

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780100

研究課題名 (和文) 組み換え酵母を用いたトリテルペノイドライブラリー創製研究

研究課題名 (英文) Combinatorial biosynthesis of plant triterpenoids in engineered yeasts

研究代表者

関 光 (SEKI HIKARU)

大阪大学・工学研究科・特任助教

研究者番号：30392004

研究成果の概要 (和文)：

植物界における代表的なトリテルペン骨格である β -amyrin、ルペオール、および α -amyrin をそれぞれ生成するオキドスクアレン環化酵素の遺伝子を複数の植物種から単離し、酵母に導入することにより、各トリテルペンを生産する組換え酵母を作出した。次に、マメ科を中心に複数の植物種から単離したトリテルペン酸化酵素 (P450) の遺伝子を、上記の各種トリテルペン生産酵母において様々な組み合わせで発現させることにより、植物体中においては存在量の低いトリテルペノイドを生産することに成功した。

研究成果の概要 (英文)

Triterpenoids, with increasing evidence of their health beneficial properties, is a diverse group of secondary metabolites. Cytochrome P450 monooxygenases (P450s) play critical roles in site-specific oxidations of triterpene skeleton; thereby create structural variation of triterpenoid aglycones. In this study, we identified several P450 enzymes involved in triterpenoid biosynthesis by using “homology-based” and “gene co-expression analysis” methods. These identified P450s were coexpressed with oxidosqualene cyclase, such as β -amyrin synthase, in engineered yeast to produce rare-natural or non-natural terpenoid products.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：トリテルペノイド、組換え酵母、P450

1. 研究開始当初の背景

組換え微生物を用いた植物有用二次代謝産物の代謝工学研究の成果として、抗マラリア活性を有するセスキテルペノイドである

アルテミシニンの前駆体や、イソキノリンアルカロイドを組み換え酵母において生産させた研究が注目されていた。一方、トリテルペノイドの場合、トリテルペン骨格形成以降

の生合成酵素（トリテルペン修飾酵素）遺伝子に関する知見が乏しかったことから、上記のような成功例は報告がなかった。一方、研究代表者らは、肝炎治療剤として使用されるトリテルペノイド配糖体であり、マメ科の薬用植物カンゾウの地下部に特異的に含まれるグリチルリチンの生合成経路において、トリテルペン骨格の酸化修飾に関与するシトクローム P450 酸化酵素の遺伝子単離に成功していたこと、また、マメ科モデル植物であるタルウマゴヤシ、ミヤコグサの公開 EST も既に充実していたことから、上記グリチルリチン生合成関連 P450 遺伝子に対して高い相同性を示す遺伝子の単離と機能解析を行うために必要な知見が得られていたことから本研究計画の着想に至った。

2. 研究の目的

マメ科の薬用植物カンゾウが生産するグリチルリチンに代表されるトリテルペノイド化合物の生合成酵素遺伝子、なかでもトリテルペノイド化合物の構造多様化への寄与が大きいシトクローム P450 酸化酵素に注目し、その探索と機能解析を行うこと、さらに、トリテルペノイド生合成関連遺伝子を導入した組換え酵母を作出し、植物体中にはごく微量にしか存在しない、あるいは非天然型のトリテルペノイドの生産を試みる。

3. 研究の方法

モデルマメ科植物であるミヤコグサおよびタルウマゴヤシの公開 EST データベースを精査し、研究代表者らがマメ科の薬用植物カンゾウから既に単離していたグリチルリチン生合成関連 P450、CYP88D6 (β -amyrin 11 位酸化酵素) および β -amyrin の 30 位の酸化反応を触媒する P450 について、ホモログの探索を行った。ヒットした配列について、RT-PCR、RACE-PCR 法により、全長 cDNA を単離し、酵母発現ベクターを作成した。代表的なトリテルペン骨格である β -アミリン、ルペオール、 α -amyrin の合成酵素遺伝子と、P450 還元酵素 (P450 酸化酵素の酸化還元パートナー) 遺伝子を予め導入した酵母株に、各 P450 の発現ベクターを導入した。得られた形質転換酵母を 10 ml スケールで培養した後、培養液を溶媒抽出後、生成物を GC-MS により分析し、各種トリテルペン骨格に対する酸化活性の有無を調べた。さらに、タルウマゴヤシの公開大規模遺伝子発現データに基

づく遺伝子共発現解析により、 β -amyrin 合成酵素遺伝子に対して高い共発現係数を示す P450 遺伝子を見出し、上記の方法により酵素機能を解析した。以上の過程を経て得られたトリテルペン酸化活性を有する P450 遺伝子を複数組み合わせる各種トリテルペン生産酵母に導入した後、培養液を GC-MS により分析した。

4. 研究成果

研究代表者らがカンゾウから既に単離していた CYP88D6 (β -amyrin 11 位酸化酵素) および β -amyrin の 30 位の酸化反応を触媒する P450 について、モデルマメ科植物であるミヤコグサおよびタルウマゴヤシから 10 以上のホモログ遺伝子を単離した。その結果、タルウマゴヤシから単離した幾つかの CYP72A サブファミリー-P450 がトリテルペノイド合成に関与することを見出した。さらに、新たに単離した CYP72A サブファミリー-P450 と先に単離していた CYP93E3 (β -amyrin 24 位水酸化酵素) を、 β -amyrin 生産酵母において同時発現させることで、これまでに植物体からの単離報告のないものも含めて複数種のトリテルペノイド化合物を生産させることができた。さらに、トリテルペノイド生合成に関わる新たな P450 分子種の探索と機能解析を行った。モデルマメ科植物であるタルウマゴヤシの公開大規模遺伝子発現データに基づく遺伝子共発現解析により、 β -amyrin 合成酵素遺伝子に対して高い共発現係数を示す CYP716A12 を見出した。 β -amyrin 生産酵母を用いた酵素機能解析を行った結果、CYP716A12 は β -amyrin の 28 位を酸化しオレアノール酸を生成する活性を有することが判明した。CYP716A12 はさらに、別のトリテルペン骨格であるルペオールおよび α -amyrin に対しても酸化活性を示し、それぞれベツリン酸、およびウルソール酸を生成することが判明した。また、複数の植物種から CYP716A12 に対して高い相同性を示す P450 を単離し、活性を調べたところ、CYP716A12 と同様のトリテルペン酸化活性を有することが判明した。さらに、 β -amyrin 合成酵素、CYP716A12、および CYP93E2 を同時発現する組換え酵母が植物体中においてはレアなトリテルペノイドを生産しうることを明らかにした。

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 4 件)

- ①. Kojoma, M., Ohyama, K., Seki, H., Hiraoka, Y., Asazu, S-N., Sawa, S., Sekizaki, H., Yoshida, S. and Muranaka, T.: *In vitro* proliferation and triterpenoid characteristics of licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fischer, Leguminosae) stolons. Plant Biotechnology, 査読有, 27, (2010), 59-66
- ②. Sudo, H., Seki, H., Sakurai, N., Suzuki, H., Shibata, D., Toyoda, A., Totoki, Y., Sakaki, Y., Iida, O., Shibata, T., Kojoma, M., Muranaka, T. and Saito, K.: Expressed sequence tags from rhizomes of *Glycyrrhiza uralensis*. Plant Biotechnology, 査読有, 26, (2009), 105-107
- ③. 村中俊哉、關 光、大山 清、カンゾウのグリチルリチン生合成遺伝子ディスカバリーと今後の研究展開、ファルマシア、査読無、45 巻、(2009)、865-869
- ④. 關 光、大山 清、村中俊哉：薬用植物甘草のグリチルリチン生合成遺伝子の発見 -組み換え酵母で生合成中間体の生産に成功-、化学と生物、査読無、47 巻、(2009)、714-716

〔学会発表〕 (計 20 件)

- ①. 關 光、村中俊哉、トリテルペノイドの構造多様化をもたらす分子基盤の解明、52 回日本植物生理学会大会シンポジウム、2011. 3. 22、東北大学
- ②. 国井美恵子、北濱 豊、關 光、村中俊哉、吉田雄三、青山由利、CYP51 ファミリーに属する P450 の新しい機能、第 33 回日本分子生物学会年会、2010. 12. 10、神戸
- ③. 關 光、村中俊哉、植物の代謝多様性を利用した非天然型テルペノイドの創製、第 62 回生物工学会大会シンポジウム、2010. 8. 28、宮崎
- ④. 關 光、漢方原料「甘草」のトリテルペノイド生合成酵素遺伝子解析、日本植物学会第 74 回大会シンポジウム、2010. 9. 9、中部大学

- ⑤. 福島エリオデット、關 光、大山 清、澤井 学、斉藤和季、村中俊哉、Coexpression analysis leads to the identification of P450 implicated in triterpenoid saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*. 第 28 回日本植物細胞分子生物学会大会、2010. 9. 2、東北大学
- ⑥. Seki, H., Ohyama, K., Sawai, S., Mizutani, M., Ohnishi, T., Sudo, H., Akashi, T., Aoki, T., Saito, K., Muranaka, T.: Identification of cytochrome P450s involved in triterpenoid saponin biosynthesis in licorice. 21th International Congress on Arabidopsis Research, 2010. 6. 7, Yokohama
- ⑦. Fukushima, E. O., Seki, H., Ohyama, K., Saito, K., Muranaka, T.: Discovery of P450 genes in triterpenoid saponin biosynthesis. 21th International Congress on Arabidopsis Research, 2010. 6. 7, Yokohama
- ⑧. 福島エリオデット、關 光、大山 清、斉藤和季、村中俊哉、マメ科植物トリテルペノイドのコンビナトリアル生合成、第 51 回日本植物生理学会大会、2010. 3. 20、熊本大学
- ⑨. 關 光、薬用植物カンゾウのグリチルリチン生合成遺伝子ディスカバリー、第 5 回ミヤコグサ・ダイズワークショップ、2009. 12. 3、かずさアーク
- ⑩. 關 光、薬用植物カンゾウのグリチルリチン生合成酵素遺伝子の探索、第 30 回富山大学・和漢医薬学総合研究所特別セミナー、2009. 10. 9、富山県民会館
- ⑪. 福島エリオデット、關 光、大山 清、斉藤和季、村中俊哉、トリテルペノイドサポニン生合成に関わる *Medicago truncatula* P450 の機能解析、第 27 回日本植物細胞分子生物学会大会、2009. 7. 31、日本大学
- ⑫. 關 光、代謝研究に適した新規毛状根ベクターの開発および薬用植物のテルペノイド生合成関連遺伝子の探索、第 27 回日本植物細胞分子生物学会大会、2009. 7. 30、日本大学
- ⑬. Seki H., Identification of cytochrome

P450s involved in the biosynthesis of
glycyrrhizin. Terpnet 2009,
2009. 5. 26, Tokyo Univ.

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：28位がヒドロキシメチル基またはカルボキシル基である五環系トリテルペン化合物の製造方法

発明者：村中俊哉、関光、福島エリオデット、梅基直行

権利者：横浜市立大学、大阪大学、キリンホールディングス(株)

種類：特許

番号：特願 2010-196222

出願年月日：2010年9月1日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関 光 (SEKI HIKARU)

大阪大学・工学研究科・特任助教

研究者番号：30392004