

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05825

研究課題名(和文) ムラサキが生産する脂溶性二次代謝産物の生合成および排出機構の解明

研究課題名(英文) Biosynthesis and efflux mechanisms of secondary metabolites produced by *Lithospermum erythrorhizon*

研究代表者

高梨 功次郎 (Takanashi, Kojiro)

信州大学・学術研究院理学系・准教授

研究者番号：10632119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：薬用植物ムラサキの根は紫根と呼ばれ、創傷治癒促進活性を有する。本研究ではこの薬効の主活性成分であるアセチルシコニンを生産する酵素LeSAT1を見出した。LeSAT1はシコニンにアセチル基を付加する酵素である。さらに本研究では、シコニンの鏡像異性体であるアルカニンにアセチル基を付加するLeAAT1も見出し、LeSAT1と合わせてその特性を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ムラサキを含むムラサキ科植物の数は多様なシコニン・アルカニン誘導体を生産する。その種類と組成は種ごとに異なり、主にアシル基の構造の違いによる多様性が大きい。本研究において、アシル基を付加する酵素を見出したことから、本酵素のムラサキ科植物におけるオルソログを取得することが出来れば、多様なシコニン・アルカニン誘導体を創出するための基盤を構築することが出来る。

研究成果の概要(英文)：Several Boraginaceae plants produce biologically active red naphthoquinone pigments, derivatives of the enantiomers shikonin and alkannin, which vary in acyl groups on their side chains. Compositions of shikonin/alkannin derivatives vary in plant species, but the mechanisms generating the diversity of shikonin/alkannin derivatives are largely unknown. This study identified and characterized two BAHD acyltransferases, shikonin O-acyltransferase (LeSAT1) and alkannin O-acyltransferase (LeAAT1), from *Lithospermum erythrorhizon*, a medicinal plant in the family Boraginaceae used in East Asia.

研究分野：植物生化学

キーワード：シコニン アシル基転移酵素 アルカニン ムラサキ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物は多種多様な二次代謝産物を生産し、その中には抗がん剤などの医薬品や染料に使われるものも少なくない。薬用植物ムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon*) が生産する脂溶性二次代謝産物であるシコニン誘導体は抗菌活性や抗腫瘍活性を有することから、ムラサキの根を乾燥させたものは「紫根」と呼ばれ、古くから生薬として用いられてきた。さらに、1970年代には高いシコニン生産性を示すムラサキの培養細胞が開発され、世界で初めて植物培養細胞を用いた有用物質の工業生産化に至った。ムラサキはシコニン誘導体を小胞輸送で細胞外に排出するため、シコニンの回収が容易であることが工業化に至った一因であるが、その排出機構の詳細は未解明のままである。また、シコニンはシキミ酸経路由来の *p*-hydroxybenzoic acid とメバロン酸経路産物である geranyl diphosphate のゲラニル基がプレニル基転移酵素である LePGT により結合し、geranylhydroquinone (GHQ) となった後、ナフトキノ骨格形成を経て生合成されるが、LePGT 以降の生合成酵素は明らかになっていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究開始前に GHQ 以降のシコニン生合成経路の解明、およびシコニンの排出機構解明を目的として、シコニン生産条件および非生産条件の培養細胞を用いた RNA-seq とプロテオーム解析を行い、シコニンを生産する条件でのみ発現が上昇する生合成酵素を複数見出した。その中に二次代謝産物のアシル化に関与することが多い BAHD アシル基転移酵素を 2 分子種見出したことから、本研究ではこの酵素の諸特性を調べることを目的とした。さらに、シコニンのアセチル化は細胞外への輸送小胞 (シコニン小胞) 内で行われると推測されていることから、本アシル基転移酵素の細胞内局在および相互作用するタンパク質を調べることで、シコニン誘導体の排出機構の一端を明らかにすることも目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) アシル基転移酵素の機能解析

解析対象のアシル基転移酵素 2 分子種をクローニングし、大腸菌およびタバコ (*Nicotiana benthamiana*) を用いた異種タンパク発現系において酵素活性を測定する。シコニンのアセチル化反応を触媒した場合、アセチル CoA 以外のアシル CoA を用いた基質特異性解析や、速度論的解析、発現解析を行い、詳細な酵素特性を明らかにする。

#### (2) アシル基転移酵素の細胞内局在解析

アシル基転移酵素に蛍光タンパク質 (GFP) を結合し、タバコ葉に発現させる。発現葉を蛍光顕微鏡を用いて観察することで、アシル基転移酵素の細胞内局在を調べる。

#### (3) アシル基転移酵素と相互作用するタンパク質の同定

デオキシシコニンからシコニンを経るアセチルシコニンの生成は、ムラサキ培養細胞の膜画面上にあるタンパク質により 1 段階の反応により行われる。そのため、シコニン小胞上にはシコニンのアセチル化を行う酵素と、デオキシシコニンの水酸化を行う酵素 (P450 を想定している) が複合体を形成していると推測されている。そこで、ムラサキ培養細胞においてシコニン生産時に発現上昇していた P450 をリスト化し、アシル基転移酵素と相互作用する分子種を同定するために、プルダウンアッセイおよび酵母ツーハイブリッド法を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) アシル基転移酵素の機能解析

解析対象のアシル基転移酵素 2 分子種は、それぞれシコニンとアルカニンを特異的に認識してアセチル基を転移したことからそれぞれ LeSAT1 (shikonin *O*-acyltransferase)、LeAAT1 (alkannin *O*-acyltransferase) と名付けた。これらは鏡像異性体特異的アシル基転移酵素として、ニチニチソウのモノテルペンインドールアルカロイド生合成に関与するものに次ぐ 2 例目となった。アセチル基に加えて 2 分子種ともイソバレリル基やイソブチリル基も転移したが、側鎖が長くなるにつれて活性は減少した。このことから、ムラサキの根においてシコニン・アルカニンのアセチル誘導体が最も多いのは、LeSAT1 および LeAAT1 がアセチル基に対して最大活性を示すからと考えられた。

#### (2) アシル基転移酵素の細胞内局在解析

LeSAT1 および LeAAT1 の C 末端に GFP を連結し、タバコ葉における蛍光を観察したところ、それぞれミトコンドリアと細胞質で蛍光を発した。シグナルペプチド予測プログラムを用いても LeSAT1 にミトコンドリア局在シグナルは見つからず、また N 末端を削るとアシル基転移活性を失ったことから、LeSAT1 の局在機構は未解明のままである。

( 3 ) アシル基転移酵素と相互作用するタンパク質の同定

シコニン生産時に発現上昇していた P450 をリスト化しデオキシシコニンを基質とした酵素アッセイを行ったところ、1 分子種がシコニンへの変換活性を有していた。この P450 と LeSAT1 もしくは LeAAT1 との間の相互作用の有無を、プルダウンアッセイおよび酵母ツーハイブリッド法を用いて調べたが、明確な相互作用は検出されなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Haruka Oshikiri, Bunta Watanabe, Hirobumi Yamamoto, Kazufumi Yazaki, Kojiro Takanashi	4. 巻 184
2. 論文標題 Two BAHD Acyltransferases Catalyze the Last Step in the Shikonin/Alkannin Biosynthetic Pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 753-761
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1104/pp.20.00207	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 押切春佳, 渡辺文太, 山本浩文, 矢崎一史, 高梨功次郎
2. 発表標題 シコニンおよびアルカニン類縁体を生成するアシル基転移酵素の解析
3. 学会等名 第30回イソプレノイド研究会例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 押切春佳, 李豪, 渡辺文太, 山本浩文, 矢崎一史, 高梨功次郎
2. 発表標題 ムラサキのシコニン・アルカニン類縁体生産におけるアシル基転移酵素の機能分化
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉村和貴, 渡辺文太, 中川友喜美, 矢崎一史, 高梨功次郎
2. 発表標題 シコニン/アルカニン生合成経路で働く geranylhydroquinone 水酸化酵素の基質特異性
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 押切春佳、渡辺文太、山本浩文、矢崎一史、高梨功次郎
2. 発表標題 ムラサキのシコニン・アルカニン類縁体生合成に關与する立体特異的なアシル基転移酵素の解析
3. 学会等名 第37回日本植物細胞分子生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 押切春佳、李豪、渡辺文太、山本浩文、矢崎一史、高梨功次郎
2. 発表標題 ムラサキにおけるシコニン・アルカニンアシル基転移酵素の機能分化
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉村和貴、中川友喜美、渡辺 文太、矢崎 一史、高梨 功次郎
2. 発表標題 ムラサキのシコニン生合成に關与する Cytochrome P450 の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 押切春佳、李豪、眞辺美咲、山本浩文、矢崎一史、高梨功次郎
2. 発表標題 ムラサキ科におけるシコニン・アルカニンアシル基転移酵素の分子進化
3. 学会等名 農芸化学会2022年大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大塚峻、市野琢爾、吉村和貴、李豪、山本浩文、矢崎一史、高梨功次郎
2. 発表標題 シコニン / アルカニン 生合成経路で働くデオキシシコニン水酸化酵素の機能解析
3. 学会等名 農芸化学会2022年大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

信州大学理学部理学科生物学コース 高梨研究室HP  
<https://sites.google.com/site/molecularsymbiology/>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関