

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06729

研究課題名(和文)スコパリアが産生する四環性ジテルペン骨格のダイバーシティを制御する分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism that regulates the diversity of the tetracyclic diterpene skeleton produced by *Scoparia dulcis*

研究代表者

山村 良美 (Yamamura, Yoshimi)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・助教

研究者番号：30464027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々が新規に取得した環化酵素SdCPS2 (syn-copalyl diphosphate synthase) は、528番目のチロシン残基が活性に大きく寄与していることを明らかにした。次に、SdKSL1はsyn-CDPを基質とし、scopadulane骨格を有するscopadula-13-*-ol*を生合成する新規環化酵素であることも示した。さらに、scopadula-13-*-ol*の水酸化反応に関与しているP450候補遺伝子を7つクローニングした。今回得られた情報は、植物が産生するラブダン関連ジテルペンの骨格多様性のメカニズムの解明に大きく寄与するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的な特色は、大腸菌のもつ一次代謝産物(IPP)を利用して、大腸菌内にジテルペン生合成酵素群を共導入させ、目的ジテルペンの*in vivo*生合成システムを構築し、目的の酵素の機能を解析する、という点にある。この手法は基質の生合成すなわち新たな標準物質の供給も可能にするものである。この手法により、これまで解析が困難と思われた酵素反応を大腸菌内で行い、培養液の成分を分析することで、その酵素の機能を特定することができる。このような手法を介して植物の持つ機能を全面的に利用することができれば、新たな有用物質生産や新規創薬シーズの開発への波及効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：It was clarified that the Tyr528 clearly contributes to the stability of the carbocation intermediate in the novel cyclization enzyme SdCPS2 (syn-copalyl diphosphate synthase). Next, we showed that SdKSL1 is a novel cyclizing enzyme that biosynthesizes scopadula-13-*-ol*, which has a scopadulane skeleton characteristic of SDB. Finally, we found seven P450 candidate genes involved in the desired hydroxylation of scopadula-13-*-ol*. This information obtained in this study greatly contributes to the elucidation of the mechanism of skeletal diversity of labdane-related diterpenes produced by plants.

研究分野：天然物化学

キーワード：植物二次代謝 ジテルペン 環化酵素 チトクロームP450 有用物質生産

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

Scoparia dulcis (スコパリア)は、主に葉で四環性ジテルペン類である scopadulcic acid B (SDB) や scopadulciol を産生する。これらの四環性ジテルペン類は、ウィルス感染症や癌、骨粗鬆症などに有効である。四環性ジテルペン類は、そのユニークな構造と多彩な生物活性から相次いで全合成のターゲットとされたが、現在のところ、ラセミ体しか得られていない。SDB などの四環性ジテルペン類は、全てその共通中間体であるゲラニルゲラニルニリン酸 (GGDP) からコパリルニリン酸 (*syn*-CDP または *ent*-CDP) を経て合成される。最終産物である SDB 誘導体は、環化酵素 *syn*-CDP 合成酵素 (CPS) やそれに関連する特異的なチトクローム P450 (P450) により合成されると想定されている。一方、*ent*-kaurene を経て gibberellin に至る経路には、*ent*-CPS およびそれにリンクする特異的な P450 が関与していると考えられている。

我々の研究グループは、これまでに高等植物が同一細胞内で構造の異なる複数のジテルペン骨格を精密に作り分ける機構に関する研究に取り組んでいる。現在までに我々は、高等植物においてフラボノイドやアルカロイドなどの二次代謝に関与する酵素として知られている P450 が、スコパリアの SDB 生合成経路において、酸化または環化メカニズムに関与することを強く示唆する研究結果を得ている。すなわち、スコパリアをはじめとする、複数の四環性ジテルペン骨格を同一の細胞内で構築する植物において、それぞれの骨格を構築するための重要なステップは、環化酵素と複数の P450 が担っているものと推察される。一方、我々は、スコパリアのジテルペン化合物のうち *ent*-kaurene や gibberellin のジャスモン酸 (JA) 応答性は極めて低いことを認めている。加えて、我々は gibberellin 生合成関連酵素 (*ent*-CPS を含めた *ent*-kaurene 合成酵素 (KS) および P450) の全てを既にクローニングし、発現特性や触媒能等の機能解析を進めている。これに対して、同じジテルペン化合物でありながら SDB とその誘導体が、JA 刺激に応答した結果、葉での蓄積量が大きく増加することを見出している。また、その生合成に関わる遺伝子の発現も、顕著に上昇することを確認している。本研究では、これまでの成果を分子基盤として、ジテルペンの骨格形成に関わる P450 を同定・機能解析し、環化酵素と P450 が多彩な四環性ジテルペン骨格を植物細胞内でどのように作り分けているのかを分子レベルで解明する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「植物の二次代謝産物の生合成酵素を包括的に解析することによって、四環性ジテルペンの骨格形成のダイバーシティを制御する分子機構を解明すること」である。

3. 研究の方法

(1) 環化酵素 SdCPS2 の活性部位の解明

結晶構造が明らかにされている *ent*-CPS を鋳型とし、SdCPS2 の構造をホモロジーモデリング法によって予測する。このモデルに基質 GGPP をドッキングして活性部位を構成するアミノ酸残基の空間的な配置や役割について推察する。予測した *syn*-CPS の活性部位アミノ酸配列を CDP の異性体を生合成する環化酵素(+)-CPS、*ent*-CPS の配列と比較することによりそれぞれの CPS において保存されているアミノ酸残基を探索する。さらに、その活性部位を形成する触媒残基のアミノ酸を他のアミノ酸残基に置換した発現ベクターを作製する。作製した発現ベクターを GGPP 生産株に導入し GC-MS で生成物を分析する。以上の結果から SdCPS2 の基質認識能に必須のアミノ酸残基を特定する。

(2) SdKSL1 の機能解析

SDB 生合成機構における SdCPS2 酵素反応の次のステップである *syn*-CDP から scopadula-13-ol の反応に関与すると推定される kaurene synthase-like (SdKSL1) の機能解析に着手する。まず、単離した全長 SdKSL1 クローンのシグナルペプチド部位を TMHMM または SignalP で予測する。予測された領域を切断した ORF 部位を組み込んだ大腸菌発現ベクター (pET28) を作製する。続いて、このベクターを *syn*-CDP 生産大腸菌株 C41 に形質転換し、IPTG で発現を誘導した大腸菌培養液抽出物を GC-MS で分析する。反応生成物のピークが観察されたら、この反応生成物を NMR で解析し、構造決定を行う。

(3) 大腸菌のジテルペン生産 *in vivo* システムを用いた改変型 P450 の機能同定

我々の先行研究により得られたトランスクリプトーム解析の結果から標的としている水酸化反応に関与していると予測される P450 (CYP71 または CYP76 ファミリーである可能性が高い) の候補をピックアップする。候補となる P450 遺伝子の全長 cDNA クローンを単離し、メチルジャスモン酸刺激、ストレス処理等をした細胞を用いて、定量的リアルタイム PCR 法で遺伝子発現の変動を解析する。その解析の結果から SDB 生合成と相関性のあるものに焦点をあて、酵素の機能解析を進める。それらの P450 の N 末端を改変させた ORF 領域とスコパリアの NADPH-P450 reductase (CPR、当研究室で既に単離・解析済) を大腸菌用発現ベクターに組み込む。GGPP の上流の遺伝子 (具体的にはメバロン酸 (MVA) 生合成経路上の酵素遺伝子群)

を既存の大腸菌 *in vivo* システムに共導入することで、生産システムの効率的な効果が得られるかを検証する。この改良型の scopadula-13- β -ol 生産株に作製した P450/CPR 発現ベクターを導入し、発現を誘導した大腸菌から酵素反応生成物について GC-MS で分析する。

4. 研究成果

(1) N 末端葉緑体移行シグナルをプログラムで推測した位置の前後で切断した発現ベクターを作製した。これらのプラスミドを導入した大腸菌が生成したジテルペンを GC-MS で分析したところ、SdCPS2 はプログラム予測された 21 アミノ酸残基に加え、51 アミノ酸残基まで切断したもので同様の活性が認められた。しかしながら、81 および 111 アミノ酸残基切断したものは SdCPS2 活性が著しく減少していた。

次に結晶構造が明らかにされているシロイヌナズナ由来 *ent*-CPS (AtCPS, PDB: 3pya) を鋳型とし、SdCPS2 の構造をホモロジーモデリング法によって予測した。SdCPS2 はジテルペン合成酵素に共通する、および の 3 つのドメインから成ることが明らかとなった。N 末端側から順に、および ドメインを形成しており、活性中心とされる DXDD モチーフは、ドメインと ドメイン境界付近に位置していると推測された。このモデルに基質 GGPP をドッキングして活性部位を構成する 4 つのチロシン残基が環化反応に必要なアミノ酸残基であると推測した。さらに予測した *syn*-CPS の活性部位アミノ酸配列を CDP の異性体を生合成する環化酵素(+)-CPS、*ent*-CPS の配列と比較することにより、それぞれの CPS において反応に重要とされているアミノ酸残基に対応する位置を調べると、ほぼすべてのアミノ酸残基が基質近傍に位置していることがわかった。

次に、推測した SdCPS2 の活性部位を形成する 6 つの触媒残基 (F279、P340、Y347、Y386、C387 および Y528) を他のアミノ酸残基に置換した変異体を作製した。作製した SdCPS2 変異体を GGPP 生産大腸菌株に形質転換した。この組換え大腸菌を培養し、GC-MS で生成物を分析した。その結果、Y347F 及び Y528F 変異体において、*syn*-CDP に加え、*syn*-halima-5,13-dienyldiphosphate 及び terpenedienyl diphosphate の生成が確認された。この結果より SdCPS2 の酵素反応において、528 番目のチロシン残基がカルボカチオン中間体の安定性に大きく寄与していることが分かった。

(2) 既に単離した SdKSL1 の機能同定を行った。N 末端側の葉緑体移行シグナル配列を切断した SdKSL1 を組み込んだベクターを *syn*-CPP 産生組換え大腸菌に形質転換した。高栄養培地を用いて IPTG で誘導後、16°C、72 時間培養した。培養液をヘキサンで抽出し、抽出物を GC-MS で分析した。また、構造決定のため、大量培養後、反応生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、NMR で解析した。その結果、SdKSL1 は *syn*-CDP を基質とし、SDB に特徴的な scopadulane 骨格を有する scopadula-13- α -ol を生合成する酵素であることが分かった。

(3) 我々の先行研究により得られたトランスクリプトーム解析の結果から標的としている水酸化反応に関与していると予測される P450 (CYP71 または CYP76 ファミリー) の候補を 26 個ピックアップした。これらの候補遺伝子の配列からプライマーを設計し、定量的リアルタイム PCR 法で各遺伝子発現の器官特異性を解析した。その結果、SDB の蓄積器官である若葉に強く発現していた 7 つの P450 候補遺伝子を絞ることができた。次に、これらの遺伝子の全長 cDNA クローンを単離した。取得した cDNA には P450 に特有の 3 つのモチーフあり、N 末端のシグナルペプチドも特定できた。候補の SdCYP クローンのトランジットペプチドを削除した ORF を発現ベクターに組み込み、基質 (scopadula-13- α -ol) 産生大腸菌株に形質転換した。発現を誘導した大腸菌から酵素反応生成物について GC-MS で分析した。しかしながら、候補 SdCYP による scopadula-13- α -ol の代謝は確認されなかった。今後は、このシステムの反応・培養条件検討を行い、引き続き SdCYP の機能の解明を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamamura Yoshimi, Mabuchi Ayaka	4. 巻 61
2. 論文標題 Functional characterization of NADPH-cytochrome P450 reductase and cinnamic acid 4-hydroxylase encoding genes from <i>Scoparia dulcis</i> L.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Botanical Studies	6. 最初と最後の頁 6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40529-020-00284-4	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Yamada A, Yamamura Y, Lee JB
2. 発表標題 Identification of the P450 gene involved in scopadulane-type diterpene biosynthesis in <i>Scoparia dulcis</i>
3. 学会等名 6th TOYAMA-BASEL Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamamura Y and Lee JB
2. 発表標題 Identification of key genes involved in scopadulane-type diterpene biosynthesis in <i>Scoparia dulcis</i>
3. 学会等名 Plant Biology 2020 World Wide Summit (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kasai Y, Lee JB, Yamamura Y
2. 発表標題 Isolation and functional characterization of UDP-glucosyltransferases involved in the benzoxazinoid biosynthesis in <i>Scoparia dulcis</i>
3. 学会等名 Plant Biology 2020 World Wide Summit (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamamoto R, Yamamura Y, Lee JB
2. 発表標題 In vivo functional characterization of eight new terpene synthase genes from medicinal plant <i>Scoparia dulcis</i>
3. 学会等名 Plant Biology 2020 World Wide Summit (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 笠井優理亜, 倉岡孝好, 吾郷良輔, 李 貞範, 山村良美
2. 発表標題 薬用植物スコパリアのBenzoxazinoid生合成における糖転移酵素の解析
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石田和也, 山本 涼, 山村良美, 黒崎文也, 李 貞範
2. 発表標題 薬用植物スコパリア由来のテルペン合成酵素遺伝子群のin vivoにおける機能解析
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019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
研究協力者	李 貞範 (Lee Jung-Bum) (40332655)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・助教 (13201)	

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
---------	---------