

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：74408

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05857

研究課題名（和文）植物におけるリグナン類の生理機能の解明

研究課題名（英文）Physiological Function of Lignans in Plants

研究代表者

堀川 学（Horikawa, Manabu）

公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機化学研究所・構造生命科学研究所・研究員

研究者番号：70270569

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：ゴマ種子には、セサミンを含むリグナン類という化合物群が蓄積している。セサミンは、裸子植物から被子植物に至る100以上の植物種で同定されていることから、植物中で何らかの機能を担っていると考えているが、その理解には至っていない。本研究では、登熟過程でゴマ種子中に蓄積したセサミン等の脂溶性リグナンは、発芽時に代謝され消失することに注目し、その機能を理解するため、代謝酵素の同定を行い、セサミン類の代謝生成物とその一連の代謝酵素群を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物二次代謝産物は、植物特有の成分で、一部は医薬品やそのリード化合物、及び、健康食品の素材等になっているが、植物自身における機能については理解されていない。その生合成酵素群を明らかにすることにより、植物中でのその成分の生成や局在を調整することが期待でき、それにより、植物中での機能の理解に結び付くと考えている。将来的に、植物の有効利用な生産のコントロールなど社会的なニーズにこたえることができる可能性があると考えている。

研究成果の概要（英文）：Sesame seeds accumulate a group of compounds called lignans that contain sesamin. Since sesamin has been identified in more than 100 plant species ranging from gymnosperms to angiosperms, it is thought to have some function in plants, but this understanding has not yet been achieved. In this study, we focused on the fact that fat-soluble lignans such as sesamin accumulated in sesame seeds during the ripening process are metabolized and lost during germination, and to understand their functions, we identified metabolic enzymes and identified a series of metabolic products of sesamines and their metabolic enzyme groups.

研究分野：天然物有機化学

キーワード：セサミン酸化酵素 オイルボディ 脂質代謝 RNA-seq オイルボディ構成タンパク質 ゴマリグナン  
セサミノール エピセサミン

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

リグナン類やフラボノイド類等の植物二次代謝物は、ヒトに対する機能性成分として注目されているが、植物自身における生理機能については十分に理解されていない(図 1a)。環境中の外的要因に対する作用は、抗昆虫作用や抗真菌作用などが知られている。また、他の植物に対する発芽抑制や発芽種子の生長抑制などが観察されているが、産生する植物自身での内因的な生理機能について分子レベルでの作用機構の詳細な情報は無い。その理由としては、(1) 多様な二次代謝物や代謝酵素の全容が明らかになっていない (2) 代謝酵素を制御するための阻害剤や分子生物学的手法が十分ではない ということが上げられる。

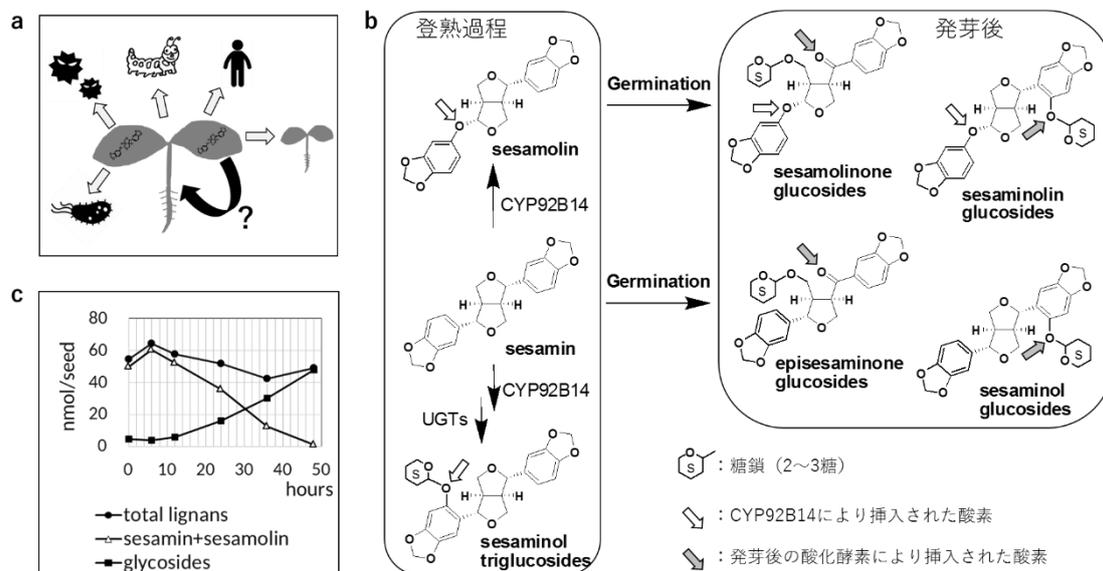


図1. ゴマリグナン類の生合成と生理機能

**a. ゴマリグナン類の生理作用** ゴマリグナン類は人に対する健康成分、昆虫に対する忌避成分として、あるいは、抗バクテリア作用や他の植物に対する発芽・成長制御作用等が報告されているが、植物自身に対する作用はほとんど分かっていない。**b. ゴマリグナン類の生合成** 登熟過程でCYP92B14はセサミンを酸化し、セサモリンとセサミノールを生成する。発芽後に機能する未同定の酸化酵素はCYP92B14と異なる酸化様式でセサミンを酸化し、エピセサミノンとセサミノールを生成する。その後、酸化生成物は配糖化される。セサモリンも同様の酸化様式により配糖体へ導かれる。**c. 発芽後のリグナン量の変化** 発芽後、セサミンとセサモリンは2日程度で消失し、代わりにそれから生成したと推定される配糖体が経時的に増加する。リグナン類の総量はほぼ一定。

発芽は植物の成長における劇的な変化であり、発芽の前後で代謝物も大きく変化するため、急激な二次代謝物の構造変化が発芽後の生長の引き金になっている可能性がある。我々は、ゴマが発芽し生長する過程で、ゴマ特有の二次代謝物の組成の大きな変化(図 1b,c)に興味をもち、代謝酵素や代謝物の同定を進めてきた (Nature Commun. 8, 2155 (2017), Plant Cell Physiol. pcy150 (2018))。これまでに、発芽前の酸化酵素と発芽後の配糖化酵素群については同定できた。一方、ゴマリグナンの主成分であるセサミンの構造をプローブとしたアフィニティ精製で、ゴマ実生抽出物より内因性セサミン結合タンパク質としてステロレオシン B を同定した (論文投稿中)。ステロレオシン B はゴマ種子中の脂質の貯蔵庫であるオイルボディを形成する構造タンパク質の一つである。ステロレオシンを含む構造タンパク質が発芽後の生長過程で消失する (Thenら) ことと我々が観測したリグナンの代謝が連動していることから、発芽後のセサミンの酸化・配糖体化が植物の生長に必要な脂質の代謝制御過程のスイッチとして働くのではないかと推測した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ゴマ発芽後の実生におけるリグナン類の生理機能を題材に、植物二次代謝物が植物自身に示す内因性の生理機能を分子レベルで明らかにすることである。

実生におけるセサミンの生理機能解明には、発芽後のセサミン酸化酵素の同定が大きな鍵になる。最近我々は、登熟過程のゴマ種子中で、セサミンを基質としてセサモリンおよびセサミノールを生成する P450 酸化酵素 (CYP92B14) を同定し、その反応メカニズムを明らかにした (図 2)。その過程で、安定同位体標識した基質の合成や LC-MS による定量分析等、申請者がもつ有機合成化学や分析化学の技術が強力な研究推進力となることを示してきた。本研究において

も、有機化学的アプローチと、次世代シーケンサーによる遺伝子解析などの分子生物学との密接な連携が、この酵素同定を可能にする。セサミンの本質的な生理機能を明らかにするためには、セサミンと標的因子の相互作用を絶つ手法が有用であると考えられるが、モデル植物ではないゴマでの遺伝子操作は困難で、交配による標的因子欠落植物作成には時間がかかる。申請者は、これまでに配糖化酵素の基質特異性についての研究 (Plant Physiol. 2015,168: 464-77)や有機合成による基質合成に実績があり、化学的な阻害剤の開発ができる考えた。また、セサミンの内因性標的候補として同定したステロレオシン B をシロイヌナズナに異種発現させると、セサミン存在下でのみ葉の成長阻害が観測されることから、生体内での両者の相互作用を立証した (論文投稿中)。ステロレオシン B はオイルボディ構成タンパク質として知られているが、リガンドによる活性制御の報告はない。従って、セサミンによる脂質代謝制御に焦点をあてた研究は我々独自のものである。本研究において、ゴマ実生におけるゴマリグナン類の生理的な意義や分子レベルでの機能解析が可能になれば、リグナン類を蓄積する他の多くの植物における分子レベルでの生理機能解明の一助となる。

### 3. 研究の方法

本研究では、実生におけるゴマリグナンの生理的な機能を、代謝酵素と内因性のセサミン標的因子の両側面から解析する。

#### 1. 代謝酵素の同定と機能解析

##### 1-1. 発芽後のリグナン類のプロファイルと酸化酵素の同定

セサミンからセサミノール及びエピセサミノンを生成する酸化酵素を同定する。発芽時の経時的なゴマリグナンプロファイル (図 1c) と RNA-seq データはすでに準備できており、両データの比較により、相関を示す候補遺伝子を絞り込む。酵素反応生成物の標品となるエピセサミノンの合成、LC-MS 分析系の構築は完了しており、酵母を用いた異種発現アッセイ系により、得られた候補遺伝子の酸化酵素活性を確認する。

##### 1-2. 発芽後のセサミン代謝酵素阻害剤の開発と機能解析

発芽後のセサミン代謝酵素機能を阻害できれば、実生におけるセサミンの生理的な機能を推測できる。そこで、基質であるセサミンや生成物であるセサミノール、エピセサミノールをリードとして化合物設計し、セサミン代謝酵素阻害剤候補を合成する。阻害剤の評価は、ゴマ種子の発芽時に阻害剤候補物質を添加し、リグナン類の代謝阻害を指標にして行う。また、代謝酵素が同定できた段階で、ホモロジーモデリングにより代謝酵素のモデル構造を構築し、効果的な阻害剤設計に活かす。上記の酵母アッセイ系で代謝酵素を発現すれば、さらに効率的に阻害剤を探索できる。開発した阻害剤を用いて、ゴマ発芽後の表現型の変化を調べる。

#### 2. 二次代謝物の内因性標的因子の同定と機能解析

我々はセサミンの存在がオイルボディの脂質代謝を阻害していると考えている。セサミンがステロレオシン B を介して発芽後の脂質制御に関わることを立証する (図 3)。

##### 2-1. オイルボディを用いた in vitro でのセサミンの脂質代謝阻害の確認

Then, J. T. (1997)らの方法によるゴマ種子オイルボディの再構成法、あるいは、他の植物種子からのオイルボディ精製法を参考に、ゴマ実生からオイルボディを調製し、リパーゼを用いた脂質代謝実験を行い、セサミンとステロレオシン B 存在下では脂質代謝が阻害されることを示す。また、セサミンがステロレオシン B の分解を阻害する可能性も検証する。

##### 2-2. セサミン酸化酵素阻害剤のオイルボディへの作用の検証 (in vivo)

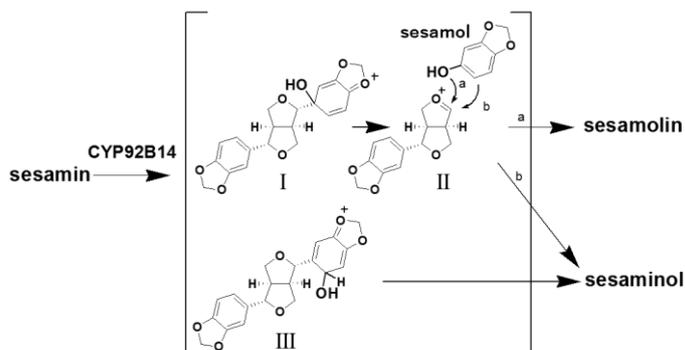
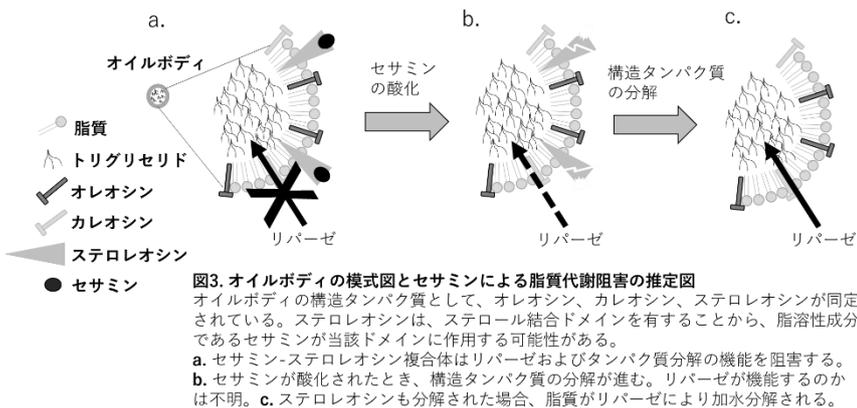


図2. CYP92B14によるセサミンの酸化メカニズム

重水素化セサミンを用いた酵素反応物の解析から、セサミンの芳香環が酸化されることが分かった。フラン環が結合している炭素が酸化(I)された場合は、フラン環と芳香環の結合がいったん開裂し、生成するオキソニウムカチオン(II)へのセサモールの付加の仕方により、セサモリンとセサミノールの両方が生成する。また、セサミノールは直接的な酸化(III)によっても生成している。

セサミン酸化酵素阻害剤を用いた発芽・生長実験 (vivo の系) において、経時的に実生をサンプリングし、オイルボディの形状の比較やステロレオシンを含む構造タンパク質、リグナン類、トリグリセリド類の定量分析を行う。セサミン酸化酵素阻害剤の有無における各主要成分の経時的变化量の相違から、セサミンあるいはセサミン-ステロレオシンB複合体が、脂質代謝の制御に関わっていることを vivo の系で証明する。



#### 4. 研究成果

##### 1. 代謝酵素の同定と機能解析

##### 1-1. 発芽後のリグナン類のプロファイルと酸化酵素の同定

セサミンからセサミノール及びエピセサミノンを生成する酸化酵素を同定するため、発芽時の経時的なゴマリグナンプロファイルを参考に RNA-seq データ解析を行い、CYP 酵素に絞り込んだ候補遺伝子について酵母細胞への異種発現を行い、基質であるセサミンの酸化活性を検討した結果、お互いに相同性の高い 3 種のセサミン酸化酵素を見出した。1 種 (CYP\_A) は、セサミノールを合成する酵素で、他の 2 種 (CYP\_B1 及び CYP\_B2) は、エピセサミノンを選択的に合成することが分かった。変異体解析から、その選択性に関与するアミノ酸残基の同定にも成功した。

また、更に、セサミンから得られたセサミノールやエピセサミノンの配糖化酵素についても、すべて同定することができた。セサミノールについては、すでに、登熟期に蓄積するセサミノールのトリグルコシドの配糖化酵素 (UGT71A9, UGT94AG1, UGT94AA2, UGT94D1) がすべて明らかにされていることから、本酵素群が発芽時にも発現していることを確認した。エピセサミノンについても上記配糖化酵素による配糖化を確認したところ、最初に配糖化された糖の 2 位水酸基を配糖化する酵素 (UGT94AG1) 以外は、すべて機能していることが分かった。そこで、発芽時の経時的な RNA-seq 解析から、エピセサミノンのモノグルコシドの 2 位水酸基の配糖化酵素は UGT94AB2 であることを明らかにした。更に、エピセサミノンに対する UGT71A9 の酵素活性が低いことから、同様に RNA-seq 解析の結果、新たに UGT\_A と UGT\_B を見出した。

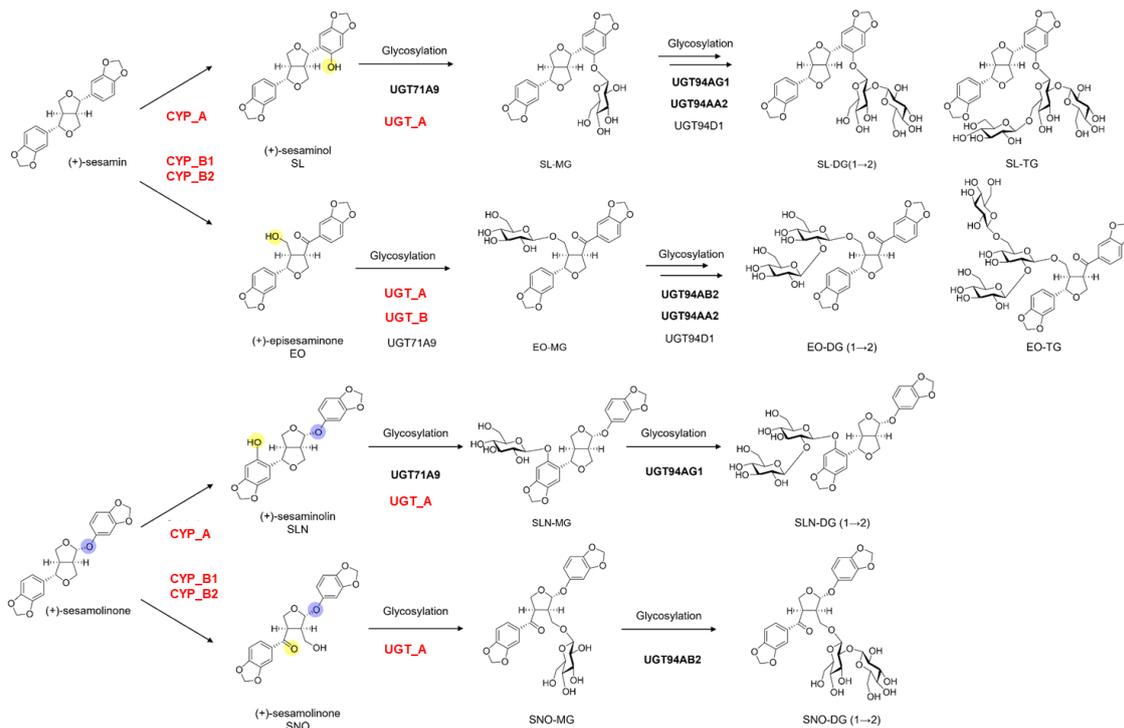


図 4. 発芽時におけるセサミン、及び、セサモリンの代謝酵素

UGT\_A はセサミノールもエピセサミノンも配糖化する酵素で、UGT\_B はエピセサミノンのみを配糖化する酵素であったが、比活性は UGT\_A の方がかなり高いことが分かった。

### 1-2. 発芽時のセサミン代謝酵素阻害剤の開発と機能解析

酵素阻害剤の開発には至らなかったが、リグナン代謝を制御する目的で、登熟期のリグナン合成に重要な Dirigent タンパク質の候補を見出した。今後は、他のリグナン代謝酵素も含め、ゲノム編集技術を活用し、リグナン生合成を制御し、植物中でのリグナン類の生理機能を明らかにすることが期待できる。

## 2. 二次代謝物の内因性標的因子の同定と機能解析

### 2-1. オイルボディを用いた in vitro でのセサミンの脂質代謝阻害の確認

脂質代謝に関連する酵素類を直接アッセイすることにより、セサミン自身がゴマの発芽時の脂質代謝を阻害していることが分かった。今後、どのようにオイルボディの構成タンパク質や含有タンパク質が関わっているかを調べる。

### 2-2. セサミン酸化酵素阻害剤のオイルボディへの作用の検証 (in vivo)

選択的な阻害剤の開発は断念したので、それを用いた実験系は構築できなかったが、上記のように、セサミンが脂質代謝に関わっていることから、本作用が、ステロレオシン B 等を介したものなのか、詳細説明に向けた足掛かりを掴むことができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 Erisa Harada, Jun Murata, Eiichiro Ono, Hiromi Toyonaga, Akira Shiraishi, Kosuke Hideshima, Masayuki P. Yamamoto, Manabu Horikawa	4. 巻 104
2. 論文標題 (+)-Sesamin-oxidising CYP92B14 shapes specialised lignan metabolism in sesame	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 1117-1128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.14989	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 Masayuki Tera, Tomotsugu Koyama, Jun Murata, Ayako Furukawa, Shoko Mori, Toshiaki Azuma, Takehiro Watanabe, Katsuhito Hori, Atsushi Okazawa, Yasuaki Kabe, Makoto Suematsu, Honoo Satake, Eiichiro Ono & Manabu Horikawa	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification of a binding protein for sesamin and characterization of its roles in plant growth	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-019-45003-7	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 堀川学・小山知嗣・寺正行	4. 巻 1
2. 論文標題 植物におけるセサミン結合タンパク質の同定と機能探索	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	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) 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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大場 幸江、東 鋭明、小埜 栄一郎、豊永 宏美、白石 慧、原田 英里砂、村田 純、堀川 学
2. 発表標題 発芽後のゴマ種子におけるリグナン配糖体およびそれらの配糖体化酵素の同定
3. 学会等名 第19回関西グライコサイエンスフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大場 幸江、東 鋭明、小埜 栄一郎、豊永 宏美、白石 慧、原田 英里砂、村田 純、堀川 学
2. 発表標題 発芽後のゴマ種子におけるリグナン配糖体およびそれらの配糖体化酵素の同定
3. 学会等名 新規素材探索研究会 第18回セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田英里砂、村田純、小埜栄一郎、白石慧、太田陽子、豊永宏美、山本将之、堀川学
2. 発表標題 ゴマのセサミン代謝酵素CYP92B14の酵素活性
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大場 幸江、東 鋭明、小埜 栄一郎、豊永 宏美、白石 慧、原田 英里砂、村田 純、堀川 学
2. 発表標題 ゴマリグナンとその生合成
3. 学会等名 第34回日本ゴマ科学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田英里砂、村田純、小埜栄一郎、白石慧、太田陽子、豊永宏美、山本将之、堀川学
2. 発表標題 ゴマ種子中のセサミン代謝酵素CYP92B14の反応特性
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究協力者	山本 将之  (YAMAMOTO MASAYUKI)		

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