

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 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：15K07992

研究課題名(和文) オンジサポニンの構造多様性を決定する生合成機構と時空間的動態の解析

研究課題名(英文) Determining factors for giving structural diversity and analysis of temporospatial dynamics of onjisaponins

研究代表者

李 貞範 (Lee, Jung-Bum)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・助教

研究者番号：40332655

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)：オンジは認知症などの疾患に対して有効性が報告されている重要な生薬であり，オンジサポニン類がその活性に寄与していると報告されている。本研究では，オンジの基原植物であるイトヒメハギ *Polygala tenuifolia* がオンジサポニン類を生合成するために必要な酵素遺伝子を解析した。次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析により，トリテルペン生合成に重要な一群の酵素遺伝子を発見し，それらの機能解析を実施した。その結果，オンジサポニン生合成に関与する種々の酵素遺伝子を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Onji is an important crude drug for demantia, and onjisaponins are suggested to contribute for the activity. In the present study, important enzyme genes responsible for onjisaponin biosynthesis in *Polygala tenuifolia* were examined by transcriptomic analyses based on next generation sequencing techniques. As results, a series of gene candidates responsible for saponin biosynthesis has been identified, and characterized their functions. in conclusion, it has been found that important enzyme genes responsible for onjisaponin biosynthesis.

研究分野：天然物化学

キーワード：オンジ サポニン生合成

## 1. 研究開始当初の背景

これまでに膨大な数のテルペノイドが報告されているが、いずれも炭素数5の倍数を基本骨格としており、構造的多様性に富んでいる。テルペノイドは既に医薬品・機能性食品・香料および工業原料として利用されているものも数多く存在し、潜在的な医薬品資源であるだけでなく、産業界でも利用価値の高い重要な化合物群である。しかしながら、天然資源を原料にこれらを調達するには、単離が煩雑なことや植物での生産性が低いケースも多々あり、さらには資源枯渇などの数多くの問題を抱えている。

遠志(オンジ)はイトヒメハギ *Polygala tenuifolia* の根茎であり、安心益智・強壮・鎮静を目標として漢方処方に配合されるが、主な薬効として去痰作用や中枢抑制作用が報告されている。さらに注目すべき効能として、アルツハイマー症などの認知症に対して、記憶障害の改善効果が報告され、実際に「中年期以降の物忘れの改善」を効能効果として承認され、製品化が可能となっており、実際に商品化されている。その活性成分としてオンジサポニン類が注目されているが、その構造は多様、かつ複雑であり合成化学的アプローチによる利用は困難であった。一方、イトヒメハギ自身国内には自生しておらず、その全てを中国からの輸入原料でまかなっている。また、実際にオンジとして利用可能になるまで、イトヒメハギを数年にわたって栽培することから、量のみならず質の担保も必要であった。

オンジサポニン類を基盤とした医薬品の開発や将来的に予想される資源枯渇に対応するためには、分子育種によるオンジサポニン高生産系統の作出も視野にいれて研究する必要がある。そのためには、オンジサポニン生合成経路の全容解明が必須であるが、まだ詳細は不明であった。これらを明らかにすることで、関与する酵素遺伝子を“有用天然物の生産基盤となる遺伝子資源”として活用可能となる。

オンジサポニン類は魅力的な生物活性を持つ医薬品資源として将来的に様々な応用が展開できる上、構造面から俯瞰しても高度に酸化や配糖化などの修飾を受けており、複雑なトリテルペンサポニン生合成の解明に魅力的なターゲットである。

## 2. 研究の目的

本研究はオンジの基原植物であるイトヒメハギ *P. tenuifolia* が生産するオンジサポニン生合成に関与する酵素遺伝子を同定し、サポニン代謝の概要を明らかにすることである。

具体的に以下の酵素遺伝子の解明を目的とする。

オンジサポニン類はアグリコンとして tenuigenin が基盤となっている。これは -amyrin が高度に酸化されている化合物で

あるため、基盤となる -amyrin を生合成するまでに関与する一連の酵素遺伝子を取得し、次いでこれを酸化する一連の Cytochrome P450 酵素遺伝子や糖転移酵素の同定を行う。

## 3. 研究の方法

オンジサポニン生合成に関わる酵素遺伝子を網羅的に解析するため、トランスクリプトーム解析を実施した。

富山大学薬学部附属薬用植物園圃場にて栽培しているイトヒメハギの地上部と根から、それぞれ RNA を抽出し、cDNA ライブラリを作製後、イルミナ社の次世代シーケンサー MiSeq によりトランスクリプトームデータを取得した。de novo アッセムブリーにより、short sequence からコンティグを作製し、各種データベースに対して検索し、in-house データベースを作成するとともに、Gene ontology 解析や KEGG orthology によるパスウェイ解析も実行した。

以上の結果から選抜したオンジサポニン生合成に関与する候補遺伝子の全長 cDNA を単離し、大腸菌を用いた発現系で機能解析することで、目的遺伝子を同定した。

## 4. 研究成果

### (1) オンジトランスクリプトーム解析

イトヒメハギのオンジサポニン生合成の全容を効率的に解明するため、次世代シーケンサーを用いた、イトヒメハギ地上部と根それぞれの部位で発現している全ての mRNA の配列を決定するトランスクリプトーム解析を実施し、それぞれで発現している遺伝子のデータベースを作成した。

それぞれの部位で発現している cDNA ライブラリを作製したところ、地上部より 953 万リード、根より 1,088 万リードのショートリードが得られた。ここから、低品質なリード並びに poly-N を含むリードを除去後、Trinity ソフトウェアを用いて de novo 幹旋回を実施し、さらに配列の冗長性を取り除くためにクラスタリングを行ったところ、トータルで 56,143 個の transcript と 47,981 個の unigene を得た。

得られた transcript について Nr や SwissProt データベースに対して BLASTp 検索を実施し、解析した。その結果 Nr では 56,143 個、SwissProt では 24,405 個の配列が既知タンパク質網野さん配列と cutoff value 1e-5 の条件でヒットした。さらに Gene Ontology 解析や Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomic (KEGG) orthology を用いてアノテーション下結果、テルペン生合成やフラボノイド生合成など二次代謝に関与する遺伝子マップを作成できた。

### (2) トリテルペノイド生合成酵素の遺伝子クローニング

前項で構築した in-house データベースの検索結果より、スクアレン合成酵素 (SQS)、

スクアレンエポキシダーゼ (SQE), 並びに 3 種のオキシドスクアレン環化酵素 (OSCs) を選抜することができた。さらに, OSC により環化反応を受けて生成するトリテルペンの酸化反応を触媒すると予想される cytochrome P450s (5 種) や配糖化酵素群も選抜できた。

そこで, SQS, SQE, ならびに OSCs の全長をクローニングした。その結果, 取得した SQS (PtSQS) と  $\beta$ -アミリン合成酵素 (PtAS) は既知の遺伝子の ORF と配列が一致していたが, その他の酵素遺伝子は新規遺伝子であった。これらに加えて, 4 個の新規 CYP450s 遺伝子の全長も取得した。これらの遺伝子のうち, PtCYP2 と命名したクローンは CYP716A サブファミリーに属する遺伝子であり,  $\beta$ -アミリン-28-酸化酵素であることが予測された。

### (3) トリテルペン生合成酵素の機能解析

オンジサポニン生合成酵素の機能解析をするにあたり, 大腸菌を宿主とした *in vivo* 発現系を構築した。具体的には, *E. coli* C-41 株にトリテルペン生合成基質となるファルネシル 2 リン酸 (FDP) を供給するために必要な遺伝子群を保有するプラスミド (pMBIS) で形質転換した。ここに, PtSQS 単独, もしくは PtSQS と PtSQE を組み込んだプラスミド (pACYC-PtSQS or pACYC-PtSQS-PtSQE) で形質転換し, 大腸菌内で生成した酵素反応生成物を GC-MS で解析した。この結果, PtSQS を含むプラスミドで形質転換した大腸菌は squalene を新たに生成することが確認されたことより, PtSQS は SQS として機能することが判明した。さらに, PtSQS と PtSQE を発現する大腸菌では squalene のピークに加えて新たに 2,3-oxidosqualen のピークが検出されたことから, SQE 活性も確認することができた。

続いて, 先に構築した形質転換体をさらに PtAS とシロイヌナズナ由来 Cytochrome P450 reductase である *ATR2* を組込んだ pET-Duet ベクターで形質転換した。この大腸菌を培養後, 酵素反応生成物を GC-MS で解析した結果,  $\beta$ -amyrin のピークを検出することができ, PtAS はオンジサポニン生合成の重要な鍵中間体である  $\beta$ -アミリンを合成する酵素であることを明らかにした。この他に全長を取得した OSC の一つは cycloartenol 合成酵素であることも同様に判明した。

続いて CYP716A ファミリーに属する PtCYP2 遺伝子の機能解析を行った。このために, 先に構築した形質転換体を pJBE16411-PtCYP2 プラスミドで形質転換し, 発現誘導後, 抽出物をメチル化し, GC-MS で分析した。その結果, ごく微量ではあるが oleanolic acid methyl ester のピークを検出することができた。従って, PtCYP2 は  $\beta$ -アミリン-18-酸化酵素であることが明らかとなった。

以上, 本研究によりイトヒメハギにおけるオンジサポニン生合成のなかでも, アグリコン形成に与える重要な酵素遺伝子の一

を解明することができた。また, 機能解析にまではいたらなかったものの, この他にもアグリコン部の酸化修飾に関与すると考えられる CYP450 遺伝子や糖転移酵素の候補遺伝子を取得しており, これらの機能解析をすすめることでオンジサポニン生合成経路の全容解明の大きな一歩となった。

## 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) Yamamura Y., Taguchi, Y., Ichitani K., Umehara I., Ohshita A., Kuroaki F., & Lee J.-B., Characterization of ent-kaurene synthase and kaurene oxidase involved in gibberellin biosynthesis from *Scoparia dulcis*. *J. Nat. Med.*, **72**, 456-63 (2018).

(2) Yamamura Y., Kuroaki F., & Lee J.-B., Elucidation of terpenoid metabolism in *Scoparia dulcis* by RNA-seq analysis. *Sci. Rep.*, **7**, 43311 (2017).

[学会発表](計 5 件)

(1) Yamamura Y., Umehara I., Kuroaki F., & Lee J.-B.: Functional characterization of syn-copalyl diphosphate synthase from *Scoparia dulcis*. The 13th International Meeting on Biosynthesis, Function and Synthetic Biology of Isoprenoids (TERPNET 2017). 2017 7, 16-20, Dalian, China.

(2) Kikuchi A., Yamamura Y., Murakami Y., Takao Y., Tatsuo Y., Kuroaki F., Lee J.-B.: *De novo* characterization of a *Polygala tenuifolia* transcriptome and gene related onjisaponin biosynthesis. The First International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network (TAA\_Pharm Symposium), 2016, 9, 12-13, Toyama, Japan.

(3) Kikuchi A., Yamamura Y., Murakami Y., Takao Y., Tatsuo Y., Kuroaki F., Lee J.-B.: Discovery of genes involved in onjisaponin biosynthesis from *Polygala tenuifolia*. 9th Joint Natural Products Conference 2016, 2016, 7, 24-27, Copenhagen, Denmark.

(4) 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 「オンジサポニン生合成に関わる酵素の解明」日本生薬学会第 64 回年会(千葉) 2017.9.9-2017.9.10

(5) 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(横浜) 2016.3.26-2016.3.29

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

李 貞範 (LEE, Jung-Bum)  
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・  
助教

研究者番号：40332655

(2)研究分担者

山村 良美 (YAMAMURA, Yoshimi)  
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・  
助教

研究者番号：30464027

(3)連携研究者

山垣 亮 (YAMAGAKI, Tohru)  
公益財団法人サントリー生命科学財団・生物  
有機科学研究所・主席研究員

研究者番号：40313209

(4)研究協力者

辰尾良秋 (TATSUO, Yoshiaki)

高尾泰昌 (TAKAO, Yasumasa)

村上芳哉 (MURAKAMI, Yoshiya)