

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780104

研究課題名(和文)ヨモギ属植物におけるセスキテルペノイド構造多様化の分子機構解明と代謝工学への利用

研究課題名(英文)Molecular basis for the structural diversity of sesquiterpenoids in the genus *Artemisia*

研究代表者

関 光 (SEKI, HIKARU)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30392004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：多様なセスキテルペノイドを生産するヨモギ属植物に着目し、その生合成に関わるセスキテルペン合成酵素およびセスキテルペン骨格の修飾に関わるP450酸化酵素の単離と機能解析を進めた。これにより、新規セスキテルペン合成酵素遺伝子として、*-*ビザボロール合成酵素遺伝子を単離した。また、*Artemisia annua*からアルテミシニン生合成酵素遺伝子として単離されていたCYP71AV1のホモログをアルテミシニン非産生植物から単離し各種セスキテルペン骨格に対する酵素活性を解析した。その結果、*A. afra*由来のホモログが *-*グアイエン に対して酸化活性をもつことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：*Artemisia* species are small herbs composing one of the largest and most widely distributed genera of the family Compositae. More than 250 species are known from the genus *Artemisia* and they produce various sesquiterpenoids. Sesquiterpenoids are a group of plant specialized (secondary) metabolites derived from a common precursor, farnesyl diphosphate (FDP) that consists of three C5 isoprene units. Sesquiterpenoids have been shown various pharmacological and/or biological activities. The most studied *Artemisia* species is *Artemisia annua* that produces artemisinin, a sesquiterpene lactone which provides the basis for effective treatments of malaria. Intriguingly, artemisinin is only produced by *A. annua*. Therefore it is important to reveal factors determining the artemisinin biosynthetic capability in *Artemisia* species.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：セスキテルペノイド ヨモギ属植物 セスキテルペン合成酵素 シトクロムP450モノオキシゲナーゼ 組換え酵母

1. 研究開始当初の背景

構造多様性に富む植物セスキテルペノイドは、潜在的医薬品資源としての価値が大きい化合物群として注目されている。約 250 種を超えるヨモギ属植物 (*Artemisia*) は、多様な有用セスキテルペノイドを生産することが知られている。なかでも、漢方原料として古くから利用されてきたアジア原産種である *Artemisia annua* (クソニンジン) が「特異的」に生産するアルテミシニン¹は現在最も重要な抗マalaria薬原料となっている。

セスキテルペノイドの構造多様化には、炭素数 15 の共通前駆物質であるファルネシル二リン酸の環化を触媒し多様なセスキテルペン骨格を生成するセスキテルペン合成酵素と、部位特異的なセスキテルペン骨格の酸化修飾を触媒するシトクロム P450 酸化酵素 (CYP) が大きな役割を果たしている。

クソニンジンのアルテミシニンについては、本研究開始時までに欧米を中心にその生合成研究が精力的に進められ、その生合成に必須のセスキテルペン合成酵素であるアモルファジエン合成酵素 (ADS) およびアモルファジエンの 12 位炭素原子に対する 3 段階の連続的な酸化反応を触媒しアルテミシニン酸を生成する CYP71AV1 (CYP の一種) をコードする遺伝子が単離されていた。一方、クソニンジン以外のヨモギ属植物種に関しては、アルテミシニンおよびその生合成中間体の生産の有無を確定する精密化学分析、ならびにそれと平行した形でのアルテミシニン生合成遺伝子およびそれらの発現の有無を明確にしようとする分子生物学・生化学的な研究はなされていなかった。

2. 研究の目的

潜在的医薬品資源として重要な化合物群であるヨモギ属植物由来セスキテルペノイドの構造および蓄積プロファイルの多様性に着目し、1) その多様性創出の分子機構を、セスキテルペン合成酵素およびセスキテルペン骨格の酸化修飾に関わる P450 酸化酵素遺伝子の構造、発現、および酵素機能の同属種間比較を通して理解するとともに、2) ヨモギ属から得られた各種セスキテルペン合成酵素と P450 の機能バリエーションを「様々な組み合わせ」で酵母に導入し、「多様な天然・非天然型セスキテルペノイドのコンビナトリアル生合成」に挑戦することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ADS 相同遺伝子の単離と酵素機能解析

13 種のヨモギ属植物 (いずれもアルテミシニン非産生種) から抽出したゲノム DNA を鋳型として、クソニンジンから単離されている ADS 遺伝子の配列を基に設計したプライマーを用いて PCR を行い、相同遺伝子の有無を調べた。相同遺伝子の存在が確認された植物種から RNA を抽出し RT-PCR を行うことにより

当該相同遺伝子の cDNA を単離、あるいは、RT-PCR により cDNA の増幅が得られなかった場合は代理プライミング法 (ゲノム断片を恒性的プロモーターの下流に連結したキメラ遺伝子を導入した形質転換植物から RNA を抽出し RT-PCR を行うことにより cDNA を得る方法) により、cDNA を得た。

得られた cDNA 断片を用いて ADS 相同遺伝子の酵母発現コンストラクトを作成し出芽酵母に導入した。得られた組換え酵母培養液の溶媒抽出物をガスクロマトグラフ-質量分析に供し、酵母内在のファルネシル二リン酸を基質として生成したセスキテルペンを分析し最終的に NMR による構造決定を行った。同時に、大腸菌発現系を用いて発現・精製した各 ADS ホモログタンパクのリコンビナントタンパクを用いたインビトロ酵素活性試験により酵素機能を解析した。

(2) CYP71AV1 相同遺伝子の単離と酵素機能解析

ADS 遺伝子の場合と同様に、13 種のヨモギ属植物 (いずれもアルテミシニン非産生種) から抽出したゲノム DNA を鋳型として、クソニンジンから単離されている CYP71AV1 遺伝子の配列を基に設計したプライマーを用いて PCR を行い、相同遺伝子の有無を調べた。相同遺伝子の存在が確認された植物種から RNA を抽出し RT-PCR を行うことにより当該相同遺伝子の cDNA を単離し酵素機能解析に使用した。

クソニンジン ADS を導入することにより内在基質 (ファルネシル二リン酸) からアモルファジエンをインビボ生産するように改変した組換え酵母に、各 CYP71AV1 バリエーションの発現コンストラクトを追加導入することにより、アモルファジエンに対する反応性を解析した。クソニンジン CYP71AV1 とアルテミシニン非産生種由来の CYP71AV1 バリエーションタンパクの 2 種では異なる反応特異性を示したことから、これらのアミノ酸配列比較ならびにホモロジーモデリングにより CYP71AV1 の反応生成物特異性決定に重要と推測されるアミノ酸残基を推定し、部位特異的なアミノ酸変異の導入ならびに酵素機能解析を行い反応生成物の組成に及ぼす効果を解析した。

同時に、ADS 以外のセスキテルペン合成酵素遺伝子を導入した組換え酵母も作出し、同様の手法を用いて CYP71AV1 バリエーションタンパクの各種セスキテルペンに対する反応性を解析した。

4. 研究成果

(1) ADS 相同遺伝子の単離と酵素機能解析

13 種のアルテミシニン非産生ヨモギ属植物種から抽出したゲノム DNA を用いた PCR により、3 種のアルテミシニン非産生種 (ミブヨモギ、クラムヨモギ、ニガヨモギ) が ADS

相同遺伝子を有することを明らかにした。増幅したゲノム断片の塩基配列を決定した結果、これらの ADS 相同遺伝子はクソニンジン ADS に対して 83%~90% のアミノ酸配列同一性を示すホモログタンパク質をコードしていることが判明した。

上記 3 種のアルテミシニン非産生種の葉から RNA を調製し RT-PCR による cDNA 単離を試みた。その結果、ミブヨモギについては全長タンパクをコードしている cDNA 断片を単離することができた。一方、クラムヨモギおよびニガヨモギについては cDNA 断片の増幅が見られなかった。そこで、サロゲート(代理)スプライシング法による cDNA の獲得を試みた。カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター下流にクラムヨモギおよびニガヨモギ由来 ADS 相同遺伝子ゲノム断片を連結したキメラ遺伝子をシロイヌナズナに導入した。得られた形質転換個体から RNA を調製し RT-PCR を行った結果、推定されるイントロンが完全に除去された全長 cDNA を得ることに成功した。

上記実験により得られた cDNA 断片を用いて ADS ホモログタンパクの酵素機能解析を行った。大腸菌発現系を用いて作成したリコンビナントタンパクを用いたインビトロ酵素活性試験の結果、ミブヨモギおよびクラムヨモギ由来の ADS ホモログタンパク質はアモルファジエンを生成せず、 β -ビザボロールを主生成物として与えることを明らかにした。また、セスキテルペン合成酵素の基質であるファルネシル二リン酸を高生産するように改変した組換え酵母に上記 ADS ホモログ遺伝子を導入したところ、酵母培養液の溶媒抽出物から β -ビザボロールを検出した。以上の結果から、ミブヨモギおよびクラムヨモギ由来の ADS ホモログタンパク質は β -ビザボロール合成酵素として機能することを明らかにした。同様の実験をニガヨモギ由来の ADS ホモログタンパク質についても行った。その結果、ニガヨモギ由来 ADS ホモログタンパク質はアモルファジエンおよび β -ビザボロールを副生成物として与えるものの、現在のところ構造未確定のセスキテルペンを主生成物として与えることを明らかにした。以上、ADS とそのホモログタンパク質のアミノ酸配列比較ならびに酵素機能比較により、ADS の生成物特異性決定に特に重要と考えられるアミノ酸残基を推定することに成功した。

(2) CYP71AV1 相同遺伝子の単離と酵素機能解析

13 種のアルテミシニン非産生ヨモギ属植物種から抽出したゲノム DNA を用いた PCR により、12 種のアルテミシニン非産生種が CYP71AV1 相同遺伝子を有することを明らかにした。さらに、RT-PCR により、クソニンジン CYP71AV1 に対して 94% 以上のアミノ酸配列同一性を示す CYP71AV1 バリエーションタンパクをコードしている cDNA をアルテミシア・ア

フラおよびニガヨモギから単離した。これらバリエーションタンパクのアモルファジエンに対する酵素活性を解析した。その結果、クソニンジン CYP71AV1 はアモルファジエンの 12 位炭素原子に対する 3 段階の連続的な酸化反応を速やかに触媒し、アルテミシニックアルコール、アルテミシニックアルデヒドを経てアルテミシニン酸を生成するのに対して、アルテミシア・アフラおよびニガヨモギの CYP71AV1 バリエーションタンパクは、アルテミシニックアルコールからアルテミシニックアルデヒドへの変換効率が低いためにアルテミシニックアルコールを主生成物として与えると同時に、現段階では構造未確定(12 位以外の位置が水酸基されたと推測される)のアルテミシニックアルコールのアイソマーを副生成物として与えることを見出した。そこで、CYP71AV1 とそのバリエーションタンパクの間で異なる 23 箇所のアミノ酸残基に注目し、ドメインスワッピングならびに部位特異的なアミノ酸置換導入を行い、上記の反応特異性の違いを決定づけるアミノ酸残基の特定を試みた。その結果、CYP71AV1 の 479 番目のセリン残基がアルテミシニックアルコールからアルテミシニックアルデヒドおよびアルテミシニン酸への変換に特に重要であることを明らかにした。この成果を、FEBS Letters 誌において発表した。

また、アルテミシア・アフラについては、ADS 以外の数種のセスキテルペン合成酵素遺伝子と組み合わせて酵母に導入することにより、現在のところ構造未確定の β -グアイエンおよびゲルマクレン酸化物を生成することを見出した。

最後に、本研究において解析対象としたミブヨモギおよびクラムヨモギは日本新薬株式会社山科植物資料館から分与頂いた。アルテミシア・アフラはプレトリア大学(南アフリカ共和国)から分与頂いた。

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)

- 1) 福島エリオデット、關 光、村中俊哉、植物テルペノイド代謝の多様性とコンビナトリアル生合成、生物工学会誌、査読無、91 巻、2013、337-341
- 2) Komori, A., Suzuki, M., Seki, H., Nishizawa, T., Meyer, J.J., Shimizu, H., Yokoyama, S. and Muranaka, T.: Comparative functional analysis of CYP71AV1 natural variants reveals an important residue for the successive oxidation of amorpho-4,11-diene. *FEBS Letters*, 査読有, 587, 2013, 278-284

〔学会発表〕(計5件)

- 1) Muangphrom, P., Suzuki, M., Seki, H., Komori, A., Fukushima, E. O. and Muranaka, T.: Functional analysis of double bond reductase 2 (DBR2) in *Artemisia absinthium*. 第55回日本植物生理学会大会(2014年3月18日、富山大学)
- 2) 西脇美香、關光、鈴木宗典、小森 彩、村中俊哉: ヨモギ属植物種由来新規-bisabolol 合成酵素遺伝子の同定、第65回日本生物工学会大会(2012年10月24日、神戸国際会議場)
- 3) 西脇美香、關光、鈴木宗典、小森 彩、村中俊哉: アルテミシニン非産生ヨモギ属植物種由来 ADS 相同遺伝子の構造、発現および酵素機能の解析、第59回日本生薬学会年会(2012年9月17日、千葉、かずさアーク)
- 4) 西脇美香、關光、鈴木宗典、小森 彩、村中俊哉: アルテミシニン非産生ヨモギ属植物種由来 ADS 相同遺伝子の構造、発現および酵素機能の解析、第30回日本植物細胞分子生物学会大会(2012年8月4日、奈良先端科学技術大学院大学)
- 5) 小森 彩、關光、鈴木宗典、西澤具子、横山茂之、村中俊哉: 相同性タンパク質を用いた CYP71AV1 の比較機能解析、第29回日本植物細胞分子生物学会大会(2011年9月8日、九州大学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

關 光 (SEKI, Hikaru)
大阪大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 30392004