

令和元年6月17日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08310

研究課題名(和文) 生合成を利用したトリテルペンの生産に関する研究

研究課題名(英文) Studies on Triterpene Production using biosynthetic genes

研究代表者

渋谷 雅明 (Shibuya, Masaaki)

新潟薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50170923

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)：酵母にトリテルペンを大量生産させるには細胞内から細胞外へ排出させることが必須であると考え、トリテルペン第一配糖化酵素のクローニングを優先させて研究を行なった。この酵素はタンパク自身に不安定性があると考えられ、無細胞系を使用しない活性測定系の構築を行なった。ダイズ由来UDP-グルコース脱水素酵素(DH)をクローニングし、酵母発現ベクターに組み込みpESC-DHを構築した。このpESC-DHに第一配糖化酵素の候補遺伝子を組み込み、酵母で発現させ配糖化活性を調べた。これまで20種について活性を調べたが、有意な活性は見いだせていない。引き続き他候補遺伝子の11種について活性を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的としたトリテルペン第一配糖化酵素遺伝子をクローニングすることができれば、トリテルペンサボニンの酵母による大量生産が可能となると期待される。理研のグループもトリテルペンサボニンであるグリチルリチンの酵母による大量生産系の構築を進めている。グリチルリチンは医薬品として有用であり、本研究が成功すれば、理研グループのグリチルリチンの大量生産系の構築に寄与するものと思われる。

研究成果の概要(英文)：I supposed that it is indispensable to excrete the product from yeast cells by glycosylation in order to accomplish the high production of triterpene by heterologous gene expression in transformed yeast. For this reason, I started cloning of triterpene glycosyltransferase (UDP-glucuronate : soyaapogenol B glucuronosyltransferase). In order to clone this transferase gene, in vivo screening assay using the yeast which was transformed with UDP-glucose dehydrogenase gene, was used. UDP-glucose dehydrogenase gene was successfully cloned from soybean, and introduced into yeast expression plasmid pESC. Resulting plasmid pESC-DH was obtained, and candidate triterpene glycosyltransferase genes was cloned into pESC-DH. During the research period, activities of 20 candidate genes were investigated using the transformed yeast with the constructed plasmid, but no active clone was found. Investigating the activity of remained 11 candidate genes was continued.

研究分野：天然物化学

キーワード：トリテルペン ソヤサポゲノールB グルクロン酸転移酵素

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本における薬学の天然物の研究は、生薬の有効成分の探索研究に源を発している。生薬の大部分は植物を基原としていることから、植物の成分研究がその大部分を占めている。日本の薬学の開祖の長井長義が、生薬麻黄から世界で初めてエフェドリンの結晶化に成功した話は有名であるが、それから百数十年経過した現代において、そのように植物から単純に新規有用化合物を得ることは100%不可能である。現代の植物化学で成功するための研究戦略、及び手法は、対象とする新しい材料を見つけること、及び丹念にHPLCで分離を繰り返すことに集約されている。

日本の薬学の先人たちは、植物から数多くの興味深い化合物を得てきたが、医薬品となっているものは、エフェドリン、グリチルリチン、ジギトキシンなど数少ない。いずれも単離が容易な化合物である。天然由来の医薬品の多くは、微生物由来の化合物が占めている。この大きな理由は、活性の強さのみならず、菌の培養による化合物の大量供給によるところが大きい。例えば、2015年のノーベル生理学・医学賞を受賞した大村智博士のイベルメクチンが医薬品となり得たのは、優れた活性のみならず、微生物由来の化合物であることから当該菌の培養により大量供給が可能であったからである。植物由来の優れた天然物が数多くあるにも関わらず、医薬品として利用できないのは、継続的にかつ大量に得ることが難しいという大きな障壁があるからである。

2. 研究の目的

現代の植物化学研究を俯瞰すると、上記のような閉塞感に満ち溢れている。これらの閉塞感を打破するには新しい手法を取り入れる必要がある。申請者は、分子生物学の手法と取り入れた生合成研究を植物成分探索研究に導入することにより壁を乗り越えることができると考えた。

天然物は何段階かの酵素反応により生合成される。各段階の酵素の遺伝子をクローニングし、微生物に導入すれば、微生物が植物成分をつくりだす。さらに酵素遺伝子を改変すれば、微生物は新規植物成分をつくりだす。いくつかの研究の先例があるが、いずれも生産性は極めて低く、しかも既知化合物の生産にとどまっている。

本研究ではトリテルペンを対象化合物とし、ゲノム配列が公開されているダイズのトリテルペン生合成遺伝子を利用して、(1) トリテルペンの大量生産系の構築、及び(2) 新規トリテルペンの創出を行い、応用的生合成研究の医薬品開発における有用性を証明する。

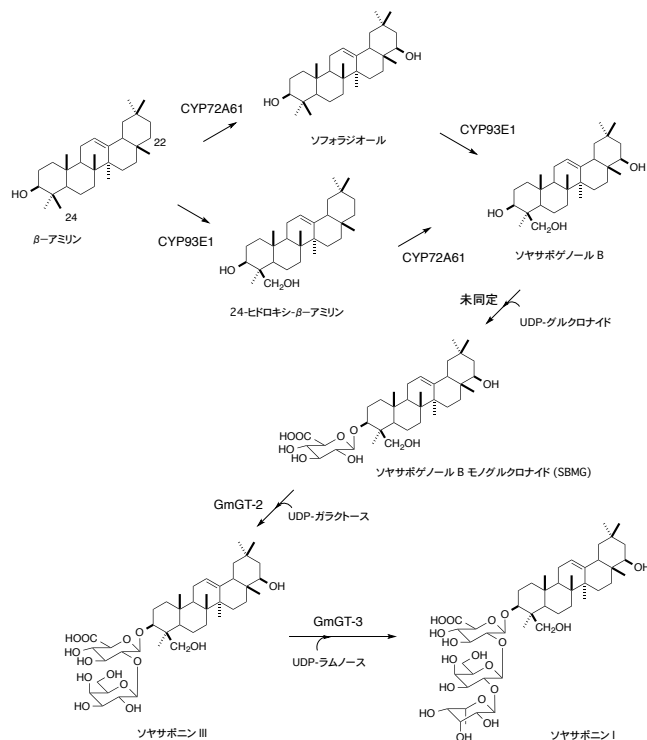


図 ダイズにおけるソヤサポニン I の生合成

3. 研究の方法

トリテルペンは植物内で水酸化、続いて配糖化を受ける。水酸化により若干水溶性が高まるが、配糖化を受けると劇的に水溶性が高まる。ソヤサポニンの生合成に関与するトリテルペンの配糖化酵素 (GmGT-2、GmGT-3) が本申請者により世界で初めてクローニングされた (Shibuya M., Nishimura K., Yasuyama N., and Ebizuka Y., *FEBS Letters*, **584**, 2258-2264 (2010))。その後、理研のグループによりグリチルリチンに関与する配糖化酵素がクローニングされているが、いずれも糖鎖付加における第二、及び第三配糖化酵素であり、トリテルペンの骨格に直接配糖化する第一配糖化酵素はクローニングされていない。第一配糖化酵素を形質転

換酵母内で共発現させることが、トリテルペンを生合成の場から排出する（酵母外に排出する）に最も適している。第一配糖化酵素のクローニングが本研究の最優先課題であり、第一配糖化酵素のクローニングに焦点をおいて研究を行なった。

研究開始時点において、第二、及び第三配糖化酵素がクローニングされてから5年が経過していたが、未だ第一配糖化酵素は同定されていなかった。その大きな原因は、候補遺伝子の絞り込みが甘かったことにあるのではなく、活性測定法に問題があった可能性が高いと考えた。当該酵素は極性の低い化合物を極性の高い化合物に変換するという点において、極性の高い化合物をさらに極性の高い化合物に変換する第二、及び第三配糖化酵素と性質が大きく異なっている。この基質捕捉の性質の相違が酵素タンパクの安定性に深く関与しているのではないかと考えた。不安定性のため大腸菌での活性測定が不可能であり、さらに、酵母での活性測定を難しくしていると考えられた。本研究では酵母での活性測定の改良を行なった。従来の活性測定法は、当該遺伝子を酵母で発現させ無細胞液を調製し、*in vitro* の反応を行なうという方法であったが、上述の不安定性を考慮し無細胞系の反応ではなく、酵母内での反応を利用して活性測定を行なうことにした。酵母には糖供与体となる UDP-グルクロン酸が存在していない。酵母内で配糖化させるには、酵母内で UDP-グルクロン酸を作り、蓄積させる必要がある。

植物では、UDP-グルクロン酸は、UDP-グルコースが UDP-グルコース脱水素酵素により酸化を受け生産される。まず、酵母内で UDP-グルクロン酸を生産させるために、ダイズから UDP-グルコース脱水素酵素をクローニングし、酵母共発現ベクターに組み込むことにした。具体的には、以下のとおりである。

(1) 既知のダイズ由来 UDP-グルコース脱水素酵素 (Glyma08g26520、Tenhaken R., and Thulke O., *Plant Physiol.*, **112**,1127-1134 (1996)) の N 末、C 末の配列に対応するオリゴ DNA を合成し、ダイズの mRNA を鋳型に RT-PCR を行なった。増幅された断片を酵母共発現ベクターにサブクローニングし、PCR に由来する誤りがないクローンを選択した。得られたクローンは、1,443bp からなる ORF を有し、480 個のアミノ酸からなるタンパクをコードしていた。(2) 得られたプラスミドを市販の酵母 *InvSc2* に導入した。形質転換酵母を培養し、ガラクトースで発現を誘導後、培地をリン酸緩衝液に置換し、生成物を蓄積させた。酵母を収穫し、細胞を破碎後、生成物をブタノールで抽出した。ブタノールを除去し、残渣をメタノールに溶解した。得られたメタノール溶液を逆相 HPLC で解析した。空ベクターで形質転換した酵母の抽出液では UDP-グルコースに対応するピークが検出された。一方、ダイズ由来 UDP-グルコース脱水素酵素遺伝子を組み込んだプラスミドで形質転換した酵母の抽出液では UDP-グルコースに対応するピークの強度が減少し、新たに、UDP-グルクロン酸に対応するピークが検出された。

上記(1)及び(2)により、トリテルペン第一配糖化酵素の活性同定系の構築に成功した。

次に、トリテルペン第一配糖化酵素の候補遺伝子の探索を行なった。Dixon ら (Dixon *et al*, *Plant Cell.*, **22** (3), 850-866 (2010)) は、タルウマゴヤシのトリテルペン生合成において、他の β -アミリン合成酵素などの生合成遺伝子と協奏的に発現する遺伝子の探索を行なっている。Dixon らは、結果としてトリテルペン第一配糖化酵素同定には至らなかったが、この論文を詳細に読むことにより本研究に有益な情報を得ることができた。Dixon らは、発現解析から 9 種の候補遺伝子を選択した。その中から 4 種を選択して、大腸菌で発現させ活性を調べ、その中の 1 個に hederagenin の C28 位にグルコースを転移する活性を見いだした。9 種から 4 種を選択した根拠は明確には記載されていない。私は、残りの 5 個の遺伝子にも同等の可能性はあるはずと考え、さらに詳細に検討した。5 個のうちの一つである Medtr4g130290 は、第 4 染色体上にあり、その位置はスクアレノエポキシダーゼの近傍にある。しかもスクアレノ合成酵素、 β -アミリン合成酵素、 β -アミリン水酸化酵素も同じ染色体上にある。さらに、 β -アミリン合成酵素、 β -アミリン水酸化酵素と発現の挙動を同じくしている。

上記の理由により、まず最初にダイズに存在する Medtr4g130290 に相同性の高いクローンを第一配糖化酵素の候補遺伝子として検討することにした。

(3) Medtr4g130290 のアミノ酸配列を利用してダイズゲノムデータベースに対して BLAST 検索を行い、相同性の高いクローン Glyma.02g104600 を見出した。

(4) Glyma.02g104600 の N 末、C 末の配列に対応するオリゴ DNA を合成し、ダイズの mRNA を鋳型に RT-PCR を行ったところ、1.4kbp の大きさの DNA 断片が増幅された。この DNA 断片を、既に構築済みの pESC-DH (2 種の異なった遺伝子を発現させることができる酵母発現ベクターの片側のサイトに UDP-グルコース脱水素酵素遺伝子を組み込んだプラスミド) に組み込んだ。シークエンスを行い、PCR により生じるエラーを含まないクローンを選択した。pESC-DH-GT640 と命名した。

(5) pESC-DH-GT640 を酵母 *InvSc2* に導入した。形質転換酵母を培養し、発現を誘導後、培地をリン酸緩衝液に置換し、生成物を蓄積させた。酵母を収穫し、培地をブタノールで抽出、及び酵母細胞を破碎後ブタノールで抽出した。ブタノールを除去し、残渣をメタノールに溶解した。得られたメタノール溶液を逆相 HPLC で解析した。培地をブタノールで抽出したものに、極めて低強度ではあったがソヤサボゲノール B と同一の保持時間を有するピークが検出された。

活性が極めて微弱であったので、実験を繰り返し行い、再現性を複数回検討した。その結果、再現性は見られず Glyma.02g104600 の活性は false であるという結論に至った。そこで、候補遺伝子の対象を広げることにした。(i)根で高発現しているもの(ii)種子で高発現しているもの

(iii)芽生で高発現しているもの(iv)生合成の上流にある β -アミリン合成酵素と強い相関があるもの(4)ステロール配糖化酵素とアミノ酸配列で相同性が高いもの(v)精製酵素の情報から脂溶性の高いもの、及び分子量が一致するもの、などを候補の基準として候補遺伝子 30 種を選び出した。これまで、合計 19 種について活性を調べた。これまでのところ有意な活性は見いだせていない。引き続き他候補遺伝子の 11 種について活性を検討している。

4. 研究成果

トリテルペンの大量生産系の構築を最終目的として研究を行なった。酵母に大量生産させるには、細胞内から細胞外へ排出させることが必須であると考え、研究開始時点で同定されていない第一配糖化酵素のクローニングを優先させて研究を行なった。これまでクローニングされていない理由の一つに酵素自身の不安定性があると考え、無細胞系を使用しない酵母を利用した活性測定系の構築を行なった。ダイズ由来 UDP-グルコース脱水素酵素をクローニングし、2種の異なった遺伝子を発現させることができる酵母発現ベクターの片側のクローニングサイトに組み込み pESC-DH を構築した。この UDP-グルコース脱水素酵素が酵母内で発現することにより、酵母内に、本来存在しない UDP-グルクロン酸を蓄積させることに成功した。pESC-DH の他方のクローニングサイトに第一配糖化酵素の候補遺伝子を組み込み、酵母で、UDP-グルコース脱水素酵素と同時に発現させソヤサポゲノール B に対するグルクロン酸転移活性を調べた。これまで 20 種について活性を調べたが、これまでのところ有意な活性は見いだせていない。引き続き他候補遺伝子の 11 種について活性を検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

※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、研究者個人に帰属されます。