

植物の異物修飾機構を応用した配糖体生産への取り組み

田口 悟朗

植物は種特異的にさまざまな二次代謝産物を合成し、周囲とのコミュニケーションに利用している。これらの物質は一般に生理活性が高く、有用なものが多い。その多くが、生合成の過程において骨格形成されたのち、さらに水酸化、メチル化、グルタチオン抱合、配糖化、アシル化など種々の修飾反応を受ける。これらの化学修飾は、生理活性の調節、安定化、輸送・蓄積などにおいて重要な役割を果たすと考えられている。また、植物は外部から農薬などの低分子の異物がもたらされた場合にも、上記と同様にさまざまな修飾反応を行うことが知られている。これらの反応は、動物の肝臓における代謝反応と良く似ており、Sandermannが「Green liver」と呼んだように、植物における重要な解毒反応であると考えられている^{1,2)}。修飾反応を受けた異物は、植物ではおもに液胞に蓄積されることが知られているが、細胞壁に蓄積される例や細胞外に放出される例も知られている。

植物では、動物の「肝臓」のような解毒代謝に特化した器官が発達しているわけではないため、同じ細胞内で発現している生合成酵素が同時に異物代謝も担っている可能性もある。ゲノム解析の進展により、植物では、これらの物質代謝に関わる修飾酵素や輸送体がゲノム上にそれぞれ数十～数百種存在することが明らかとなった。たとえばモデル植物であるシロイヌナズナの場合、表1に示すようにシトクロムP450酵素が272種、配糖化酵素が107種、ABCトランスポーターが100種以上、それぞれ存在する^{3,4)}が、その数は哺乳動物や酵母など他の真核生物と比較すると圧倒的に多く、植物の持つ多様な二次代謝産物の生産を支えると考えられている^{2,4)}。同時に、植物は潜在的に種々の異物に対応する能力を備えており、この能力を利用した多様な物質変換系を構築できる可能性があるといえる。これらの修飾酵素や輸送体がそれぞれどのような代謝に関与しているのかは不明

表1. シロイヌナズナゲノムに存在する、異物代謝に関連する可能性がある遺伝子の数

遺伝子ファミリー	遺伝子数
シトクロム P450 酵素	272
配糖化酵素	107
アシル化酵素 (CoA 依存型)	64
グルタチオン-S-転移酵素	48
糖質加水分解酵素ファミリー1	47
メチル化酵素 (SABATH + Type I)	30
ABCトランスポーター (うちフルサイズ)	>100 (53)

(文献3, 4から抜粋して作成)

な点が多く、これからの詳細な解析が期待される。

これらの修飾反応のうち、配糖化反応は多くの二次代謝産物の最終段階の反応であるとともに、異物代謝においても主要な反応である^{2,5)}。低分子化合物に対する糖転移反応に関わる配糖化酵素は、おもに糖転移酵素ファミリー1に属しており、ヌクレオチド糖を糖供与体として、糖受容体の水酸基やアミノ基、カルボキシ基などに糖を転移する反応を触媒する⁵⁻⁷⁾。ヌクレオチドとしてUDP、糖としてグルコースが一般的であるが、その他にガラクトース、ラムノース、グルクロン酸、キシロースなど多様な糖が利用される。

配糖化された化合物は、元の化合物と比べてその水溶性や安定性が大きく向上するなど、物性が大きく変化する。この配糖化反応の生体内での役割として、1) 不安定な化合物の安定化、2) 物質の輸送・蓄積のタグ、3) 生理活性物質の活性調節、などが考えられている⁵⁾。このように、配糖化によって化合物の物性や生物活性を制御できるうえ、配糖体は加水分解によって元の化合物に戻すことが比較的容易であることなどから、配糖化反応は物質の修飾反応としての利用価値が高く、その利用に向けた種々の取り組みが行われている。本稿では、植物の代謝能力を利用した物質変換、特に配糖体生産へ向けた取り組みについて紹介したい。

植物培養細胞を用いた物質変換

植物の代謝能力を利用した物質変換では、液体培養、もしくは固定化した植物培養細胞に物質を投与し、代謝物に変換する「biotransformation」が70年代から盛んに行われてきた⁸⁾。この手法は、生合成中間体を投与して有用物質生産を増強する手法と、本来その植物に存在しない化合物を投与して、新規の化合物の合成を試みる手法とに大別できる。これまでに、さまざまな物質の変換が試みられ、植物の代謝能力の有用性が示されてきた。しかし、1) 細胞培養のコストがかかる、2) 配糖体など、代謝物の多くは細胞内(おもに液胞内)に蓄積される(図1A)ため、成分の抽出作業が必要となり、細胞を生かしたままの連続生産が難しい、などの限界があり、高付加価値なもの以外は実用化の可能性も低かった。

配糖化酵素の機能解析と配糖体生産の試み

植物に種々の物質変換を触媒する酵素活性が存在することが明らかとなったが、配糖化酵素などの植物代謝酵素は、一般にその植物体内での生成量があまり多くなく不安定なものが多かったため、精製した酵素を利用した

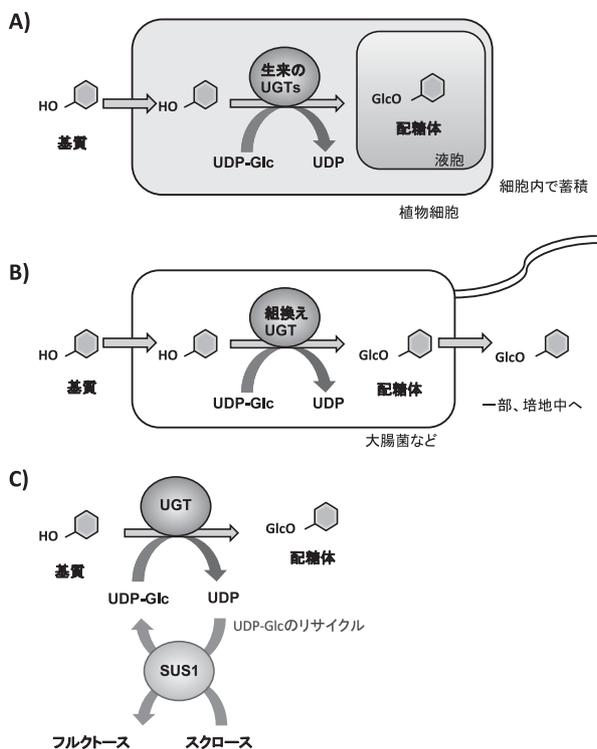


図1. さまざまな配糖体生産の試み。A) 植物細胞を用いたbiotransformation。B) 異種宿主発現させた配糖化酵素による配糖体への変換（文献12より）。C) スクロース合成酵素とリンクさせてUDP-グルコースをリサイクルする配糖体への変換反応（文献14より）。UGT, 配糖化酵素；SUS1, スクロース合成酵素。

物質生産は困難であった。近年、植物酵素遺伝子の解析が進展すると、異種宿主発現酵素を用いた物質変換が盛んに試みられるようになった。たとえば、Limらは、ゲノム情報を元に、シロイヌナズナの配糖化酵素を大腸菌で網羅的に発現させて反応性を解析する手法で種々の基質に対する配糖化酵素を同定した⁹⁾。その後、さまざまな植物種から多種多様な基質に対する配糖化酵素の遺伝子が単離され、その解析が進展している^{6,7)}。従来、配糖化酵素はどちらかという「厳密な基質特異性」を示すことが多いと考えられていたが、筆者らの解析なども含め、特に異物代謝に関与すると考えられる配糖化酵素では、より「幅広い基質特異性」を持つことが明らかとなっている^{10,11)}。また、*in vitro*では、*in vivo*と比較して多様な基質に反応することも多いため⁶⁾、これら基質認識についての分子機構の解明により、さまざまな化合物に対する配糖化反応が可能になると期待される。

配糖化酵素反応を行う場合、基質となるUDP糖が高価であるため、その供給が課題であった。Limらは、微生物の内在性UDP-グルコースを利用する「細胞内変換系」(図1B)を提唱し¹²⁾、基質と酵素の組み合わせによっては約50%の変換効率が得られ、生成物が「培地中」に放出されることを報告した¹³⁾。この変換系では、基質に

よる変換効率の差が大きいので、今後、その変換効率を向上させることができるかが鍵といえる。

また、Masadaらは、目的物質の変換を行う配糖化酵素の反応をスクロース合成酵素の逆反応によってUDP-グルコースを合成させる反応とリンクさせた配糖体の合成方法(図1C)を確立し、薬用成分クルクミンなどの配糖体への大量変換に成功した¹⁴⁾。高濃度のスクロースが必要といった課題はあるものの、UDP-グルコースの供給にめどが付いたことから、より安価な目的配糖体生産が可能となることが期待される。

最近、Matsubaらは、カーネーションから新規のアントシアニン配糖化酵素を報告した¹⁵⁾。この酵素は、従来の糖転移酵素とはまったく異なる糖質加水分解酵素ファミリー1に属しており、UDP糖に依存せず、アシル化糖からアントシアニンへの糖転移反応を触媒する。この反応がどのような範囲の基質に対して利用可能かはまだ不明であるが、高価なUDP糖を必要としないため、より安価な配糖体合成系の確立が可能となるかもしれない。

異物代謝における配糖化・マロニル化と配糖体の放出

筆者らは、異物代謝のモデルとして種々の植物の幼植物にフェノール性異物であるナフトールを投与し、その代謝における修飾反応と代謝物の蓄積形態を解析した^{16,17)}。その結果、タバコなど多くの植物で、培地から吸収されたナフトールはマロニル化されたグルコース配糖体として細胞内に蓄積された。植物体内への移行割合に差があるが、この反応は多くの高等植物で観察されたことから、植物で一般的な異物代謝反応であると考えられた。さらに興味深いことに、シロイヌナズナなど、いくつかの植物種の幼植物では、投与したナフトールの一部がマロニル化を受けていないグルコシドとして培地中から検出された(図2)。この放出現象はほかのいくつかのフェノール性異物を投与した際にも観察された。細胞外

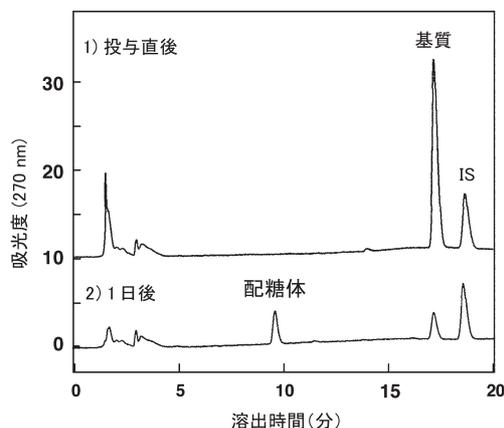


図2. シロイヌナズナ幼植物による異物配糖体の放出。液体培地で生育させたシロイヌナズナ幼植物にナフトールを投与し、HPLCで解析した。一部が配糖体として放出された。IS, 標準物質（文献17より）。

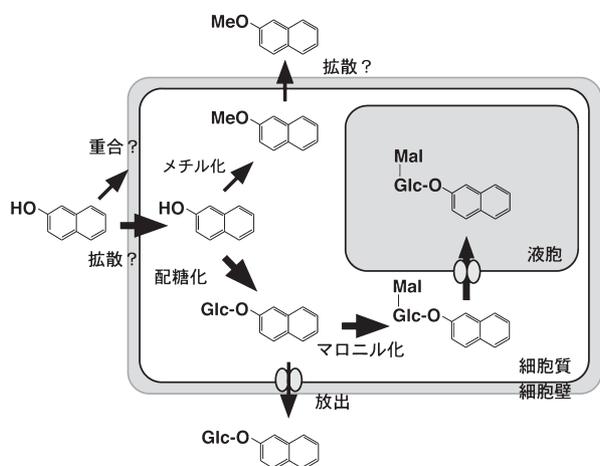


図3. シロイヌナズナのナフトール代謝の模式図。細胞内に入ったナフトールはおもにマロニルグルコシドとして細胞内に蓄積されるほか、一部はメトキシ体、配糖体として、細胞外に放出される。また、細胞壁に重合するものも認められる。Glc, グルコシル; Mal, マロニル; Me, メチル (文献17より、一部改変)。

で配糖化活性は検出されず、また、配糖体を投与しても細胞内に輸送されないことから、一定の条件下では、配糖体が細胞外へ放出されることを示唆していた。そこで、このマロニル化反応に関わるシロイヌナズナのマロニル化酵素 (AtPMT1) を特定し、その破壊株 (*pmat1*) の幼植物にナフトールを投与したところ、生成した配糖体の大部分が培地中へ放出された。一方、*pmat1* に *AtPMT1* を発現させて相補した株では、配糖体の培地への放出が野生株と同等まで減少した¹⁷⁾。このことから、ナフトールなど細胞内蓄積時に配糖化およびマロニル化を受ける化合物では、マロニル化が細胞内蓄積の鍵となっており、マロニル化を受けないと、配糖体が細胞外に放出されることが示唆された (図3)。

異物代謝機構を応用した生物変換

植物による物質変換では、通常、前述のように培養細胞が用いられてきたが、培養コストの問題が大きかった。幼植物は成熟植物と比較すると特徴的な物質の生産は少ないが、目的の代謝活性が得られるのであれば、生育期間が短いところから栽培コストを格段に抑えることが可能となる。そのため、特に目的の活性を示す、もしくは組換え酵素を発現させた幼植物・芽生えなどをもちいる物質変換系は、今後、物質生産の有用な選択肢となると考えられる。

また、植物の配糖化反応をそのまま物質変換系として利用すると、生成物が細胞内 (液胞内) に蓄積されるという問題があった。今回、筆者らは、種々の植物において異物配糖体が放出される現象を発見した。さらに、シロイヌナズナ幼植物において配糖化に続いて起こる反応の活性を欠失させたところ、大部分の異物配糖体が培地

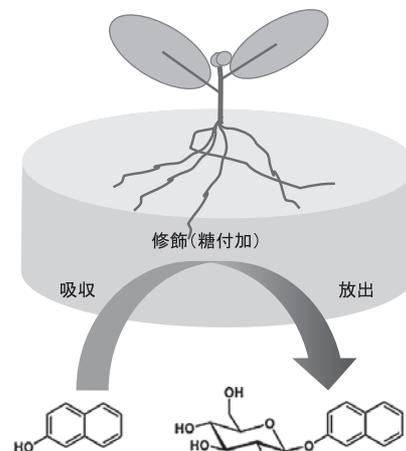


図4. 植物の異物代謝機構を応用した配糖体生産

中に放出された。このことは、幼植物体を利用して、異物代謝機構を応用した配糖体の分泌生産が可能となりうることを示唆している (図4)。

生物変換系では、化学反応と比較すると、目的化合物の物性、とりわけ水 (培地/溶媒) への溶解性とその変換効率を考える上での大きな課題となることが多い。今回の系でもその点はまだ残したままであり、検証が必要である。また、植物そのものを利用した物質変換では、酵素反応による物質変換と比較すると基質コストは低いが、副反応による基質のロスが課題となる。ナフトールの例では、植物種により、メチル化物などの副生成物、過酸化反応によって細胞壁に重合したと推定されるロスなどが観察された。今後、異物代謝反応の解析と制御を通じ、より効率的な目的代謝物の生産を検討したい。

文 献

- 1) Sandermann, H.: *Pharmacogenetics*, **4**, 225 (1994).
- 2) Sandermann, H.: *Trends Plant Sci.*, **9**, 406 (2004).
- 3) D'Auria, J. and Gershenzon, J.: *Curr. Opin. Plant Biol.*, **8**, 308 (2005).
- 4) Martinoia, E. et al.: *Planta*, **214**, 345 (2002).
- 5) Jones, P. and Vogt, T.: *Planta*, **213**, 164 (2001).
- 6) Claire, M. M. et al.: *Trends Plant Sci.*, **10**, 543 (2005).
- 7) Bowles, D. et al.: *Curr. Opin. Plant Biol.*, **8**, 254 (2005).
- 8) Reinhard, E. et al.: *Adv. Biochem. Eng.*, **16**, 49 (1980).
- 9) Lim, E. K. et al.: *J. Biol. Chem.*, **276**, 4344 (2001).
- 10) Taguchi, G. et al.: *Plant Sci.*, **64**, 231 (2003).
- 11) Loutre, C. et al.: *Plant J.*, **34**, 485 (2003).
- 12) Lim, E. K.: *Chemistry*, **11**, 5486 (2005).
- 13) Caputi, L. et al.: *Chemistry*, **14**, 6656 (2008).
- 14) Masada, S. et al.: *FEBS Lett.*, **581**, 2562 (2007).
- 15) Matsuba, Y. et al.: *Plant Cell*, **22**, 3374 (2010).
- 16) Taguchi, G. et al.: *Plant J.*, **42**, 481 (2005).
- 17) Taguchi, G. et al.: *Plant J.*, **63**, 1031 (2010).