

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590009

研究課題名（和文）植物糖転移酵素を利用した機能性化合物の糖鎖構築と消化管吸収性の改善

研究課題名（英文）Glycosyl conjugation of functional natural products for improvement of their intestinal absorption.

研究代表者

水上 元（MIZUKAMI HAJIME）

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：30128219

研究成果の概要（和文）：高等植物の第二次代謝に関する糖転移酵素遺伝子を有効に活用することによって天然機能性化合物の配糖体糖鎖を構築し、消化管吸収性と機能性の改善に結びつけることを目的として実施した。各種植物から二次代謝糖転移酵素をコードする cDNA を単離し、組換え酵素を用いてその触媒機能を解析した。その結果、アポカロテノイド、プレニルフラノクマリン、イリドイドなどに対する新規糖転移酵素の同定に成功し、それらの有用化合物の代謝工学的的手法による生産の土台を提供することが出来た。また、糖転移酵素を用いて生産した各種ケルセチン配糖体の消化管吸収と抗炎症作用を比較することにより、配糖体糖鎖の構造と消化管吸収性との関係について有用な知見を得た。

研究成果の概要（英文）：The present investigation was carried out to glycosylate various natural compounds with useful physiological activities by using recombinant glycosyltransferases, and to compare the intestinal absorption of the glycosides. A wide array of plant secondary product glycosyltransferases were cloned from various plant sources and their biochemical functions were characterized. Apocarotenoid glycosyltransferases from *Gardenia jasminoides*, iridoid-specific glycosyltransferases from *Catharanthus roseus*, *Lonicera japonica* and *G. jasminoides*, and a prenylfuranocoumarin glycosyltransferase from *Glehnia littoralis* were successfully isolated and functionally characterized, providing a working platform for synthetic biology of plant secondary glycosides. A series of quercetin glycosides were enzymatically synthesized and their intestinal absorption and anti-inflammatory activity were compared.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：薬学

科研費の分科・細目：化学系薬学

キーワード：二次代謝糖転移酵素 / 生物転換 / 配糖体 / 機能性化合物 / 消化管吸収

1. 研究開始当初の背景

(1) 天然機能性化合物の多くは、抗酸化作用、抗炎症作用、抗アレルギー作用などの興味ある活性を示すが、その難水溶性のために経口的に摂取した場合の消化管吸収は極めて低く、消化管内を素通りして糞便中に排泄される。これらの機能性化合物に糖分子を付加して水溶性を改善することは、消化管吸収能の改善、ひいては機能性の改善にもつながる有用な手段である。

(2) われわれは、*quercetin* の数種の配糖体の消化管吸収を検討し、いずれの配糖体でも水溶性は大きく増加したが、消化管吸収能は特定の糖鎖構造を持つ配糖体でのみ大幅に改善することを認めた。このことは、機能性化合物に付加した糖鎖構造を認識して消化管粘膜を通過させるメカニズムが存在することを示唆している。したがって、機能性化合物の糖鎖構造と消化管吸収との関係を明らかにすることは、機能性化合物の消化管吸収と機能性の改善につながる大きな可能性を有していると考えられる。

(3) 糖鎖の化学合成法については目覚ましい進歩が見られるものの、位置特異的、立体特異的にかつ効率よく糖鎖を伸長・修飾することは一般にはなお困難である。一方、種々の複雑な糖鎖構造を有する低分子化合物を生産する高等植物や微生物のゲノムには二次代謝産物の配糖化に関与する多数の糖転移酵素遺伝子が存在している。高等植物についてみると、これらの糖転移酵素のうちアグリコン分子に糖を抱合する反応を触媒する酵素 (*aglycone-sugar transferase*: 以下では「糖抱合酵素」とする) については研究成果が蓄積しており、生合成中間体だけでなく異物を含む広範な構造の化合物を糖受容体として認識して、位置特異的、立体特異的に糖鎖を付加する多数の酵素が存在することが明らかになっている。しかしながら、配糖体の糖鎖部分にさらに糖を付加して糖鎖を伸長する反応を触媒する酵素 (*sugar-sugar transferase*: 以下、「糖鎖伸長酵素」とする) については、糖鎖構造の多様性を創出し、薬理活性をはじめとする配糖体の機能性にも大きな影響を及ぼす重要な酵素であるにもかかわらずその研究は極めて不十分である。植物ゲノムから種々の基質特異性、位置特異性を有する糖鎖伸長酵素をクローニングすることができれば、糖抱合酵素と組合せて使うことにより、糖鎖構造の多様な機能性化合物の配糖体を効率的に生産することが可能になると期待される

2. 研究の目的

本研究は、高等植物の第二次代謝に関する糖転移酵素遺伝子を有効に活用することによって天然機能性化合物の配糖体糖鎖を構

築し、消化管吸収性と機能性の改善に結びつけることを目的として実施した。具体的には、種々の植物遺伝子資源からゲノム情報に基づいて各種糖鎖伸長酵素遺伝子をクローニングし、組換え酵素を用いる機能性化合物の配糖体糖鎖修飾法を確立し、配糖体ライブラリーを構築する。糖鎖修飾機能性化合物の消化管吸収特性を比較、評価することによって、糖鎖構造と消化管吸収性の関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 各種植物およびその培養細胞から cDNA ライブラリーを構築し、植物二次代謝糖転移酵素に保存された配列をもとに *homology-based cloning* または EST データを用いて糖転移酵素遺伝子の cDNA を出来るだけ多く、クローニングする。

(2) これらの cDNA を大腸菌で発現させることにより、組換え糖転移酵素を作成する。

(3) 色々な天然機能性化合物を基質として組換え糖転移酵素による配糖化反応を行い、生成物を単離、構造決定することにより、それぞれの酵素の触媒機能を明らかにするとともに、配糖体ライブラリーを構築する。

(4) さまざまな糖鎖を持つ配糖体をマウスに経口投与し、血中濃度推移を比較することにより、配糖体の糖鎖構造と消化管吸収性の関係を検討する、

4. 研究成果

(1) クチナシ、スイカズラ、ニチニチソウ、ハマボウフウの植物体および培養細胞から糖転移酵素をコードする全長 cDNA を約 30 クローン単離し、その配列に基づく遺伝子系統樹を作成した。

(2) 得られた cDNA を大腸菌で発現させ、組換え酵素の生産を試みた。約 30 のクローンのほとんどすべてで、発現の程度に差はあるものの組換え酵素を可溶性タンパク質として得ることが出来た。

(3) 各種の天然機能性化合物を基質として糖転移反応を試みることにより、クチナシから、そのイリドイド配糖体成分である *geniposide* の生合成に関与するイリドイド特異的糖転移酵素 UGT85A24 (発表論文①)、アポカロチノイドである *crocetin* の配糖化と糖鎖伸長に関与する 2 つの糖転移酵素 UGT75L6 および UGT94E5 (発表論文②) を同定した。さらにニチニチソウおよびスイカズラから *secologanin* の生合成に関与するイリドイド特異的糖転移酵素、ハマボウフウからフラノクマリン配糖体の糖鎖伸長を触媒する糖転移酵素を単離することにも成功した (これらは論文作成中)。

(3) シロイヌナズナのショ糖合成酵素 AtSUS1 と組換え配糖化酵素を組み合わせ、

糖転移反応と UDP-glucose の再生反応をカップリングさせた one-pot two enzyme system が単に配糖化反応を効率化させるだけでなく、糖転移酵素の基質特異性を拡張するためにも極めて有力な手段であることを明らかにした（発表論文③）。

（４）本研究で得られた組換え糖転移酵素を利用して各種の quercetin 配糖体の消化管吸収性を比較し、糖鎖構造と消化管吸収性との関係を検討した（発表論文④）。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 4 件）

- ① Makino, T., Kanemaru, M., Okuyama, S., Shimizu, R., Tanaka, H., Mizukami, H. (2013) Anti-allergic effects of enzymatically modified isoquercitrin (α -oligoglucosyl quercetin 3-O-glucoside), quercetin 3-O-glucoside, α -oligoglucosyl rutin, and quercetin, when administered orally to mice. **J.Nat. Med. in press** (DOI 10.1007/s11418-013-0760-5). (査読有)
- ② Nagatoshi, M., Terasaka, K., Owaki, M., Sota, M., Inukai, T., Nagatsu, A., Mizukami, H. (2012) UGT75L6 and UGT94E5 mediate sequential glucosylation of crocetin to crocin in *Gardenia jasminoides*. **FEBS Lett.** 586, 1055 – 1061. (査読有)
- ③ Terasaka, K., Mizutani, Y., Nagatsu, A., Mizukami, H. (2012) In situ UDP-glucose regeneration unravels diverse functions of plant secondary glycosyltransferases. **FEBS Lett.** 586, 4344 – 435. (査読有)
- ④ Nagatoshi, M., Terasaka, K., Nagatsu, A., Mizukami, H. (2011) Iridoid-specific glucosyltransferase from *Gardenia jasminoides*. **J. Biol. Chem.** 286, 32866 – 32874. (査読有)

〔学会発表〕（計 13 件）

- ① 田中和貴（水上 元）植物酵素による糖転移ケルセチンの生産とその消化管吸収特性 フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー 2012 年 10 月 25 日 名古屋市
- ② 浅田圭祐（水上 元）セコロガニン生合成に関与する配糖化酵素の機能解析 第 30 回日本植物細胞分子生物学会 2012 年 8 月 05 日 生駒市
- ③ 犬飼竜徳（水上 元）ハマボウフウ培養細胞由来クマリン配糖体糖鎖伸長酵素の機能解析 第 30 回日本植物細胞分子生物学会 2012 年 8 月 05 日 生駒市
- ④ 田中和貴（水上 元）植物酵素による糖

転移ケルセチンの生産とその消化管吸収特性 日本食品化学学会第 18 回総会・学術大会 2012 年 6 月 21 日 函館市

- ⑤ Hajime Mizukami Improving Intestinal Absorption of Bioactive Natural Products Workshop on Innovation and Pioneering Technology 2012 年 2 月 18 日 Kobe
- ⑥ Keisuke Asada (Hajime Mizukami) Molecular cloning and characterization of an iridoid 1-O-glucosyltransferase involved in secologanin biosynthesis Phytochemical Society of North America 50th Anniversary Meeting 2011 年 12 月 12 日 Kohara Coast, Hawaii
- ⑦ 鬼頭 宏和（水上 元）スイカズラ由来イリドイド配糖化酵素の単離と機能解析 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2011 年 11 月 23 日 名古屋市
- ⑧ 浅田 圭祐（水上 元）ニチニチソウ由来イリドイド生合成新規配糖化酵素の機能解析 第 29 回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム 2011 年 9 月 8 日 福岡市
- ⑨ 寺坂 和祥（水上 元）ハマボウフウ由来クマリン配糖化酵素のクローニングと機能解析 第 29 回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム 2011 年 9 月 8 日 福岡市
- ⑩ 水上 元 Production of Bioactive Glycosides Using Plant Glycosyltransferase Plant and Animal Genome XIX 2011 年 1 月 17 日 San Diego
- ⑪ 寺坂和祥（水上 元）クチナシ培養細胞由来 crocetin 配糖化酵素の単離と機能解析 第 28 回日本植物細胞分子生物学会大会 2010 年 9 月 3 日 仙台市
- ⑫ 永利麻衣（水上 元）植物イリドイド配糖化酵素における基質特異性制御部位の探索 第 28 回日本植物細胞分子生物学会大会 2010 年 9 月 2 日 仙台市
- ⑬ 水谷優希（水上 元）In situ UDP-glucose 再生系の存在下での二次代謝糖転移酵素の機能解析 第 28 回日本植物細胞分子生物学会大会 2010 年 9 月 2 日 仙台市

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

[その他]

ホームページ等

<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/syg/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水上 元 (MIZUKAMI HAJIME)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：30128219