

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：23201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14389

研究課題名(和文)高機能物質生産に特化した植物培養細胞の創出

研究課題名(英文)Creation of the plant cultured cells to produce the functional products

研究代表者

北岡 直樹(Kitaoka, Naoki)

富山県立大学・工学部・助教

研究者番号：20785547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：タケ培養細胞を用いた香料や医薬品原料を高効率な生産システムの構築を目指し研究を進めた。香料として利用されているバニリン、防腐剤として利用されるヒドロキシ安息香酸エステル(パラベン)の生産を目指し、*Pseudomonas putida*由来の遺伝子を導入した細胞を作出した。同細胞における代謝物の解析を行い、ヒドロキシ安息香酸とバニリン酸のグルコース配糖体の高蓄積を確認した。続いて、*Bacillus amyloliquefaciens*由来の遺伝子を導入した細胞を作出し、ポリマー原料として利用が見込まれるビニルフェノール類縁化合物のプリメベロース配糖体を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タケ培養細胞を宿主としてヒドロキシ安息香酸およびビニルフェノールの配糖体を生産可能であることを示した。特に、ヒドロキシ安息香酸のグルコース配糖体の生産量は培地1Lあたり1.7gに達し、タケ培養細胞が極めて優れた物質生産宿主であることを示すことができた。また、ヒドロキシ安息香酸とビニルフェノールで異なる糖が結合した配糖体が得られたことから、タケ培養細胞内における配糖体の生成機構に興味を持たれる。

研究成果の概要(英文)：We generated the transformed bamboo cells which efficiently produced the functional products. Firstly, we generated the bamboo cells which were transformed by hydroxycinnamic acid hydratase/aldolase (PpHCHL) from *Pseudomonas putida*. In the PpHCHL-transformed cells, the high accumulation of glucose conjugates of vanillic acid and 4-hydroxybenzoic acid were observed. Secondary, we generated the bamboo cells which were transformed to express phenolic acid decarboxylase (BaPAD) from *Bacillus amyloliquefaciens*. In the BaPAD transformed cells, primeverosides of 4-vinylphenol and 4-vinylguaiaicol were produced.

研究分野：生物有機化学

キーワード：植物培養細胞 遺伝子組換え タケ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物は多種多様な二次代謝産物を生合成しており、それらの中には医薬品や香料として利用されているものがある。しかしながら、それら代謝産物の植物体内における生合成量は少なく実用化には程遠い場合がほとんどである。それら代謝産物を生産する手法の一つに植物培養細胞を用いた手法がある。植物体と比較して増殖が速く培養条件のコントロールが容易であるという利点などから、植物培養細胞は物質生産宿主として用いられてきた。

研究実施者の所属研究室では、細胞内での活発な代謝経路から分岐する生合成経路を細胞に導入する「合理的代謝フロースイッチング」¹⁾を提唱し、植物培養細胞を用いた有用物質の生産法の確立を目指し研究を進めてきた。高効率な培養系および遺伝子組換え系が確立されているタケ亜科に属するハチク (*Phyllostachys nigra*) 筍由来の培養細胞の代謝物の解析を行い、木化誘導条件において feruloylputrescine を高蓄積し、同培養細胞においてはフェニルプロパノイド代謝系およびポリアミン代謝系が活発であることが明らかとした。この知見を踏まえて、オオムギ由来の agmatine coumaroyltransferase を導入した組換えハチク細胞を作出したところ、目的化合物である *p*-coumaroylagmatine が高蓄積したことから、ハチク培養細胞の物質生産宿主としての潜在能力の高さが示されていた²⁾。

2. 研究の目的

ハチク培養細胞で活発な代謝系から高機能化合物への反応を触媒する酵素遺伝子を遺伝子組換えにより導入した「高機能物質を生産するハチク培養細胞」の作出を目指した。加えて、ハチク培養細胞において活発な代謝経路に位置する遺伝子を破壊することで、物質生産効率のさらなる向上を目指した。

3. 研究の方法

・外来遺伝子を導入した組換えハチク培養細胞の作出

ハチク培養細胞で活発であることが示されていたフェニルプロパノイド経路から高機能物質へ代謝の流れをスイッチする外来遺伝子を導入した組換えハチク培養細胞をパーティクルボンバードメントを用いて作出した。形質転換には市販の pRI 201-ON が持つ植物選抜時の耐性遺伝子をカナマイシンからハイグロマイシンに改変したベクターを用いた。ハイグロマイシンによる形質転換細胞の選抜後、ゲノムへの遺伝子の導入を PCR にて確認した。また得られた組換え細胞の粗酵素抽出液を用いて酵素反応を行い、導入した酵素がハチク培養細胞内で適切に発現されていることを確認した。組換えハチク培養細胞の代謝物を HPLC にて確認し、組換え株で新たに出現し生成物と合成した標品との HPLC および LC-MS を用いた比較、もしくは生成物を単離精製することで生成物の化学構造を決定した。作出した組換え細胞を懸濁培養し生成物の生産量が最大となる培養条件を調べた。

・遺伝子破壊株の作出

高機能物質の生産量向上を目指し、ハチク培養細胞の代謝経路を改変した組換え細胞の作出を行った。まず初めに、標的となる酵素の機能を明らかにするため、ハチクの cDNA より候補遺伝子のクローニングを行い、大腸菌を宿主とした発現系を用いた組換え酵素の酵素活性を調べた。さらに、標的遺伝子のハチク培養細胞の破壊株をゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 を用いて作製した。

4. 研究成果

(1) *PpHCHL* を導入したハチク培養細胞の作出

Feruloylputrescine の生合成中間体でもある feruloyl-CoA もしくは *p*-coumaroyl-CoA を基質とし、それぞれ vanillin と 4-hydroxybenzaldehyde への変換を触媒する酵素遺伝子である *Pseudomonas putida* KT2440 *hydroxycinnamoyl-CoA hydratase/lyase* (*PpHCHL*) を導入した組換えハチク培養細胞を、パーティクルボンバードメント法を用いて作出した。ベクターが有するハイグロマイシン耐性遺伝子による一次選抜を行った後に、ゲノムへの *PpHCHL* の導入を PCR にて確認した。作出した *PpHCHL* 導入株カルスにおける代謝物を解析した結果、4-hydroxybenzoic acid glucose ester、4-hydroxybenzoic acid glucoside、および vanillic acid glucose ester の新たな蓄積が確認された。組換え細胞を懸濁培養した結果、*PpHCHL* 導入株において前述の 3 化合物の細胞内における蓄積がみられ、4-hydroxybenzoic acid glucose ester と vanillic acid glucose ester はその蓄積量が木化誘導条件で顕著に増加した。特に、4-hydroxybenzoic acid glucose ester の蓄積量は培地 1 L あたり 1.7 g に達した。*PpHCHL* 導入株から調製した粗酵素を用いて酵素活性を調べたところ、feruloyl-CoA と *p*-coumaroyl-CoA から、それぞれ vanillin と 4-hydroxybenzaldehyde へと変換する酵素活性が検出された。

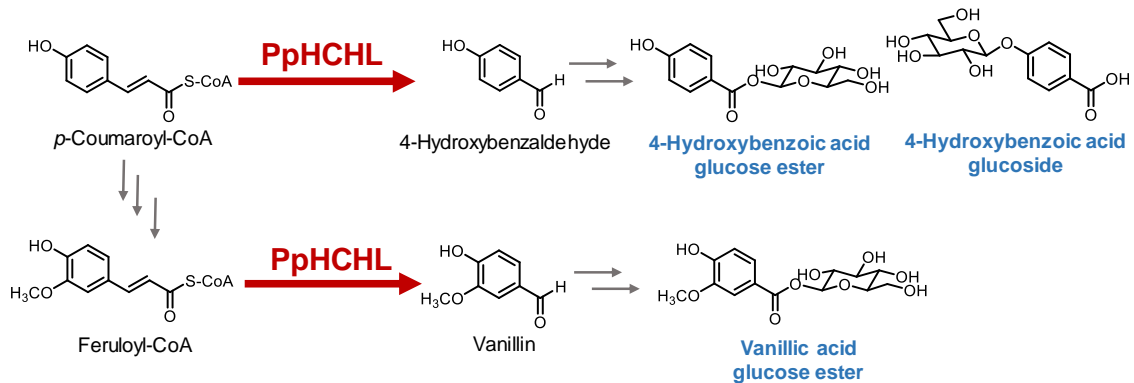


図1 *PpHCHL*導入株における生成物と生成機構

(2) *BaPAD* を導入したハチク培養細胞の作出

フェニルプロパノイド化合物である *p*-coumaric acid および ferulic acid を基質とし、それぞれ 4-vinylphenol (4-VP) と 4-vinylguaiacol (4-VG) への変換を触媒する酵素遺伝子である *Bacillus amyloliquefaciens* 由来の *phenolic acid decarboxylase* (*BaPAD*) を導入した組換えハチク培養細胞をパーティクルボンバードメント法により作出した。*BaPAD* 導入株における代謝物を解析した結果、野生株にはみられない 2 種類の化合物が確認された。*BaPAD* 導入株の懸濁培養細胞のメタノール抽出物を、ODS ならびにシリカゲルカラムクロマトグラフィー、次いで逆相系分取 HPLC に供し、両化合物を精製した。各種分光学的手法による構造解析から、それらの化学構造を 4-VP primeveroside (別名 ptelatoside A²⁾) と 4-VG primeveroside と決定した。*BaPAD* 導入株を細胞増殖が活発な増殖条件とリグニン生合成が誘導される木化条件でそれぞれ懸濁培養したところ、4-VP primeveroside および 4-VG primeveroside の培地 1 L 当たりの生産量は増殖条件で高く、最大でそれぞれ 45 mg/L および 84 mg/L であった。4-VP primeveroside および 4-VG primeveroside の生成機構を確かめるため、4-VP、4-VG およびそれらのグルコース配糖体の取り込み実験を行った。その結果、それら化合物を取り込ませたハチク培養細胞の野生株で、4-VP primeveroside もしくは 4-VG primeveroside が得られ、4-VP および 4-VG がグルコース配糖体を経てプリメベロース配糖体が生成することを明らかにした。

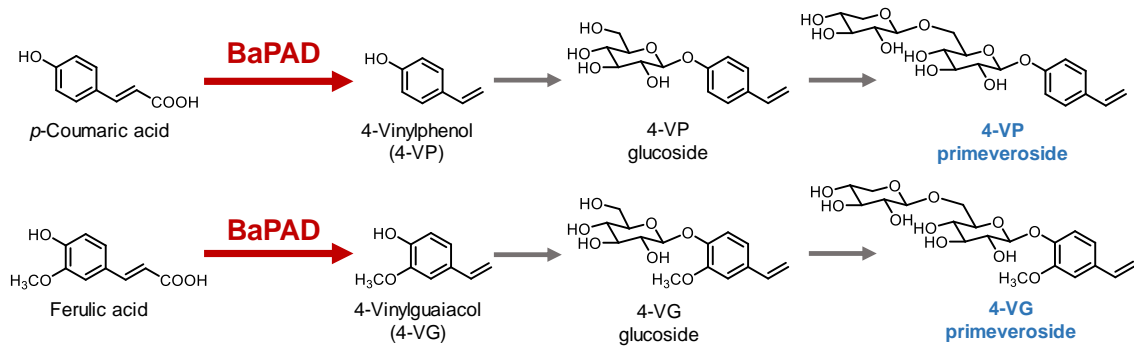


図2 BaPAD導入株における生成物と生成機構

(3) 遺伝子破壊株の作製

高機能物質の生産効率のさらなる向上を目指し、導入酵素の基質を中間体とする代謝の流れをシャットアウトしたハチク培養細胞の作出を行った。リグニンの生合成経路に位置し *p*-coumaroyl-CoA および feruloyl-CoA を基質とする酵素遺伝子の *cinnamoyl-CoA reductase* (*PnCCR*) を破壊する標的として選びクローニングを行った。大腸菌を宿主として発現させた組換え *PnCCR* の酵素活性を調べたところ、所望の *p*-coumaroyl-CoA および feruloyl-CoA から *p*-coumaraldehyde および coniferaldehyde への酵素活性を得ることに成功した。続いて、ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 用のベクターを用いて *PnCCR* 破壊株の作出を行った。ベクター由来の Cas9 およびガイド RNA のハチク細胞のゲノムへの導入は確認できたが、*PnCCR* に変異が導入された破壊株の作出には至らなかった。RNAi を用いた発現抑制株の作出もしくはゲノム編集技術が確立しているイネなどを宿主として試すなど、代謝経路を改変した植物培養細胞の作出にはさらなる検討が必要と考えられる。

<引用文献>

- 1) Nomura et al. (2018) *Sci. Rep.*, 8, 13203. 2) Ojika et al. (1984) *Chem. Lett.*, 13, 397.

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kitaoka Naoki, Nomura Taiji, Ogita Shinjiro, Kato Yasuo	4. 巻 -
2. 論文標題 Bioproduction of glucose conjugates of 4-hydroxybenzoic and vanillic acids using bamboo cells transformed to express bacterial 4-hydroxycinnamoyl-CoA hydratase/lyase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.02.010	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 北岡直樹、中畑未来、野村泰治、荻田信二郎、加藤康夫
2. 発表標題 Pseudomonas putida由来enoyl-CoA hydratase/ aldolaseを導入したタケ培養細胞の作出
3. 学会等名 日本農芸化学会 2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kitaoka Naoki, Nomura Taiji, Ogita Shinjiro, Kato Yasuo
2. 発表標題 Bioproduction of glucose esters of vanillic acid and 4-hydroxybenzoic acid in the transformed bamboo cells expressing bacterial 4-hydroxycinnamoyl-CoA hydratase/lyase
3. 学会等名 Gordon Research Conference Plant Metabolic Engineering (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北岡直樹、早田朋代、野村泰治、荻田信二郎、加藤康夫
2. 発表標題 Bacillus amyloliquefaciens由来phenolic acid decarboxylaseを発現したタケ培養細胞によるスチレン誘導体の生産
3. 学会等名 日本農芸化学会 2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ヒドロキシ安息香酸誘導体の生合成方法	発明者 北岡直樹、野村泰治、加藤康夫	権利者 富山県
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-038992	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----