

令和元年6月17日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08314

研究課題名(和文)サイコサポニン生合成機構の解明および酵母による生産

研究課題名(英文)Elucidation of saikosaponin biosynthesis mechanism and saikosaponin production by yeast

研究代表者

野路 征昭 (Masaaki, Noji)

徳島文理大学・薬学部・准教授

研究者番号：80271534

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)：ミシマサイコのESTデータベースを検索することで、これまでに単離された -アミリンの28位の炭素を水酸化するシトクロムP450、R144792と、16位の炭素を水酸化する酵素、Rnn2525に加え、23位を水酸化するR144574、16位を水酸化するRnn9542および13位と28位間のエーテル結合を形成するCL4443を単離した。これでサイコサポニン生合成に関与する全てのシトクロムP450を同定することに成功した。これらの酵素遺伝子を酵母で発現させた結果、ミシマサイコの主要なサポニンであるサイコサポニンAのアグリコン、サイコゲニンFを生産させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サイコサポニン生合成に関与する全てのシトクロムP450を同定することに成功したことで、植物がつくる複雑な二次代謝物の生合成機構の解明が可能となった。またミシマサイコのサイコサポニン生合成に関与する酵素の6遺伝子を酵母内で同時に発現させることに成功した。その結果、ミシマサイコの主要なサポニンであるサイコサポニンAのアグリコンを酵母で生産させることに成功した。このことにより、酵母を用いて植物が産生する有用な代謝物を早く、大量につくりだすための基盤作りに成功したといえる。

研究成果の概要(英文)：By searching the EST databases of *Bupleurum falcatum* L., we have isolated three cDNAs of cytochrome P450, R144574, which hydroxylates the carbon at position 23 of -amyrin, Rnn9542 hydroxylating C-16, and CL4443 forming an ether linkage between C-13 and C-28, in addition to R144792 hydroxylating C-28, and Rnn 2525 hydroxylating C-16, which have so far been identified as the cytochrome P450s involved in saikosaponin biosynthesis. As a consequence, we successfully identified all the cytochrome P450s involved in saikosaponin biosynthesis. Furthermore, as a result of expressing these enzyme genes in yeast, we succeeded in producing saikogenin F, the aglycone of saikosaponin A, which is one of a major saponin of *B. falcatum* L..

研究分野：天然資源系薬学

キーワード：サイコサポニン 生合成 シトクロムP450

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物は、薬用資源、食料、工業原料として大変有用であるが、これら植物の有用性は、植物が作り出す 20 万 ~ 100 万種にもものぼる代謝物によるものである。このように植物は多種多様な物質生産能力をもつことから、植物は有用物質生産に關与する遺伝子資源の宝庫であるといえる。植物の有する化学的多様性の遺伝子レベルでの解明とその応用は、人口の爆発的増加とそれに伴う感染症の拡大、食料問題、環境破壊など地球規模での諸問題の解決のために極めて重要なテーマである。

ミシマサイコは生薬「柴胡」の基原植物で、その根である「柴胡」は、漢方で解熱、抗炎症などを目標に慢性肝炎、慢性腎炎などに用いられ、小柴胡湯、柴胡桂枝湯、柴苓湯、四逆散などの漢方方剤に配合されている。ミシマサイコの薬用成分であるオレアナン型トリテルペンサポニン(サイコサポニン A, C, D など)には、中枢抑制(強い鎮痛、鎮静)、抗炎症、解熱、抗潰瘍、肝タンパク質合成促進、肝グリコーゲン量増加、コレステロール低下作用が認められている。この重要な薬用植物であるミシマサイコから、薬用成分であるサイコサポニン生合成に關与する酵素等の遺伝子の単離、解析を行い、ミシマサイコのサイコサポニン生合成の分子機構の全容を解明すると同時に、形質転換酵母を用いた、設計・合成生物学的な手法によって薬用植物資源の化学的多様性を合理的にエンジニアすることを目的とした。

サイコサポニンはオキドスクアレンが閉環して生じる 5 環性トリテルペンである。-アミリンの 16 位、23 位、28 位の炭素のシトクロム P450 による水酸化、13 位と 28 位の炭素が酸素原子を介してエーテル結合することで、環状エーテルが形成される過程、およびアグリコンであるサイコゲニンの配糖体化により生合成されると考えられるが、その全容は未だ明らかになっていない。これまでに我々はミシマサイコのサイコサポニン生合成の全容を分子生物学的に解明するための効率的な方法として、次世代シーケンサーを用いて、ミシマサイコの根、茎、葉それぞれの部位で発現している全ての mRNA の配列の配列を決定することによるトランスクリプトーム解析を行い、ミシマサイコの根、茎および根の EST (expressed sequence tag) データベースを作成した。この EST データベースを BLAST 検索することで、スクアレン合成酵素遺伝子を 1 個、スクアレンエポキシダーゼを 3 個、オキドスクアレンを閉環する酵素遺伝子を 6 個推定することが出来た。その結果をもとに、オキドスクアレン閉環酵素遺伝子の cDNA クローニングを行い、6 個の cDNA (BfOSC1 ~ 6) を単離した。これら cDNA を酵母で発現させ機能解析を行った結果、BfOSC1, 6 はシクロアルテノール合成酵素、BfOSC2, 5 が -アミリン合成酵素、BfOSC3, 4 は副生成物として -アミリンも合成するが、-アミリン合成酵素活性をもつことを明らかにしてきた。また、次世代シーケンサー解析により得られた短いリード配列を各 BfOSC のコード領域配列にマッピングすることにより、*in silico* 発現解析を行った結果、

-アミリン合成酵素は根で、-アミリン合成酵素は葉、茎でより多く発現していることが示唆された。またシクロアルテノール合成酵素は根、茎、葉で同程度発現していると予想された。以上のように、ミシマサイコで発現している全てのオキドスクアレン閉環酵素遺伝子のクローニング、機能解析に成功した。次にサイコゲニン合成に關与するシトクロム P450 について研究を行った結果、-アミリンの 28 位を水酸化するシトクロム P450、および 16 位を水酸化するシトクロム P450 を含む 13 個の新規シトクロム P450 遺伝子をミシマサイコから単離することに成功した。さらに、これら遺伝子の機能解析を酵母を用いて行う過程において、シトクロム P450 の活性発現に必要なシトクロム P450 還元酵素遺伝子も 3 種、ミシマサイコから単離している。

2. 研究の目的

小柴胡湯、柴胡桂枝湯、柴苓湯、四逆散などの重要な漢方方剤に配合されている生薬「柴胡」の基原植物であるミシマサイコ (*Bupleurum falcatum* L.) の主要薬用成分であるサイコサポニンの生合成に關与する酵素群の遺伝子を単離、解析することで、サイコサポニン生合成の分子機構の全容を解明すると同時に、得られたサイコサポニン生合成に關与する遺伝子を酵母に導入することで、酵母による薬用植物成分の生産の可能性について検討することを目的とし、以下の研究を行う。

- ・ミシマサイコにおけるサイコサポニン生合成に關与すると考えられる未同定のシトクロム P450、およびサイコゲニン配糖体化酵素遺伝子の同定と機能解析を進める。また、-アミリンの 13 位と 28 位の炭素が酸素原子を介してエーテル結合することで、環状エーテルが形成される過程についても、その詳細を明らかにする。

- ・得られた複数の鍵酵素を酵母をプラットフォームとした異種発現系により発現させることで、薬用植物ミシマサイコの細胞内で行われているサイコサポニン生合成の全過程を酵母内で再現させ、設計・合成生物学的な手法によって薬用植物の化学的多様性を合理的にエンジニアする。

3. 研究の方法

ミシマサイコのサイコサポニン生合成に關与している酵素遺伝子のうち未だ同定のされていないシトクロム P450 について、cDNA クローニングを行い、その機能を解析する。またサイコゲニンの配糖体化酵素についてもシトクロム P450 と同様の方法で同定を試みる。その方法は、

作成したミシマサイコの EST データを、他植物で同定された -アミリンを基質とするシトクロム P450 とのアミノ酸配列の相同性や、ミシマサイコの葉、茎、根での遺伝子発現パターンの解析により候補を選定する。また、得られた遺伝子資源の有効利用を目的に、酵素遺伝子を組み込んだ遺伝子組換え酵母の作製を試み、酵母による有用薬用成分生合成の可能性について検討する。

4. 研究成果

-アミリンの 23 位の酸化に関わると考えられるシトクロム P450 を同定するために、オレアノール酸の 23 位を水酸化するタルウマゴヤシの CYP72A68v2 と類似したアミノ酸配列をもつシトクロム P450 候補を 12 種選定し、これらの cDNA の単離を試みた。その中でシトクロム P450、R144574 について、-アミリンの 28 位が水酸化された Erythrodiol を生合成する酵母で発現させたところ、23 位が酸化されている新たな代謝物を生産していることが明らかとなった。以上の結果より、R144574 はサイコサポニン A および D の生合成に関わるシトクロム P450 の 1 つであると考えられる。

次に、-アミリンの 16 位を水酸化すると報告のあったキキョウの CYP716A141 と類似したアミノ酸配列をもつシトクロム P450 候補 2 種を選定し、その中の 1 つ、Rnn9541 を酵母で発現させたところ、16 水酸化体の産生が確認された。

これまでに我々が同定した 16 位、16 位、23 位、28 位の水酸化を触媒するシトクロム P450 遺伝子のミシマサイコでの葉・茎・根の発現量を解析したところ、その発現パターンの類似性が非常に高かった。そこで、-アミリンの 13 位と 28 位間のエーテル結合形成にもシトクロム P450 が関与していると考えらるならば、同様な発現パターンを示すと予測し、K-means 法を用いた発現パターン分類や、系統樹や発現量比較による解析を行った。その結果シトクロム P450 遺伝子 CL4443 を選定し、形質転換酵母に導入したところ、-アミリンの 13 位と 28 位間にエーテル結合が確認された。このことより、CL4443 はサイコゲニン生合成に必要な環化反応を触媒するシトクロム P450 であることが明らかとなった。以上の結果により、ミシマサイコにおいてサイコサポニン生合成に関与する全てのシトクロム P450 遺伝子を同定することに成功した。

次に酵母を用いた薬用成分の生産を目指して、これまでに得られたミシマサイコ由来のサイコサポニン生合成酵素をさまざまな組み合わせで同時に発現させ、サイコゲニンおよびその関連化合物の生産を試みた。その中でも、-アミリンを生産する酵母に -アミリンの 16、23、28 位の水酸化酵素遺伝子と 13 位 28 位間の環化酵素遺伝子およびシトクロム P450 の活性に必要なシトクロム P450 還元酵素遺伝子の計 6 個の酵素遺伝子を導入し、同時に発現させたところ、目的の化合物であるサイコゲニン F とサイコゲニン F の代謝物と考えられるサイコゲニン A を酵母で生産させることに成功した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

1. Kaemgalangol A: Unusual seco-isopimarane diterpenoid from aromatic ginger *Kaempferia galanga*. Swapana, N., Tominaga, T., Suenaga, M., Imagawa, H., Noji, M., Elshamy, A., I., Ibrahim, M., A., A., Hegazy, M., F., Brajakishor, S., C., Umeyama, A. *Fitoterapia* **129**, 47-53 (2018) 査読有り
2. A New Diphenyl Ether Glycoside from *Xylosma longifolium* Collected from North-East India. N. Swapana, N., Noji, M., Nishiuma, R., Izumi, M., Imagawa, H., Kasai, Y., Okamoto, Y., Iseki, K., Singh, Ch. B., Asakawa, Y., Umeyama, A., *Nat. Prod. Commun.*, **12**, 1273-1275 (2017) 査読有り
3. Phenolic Constituents, Anti-Inflammatory and Antidiabetic Activities of *Cyperus Laevigatus* L. Elshamy, A., I., El-Shazly, M., Yassine, Y., M., El-Bana, M., A., Farrag, A., Nassar, M., I., Noji, M., Umeyama, A., *Pharmacognosy J.* **9**(6) 828-833 (2017) 査読有り
4. Six new lanostane triterpenoids from the fruiting body of *Tyromyces sambuceus* and antiproliferative activity. Kokudo, N., Okazoe, M., Takahashi, J., Iseki, K., Yoshikawa, K., Imagawa, H., Hashimoto, T., Noji, M., Umeyama, A., *Nat. Prod. Commun.*, **11**, 169-172 (2016) 査読有り
5. Two novel diphenolic metabolites from the inedible mushroom *Thelephora palmate*. Nishio, A., Mikami, H., Imagawa, H., Hashimoto, T., Tanaka, M., Ito, T., Iguchi, M., Iseki, K., Noji, M., Umeyama, A., *Nat. Prod. Commun.*, **11**, 1147-1149 (2016) 査読有り
6. In vitro antitrypanosomal activity of the secondary metabolites from the mutant strain IU-3 of the insect pathogenic fungus *Ophiocordyceps coccidiicola* NBRC 100683. Ganaha, M., Yoshii, K., Ōtsuki, Y., Iguchi, M., Okamoto, Y., Iseki, K., Ban, S., Ishiyama, A., Hokari, R., Iwatsuki, M., Otoguro, K., Ōmura, S., Hashimoto, T., Noji, M., Umeyama, A., *Chem. Pharm. Bull.*, **64**, 988-990 (2016) 査読有り
7. Comparative analysis of transcriptomes in aerial stems and roots of *Ephedra sinica* based on high-throughput mRNA sequencing. Okada, T., Seki, S., Takahashi, H., Noji, M., Kenmoku, H., Toyota, M., Asakawa, Y., Suzuki, Y., Sugano, S., Kanaya, S., Kawahara, N., *Genomics Data*, **10**, 4-11 (2016) 査読有り
8. Cloning and functional analysis of three chalcone synthases from the flowers of safflowers

Carthamus tinctorius. Shinozaki, J., Kenmoku, H., Nihei, K., Masuda, K., Noji, M., Konno, K., Asakawa, Y., Kazuma, K., *Nat. Prod. Commun.*, **11**, 1147-1149 (2016) 査読有り

〔学会発表〕(計 8件)

1. サイコサポニン生合成に関する酵素遺伝子群の探索, 中西亜季, 野路征昭, 西澤奨, 兼目裕充, 米山達朗, 梅山明美, 日本薬学会第 139 年会 (千葉), 2019. 3.20-23 .
2. 酵母を用いたサイコゲニンおよびその関連化合物の生産, 大橋幸治, 野路征昭, 岡本育子, 米山達朗, 梅山明美, 日本薬学会第 139 年会 (千葉), 2019. 3.20-23 .
3. サイコサポニン A, C の生合成に関する -アミリン 16 位水酸化酵素の探索, 西澤奨, 野路征昭, 米山達朗, 兼目裕充, 岡本育子, 梅山明美, 日本生薬学会第 65 年会 (広島), 2018. 9.16-17 .
4. サイコサポニン生合成に関するシトクロム P450 遺伝子の探索, 遠藤加奈子, 野路征昭, 兼目裕充, 高橋宏暢, 岡田岳人, 浅川義範, 梅山明美, 豊田正夫, 日本薬学会第 137 年会 (仙台), 2017. 3.24-27 .
5. サイコサポニン生合成に関するシトクロム P450 遺伝子の単離と機能解析, 野路征昭, 遠藤加奈子, 兼目裕充, 岡田岳人, 高橋宏暢, 浅川義範, 豊田正夫, 梅山明美, 日本生薬学会第 64 年会 (千葉), 2017. 9.9-10 .
6. ミシマサイコ由来のシトクロム P450 遺伝子の単離と解析, 山口誠美, 野路征昭, 遠藤加奈子, 兼目裕充, 高橋宏暢, 岡田岳人, 浅川義範, 梅山明美, 豊田正夫, 日本薬学会第 136 年会 (横浜), 2016. 3.26-29 .
7. サイコサポニン生合成に関する糖転移酵素遺伝子の探索, 新見明子, 野路征昭, 西森千晶, 兼目裕充, 高橋宏暢, 岡田岳人, 浅川義範, 梅山明美, 豊田正夫, 日本薬学会第 136 年会 (横浜), 2016. 3.26-29 .
8. サイコサポニン生合成に関するシトクロム P450 および糖転移酵素の探索, 野路征昭, 山口誠美, 新見明子, 兼目裕充, 岡田岳人, 高橋宏暢, 浅川義範, 豊田正夫, 梅山明美, 日本生薬学会第 63 年会 (富山), 2016. 9.24-25 .

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。