

植物トリテルペノイド生合成制御機構の解明

Regulatory mechanisms of triterpenoid biosynthesis in plants

(日本生物工学会推薦)

代表研究者 大阪大学 關 光

Osaka University

Hikaru Seki

Biosynthesis of plant specialized metabolites is strictly regulated as it is often limited in the specific organs or tissues, or induced in response to external or internal stimuli. However regulatory mechanism of triterpenoid biosynthesis is largely unknown. Glycyrrhizin is a triterpenoid saponin produced only in roots and stolons of *Glycyrrhiza* species (licorice) in the legume family. It is widely used as medicines and natural sweetener. Glycyrrhizin is biosynthesized through, cyclization of 2,3-oxidosqualene by β -amyrin synthase (bAS) and oxidations at C-11 and C-30 positions of β -amyrin by two cytochrome P450 monooxygenases, CYP88D6 and CYP72A154, and subsequent glycosylations. Besides glycyrrhizin, licorice also produces soyasaponins. Soyasaponins are also derived from β -amyrin, and CYP93E3 catalyzes hydroxylation at C-24 position of β -amyrin, leading to soyasaponin biosynthesis. The objective of this research is to identify TF(s) regulating the expression of glycyrrhizin and soyasaponin biosynthesis in licorice. In this study, we obtained eight candidate TFs from licorice transcriptome database and analyzed their activity to activate transcription from the promoter of triterpenoid biosynthetic genes (*bAS*, *CYP88D6* and *CYP93E3*) by transient transactivation assays using tobacco BY-2 protoplasts. As a result, two candidate TFs were able to activate transcription from *bAS* and *CYP93E3* gene promoters.

研究目的

植物は動物とは異なり、自ら移動することが出来ない。そのため植物は周囲の環境変化に適応するために、多様な二次代謝産物（近年は特化代謝産物とも呼ばれる）を生産する。二次代謝産物とは、アミノ酸、糖、核酸などの生物に共通に存在し生存に必須と考えられるいわゆる一次代謝産物とは異なり、植物の一部の属や種が特異的に生産する低分子化合物である。植物が生産する二次代謝産物は植物界全体で100万種以上と推定されており (Afendi *et al.*, 2012)、一般に、生物的、非生物的ストレスに対する防御に重要な役割を持つと考えられている。例えば、害虫による食害に対しては直接的に害虫の生育を阻害するアルカロイドや、害虫の天敵をおびき寄せるテルペノイドなどを生産することが知られている。

同時に、植物二次代謝産物は、医薬品、香料、食品添加物原料などとしてヒトにとって重要な化合物群である。例えば、20世紀最高の抗がん剤といわれ、乳がん治療等に広く使われるタキソール（パクリタ

キセル）はもともとタイヘイヨウイチイという針葉樹の樹皮から発見された化合物である。また、近年、抗マラリア薬原料として世界的に重要なアルテミシニン、中国で古くから生薬として用いられてきたクソニンジンというヨモギ属植物の一種が特異的に生産する化合物である。

テルペノイドは二次代謝産物の中で最も構造的に多様性に富む化合物群である。テルペノイドは炭素数5のイソプレユニットを構成単位とする化合物群であり、イソプレユニットの数によってモノテルペン (C_{10}) からポリテルペン ($>C_{40}$) に分類されるが、そのうち6個のイソプレユニットからなる炭素数30の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トリテルペノイドと称される。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薬用ニンジン（人参）のジンセノサイドに代表される漢方原料（生薬）の主活性成分の他、オレアノール酸やベツリン酸など、機能性食品素材、化粧品素材、あるいは新規医薬品のリード化合物となりえる

多様な生理活性物質が含まれる。これらの化合物が有する生理活性については多数の薬理学的研究がなされてきた一方で、植物においてこれらの化合物がどのように合成されるのか？、生合成およびその制御機構についての研究は極めて少ない。

本研究では、マメ科の薬用植物「甘草(カンゾウ)」のみが生合成するトリテルペノイド配糖体であり肝炎治療剤、抗炎症剤等として多用されている「グリチルリチン」(Hayashi and Sudo *et al.*, 2009) および、マメ科植物全般が共通して生産するトリテルペノイド配糖体であるソヤサポニンに注目して、それらの生合成がどのようにコントロールされているのかを明らかにすべく、カンゾウにおける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転写制御因子の同定を目的として研究を進めた。

研究経過

植物二次代謝産物の生合成は時間的、空間的に高度に制御されており、一般に高い組織特異性や外部刺激応答性を示す。カンゾウのグリチルリチンの場合、地下部の根および地下茎に特異的に蓄積し地上部組織からは検出されない。こうした生合成制御においては転写制御因子による生合成酵素遺伝子の転写制御が特に重要であると考えられる。

研究代表者らは、グリチルリチン生合成に関わる酵素として、トリテルペノイドの共通前駆物質である炭素数 30 の鎖状化合物である 2,3-オキシドスクアレンを閉環して β -アミリンを生成する β -アミリン合成酵素(bAS)、および、 β -アミリンの 11 位炭素および 30 位炭素の酸化反応をそれぞれ触媒しグリチルリチン生合成に向かわせるシトクロム P450 酸化酵素 (P450) として CYP88D6 (Seki *et al.*, 2008) および CYP72A154 (Seki, Sawai, and Ohyama *et al.*, 2011) を先に同定している。また、同じく β -アミリンの別の位置 (24 位炭素) の水酸化を触媒しソヤサポニン生合成に向かわせる別の P450 として CYP93E3 を先に同定している (Seki *et al.*, 2008)。

カンゾウにはグリチルリチンの含量が異なる様々な系統が存在する。グリチルリチン「高」含量系統とグリチルリチン「低」含量系統における上記遺伝子の発現プロファイルを比較した結果、上記の酵素遺伝子の発現はいずれも、グリチルリチン「低」含量系統においてよりもグリチルリチン「高」含量系

統において顕著に高いことを見出した。このことは、両系統間におけるグリチルリチン含量が生合成酵素遺伝子の転写レベルで決定づけられていることを示唆する。そこで、 β -アミリン合成酵素、CYP88D6 および CYP93E3 遺伝子について、グリチルリチン高含量系統と低含量系統の両系統から転写制御に重要と推定される翻訳開始点上流約 2 kb のプロモーター領域 DNA 断片を単離し塩基配列を比較した。その結果、両系統間でプロモーター領域中に DNA 多型が見られたことから、これら DNA 多型によってプロモーター活性が変化している可能性が考えられた。そこで、これらのプロモーターの活性を評価することを目的として、各プロモーター断片を GUS レポーター遺伝子に連結したキメラ遺伝子を作成した。カンゾウの形質転換体作出系は未だ確立されていないため、形質転換個体の作出が容易なモデル植物であるシロイヌナズナに導入した。得られた形質転換シロイヌナズナを GUS 染色した結果、*bAS* のプロモーターでは根全体で発現が見られたのに対し、*CYP88D6* のプロモーターでは根のごく一部でのみ特異的に発現が見られた。また、系統間でプロモーター配列に多型が見られたが、少なくともシロイヌナズナにおける GUS 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、「高含量系統では両遺伝子の発現レベルが低含量系統よりも高い」といった発現レベルの違いが、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因子の発現レベルの違いに起因する可能性が高いと推察された。

そこで、これら生合成遺伝子の転写制御にかかわる転写制御因子の探索を進めた。カンゾウの培養細胞における β -アミリン合成酵素遺伝子の発現は、培養細胞にメチルジャスモン酸を処理した場合に上昇し、酵母抽出物エリシターを処理すると逆に低下することが報告されている (Hayashi *et al.*, 2003)。同様の現象は、マメ科モデル植物のタルウマゴヤシにおけるトリテルペノイド生合成関連酵素遺伝子 (β -アミリン合成酵素遺伝子および P450 遺伝子) についても報告されている (Suzuki *et al.*, 2002)。すなわち、マメ科カンゾウとタルウマゴヤシにおけるトリテルペノイド生合成は類似した制御機構によってコントロールされていると推察される。マメ科モデル植物のタルウマゴヤシについては、メチルジャスモン酸あるいは酵母抽出物エリシターで処理した培養細胞由来のトランスクリプトームデータセッ

ト (The Samuel Roberts Noble Foundation, <http://mtgea.noble.org/v3/index.php>) が Web 上で一般に公開されている。そこで、タルウマゴヤシにおいて、トリテルペノイド生合成関連酵素遺伝子と発現パターンが類似する転写因子を絞り込んだところ、1479 種の転写因子から 8 種の候補転写因子を選抜することができた。次に、得られた 8 種のタルウマゴヤシ転写因子と構造的に類似する (アミノ酸配列の相同性が高い) 転写因子をカンゾウから単離すべく、研究代表者らが作成したカンゾウのトランスクリプトームデータベースを用いてホモロジー検索を行った。これにより、各タルウマゴヤシ由来転写因子に対して 83% 以上のアミノ酸配列同一性を示すカンゾウ転写因子を計 8 種見出した。これらの 8 種のカンゾウ転写因子について、RT-PCR 法により全長 cDNA 断片のクローニングを行った後、恒常的な高レベルの転写をもたらすカリフラワーモザイクウイルス由来 35S プロモーターの下流に連結したプラスミド (エフェクターコンストラクト) を作成した。

続いて、これらの候補転写因子の転写活性化能を評価するためにタバコ BY-2 培養細胞由来プロトプラストを用いたトランジェントアッセイを行った。単離したプロトプラストに、bAS、CYP88D6 および CYP93E3 遺伝子プロモーターをそれぞれ GUS レポーター遺伝子の上流に連結したレポーターコンストラクトと各転写因子のエフェクターコンストラクトを同時導入した後 GUS の活性を測定した。その結果、2 種の候補転写因子が転写活性化能を示した。そのうち一種は、bAS、CYP88D6 および CYP93E3 遺伝子プロモーター全てに対して転写活性化能を示し、特に CYP93E3 遺伝子プロモーターからの GUS 活性を約 17 倍上昇させた。またもう一方は CYP93E3 遺伝子プロモーターからの GUS 活性を約 7 倍上昇させた。以上の結果から、これら 2 種の転写因子がカンゾウにおけるソヤサポニン生合成酵素遺伝子の発現制御に関与する可能性が示唆された。

考察

植物細胞における *bAS*, *CYP88D6* および *CYP93E3* に対する 8 種の候補転写因子の転写活性化能を調べた結果、2 種の候補転写因子が *CYP93E3* プロモーターの活性を上昇させた。またこれら 2 種の候補転写因子の発現パターンを調べたところ、*CYP93E3* と発現パターンが類似していたことから、これら 2 種の

転写因子はソヤサポニン生合成酵素遺伝子の発現制御に関与する可能性が示唆される。

今後、ソヤサポニン生合成酵素遺伝子の発現制御に関与する可能性が示唆された 2 種の転写因子について、まずはこれらの転写因子が直接的に *CYP93E3* プロモーターに結合し転写を制御しているかを検証する必要がある。そのためにデリーションプロモーターを用いたトランスアクチベーション実験を行い、プロモーター中のどの領域に結合するかを絞り込む予定である。

またタバコ BY-2 培養細胞を用いたトランジェントアッセイ系よりも、より実際のカンゾウ植物体に近い条件での転写活性化能を評価するための新たな実験系の確立が必要である。上記 2 種の転写因子の機能を解明するための最も確実な方法は、これら転写因子遺伝の発現を抑制した形質転換カンゾウ個体を作成し、ソヤサポニン生合成遺伝子の発現量およびソヤサポニンの蓄積量を解析することである。しかしながら、現在までに、形質転換カンゾウ個体作成の成功例は報告されていない。ウイルスベクターを利用した一過的なジーンサイレンシング手法や形質転換毛状根組織の作出などの手法を駆使して、今回見出した 2 種の転写因子のカンゾウにおける機能を明らかにして行く必要があると考えられる。

参考文献

1. Afendi, F. M. *et al.*: KNApSAcK family databases: integrated metabolite-plant species databases for multifaceted plant research. *Plant Cell Physiol.*, 53, 1-12 (2012)
2. Hayashi, H. and Sudo, H.: Economic importance of licorice, *Plant Biotechnol.*, 26, 101-104 (2009)
3. Seki, H. *et al.*: Licorice β -amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 14204-14209 (2008)
4. Seki, H. Sawai, S. and Ohshima, K. *et al.*: Triterpene functional genomics in licorice for identification of CYP72A154 involved in the biosynthesis of glycyrrhizin, *Plant Cell*, 23, 4112-4123 (2011)
5. Hayashi, H. *et al.*: Up-regulation of soyasaponin biosynthesis by methyl jasmonate in cultured cells of *Glycyrrhiza glabra*. *Plant Cell Physiol.*, 44, 404-411 (2003)

6. Suzuki, H. *et al.*: A genomics approach to the early stages of triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Plant Journal* 32, 1033-1048 (2002)

研究の発表

口頭発表

1. 田村啓太、關 光、平岡靖子、持田恵一、斉藤和季、村中俊哉：植物トリテルペノイドサポニン生合成制御機構の解明、第 55 回日本植物生理学会年会（2014 年 3 月、富山）

ポスター発表

1. 田村啓太、關 光、平岡靖子、斉藤和季、村中俊哉：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、北海道当別）
2. K. Tamura, H. Seki, Y. Hiraoka, K. Saito, T. Muranaka: Promoter analysis of glycyrrhizin

biosynthetic genes using transgenic *Arabidopsis thaliana*. 25th International Conference on Arabidopsis Research (Vancouver, Canada, July 2014)

3. 田村啓太、關 光、平岡靖子、斉藤和季、村中俊哉：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、盛岡）
4. K. Tamura, H. Seki, Y. Hiraoka, K. Saito, T. Muranaka: Promoter activities of glycyrrhizin biosynthetic genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. Metabolomics Workshop (Ardmore, USA, March 2015)

誌上発表

1. H. Seki, K. Tamura, T. Muranaka: P450s and UGTs: key players in the structural diversity of triterpenoid saponins, *Plant Cell Physiol.*, in press.