

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：32665

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19186

研究課題名(和文)薬用植物に含まれるフェニルエタノイド配糖体の生合成機構解明と効率的バイオ生産

研究課題名(英文)Elucidation of the biosynthetic pathway for the effective production of phenylethanoid glycosides in medicinal plants

研究代表者

松藤 寛 (MATSUFUJI, Hiroshi)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：70287605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,600,000円

研究成果の概要(和文)：フェニルエタノイド配糖体(PhGs)は、薬用植物に広く分布し、様々な薬理作用をもつことから、医薬品またはこれらをリード化合物とした創薬利用が期待されている。しかし、代表的化合物のアクテオシド(Act)でさえ、生合成経路が不明で、大量発現系が構築されておらず、疾病治療に用いるための量産化が課題となっている。そこで、Actを特異的に生合成するゴマ培養細胞を用い、エリシターによる高発現誘導、RNA-Seqを用いたトランスクリプトーム解析、酵母異種発現酵素を用いた機能解析を行い、ActをはじめとするPhGsの基本骨格生成に寄与するUGT活性酵素遺伝子2種をゴマ培養細胞より初めて見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PhGsは1950年に天然中から初めて見出され、そして薬理作用が明示された80～90年代以降から今に至るまで「医薬品としての利用」が期待されているにもかかわらず、未だに生合成下流の経路が不明で、量産化できていない。本研究によりActをはじめとするPhGsの基本骨格生成に寄与する酵素遺伝子の一端が明らかとなった。これにより種々のPhGsの生合成機構の解明ならびに効率的バイオ生産に拍車がかかることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Phenylethanoid glycosides (PhGs) are widely distributed in medical plants. Recent pharmacological studies of PhGs have shown extensive biological activities. Therefore, valuable PhGs has been expected to use for pharmaceutical applications. However, industrial mass production remains unresolved for effective applications such as large scale evidence-based human study because biosynthesis of acteoside (Act), the most representative one of PhGs, several downstream intermediate, key enzymes and their corresponding genes remain to be discovered. In this study, we examined the effective accumulation of Act by elicitation in sesame cultured cells, and followed to the major genomic determinants of Act biosynthesis by transcriptome analysis, and functional expression of the candidate genes. The two key genes, which modulate the sequential glucosylation step in the biosynthesis of PhGs with hydroxytyrosol unit such as Act, were identified in sesame cultured cells for the first time.

研究分野：食品科学

キーワード：フェニルエタノイド配糖体 アクテオシド 生合成経路 トランスクリプトーム

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

フェニルエタノイド配糖体(PhGs)は、水溶性のポリフェノールで、C6-C2のグルコース配糖体を基本骨格とし、様々な糖類や桂皮酸類が結合した形で、天然に広く分布している。PhGsは様々な薬理作用を示し、また最近ではアルツハイマーやパーキンソン病への *in vivo* 効果が明らかにされるなど、医薬品として、またこれらをリード化合物とした創薬利用が期待されている。しかし、最も幅広く存在し、代表的な化合物として知られるアクテオシド(Act)でさえ、その大量発現系が構築されておらず、疾病治療に用いるための量産化が大きな課題となっている。

高含有植物(2~3% Act 生産)の細胞を用いたバイオ生産が試みられているものの、生合成関連遺伝子や酵素が不明なため、高生産植物細胞同士で形質転換するなど工夫されているが、生産量は少なく、量産化には至っていない。Actの生合成経路は植物培養細胞(オリーブやアカヤジオウ)を用いて報告されているが、カフェ酸、サリドロサイド、ヒドロキシチロソール以降の中間体が検出されておらず、C6-C2から配糖体・アシル化体へと至る生合成の詳細は不明なままである。PhGsの生産性が低い場合、関連遺伝子・酵素の発現量も低くなり、また同時に生産される他の二次代謝物由来の妨害により、詳細な生合成経路の解明が困難になっていると予想される。

### 2. 研究の目的

このような中、我々は、先行研究で、ゴマ(*Sesamum indicum* L.)の葉がアクテオシドを豊富に含むこと、またその成長過程で、他の植物体と比べて、多量のアクテオシドを生産することを明らかにした(最大 12.3%)\*<sup>1</sup>。また、ゴマの組織培養を試み、葉中に存在する他のフラボノイドやイリドイド類を生産せず、アクテオシドを高生産する培養細胞株を確立することができた。本株は、葉中では観察されない PhGs と思われる複数のマイナー成分も生産していたことから、PhGs 生合成関連遺伝子や酵素を『有意に』検出できる可能性を示す。そこで、本研究ではこの細胞株を用いて、PhGs 生合成機構の網羅的解明と効率的な大量生産系の確立を目的とした。

### 3. 研究の方法

ゴマの培養細胞は、既報に従い、無菌播種、カルス誘導、懸濁培養し、LC-MS/MSで成分確認したものを使用した。エリシター添加による発現誘導、高発現条件下でのRNA-Seq解析を行い、高発現している遺伝子の網羅的探索を行った。さらに、目的候補遺伝子をクローニングし、酵母異種発現酵素を用いた *in vitro* アッセイにより、酵素機能の解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) ゴマ培養細胞における Act 高生産条件の検討

本細胞株は、既報<sup>\*1, 2</sup>で見出したゴマ葉中では顕著に検出されるイリドイド類(Lamalbid, Sesamoside, Shanzhiside Me ester)とフラボノイド(Pedaliin)を生産せず、Actと葉中では未検出のPhGsと思われる複数のAct類縁体を生産する。そこでまず、様々なストレス誘導に関連した既知のエリシター5種を用いて、Act生産量に及ぼす影響を調べた(図1)。結果、ジャスモン酸メチルの添加でAct生産量が処理72h後に5.5倍増加することが判明した(0h, 36.2 mg/L; 72h, 199.6 mg/L)。また、クロマト分析よりActのみが増加しており、他の二次代謝物の影響を受けずに、Act生合成関連酵素遺伝子のみが高発現誘導されていると考えられた。

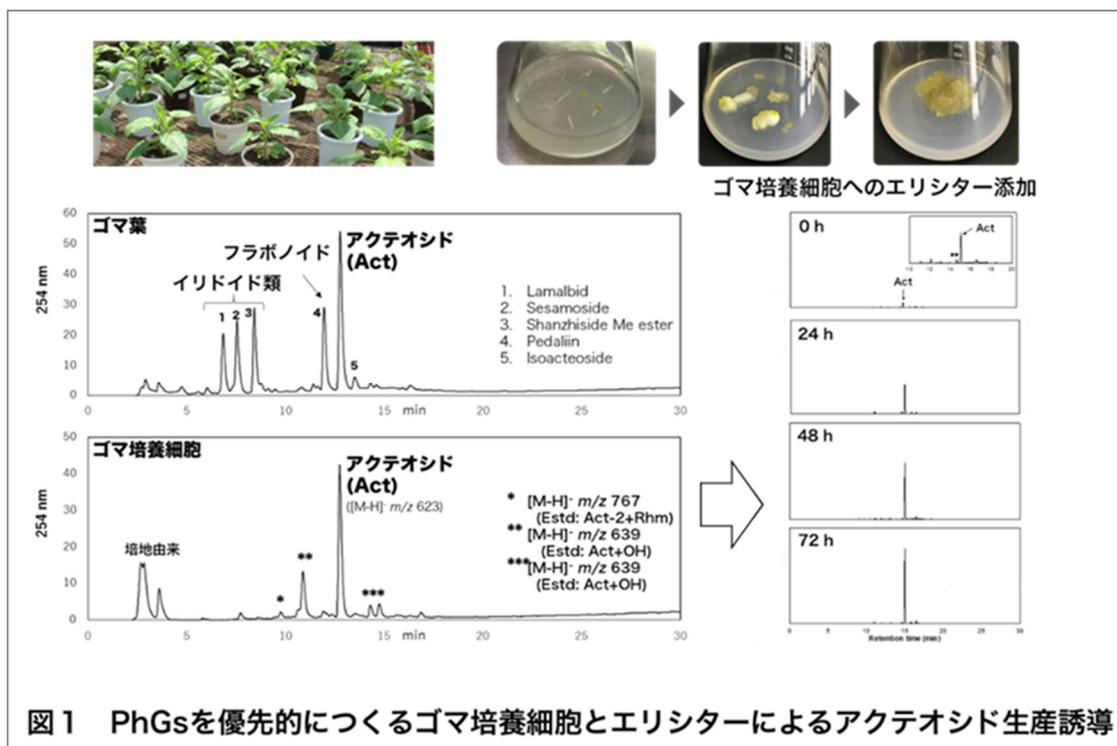
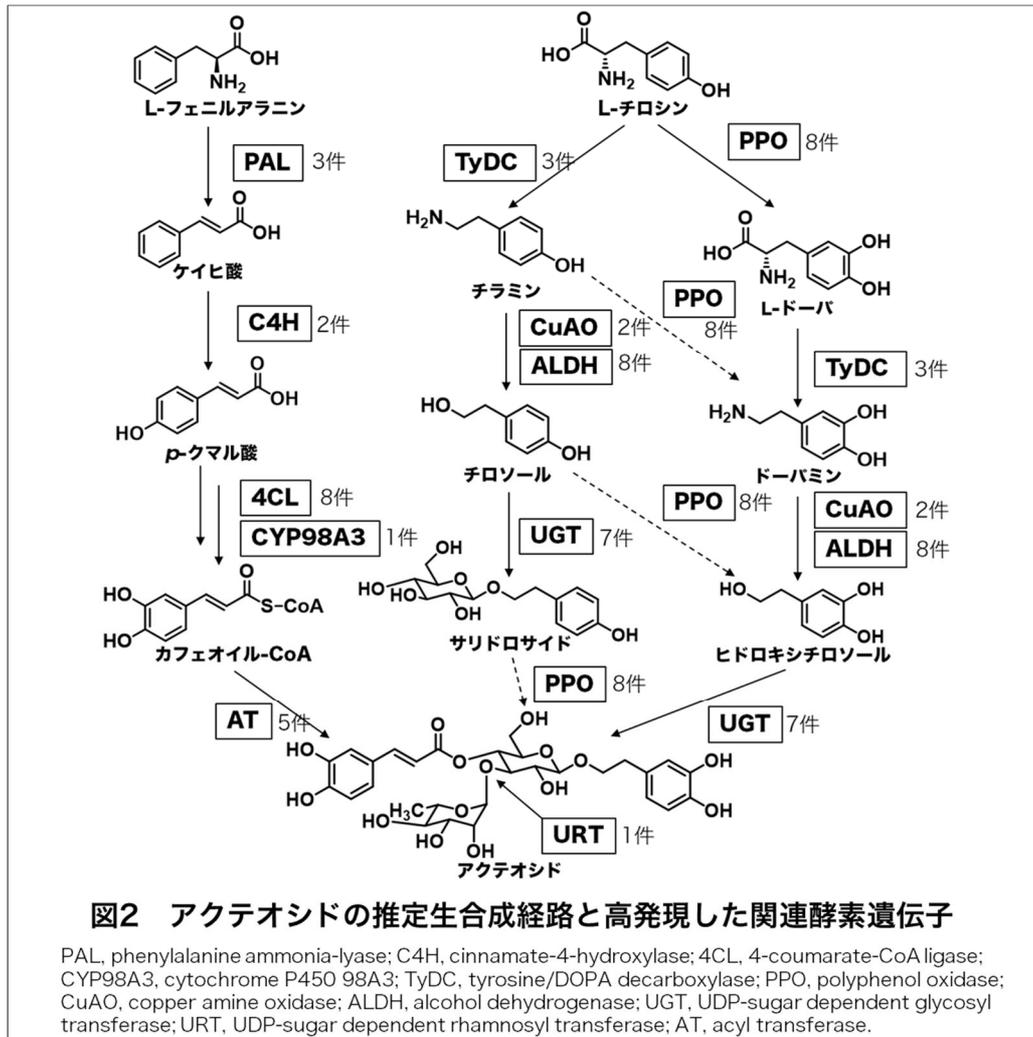


図1 PhGsを優先的につくるゴマ培養細胞とエリシターによるアクテオシド生産誘導

## (2) RNA-Seq を用いたトランスクリプトーム解析

クロマト分析の結果から、エリシター無添加を 0h とし、処理後 6, 12, 24 h の細胞から RNA を抽出し、RNA-seq 解析に供した。得られた配列データについて、CLC Genomics Workbench による *de novo* アセンブリを行い、62008 の Contig を得た。増加した Contig の抽出および Blast 解析の結果、Act 生合成推定経路における Tyr 代謝経路、Phe 代謝経路の関連酵素遺伝子が見出され、さらにヒドロキシチロソールの配糖体化に関与すると思われる UDP-グルコース転移酵素 (UGT) の候補遺伝子を 7 つ、rhamnose 付加に関与すると思われる UDP-ラムノース転移酵素 (URT) の候補遺伝子を 1 つ、caffeic acid(caffeoyl-CoA) の付加に関与すると思われるアシル化転移酵素(AT) の酵素遺伝子を 5 つ選抜することができた (図 2)。



## (3) 高発現した配糖化酵素遺伝子の機能解析

候補遺伝子のうち、RPKM に基づく発現量が有意に増加した UGT 遺伝子 Contig31910(4000 倍増加), Contig6407(250 倍増加), Contig15760(80 倍増加)を PCR で増幅後、発現ベクターにサブクローニングした。酵母異種発現酵素を用いた *in vitro* アッセイにより、ヒドロキシチロソールを含む種々の C6-C 化合物(C6-C1 安息香酸類, C6-C2 チロソール類, C6-C3 桂皮酸類, C6-C3-C6 フラボノイド類)に対する配糖化活性を検討した。しかし、残念ながら、いずれも C6-C2 に対して全く活性を示さず、Act 生合成にかかわる酵素ではないことが判明した。最も発現量が増加していた Contig31910 の酵素は全ての C6-C 化合物に対して無活性であったが、Contig6407 の酵素は C6-C3 の *p*-クマル酸やカフェ酸のカルボキシ基を配糖化する酵素であること、Contig15760 は C6-C3 の *p*-クマル酸、カフェ酸、フェルラ酸の 4 位のフェノール性水酸基を配糖化する酵素遺伝子であると考えられた。

## (4) 系統樹による C6-C2 に対する UGT 候補遺伝子の選抜と機能解析

次いで、配糖化候補遺伝子の系統樹を構築し、C6-C2 に対する活性をもつ酵素候補遺伝子のさらなる絞り込みをおこなった。結果、hydroquinone-*O*-GT を触媒する酵素で、ヒドロキシチロソールへの配糖体化活性が報告されている UGT72B14 と同じクレードに属する遺伝子 Contig13709, 33692, 14458 が絞り込まれた。また、上記 4-3 で高発現した 3 つの Contig はそれぞれ Lignan glycosyl

transferase ファミリー, UGT84 ファミリー, UGT73 ファミリーに属すると考えられ, 別の機能を有する酵素遺伝子であることが改めて確認できた。本細胞株においてリグナン類の生成は LC-MS/MS 分析において認められないが, エリシター処理で 4000 倍も増加するリグナン配糖化酵素遺伝子 (Contig13709) が検出されたことは興味深く, リグナン類を豊富に含むゴマ種子の方が葉中の Act 量が多い傾向にあるという我々の実験結果の解明の糸口になるかもしれない。絞り込んだ候補遺伝子の機能解析を行ったところ, Contig13709 と 33692 はヒドロキシチロソールと反応し, Act をはじめとする種々の PhGs の基本骨格となるヒドロキシチロソールグルコシドを生成することが LC-MS/MS および NMR で確認できた。これにより, ゴマ培養細胞中よりヒドロキシチロソールに対して UGT 活性を示す酵素遺伝子 2 種を初めて見つけ出すことに成功した。

#### < 引用文献 >

1. Fuji, Y., Uchida, A., Fukahori, K., Chino, M., Ohtsuki, T., Matsufuji, H. Chemical characterization and biological activity in young sesame leaves (*Sesamum indicum* L.) and changes in iridoid and polyphenol content at different growth stages. PLOS ONE, 13, e0194449 (2018).
2. Fuji, Y., Ohtsuki, T., Matsufuji, H. Accumulation and subcellular localization of acteoside in sesame plants (*Sesamum indicum* L.). ACS Omega, 3, 17287-17294 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 2件）

1. 著者名 Y. Fuji, T. Ohtsuki, H. Matsufuji	4. 巻 3
2. 論文標題 Accumulation and subcellular localization of acteoside in sesame plants ( <i>Sesamum indicum</i> L.).	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 17287-17294
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.8b02798	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 -

1. 著者名 藤佑志郎、松藤寛	4. 巻 3
2. 論文標題 ゴマ草中のフェニルエタノイド配糖体の局在と生合成機構の解明	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 1050-1053
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 松藤寛	4. 巻 168
2. 論文標題 フェニルエタノイド配糖体の魅力と謎 - ゴマ葉からのチャレンジ -	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 SUNATEC e-Magazine	6. 最初と最後の頁 200301/02
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松藤寛
2. 発表標題 機能性食品の成分化学研究に植物科学研究が教示してくれた未来
3. 学会等名 生命科学研究所シンポジウム 植物機能化学：現在から未来へ（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤佑志郎, 大槻崇, 明石智義, 松藤寛
2. 発表標題 エリシター処理により誘導されたゴマ培養細胞中配糖体化酵素の解析
3. 学会等名 日本ゴマ科学会第34回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 余田圭人, 宮澤知也, 守屋佳奈, 大槻崇, 藤佑志郎, 松藤寛
2. 発表標題 品種の異なるゴマの栽培中の葉中アクテオシド含量の変化
3. 学会等名 日本ゴマ科学会第34回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤佑志郎, 大槻崇, 明石智義, 松藤寛
2. 発表標題 エリシテーションにより高発現したゴマ培養細胞中配糖体化酵素の解析
3. 学会等名 日本植物細胞分子生物学会第37回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松岡聖朗, 大槻崇, 石附京子, 藤佑志郎, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 松藤寛
2. 発表標題 フラバノン配糖体定量分析への <sup>1</sup> H-qNMRに基づく相対モル感度法の応用
3. 学会等名 日本食品科学工学会第66回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 城間咲希, 大槻崇, 岩淵範之, 松藤寛
2. 発表標題 食品廃棄物利用を目指した食品タンパク質の有機蛍光物質への簡易変換
3. 学会等名 第8回JACI/GSCシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松岡聖朗, 大槻崇, 藤佑志郎, 松下明里, 松田美優, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 松藤寛
2. 発表標題 1H-qNMR に基づく相対モル感度を用いたゴマ若葉抽出物等に含まれるアクテオシドの定量について
3. 学会等名 日本食品化学学会第25回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤佑志郎, 大槻崇, 明石智義, 青木俊夫, 松藤寛
2. 発表標題 ゴマにおけるアクテオシドの生合成遺伝子の探索
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 松岡聖朗, 大槻崇, 松藤寛
2. 発表標題 Aタイプ結合を有するプロシアニジン(PC)の比色定量法における反応性
3. 学会等名 日本食品科学工学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大槻崇, 松田美優, 松下明里, 小島豪, 松岡聖朗, 西崎雄三, 増本直子, 山崎太一, 黒江美穂, 沼田雅彦, 井原俊英, 杉本直樹, 佐藤恭子, 松藤寛
2. 発表標題 1H-qNMRに基づく相対モル感度を用いたラカンカ抽出物中のモグロシドV分析法の確立
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>研究成果の一部は</p> <p>1) 研究室HPゴマ葉中の有用成分の探索と生合成機構解明  <a href="http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~foodanalysis/research_subject/index.html#search">http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~foodanalysis/research_subject/index.html#search</a></p> <p>2) 2019年度日本大学生物資源科学部市民講座 未来の農を支えるスマートアグリカルチャー 「ゴマ葉の機能性成分と栽培環境」2019年6月22日 日本大学生物資源科学部校内 (<a href="https://www.brs.nihon-u.ac.jp/wp-content/uploads/20190507154939.pdf">https://www.brs.nihon-u.ac.jp/wp-content/uploads/20190507154939.pdf</a>)</p> <p>3) 学部で実施されたオープンキャンパス(6月、8月)等を通じて、高校生、大学生、一般市民に広く情報提供した。</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