

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 23 年 6 月 1 日現在

機関番号：36102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710226

研究課題名（和文）ゼニゴケ油体テルペノイドの生合成酵素及び遺伝子の特徴付けと物質生産への利用

研究課題名（英文）Studies of terpene cyclases responsible for the biosynthesis of oil components in *Marchantia polymorpha* and their use to metabolic engineering system.

研究代表者

兼目裕充（KENMOKU HIROMICHI）

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号：10399438

研究成果の概要（和文）：ゼニゴケは増殖が速く、テルペノイド等の新油性化合物を大量に蓄積するという特徴を持つことから、医農薬やその原料を生産・蓄積させることのできる新たな植物工場として注目され始めている。本研究ではゼニゴケの親油性分の多くを占めるテルペノイドに着目し、その生合成酵素及び遺伝子の特徴を明らかにすると共に、これをゼニゴケにおける有用物質生産に利用することを目的とした。その中でも数種のセスキテルペンおよびジテルペン合成酵素遺伝子のクローニングに成功し、その機能解析・特徴付けでは興味深い知見を提供できた。

研究成果の概要（英文）：Liverwort *Marchantia polymorpha* is an attractive plant factory for genetic engineering and heterologous expression of transgenes responsible for the biosynthesis of hydrophobic compounds such as fine chemicals and pharmaceuticals. From the viewpoint of the controls of constituents in oil bodies in *M. polymorpha*, we planned to identify and analyze of terpene cyclases involved in production and accumulation of hydrophobic compounds. Our research has provided interesting information by characterization of sesquiterpene and diterpene cyclases from *M. polymorpha*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：複合新領域

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：ゼニゴケ、テルペノイド、環化酵素、油体、物質生産

1. 研究開始当初の背景

コケ植物のタイ類はツノゴケ類やセン類とは異なり、テルペノイド等の新油性化合物を大量に蓄積した油体と呼ばれる細胞内構造体または油体細胞を持つことや、生活史の大半を半数体世代で過ごすことが特徴である。特

にゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) はタイ類のなかでも増殖が速く、1細胞に由来する個体を無性芽から容易に分離できることや、最近ではアグロバクテリアによる外来遺伝子導入方法が開発されたことから、正遺伝学の材料としてのモデル生物のみならず、医農薬や

その原料を生産・蓄積させるための植物工場として注目され始めている。高等植物において、テルペノイドを生合成する酵素群は細胞内オルガネラに分散・局在しており、多様な炭素骨格を形成するテルペン環化酵素については、モノテルペン環化酵素およびジテルペン環化酵素がプラスチド（葉緑体）、セスキテルペン環化酵素およびトリテルペン環化酵素は細胞質に局在することが知られている。一方、タイ類のテルペノイド生合成経路には多様性があり、ゼニゴケを含む一部のタイ類の油体ではテルペノイドの蓄積のみならず生産も行われ、MEP経路とメバロン酸経路間の大規模な物質のクロストークが存在する可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

これまでの国内外の諸研究から、高等植物のジテルペン環化酵素が移行配列によってプラスチドに局在するように、タイ類の油体に局在するような移行配列を発見できる可能性が高いと考え、ゼニゴケが有するテルペノイド生合成酵素に着目した。ゼニゴケを植物工場として効率的に利用するためには、ゼニゴケ油体成分の生産制御や物質生産に関わる外来導入遺伝子産物を効果的に油体に局在させる技術の開発が重要であると考えた。これを踏まえ、本研究ではゼニゴケ油体の主要な成分であるテルペノイドの生合成を司る酵素の機能解析および当該酵素群の器官・細胞内局在を主とする制御機構の実証と解明を目的として、以下の研究を計画した。

- (1) 化合物の取り込み実験によるゼニゴケテルペノイドの生合成経路の検証
- (2) ゼニゴケテルペン環化酵素の機能解析（環化産物の同定）
- (3) テルペン環化酵素のゼニゴケ細胞内での局在の解析

3. 研究の方法

(1) 化合物の取り込み実験によるゼニゴケテルペノイドの生合成経路の検証

高等植物の培養細胞では生合成・代謝系の混乱がしばしば生じることがあり、コケ植物のタイ類でこれまで報告されてきたメバロン酸経路およびMEP経路の寄与がどれ程あるのかについては、そのような混乱によるものである懸念もある。従って、他のタイ類での結果との比較のために、ゼニゴケがカルス状培養細胞となる糖高濃度培地での $[1-^{13}\text{C}]$ -グルコースの取り込み実験を行う一方で、葉状体を保ったまま培養できる糖低濃度液体培地に

において、メバロン酸経路を経る代謝産物を特異的に標識できる阻害剤メバスタチンと標識基質 $[2-^{13}\text{C}]$ -メバロノラクトン、およびMEP経路を特異的に標識できる阻害剤5-ケトクロマゾンと標識基質 $[1-^{13}\text{C}]$ -1-デオキシ-D-キシロースをそれぞれ用いた取り込み実験を行う。得られるセスキテルペノイド、コパロールおよびフィトール（ジテルペノイド）およびステイグマステロール（トリテルペノイド）の標識パターンをGC-MS分析によって評価する。

(2) ゼニゴケテルペン環化酵素の機能解析（環化産物の同定）

公開データベース上の約4万件のゼニゴケESTデータについてアセンブルおよびBLASTによるアノテーションを行って得た4種のセスキテルペン環化酵素様遺伝子（MpSTS1~4）、3種のジテルペン環化酵素様遺伝子（MpDTS1~3）および1種のトリテルペン環化酵素様遺伝子（MpTTS1）について候補断片配列が得られたことから、RACE実験により、これらの全長配列を確定すると共に、GST（グルタチオンS-トランスフェラーゼ）等との融合タンパク質として大腸菌で発現させ、アフィニティカラムで精製した酵素として、それぞれFDPおよびGGDP等を基質とした環化産物を同定する。

(3) テルペン環化酵素のゼニゴケ細胞内での局在の解析

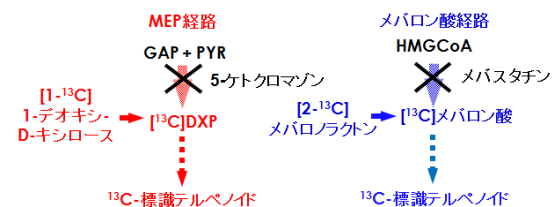
タイ類の油体は高等植物種子の油体と根本的に異なっており、ERに由来する一重膜で構成されている。(1)および(2)で油体へ局在するテルペン環化酵素が示唆された場合は、その油体移行配列の特定を検討する。その際には、移行配列前後をGFP（緑色蛍光蛋白質）や外来テルペン環化酵素、具体的には真菌由来サンダラコピマラジエン合成酵素（日本農芸化学会 広島, 2004）に置き換えて導入するモデル実験を行う。

4. 研究成果

(1) 化合物の取り込み実験によるゼニゴケテルペノイドの生合成経路の検証

ゼニゴケにおいて生産・蓄積されるテルペノイドのイソプレレン単位の由来に、メバロン酸経路およびMEP経路の寄与がどれ程あるのかについては全く研究されていないことから、まず、ゼニゴケがカルス状培養細胞となる糖高濃度培地、および葉状体を保ったまま培養できる糖低濃度液体培地での $[1-^{13}\text{C}]$ -グルコースの取り込み実験を行った。明期：暗期 16:8 の条件下、両培地で得た植物体において、セスキテルペノイド、コパロールおよびフィトール（ジテルペノイド）およびステイグマステロール（トリテルペノイド）のう

ち、セスキテルペノイド、フィトール、ステイグマステロールを検出できた。糖低濃度液体培地での標識グルコースの取り込み率は低いものの、セスキテルペノイドおよびステイグマステロールは標識グルコースの解糖から生じた 2-¹³C アセチル CoA からメバロン酸経路を経て生合成されることが示唆された。また、フィトールについては MEP 経路から生合成されていることが示唆され、高等植物と同様であることが示された。糖低濃度液体培地において、メバロン酸経路を経る代謝産物を特異的に標識できる阻害剤メバスタチンと標識基質 [2-¹³C]-メバロノラクトンによる標識実験を行ったところ、明瞭にセスキテルペノイドとステイグマステロールへの高い取り込みが見られ、フィトールについてはほとんど標識が見られなかったことから、支持される結果となった。現在、糖低濃度液体培地において、MEP 経路を特異的に標識できる阻害剤 5-ケトクロマゾンと標識基質 [1-¹³C]-1-デオキシ-D-キシロースを用いた取り込み実験を検討している。



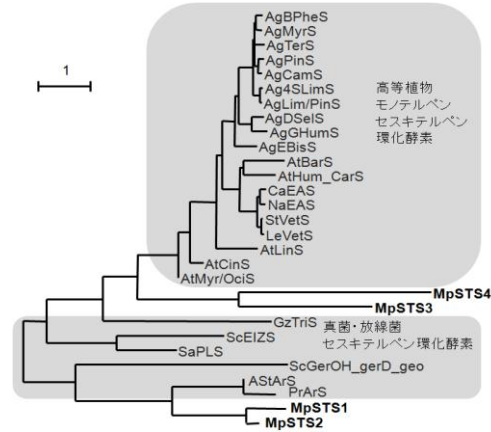
一方の糖高濃度培地におけるカルス状培養細胞においては、標識グルコースの取り込み率が高いものの、特にフィトールにおいてはバッチごとに取り込み様式のバラつきが見られ、主に MEP 経路を経た標識に近い結果が得られたが、アルコール側のイソプレン単位がメバロン酸経路を経て標識される傾向が強くなること示された。これらの結果から、糖高濃度培地におけるゼニゴケのカルス状培養細胞では、高等植物と同様に生合成・代謝系の混乱が生じていることが示唆された。

(2) ゼニゴケテルペン環化酵素の機能解析 (環化産物の同定)

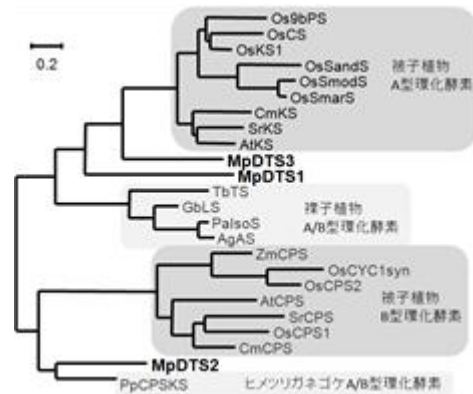
公開データベース上の約 4 万件のゼニゴケ EST データについてアセンブル約 5000 の Contig 配列を得た。これらの BLAST によるアノテーションを行って得た 4 種のセスキテルペン環化酵素様遺伝子 (MpSTS1~4)、3 種のジテルペン環化酵素様遺伝子 (MpDTS1~3) および 1 種のトリテルペン環化酵素様遺伝子 (MpTTS1) について、RACE 実験により全長配列を得た。また、これらの配列を基に作製した遺伝子特異的プライマーを用いて、ゲノムに当該遺伝子群が存在していることを確認できた。

セスキテルペン環化酵素様遺伝子 MpSTS1~4 を機能が明らかとなっている高等植物由

来モノテルペンおよびセスキテルペン環化酵素、真菌または放線菌由来のセスキテルペン環化酵素と進化系統樹解析を行った所、MpSTS3 および MpSTS4 は高等植物由来環化酵素と真菌・放線菌由来環化酵素との間に位置し、MpSTS1 および MpSTS2 は真菌・放線菌由来環化酵素に近い結果となった。

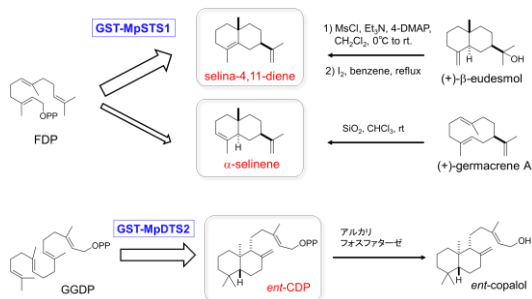


また、ジテルペン環化酵素様遺伝子 MpDTS1 および MpDTS3 については進化系統樹解析において被子植物のコパリルニリン酸から *ent*-カウレンへの合成を触媒する A 型酵素群と裸子植物由来 A/B 型環化酵素群との間に位置した。MpDTS2 は、GGDP から *ent*-カウレンを一挙に合成する蕨類ヒメツリガネゴケのジテルペン環化酵素 (PpCPS/KS) と共にコパリルニリン酸を合成する B 型環化酵素群に近い結果となった。



4 種のセスキテルペン環化酵素様遺伝子 (MpSTS1~4) および 3 種のジテルペン環化酵素様遺伝子 (MpDTS1~3) を GST(グルタチオン S-トランスフェラーゼ)との融合タンパク質として大腸菌で発現させ、アフィニティカラムで精製した酵素として、それぞれ FDP および GGDP 等を基質とした環化産物の同定を試みたところ、MpSTS1 は 2 種類のセスキテルペン炭化水素、MpDTS2 はコパリルジリン酸をそれぞれ生成する酵素であることが明らかとなった。MpDTS2 はヒメツリガネゴケの *ent*-カウレン合成酵素 (PpCPS/KS) と高い相

動性を示しことから、同様のキメラ型二機能性酵素と想定していたが、機能的にはコパリルニリン酸を合成する B 型環化酵素であった。



一方で、他の 5 種類のテルペン環化酵素については、それぞれ発現大腸菌の培養条件等を検討したが、発現量が極端に少ないか、インクルージョンボディとなり、満足な量のリコンビナント酵素を回収するには至らなかった。新たに宿主大腸菌の検討や His-Trx および His-Nus タグ等を用いた可溶化の検討を行ったところ、MpSTS2~4 および MpDTS1 については小スケールにおいて可溶化に目途がついたが、アフィニティカラム精製が機能せず、精製リコンビナント酵素を得るに至っていない。このため、大腸菌内で FDP または GGDP を大量に供給することで、環化産物を直接得ることができる発現系を用いた機能解析に切り替えて、それぞれの環化産物同定の検討を進めている。

(3) テルペン環化酵素のゼニゴケ細胞内での局在の解析

(1) の結果から葉状体ゼニゴケにおけるセスキテルペノイドの生産はメバロン酸経路、ジテルペノイドの生産は MEP 経路を経ることが示された。従って高等植物と同様に細胞質でセスキテルペン、プラスチドでジテルペンが生産されると考えられる。そこで、外来導入酵素遺伝子を効果的に発現させて、酵素反応産物を効率よく得るために、以下のモデル実験を行った。シロイヌナズナにおいて、細胞質またはプラスチドに導入遺伝子産物が局在することが確認できている真菌由来サンダラコピマラジエン合成酵素 (NcSS: 日本農芸化学会 広島, 2004) 遺伝子を組み込んだプラスミドをアグロバクテリウムを用いてゼニゴケに導入した。両プラスミドコンストラクトには NcSS の C 末端に GFP (緑色蛍光蛋白質) 配列を付加してあり、細胞内局在を観察できる。また、プラスチド局在用のプラスミドコンストラクトには NcSS の N 末端側にシロイヌナズナ由来の色素体移行シグナル配列を付加してある。再生した導入植物体は生産量の個体差が大きいものの、両コンストラクトともサンダラコピマラジエンの生産を確認できたが、GFP 蛍光は細胞質および

プラスチドの双方で検出され、シロイヌナズナ由来の色素体移行シグナル配列があまり機能していないことが窺えた。これを踏まえ、現在、機能を明らかにすることができたゼニゴケ由来セスキテルペン環化酵素遺伝子 MpSTS1 およびジテルペン環化酵素遺伝子 MpDTS2 の C 末端側に GFP 配列を付加したコンストラクトを作成し、発現したそれぞれの酵素の細胞内局在を検証すると共に、ゼニゴケ由来の各移行配列の同定を進めている。

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)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 兼目裕充, 高橋宏暢, 江角朋之, 野路征昭, 豊田 正夫, 浅川義範: ゼニゴケ油体構成テルペノイドの生成に関わる酵素遺伝子の同定と機能解析 II. 日本薬学会第 131 年会, 静岡, 2011 年 3 月 (震災により登録のみ、学会は成立)
- ② 白木ひとみ, 兼目裕充, 大久保翔, 豊田正夫, 浅川義範: モデル真菌 *Aspergillus nidulans* におけるジテルペン合成キメラ型酵素の機能解析. 日本薬学会第 131 年会, 静岡, 2011 年 3 月 (震災により登録のみ、学会は成立)
- ③ 竹上沙也加, 兼目裕充, 多田博幸, 佐々武史, 豊田正夫, 浅川義範: 14-3-3 タンパク制御物質の探索と生産性向上. 日本薬学会第 131 年会, 静岡, 2011 年 3 月 (震災により登録のみ、学会は成立)
- ④ 兼目裕充, 高橋宏暢, 江角朋之, 野路征昭, 豊田 正夫, 浅川義範: ゼニゴケ油体構成テルペノイドの生成に関わる酵素遺伝子の同定と機能解析. 戦略的研究基盤形成支援事業第 1 回研究発表会, 徳島, 2010 年 12 月 21 日
- ⑤ 三沢典彦, 原田尚志, 藤澤雅樹, 兼目裕充, 水谷悟: ショウガ由来の新規セスキテルペン合成酵素の構造と機能解析. 第 28 回日本植物細胞分子生物学会, 仙台, 2010 年 9 月 3 日
- ⑥ 兼目裕充, 高橋宏暢, 江角朋之, 野路征昭, 豊田正夫, 浅川義範: ゼニゴケ油体構成テルペノイドの生成に関わる酵素遺伝子の同定と機能解析. 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010 年 3 月 29 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兼目裕充 (KENMOKU HIROMICHI)

徳島文理大学薬学部助教

研究者番号: 10399438