

組換え酵母を用いた植物トリテルペノイドの生産

關 光*・村中 俊哉

高等植物が生産する代謝産物は20万種を越えると推定されており¹⁾、哺乳動物のそれを遥かにしのぐ化学的多様性を有している。植物が有するこのような化学的多様性は潜在的な医薬品資源として重要な位置を占めており、実際、現在使用されている医薬品の約25%は、植物由来の化合物そのもの、植物由来化合物の誘導体、あるいは植物成分をヒントにした化合物であると言われている²⁾。これら植物医薬品は、植物材料からの抽出あるいは半合成との組み合わせの他、培養細胞を用いたバイオテクノロジー生産などにより供給されてきたが、近年、植物が有する生合成系を微生物において再構築し、植物医薬成分を生産させようとする新たな試みが注目されている。本稿では、多様な生理活性物質を含む植物トリテルペノイドに焦点をあて、生合成に関わる酵素遺伝子の同定、ならびに、生合成遺伝子を導入した組換え酵母において植物由来の生合成経路を再構築/デザインする筆者らの試みについて紹介したい。

医薬品原料としての植物トリテルペノイド

6個のイソプレン単位から構成されるトリテルペノイ

ドは、メバロン酸経路を経て生成する炭素数30の鎖状化合物である2,3-オキシドスクアレン（トリテルペノイドおよびステロール類の共通前駆体）がさまざまな様式で閉環したトリテルペノールが炭素骨格となり、さらに種々の修飾反応を受けて生成する³⁾（図1）。その構造は多様で、植物では、トリテルペノールだけでも80種以上が知られている。多くの場合トリテルペノールは、部位特異的な酸化反応を受けた後、配糖化され、構造がさらに多様化する。

トリテルペノイドには、カンゾウ（甘草）のグリチルリチンやチョウセンニンジン（朝鮮人参）のジンセノサイドなど、重要な生薬の有効成分と考えられているものや、その誘導体（PA-457⁴⁾）が抗HIV薬として開発が進められているベツリン酸など、多くの生理活性物質が含まれている。その生合成/構造多様化の過程においては、2,3-オキシドスクアレンを環化し種々のトリテルペノールを生成するオキシドスクアレン環化酵素（OSC）の他、トリテルペノールの酸化修飾を担うシトクロームP450モノオキシゲナーゼ（P450）、および配糖化反応を触媒するファミリー1グリコシルトランスフェラーゼ

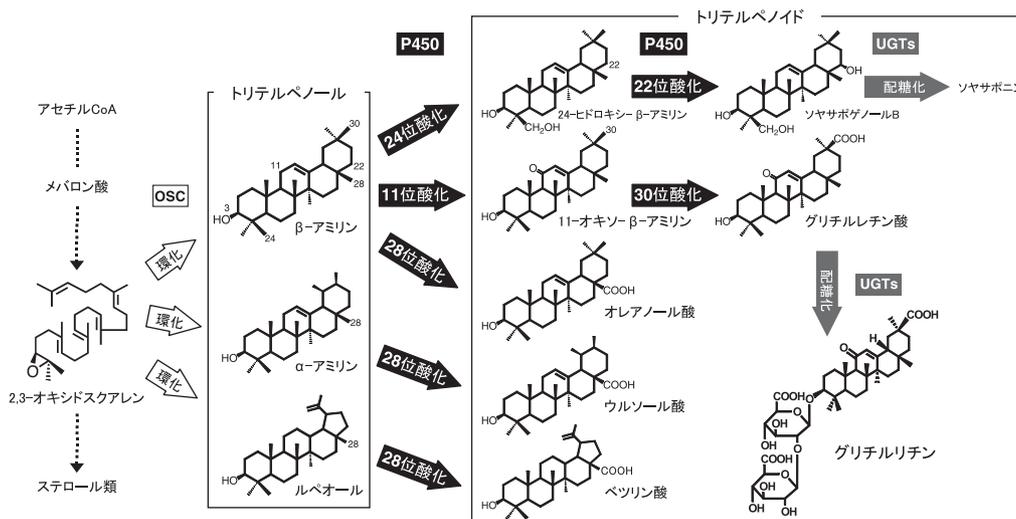


図1. トリテルペノイド生合成のスキーム

* 著者紹介 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻（准教授） E-mail: hseki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

(UGT)と呼ばれる酵素群が大きな役割を果たしている。しかしながらこれらのうち、特に、P450に関する知見はいまだ乏しい。

本稿では、カンゾウに含まれるトリテルペノイド配糖体(サポニン)であるグリチルリチンのケースを中心に、植物トリテルペノイド生合成に関わるP450の単離・機能同定、および組換え酵母における植物トリテルペノイドの生産に関する筆者らの最近の研究成果について解説する。

カンゾウ(甘草)について

カンゾウはマメ科カンゾウ属の多年草であり、その肥大した根および地下茎にグリチルリチンを含む(乾燥した根・地下茎が生薬の甘草である)。甘草から抽出・精製されたグリチルリチンやその塩類、また、グリチルリチンの加水分解により得られるグリチルレチン酸(非糖部に相当)には、抗炎症作用、肝機能補強作用など多様な薬理作用があることから、医薬・化粧品原料として用いられている。また、グリチルリチンはショ糖の150倍以上の甘さを持つことから、カンゾウ抽出物は甘味料としても多用されている⁵⁾。しかしながら、近年、大産地である中国において乱獲によるカンゾウ生育地の砂漠化およびグリチルリチン含量が高い優良品の減少が問題となっている。そのため、日本国内でも、グリチルリチン高含量品種の育種⁶⁾、植物工場での栽培試験など多方面からの研究が進展している。

グリチルリチン生合成遺伝子ディスカバリー

グリチルリチンは、その炭素骨格の構造から、多くの植物種に共通して含まれるトリテルペノールである β -アミリンを前駆物質として、11位の2段階の酸化、30位の3段階の酸化、3位水酸基への糖転移反応を経て生合成されると考えられる(図1)。筆者らが本研究を開始した当時すでに、2,3-オキシドスクアレンを閉環し β -アミリンを生成する β -アミリン合成酵素(OSCの一種)については、スペインカンゾウを含む複数の植物種から遺伝子単離がなされていた⁷⁾。一方、 β -アミリンからグリチルリチンに至る経路に関わる生合成酵素についてはまったく明らかにされていなかった。そこで筆者らは、 β -アミリン以降の生合成酵素遺伝子の同定を目的として、約1万の非重複配列を含むウラルカンゾウ地下茎由来ESTを構築した⁸⁾。

植物P450は大きなジーンファミリーを形成する

植物二次代謝においては、P450と呼ばれる一群の酵素が大きな役割を果たすことが良く知られている。P450は、分子状酸素から一原子の酸素を基質に導入する一原子酸素添加酵素であり、活性中心にヘム鉄が配位する膜結合型タンパク質である。P450の命名はアミノ酸配列の相同性に基づいており、たとえばCYP71A1の場合、CYPはP450スーパーファミリーに属することを示し、71はファミリー番号、Aがサブファミリー記号、1が遺伝子番号を示す⁹⁾。アミノ酸配列が40%以上一致すると同一ファミリーに、55%以上一致すれば同一サブファミリーに分類されるのが原則である。P450は生物界に広く分布するが、生物種によって有するP450遺伝子の数は大きく異なる。被子植物では、1ゲノムあたり約50ファミリー、約300個のP450遺伝子が存在することが明らかとなっている¹⁰⁾。この数字は、酵母、ショウジョウバエ、ヒトが有するP450分子種の数(それぞれ、3, 87, 56)と比較して際立って多く、このことは、植物が有する化学的多様性の創出にP450が重要な役割を果たしていることを示唆している^{9,10)}。

筆者らが本研究を開始した当時、トリテルペノイド生合成に関与するP450としてはサイズのCYP93E1のみが機能同定されていた¹¹⁾。CYP93E1は、グリチルリチンと同じく β -アミリンを基本骨格とするソヤサポニンの生合成経路において、 β -アミリン24位酸化酵素として機能する酵素である(図1)。そこで筆者らは、グリチルリチン生合成に関わる酸化酵素もP450であると予想し、前述のESTから、それらをコードする遺伝子の特定を試みた。

β -アミリン11位酸化酵素の機能同定

筆者らは、前述のESTから約40のP450遺伝子を抽出し、グリチルリチンが蓄積する地下部での発現が高い5つの候補P450を選抜した。各P450遺伝子を昆虫細胞に導入しタンパク質を発現させた。ほとんどの植物P450は膜結合タンパクであるため、各P450を発現する昆虫細胞からマイクロソーム画分を調製し、 β -アミリンを基質とするインビトロ酵素活性試験を行った。その結果、候補P450の一つであるCYP88D6が β -アミリンの11位の2段階の水酸化反応を触媒し、予想生合成中間体の1つである11-オキソ- β -アミリンに変換することを見出した¹²⁾(図1)。

これまでに、CYP88Dサブファミリーに属するP450は、カンゾウ、タルウマゴヤシ、ミヤコグサといったマメ科植物からしか見つかっていない。このことは、CYP88Dサブファミリーがマメ科で特異的に進化し、トリテルペノイドの構造多様化に寄与している可能性を示唆している。

11-オキソ-β-アミリン30位酸化酵素の機能同定

続いて筆者らは、同様の*in vitro*実験により、CYP88D6とは異なるファミリーに属するCYP72A154が11-オキソ-β-アミリンの30位の酸化反応を触媒することを見いだした¹³⁾。CYP72AサブファミリーはCYP88Dと異なり、単子葉、双子葉問わず、植物界に広く分布し、これまでにCYP72A219まで命名がなされている。しかしながら、それらの酵素機能はほとんど解明されておらず、筆者らによるCYP72A154の機能同定以前は、唯一、ニチニチソウのCYP72A1がテルペノイドインドールアルカロイドの合成酵素として機能することが報告されているのみであった。今後、マメ科を中心にさまざまな植物からCYP72AサブファミリーP450を単離し、潜在的なトリテルペノール酸化活性を調べることで、新たな酵素機能を発見できると期待する。

組換え酵母におけるグリチルレチン酸の生産

筆者らは次に、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) におけるグリチルレチン酸の生産を試みた。グリチルレチンの前駆物質であるβ-アミリンは、トリテルペノイドおよびステロール類の共通前駆体である2,3-オキシドスクアレンがβ-アミリン合成酵素により閉環して生成する。酵母は膜構成成分としてエルゴステロールを生合成するが、トリテルペノイドに至る生合成経路は持っていない。したがって、酵母内在の2,3-オキシドスクアレンのプールの一部を、導入したグリチルレチン経路に振り向けることが可能であると考えた。筆者らは、ミヤコグサ由来β-アミリン合成酵素遺伝子とともに、前述の2種のP450遺伝子を酵母に導入し同時発現させた。その結果、微量ながらも、グリチルレチン酸とその類縁化合物を*in vivo*で生産することに成功した(図2)¹³⁾。グリチルレチン酸はそれ自体が高い抗炎症作用を持つため、医薬品や化粧品に配合される有用化合物である。しかしながら、植物体中での含有量が著しく低いため、現在は、植物から抽出したグリチルレチンを加水分解することによ

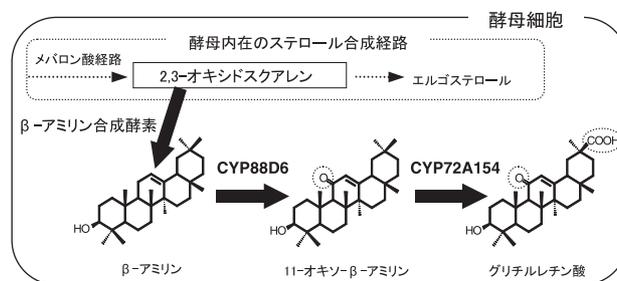


図2. 組換え酵母におけるグリチルレチン酸の生産。黒い実線矢印で示した経路を導入した。

り供給されている。現時点での組換え酵母での生産量は微量であるが、今後、メバロン酸経路の増強や2,3-オキシドスクアレン以降のステロールパスウェイの抑制などトリテルペノイド生産に最適化した酵母株の分子育種などによって生産性が向上すれば、新たな原料供給源になりうるものと期待している。

組換え酵母におけるオレアノール酸の生産

筆者らはさらに、組換え酵母におけるトリテルペノイド生成物の多様化に向けて、新たなP450の単離に着手した。新たな候補P450を見いだすための手法として、遺伝子共発現解析を用いた。本解析手法は、「関連する機能を有する遺伝子は発現パターンが類似していることが多い」ことに基づく遺伝子機能予測手法である。筆者らは、マメ科モデル植物であるタルウマゴヤシの遺伝子共発現データベース¹⁴⁾を用いて、β-アミリン合成酵素遺伝子と発現パターンが特に類似する(共発現係数0.8以上)候補P450を抽出した。あらかじめβ-アミリン合成酵素遺伝子を導入したβ-アミリン生産酵母に各候補P450を導入し、共発現させた。その結果、候補P450の一つであるCYP716A12がβ-アミリンの28位の3段階酸化を触媒しオレアノール酸を生成することを発見した¹⁵⁾。さらにCYP716A12は、別のトリテルペノールであるα-アミリンおよびルペオールを生産する酵母においても同様の活性を示し、それぞれ、ウルソール酸およびベツリン酸を生成することを見いだした¹⁵⁾。オレアノール酸、ウルソール酸はどちらも、抗腫瘍活性を含む多様な生理活性を有しており、医薬・化粧品への応用に関する報告も多い。また、ベツリン酸はその誘導体が抗HIV薬として開発が進められていることから、グリチルレチン酸の場合と同様に、今後の生産性向上が望まれる。

今後の課題と展望

以上、本稿では、組換え酵母を用いた植物トリテルペノイドの生産について紹介した。本手法を用いて、植物材料からの分離精製では十分量が得られず生理活性評価が困難であった化合物を生産・提供できる可能性がある。さらには、さまざまな植物から単離した生合成酵素 (OSC, P450) 遺伝子を、「種の壁を超えた」さまざまな組み合わせにおいて酵母内で共発現させる「非天然型トリテルペノイドのコンビナトリアルバイオケミストリー」への展開も期待される。近年、次世代シーケンサーの普及に伴い、これまで分子生物学の対象とはならなかった植物種からも膨大な遺伝子配列情報が生み出されつつある。たとえば2008年には、カナダの研究グループにより、中国の薬用植物を中心に1000種の植物を対象とするトランスクリプトーム解析プロジェクトがスタートしている。今後得られる大量の配列/トランスクリプトームデータが起爆剤となり本研究分野の進展がますます加速するものと期待している。

本研究の一部は、(独) 生物系特定産業技術支援センター「イノベーション創出基礎的研究推進事業」、(独) 新エネルギー・産業技術総合開発機構「植物の物質生産プロセス制御基盤研究」、文部科学省科学研究費補助金「生合成マシナリー、生物

活性物質構造多様性創出システムの解明と制御」および、加藤記念バイオサイエンス研究振興財団の研究助成により行われた。また、共同研究者である千葉大学・斉藤和季教授、東京工業大学・大山清助教、理化学研究所植物科学研究センター・澤井学研究員に感謝致します。

文 献

- 1) Dixon, R. A. and Strack, D.: *Phytochemistry*, **62**, 815 (2003).
- 2) Foster, S. and Johnson, R.: *Desk Reference to Nature's Medicine*. National Geographic Society, Washington D.C, US. (2006).
- 3) 大山清, 村中俊哉: 植物の生長調節, **44**, 56 (2009).
- 4) Saklani, A. and Kutty, S. K.: *Drug Discov. Today*, **13**, 161 (2008).
- 5) Hayashi, H. and Sudo, H.: *Plant Biotechnol.*, **26**, 101 (2009).
- 6) Kojoma, M. *et al.*: *Biol. Pharm. Bull.* (in press)
- 7) Hayashi, H. *et al.*: *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 912 (2001).
- 8) Sudo, H. *et al.*: *Plant Biotechnol.*, **26**, 105 (2009).
- 9) 水谷正治: 植物の生長調節, **40**, 67 (2005).
- 10) Nelson, D. and Werck-Reichhart, D.: *Plant J.*, **66**, 194 (2011).
- 11) Shibuya, M. *et al.*: *FEBS J.*, **273**, 948 (2006).
- 12) Seki, H. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 14204 (2008).
- 13) Seki, H. *et al.*: *Plant Cell* (in press)
- 14) http://mtgea.noble.org/v2/correlation_search_form.php
- 15) Fukushima, E. O. *et al.*: *Plant Cell Physiol.* (in press)