

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 17 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460142

研究課題名(和文) 未来型トリテルペンの創出、及びトリテルペン高生産系の確立

研究課題名(英文) Production of new triterpene and establishment of high production system of triterpene

研究代表者

渋谷 雅明 (Shibuya, Masaaki)

新潟薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50170923

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)：ダイズのゲノムには11種のトリテルペン合成酵素ホモログが存在する。これらのうち転写されていないホモログ(locus name: Glyma.20G192700)のゲノム遺伝子をクローニングし、イントロンを除去し、酵母で発現させ、新規トリテルペンの取得を試みた。得られた化合物は、既知物質のルペオールであった。本来の目的の未来型新規トリテルペンの創出とは異なるが、ダイズからルペオールの単離報告はなく、遺伝子機能解析研究からルペオールがダイズに存在していた、あるいはこれから存在する可能性を示したことになる。

研究成果の概要(英文)：Eleven triterpene synthase homologs are found in Glycine max genome. Among them, one homolog (locus name: Glyma.20G192700) is not transcribed in G. max. This gene was amplified by PCR with genome DNA as a template, from which introns were removed. Resultant DNA was expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Accumulated product in yeast cells was analyzed by GC-MS, and identified as lupeol which is known compound. Although this result is deviated substantially from original purpose to produce new triterpene, it is succeeded in revealing that lupeol had occurred, or will occur in G. max, by functional analysis of the genomic gene.

研究分野：天然資源系薬学

キーワード：トリテルペン トリテルペン合成酵素 ゲノム遺伝子 シロイヌナズナ ダイズ ルペオール

1. 研究開始当初の背景

天然物は構造多様性を有し、様々な分野で有用性が大きい。薬学において天然物は医薬品のシーズとして極めて重要である。先人たちはこれまで多種の天然物を発見し、医薬品開発へ大きな貢献をしてきた。引き続き私たちは、ガンなどの難治疾患を解決するため、また、生活習慣病などの新たな疾患の治療のために新規天然物の探索を継続する必要がある。

新規天然物の発見は材料への依存度が高く、地球の資源は有限であるため、従来手法では、天然物にどんなに構造多様性があるとしても将来にわたっての継続的な新規天然物の発見は難しい。このような閉塞状況を打開するには、新しい方法を用いて天然物の構造多様性を拡大する必要がある。

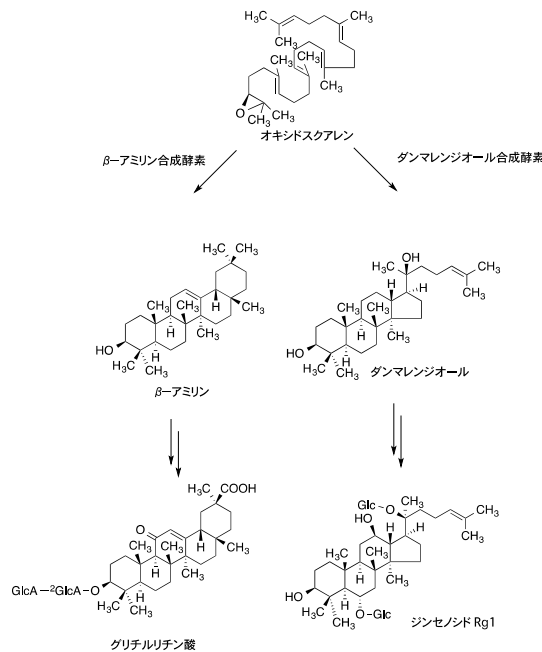
ゲノム情報から明らかになった「機能未知の生合成酵素遺伝子」の存在は、天然物研究において極めて魅力的である。大胆な表現であるが、「天然物の構造は進化する」と考えて間違いはない。物質の構造が自立的に進化するはずはなく、「天然物の構造の進化」は、生物が進化することに依存している。ゲノム情報から明らかになった「機能未知の生合成酵素遺伝子」には、タンパクをコードする「構造的に不完全な遺伝子」、及び「発現していない遺伝子」が含まれる。これらの「構造的に不完全な遺伝子」、及び「発現していない遺伝子」は、「進化した天然物を得る」という目的にとって極めて魅力的である。「構造的に不完全な遺伝子」を「進化の途中の未成熟な遺伝子」と、また「発現していない遺伝子」を「将来に発現する遺伝子」と考えれば、なんらかの手法でこれらを「完全な遺伝子」、及び、「発現する遺伝子」に変換することで、「未来型天然物」を得ることが出来るはずである。

2. 研究の目的

本研究ではトリテルペンを対象化合物とする。トリテルペンは、主に植物に分布し、その多くが配糖体の型で蓄積している。カンゾウのグリチルリチンやニンジンなどのジンセノシドなどが著名である。

興味深い生物活性が数多く報告されているが、単離が容易でないことから、医薬品となったトリテルペンはグリチルリチン以外にない。本研究では、「未来型トリテルペン骨格」を見だし、トリテルペン骨格の構造多様性の拡大を計る。トリテルペンの骨格は、鎖状分子オキドスクアレンが閉環して生成する。この反応を触媒する酵素は、共通の基質の名称に基づきオキドスクアレン閉環酵素、生成物の総称に基づきトリテルペン合成酵素、あるいは特定の生成物の構造に基づきβ-アミリン合成酵素などと呼ばれる。天然に存在するトリテルペンは大部分がオレアナン骨格を有しており、この骨格はβ-アミリン合成酵素により作り出されている。このβ-アミリン合成酵素は、1998年に

本申請者により世界で初めてオタネニンジン (*Panax ginseng*) からクローニングされた。その後、本申請者を含め複数の研究グループにより 30 種を超えるトリテルペン合成酵素がクローニングされている



様々な植物からトリテルペン合成酵素がクローニングされたことから、アミノ酸配列情報に基づいた機能の推定が可能となった。興味深いことに、最初に全ゲノムが解読されたモデル植物のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のトリテルペン合成酵素は他の植物のトリテルペン合成酵素とは異なった分子進化を辿ったことが推測された。丹念に BLAST 検索をすると、シロイヌナズナには、同定された 14 種のトリテルペン合成酵素以外に、2 種の「不完全なトリテルペン合成酵素」が存在する。(1) これらを、分子生物学の手法を駆使して、完全型に作り替え、「未来型のトリテルペンの創出」を試みる。(2) また、公開されたダイズ (*Glycine max*) の全ゲノム配列に中にも興味深いトリテルペン合成酵素があり、これらについても同様の方法で、未来型のトリテルペンの創出を試みる

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナのトリテルペン合成酵素

全塩基配列が解析されたシロイヌナズナには、14 種のオキドスクアレン閉環酵素が存在する。本申請者、及びライス大学 (米国) のグループが独立に研究を行った結果、それらの全ての酵素機能が同定された。14 種のホモログ以外に不完全な 2 種のホモログが存在する。丹念に BLAST を利用した相同性解析したところ、そのうちの 1 種 (Locus name: At3g29255) はフレームシフト、及び途中の終止コドンの存在があるものの、ほぼ全長の長さのものであることがわかった。本研究においてはゲノム DNA を鋳型に PCR を行い、この

不完全ゲノム遺伝子をクローニングする。植物ゲノム遺伝子にはイントロンが含まれているために、酵母で発現させた場合、そのままでは翻訳が適切に行われず、目的の酵素タンパクを得ることができない。何らかの手法でイントロンを除去する必要がある。また、この遺伝子の場合、フレームシフト解除、及び終止コドンの除去をする必要がある。本研究では、PCR を駆使してイントロンの除去、フレームシフト解除、及び終止コドンの除去を行う。そして、酵母で発現させ、酵素機能解析を行う。

(2) ダイズのトリテルペン合成酵素

ダイズのゲノムには 11 種のトリテルペン合成酵素ホモログ (Gm1 - Gm11 と命名) が存在する。これまで機能が同定されたものは 1 種 (Gm1: β -アミリン合成酵素) にすぎない。これらのトリテルペン合成酵素の全ての生成物を明らかにすれば、ダイズに存在するトリテルペンの全ての骨格を明らかにすることができ、また、その中に新規トリテルペン骨格を見出せる可能性がある。なかでも、発現していない遺伝子 (転写が行われていないという意味) の産物は新規トリテルペン生成能を有する可能性が高い。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナのトリテルペン合成酵素

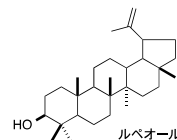
目的の項で述べた At3g29255 は、12 個のイントロンと 13 個のエクソンからなる。シロイヌナズナ植物体から抽出したゲノム DNA を鋳型に PCR を行い、At3g29255 のゲノム DNA 断片を得た。この断片をプラスミドにサブクローニングし、複数個のクローンを得、全配列を決定した。これらの複数個のクローンには、PCR で生じた誤りが含まれていた。誤りを含まない部分を鋳型にし、13 個のエクソンに対応する DNA 断片を得た。精製した 13 個の DNA 及び、N 末、及び C 末に対応する配列に基づいたプライマーを用いて PCR を行い、全長に相当する DNA 断片を得た。このとき、フレームシフトの解除、終止コドンの解除も、プライマーを適切にデザインすることにより、一気にいった (フレームシフト発生点の前後を 2 つに断片化して独立に増幅させる。終止コドンの解除も同じ。)。得られた全長 DNA 断片をプラスミドベクターにサブクローニングし、塩基配列を決定した。誤りを含まないクローンを用いてラノステロール合成酵素欠損酵母株を形質転換した。使用したラノステロール合成酵素欠損酵母株は、トリテルペン合成酵素の基質となるオキシドスクアレンが細胞内に蓄積しており、導入遺伝子がトリテルペン合成酵素として機能すれば、生成物を与える。しかしながら、得られた At3g29255 に対応する遺伝子 (以降 MX021.12 と呼ぶ) を導入した酵母には、トリテルペンの生産は確認できなかった。

次に、MX021.12 に機能を付与するため、ダイズ由来 β -アミリン合成酵素 (GMY) とのキメラ酵素の作成、シロイヌナズナ由来マーネ

ラル合成酵素 (MF020.1) とのキメラ酵素の作成、及びその改変酵素の作成を行なった。まず、PCR により GMY の N 末断片 (558bp、アミノ酸 186 個分) と、MX021.12 の C 末断片 (1731bp、アミノ酸 577 個分) 端に用いたキメラ酵素を作成した。次に、これらを PCR により連結し、全長に相当するキメラ酵素の cDNA を得、酵母発現ベクター pYES2 に導入した。得られたプラスミドを用いて酵母 (GIL-77 株) を形質転換した。形質転換酵母を培養後、生成物をシリカゲル TLC 解析したが、生成物を確認できなかった。次に、同様に、N 末から 186 番目のアミノ酸の位置で MF020.1 (N 末側) と MX021.12 (C 末側) のキメラ酵素を作成し、酵母 (GIL-77 株) を用いて生成物を調べた。しかし、生成物を確認することはできなかった。作成したキメラ酵素 (MF020.1+MX021.12) の配列と MF020.1 の配列を比較すると 731 番目以降で相同性が喪失していることが判明したので、次に、キメラ酵素 (MF020.1+MX021.12) の 731 番目のリジンを欠損させ、相同性が復活したキメラ改変酵素を作成した。しかしながら、このキメラ改変酵素にも酵素活性を検出することができなかった。

(2) ダイズのトリテルペン合成酵素

ダイズの機能未同定の 10 種のクローンのうち発現していないもの (Gm5) について機能を調べ、未来型新規トリテルペンの創出を試みた。まず、ダイズの植物体からゲノム DNA を抽出した。PCR により Gm5 ゲノム遺伝子の DNA 断片を得た。Gm5 は 16 個のイントロンを含んでいるため、次にイントロンの除去を行った。得られたゲノム遺伝子を鋳型に 17 種の PCR を行いエキソン部分に相当する 17 種の DNA 断片を得た。得られた DNA 断片を PCR により連結し、イントロンのない mRNA に相当する cDNA を作り出した。この cDNA を酵母ベクター pYES2 にクローニングした。構築したプラスミドをラノステロール欠損酵母株 GIL77 に導入し、発現を誘導し、酵母内に蓄積したトリテルペンをシリカゲルカラムクロマトグラフィーで単離した。各種スペクトルを測定し得られた化合物の構造を決定した。得られた化合物は、既知物質のルペオールであった。



本来の目的の未来型新規トリテルペンの発見とは異なるが、ダイズからルペオールの単離報告はなく、遺伝子機能解析研究からルペオールがダイズに存在していた、あるいはこれから存在する可能性を示したことになる。

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 2 件)

(1) Junichi Shinozaki, Masaaki Shibuya, Yutaka Ebizuka and Kazuo Masuda, "Cyclization of all-*E*- and 2*Z*-geranylarnesols by a bacterial triterpene synthase: Insight into sesterterpene biosynthesis in *Aleuritopteris ferns*", *Biosci. Biotechnol Biochem.*, **77**, 2278-2282 (2013).

(2) Rachel Davidovich-Rikanati, Lior Shalev, Nadine Baranes, Ayala Meir, Maxim Itkin, Shahar Cohen, Kobi Zimler, Vitaly Portnoy, Yutaka Ebizuka, Masaaki Shibuya, Yosef Burger, Nurit Katzir, Arthur A. Schaffer, Efraim Lewinsohn and Ya'akov Tadmor, "Recombinant yeast as a functional tool for understanding bitterness and cucurbitacin biosynthesis in watermelon(*Citrullus spp.*)", *Yeast*, **32**, 103-114 (2015).

〔学会発表〕(計 1 件)

健康と食品に関する新潟国際会議 (ICFHN2014)、渋谷雅明、"The fourteenth oxidosqualene cyclase from *Arabidopsis thaliana*"、新潟、2014.10.30

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nupals.ac.jp/~pharmacog0711/Shoyaku/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渋谷 雅明 (SHIBUYA MASA AKI)

新潟薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50170923