Masato Kumatani, Keisuke Kobayashi, Toshiaki Umezawa
2. 発表標題 Biosynthesis of heartwood and antitumor lignans
3. 学会等名 The 3rd Asia Research Node Symposium on Humanosphere -Present and Future of Humanosphere Science- (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学生存圏研究所森林代謝機能化学分野業績 http://www.rish.kyoto-u.ac.jp/lmsfpm/gyoseki.html</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	飛松 裕基 (Tobimatsu Yuki) (20734221)	京都大学・生存圏研究所・准教授 (14301)	
研究分担者	鈴木 史朗 (Suzuki Shiro) (70437268)	京都大学・生存圏研究所・助教 (14301)	転出により令和2年度以降削除

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	河合 真吾 (Kawai Shingo) (70192549)	静岡大学・農学部・教授 (13801)	
研究協力者	橋本 涉 (Hashimoto Wataru) (30273519)	京都大学・大学院農学研究科・教授 (14301)	
研究協力者	河井 重幸 (Kawai Shigeyuki) (00303909)	石川県立大学・生物資源環境学部・教授 (23303)	
研究協力者	佐竹 炎 (Satake Honoo) (20280688)	公益財団法人サントリー生命科学財団・その他部局等・主幹 研究員 (74408)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関