

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19082

研究課題名（和文）人工的なトリテルペン配糖体生合成メタボロンの構築

研究課題名（英文）Construction of artificial triterpene saponin biosynthetic metabolon

研究代表者

関 光（Seki, Hikaru）

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：30392004

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：トリテルペン配糖体（以下、サポニンと記述）は植物が産生する低分子化合物群のグループであり、天然甘味料原料として使用される甘草根に含まれる甘味成分のグリチルリチンなど多くの機能性成分がある。本研究では、多段階にわたるサポニン生合成に関わる複数酵素について、それらのタンパク間相互作用の有無を調べるとともに、微生物細胞内で人工的な酵素複合体（メタボロン）の形成を促進することによって組換え微生物細胞におけるサポニン生産量を増加させようことを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

希少な植物に特有の有用機能性成分を培養が容易な微生物を用いて、希少な植物原料に依存せず安定・安価に生産しようとする研究が多くなされているが、本来植物細胞が行っている多段階にわたる一連の酵素反応を微生物細胞内において再現することは必ずしも容易ではなく、実用化には生産性の向上が求められる。本研究は、微生物細胞内で多くの生合成酵素の複合体化を人工的に促進することで生産性の向上が可能であることを示したことから社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：Triterpene glycosides, also known as saponins, are a group of small molecules found in plants. They contain various functional components, such as glycyrrhizin, a sweetening agent present in licorice root, which is used as a natural sweetener. Metabolon, a temporary structural-functional complex formed by sequential enzymes in a metabolic pathway, can be considered a shortcut in the pathway that enhances production efficiency. This study explores the potential protein-protein interactions among multiple enzymes involved in the multi-step saponin biosynthesis. Additionally, it investigates the possibility of enhancing saponin production in recombinant microbial cells by promoting the formation of an artificial enzyme complex (metabolon) within these cells.

研究分野：植物代謝工学

キーワード：トリテルペン配糖体 サポニン 生合成 メタボロン 合成生物学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、薬用植物が産生する様々な薬理活性物質の生合成経路を微生物ホストにおいて再設計・構築する合成生物学研究が精力的に行われている。私たちは、医薬品原料として重要な化合物群である植物トリテルペノイド配糖体(サポニン)の生合成研究を行ってきた。最重要漢方原料である甘草(カンゾウの根)から抽出される「グリチルリチン」は肝炎治療剤、甘味料原料等として使用される有用サポニンである。私たちはこれまでに、グリチルリチン生合成の鍵となる2種のシトクロム P450 酸化酵素 (P450) および糖転移酵素の全てを同定し、これらを含む計7種の酵素遺伝子を導入した組換え酵母におけるグリチルリチンの *de novo* 合成に成功した<sup>1)</sup>。しかしながら、その生産量は非常に低いため酵母細胞内におけるグリチルリチン生合成を促進させるための新たなアプローチが必要と考えられる。代謝酵素複合体(メタボロン)は、代謝経路を構成する酵素タンパク質によって細胞内で特異的に形成される複合体のことであり、代謝中間体を媒質中に拡散させずに酵素から別の酵素へ直接渡すこと(チャネリング)が可能となり、細胞の代謝機能の円滑化・高効率化が図られると考えられている<sup>2)</sup>。植物二次代謝におけるメタボロン形成は、数種のフラボノイドおよび青酸配糖体の生合成経路において報告されてきたが、サポニン生合成に関連する酵素生合成経路におけるメタボロン形成は明らかになっていない。そこで本研究では、私たちが同定してきたグリチルリチンの生合成に関わる酵素群のメタボロン形成の有無さらには微生物細胞内において人工的にメタボロン形成を促進することでサポニン生産量が向上するか否かを明らかにすることとした。

### 2. 研究の目的

グリチルリチン生合成酵素群をモデルとして、植物が産生する有用物質であるサポニンの生合成に関わる酵素タンパク質に着目し、生合成酵素間のタンパク質間相互作用の有無を明らかにする。さらには、微生物細胞内でサポニン生合成酵素タンパク質間の相互作用を促進あるいは人工的に複合体を形成させることにより酵母細胞内でのサポニン生産量が増高するかを検証する。これにより、微生物細胞内で人工的メタボロンを構築し新たな代謝経路をデザインする、あるいは代謝経路の高円滑化を図るといった代謝工学における新たな手法の開発に向けた基礎的知見を得ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 酵母スプリットユビキチン法を用いたグリチルリチン生合成酵素間の相互作用解析  
トリテルペノイドの共通前駆物質である 2,3-オキシドスクアレン以降のグリチルリチン生合成経路を図1に示した。グリチルリチンの生合成に関わることが判明している酵素である -アミリン合成酵素(オキシドスクアレン環化酵素の一種)、シトクロム P450 モノオキシゲナーゼ(CYP88D6 および CYP72A154)および還元酵素 CPR、糖転移酵素(CSyGT および UGT73P12)間に直接的なタンパク質間相互作用があるかを解析する。上記の酵素の内、一般的に細胞質に局在すると予想されている UGT73P12 以外はいずれも小胞体膜上に局在すると考えられるため、膜タンパク質の相互作用解析に適した酵母ツーハイブリット法であるスプリットユビキチン法を用いる。これにより、グリチルリチン生合成において鍵となる酵素間相互作用の組み合わせを明らかにする。さらに、酵母細胞内において相互作用が観察されたタンパク質どうしが植物細胞内の環境においても相互作用するのかを BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) 法により確認する。

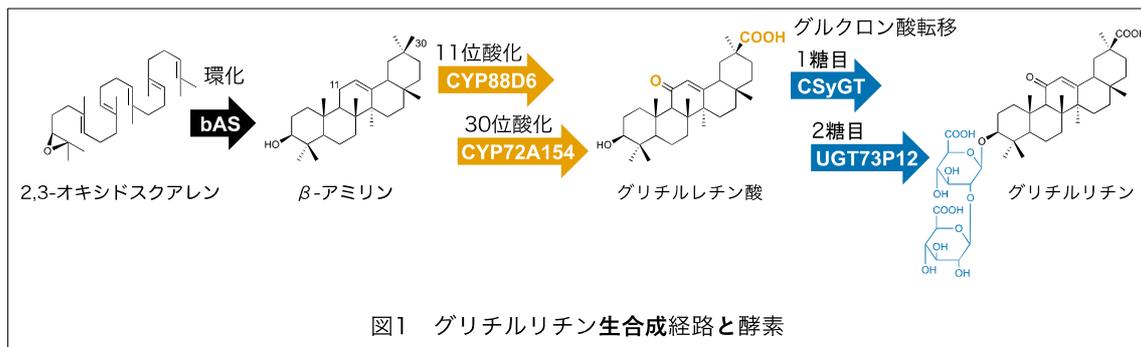
(2) 酵母細胞でのグリチルリチン生合成酵素間の複合体化の促進あるいは人工的な複合体構築  
シロイヌナズナにおけるリグニン生合成においては、小胞体膜に局在する非酵素タンパク質の幾つかがりグニン生合成に関わる P450 の複数と相互作用し複合体化を促進する「足場タンパク質」として機能すると推測されている。そこで、グリチルリチンの基原植物であるカンゾウにおける該タンパク質ホモログの探索ならびに上記酵素タンパク質との相互作用解析を行う。さらに、互いに相互作用することが確認されているペプチド配列を N 末端あるいは C 末端に融合した酵素タンパク質を発現させることで実験 1 においてタンパク質間相互作用が確認されなかった酵素間の相互作用を人工的に形成させる。

(3) 私たちは、7種の植物由来酵素遺伝子を導入することで酵母細胞内に存在する 2,3-オキシドスクアレンからグリチルリチンを *de novo* 合成することに成功している<sup>1)</sup>。そこで、実験 2 において探索した「足場タンパク質」の共導入および人工的な複合体化を行った場合のグリチルリチン関連物質の生産量を LC-MS で測定することにより、生合成酵素複合体化によるグリチルリチン生合成の促進効果の有無を解析する。

### 4. 研究成果

(1) 酵母スプリットユビキチン法を用いたグリチルリチン生合成酵素間の相互作用解析

図1に示すグリチルリチン生合成経路に関わる酵素間のタンパク質-タンパク質相互作用の有無を調べた結果、一部の酵素間どうしの組み合わせにおいてのみ直接的な相互作用を確認した。しかしながら解析に供した酵素タンパク質の全てを含む包括的な複合体の存在を示唆するデータは得られなかった。本実験は酵母細胞内の環境において酵素タンパク質間の相互作用を解析しているため、フォスホポジティブおよびフォスホネガティブデータが得られる可能性が否定できないため本実験に供した酵素タンパク質に関して植物細胞内の環境における相互作用の有無を確認するためのBiFC実験用のプラスミドコンストラクトを作成し、ベンサミアナタバコ葉における一過的発現による相互作用解析を行っている。



(2) 酵母細胞でのグリチルリチン生合成酵素間の複合体化の促進あるいは人工的な複合体構築特許出願を予定しているため現時点では詳細の記載を避けるが、カンゾウのトランスクリプトームデータベースからの小胞体膜局在タンパク質の探索から、グリチルリチン生合成酵素と相互作用をする2種の足場タンパク質候補遺伝子を見出した。これら2種のタンパク質はそれぞれがグリチルリチン生合成酵素の一部と直接的な相互作用をするだけでなくダイマーを形成しうるため、グリチルリチン生合成酵素の高次複合体化に寄与するハブの役割をすることが示唆された。以上の結果から、小胞体膜上における図2に示すようなタンパク質間相互作用モデルが予想される<sup>3)</sup>。

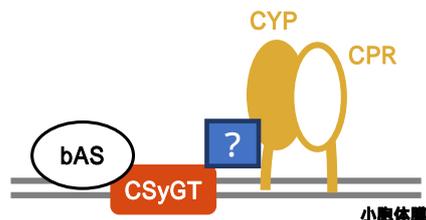


図2 サポニン生合成メタボロンの予想図

Split-ubiquitin法を用いた相互作用解析によってbASとCSyGT間の相互作用が観察できた。しかし、CSyGTとCYPとの相互作用が見られなかったことから、生合成経路に直接的に関与しない“仲介”タンパク質(青色)を介したメタボロンの形成が推定される。

(3) サポニン生産酵母への足場タンパク質遺伝子導入がサポニン生産性に及ぼす効果の解析  
出芽酵母にβ-アミリン合成酵素、CYP88D6、CYP72A63(CYP72A154のタルウマゴヤシ由来ホモログ)、糖転移酵素(CSyGTおよびUGT73P12)、シロイヌナズナ由来UDP-グルコースデヒドロゲナーゼ(AtUGD2)およびミヤコグサ由来シトクロムP450還元酵素(LjCPR1)の遺伝子を導入することで、酵母内在のエルゴステロール生合成経路の中間代謝産物である2,3-オキシドスクアレンからグリチルレチン酸モノグルクロニド(グリチルリチンの前駆物質)を*de novo*合成する酵母株を作成した。そこで、本菌株に上記項目2で見出した足場タンパク質候補遺伝子を導入した結果、グリチルレチン酸モノグルクロニドの生産量が有意に増加することが判明した。このことから、小胞体膜上での生合成酵素の集合体化促進がサポニン生合成の円滑化に寄与することが示唆された。

#### <引用文献>

1) Chung SY, Seki H, Fujisawa Y, Shimoda Y, Hiraga S, Nomura Y, Saito K, Ishimoto M, Muranaka T: A cellulose synthase-derived enzyme catalyses 3-O-glucuronosylation in saponin biosynthesis. Nat. Commun. 11: 5664 (2020).

2) 中山 亨、和氣駿之、高橋征司: 植物特化代謝とメタボロン、植物の生長調節、56巻、2021、14-25

3) Soo Yeon CHUNG、關 光、村中俊哉: 酵母を用いたグリチルリチンの生産とメタボロン形成の可能性、酵素工学ニュース、第88号 2022年10月

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Fujiyama Kazuhito, Muranaka Toshiya, Okazawa Atsushi, Seki Hikaru, Taguchi Goro, Yasumoto Shuhei	4. 巻 -
2. 論文標題 Recent advances in plant-based bioproduction	5. 発行年 2024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) 10.1016/j.jbiosc.2024.01.007	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 關 光、Soo Yeon CHUNG、村中俊哉	4. 巻 61
2. 論文標題 サポニン生合成に関わる新しい糖転移酵素ファミリーの発見	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 477-483
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 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 -
1. 著者名 Chiyo Naoki, Seki Hikaru, Kanamoto Takuya, Ueda Hiroshi, Kojoma Mareshige, Muranaka Toshiya	4. 巻 65
2. 論文標題 Glycyrrhizin Production in Licorice Hairy Roots Based on Metabolic Redirection of Triterpenoid Biosynthetic Pathway by Genome Editing	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant And Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 185 ~ 198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcad161	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 Sakanishi Manami, Chung Soo Yeon, Fujiwara Kentaro, Kojoma Mareshige, Muranaka Toshiya, Seki Hikaru	4. 巻 43
2. 論文標題 Disruption of a licorice cellulose synthase-derived glycosyltransferase gene demonstrates its in planta role in soyasaponin biosynthesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Cell Reports	6. 最初と最後の頁 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcad161	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 Suzuki H, Takahashi H, Fukushima EO, Nakazono M, Muranaka T, Seki H	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification of basic helix-loop-helix transcription factors that activate betulinic acid biosynthesis by RNA-sequencing of hydroponically cultured <i>Lotus japonicus</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 PPR572402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2022.11.16.516519	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 該当する

1. 著者名 Takahashi H, Abo C, Suzuki H, Romsuk J, Oi T, Yanagawa A, Gorai T, Tomisaki Y, Jitsui M, Shimamura S, Mori H, Kaga A, Ishimoto M, Seki H	4. 巻 -
2. 論文標題 Triterpenoids in aerenchymatous phellem contribute to internal root aeration and waterlogging adaptability in soybean	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Research Square	6. 最初と最後の頁 PPR568134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21203/rs.3.rs-2230730/v1	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 Rai A, Hirakawa H, Rai M, Shimizu Y, Shirasawa K, Kikuchi S, Seki H, Yamazaki M, Toyoda A, Isobe S, Muranaka T, Saito K	4. 巻 29
2. 論文標題 Chromosome-scale genome assembly of <i>Glycyrrhiza uralensis</i> revealed metabolic gene cluster centred specialized metabolites biosynthesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 DNA Res.	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/dnares/dsac043	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 Romsuk J, Yasumoto S, Fukushima EO, Miura K, Muranaka T, Seki H	4. 巻 13
2. 論文標題 High-yield bioactive triterpenoid production by heterologous expression in <i>Nicotiana benthamiana</i> using the Tsukuba system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front. Plant Sci.	6. 最初と最後の頁 991909
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2022.991909	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

1. 著者名 Romsuk J, Yasumoto S, Seki H, Fukushima EO, Muranaka T	4. 巻 10
2. 論文標題 Identification of key amino acid residues toward improving the catalytic activity and substrate specificity of plant-derived cytochrome P450 monooxygenases CYP716A subfamily enzyme for triterpenoid production in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front. Bioeng. Biotechnol.	6. 最初と最後の頁 955650
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fbioe.2022.955650	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

1. 著者名 關 光、Soo Yeon CHUNG、村中俊哉	4. 巻 57
2. 論文標題 植物トリテルペノイドの酵母生産: 実例および展望	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 植物の生長調節	6. 最初と最後の頁 77-83
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 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 -

1. 著者名 Soo Yeon CHUNG、關 光、村中俊哉	4. 巻 88
2. 論文標題 酵母を用いたグリチルリチンの生産とメタボロン形成の可能性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 酵素工学ニュース	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 -

1. 著者名 Istiandari Pramesti, Yasumoto Shuhei, Srisawat Pisane, Tamura Keita, Chikugo Ayaka, Suzuki Hideyuki, Seki Hikaru, Fukushima Ery Odette, Muranaka Toshiya	4. 巻 12
2. 論文標題 Comparative Analysis of NADPH-Cytochrome P450 Reductases From Legumes for Heterologous Production of Triterpenoids in Transgenic <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 762546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2021.762546	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15件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 關 光、JUTAPAT Romsuk、三浦 謙治、村中俊哉
2. 発表標題 アグロ浸潤法によるベンサミアナタバコ葉における植物インスリン「コロソリン酸」の異種生産
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 森田遥絵、北村実紗子、岡本有平、田村啓太、坊農秀雅、村中俊哉、關 光
2. 発表標題 ダイズにおいてソヤサポニン生合成を制御するbHLH 型転写因子の機能解析
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 森田遥絵、北村実紗子、村中俊哉、關 光
2. 発表標題 ダイズにおいてソヤサポニン生合成を制御する転写因子の探索
3. 学会等名 第40回日本植物バイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 千代直樹、關 光、金本拓也、上田大志、高上馬希重、村中俊哉
2. 発表標題 ゲノム編集によるグリチルリチン高生産毛状根の作出
3. 学会等名 第40回日本植物バイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 關 光
2. 発表標題 酵母で植物有用物質をつくる
3. 学会等名 大阪大学大学院工学研究科テクノアリーナフォーラム：インテリジェントアグリ工学の新展開（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤原健太郎、高上馬希重、村中俊哉、關 光
2. 発表標題 カンゾウ培養ストロンにおけるグリチルリチン生合成遺伝子の発現におよぼすDNAメチル化酵素阻害剤の効果
3. 学会等名 2022年度（第11回）近畿植物学会講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 チونسヨン、和氣駿之、中山 亨、村中俊哉、關 光
2. 発表標題 トリテルペノイドサポニン生合成におけるセルロース合成酵素類似タンパク質の機能解析
3. 学会等名 2022年度（第11回）近畿植物学会講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 關 光
2. 発表標題 植物甘味成分の酵母生産
3. 学会等名 第74 回日本生物工学会大会シンポジウム：植物由来のバイオプロダクションの新潮流（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 關 光
2. 発表標題 植物の有用成分を酵母でつくる
3. 学会等名 市民公開シンポジウム：食と農の技術革新がSDGsへ貢献する！（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Romsuk J, Yasumoto S, Fukushima E0, Miura K, Muranaka T, Seki H
2. 発表標題 Nicotiana benthamiana as a production platform for bioactive triterpenoid maslinic acid
3. 学会等名 第39回日本植物バイオテクノロジー学会大会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原健太郎、高上馬希重、村中俊哉、關 光
2. 発表標題 エピジェネティック酵素阻害剤がカンゾウ培養ストロンにおけるグリチルリチン生合成遺伝子の発現におよぼす効果
3. 学会等名 第39回日本植物バイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阪西真実、藤原健太郎、高上馬希重、村中俊哉、關 光
2. 発表標題 ゲノム編集による薬用植物甘草セルロース合成酵素類似タンパク質のサポニン生合成における機能の同定
3. 学会等名 第39回日本植物バイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 チョンスヨン、和氣駿之、中山 亨、村中俊哉、關 光
2. 発表標題 トリテルペノイドサポニン生合成酵素群のタンパク質間相互作用の解析
3. 学会等名 第39回日本植物バイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 關 光
2. 発表標題 植物サポニン生合成に関わる新たな糖転移酵素の発見と組換え酵母でのサポニン生産
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Istiandari P, Yasumoto S, Fukushima E0, Seki H, Muranaka T
2. 発表標題 Comparative analysis of plant NADPH-cytochrome P450 reductase classes of Lotus japonicus towards triterpenoids biosynthesis
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022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

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			
エクアドル	Universidad Regional Amazonica IKIAM			