

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450123

研究課題名(和文)植物トリテルペノイド生合成制御の分子機構解明

研究課題名(英文)Regulatory mechanisms of triterpenoid biosynthesis in plants

研究代表者

関 光 (SEKI, HIKARU)

大阪大学・工学研究科 准教授

研究者番号：30392004

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)：植物トリテルペノイドの生合成制御機構を明らかにすべく、マメ科カンゾウ(甘草)が生産するグリチルリチンおよびマメ科植物全般が生産するソヤサポニンに注目し、先に同定していた生合成酵素(7-アミリン合成酵素、CYP88D6およびCYP93E3)遺伝子の発現制御に関わるプロモーター単離ならびに候補転写因子の遺伝子単離を行った。選抜した9種の候補転写因子について上記3種の生合成遺伝子プロモーターに対する転写活性化能を解析し、1種がソヤサポニン生合成に関わるCYP93E3(7-アミリン24位水酸化酵素)遺伝子プロモーターからの転写を30倍以上活性化することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Biosynthesis of triterpenoids is strictly regulated, as it is often limited to specific organs or tissues, or induced in response to external stimuli. However, the regulatory mechanism of triterpenoid biosynthesis is largely unknown. Glycyrrhizin is a triterpenoid saponin produced by Glycyrrhiza species (licorice) that is widely used as a medicine and natural sweetener. In addition to glycyrrhizin, licorice also produces other types of triterpenoids, such as soyasaponins. To elucidate the regulatory mechanisms behind tissue-type- and stimuli-dependent triterpenoid metabolism in licorice, we aimed to identify transcription factors (TFs) regulating the expression of triterpenoid biosynthetic genes. As a result, we identified a TF able to transactivate the CYP93E3 promoter by approximately 30-fold to promote soyasaponins biosynthesis.

研究分野：植物二次代謝

キーワード：植物トリテルペノイド 生合成 プロモーター 転写因子 シトクロムP450モノオキシゲナーゼ

1. 研究開始当初の背景

植物が生産する多様なトリテルペン関連化合物(トリテルペノイド:6個のイソプレレン単位からなる炭素数30の鎖状化合物、2,3-オキシドスクアレンを共通前駆体とする化合物群)は、様々な生薬の主活性成分として知られている他、医薬品原料、化粧品原料、天然甘味料原料等として多用されている。トリテルペノイドを含む植物二次代謝産物の生合成の多くは、器官・組織、さらにはセルタイプ特異的に、あるいは種々の環境要因に応答して緻密に制御されている。

様々な分類される二次代謝産物の中でも、アルカロイド、フェニルプロパノイド、グルコシノレートなどの化合物群については、それぞれの生合成制御において中心的な役割をはたす幾つかの転写制御因子がすでに同定されている。一方、トリテルペノイド生合成制御に関わる制御因子はモデル植物も含めていずれの植物種からも未だ同定されていない。そこで本研究では、植物有用トリテルペノイドの代表格である「グリチルリチン」を生産するマメ科カンゾウを主な研究材料として、生合成酵素遺伝子の発現制御に関わるシス因子および転写制御因子の同定を目指すこととした。

2. 研究の目的

植物におけるトリテルペノイドの生合成制御機構を、生合成酵素遺伝子の転写制御のレベルで明らかにする。特に、日本国内で最も使用量が多い生薬である甘草の基原植物であるマメ科カンゾウに着目し、カンゾウが特異的に生産するグリチルリチンやマメ科植物全般が共通して生産するソヤサポニンといった異なるトリテルペノイドの生合成が各器官・組織によってどのように制御(作り分け)されているのかを明らかにすべく、先に同定したグリチルリチンおよびソヤサポニン生合成酵素遺伝子の発現制御に関わるシス因子および転写制御因子を同定する。これにより、これまでいずれの植物種においても全く明らかにされていない、植物トリテルペノイド生合成制御の分子機構を解明するとともに、同定した転写制御因子を高発現する形質転換カンゾウ毛状根を作出し、転写因子を利用した植物トリテルペノイド代謝工学・物質生産への応用につながる基礎的知見を得ることを目的とする。さらに、カンゾウで明らかになった制御機構の普遍性を評価するために、マメ科以外の生薬原料植物からも新規のトリテルペノイド生合成酵素遺伝子を単離し機能同定する。

3. 研究の方法

(1) グリチルリチン生合成酵素遺伝子プロモーターの系統間比較

グリチルリチン生合成酵素遺伝子プロモーター中のシス配列を推定するため、グリチルリチン含量が異なる系統間のプロモータ

ー配列比較を行った。ウラルカンゾウにはグリチルリチン含量が高い「高含量」系統とグリチルリチン含量が低い「低含量」系統が存在する。グリチルリチン生合成に関わる酵素であるβ-アミリン合成酵素(bAS)およびβ-アミリン 11 位酸化酵素(CYP88D6)をコードする遺伝子の発現を両系統間で比較したところ両遺伝子の発現量はグリチルリチン「高」含量系統において顕著に高いことを見出した。そこで、これらの酵素遺伝子のプロモーター配列を両系統から単離し塩基配列ならびにプロモーター活性を比較することで遺伝子発現に重要なシス因子の候補探索を行った。

(2) トリテルペノイド生合成酵素遺伝子の発現制御に関わる転写因子の同定

これまでに整備したカンゾウの組織・器官別トランスクリプトームデータからトリテルペノイド生合成酵素遺伝子の発現制御に関わる候補転写因子のマイニングを行った。具体的には、グリチルリチン生合成に関わるbASおよびCYP88D6に加え、ソヤサポニン生合成に関わるβ-アミリン 24 位水酸化酵素(CYP93E3)をコードする遺伝子と発現パターンが類似する転写因子遺伝子を選抜し、全長コード領域を含むcDNA断片を単離した。各候補転写因子cDNAを構成的プロモーターであるCaMV35Sプロモーターの下流に連結したエフェクターコンストラクトを構築し、上記トリテルペノイド生合成酵素遺伝子プロモーター::GUSレポーター遺伝子に対する転写活性化能をタバコBY-2培養細胞由来プロトプラストへのレポーター/エフェクターコンストラクトのコ・トランスフェクションによって解析した。

(3) カンゾウ培養ストロンのトリテルペノイドおよび遺伝子発現プロファイリング

これまでに、カンゾウ培養組織でのグリチルリチン生産が試みられたが成功例はない。培養組織ではなぜグリチルリチン生産が抑制されるのかを明らかにするため、カンゾウ培養ストロンと土壌栽培根のリテルペノイドプロファイリングを行った。それと同時に、カンゾウ培養ストロンのトランスクリプトーム解析を新たに行い、培養ストロンで特異的に蓄積するトリテルペノイドの生合成に関わる新規P450の同定を進めた。

(4) 薬用植物キキョウからの新規トリテルペノイド生合成関連P450の同定

キキョウの根(桔梗根)に含まれるトリテルペノイド配糖体の生合成に関わる新規P450を同定すべく医薬基盤・健康・栄養研究所薬用植物資源研究センターにて系統保存されているキキョウの根、葉、花弁を材料とするRNA-seq解析を行い、得られた約4万の遺伝子のうち、根での発現が高い6種のP450遺伝子を単離し、β-アミリン合成酵素遺伝

子をあらかじめ導入しβ-アミリンを内在基質から生産するように改変した出芽酵母株に導入した。得られた組換え酵母株培養液の溶媒抽出物をガスクロマトグラフィー質量分析装置で分析しβ-アミリンに対する酸化活性の有無を評価した。

4. 研究成果

(1) グリチルリチン生合成酵素遺伝子プロモーターの系統間比較

グリチルリチン「高」含量系統とグリチルリチン「低」含量系統のそれぞれから *bAS* および *CYP88D6* 遺伝子プロモーター断片を単離し塩基配列を比較した結果、系統間でプロモーター配列に多型が見られた。次に、各プロモーターを GUS レポーター遺伝子に連結したコンストラクトを作成しプロモーター活性を比較したところ、系統間でのプロモーター GUS の発現に顕著な量的・質的な差は認められなかった。このことから、系統間での生合成遺伝子の発現レベルの違いは、プロモーター配列中の多型よりも両遺伝子の発現制御にかかわる転写制御因子の発現レベルの違いに起因する可能性が示唆された。

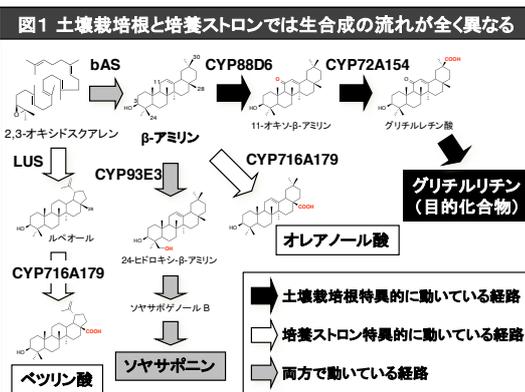
(2) トリテルペノイド生合成酵素遺伝子の発現制御に関わる転写因子の同定

カンゾウおよびモデルマメ科植物タルウマゴヤシのトランスクリプトームデータを用いた候補転写因子の選抜を進め、計9種の候補転写因子を選抜した。これらの全長コード領域を含む cDNA 断片を単離し CaMV35S プロモーターの下流に連結したエフェクターコンストラクトを構築した。*bAS*、*CYP88D6* および *CYP93E3* 遺伝子プロモーターそれぞれに対する転写活性化能を解析した結果、候補転写因子のうちの1種 (bHLH ファミリー) が *CYP93E3* 遺伝子プロモーターからの転写を30倍以上活性化することが判明した。さらに、*CYP93E3* 遺伝子プロモーターを5'上流側から段階的に欠失させたディリジョンコンストラクトならびに bHLH ファミリーの結合モチーフに変異を導入した変異プロモーターを用いた実験を行うことで上記の候補転写因子が結合すると推定されるシス領域を特定した。

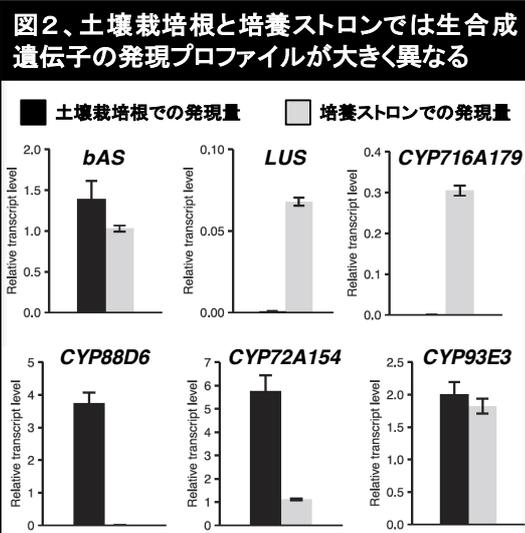
(3) カンゾウ培養ストロンのトリテルペノイドおよび遺伝子発現プロファイリング

培養ストロンに含まれるトリテルペノイドを分析した結果、培養ストロンではオレアノール酸、ベツリン酸が特異的に蓄積しており、逆にグリチルリチンは土壤栽培根の1/1,000程度しか含まないことが判明した。そこで、オレアノール酸およびベツリン酸生合成に特異的に関与する P450 を特定するために、培養ストロンのトランスクリプトーム解析を行い、先にタルウマゴヤシから同定したオレアノール酸およびベツリン酸生合成に関与する *CYP716A12* のホモログを探索した。

得られた推定オルソログである *CYP716A179* の酵素活性を解析したところ、ルペオールおよびβ-アミリンの28位を酸化してそれぞれベツリン酸およびオレアノール酸を生成することが判明した (図1)。



次に、土壤栽培根と培養ストロンにおける各酵素遺伝子の発現を比較したところ、グリチルリチン経路に特異的な *CYP88D6* および *CYP72A154* の発現は培養ストロンにおいて抑制されており、逆に、ベツリン酸経路に特異的なルペオール合成酵素 (LUS) 遺伝子およびベツリン酸とオレアノール酸経路の両方に関わる *CYP716A179* は培養ストロンのみで発現していることが判明した (図2)。



これらの観察から、今後、培養ストロンにおいて *LUS* および *CYP716A179* の転写を特異的に活性化する因子、同時に、*CYP88D6* および *CYP72A154* の転写を特異的に抑制する因子の探索が必要であると考えられる (文献番号2)。

(4) 薬用植物キキョウからの新規トリテルペノイド生合成関連 P450 の同定

キキョウの根 (桔梗根) に含まれるトリテルペノイド配糖体の生合成に関わる新規 P450 を同定すべくトランスクリプトーム解析を行い、根において高く発現する P450 遺伝子6種 (*CYP716* および *CYP72* ファミリー)

を選抜し機能解析を行うことにより2種の新規P450、CYP716A140v2およびCYP716A141を機能同定した。

CYP716A140v2は β -アミリン28位酸化酵素、もう一方のCYP716A141は β -アミリン β 16位水酸化酵素として機能することを明らかにした。今後、これらのP450の根における発現を制御する因子、カンゾウとの共通性の有無についても興味を持たれる(文献番号1)。

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6件)

1) Tamura, K., Teranishi, Y., Ueda, S., Suzuki, H., Kawano, N., Yoshimatsu, K., Saito, K., Kawahara, N., Muranaka, T. and Seki, H.: Cytochrome P450 monooxygenase CYP716A141 is a unique β -amyrin C-16 β oxidase involved in triterpenoid saponin biosynthesis in *Platycodon grandiflorus*. *Plant Cell Physiol.* in press. 査読有 doi.org/10.1093/pcp/pcx043

2) Tamura, K., Seki, H., Suzuki, H., Kojoma, M., Saito, K. and Muranaka, T.: CYP716A179 functions as a triterpene C-28 oxidase in tissue-cultured stolons of *Glycyrrhiza uralensis*. *Plant Cell Rep.* 36(3): 437-445 (2017). 査読有 doi:10.1007/s00299-016-2092-x

3) Mochida, K., Sakurai, T., Seki, H., Yoshida, T., Takahagi, K., Sawai, S., Uchiyama, H., Muranaka, T. and Saito, K.: Draft genome assembly and annotation of *Glycyrrhiza uralensis*, a medicinal legume. *Plant J.* 89(2): 181-194 (2017). 査読有 doi:10.1111/tpj.13385

4) 關 光, 田村啓太, 村中俊哉: 植物の非糖質系天然甘味成分の生合成、FFI ジャーナル Vol. 221(3): 225-231 (2016). 査読有

5) 關 光: 薬用植物研究の最前線、生物工学会誌 Vol. 93(7): 413 (2015). 査読無し

6) Seki, H., Tamura, K. and Muranaka, T.: P450s and UGTs: key players in the structural diversity of triterpenoid saponins. *Plant Cell Physiol.* 56(8): 1463-1471 (2015). 査読有 doi:10.1093/pcp/pcv062

[学会発表] (計15件)

1) 關 光, 植物トリテルペノイド生合成とその制御機構、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 19 日、京都女子大学(京都府・京都市)

2) Tamura, K. et al: Molecular cloning and characterization of triterpene oxidases in *Platycodon grandifloras*. 第 58 回日本植物生理学会年会、2017 年 3 月 18 日、鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県・鹿児島市)

3) Yoshida, K. et al: Exploration of the transcription factors regulating triterpenoid biosynthesis in licorice. 第 58 回日本植物生理学会年会、2017 年 3 月 18 日、鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県・鹿児島市)

4) 關 光, 植物テルペノイドの代謝多様性と遺伝子ディスカバリー、第 53 回植物化学シンポジウム、2016 年 12 月 10 日、千葉大学薬学部 120 周年記念講堂(千葉県・千葉市)

5) Tamura, K. et al: Identification of β -amyrin 28-oxidase in *Glycyrrhiza uralensis*. 第 68 回生物工学会大会、2016 年 9 月 30 日、富山国際会議場(富山県・富山市)

6) 關 光ら: テルペノイドの代謝多様性と遺伝子ディスカバリー、第 68 回生物工学会大会、2016 年 9 月 30 日、富山国際会議場(富山県・富山市)

7) 寺西優雅ら: キキョウサポニンの生合成に関わるシトクロム P450 の同定、第 34 回日本植物細胞分子生物学会大会、信州大学繊維学部、2016 年 9 月 3 日、(長野県・上田市)

8) 田村啓太ら: 薬用植物カンゾウのトリテルペノイド生合成制御に関わる転写因子の探索、第 34 回日本植物細胞分子生物学会大会、信州大学繊維学部、2016 年 9 月 1 日、(長野県・上田市)

9) Tamura, K. et al: Identification of β -amyrin 28-oxidase in *Glycyrrhiza uralensis*, 55th Annual Meeting of the Phytochemical Society of North America, August 7, 2016, Davis, California, USA.

10) 田村啓太: 植物トリテルペノイドサポニンの生合成酵素遺伝子とその制御機構、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

11) 田村啓太ら: ウラルカンゾウ由来 β アミリン28位酸化酵素の同定、第57回日本植物生理学会年会、2016年3月20日、岩手大学上田キャンパス(岩手県・盛岡市)

12) Tamura, K. et al: Analysis of Promoter Activities of Glycyrrhizin Biosynthetic Genes in Transgenic *Arabidopsis thaliana*. Noble Foundation Metabolomics Workshop,

March 2015, Ardmore, Oklahoma, USA.

13) 田村啓太ら：薬用植物カンゾウのグリチルリチン生合成遺伝子のプロモーター解析、第32回日本植物細胞分子生物学会大会、2014年8月21日、いわて県民情報交流センター（岩手県・盛岡市）

14) Tamura, K. et al: Promoter Analysis of Glycyrrhizin Biosynthetic Genes Using Transgenic *Arabidopsis thaliana*. 25th International Conference on Arabidopsis Research, July 2014, Vancouver, Canada.

15) 田村啓太ら：薬用植物カンゾウのグリチルリチン生合成遺伝子のプロモーター解析、根研究学会 第40回根研究集会、2014年5月17日、北海道医療大学（北海道県・石狩郡当別町）

〔図書〕（計1件）

1) 關光、田村啓太、村中俊哉：第2章 トリテルペノイド生合成における P450 の多様な機能-薬用植物・生薬の最前線、シーエムシー出版（東京）132-139（2014）.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関光（SEKI, Hikaru）

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：30392004