

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 26 日現在

機関番号：86401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460127

研究課題名(和文) 消化管吸収性の改善を指向した天然機能性化合物の配糖体化

研究課題名(英文) Glycosylation of functional natural compounds for improving intestinal absorption

研究代表者

水上 元 (Mizukami, Hajime)

公益財団法人高知県牧野記念財団・その他部局等・その他

研究者番号：30128219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：クチナシ、イチゴ、ダイズなどの植物から低分子化合物の水酸基または炭素原子に糖鎖を抱合する糖転移酵素を単離し、その機能を解析した。これによって、天然の生理活性化合物のたよ配糖体ライブラリーの拡大が可能になった。  
これらの配糖体の消化管での加水分解反応の受けやすさと消化管吸収性との関係を解析するために、ヒト及びラット消化管由来の lactose-phlorizin hydrolase (LPH) の組換え酵素を用いて各種天然化合物由来の配糖体の加水分解特性を比較するために、LPH組換え酵素の作製を試みた。

研究成果の概要(英文)：We have isolate and characterized O- and C-glycosyltransferases from various plants including Gardenia jasminoides, Fragaria xananassa and Glycine max. By using the recombinant glycosyltransferases so far obtained, a wide array of natural glycosides can be easily prepared. To analyze the relationship between sugar chain structures of natural glycosides and intestinal absorption of these compounds, we have tried to prepare recombinant lactose-phlorizin hydrolase (LPH) originated from human or rat intestine.

研究分野：薬用植物学、生薬学

キーワード：生理活性天然物 糖鎖構築 糖転移酵素 消化管吸収

## 1. 研究開始当初の背景

天然機能性化合物の多くは、抗酸化作用、抗炎症作用、抗アレルギー作用などの興味ある活性を示すが、その難水溶性のために経口的に摂取した場合の消化管吸収は極めて低く、消化管内を素通りして糞便中に排泄されることが多い。これらの機能性化合物に糖分子を付加して水溶性を改善することは、消化管吸収能の改善、ひいては機能性の改善のための有用な手段である。種々の糖鎖構造を有する天然化合物を酵素的に合成し、その消化管吸収を比較することによって糖鎖構造と消化管吸収性の関係を明らかにすることは天然化合物の機能性の改善につながる大きな可能性を有している。本研究の申請者は、このような観点から「植物糖転移酵素を利用した機能性化合物の糖鎖構築と消化管吸収性の改善」に関する研究を平成 22~24 年度科学研究費補助金の助成を得て実施し、以下の成果を得た。

(1) 各種植物を遺伝子源とした糖鎖転移酵素の cDNA クローニングを行い、多様な糖転移酵素 cDNA の単離に成功した。

(2) 糖転移酵素による糖転移反応は、反応産物である UDP が反応系に蓄積することによって阻害される。糖転移反応と UDP から UDP-glucose を再生する反応系を組み合わせることによって、糖転移酵素の触媒機能が顕著に拡大することを明らかにした。

(3) Quercetin の数種の配糖体の消化管吸収を検討し、すべての配糖体で水溶性は増加したが、消化管吸収能は特定の糖鎖構造を持つ配糖体でのみ改善することを認め、消化管吸収性が改善するためには、小腸上皮の lactose-phlorizin hydrolase (LPH) によって認識されうる糖鎖構造を有していることが必要であることを示唆する結果を得た。

これらの研究によって、組換糖転移酵素を用いた天然化合物の糖鎖酵素の構造多様性の拡大 (glycodiversification) が可能となり、多様な糖鎖構造を有する天然機能性化合物の消化管吸収性を *in vitro* および *in vivo* で網羅的に解析することが可能になった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は以下のとおりである。

(1) 種々の植物から様々な機能を持つ糖転移酵素をクローニングし、その機能を解析する。

(2) これらの糖転移酵素を用いて種々の糖鎖構造を持つ天然機能性化合物配糖体のライブラリーを構築する。

(3) ヒト小腸上皮組織由来の cDNA ライブラリーから得た組換え LPH を用いる配糖体加水分解アッセイ法を開発し、配糖体の加水分解反応をスクリーニングする。

(5) 配糖体の消化管吸収性をラットに経口投与して *in vivo* で調べることにより、LPH 加水分解反応が配糖体の消化管吸収性の予測指標として使えるかどうかを検討する。

(6) 糖鎖構造と消化管吸収性の関係を明らかにし、機能性化合物の合目的な機能性改善法として提起する。

## 3. 研究の方法

### [1] 糖転移酵素のクローニングと機能解析 (1) クチナシ由来新規糖転移酵素の単離と機能解析

クチナシ由来新規糖転移酵素の単離  
クチナシ培養細胞から調製した total RNA を基質として、糖転移酵素に共通なモチーフをもとに設計した degenerate primer をもとに RT-PCR を行い、さらに 5'-RACE と 3'-RACE を行うことにより、多数の糖転移酵素に対応する全長 cDNA クローンを得た。

クチナシ由来新規糖転移酵素の配糖化活性の測定

単離した糖転移酵素の ORF を大腸菌発現用ベクターである pQE30 に N 末端で His-tag 融合タンパク質となるように組み込んだ。この発現ベクターを導入した大腸菌を培養し、発現誘導した後、菌体を回収した。菌体をバッファー中で超音波破碎した後、His-tag を利用した酵素精製を行った。得られた酵素液を用いて、UDP-glucose 存在下、apocarotenoids への配糖化反応を行い、生成物を HPLC で分析した。

### (2) ダイズ糖転移酵素の単離と機能解析

EST 情報に基づく C-糖転移酵素の同定  
ダイズ EST 情報に基づいて分子生物学的解析を行い、さらに器官別発現情報を参照することにより、C-糖転移酵素候補クローンを同定した。

C-糖転移酵素活性の測定

クチナシ由来の新規糖転移酵素と同様に組換糖転移酵素を His-tag タンパク質として発現させ、精製した。得られた酵素液を用いて、UDP-glucose 存在下、各種基質への化反応を行い、生成物を HPLC で分析した。

### (3) イチゴ由来新規糖転移酵素の単離と機能解析

イチゴ花托由来糖転移酵素遺伝子の単離  
スーパーマーケットで販売されていたイチゴの花托を購入し、total RNA を抽出した。これをもとに逆転写反応により cDNA を調製した。これを鋳型として、イチゴの公開 EST 情報から得た糖転移酵素の配列情報を元にして設計したプライマーと組み合わせ、糖転移酵素遺伝子の配列を PCR により増幅した。EST 情報が部分配列であったものは、RACE 法を利用して未知部分の配列を得て、全長配列とした。

FaGTs の配糖化活性の測定

クチナシ由来糖転移酵素の場合と同様に、組換糖転移酵素を His-tag タンパク質として発現させ、精製した。得られた酵素液を用いて、UDP-glucose 存在下、HDMF への配糖化反応を行い、生成物を HPLC で分析し

た。

## [ 2 ] 哺乳動物由来 LPH の発現と機能解析 LPH ORF のクローニングと哺乳動物細胞 発現用ベクターの構築

ヒト LPH は、ORF が組み込まれたクローンを transOMIC technologies より購入した。ラット LPH は、ラット小腸由来の cDNA を鋳型として ORF 部分を RT-PCR 法により単離した。これらを発現用ベクター pCI-neo に組み込んだ。

### 哺乳動物細胞での LPH の発現

発現用の細胞として、ヒト胎児腎細胞由来の HEK293 細胞を用い、100 mm シャーレー枚当たり  $6.0 \times 10^6$  個の細胞に対して、構築した発現用ベクター 30  $\mu$ g を HilyMax (同仁化学研究所) を用いて添付のプロトコールに従ってトランスフェクションした。

### LPH による加水分解活性の測定

LPH を発現させた細胞を、適当量の 100 mM クエン酸緩衝液 (pH4.8) に懸濁し、超音波破碎した。破碎後の懸濁液を遠心し、得られた上清を粗酵素液とした。この粗酵素液を 1 mM florigin 存在下、37 °C でインキュベートした。一定時間経過後、メタノールを加えて反応を停止し、遠心後の上清を HPLC で分析した。

## 4 . 研究成果

### [ 1 ] 糖転移酵素のクローニングと機能解析

#### (1) クチナシ由来新規糖転移酵素の単離と機能解析

クチナシ培養細胞から、植物糖転移酵素の保存配列をもとにした homology-based cloning を行うことにより、15 の糖転移酵素 cDNA を得た。それらの ORF を大腸菌発現ベクターに組み込み、His-tag タンパク質として発現させて得た酵素を apocarotenoids と UDP-glucose の存在下で反応させることによって、crocetin の配糖化に関与する糖転移酵素として UGT75L6 を、crocin 類の糖鎖伸長酵素として UGT94E5 を単離し、機能的に同定した。本酵素を利用することにより、apocarotenoids への糖鎖構築が可能になった。

#### (2) ダイズ糖転移酵素の単離と機能解析

イネの C-糖転移酵素に相同性を示す遺伝子をダイズのゲノム情報を用いて探索し、100 個の候補 ORF を得た。これらの ORF の配列を分子系統学的に解析した結果、2 つの ORF ( Glyma09g29160.1 と Glyma16g33750.1 ) を同定した。さらに、ダイズ EST データベースを検索した結果、Glyma09g29160.1 が反応産物であると予想される vitexin が存在する根で発現していることがわかった。そこで、Glyma09g29160.1 の ORF ( UGT708D1 ) を His-tag タンパク質として発現させ、vitexin 生合成の基質であると考えられる 2-hydroxynaringenin と反応させることによ

り、本酵素が flavanone C-糖転移酵素であることを示した。

#### (3) イチゴ由来新規糖転移酵素の単離と機能解析

イチゴの主な香り成分である 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (HDMF) が配糖体として細胞内に蓄積する過程に関わる糖転移酵素をクローニングするため、公開されているイチゴの EST 情報を活用した。EST 情報から、カルボキシル基を特異的に認識する糖転移酵素に属するものを除外し、さらに、HDMF-glucoside が蓄積する部位である、イチゴ花托において遺伝子発現しているものを選択した。その後、RACE 法などを組み合わせることにより、既知のイチゴ糖転移酵素遺伝子 ( FaGT, *Fragaria*  $\times$  *ananassa* glycosyltransferase ) として報告されている、FaGT1~7 とは異なる、FaGT8~FaGT14 の 7 クローンを単離した。これらの配糖化活性を検討するため、His-tag 融合タンパク質として大腸菌で発現させたところ、4 クローン ( FaGT8, 11~13 ) のみが発現した。これらの大腸菌から得た組換え酵素の HDMF に対する配糖化活性を調べたところ、FaGT13 のみに HDMF に対する配糖化活性を見出した。また、FaGT13 は、furanone 骨格を有する化合物に対して高い基質特異性も有することが示された。現在、組換え酵素を用いて HDMF 配糖体の大量調製を実施している。さらに、FaGT11 および 12 は、cyanidin に対して配糖化活性を有するクローンであることも明らかとなった。

#### (4) その他

クチナシ、センブリからの iridoids 特異的な糖転移酵素の単離と機能的同定にも取り組んだ。

### [ 2 ] 哺乳動物由来 LPH の発現と機能解析

哺乳動物の小腸上皮に発現している、LPH の ORF 部分を哺乳動物細胞発現用ベクターに組み込み、HEK293 細胞で一過的に発現させた。発現させた細胞から粗酵素液を調製し、LPH の基質として知られている phlorizin を用いた加水分解反応を行ったところ、ヒト LPH、ラット LPH とともに、経時的に phlorizin を加水分解し、アグリコンであるフロレチンを遊離させた。空ベクターを用いたネガティブコントロールの細胞から調製した酵素液では、phlorizin が加水分解されることがなかったことから、この加水分解反応が LPH に依存したものであることが確認できた。また、phlorizin を基質とした反応では、ヒト LPH とラット LPH に差異は認められなかった。しかしながら、加水分解活性のレベルが安定しないことから、一過的な発現レベルが安定していないことが原因と考えられた。そこで、現在形質転換法や細胞株について検討した上で、今後様々な配糖体に対する加水分解活

性について明らかにしていきたい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

Asada, K., Salim, V., Masada-Atsumi, S., Edmunds, E., Nagatoshi, M., Terasaka, K., Mizukami, H., De-Luca, V. A  
7-deoxyloganic acid glucosyltransferase contributes a key step in secologanin biosynthesis in Madagascar periwinkle. The Plant Cells 25, 4123-4134 (2013).

Hirade, Y., Kotoku, N., Terasaka, K., Saiji-Hamano, Y., Fukumoto, A., Mizukami, H. Identification and functional analysis of 2-hydroxyflavanone C-glucosyltransferase in soybean (Glycine max). FEBS Lett 589 (15), 1778-1786 (2015).

水上 元 植物糖転移酵素を用いた機能性化合物の糖鎖構築 薬学雑誌 135, 867-882 (2015).

〔学会発表〕(計3件)

立岩千佳、寺坂和祥、水上 元、センブリ由来イリドイド配糖化酵素遺伝子の探索。日本生薬学会第60回年会、2013年9月7日、北海道医療大学(北海道当別町)。

鮎川美奈子、木村雪乃、永利麻衣、寺坂和洋、加藤信樹、樋口恒彦、水上 元、クチナシのクロシン生合成に関与するアルデヒド酸化酵素の機能解析。第31回日本分子生物学会札幌大会、2013年9月11日、北海道大学(札幌市)。

山田亜紀、牧野利明、水上 元、寺坂和祥、イチゴのHDMF配糖体の生合成に関わる糖転移酵素の単離、第33回日本植物細胞分子生物学会大会、2015年8月12日、東京大学(東京都文京区)。

〔図書〕(計1件)

寺坂和祥 他. 薬用植物・生薬の開発と今後の展望. 269ページ、シーエムシー出版、東京、2014年。

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者 水上 元(MIZUKAMI, Hajime)  
公益財団法人高知県牧野記念財団・理事長  
研究者番号：30128219
- (2) 研究分担者 寺坂和祥(TERASAKA, Kazuyosi)  
名古屋市立大学大学院薬学研究科・講師  
研究者番号：60405214