

平成 30 年 5 月 2 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07990

研究課題名(和文)植物二次代謝能活性化スイッチとしてのRac型GTPaseの有用物質生産への応用

研究課題名(英文) Rac-GTPases as a key functional protein for activation of plant secondary metabolism

研究代表者

黒崎 文也 (Kurosaki, Fumiya)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・教授

研究者番号：70143865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：特殊な条件下でのみ *Aquilaria microcarpa* に発現する芳香性セスキテルペン生合成酵素  $\gamma$ -guaiene synthase 遺伝子(GS)の転写活性の誘導にRac型GTPaseが関わることを示し、更に、このGTPaseにGTPが結合したままの状態でも保持されるよう変異を入れたCARac2を *A. microcarpa* 培養細胞に導入したところ顕著なGS発現が観察されることを明らかにした。また、大腸菌及びタバコBY2細胞を宿主として、GSとその基質供給酵素であるFPSとを共発現させることで、高い  $\gamma$ -guaiene生産性を有するプラットフォームを構築した。

研究成果の概要(英文)：  $\gamma$ -Guaiene is an aroma sesquiterpene compound accumulated in the trunk of *Aquilaria microcarpa* upon the microbial infection or mechanical wounding. We demonstrated that Rac-GTPase, a class of monomeric GTP binding protein, plays a central role in the transcriptional activation processes of  $\gamma$ -guaiene synthetic enzyme gene (GS). We also showed that transformation of *A. microcarpa* with a modified gene of Rac-GTPase, CARac2, of which translate is capable of binding to GTP continuously, resulted in an appreciable expression of GS in the plant cells. In order to construct the bio-production systems of  $\gamma$ -guaiene, GS plus farnesyl diphosphate synthase gene were co-expressed in *Escherichia coli* or tobacco BY2 cells. Upon the addition of mevalonolactone as the precursor,  $\gamma$ -guaiene contents in the transformed *E. coli* was 37.9 mg/L culture while 428 mg/L of the compound was accumulated in BY2 cells.

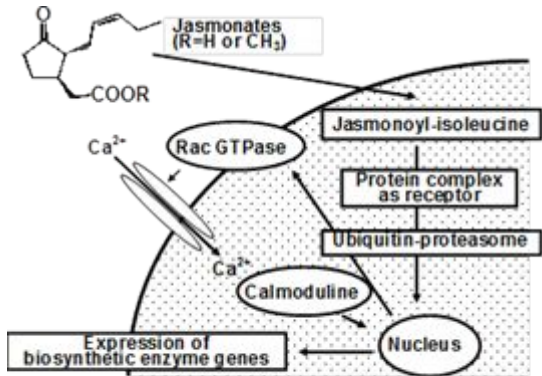
研究分野：植物分子生物学

キーワード：有用物質生産 遺伝子組み換え植物 芳香性セスキテルペン 植物二次代謝 Rac型GTPase

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物ホルモンの一種であるジャスモン酸あるいはジャスモン酸メチルは多彩な二次代謝物の生合成能を誘導・活性化する機能を有することが知られているが、細胞内情報伝達機構については ubiquitin-proteasome 系を介して核内にメッセージが届くことが示されているにとどまっておらず、このホルモンによる刺激がどのようにして二次代謝関連遺伝子の発現に結びつくかは不明のままであった。

(2) 最近我々はジャスモン酸で誘導される二次代謝能の誘導に calmodulin をキとする細胞内 Ca カスケードの活性化が必須であって、これには Rac 型と呼ばれる植物に特異的な単量体 GTP 結合タンパクが関わっていることを見出した (図 1)。



(図 1)

(3) 更に、この Rac 型 GTPase の翻訳産物のアミノ酸配列に GTP が結合したままとなる変異を導入して常時活性型とした *CArac2*、更に GDP のみが結合するよう変異を導入し常時不活性型とした *DNrac2* を過剰発現した組み換え体において、*CArac2* 変異体の二次代謝能が顕著に活性化されることを示している。

2. 研究の目的

香木として知られるジンコウ (沈香) の基原植物の一つである *Aquilaria microcarpa* は二環性セスキテルペンである  $\delta$ -guaiene を主な芳香成分として産生することが示されているが、その生合成酵素である  $\delta$ -guaiene synthase をコードする遺伝子 (*GS*) はジャスモン酸処理によってはじめて転写が誘導される。今回の実験は、 $\delta$ -guaiene を効率良く、また再現性良く生産するシステムを構築するために、Rac 型 GTPase 及びその変異体を *A. microcarpa* 培養細胞に導入・過剰発現させ、*GS* の転写活性を恒常的に高いレベルに維持することを目的とした。また、大腸菌及びタバコ BY2 細胞による異種発現系を用いて、 $\delta$ -guaiene の高効率生物生産システムの構築についても検討した。

3. 研究の方法

(1) Calmodulin 遺伝子である *cam1*、Rac 型 GTPase 遺伝子である *rac2*、変異を導入し恒

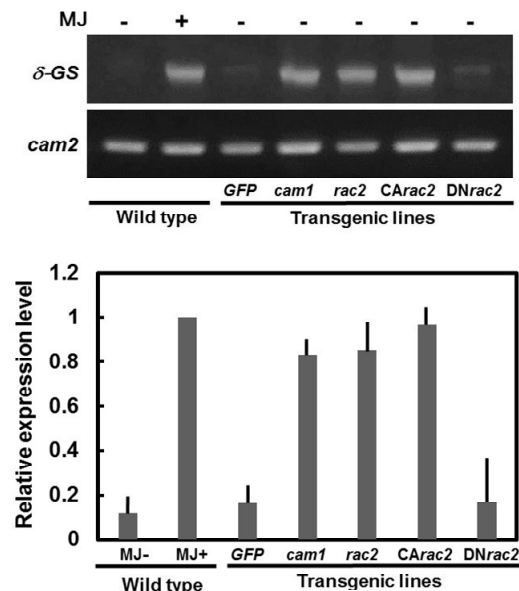
常活性型とした *CArac2*、不活性型とした *DNrac2* を発現ベクター pBI-0X-GW にそれぞれサブクローニングした後、アグロバクテリウム法によって *A. microcarpa* 培養細胞に導入した。また、レポーター遺伝子としては *GFP* を用いた。抗生物質含有培地上での選抜によって細胞株を確立後、RNA を調整し逆転写反応を行ったサンプルについて RT-PCR により *GS* の転写活性を測定した。

(2) 大腸菌を宿主とする生物生産システムの作成にあたっては、放線菌から単離したメバロン酸経路関連酵素遺伝子クラスター、あるいは酵母由来の isopentenyl diphosphate isomerase 遺伝子、ラット由来の acetoacetyl CoA ligase 遺伝子をそれぞれ順次連結した発現ベクター、pAC-Mev、pAC-Mev/Scidi、pAC-Mev/Scidi/AacI による形質転換を行った。その後、バイアル内の組み換え大腸菌培養液のヘッドスペースに蓄積した化合物を micro-extraction 法によってファイバーに吸着させ、GC-MS あるいは GLC によって解析と定量を行った。

(3) タバコ BY2 細胞を用いた生物生産システムにおいては 2 箇所のクローニングサイトを有する pRI201-ON を発現ベクターとして、*A. microcarpa* 培養細胞の場合と同様にアグロバクテリウム法によって *FPS* と *GS* 遺伝子を導入した。寒天培地上で組み換え体を選抜し液体培地へと移行して、バイアル内の培養液のヘッドスペースに蓄積された化合物を GC-MS、GLC によって解析・定量した。

4. 研究成果

(1) 特殊な条件下でのみ *A. microcarpa* が生成する芳香性セスキテルペン  $\delta$ -guaiene の生合成酵素である *GS* をコードした遺伝子ホモログの単離を試み、*GS-2*、*GS-3*、*GS-4* と名付けた 3 種類の遺伝子断片を新たに単離した。遺伝子マイニングによって N 末端の 10 アミノ酸、C 末端の 9 アミノ酸相当の配列をそれ



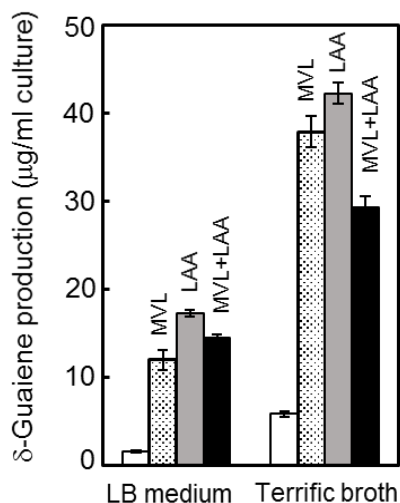
(図 2)

ぞれ補ったものを大腸菌で過剰発現させ、翻訳産物を glutathione-S-transferase との融合タンパクとして得た後にアフィニティカラムクロマトグラフィーによって精製した。組み換えタンパクを用いた酵素反応の生成物を GC-MS によって解析した結果、ここで得た 3 種類の遺伝子がいずれも  $\delta$ -guaiene synthase をコードしていることが明らかになった。

更に、ジャスモン酸刺激によって誘導された *GS* の転写活性が、calmodulin 阻害剤の W-7、並びにコピキチン・プロテオソーム系阻害剤の NSC23766 によって用量依存的に抑制されることを RT-PCR によって確認した。また、calmodulin 遺伝子である *cam1*、Rac 型 GTPase 遺伝子である *rac2*、変異を導入した *CArac2*、*DNrac2* をそれぞれ *A. microcarpa* 培養細胞に導入したところ、*cam1*、*rac2*、*CArac2* を過剰発現した組み換え体においてはジャスモン酸非存在下であっても顕著な *GS* 転写活性の誘導が見られることを示した (図 2)。

(2) 次の実験では、生合成マシナリーを意識して大腸菌を用いた  $\delta$ -guaiene 生産系の構築を試みた。すなわち、テルペンサイクラーゼである *GS* と、基質供給酵素である farnesyl diphosphate synthase 遺伝子 (*FPS*) を共発現するベクターを構築し、大腸菌 BL21 株の形質転換を行った。その結果、*FPS* のみの発現では  $\delta$ -guaiene 生成は検出できず、また *GS* のみでは 0.004 mg/L と、極めて微量の産生しか見られなかった。これに対して、*FPS* と *GS* を共発現させた大腸菌では  $\delta$ -guaiene 生成量の有意な増加がみられ、富栄養培地である Terrific broth 中で組み換え体を培養した場合には生産量が 0.6 mg/L culture であった。

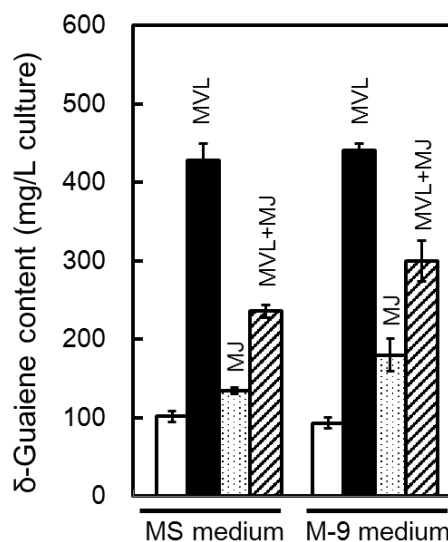
テルペン化合物の生合成前駆体の供給系として大腸菌に 6 種類のメバロン酸経路関連遺伝子を導入・過剰発現し、更にメバロノラクトン (MVL) を添加したところ、 $\delta$ -guaiene 生成量が 31 mg/L culture となった。更にメバロン酸経路関連遺伝子を 7 種類あるいは 8 種



(図 3)

類とし MVL あるいはリチウムアセテート (LAA) を培養に添加したところ、 $\delta$ -guaiene 量が 35-42 mg/L culture にまで上昇した。このように、大腸菌へのメバロン酸経路関連遺伝子群の導入と前駆体の供給とによって、効率良く  $\delta$ -guaiene を生産するシステムが構築された (図 3)。

(3) 続いて、より高効率な生物合成系の構築を目指してタバコ培養細胞 BY2 株を宿主とする  $\delta$ -guaiene 生産系の構築を試みた。発現ベクターとして pRI201-ON を用い、その二つのクローニングサイトに *GS* と *FPS* をそれぞれ組み込み BY2 の形質転換を行った。その結果、*GS* のみの発現では 0.2 mg/L culture の低い産生能しか見られなかったのに対して、*FPS* と *GS* を共発現させた組み換え体では 4.5-11.8 倍程度の  $\delta$ -guaiene 生成量の増加がみられた。*FPS/GS* 共発現体の中で最も生産性が高かった株について攪拌効率を上げてエアリングを促したところ、 $\delta$ -guaiene 量が 5.9 mg から 102 mg/L culture へと飛躍的に上昇し、更に、MVL 添加によって 428 mg/L culture の高生産性を示した。一方、メチルジャスモン酸 (MJ) 添加による  $\delta$ -guaiene 生成量の変化は明確ではなく、二次代謝に阻害的に作用するとされるアンモニウム塩を除いた M-9 培地中で変異株を培養した場合もセスキテルペン量の大きな変動は認められなかった (図 4)。



(図 4)

このように、テルペンサイクラーゼ遺伝子と *FPS* とをタバコ BY2 細胞で共発現させることによって高効率な  $\delta$ -guaiene 生産プラットフォームを構築することができた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 18 件)

- 1 Kato, T., Taura, F., Lee, J. B. & Kurosaki, F. (2018). High level production of  $\delta$ -guaiene, a bicyclic

sesquiterpene accumulated in agarwood, by co-expression of  $\beta$ -guaiene synthase and farnesyl diphosphate synthase genes in tobacco BY-2 cells. *Nat. Prod. Commun.* **13**, 9-13. 査読有  
<http://www.naturalproduct.us/>  
Taura, F., Iijima, M. & Kurosaki, F. (2018). Daurichromenic acid and grifolic acid: phytotoxic meroterpenoids that induce cell death in cell culture of their producer *Rhododendron dauricum*. *Plant Signal. Behav.* **13**, e1422463 査読有  
DOI:org/10.1080/15592324.2017.1422463  
Yamamura, Y., Taguchi, Y., Ichitani, K., Umebara, I., Ohshita, A., Kurosaki, F. & Lee J. B. (2018). Characterization of ent-kaurene synthase and kaurene oxidase involved in gibberellin biosynthesis from *Scoparia dulcis*. *J. Nat. Med.* **72**, 456-463. 査読有  
DOI: 10.1007/s11418-017-1168-4  
Yamamura, Y., Kurosaki, F. & Lee, J. B. (2017). Elucidation of terpenoid metabolism in *Scoparia dulcis* by RNA-seq analysis. *Scientific Rep.* **7**, 43311. 査読有  
DOI: 10.1038/srep43311  
Okada, M., Saito, K., Wong, C. P., Li, C., Wang, D., Iijima, M., Taura, F., Kurosaki, F., Awakawa, T. & Abe, I. (2017). Combinatorial biosynthesis of (+)-daurichromenic acid and its halogenated analogue. *Organic Lett.* **19**, 3183-3186. 査読有  
DOI: 10.1021/acs.orglett.7b01288  
Iijima, M., Munakata, R., Takahashi, H., Kenmoku, H., Nakagawa, R., Kodama, T., Asakawa, Y., Abe, I., Yazaki, K., Kurosaki, F. & Taura, F. (2017). Identification and characterization of daurichromenic acid synthase active in anti-HIV biosynthesis. *Plant Physiol.* **174**, 2213-2230. 査読有  
DOI: org/10.1104/pp.17.00586  
Sasaki, K., Hayashi, K., Matsuya, Y., Sugimoto, K., Lee, J. B., Kurosaki, F. & Hayashi, T. (2016). In vitro and in vivo antiherpetic effects of (1R,2R)-1-(5'-methylful-3'-yl)propane-1,2,3-triol. *J. Nat. Med.* **70**, 217-224. 査読有  
DOI: 10.1007/s11418-016-0964-6.  
Taura F., Iijima, M., Yamanaka, E., Takahashi, H., Kenmoku, H., Saeki, H., Morimoto, S., Asakawa, Y., Kurosaki F. & Morita, H. (2016). A novel class of plant type III polyketide synthase involved in orsellinic acid biosynthesis from *Rhododendron*

*dauricum*. *Front. Plant Sci.* **7**, 1452. 査読有  
DOI: 10.3389/fpls.2016.01452  
Kato, T., Lee, J. B., Taura, F. & Kurosaki, F. (2016). Enhanced production of  $\beta$ -guaiene, a bicyclic sesquiterpene accumulated in agarwood, by coexpression of  $\beta$ -guaiene synthase and farnesyl diphosphate synthase genes in *Escherichia coli*. *Nat. Prod. Commun.* **11**, 1221-1224. 査読有  
<http://www.naturalproduct.us/>  
Kurosaki, F., Kato, T., Misawa N. & Taura, F. (2016). Efficient production of  $\beta$ -guaiene, an aroma sesquiterpene compound accumulated in agarwood, by mevalonate pathway-engineered *Escherichia coli* cells. *Adv. Biosci. Biotechnol.* **7**, 435-445. 査読有  
DOI: 10.4236/abb.2016.711042  
Ogita, S., Lee, J. B., Kurosaki, F. & Kato, Y. (2015). The biosynthetic activities of primary and secondary metabolites in suspension cultures of *Aquilaria microcarpa*. *Nat. Prod. Commun.* **10**, 779-782. 査読有  
<http://www.naturalproduct.us/>  
Kurosaki, F. & Taura, F. (2015). Transcriptional activation of sesquiterpene biosynthetic enzyme  $\beta$ -guaiene synthase gene in cell cultures of *Aquilaria microcarpa* overexpressing cam1 and rac2 encoding calmodulin and Rac GTPase. *Plant Gene* **2**, 25-28. 査読有  
DOI:10.1016/j.plgene.2015.03.004  
Kurosaki, F., Hirohashi, S., Katoh, T., Taura, F. & Lee, J. B. (2015). Cloning and characterization of  $\beta$ -guaiene synthase genes encoding a sesquiterpene cyclase from *Aquilaria microcarpa* cell cultures. *Am. J. Plant Sci.* **6**, 2603-2611. 査読有  
DOI:10.4236/ajps.2015.616263.

[学会発表](計17件)

梅原依男, 山村良美, 黒崎文也, 李貞範. 薬用植物スコパリアにおけるジテルペン環化酵素の機能解析. 日本生薬学会第64回年会; 2017 Sep 9-10; 千葉.

李貞範, 菊地天禎那, 土屋未緒, 山村良美, 村上芳哉, 辰尾良秋, 高尾泰昌, 黒崎文也. オンジサポニン合成に関わる酵素の解明. 日本生薬学会第64回年会; 2017 Sep 9-10; 千葉.

飯島未宇, 兼目裕充, 高橋宏暢, 李貞範, 豊田正夫, 浅川義範, 黒崎文也, 田浦太志. ローゼラニウム由来 12-oxophytodienoic acid reductase の機能解析. 第61回香料・テルペンおよび精

油化学に関する討論会；2017 Sep 9-11；  
金沢。

佐伯春奈，飯島未宇，黒崎文也，田浦太志．*エゾムラサキツツジのダウリクロメン酸生合成に關与するプレニル転移酵素*．第35回日本植物細胞分子生物学会；2017 Aug 29-31；さいたま。

川畑文明，黒崎文也，田浦太志．*Helichrysum italicum* 由来ポリケタイド合成酵素に關する研究．第35回日本植物細胞分子生物学会；2017 Aug 29-31；さいたま。

加藤貴裕，李貞範，田浦太志，三沢典彦，黒崎文也．*メパロン酸経路關連遺伝子群を導入した大腸菌による芳香性セスキテルペン  $\delta$ -guaiene の生成*．日本薬学会第137年会；2017 Mar 24-27；仙台。

菊地天禎那，山村良美，村上芳哉，高尾泰昌，辰尾良秋，黒崎文也，李貞範．*オンジサポニン生合成酵素遺伝子の探索*．日本薬学会第136年会；2016 Mar 26-29；横浜。

川畑文明，兼目裕充，高橋宏暢，浅川義範，黒崎文也，田浦太志．*Helichrysum italicum* 由来のポリケタイド合成酵素に關する研究．日本生薬学会第63年会；2016 Sep 24-25；富山。

田口裕香里，市谷圭，李貞範，山村良美，黒崎文也．*Scoparia dulcis* 由来ジベレリン生合成酵素群の機能解析．第34回日本植物細胞分子生物学会大会；2016 Sep 1-3，上田。

廣橋峻，加藤貴裕，李貞範，田浦太志，黒崎文也．*Aquilaria microcarpa* の培養細胞における  $\delta$ -guaiene synthase 活性の誘導．日本生薬学会第62回年会；2015 Sep 11-12；岐阜。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒崎 文也 (KUROSAKI, Fumiya)  
富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・  
教授  
研究者番号：70143865

### (2) 研究分担者

加藤 康夫 (KATOH, Yasuo)  
富山県立大学・工学部・教授  
研究者番号：20254237

荻田信二郎 (OGITA, Shinjiro)  
県立広島大学・生命環境学部・教授  
研究者番号：50363875

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし