

# メタボロン…植物二次代謝工学におけるインパクト

中山 亨\*・兪 東燦・高橋 征司

植物は、フラボノイドやリグニン関連化合物などのフェニルプロパノイド、アルカロイド、イソプレノイド、青酸配糖体など、多様な二次代謝産物を生産する。これらの代謝産物は、植物と動物・昆虫あるいは植物と微生物の間の相互作用に影響を与え、植物の生存・生殖戦略において重要な役割を果たす。これらの化合物群はまた、これを摂取したヒトに対してもさまざまな生理作用（薬理作用や食品三次機能など）を発揮する。このように医・薬・農・工の諸分野で利用価値が高い植物二次代謝産物を、代謝工学や合成生物学的手法を用いて量産化しようという試みが近年活発化している。こうした試みにおいて、宿主細胞内に人為的に構築しようとする代謝経路の機能の効率向上は重要な課題である。その場合、代謝経路を構成する個々の酵素が細胞内で本来どのような状態で存在するのか、またそれが細胞内の効率的な代謝機能の発現にいかに関与するのかといった点を理解することは、代謝経路の設計の際に重要な要素となると考えられる。その場合の鍵のひとつとなるのがメタボロン (metabolon) である。

## メタボロン

メタボロンとは、代謝経路を構成する酵素タンパク質によって細胞内で特異的に形成される複合体のことである<sup>1)</sup>。タンパク質間の相互作用の強弱に応じて、複合体形成にも静的なものから動的なものまでさまざまなものがありうる。こうしたメタボロンの形成により、代謝中間体を媒質中に拡散させずに酵素から別の酵素へ直接渡すこと（チャネリング）が可能となり、細胞の代謝機能の円滑化・高効率化が図られると考えられている<sup>2)</sup>（後述）。一次代謝では、共有結合を含む強い相互作用を介して形成される静的なメタボロン形成とチャネリングの例として、ピルビン酸脱水素酵素複合体や動物の脂肪酸合成酵素が知られている。また弱いタンパク質間相互作用に基づく動的なメタボロンの存在とチャネリングは、動物の解糖系<sup>3)</sup>、TCA回路<sup>3)</sup>、およびプリン塩基の *de novo* 生合成系（プリノソーム）<sup>4)</sup>、植物の解糖系<sup>5)</sup>、Calvin-Benson回路<sup>6)</sup>、システイン生合成系<sup>7)</sup>などで提案されてきた。

## 植物二次代謝におけるメタボロン形成

植物二次代謝産物の生合成経路のなかで、タンパク質間相互作用の解析を通じてメタボロンの存在が直接的に示されているのは、フラボノイドと青酸配糖体の生合成経路である。いずれの経路においても、代謝中間体の酸素化反応を重要なステップとして含み、それらの多くはシトクロム P450 (P450) によって触媒される。P450 はヘムを補欠分子族としてもち、その還元型が一酸化炭素と結合すると 450 nm に吸収極大を示す水酸化酵素の総称である<sup>8)</sup>。一般に植物の P450 は、細胞内ではその N 末端の膜貫通ドメインを介して小胞体膜に結合し、触媒ドメインを細胞質側に突き出した形で存在している<sup>8)</sup>。フラボノイドや青酸配糖体の生合成では、そのような P450 の細胞質側ドメインを核にして、これにアクセサリタンパクや生合成酵素が動的に解離・会合するメタボロンが形成される<sup>9)</sup>。したがってこれらの化合物群の生合成では、P450 はその触媒的役割のみならず、小胞体膜上でのメタボロン形成のためのプラットフォームの提供という構造的役割を担うことになる。他の植物二次代謝産物の生合成においても、P450 が関わる場合には同様であると推定される。

## フラボノイド生合成におけるメタボロン形成

フラボノイドは C6-C3-C6 の一般構造をもち、高等植物に普遍的に存在する化合物であり、その基本骨格（C3 部分の構造の違い）に基づいて 10 種類の主なカテゴリーに分類される。図 1 にはそれらのうち、カテキン以外の 9 種類の構造が示されている。フラボノイド骨格は複数のヒドロキシ基で置換され、また多くの場合、そのヒドロキシ基がグリコシル基やメチル基などで修飾を受け、さらにグリコシル基がアシル化されることなどにより構造的多様性を増し、液胞に蓄積している。フラボノイドは花色の発現や調節に重要な役割を果たし、冒頭で述べた意義に加えて花卉園芸学的にも重要な意義をもつ<sup>10)</sup>。フラボノイドの生合成経路は種子植物でほぼ共通しており、アミノ酸フェニルアラニンから図 1 に示したステップにより導かれる。図に示された酵素の中では C4H、FNS (II 型)、F3'H、F3'5'H、および IFS が小胞体膜結

\*著者紹介 東北大学大学院工学研究科バイオ工学専攻専攻（教授） E-mail: nakayama@seika.che.tohoku.ac.jp

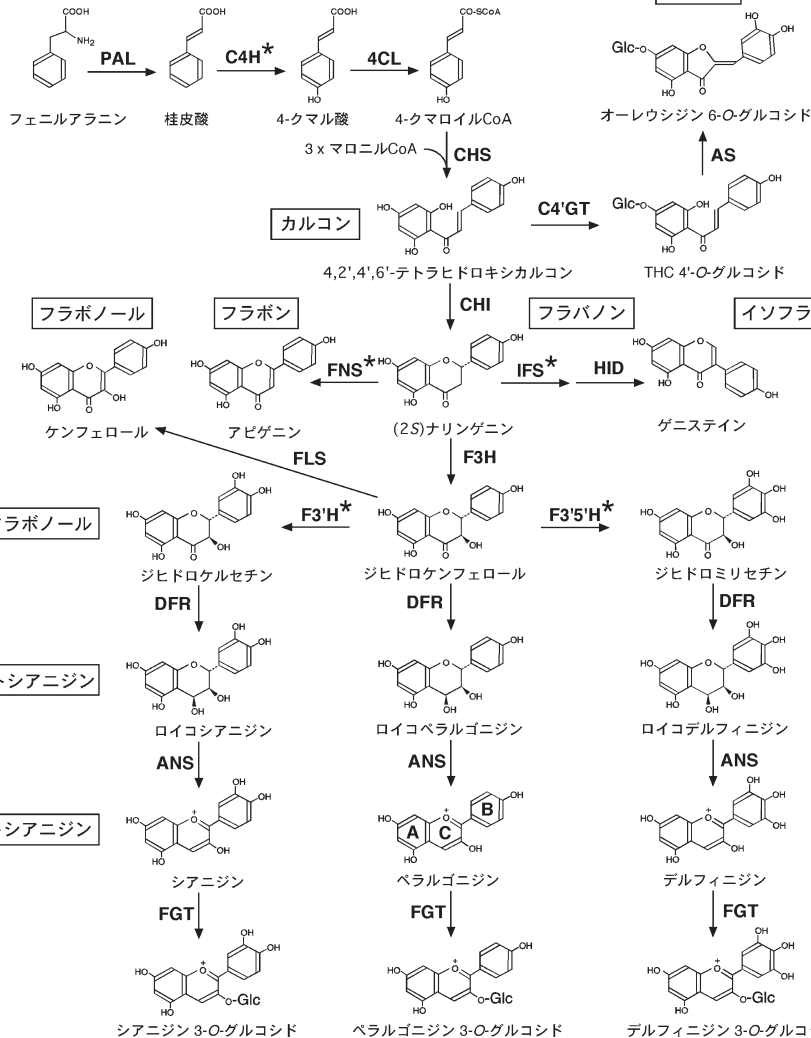


図1. フラボノイドの生合成経路。各構造式の下には各フラボノイドの化学名を示す。フラボノイドの分類名を白の四角で囲む。酵素略号のフルネームは次の通りである。PAL, フェニルアラニンアンモニリアーゼ; C4H, 桂皮酸4-ヒドロキシラーゼ; 4CL, 4-クマル酸:CoAリガーゼ; CHS, カルコン合成酵素; AS, オーロン合成酵素; IFS, 2-ヒドロキシイソフラバノン合成酵素; HID, 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ; CHI, カルコンイソメラーゼ; FNS, フラボン合成酵素; F3H, フラバノン3-ヒドロキシラーゼ; FLS, フラボノール合成酵素; F3'H, フラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ; F3'5'H, フラボノイド3',5'-ヒドロキシラーゼ; DFR, ジヒドロフラボノール4-レダクターゼ; ANS, アントシアニン合成酵素; FGT, フラボノイドグルコシルトランスフェラーゼ; C4'GT, カルコン4'-グルコシルトランスフェナーゼ。シトクロムP450の酵素の略号の右肩にアステリスクを付した。

合型のP450であり、その他の酵素は可溶性である(酵素のフルネームについては、図1の説明を参照されたい)。

フラボノイド生合成酵素が複合体を形成するという仮説は当初、この経路の高効率な代謝を説明するために提案された<sup>11)</sup>。時をほぼ同じくして、キク科植物の培養細胞やそのミクロソーム画分を用いた実験によってF3'H, F3H, C4Hの膜局在性が示され<sup>12)</sup>、またソバの胚軸、アマリリスの花弁、赤キャベツの実生を用いた各種の生化学実験によって、可溶性のフラボノイド生合成酵素(PAL, FGT)が膜画分にも見いだされることが示された<sup>13)</sup>。

さらにCHSの小胞体局在性がソバの細胞を用いて免疫学的手法により示された<sup>14)</sup>。以上のような経緯を経てフラボノイド生合成では小胞体膜に結合したP450 (C4H, F3'Hなど)を核としてこれに可溶性酵素が可逆的に解離会合し、小胞体膜の細胞質側表面にメタボロンを形成するというモデルが提唱されるに至った<sup>15)</sup>。このモデルでは、メタボロンは代謝経路で隣り合う酵素どうしが膜上に直列に配置された構図でしばしば描かれる(図2A)。しかしながら、メタボロン形成の基盤となるタンパク質間相互作用は弱いと推定され、酵素複合体が

実際に単離された例はない。

生合成酵素間の相互作用は、米国の Winkel-Shirley らによってシロイヌナズナのフラボノイド生合成系について解析された。まず CHS, CHI, F3H, DFR 間の相互作用が酵母ツーハイブリッドシステムにより解析され、CHS, CHI, DFR の間に相互作用が見いだされるとともに、相互作用におけるタンパク質間の配向性の重要性も示唆された<sup>16)</sup>。さらにアフィニティークロマトグラフィーや免疫沈降実験によって、実生に含まれる CHS, CHI, F3H の間に相互作用が存在することが示された<sup>16)</sup>。CHS 反応の生成物（テトラヒドロキシカルコン）は細胞内の条件下では不安定であり、非酵素的に異性化されてナリンゲニン（フラバノンの一種）のラセミ体を与えるが、細胞内ではその (2*S*) 体のみが生成する。このナリンゲニン生成の立体特異性は CHS と CHI の間のチャネリングによって説明される。蛍光抗体法や免疫電顕観察による根の細胞の観察によって、CHS と CHI は細胞の小胞体のみならず、液胞膜、未同定の高電子密度領域に共存し<sup>17)</sup>、さらには核内にも共存していることが示された<sup>18)</sup>。さらに最近、アントシアニンとフラボノールへの代謝の分岐部分に位置する酵素（FLS, DFR）の CHS との相互作用が蛍光共鳴エネルギー移動解析によって検索された<sup>19)</sup>。その結果、CHS と FLS の間の相互作用および CHS と DFR の間の相互作用が認められるとともに、FLS と DFR は CHS への結合に際して互いに斥け合うことも明らかにされた。このことはフラボノイド生合成メタボロンでは、代謝経路上必ずしも隣り合わない酵素どうしも相互作用でき、シロイヌナズナの例では CHS をハブにしたより立体的な構成となっているこ

とが示唆される（図2B）。また FLS と DFR 相互の CHS への排他的な結合からは、酵素の解離会合による動的な代謝制御の存在が伺われ、そのような制御において CHS が果たす中心的な役割も示唆された。

一方、2004年には、タバコの培養細胞を用いて生合成経路の初期過程におけるメタボロン形成も検討されている<sup>20)</sup>。エピトープ標識された PAL アイソザイムを発現する培養細胞の免疫学的観察から、二つの PAL アイソザイムのうち一方（PAL1）が小胞体と細胞質の両方に、もう一方（PAL2）は細胞質に存在することが示された。GFP とこれらの PAL アイソザイムの融合体を用いた蛍光イメージング解析や蛍光共鳴エネルギー移動解析により、PAL1 は小胞体膜上の C4H に強く、PAL2 は弱く結合することが示された。一方、ポプラの PAL と C4H を共発現させた酵母細胞を用いて調べた実験では、両酵素間での代謝中間体（桂皮酸）のチャネリングを支持する結果は得られなかった<sup>21)</sup>。メタボロンの形成に植物起源の他のタンパク質の存在が必要な可能性もある。

#### 青酸配糖体生合成におけるメタボロン形成

青酸配糖体は植物によって生産される  $\alpha$ -ヒドロキシニトリル配糖体である<sup>22)</sup>。バラ科植物（ウメ、アーモンド）の果実・種子に含まれるアミグダリンやイネ科のソルガム (*Sorghum bicolor*) に含まれるデュリン (dhurrin) などはその代表例である。青酸配糖体は液胞に蓄積されそれ自体では毒性をもたないが、動物による摂食に伴って植物細胞が破壊されると細胞壁に存在する  $\beta$ -グルコシダーゼの作用により分解され、有毒なシアン化水素を生成する（図3）。このため青酸配糖体の蓄積は、草食動物による摂食に対する植物の防御戦略のひとつとして理解されている<sup>22)</sup>。青酸配糖体の前駆体はアミノ酸であり、それらのなかでチロシンを前駆体とするデュリンの生合成が詳細に検討されている（図3）。デュリンの生合成には、2つの P450（CYP79A1 および CYP71E1）と細胞質局在性 UDP-グルコース依存性グルコシルトランスフェラーゼ（UGT85B1）が関与する。これらの P450 は多機能性であり、CYP79A1 はチロシンの2段階の *N*-ヒドロキシ化、脱炭酸、異性化により *Z*-アルドキシムを生成し、また CYP71E1 は *Z*-アルドキシムの脱水とヒドロキシ化を触媒して  $\alpha$ -ヒドロキシニトリルを与える。UGT85B1 による  $\alpha$ -ヒドロキシニトリルのグルコシル化によりデュリンが生成する（図3）。この一連の過程で生成する代謝中間体（*N*-ヒドロキシおよび *N,N*-ジヒドロキシアミノ酸、*E* および *Z*-アルドキシム、 $\alpha$ -ヒドロキシニトリル）は細胞内条件下で不安定であるが、いずれ

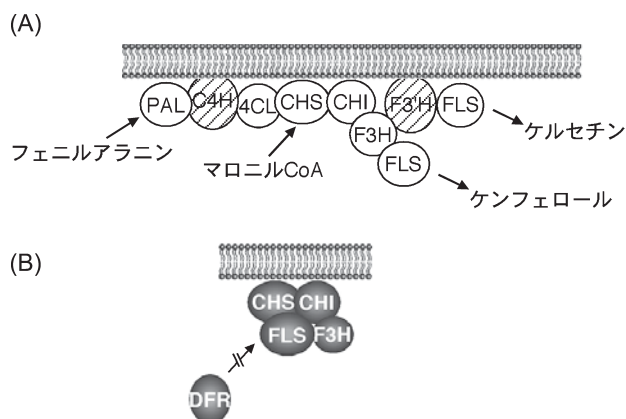


図2. 提案されているフラボノイド生合成経路のメタボロンのイメージ。(A) 酵素が直列的に配置されたメタボロン。シトクロムP450を斜線つきの楕円で示す。(B) DFRとFLSの排他的結合。



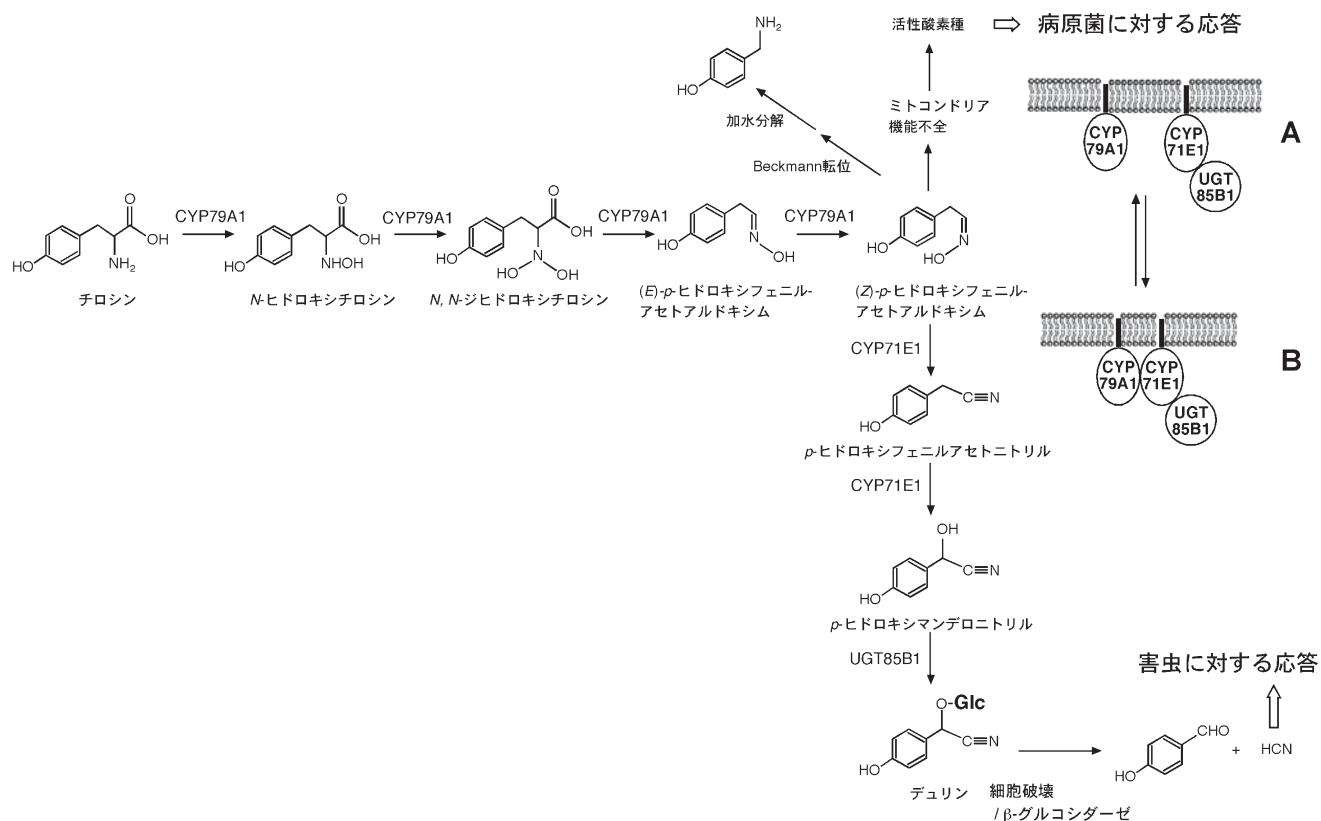


図3. デュリンの生合成経路とメタボロン

も媒質中に拡散することなく最終産物に導かれることが示されている<sup>23)</sup>。またCYP79A1, CYP71E1, UGT85B1を異種発現させたシロイヌナズナの葉には4% (w/w乾燥重量) ものデュリンが蓄積されるが、やはり代謝中間体やその分解産物は検出されない<sup>24,25)</sup>。こうした事実から、CYP79A1, CYP71E1, UGT85B1は細胞内で互いに会合してメタボロンを形成し(図3B)、中間体のチャネリングが起こっていることが強く示唆されていた。2008年に、これらの酵素間の相互作用の有無が、蛍光タンパク質と酵素の融合体を発現させた細胞の蛍光イメージングによって解析され、小胞体上の細胞質側表面に存在するCYP79A1/CYP71E1複合体にUGT85B1が結合することによってメタボロンが形成されることが裏付けられた<sup>26)</sup>。なお最近、植物の糸状菌感染防御機構の発現に際して、アミノ酸からCYP79反応により導かれるアルドキシムのベックマン転位生成物(アミン)が生じていることが示され、糸状菌感染防御におけるCYP79反応生成物の重要性が示唆されている<sup>27)</sup>。一般にアルドキシムには抗真菌活性があり、アルドキシム構造を有する合成抗真菌剤も存在する。通常の条件下ではCYP79反応により生成するアルドキシムはメタボロン

形成によりチャネリングされ速やかに代謝されるので、細胞質に漏出することはない。しかしながら糸状菌感染時には、このメタボロンが解離してアルドキシムを細胞中に漏出させ(図3A)、感染微生物に対する抵抗性発現の一助としている可能性が指摘された<sup>28)</sup>。この指摘はまだ仮説の域を出ていないが、植物の生理応答の仕組みをメタボロンの動的な形成・解離と関連づけて説明しようとする点でユニークであり、今後の解明が待たれる。

### 代謝の微視的区画化

これまでさまざまな代謝系で提案されてきた動的なメタボロンとチャネリングについては、*in vitro*実験では否定的な結果も数多く報告され<sup>29)</sup>、その存在について批判的な議論も絶えなかった<sup>30-32)</sup>。しかしながらこの十数年間で、細胞の内部環境や生体成分の細胞内拡散過程を非侵襲的に観察した結果が蓄積し、細胞質やミトコンドリアマトリクスにおける酵素や代謝産物の分布や拡散過程が、可溶性成分といえども必ずしも均一ではないことが明らかとなってきた<sup>31,33)</sup>。細胞質やミトコンドリアマトリクスでは代謝が分子レベルで区画化されている(代

謝の微視的区画化)と認識されるようになり<sup>31,33)</sup>, 動的メタボロンの形成とチャネリングの存在についても「代謝の微視的区画化」との関連で理解され, 広く受け入れられるようになってきた<sup>34)</sup>. 微視的に区画化された代謝系において, メタボロン形成により代謝中間体のチャネリングがおこり次のような有益な効果が生じることが指摘されている<sup>3)</sup>. (1) 代謝中間体の媒質中への拡散・ロスの防止 (代謝中間体のプールの最小化), (2) 酵素の活性部位から別の酵素の活性部位への代謝中間体の到達時間の短縮, (3) 不安定な代謝中間体の安定な中間体への迅速な変換, (4) 細胞毒性のある代謝中間体の細胞内への拡散防止または迅速な無毒化, (5) 競合反応からの隔離と制御, (6) 酵素の解離会合による代謝の動的制御.

これらの効用の重要性は, すでに述べた青酸配糖体やフラボノイドの生合成の代謝的特徴に照らせば容易に理解することができる. 脂溶性が高い代謝中間体の細胞内保持はリン酸化により達成されることが多いが, そのような仕組みをもたない植物の脂溶性代謝産物の生合成系では, 上述のチャネリングの効用 (1) はとりわけ重要な意義があるものと推察される.

### 生物工学への応用

以上のことから明らかなように, 代謝の効率を向上させるためには, チャネリングが可能となるように生合成酵素を細胞内に適切な形に組織化することが有効である. 特に, 酵素間相互作用の有無があらかじめ明らかでない異なる植物起源の酵素を組み合わせる代謝経路をデザインする場合には重要である. このことを実現させるための手段のひとつは, 異なる生合成酵素について適切にデザインされた融合体を異種発現させることである<sup>35)</sup>. さらに興味深い方法として最近, メタボロン形成の足場となるタンパク質がデザインされている<sup>36)</sup>. この合成足場タンパク質は, 特定のアミノ酸配列に特異的に結合する能力を有するタンパク質ドメインを, リンカーを介して連結したものである. そのタンパク質ドメインとして, SH3ドメイン (Src Homology 3 domain, およそ60アミノ酸からなるタンパク質ドメインで, Pro-X-X-Proをコアとする短いアミノ酸配列に結合する), GBD (GTPase-binding) ドメイン, PDZドメイン (80-90アミノ酸からなるタンパク質ドメインで, 標的タンパク質のC末端に存在する短い配列モチーフに結合する) が用いられている. 合成足場タンパク質にはこれらのタンパク質ドメインの繰り返し構造が導入されている (図4A). 一方, 生合成酵素にはこれらのドメインへの特異結合配

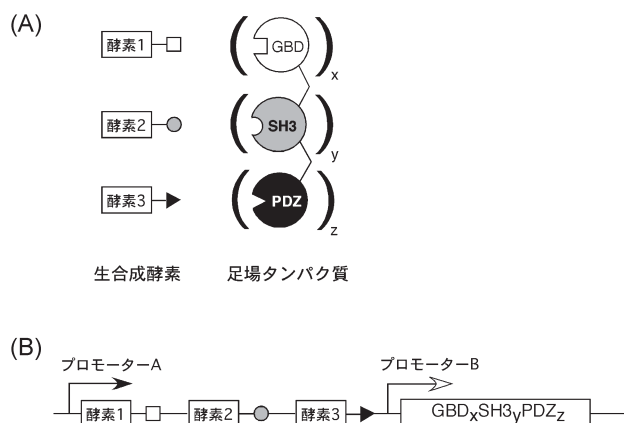


図4. 特異配列結合ドメイン (GBD, SH3, PDZ) の融合体を足場にした, 3つの連続する生合成酵素からなるメタボロンの設計.  $x, y, z$  は1~4の整数.

列を付加させる. 足場タンパク質と生合成酵素群の遺伝子をそれぞれ異なる誘導型プロモーターの支配下に置き細胞内で共発現させると, 酵素が足場タンパク質の対応するドメインに配列特異的に結合し代謝経路の順番に従って配置された人工的メタボロンが細胞内に形成される (図4A, B). 結合ドメインの繰り返し回数の組み合わせによって個々の代謝反応の流量をコントロールできるのみならず, 足場タンパク質と生合成酵素の発現量比, 結合ドメインの配列順序などによって, 代謝フラックスや生成物の蓄積量を調節できる. メバロン酸経路の生合成酵素を用いた検討では, 足場タンパク質を用いない系と比較して最大で77倍のメバロン酸生成が得られている. この系はもともと大腸菌を宿主とする代謝工学のためにデザインされたものであり, これを植物細胞に適用して植物細胞内に人工的なメタボロンを形成させた例はまだない. しかしながら最近, この技術を利用してシロイヌナズナの4CL (図1) とブドウのステルベン合成酵素STSからなるメタボロンを酵母細胞内に形成させ, 赤ワインの健康成分であるレスベラトロールの生産を検討した例が報告され, メタボロンを形成させない場合の5倍, 融合酵素発現系の場合の2.7倍の生産性が得られている<sup>37)</sup>. さらに最近では, 4CLやSTSをDNA結合タンパク質と融合させ, プラスミドDNA上にこれらの酵素からなるメタボロンを形成させ, 大腸菌中で高効率なレスベラトロール生産を行わせた例も報告された<sup>38)</sup>.

### おわりに

メタボロンの解明は, 動的で複雑な生命現象の一つのシステムとして理解するシステムズバイオロジーの一環

として捉えることができる。構造的に多種多様な化合物を生み出す植物二次代謝の巧みな戦略は、それに関わる生合成酵素によって形成される動的メタボロンの動態やその調節機構を明らかにすることによって、さらに高度に理解されるであろう。そしてそのような理解に基づいた工夫を盛り込むことにより、植物二次代謝工学にさらなる成功がもたらされることが期待される。

## 文 献

- 1) Ovadi, J. and Srere, P. A.: *Cell Biochem. Funct.*, **14**, 249 (1996).
- 2) Ovadi, J.: *J. Theor. Biol.*, **152**, 1 (1991).
- 3) Ovadi, J. and Srere, P. A.: *Int. Rev. Cytol.*, **192**, 255 (2000).
- 4) An, S. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 12872 (2010).
- 5) Giege, P. *et al.*: *Plant Cell*, **15**, 2140 (2003).
- 6) Suss, K. H. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5514 (1993).
- 7) Saito, K. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **270**, 16321 (1995).
- 8) Chapple, C.: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **49**, 311 (1998).
- 9) Ralston, L. and Yu, O.: *Phytochem. Rev.*, **5**, 459 (2006).
- 10) Tanaka, Y. and Ohmiya, A.: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **19**, 190 (2008).
- 11) Stafford, H. A.: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **25**, 59 (1974).
- 12) Fritsch, H. and Grisebach, H.: *Phytochemistry*, **14**, 2437 (1975).
- 13) Hrazdina, G. and Wagner, G. J.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **237**, 88 (1985).
- 14) Hrazdina, G. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 8966 (1987).
- 15) Winkel-Shirley, B.: *Physiol. Plant.*, **107**, 142 (1999).
- 16) Burbulis, I. E. and Winkel-Shirley, B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 12929 (1999).
- 17) Saslowsky, D. and Winkel-Shirley, B.: *Plant J.*, **27**, 37 (2001).
- 18) Saslowsky, D. E. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **280**, 23735 (2005).
- 19) Crosby, K. C. *et al.*: *FEBS Lett.*, **585**, 2193 (2011).
- 20) Achnine, L. *et al.*: *Plant Cell*, **16**, 3098 (2004).
- 21) Ro, D. K. and Douglas, C. J.: *J. Biol. Chem.*, **279**, 2600 (2004).
- 22) Møller, B. L.: *Curr. Opin. Plant Biol.*, **13**, 338 (2010).
- 23) Møller, B. L. and Conn, E. E.: *J. Biol. Chem.*, **255**, 3049 (1980).
- 24) Tattersall, D. B. *et al.*: *Science*, **293**, 1826 (2001).
- 25) Kristensen, C. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 1779 (2005).
- 26) Nielsen, K. A. *et al.*: *Phytochemistry*, **69**, 88 (2008).
- 27) Bednarek, P. *et al.*: *Science*, **323**, 101 (2009).
- 28) Møller, B. L.: *Science*, **330**, 1328 (2010).
- 29) Wu, X. M. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 497 (1991).
- 30) Ovadi, J.: *J. Theor. Biol.*, **152**, 135 (1991).
- 31) Saks, V. *et al.*: *Int. J. Mol. Sci.*, **9**, 751 (2008).
- 32) Barros, L. F. and Martinez, C.: *Biophys. J.*, **92**, 3878 (2007).
- 33) Ovadi, J. and Saks, V.: *Mol. Cell. Biochem.*, **256/257**, 5 (2004).
- 34) Conrado, R. J. *et al.*: *Curr. Opin. Biotechnol.*, **19**, 492 (2008).
- 35) Wang, Y. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 20684 (2011).
- 36) Dueber, J. E. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **27**, 753 (2009).
- 37) Wang, Y. and Yu, O.: *J. Biotechnol.*, **157**, 258 (2011).
- 38) Conrado, R. J. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **40**, 1879 (2012).