

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07097

研究課題名(和文) 薬用植物における機能性含硫黄成分の生合成酵素群の同定とその応用

研究課題名(英文) Identification of enzymes involved in the biosynthesis of bioactive sulfur-containing compounds in medicinal plants and its downstream application

研究代表者

吉本 尚子 (YOSHIMOTO, Naoko)

千葉大学・大学院薬学研究院・講師

研究者番号：10415333

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)：システインスルホキシド誘導体(CSOs)はヒガンバナ科のネギ属やツルバギア属、ノウゼンカズラ科ニンニクカズラ属等に属する植物が生産する薬学的に重要な機能性含硫黄成分である。本研究では、これらの植物におけるCSOs含有量に影響する外的・内的要因について解析した。その解析結果と、CSOs含有植物の部位別ディープ・トランスクリプトームデータを利用し、CSOsの生合成に関わる酵素遺伝子の候補を探索した。さらに、候補遺伝子のコード領域をクローニングし、異種発現系を用いた機能解析や植物組織別の遺伝子発現量の解析等を行うことで、候補遺伝子のCSOs生合成における役割を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、植物が生産する機能性含硫黄成分であるCSOsについての生合成の分子基盤を明らかにするものである。本研究結果は、人類にとって有用な含硫黄成分の効率的な生物生産系を合成生物学的アプローチによって構築するための基礎的知見として役立つものであり、天然に存在する有用遺伝子資源の探索と活用としての意義がある。

研究成果の概要(英文)：S-Alk(en)ylcysteine sulfoxides (CSOs) are sulfur-containing health-beneficial compounds characteristically found in plants belonging to Allium, Tulbaghia, and Mansoa. In this study, we found some environmental and developmental factors that affect the content of CSOs. Using the information on the factors affecting the CSOs content and the deep-transcriptome data, we identified enzymatic genes potentially involved in the biosynthesis of CSOs. Some genes were confirmed for their function in the biosynthesis of CSOs by analyzing the catalytic function of the encoded protein and the tissue-specific gene expression patterns.

研究分野：生合成

キーワード：天然薬用資源 植物 生合成 遺伝子 含硫黄成分

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

システインスルホキシド誘導体 (CSOs) はヒガンバナ科のネギ属やツルバギア属、ノウゼンカズラ科ニンニクカズラ属等に属する植物が生産する含硫黄成分であり (図1) 植物組織の損傷に伴い酵素的および非酵素的な反応を経て、抗微生物活性、発癌抑制活性、免疫賦活作用、血小板凝集抑制作用、コレステロールおよびトリグリセリド低下作用等の重要な薬理活性を示す多様な硫黄化合物群に変換される (引用文献)。実際、ネギ属を代表する植物であるニンニクは、古くから強壮作用や駆虫作用を示す薬用植物 [生薬名: 大蒜 (タイサン)] として世界中で使用されており、また、1990年代には米国国立癌研究所の研究により癌予防に最も効果が高い野菜であると報告されている。

CSOsの生合成に関わる酵素を同定しようとする試みは1990年代からなされていたが、実際に分子レベルで明らかにされた文献報告は、我々が2015年に発表したニンニクの代表的なCSOsであるアリインの生合成に関わる脱グルタミル化酵素 (AsGGT1, AsGGT2, AsGGT3) とS酸化酵素 (AsFMO1) に限られていた (引用文献)。これらの生合成酵素の同定は、ネギ属植物の公開EST (mRNAの断片的な配列情報; Expressed Sequence Tag) 配列群の機能アノテーション解析に基づき行った。さらに、我々はCSOs生合成の分子機構の全容解明を目指し、植物部位別ディープ・トランスクリプトームデータと含硫黄代謝物プロファイルの統合解析によるCSOs生合成関連酵素の探索を進めた。その過程で、CSOsの生合成の効率に影響する要因を解明することでCSOs生合成関連酵素の同定を効率的に進められるとの発想に至った。CSOs生合成関連遺伝子が分子レベルで同定されれば、遺伝子配列の人為的改変による機能拡張や、合成生物学的手法によるCSOs関連有用化合物の生物生産系を開発することが可能となり、将来的には天然に存在する遺伝子資源の活用にも貢献できると考えられた。

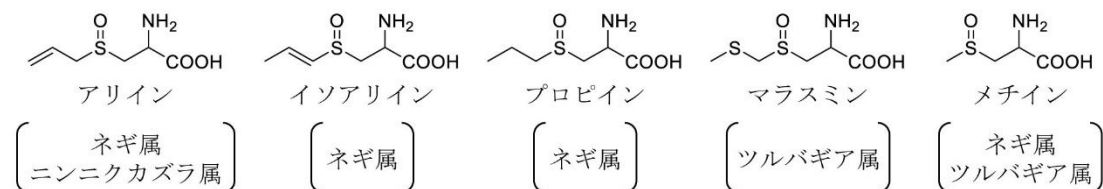


図1 植物の代表的なCSOsと、含有する植物の属名

2. 研究の目的

本研究の目的は、天然薬用植物資源 (ネギ属、ツルバギア属、ニンニクカズラ属植物等) における代表的な機能性含硫黄成分であるCSOsの生合成の分子基盤を明らかにし、CSOsおよび関連する機能性含硫黄成分の生物生産系の合理的構築の道筋を立てることである。本研究成果は、将来的に天然に存在する重要遺伝子資源の有効かつ持続的な利用とそれによる人類の健康増進に役立てられると期待できる。

3. 研究の方法

CSOsの生合成に関わる遺伝子の探索を行うために、CSOs含有量に影響する要因 (細胞分化、エリシター投与等) の解析と、CSOs生産植物の部位別ディープ・トランスクリプトームデータの機能アノテーション解析を行った。ディープ・トランスクリプトームデータは当研究グループで既に取得していたものを使用した。CSOsや関連化合物の定性定量分析は、HPLCやLC-MSを用いて行った。遺伝子のクローニングや機能解析用のプラスミド構築や異種発現は、一般的な分子生物学的手法を用いて行った。異種発現により得た組換えタンパク質の抽出や精製、酵素活性測定は、一般的な生化学的手法を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 細胞分化がCSOs含有量へ与える影響の解析

一般的に植物をカルス化することで、二次代謝成分の生産性が変化する例が多くみられる。そこで、代表的なネギ属植物 [タマネギ (*Allium cepa*)、ネギ (*Allium fistulosum*)、ニラ (*Allium*

tuberosum)]の植物体とカルスについてCSOsの含有量とCSOsの分解に関わる酵素であるアリイナーゼの活性を測定し、細胞の分化がCSOs含有量やアリイナーゼ活性に与える影響を解析した。タマネギとネギの5週齢の植物体は、イソアリインを主要なCSOとして、メチンを少量CSO成分として含んでいた。それに対し、タマネギとネギのカルスではメチンを主要なCSOとして含み、イソアリイン含有量は低かった。また、ニラの5週齢の植物体では、メチン、アリイン、イソアリインの3種のCSOsをほぼ等濃度で含有していたのに対し、ニラのカルスではメチンを主要なCSOとして含み、アリインやイソアリイン含有量は非常に低かった(図2)。この結果は、解析に用いた3種のネギ属植物種では、CSOsのうちメチンの生合成は未分化細胞でも行うことができるのに対し、アリインやイソアリインの生合成を行うためには細胞の適切な分化が必要であることを示している。次に、植物体とカルスのアリイナーゼ活性を測定したところ、タマネギとネギについてはカルスのアリイナーゼ活性値は植物体の活性値の30%未満であり、細胞の適切な分化がこれら植物種におけるアリイナーゼ活性の発現に必要なことが示唆された。一方、ネギについてはカルスのアリイナーゼ活性値はカルスの系統により大きく異なり、植物体の活性値の11~196%であった。これらの結果は、国際学術誌 *Journal of Natural Medicines* 誌に発表した(引用文献)。

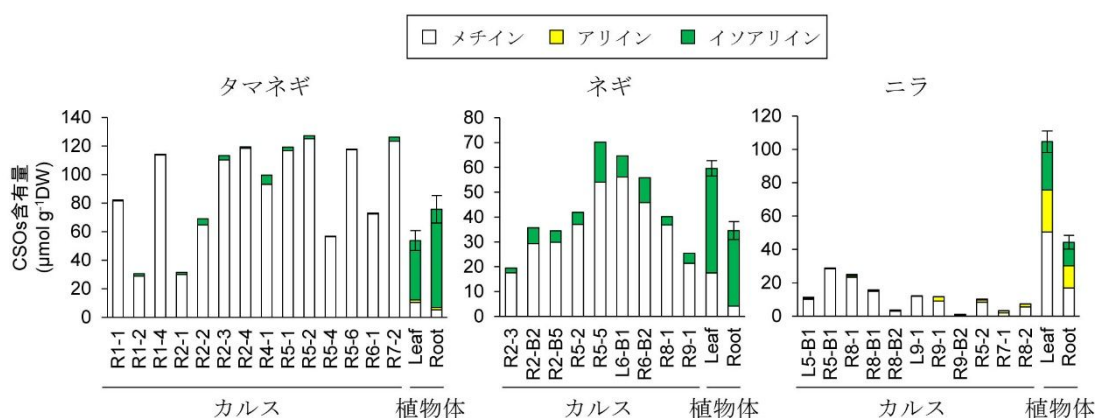


図2 主要ネギ属植物のカルスと植物体におけるCSOs含有量の比較

(2) エリシター処理がCSOs含有量へ与える影響の解析

一般的に、植物二次代謝成分の含有量はエリシターとよばれる化学物質群の投与によって変化することが知られている。そこで、代表的なネギ属植物[ニンニク(*Allium sativum*)、タマネギ、ネギ、ニラ]について各種エリシター処理を行い、CSOs含有量を測定した。また、(1)項によりタマネギ、ネギ、ニラにおいてはカルスと植物体の間でCSOs生合成効率が異なることが示唆されたことから、これらの植物のカルスについてもエリシター処理を行い、CSOs含有量を測定した。その結果、一般的に植物の病傷害ストレス応答に関与することが知られている2種のエリシターの投与により、CSOsの含有量が増加することが示された。また、各エリシター処理によるCSOs含有量の変化の様式は植物種や細胞の分化の有無により異なることから、植物種や細胞の状態によってCSOs生合成経路のうち各エリシターによって調節を受けるポイントが異なることが示唆された。

(3) ディープ・トランスクリプトームデータの機能アノテーション解析に基づくCSOs生合成関連遺伝子の探索と機能同定

CSOsを生産する薬用植物のうち、ネギ属ニンニク、ツルバギア属ツルバギア・ピオラセア(*Tulbaghia violacea*)、ニンニクカズラ属ニンニクカズラ(*Mansoa alliacea*)の部位別ディープ・トランスクリプトームデータについて機能アノテーション解析を行い、CSOsの生合成への関与が推定される遺伝子配列群を抽出した。抽出された配列群の遺伝子発現プロファイルのデータは、適宜、CSOsとその生合成中間体の含有量プロファイルデータと統合解析することで、CSOsやその生合成中間体の蓄積と相関して発現する遺伝子配列をCSOs生合成酵素遺伝子の有力候補として絞り込んだ。絞り込んだ遺伝子配列群は、その配列情報をもとに設計したプライマーを用いてRACE法やRT-PCR法を行うことで、コード領域全長を含むcDNAをクローニングした。得られたcDNAは大腸菌や酵母等の異種生物に導入することで組換えタンパク質を発現させ、*in vitro*酵素反応や推定基質フィーディング実験による機能解析を行った。また、RT-PCR法による植物組織中のmRNA発現量の解析や、GFP融合タンパク質を用いた細胞内局在性解析を行った。これらの結果から、各遺伝子のCSOs生合成における機能を考察した。

特に、ツルバギア・ピオラセアから CSOs 生合成関連遺伝子として同定した *TvMAS1* は、植物のクレード III フラビン含有モノオキシゲナーゼに分類されるタンパク質をコードし、この植物が含有する主要な CSO であるマラスミンの生合成の最終段階において、前駆体スルフィド化合物 *S*-(メチルチオメチル)システインの 4 位の硫黄原子を特異的に酸化することで、スルホキシド化合物であるマラスミンを合成することを明らかにした (図 3)。この結果は、国際学術誌 *Plant Biotechnology* 誌に発表した (引用文献)。

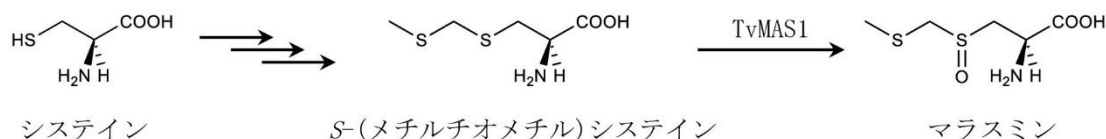


図 3 ツルバギア・ピオラセアのマラスミン生合成におけるTvMAS1の役割

<引用文献>

Naoko Yoshimoto, Kazuki Saito.: *S*-Alk(en)ylcysteine sulfoxides in the genus *Allium*: proposed biosynthesis, chemical conversion, and bioactivities. *J. Exp. Bot.*, 70, 4123-4137 (2019).

Naoko Yoshimoto, Ayami Yabe, Yuka Sugino, Soichiro Murakami, Niti Sai-ngam, Shin-ichiro Sumi, Tadimitsu Tsuneyoshi, Kazuki Saito.: Garlic γ -glutamyl transpeptidases that catalyze deglutamylation of biosynthetic intermediate of alliin. *Front. Plant. Sci.* 5, 758 (2015).

Naoko Yoshimoto, Misato Onuma, Shinya Mizuno, Yuka Sugino, Ryo Nakabayashi, Shinsuke Imai, Tadimitsu Tsuneyoshi, Shin-ichiro Sumi, Kazuki Saito.: Identification of a flavin-containing *S*-oxygenating monooxygenase involved in alliin biosynthesis in garlic. *Plant J.*, 83, 941-951 (2015).

Naoko Yoshimoto, Takashi Asano, Ayuna Kisanuki, Chihiro Kanno, Machiko Asanuma, Mami Yamazaki, Isao Fujii, Kazuki Saito.: The ability of callus tissues induced from three *Allium* plants to accumulate health-beneficial natural products, *S*-alk(en)ylcysteine sulfoxides. *J. Nat. Med.*, 76, 803-810 (2022).

Jichen Wang, Hideyuki Suzuki, Nanako Nakashima, Mariko Kitajima, Hiromitsu Takayama, Kazuki Saito, Mami Yamazaki, Naoko Yoshimoto.: Identification of a regiospecific *S*-oxygenase for the production of marasmin in traditional medicinal plant *Tulbaghia violacea*. *Plant Biotechnol.*, 39, 281-289 (2022).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Naoko Yoshimoto, Takashi Asano, Ayuna Kisanuki, Chihiro Kanno, Machiko Asanuma, Mami Yamazaki, Isao Fujii, Kazuki Saito	4. 巻 76
2. 論文標題 The ability of callus tissues induced from three Allium plants to accumulate health-beneficial natural products, S-alk(en)ylcysteine sulfoxides	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 803-810
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11418-022-01631-4	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 -

1. 著者名 Jichen Wang, Hideyuki Suzuki, Nanako Nakashima, Mariko Kitajima, Hiromitsu Takayama, Kazuki Saito, Mami Yamazaki, Naoko Yoshimoto	4. 巻 39
2. 論文標題 Identification of a regiospecific S-oxygenase for the production of marasmin in traditional medicinal plant Tulbaghia violacea	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 281-289
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.22.0619a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉本尚子, 王吉農, 鈴木秀幸, 中嶋なな子, 北島満里子, 高山廣光, 斉藤和季, 山崎真巳
2. 発表標題 ヒガンバナ科植物Tulbaghia violaceaの機能性含硫成分マラスミンの生合成に関わるS-酸化酵素の同定
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会（札幌）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村田夏奈子, 木佐貫あゆな, 浅野孝, 斉藤和季, 山崎真巳, 吉本尚子
2. 発表標題 ネギ属植物に対するエリシター処理がシステインスルホキシド誘導体の含有量に与える影響の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会（札幌）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤野伊吹, 佐藤朱莉, 吉本尚子, 浅野孝
2. 発表標題 ニンニクにおける効率的なカルス誘導法の確立
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会 (札幌)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉本尚子, 木佐貫あゆな, 浅野孝, 藤井勲, 斉藤和季
2. 発表標題 ネギ属植物カルスにおける硫黄二次代謝能の解析
3. 学会等名 日本生薬学会第67回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋あおい, 石井梨紗子, 鈴木秀幸, 松友利暁, 中本雅斗, 斉藤和季, 山崎真巳, 吉本尚子
2. 発表標題 ニンニクのシステインスルホキシド化合物群の生合成に関わる酵素と共発現するグルタチオン-S-転移酵素の機能解析
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小早川奈央, 浅野雅代, 大岩優海菜, 鈴木秀幸, 松友利暁, 中本雅斗, 斉藤和季, 山崎真巳, 吉本尚子
2. 発表標題 ニンニクのシステインスルホキシド化合物群の生合成におけるグリシル基脱離酵素の同定と機能解析
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Wang Jichen, Hideyuki Suzuki, Nanako Nakashima, Mariko Kitajima, Kazuki Saito, Mami Yamazaki, Naoko Yoshimoto
2. 発表標題 Identification of an S-oxygenase involved in the biosynthesis of marasmin, an antibacterial component in <i>Tulbaghia violacea</i>
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木佐貫あゆな, 浅野孝, 藤井勲, 斉藤和季, 吉本尚子
2. 発表標題 ネギ属植物のカルスにおける硫黄二次代謝能の解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木佐貫あゆな, 浅野孝, 藤井勲, 斉藤和季, 吉本尚子
2. 発表標題 ネギ属植物のカルスの誘導と硫黄二次代謝能の解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担 者	浅野 孝	岩手医科大学・薬学部・助教	
	(ASANO Takashi)		
	(10552888)	(31201)	

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
---------	---------