

## 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24年 5月25日現在

機関番号：23903  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2010～2011  
 課題番号：22710218  
 研究課題名（和文） 植物の二次代謝産物配糖体生成に関わる糖鎖伸長酵素の分子基盤の解明  
 研究課題名（英文） Characterization of sugar-sugar glycosyltransferases involved in plant secondary metabolism.  
 研究代表者  
 寺坂 和祥（TERASAKA KAZUYOSHI）  
 名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教  
 研究者番号：60405214

研究成果の概要（和文）：天然で glucose 2 分子が  $\beta$ 1,6-結合した gentiobiose 糖鎖をもつ化合物を生合成する、アカネ科のクチナシおよびセリ科のハマボウフウを遺伝子源として利用し、糖鎖伸長活性を有する新規糖転移酵素遺伝子を 2 種単離した。これらの組換え酵素を用いて、糖転移活性を詳細に解析したところ、これらは糖鎖伸長活性のみを示すとともに高い基質特異性を有する糖転移酵素であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We isolated cDNA clones encoding novel sugar-sugar glucosyltransferases catalyzing 1,6-glucosylation from *Gardenia jasminoides* and *Glehnia littoralis* that produce gentiobioside compounds in planta. These recombinant proteins exhibited a unique glucosyl chain elongation activity forming gentiobioside.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：植物分子生物学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：植物二次代謝、低分子有機化合物配糖体、糖転移酵素

## 1. 研究開始当初の背景

植物は、多種多様な構造と活性を有する二次代謝産物を生合成し、それらを必要とする組織において蓄積する。これらの二次代謝産物は、色素や香料としての食品添加物、化粧品原料さらには医薬品原料やそのリード化合物として産業的にも応用されており、近年の化石燃料代替エネルギーの開発に伴う植物バイオマスへの注目とともに、その需要が高まっている。これらの二次代謝産物の多彩

な機能は、その構造の多様さに由来するものである。それは、基本骨格の多様性に加えて、水酸化、メチル化、配糖化（糖転移）などの多くの位置選択的な修飾反応が大きく寄与している。これらのうち特に配糖化は、植物由来の二次代謝糖転移酵素（Plant Secondary Product Glycosyltransferases, PSPGs）によって複雑な糖鎖構造を創出し、化合物の生理活性や物理化学的性質などを決定する最も重要なステップの一つである。

植物は、自らの生合成する化合物のみならず外来性の多種多様な低分子化合物に対して立体・位置選択的に糖転移できる糖転移酵素を多数有している。これらの糖転移酵素についてはこれまで多数の研究が行われてきたが、その大部分は基本骨格（アグリコン）に糖転移する酵素についてのものであり、配糖体の糖部分にさらに糖転移して、糖鎖伸長を行う酵素についての研究は非常に少なかった。さらに、糖鎖を伸長するという事は、低分子化合物配糖体に無限の構造的多様性を生み出し、薬理活性や物性などの機能性にも大きな変化を生じる可能性をもっていると考えられた。

これまで、申請者らは植物培養細胞を用いた低分子化合物配糖体生成の解析を行ってきた中で、ニチニチソウ培養細胞が curcumin や quercetin などの配糖体を生成する際に、glucose 分子を 2 分子  $\beta$ 1,6 結合で伸長した糖鎖を付加することを見出した。その酵素活性の検討と糖転移酵素遺伝子クローニングを行った結果、ニチニチソウ由来糖転移酵素 CaUGT3 (*Catharanthus roseus* UDP-glycosyl transferase 3) を発見し、特異な酵素活性を明らかにしてきた。

そこで、本研究において、CaUGT3 のような糖鎖伸長酵素が有している特徴的な酵素活性を担う分子基盤を明らかにすることで、糖鎖伸長酵素を利用した非天然型の有用低分子化合物配糖体の創製のための研究基盤を確立できると考えた。

## 2. 研究の目的

これまで、植物の二次代謝に関わる糖転移酵素の研究分野では、低分子化合物の基本骨格（アグリコン）に糖転移する酵素の単離、機能解析が中心に行われてきた。しかしながら、天然には複雑な糖鎖の付加された化合物が無数に存在することから、その糖転移反応を担う分子も同じく無数に存在すると考えられる。

そこで、本研究では糖鎖伸長型の糖転移酵素について、特徴的な糖鎖伸長活性を担うアミノ酸残基や、生成物の立体選択性を決定する機構などの未だ解明されていない分子基盤を明らかにし、さらに糖鎖伸長酵素を利用した、非天然型の有用低分子化合物配糖体の創製のための研究基盤を確立することを目的とした。具体的には以下の3項目について研究を実施することとした。

(1) 申請者らが単離した、glucose の  $\beta$ 1,6 結合を形成し gentiobiose 糖鎖を生成する糖転移酵素 CaUGT3 と同様の反応を触媒する分子を、さらにクチナシおよびハマボウフウとい

った別の植物種より単離、触媒機能を解析し、その基質特異性を明らかにする。

(2) アグリコンに直接糖転移する酵素の結晶構造を鋳型とした CaUGT3 のホモロジーモデリング解析より得られている、糖鎖伸長酵素に必須のアミノ酸残基の機能について、点変異導入酵素を作製し、酵素活性の変化により確認する。

(3) 糖鎖伸長酵素の活性発現の分子基盤を明らかにするため、CaUGT3 の結晶を作製し、X線結晶構造解析を行う。

## 3. 研究の方法

(1)  $\beta$ 1,6-結合を生成する糖鎖伸長酵素の新規分子種のクローニングと機能解析

天然で gentiobiose 糖鎖をもつ化合物を生合成することが知られている、アカネ科クチナシ (crocetin gentiobioside を生合成) およびセリ科のハマボウフウ (osthenol gentiobioside を生合成) を遺伝子源として利用し、糖鎖伸長酵素をクローニングした。

### ①糖鎖伸長酵素 cDNA のクローニング

すでに糖鎖伸長活性を確認しているクチナシおよびハマボウフウの培養細胞を植物材料として用いた。これらの植物材料から調製した cDNA から、植物二次代謝産物糖転移酵素に高度に保存された PSPG-box の配列に基づいた degenerate primer を用いた PCR を行い、上記領域を含む糖転移酵素 cDNA の 3' 末端側断片をできるだけ多数得た。これらの部分配列を分子系統学的に解析し、ごく少数であるが得られている糖鎖伸長酵素に近いグループに属するものを選んで、全長 cDNA の単離を行った。

### ②新規糖鎖伸長酵素の酵素化学的解析

クローニングした全長 cDNA を大腸菌発現系を用いて発現させ、組換え酵素の活性を測定し、目的の gentiobioside 糖鎖伸長活性を有しているかを確認した。続いて、組換え酵素を用いて基質特異性をはじめとするその触媒機能を解析した。

### (2) 結晶構造解析による糖鎖伸長酵素の触媒機構の解明

大腸菌で発現させた組換え糖鎖伸長酵素の大量発現と精製について検討した。まず、これまで CaUGT3 の酵素化学的性質を明らかにしてきた大腸菌ベクター・ホスト系を利用して、大量発現と精製を行った。N 末端側に His タグを付加していたので、本タグによる

アフィニティー精製を行った上で、発現量および精製度について SDS-PAGE により確認した。さらに、組換え糖鎖伸長酵素の発現や精製の安定性を向上させるため、タグの位置やプロモーターの異なるベクターも利用し、さらに発現させる宿主大腸菌についても検討した。

#### 4. 研究成果

(1) クチナシ由来 crocetin 配糖化酵素および crocetin 配糖体糖鎖伸長酵素の単離と機能解析

① アカネ科クチナシはその果実に crocin (crocetin gentiobioside) を蓄積する (図 1)。また、その培養細胞は crocetin 配糖化活性を有している。そこで、この培養細胞から調製した cDNA を用いて、植物二次代謝産物糖転移酵素に高度に保存された PSPG-box の配列に基づいた degenerate PCR および RACE PCR により糖転移酵素全長 cDNA を 15 種得た。

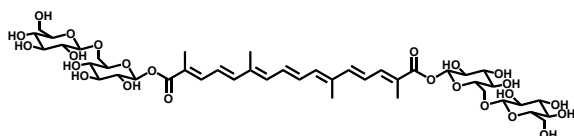


図1 Crocin (crocetin gentiobioside) の化学構造

② 単離した全長 cDNA を大腸菌発現系を用いて発現させた。得られた組換え酵素を用いて、まずアグリコンである crocetin に配糖化活性のある分子種のスクリーニングを行った。その結果、GjUGT1 (*Gardenia jasminoides* UDP-glycosyltransferase 1) および GjUGT14 に crocetin 配糖化活性を見出した。これらは、crocetin の両端のカルボキシル基を配糖化するものの、糖鎖伸長活性は有していなかった。また、カルボキシル基を有するフェニルプロパノイドのいくつかにも配糖化活性を示したが、crocetin に対して高い基質特異性を有していた。

③ GjUGT1 または GjUGT14 により生成される crocetin 配糖体の糖鎖を伸長する活性を有する分子種をスクリーニングするため、GjUGT1 による crocetin 配糖化反応の反応液に、さらに別の分子種の組換え酵素を添加して、糖鎖伸長活性を検出した。その結果、GjUGT9 に糖鎖伸長活性を見出した。GjUGT9 は、アグリコン (crocetin) には配糖化活性を示さず、crocetin 配糖体の糖鎖を伸長する活性のみを有していた。また、gentiobiose 以上の糖鎖伸長活性は示さなかった。さらに様々な配糖体に対する糖鎖伸長活性を検討した結果、crocetin 配糖体に対して高い基質

特異性を有していた。

④ 以上の 3 分子種についてクチナシ植物体における遺伝子発現を解析した。その結果、crocetin 蓄積器官において全ての分子種が発現していたことから、酵素活性の結果も考え合わせると、これらの糖転移酵素が植物体において、crocetin 生合成に関与していると考えられた。

⑤ これらの結果から、これまで未知であったクチナシにおける crocetin 生合成の配糖化ステップの全容を初めて明らかにした。さらに 3 種の糖転移酵素の配列情報から予測される酵素の細胞内局在から、配糖化段階における crocetin および crocetin 配糖体の細胞内局在を推定することができた。すなわち、crocetin の生成と GjUGT1, 14 による配糖化は色素体で行われ、その後、細胞質に移行し、糖鎖伸長が行われると推定された。

⑥ Crocetin は zeaxanthin の酸化開裂により生成するとされており、その酸化開裂酵素も単離されている。さらに、微生物のカロテノイド生合成研究から zeaxanthin 産生大腸菌株も確立されている。本研究で単離した糖転移酵素とこれらの材料を組み合わせることで、合成生物学的手法による crocin の生産が可能になると考えられ、強い着色性と高い水溶性から天然色素としての需要も高い crocin の供給に貢献できると考えられる。

(2) ハマボウフウ由来 osthenol 配糖化酵素および osthenol 配糖体糖鎖伸長酵素の単離と機能解析

① セリ科のハマボウフウは地下茎および根に osthenol gentiobioside を蓄積する (図 2)。そこで、クチナシと同様の方法で糖転移酵素遺伝子の網羅的取得を行い、4 種の全長 cDNA を得た。

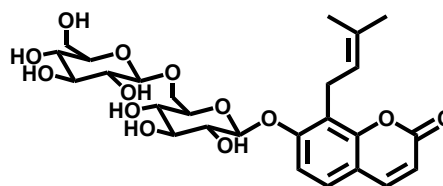


図2 Osthenol gentiobioside の化学構造

② クチナシから単離した cDNA と同様に大腸菌発現系により作製した組換え酵素とアグリコンの osthenol を用いて、まず osthenol 配糖化活性を有する分子種をスクリーニングした。その結果、GIUGT4 (*Glehnia littoralis* UDP-glycosyltransferase 4) に osthenol 配糖化活性を見出した。GIUGT4 は、

osthenol の水酸基を配糖化するものの、糖鎖伸長活性は示さなかった。また、水酸化されたクマリン類やフラボノイドの水酸基に対しても配糖化活性を示したが、osthenol に対して高い基質特異性を有していた。

③GLUGT4 によって生成される osthenol 配糖体の糖鎖を伸長する分子種をクチナシの場合と同様に組換え酵素を混合することでスクリーニングした。その結果、GLUGT1 に osthenol 配糖体糖鎖伸長活性を見出した。基質特異性については現在検討中であるが、GLUGT1,4 とともにハマボウフウ植物体における osthenol gentiobioside 蓄積器官で発現していたことから、植物体での osthenol gentiobioside 生合成に関与していると考えられる。

④Osthenol gentiobioside は天然では数少ないプレニル基と糖鎖によって修飾された化合物であり、これらの結果から、新しい基質特異性を有する糖転移酵素のメンバーを得ることができた。

#### (3)組換え糖鎖伸長酵素発現系の検討

本研究で糖鎖伸長活性を見出した GjUGT9 を用いて、組換え酵素の発現について様々な大腸菌発現用ベクターおよび大腸菌株を検討した。最初に組換え酵素精製に必要な His タグの位置について N 末端・C 末端の両方で検討したところ、N 末端に His タグ付加した場合において安定した発現が確認できた。また発現ホストとして金属結合タンパク質の割合を減少させた大腸菌株で His タグ精製に改善がみられた。今後、この条件で大量発現と精製を行っていく予定である。

(4)本研究で得られた結果は、植物の二次代謝産物の中でも大きなグループを形成している配糖体の中で有用であるものの、これまで未知であった crocin や osthenol gentiobioside の生合成経路の解明に寄与するものである。さらには今後、合成生物学的手法による有用化合物生産への基盤となるものであると考えられる。また、今回新たに単離した gentiobiose 糖鎖生成活性を有する新規糖転移酵素 GjUGT9 や GLUGT1 の配列情報は、特徴的な糖鎖伸長活性の分子基盤の解明の手がかりとなるものである。

本研究により、植物のポストゲノム研究において多数見出されている、機能未知の糖転移酵素という遺伝子源と、天然物化学研究により単離されてきた多数の有用配糖体という化合物資源の一部を結びつけることが可能となった。今後、本研究で単離した糖鎖伸

長酵素の高い基質特異性を担う分子基盤を明らかにできれば、厳密な立体および糖鎖伸長の制御の実現につながると考えられる。

#### 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 2 件)

- ①Mai Nagatoshi, Kazuyoshi Terasaka, Miki Owaki, Makiko Sota, Tatsunori Inukai, Akito Nagatsu, Hajime Mizukami  
UGT75L6 and UGT94E5 mediate sequential glucosylation of crocetin to crocin in *Gardenia jasminoides*  
FEBS Letters、査読有、586 巻、2012、1055-1061、  
DOI: 10.1016/j.febslet.2012.03.003
- ②Mai Nagatoshi, Kazuyoshi Terasaka, Akito Nagatsu, Hajime Mizukami  
Iridoid-specific Glucosyltransferase from *Gardenia jasminoides*  
The Journal of Biological Chemistry、査読有、286 巻、2011、32866-32874、  
DOI: 10.1074/jbc.M111.242586

[学会発表] (計 4 件)

- ①永利麻衣、組換え酵素カクテルを用いた zeaxanthin から crocin の生産、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 29 日、北海道大学 (札幌市)
- ②岡本隼己、ハマボウフウ培養細胞由来クマリン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 (福岡) 大会、2011 年 9 月 8 日、九州大学 (福岡市)
- ③岡本隼己、ハマボウフウ培養細胞由来 coumarin 配糖化酵素のクローニングと機能解析、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 31 日、ツインメッセ静岡 (静岡市)
- ④寺坂和祥、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 (仙台) 大会、2010 年 9 月 3 日、東北大学雨宮キャンパス (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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺坂 和祥 (TERASAKA KAZUYOSHI)  
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号：60405214

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：