

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：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460145

研究課題名(和文)重要薬用植物ミシマサイコにおけるサイコサポニン生合成機構の全容解明

研究課題名(英文)Elucidation of machinery for saikosaponin biosynthesis in *Bupleurum falcatum* L.

研究代表者

野路 征昭 (Noji, Masaaki)

徳島文理大学・薬学部・准教授

研究者番号：80271534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ミシマサイコのサイコサポニン生合成の全容を解明するために、ミシマサイコの根、茎、葉それぞれのESTデータベースを作成した。

サイコサポニンの生合成に関与する酵素の遺伝子を単離するために、このESTデータベースを検索した結果、16種の新規シトクロムP450のcDNAを単離し、 β -アミリンの28位の炭素を水酸化するシトクロムP450、R144792と、16位の炭素を水酸化するシトクロムP450、Rnn2525を同定した。次にサイコゲニンの配糖体化酵素について、 β -アミリンを基質とすると考えられるUGT73Cサブファミリーと類似性の高い2種のグリコシルトランスフェラーゼのcDNAを単離に成功した。

研究成果の概要(英文)：In order to identify the genes involved in saikosaponin biosynthesis, we first established expressed sequence tag (EST) databases of roots, leaves, and stems from *Bupleurum falcatum* L. by using next-generation sequencing platforms.

Some candidate genes that may be concerned with the biosynthesis of saikosaponins were available by searching EST databases of *B. falcatum*. Sixteen new cDNAs encoding cytochrome P450 were isolated and were characterized using a yeast expression system. One of these cytochrome P450s, R144792, catalyzes the C-28 hydroxylation of β -amyirin, and another cytochrome P450, Rnn2525, catalyzes the C-16 α hydroxylation of β -amyirin, that are essential for the biosynthesis of saikosaponins. Furthermore, two new cDNAs encoding glycosyltransferase were isolated from *B. falcatum*.

研究分野：天然資源系薬学

キーワード：ミシマサイコ サイコサポニン生合成 シトクロムP450 グリコシルトランスフェラーゼ

1. 研究開始当初の背景

植物は、薬用資源、食料、工業原料として大変有用であるが、これら植物の有用性は、植物が作り出す20万~100万種にもよる代謝物によるものである。このように植物は多種多様な物質生産能力をもつことから、植物は有用物質生産に關与する遺伝子資源の宝庫であるといえる。植物の有する化学的多様性の遺伝子レベルでの解明とその応用は、人口の爆発的増加とそれに伴う感染症の拡大、食料問題、環境破壊など地球規模での諸問題の解決のために極めて重要なテーマである。

ミシマサイコは生薬「柴胡」の基原植物で、その根である「柴胡」は、漢方で解熱、抗炎症などを目標に慢性肝炎、慢性腎炎などに用いられ、小柴胡湯、柴胡桂枝湯、柴芩湯、四逆散などの漢方方剤に配合されている。ミシマサイコの薬用成分であるオレアナン型トリテルペンサポニン(サイコサポニン A, C, D など)には、中枢抑制(強い鎮痛、鎮静)、抗炎症、解熱、抗潰瘍、肝タンパク質合成促進、肝グリコーゲン量増加、コレステロール低下作用が認められている。しかしながら、このように重要な薬用植物であるミシマサイコの薬用成分サイコサポニンの生合成に關与する酵素等の遺伝子は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、小柴胡湯、柴胡桂枝湯、柴芩湯、四逆散などの重要な漢方方剤に配合されている生薬「柴胡」の基原植物であるミシマサイコ(*Bupleurum falcatum* L.)について、主要薬用成分であるサイコサポニンの生合成に關与する酵素群の遺伝子を推定し、単離、解析を行い、サイコサポニン生合成の分子機構の全容を解明すると同時に、設計・合成生物学的な手法によって薬用植物資源の化学的多様性を合理的にエンジニアすることを目的とした。

具体的には、ミシマサイコにおけるサイコサポニン生合成に關与すると考えられるシトクロム P450、およびサイコゲニン配糖体化酵素遺伝子の同定と機能解析を進める。また、-アミリンの13位と28位の炭素が酸素原子を介してエーテル結合することで、環状エーテルが形成される過程についても、その詳細を明らかにする。

次に、得られた鍵酵素を、酵母をプラットフォームとした異種発現系により発現させ、設計・合成生物学的な手法によって薬用植物の化学的多様性を合理的にエンジニアする。

3. 研究の方法

ミシマサイコのサイコサポニン生合成の全容を分子生物学的に解明するための効率的な方法として、次世代シーケンサーを用いて、ミシマサイコの根、茎、葉それぞれの部位で発現している全ての mRNA の配列の配列を決定することによるトランスクリプト

ーム解析を行い、ミシマサイコの根、茎および根の EST (expressed sequence tag) データベースを作成する。次にこの EST データベースを BLAST 検索や部位別発現量の比較をすることで、サイコサポニン生合成に關与すると考えられる候補 cDNA を単離する。これら cDNA のコードする酵素の機能を、酵母や大腸菌の発現系を用いて解析することで、サイコサポニン生合成に關与する酵素遺伝子を同定する。

4. 研究成果

(1) ミシマサイコのサイコサポニン生合成の全容を効率的に解明するために、次世代シーケンサーを用いて、ミシマサイコの根、茎、葉それぞれの部位で発現している全ての mRNA の配列の配列を決定することによるトランスクリプトーム解析を行い、ミシマサイコの根、茎および根の EST (expressed sequence tag) データベースを作成した。次世代シーケンサーによる解析では、膨大な塩基配列データをアセンブルし、短い数多くのリード配列をつなぎ合わせることで、質の高いコンティグ配列を得る必要がある。本研究では、様々なアセンブリソフト、手法を試み、データを詳細に解析することにより、質の高い EST データベースが作成できた。例えば、ミシマサイコは根を薬用部位として用いることから、サイコサポニン生合成に關与するシトクロム P450 は少なくとも根で発現していると考えられる。植物は動物に比べ数多くのシトクロム P450 種をもつことが知られているが、今回作成した EST データベースを検索したところ、ミシマサイコの根で発現しているシトクロム P450 は 109 個であると推測され、これら 109 個のシトクロム P450 の平均コード領域長は約 1490bp であった。シトクロム P450 が約 500 アミノ酸からなるタンパク質であることから、ミシマサイコの根で発現している P450、109 個についてほぼ全長コード領域の情報が得られたことになり、今回作成した EST データベースの質の高さが保障される。この EST データを検索することで、サイコサポニン生合成に關与する全てのステップの酵素遺伝子を容易に、迅速に単離することが出来る。さらに、このデータを解析することで、根、茎、葉で特異的発現をしている遺伝子の同定はもちろん、各々の遺伝子の発現量の高低を比較するためにノーザン分析や RT-PCR を行わなくとも、*in silico* で遺伝子発現解析を行うことが可能となった。

(2) サイコサポニンの生合成には 11 位、16 位、23 位、28 位の 4 箇所が水酸化される必要があるため、少なくとも 4 種類のシトクロム P450 が關与していると予想される。サイコサポニンのアグリコンであるサイコゲニン生合成に關与するシトクロム P450 を同定するために、根、茎、葉での部位別遺伝子発現パターンから予想された 6 つの候補遺伝子、

根特異的に発現していると考えられる 4 つ、及び既に報告されているシトクロム P450 との類似性から 1 つの候補遺伝子の計 11 種のミシマサイコ由来の新規シトクロム P450 について cDNA クローニングを行い、その機能を解析した。ミシマサイコ由来の β -アミリン合成酵素遺伝子を導入した β -アミリン産生酵母内で、これら 11 種のシトクロム P450 をそれぞれ発現させ、代謝物を解析した。その結果、 β -アミリンを基質とし得るシトクロム P450 は、このうち 2 種で、R144792 は β -アミリンの 28 位の炭素を水酸化し、R197504 は 28 位の炭素をカルボン酸にまで 3 段階酸化することが明らかになった。この 2 つのシトクロム P450 は互いのアミノ酸配列の類似性が高いことから、構造の僅かな違いにより反応生成物が異なっていると考えられ興味深い。また、 β -アミリンからサイコゲニンまでの生合成は数種のシトクロム P450 による逐次反応であると予想されるため、複数のシトクロム P450 遺伝子を酵母で共発現させる系を構築した。さらに cDNA クローニングを進めた結果、これまでに、ミシマサイコより 16 種の新規シトクロム P450 の cDNA クローニングに成功し、これらの機能解析の結果、 β -アミリンの 28 位の炭素を水酸化するシトクロム P450、R144792 と、16 位の炭素を水酸化するシトクロム P450、Rnn2525 を同定することができた。これら 2 種のシトクロム P450 は部位別の発現パターン等から、サイコサポニンの生合成に関与していると考えられる。

(3) サイコゲニンからサイコサポニンへの生合成に関与する糖転移酵素遺伝子の単離を試みた。ミシマサイコから遺伝子を単離するために、まずミシマサイコの根の EST データベースから糖転移酵素を検索したところ、約 1400 個の EST を糖転移酵素遺伝子の候補配列として得ることができた。その後、各 EST 断片の重複を解析し、さらにハルザキヤマガラシ由来で、オレアナン系トリテルペノイドを配糖体化する糖転移酵素 BvUGT73C10 とのアミノ酸配列の類似性から、糖転移酵素の候補遺伝子を 8 個にまで絞り込むことができた。サイコサポニンの生合成は根で行われていると予想されているので、8 つの候補遺伝子の中から、葉よりも根での発現量が多いと予想される pcap10987 と pcap116407 についてプライマーをデザインし PCR を行って全長 cDNA を得ることができた。塩基配列を決定した結果、pcap10987 は 1473 塩基、pcap116407 は 1470 塩基のコード領域をもつことが確認できた。この候補遺伝子産物がサイコサポニン生合成に関与する糖転移酵素として働くのかを知るために組換えタンパク質を用いて活性をみることにした。単離した cDNA のコード領域を大腸菌発現ベクターに組み込み、タンパク質を発現させ抽出し SDS-PAGE を行うと、目的タンパク質が発現しているこ

とが確認できた。しかしながら、この粗抽出タンパク質を用いて活性測定を行ったところ、活性は見られなかった。粗抽出タンパク質中に目的のタンパク質の量が少ないことが原因ではないかと考え、現在、粗抽出タンパク質から目的のタンパク質の精製を試みている。また、目的タンパク質の発現量を増やすために、培養・誘導条件も検討中である。

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 3 件)

Naoki Kokudo, Mina Okazoe, Joji Takahashi, Kanako Iseki, Kazuko Yoshikawa, Hiroshi Imagawa, Toshihiro Hashimoto, Masaaki Noji and Akemi Umeyama: Six new lanostane triterpenoids from the fruiting body of *Tyromyces sambuceus* and antiproliferative activity. *Nat. Prod. Commun.*, **11**, 169-172 (2016)

Michimi Nakamura, Tomoko Ochiai, Masaaki Noji, Yasumitsu Ogura, Kazuo T. Suzuki, Naoko Yoshimoto, Mami Yamazaki and Kazuki Saito: An improved tolerance to cadmium by overexpression of two genes for cysteine synthesis in tobacco. *Plant Biotechnology*, **31**, 141-147 (2014) DOI: 10.5511/plantbiotechnology.14.0130a
Hiromichi Kenmoku, Hiroyuki Tada, Megumi Oogushi, Tomoyuki Esumi, Hironobu Takahashi, Masaaki Noji, Takeshi Sassa, Masao Toyota and Yoshinori Asakawa: Seed dormancy breaking diterpenoids from the liverwort *Plagiochila sciophila* and their differentiation inducing activity in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Nat. Prod. Commun.*, **9**, 915-920 (2014)

[学会発表](計 5 件)

ミシマサイコ由来のシトクロム P450 遺伝子の単離と解析: 山口誠美、野路征昭、遠藤加奈子、兼目裕充、高橋宏暢、岡田岳人、浅川義範、梅山明美、豊田正夫。日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月(横浜)

サイコサポニン生合成に関与する糖転移酵素遺伝子の探索: 新見明子、野路征昭、西森千晶、兼目裕充、高橋宏暢、岡田岳人、浅川義範、梅山明美、豊田正夫。日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月(横浜)
Molecular cloning and characterization of structural genes for saikosaponin biosynthetic enzymes in *Bupleurum*

falcatum L., Masaaki Noji, Hiromichi Kenmoku, Taketo Okada, Hironobu Takahashi, Akemi Umeyama, Masao Toyota, Yoshinori Asakawa, ISPSA 2015 Tokushima, 8. 30-9. 2.

サイコサポニン生合成に関するシトクロム P450 遺伝子の単離と機能解析：野路征昭，中渡瀬光華，武岡志保，後藤真弓，兼目裕充，高橋宏暢，岡田岳人，豊田正夫，浅川義範．日本薬学会第 135 年会，2015 年 3 月（神戸）

サイコサポニン生合成に関するシトクロム P450 の解析：野路征昭，後藤真弓，武岡志保，兼目裕充，高橋宏暢，岡田岳人，豊田正夫，浅川義範．日本生薬学会第 61 回年会，2014 年 9 月（福岡）

〔図書〕（計 1 件）

岡田岳人、野路征昭：薬用植物・生薬のメタボローム解析：川原信夫 監修「薬用植物・生薬の最前線～国内栽培技術から品質評価，製品開発まで～」シーエムシー出版 pp. 122-131 (2014)

6．研究組織

(1)研究代表者

野路 征昭 (NOJI, Masaaki)
徳島文理大学・薬学部薬学科・准教授
研究者番号：8 0 2 7 1 5 3 4