

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14788

研究課題名(和文) フェニルエタノイド配糖体の効率的バイオ生産に向けた基盤研究

研究課題名(英文) Comprehensive studies for the biotechnological production of phenylethanoid glycosides.

研究代表者

藤 佑志郎 (Fuji, Yushiro)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・特別研究員

研究者番号：90847815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：フェニルエタノイド配糖体(PhGs)は、C6-C2のグルコース配糖体を基本骨格とした化合物の総称である。代表的なPhGsであるアクテオシドは多くの薬用植物中に存在し、様々な薬理作用を示すことから、医薬品としての利用が期待されているが、量産系が課題である。そこでアクテオシド生合成機構の解明を目的にバイオ生産に向けた検討を行った。その結果、ゴマ培養細胞系とエリシテーションによるアクテオシド誘導生産系を用いたトランスクリプトーム解析により、アクテオシド生合成経路の候補遺伝子を選抜した。さらに、組換えタンパク質を用いた機能解析により、PhGsの骨格形成に重要な配糖体化酵素とアシル化転移酵素を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フェニルエタノイド配糖体は様々な薬理作用を示し、医薬品としての利用が期待されるものの量産化が課題であった。本研究の遂行により、フェニルエタノイド配糖体の骨格形成に重要な配糖体化酵素やアシル化転移酵素が明らかとなり、バイオ生産に向けた取り組みに大きく貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Phenylethanoid glycosides (PhGs) are compounds based on C6-C2 glucose glycoside. Acteoside, which is representative PhG, is present in many medicinal plants and is expected to be used as a medicine because of its various pharmacological effects. However, mass production systems have not yet been established. Thus, a study was conducted to elucidate the mechanism of acteoside biosynthesis.

As a result, we selected candidate genes for the acteoside biosynthetic pathway by transcriptome analysis using a sesame cell culture system and an elicitation for acteoside-induced production system. Furthermore, we identified glycosyltransferases and acyltransferases important for the structural formation of PhGs by functional analysis using recombinant proteins.

研究分野：植物生化学

キーワード：フェニルエタノイド配糖体 生合成 アクテオシド ゴマ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

フェニルエタノイド配糖体 (PhGs) は、C₆-C₂のグルコース配糖体を基本骨格とする化合物の総称であり、これまでに 300 種以上同定されている (図 1A). 代表的な PhG であるアクテオシド (図 1B) は、20 科 77 属 150 種以上の薬用植物中に存在し、多様な疾患に対し抗酸化や抗腫瘍、神経保護作用などの様々な薬理作用を示すことから、医薬原料として極めて有望であり、世界的に注目されている。しかし、利用に向けた問題点として、一般的な薬用植物中の含量が極微量であること (0.02~0.4%)、特異的な構造のため化学合成では多段階のステップが必要で低収率であること、バイオ生産は生合成機構が未解明なため生産量が少なく、疾病治療に用いるための量産化が大きな課題となっている。

PhGs の生合成として、アクテオシドの生合成経路 (図 2A) が植物培養細胞 (オリーブやライラック) を用いて報告されているものの、カフェ酸やサリドロサイド、ヒドロキシチロソール以降の C₆-C₂ から配糖体・アシル化体へと至る生合成機構の詳細は不明であった (図 2B)。

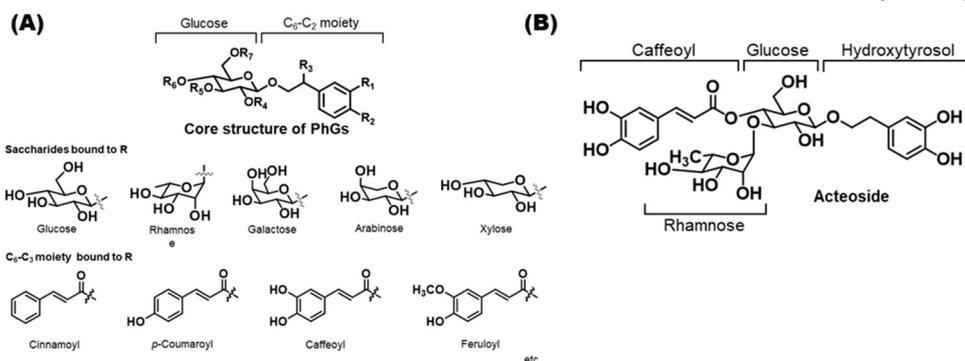


図1. フェニルエタノイド配糖体の構造 (A) コア構造と主な置換基 (B)アクテオシドの構造

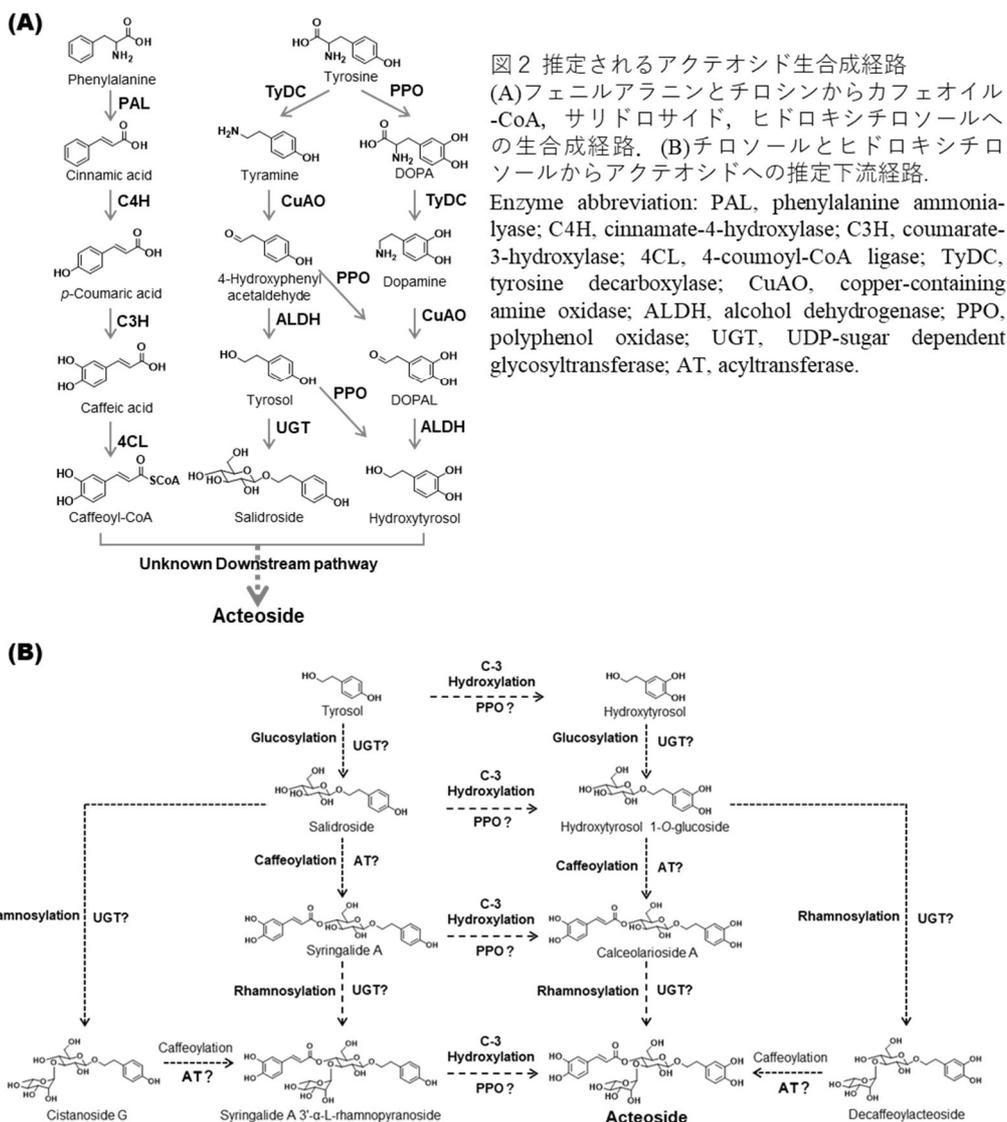


図2 推定されるアクテオシド生合成経路

(A)フェニルアラニンとチロシンからカフェオイル-CoA, サリドロサイド, ヒドロキシチロソールへの生合成経路, (B)チロソールとヒドロキシチロソールからアクテオシドへの推定下流経路.

Enzyme abbreviation: PAL, phenylalanine ammonia-lyase; C4H, cinnamate-4-hydroxylase; C3H, coumarate-3-hydroxylase; 4CL, 4-coumoyl-CoA ligase; TyDC, tyrosine decarboxylase; CuAO, copper-containing amine oxidase; ALDH, alcohol dehydrogenase; PPO, polyphenol oxidase; UGT, UDP-sugar dependent glycosyltransferase; AT, acyltransferase.

2. 研究の目的

ゴマ (*Sesamum indicum* L.) はアクテオシドを葉に多く蓄積し、開花期には最大 12.9% (乾燥葉中) も蓄積するアクテオシド高生産植物である。これまでの研究で、アクテオシドを主要成分として PhGs を生産するゴマ培養細胞株を作製し、ジャスモン酸メチル (MeJA) をエリシターとして用いることで、アクテオシドを誘導生産する実験系も確立した。さらに、MeJA 処理したゴマ培養細胞のトランスクリプトーム解析により、アクテオシド生成経路における候補遺伝子を選抜した。

そこで本研究では、アクテオシド生成経路下流の PhGs 骨格形成に関わる配糖体化、アシル化に関わる候補遺伝子の機能解析を行った。

3. 研究の方法

(1) アクテオシド骨格形成に関わる C₆-C₂ 配糖体化酵素の同定

配糖体化酵素 (UDP-グルコーストランスフェラーゼ, UGT) の候補選抜として、チロソールに対する UGT 活性を持つ *Arabidopsis thaliana* の UGT85A1 および *Rhodiola sachalinensis* の UGT72B14 とのアミノ酸同一性に基づいて 5 個の遺伝子を選抜した (SiUGT1-5)。候補遺伝子を実験用ベクター (pET-53-DEST) に導入し、このベクターで大腸菌 C41(DE3) を組換えさせた。組換え大腸菌を用いて His タグ融合タンパク質として発現させ、IPTG により組換えタンパク質の蓄積を誘導後、ニッケルカラムとゲル濾過カラムを用いて組換えタンパク質を精製した。精製した組換えタンパク質を用いて、C₆-C₂ 化合物 (ヒドロキシチロソール, チロソール, フェネチルアルコール) に対する配糖体化活性を測定した。SiUGT1 とヒドロキシチロソール, UDP-グルコースとの反応生成物は、分取・精製し、LC-PDA, LC-MS/MS, NMR 測定により同定した。

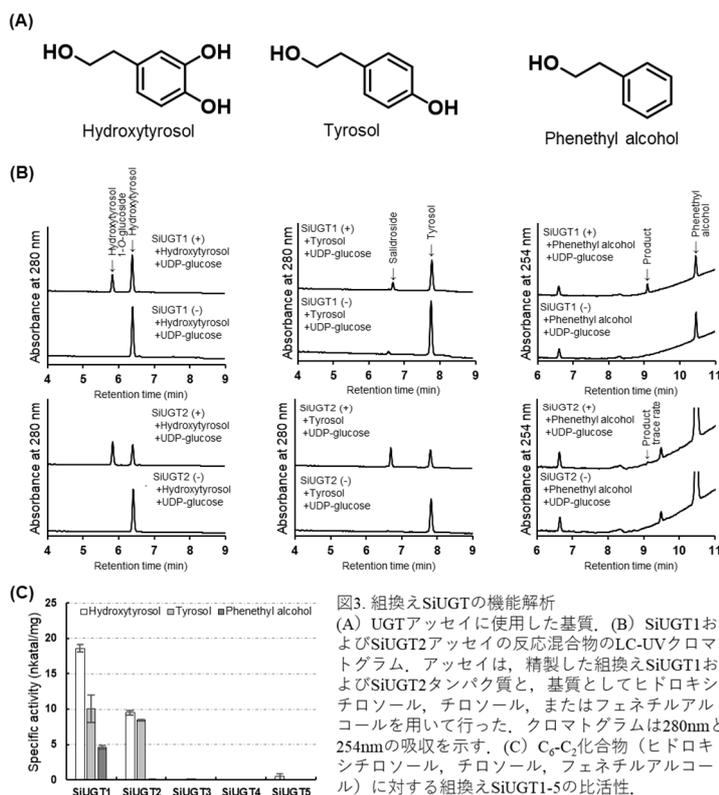
(2) アシル化転移酵素の同定

アシルトランスフェラーゼ (AT) の候補遺伝子は、クラスター解析や配列の同一性から 3 つの遺伝子を選抜した (SiAT1-3)。(1) と同様に発現・精製した組換えタンパク質を用いて C₆-C₂ 配糖体 (ヒドロキシチロソール 1-O-グルコシド, サリドロサイド, デカフェオイルアクテオシド) とカフェオイル-CoA を用いた酵素アッセイを行い、SiAT1-3 のアシル化転移活性を評価した。SiAT1 とヒドロキシチロソール 1-O-グルコシド, カフェオイル-CoA との反応生成物は、分取・精製し、LC-PDA, LC-MS/MS, NMR 測定により同定した。

4. 研究成果

(1) アクテオシド骨格形成に関わる C₆-C₂ 配糖体化酵素の同定

C₆-C₂ 化合物 (ヒドロキシチロソール, チロソール, フェネチルアルコール) に対する SiUGT1-5 の配糖体化活性を測定した (図 3A)。SiUGT1 をヒドロキシチロソールおよび UDP-グルコースとインキュベートし、反応混合物を LC-PDA-MS で分析したところ、新たなピークが確認された。生成物を分取・精製し、LC-PDA, LC-MS/MS, NMR 解析に供したところヒドロキシチロソール 1-O-グルコシドと同定した (図 3B)。また、チロソールとの反応生成物は標品との保持時間, UV スペクトル, MS スペクトルからサリドロサイドであることが判明した。SiUGT2 は SiUGT1 よりも活性が低いものの同様の基質特異性を示した (図 3B, C)。これらのことからグルコース部分をチロソールおよびヒドロキシチロソールのアルコール性ヒドロキシル基に転移させる活性を持つ SiUGT1 (UGT85AF10) および SiUGT2 (UGT85AF11) を同定した。



(2) アシル化転移酵素の同定

C₆-C₂配糖体(ヒドロキシチロソール 1-O-グルコシド, サリドロサイド, デカフェオイルアクテオシド)に対する SiAT1-3 のアシル化転移活性を測定した(図 4A). SiAT1 をヒドロキシチロソール 1-O-グルコシドおよびカフェオイル-CoA とインキュベートし、反応混合物を LC-PDA-MS で分析したところ、新たに3つのピークが確認された. 主要生成物は、カルセオラリオシド A (グルコースの4位にカフェオイル基が結合した PhG) であり、カルセオラリオシド B (グルコースの6位にカフェオイル基が結合した PhG) とプランタイノシド A (グルコースの3位にカフェオイル基が結合した PhG) が少量生成された(図 4B, C). サリドロサイドを基質にした場合も同様に3つのピークが確認された. SiAT2 は SiAT1 よりも LC-MS/MS 分析による生成物の強度値は低いものの同様の基質特異性を示した(図 4B). 一方で、SiAT1, 2 にヒドロキシチロソール 1-O-グルコシド, サリドロサイドへのアシル化転移活性は確認されたものの、デカフェオイルアクテオシドに対するアシル化転移活性は確認できなかった. このことは、ラムノースの配糖体化が、アシル化の後に起こることを強く示唆している.

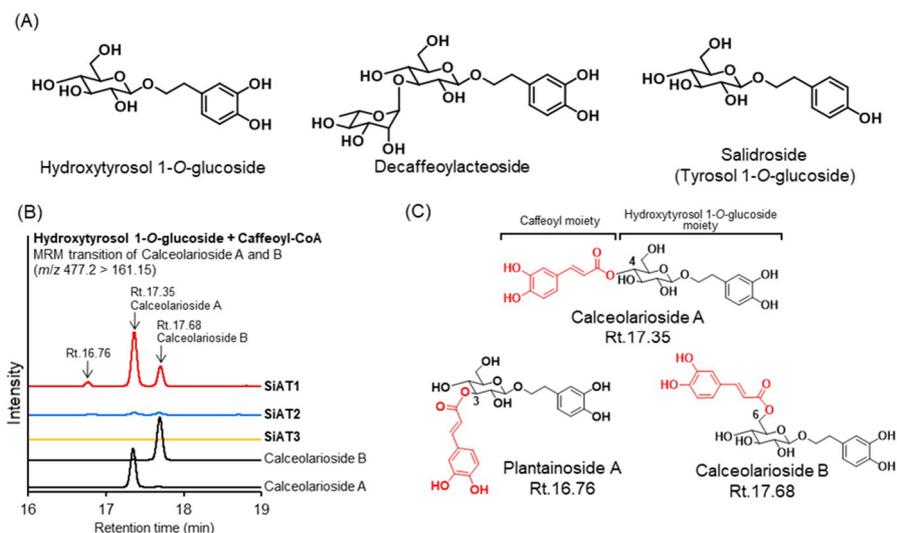


図4. 組換えSiATの酵素活性

(A) ATアッセイに用いた基質, (B) カルセオラリオシドAおよびBに最適化されたMRM条件 (MRMトランジション m/z 477.2 > 161.15) を用いて検出したヒドロキシチロソール1-O-グルコシドを基質とするSiAT1-3アッセイの反応混合物のMRMクロマトグラム.

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 0件）

1. 著者名 Fuji Yushiro, Uchida Kai, Akashi Tomoyoshi, Ohtsuki Takashi, Matsufuji Hiroshi, Hirai Masami, Yokota	4. 巻 64
2. 論文標題 Molecular Identification of UDP-Sugar-Dependent Glycosyltransferase and Acyltransferase Involved in the Phenylethanoid Glycoside Biosynthesis Induced by Methyl Jasmonate in Sesamum indicum L.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant And Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 716 - 728
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcad053	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤佑志郎, 松藤寛, 平井優美
2. 発表標題 ゴマ培養細胞を用いたフェニルエタノイド配糖体生合成酵素の解析
3. 学会等名 第 38 回日本ゴマ科学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤佑志郎, 松藤寛, 平井優美
2. 発表標題 エリシテーションにより高発現したゴマ培養細胞中ラムノシル化酵素の解析
3. 学会等名 第40回日本植物バイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤佑志郎, 松藤寛, 平井優美
2. 発表標題 フェニルエタノイド配糖体生合成に関連するゴマ培養細胞中高次配糖体化酵素の解析
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 藤佑志郎, 松藤寛, 明石智義, 平井優美
2. 発表標題 エリシテーションにより高発現したゴマ培養細胞中アシル化酵素の解析
3. 学会等名 第39回 日本植物バイオテクノロジー学会 (堺)大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤佑志郎, 松藤寛, 明石智義, 平井優美
2. 発表標題 ゴマ培養細胞を用いたフェニルエタノイド配糖体合成におけるアシル化転移酵素遺伝子の単離と解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会
4. 発表年 2022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

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