

LC-MS analysis of ground parts
of *Glycyrrhiza uralensis*

HPLC condition
Senshu Pak PEGASIL ODS-II 2*250mm,
0.2ml/min,
0.5%AcOH-CH₃CN:0.5%AcOH-H₂O
20:80 0-15min
20:80-50:50 15-30min
50:50-100:0 30-35min
100:0 35-45min
100:0-20:80 45-47min
20:80 47-55min

**Glycyrrhizin and 20-epiglycyrrhizin
were not identified from ground parts
(leaf, stem, flower) of *Glycyrrhiza***

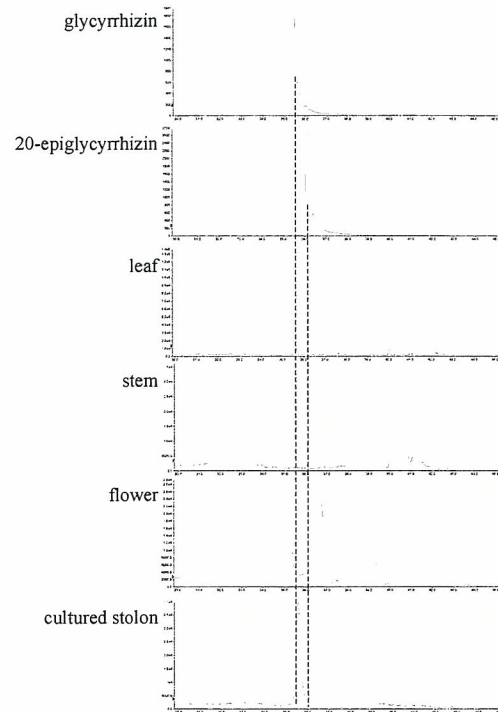


図3 各植物組織におけるグリチルリチンおよび関連物質の分析結果

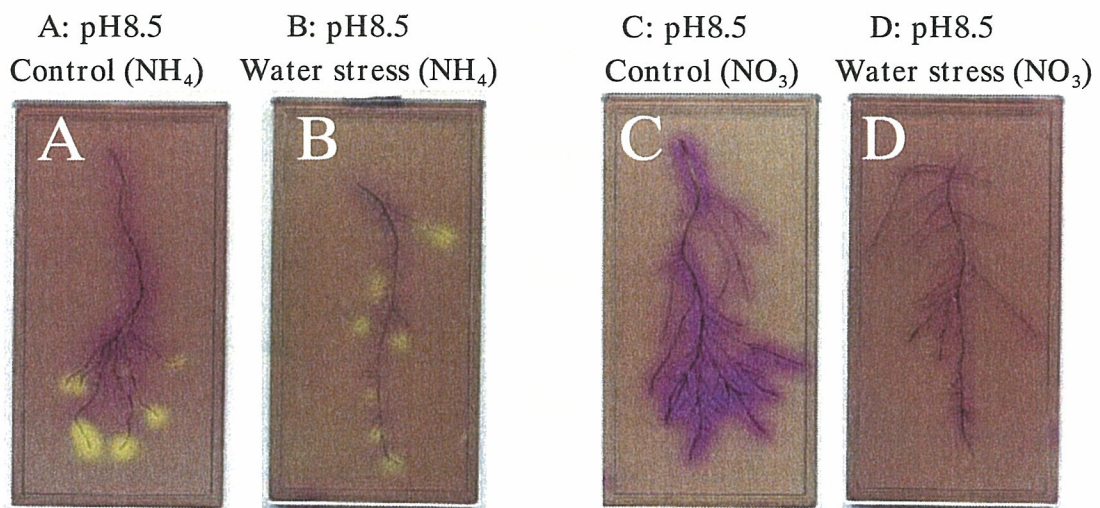


図4 アガーフィルム法でみたカンゾウ根圏の pH変化 (置床後4時間目)

赤紫で pH が高く、黄色で pH が低いことを示している。Aではアンモニアの吸収とともに根から H⁺イオンが放出され根圏が酸性化し、Cでは硝酸の吸収とともに OH⁻イオンが放出されアルカリ化が進行しており、いずれも吸収が活発に行われている。水ストレスの付与により硝酸の吸収が低下し (D)、一方、アンモニアの吸収は吸収帯が根端部を中心に分枝根全体に拡大している (B)。

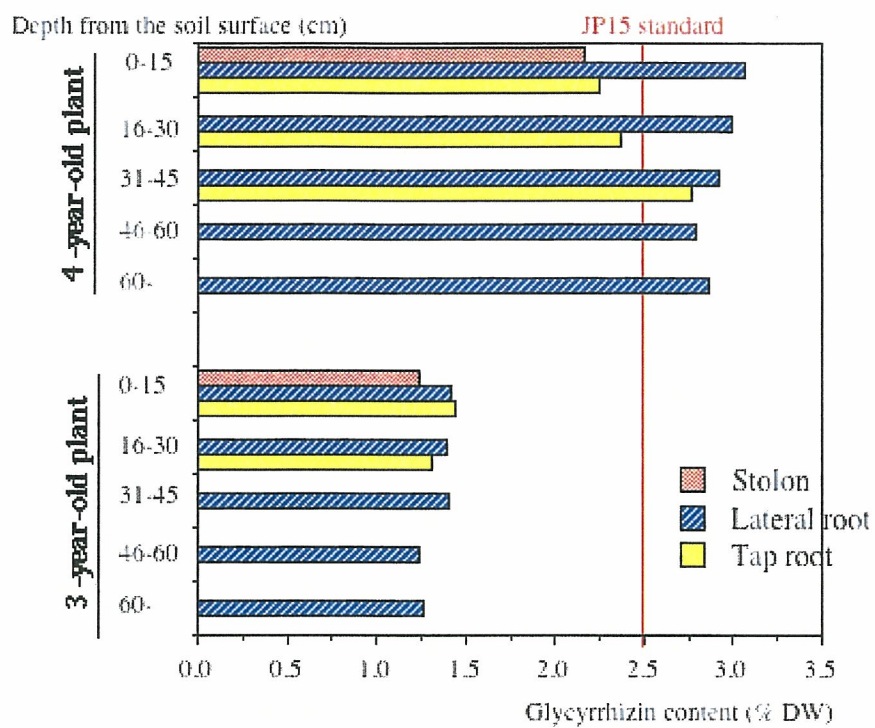


図5 土壤深度別の根中グリチルリチン含量

生合成解析と遺伝子組換え技術を基盤とする薬用植物の活用に関する研究

分担研究者 関田節子 徳島文理大学 香川薬学部 教授

要旨 世界的に薬用植物の利用が高まる一方で乱獲、環境変化により資源は減少し、産出国は政策的な輸出規制を行っている。医療の一端を担う漢方薬・生薬製剤への影響は大きい。また、ガン、新興感染症など治療薬のリード化合物の供給源として薬用植物の注目度は高まっている現在、資源の枯渇への対策は急務である。一方、薬用植物の品質評価や遺伝子に関する技術の進展は大きい。そこで、将来的な資源の安定供給を目的として、有効成分の生合成遺伝子制御による効率的な栽培法の確立を目指す。本研究では、産地の砂漠化防止のために採取が規制されている麻黄を対象に、ephedrine 生合成遺伝子を明らかにし、その発現に及ぼす機能を明らかにした。

A. 研究目的

現在、世界各国で製造・販売認可を受けた医療用・一般用医薬品の約30%は天然資源に由来するものである。その一方で、天然資源・生態系の保護、砂漠化防止、異常気象等による収量の低下等々の理由により、薬用植物資源の採取および取引の規制がしばしば行われている。これら有限な薬用植物資源の有効利用を未来に亘って存続させていくために、バイオテクノロジーを駆使した、薬用植物および天然医薬品成分の効率的生産系の確立を志向した研究が国内外で広く行なわれている。具体的には、植物組織・細胞培養系および植物体再生系に関する研究、更に、近年ではこれらの研究に加えて遺伝子工学的手法による形質転換体の作出に関する研究が急進展している。特に天然医薬品成分の原料となる二次代謝産物は、細胞内における分子レベルでの厳密な制御のもとで生合成されており、上述の研究を遂行するためには目的とする二

次代謝産物生合成系を触媒する酵素および転写因子等をコードする遺伝子のクローニングと機能解析に関する研究が不可欠である。二次代謝産物の生合成に関する分子生物学的・生化学的、また、ポストゲノム科学的研究は数多く行われており、植物においては、フラボノイド、トリテルペン、ステロール、ポリケタイド、トロパンアルカロイド、ニコチンアルカロイド、タキソール等の生合成系が分子レベルで解明されつつある。その一方で、依然として未解明、あるいは、断片的な理解に留まっている二次代謝産物生合成系も数多く存在する。その理由として、二次代謝系遺伝子の発現量は一般的に低いこと、また、極めて特異的な酵素反応であることからアッセイ系の確立に相当な労力を有すること、等が挙げられる。しかし、生合成遺伝子を解明することは、遺伝子改変による有用成分高生産植物の作出、あるいは、組換えタンパク質を利用した *in vitro* における有用成分の酵素

的全・半合成等を遂行していくための基盤となる。

本研究は、ephedrine 系アルカロイド合成に関与する遺伝子群のクローニングと機能解析を目的として遂行した。ephedrine はマオウ(生薬「麻黄」)に含有される主要な薬効アルカロイド成分である(Fig. 1)。

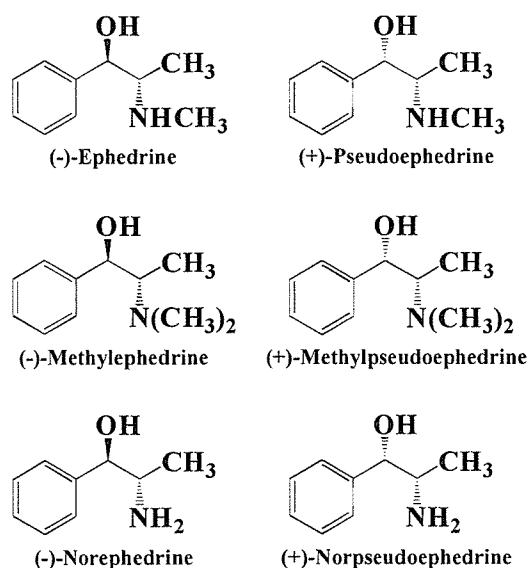


Figure 1. Structures of Naturally Occurring Ephedrine Alkaloids

ephedrine 系アルカロイド含量は、種・品種間によって差のあることが知られており、第 15 改正日本薬局方においては *Ephedra sinica*、*E. intermedia*、*E. equisetina* の 3 種が収載されている。ephedrine 系アルカロイドは、アミノ酸 L-phenylalanine 由来の C₆-C₁ unit と pyruvic acid 由来の C₂ unit との縮合反応に基づいて生合成される。従って ephedrine 系アルカロイドは、ベンゼン環に直鎖状 3 炭素が結合した C₆-C₃ フェニルプロパノイド化合物を産生するフェニルプロパノイド(シキミ酸)経路によって全て生合成されるものではなく、*Ephedra* 属植物に特異的な希少経路によって生合成されるものと考えられている。

同生合成の初期代謝産物である *trans*-cinnamic acid は、酵素タンパク質で

ある PAL(Phenylalanine Ammonia-Lyase)の触媒下、L-Phe より生合成される。また一般に、PAL はフェニルプロパノイド経路の鍵酵素として知られており、一次代謝から二次代謝への導入酵素と考えられている。しかし、過去に ephedrine 系アルカロイド合成に関与する遺伝子のクローニング報告は無かったことから、本研究において、同生合成に関与する *pal* 遺伝子(*Espal*)を *E. sinica* からのクローニング、組換えタンパク質の誘導と精製、その機能解析を行った。

B. 研究方法

1. 材料

E. sinica の種子をバーミキュライト・川砂混合土に播種後、地上茎が第 4 節まで分化した植物体を用いた。*E. sinica* の種子は金沢大学大学院自然科学研究科・御影雅幸教授より御供与頂いた。

2. *Espal* 遺伝子のクローニング

植物体より total RNA を抽出後、オリゴ dT プライマーを用いて mRNA の逆転写反応を行い、cDNA を合成した。これを鋳型として、既知の植物由来 *pal* 遺伝子のホモロジーよりデザインした縮重型プライマーを用いた PCR を行った。次に、特異的増幅産物の塩基配列を確認後、nested PCR を行ない、末端未知領域を 3'-RACE および 5'-RACE により同定した後、ORF 領域を標的とした end-to-end PCR を行った。

3. EsPAL 組換えタンパク質の誘導と精製

Espal の ORF 領域を GST 融合型遺伝子発現ベクター pGEX-6P-1(GE 社製)に導入した(pGEX-EsPAL)。pGEX-EsPAL およびネガティブコントロールとして空ベクターを用いて *E. coli* BL21 を形質転換した後、2xYT-アンピシリン (100 g/ml) を用いて 37°C にて培養した。EsPAL 組換えタンパク質の誘導は、20°C 培養にて

IPTG を最終濃度 0.2 mM となるように加えて行った。菌破碎後に得られる粗タンパク質溶液より EsPAL を精製するため、GST アフィニティークロマトグラフィーを行った。

4. PAL 活性の測定

酵素反応バッファー(100 mM Bis-Tris Propane/HCl [pH 8.5], 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA [pH 8.0])に基質として 2.0-0.01 mM L-Phe または L-Tyr を加え、EsPAL 存在下 37°C にて 20 分間反応を行なった。酵素反応により生成する L-Phe 由来 *trans*-cinnamic acid および L-Tyr 由来 *p*-coumaric acid は UPLC (Waters 社製)を用いて分析した。分離カラムには ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 x 50 mm) を用い、溶離液 A: 3% AcOH/H₂O および溶離液 B: CH₃CN のグラジエント送液 (0→100%B)により化合物を分離した。化合物の検出には PDA を用い、*trans*-cinnamic acid は 278 nm、*p*-coumaric acid は 310 nm の波長により定量した。

C. 研究結果

1. *Espal* 遺伝子のクローニング

既知の植物由来 *pal* 遺伝子のホモロジーよりデザインした縮重型プライマーを用い、cDNA を鋳型とした PCR を行った。その結果、得られた特異的増幅産物より、プライミング領域を除いた 638 bp について塩基配列を決定した。決定した塩基配

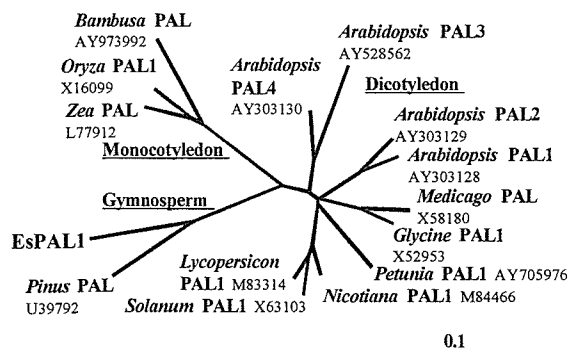


Figure 2. Phylogenetic Analysis of Plant PALs
The amino acid sequences of plant PALs were phylogenetically analyzed. Plant PALs were shown with DDBJ/GenBank/EMBL accession numbers.

列は、全体として既知の植物由来 *pal* 遺伝子と高い相同性を有したため、残りの未知領域についてもクローニングを行うことにした。引き続き 3'-RACE および 5'-RACE を行い、それぞれ 874 bp、654 bp の ORF 末端領域を決定した。また、両末端の UTR 配列についても決定した。これら一連の研究の結果、*Espal* の ORF 長は 2166 bp であり、722 アミノ酸をコードすることが明らかとなった。更に、複数クローンの塩基配列解析より、9 アミノ酸部位に多様性を有する、少なくとも 4 種類以上の EsPAL が存在することを明らかにした (EsPAL1-4)。また、分子進化系統解析より EsPAL は同じ裸子植物であるテーダマツ (*Pinus taeda*) 由来 PAL と最も高い相同性を有しており、EsPAL1 との同一性は 77% であった (Fig. 2)。

2. 組換えタンパク質による EsPAL の機能解析

Espal1-4 遺伝子をそれぞれ発現ベクタ

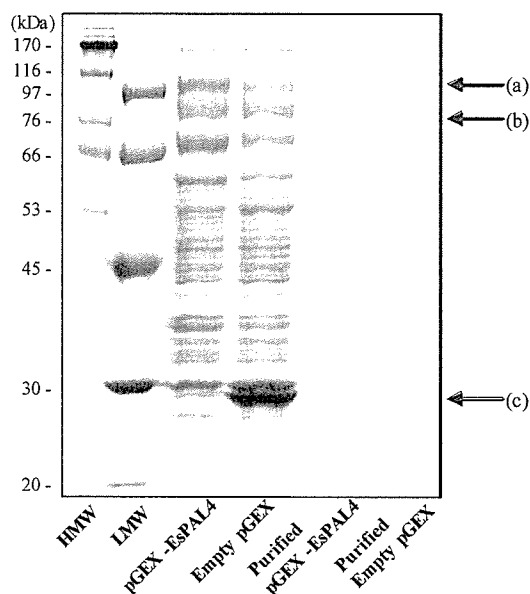


Figure 3. Purification and SDS-PAGE analysis of recombinant EsPAL4 produced in *E. coli*

The crude extracts from *E. coli* harboring pGEX-EsPAL4 and empty pGEX vector and the purified recombinant proteins were separated by 10% SDS-PAGE with the high and low molecular weight marker, HMW and LMW. Protein bands were detected by Coomassie Brilliant Blue staining. Arrowhead indicates the position of the EsPAL4 fused with GST-tag (a), the purified EsPAL4 after the cleavage between EsPAL4 and GST-tag on a column by PreScission Protease (Amersham) (b) and GST produced from empty pGEX (c).

一に導入し、*E. coli* を宿主として組換えタンパク質を誘導した(Fig. 3)。

これらのうち先に得られた EsPAL4 を用いて PAL 反応を行い UPLC により分析した結果、標準物質および空ベクター由来精製組換えタンパク質を用いた反応サンプル分析との比較から、EsPAL4 反応による *trans*-cinnamic acid の生成を確認した。この結果より、本研究よりクローニングした *Espal4* は PAL 活性を機能として有することが明らかとなった。また、L-Phe と構造が類似し、フェニルプロパノイド経路中間体である *p*-coumaric acid の前駆物質である L-Tyr を基質としたときの反応(TAL 反応)は進行しなかった。

D. 考察

麻黄は北半球と南アメリカのやや乾燥した地域に分布し、1 属約 35 種とも 60 種とも言われている。これは分類形質の一つである外部形態が簡素で類似しているため分類に混乱が見られることによる。また、代表的な成分である ephedrine 系アルカロイド類の含有量も種間あるいは同種であっても環境条件などにより差があることが知られており、生薬の基原植物としては中国産の *E. sinica*, *E. intermedia*, *E. equisetina* に限定されている。近年、中国は麻黄の産地の砂漠化を防止する目的で採取を制限したことから野生植物のみに依存せず、栽培化が勧められている。そこで栽培時の種株の選択あるいは分子生物学的生産を目的に、植物体における ephedrine 系アルカロイド生合成遺伝子の解明を開始した。

本研究では、*E. sinica* より *pal* 遺伝子のクローニングを行い、その機能解析を行った。本報告では、EsPAL4 の組換えタンパク質を用いた機能解析について得られた結果について述べた。今後、Km 値や *V*_{max} 値の検討等、詳細な解析を現在進めているところである。残りの

EsPAL1-3 についても同様に機能解析を行い、特に、EsPAL1-4 それぞれの活性と各変異アミノ酸との相関解明を中心に研究を進めていく。また、組織別遺伝子発現パターン解析、サザン解析、細胞内局在性研究等の諸研究を進めることで、ephedrine 系アルカロイド生合成初期過程の分子レベルで明らかにしていく。そして、本研究より得られた知見をもとに、ephedrine 系アルカロイド生合成初期段階のエンジニアリングによるアルカロイド高生産型マオウの作出、および、組換えタンパク質を利用した新規効率的合成系の確立を目指していく。

E. 結論

E. sinica より、ephedrine 系アルカロイド生合成に関与する遺伝子として初めて *pal* 遺伝子(*Espal*)をクローニングし、その機能解析を行った。

Espal の ORF 長は 2166 bp であり、722 アミノ酸をコードすることが明らかとなった。更に、複数クローンの塩基配列解析より、*E. sinica* には少なくとも 4 種類以上の EsPAL が存在することを明らかにした(EsPAL1-4)。これらのうち先に得られた EsPAL4 組換えタンパク質による機能解析を行った結果、機能としての PAL 活性を *in vitro* において証明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 岡田岳人, 中村由紀子, 金谷重彦, 高野昭人, 中根孝久, 御影雅幸, 代田修, 柴田大輔, 山崎真巳, 関田節子: ephedrine 系アルカロイド生合成に関する分子生物学的研究、および、マオウ代謝物のメタボローム, 第7回長井長義記念シンポジウム, 平成 18 年 9 月 6-7 日, 徳島.

2) Okada, T., Nakamura, Y., Kanaya, S., Takano, A., Nakane, T., Mikage, M., Shiota, O., Yamazaki, M., and Sekita, S. : Molecular biological study on ephedrine alkaloid biosynthesis and total metabolite analysis by metabolomic approach in *Ephedra* plants : ICOB-5 and ISCNP-25 IUPAC, International Conference on Biodiversity and Natural Products, July 23-28, Kyoto, Japan.

3) 岡田岳人, 山崎真巳, 御影雅幸, 関田節子 : ephedrine 系アルカロイド生合成に関与するマオウ由来 *pal* 遺伝子のクローニングと機能解析, 日本薬学会第 127 年会, 平成 19 年 3 月 28-30 日, 富山.

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

沈香成分の生合成解析

分担研究者 木内文之 (独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター・センター長

協力研究者 本多義昭 京都大学大学院薬学研究科・教授

協力研究者 伊藤美千穂 京都大学大学院薬学研究科・助教授

協力研究者 矢倉 徹 京都大学大学院薬学研究科・助手

要旨 沈香の樹脂成分（クロモン類、セスキテルペン類）の生合成機構解明を目的として、市販の各種沈香や人為的傷害を加えた、また傷害を加えないジンコウノキの材の詳細な成分分析と、培養細胞を用いた成分産生誘導実験を行った。その結果、樹脂成分生合成に関係が深いと予想される成分（エポキシクロモン類、各種配糖体）を同定し、また培養細胞系の実験からは、エリシター様の化合物で成分産生が誘導されることが示され、さらにメチルジャスモン酸を投与した細胞からセスキテルペン合成酵素をクローニングした。

A. 研究目的

沈香はわが国古来よりの伝統的な薬用香木であるが、その基原は熱帯から亜熱帯のアジア地域に産するジンチョウゲ科の木本で、わが国に野生はない。特に香木として用いられる際には、その樹脂成分の含有量と成分組成の違いによって細かく分類され、価格や用途も様々である。この沈香の樹脂は、健全な基原の材には見出されず、傷害を受けた部位に特異的に蓄積されるが、その詳細なメカニズムや成分の違いを生み出す原因についてはこれまで研究例が殆どない。沈香の基原植物として知られている *Aquilria* 属植物は、その全てが一昨年に CITES、いわゆ

るワシントン条約の絶滅危惧種第2種のリストに加えられ、現在では国際取引が厳しく制限されているが、香水、香油のブレンド材料等として、沈香の需要は増加傾向にある。さらに、最近の我々の研究から、沈香の樹脂成分には、動物に対する吸入投与で強い鎮静活性があることが明らかになり、ADHD（注意欠陥多動性障害）や各種ストレス性疾患に対するアロマセラピー的な使い方など、副作用の少ない医療的用途の可能性も出てきている。そこで、本研究では、この沈香に含まれる成分の生合成メカニズムを明らかにし、現在では方法が確立されていない沈香の人工的生産法開発の足がかりと

すると共に、ポストゲノムの時代といわれながら、まだ情報不足の感がある植物二次代謝物質の生合成について、その一部を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

(1) 人為的に傷害を加えた沈香および市販の沈香に含まれる成分の詳細分析：

沈香の樹脂成分には、多様なセスキテルペンとクロモン類が含まれるが、それらの成分組成には非常に大きな変異がある。そこで、多くの沈香サンプルについて、セスキテルペンはGC-MSを用いて、クロモン類はHPLCを用いて、それぞれ詳細に分析し、組成変化に一定のパターンがあるのかを検討するとともに、ステンレスピンを用いて人為的に傷害を加えた温室栽培のジンコウノキの材中に生成する樹脂成分関連化合物を探索、構造決定した。

(2) 健全な沈香基原植物に含まれる成分の詳細分析：

健全な基原植物には、樹脂成分は見出されないものの、樹脂成分の生合成材料となる化合物が存在しているはずである。そこで、傷害の無い基原植物の材に含まれる主な成分をカラムクロマトグラフィーにて分離・精製し、各種スペクトルデータにより構造決定した。

(3) 沈香基原植物より誘導した培養細胞を用いた樹脂成分生成誘導実験：

京都大学大学院薬学部薬用植物園の温室で栽培している沈香基原植物より誘導した液内培養細胞系を用い、継代後7日目の細胞に、メチルジャスモン酸、 β -グルカン、イソマルトオリゴ糖、塩化第二鉄、

サリチル酸、水溶性キトサンを、各々濃度を変えて無菌的に投与し、2週間の培養の後に収穫し、細胞内に生成したセスキテルペン類とクロモン類を分析した。また、これらのうち、成分生成の反応が高かったものについては、さらに物質生産のタイムコースなどの検討を加えた。

(4) 培養細胞からの樹脂成分生合成関連酵素遺伝子のクローニングと機能解析：

(3)の結果を踏まえ、化合物投与時に特異的に発現する遺伝子のうち、樹脂成分、特にセスキテルペン生合成に関与する可能性の高いものをサブトラクション法とRACE法を組み合わせた方法でクローニングした。即ち、メチルジャスモン酸を投与した細胞のcDNAから、コントロール細胞のcDNAを引き算してサブトラクションライブラリーを得、これに含まれる配列からテルペン合成酵素に保存性の高い領域に設計したプライマーを手がかりにセスキテルペン合成酵素遺伝子に類似の配列をクローニングした。得られた配列は、大腸菌にて発現させ、ファルネシルジフオスフェイトを基質として酵素反応を行い、生成物をSPME-GC-MSにて同定した。

C. 研究結果

(1) 人為的に傷害を加えた沈香および市販の沈香に含まれる成分の詳細分析：

人為的に傷害を加えたジンコウノキの材からは、HPLCで検出される成分として、agarotetrol, dehydroconiferyl alcohol, feruloyltyramine, genkwain, 7',4'-O-

methylapigenine, oxidoagarochromoneA, -B, -C, 2-(2-phenylethyl)chromone, (-)-simulanol, syringaresinol, 7,3',4'-tri-O-methyluteoline, などが (Figure 1)、またGC-MSで検出される成分としては、12,15-dioxo- α -selinene, 12,15-dioxo-selina-4,11-diene, 12-hydroxy-15-oxo-selina-4,11-diene, α -guaiene, δ -guaiene, α -humulene, methyl 15-oxo-eudesmane-4,11-diene-12-oate, などが確認された。

これらの成分はみな一様に生成するのではなく、傷害を加えて1週間以内の早い時期に現れる成分と、その後数週間から数ヶ月程度の期間に蓄積すると思われる成分、またそれ以上の時間が十分経過した後に検出される成分、に大別された。即ち、リグナンの1つであるsyringaresinolと α -guaiene, δ -guaiene, α -humuleneの3種のセスキテルペン類は、傷害を加えた直後から1週間程度の間によく検出され、その後、特徴的なエポキシクロモン類

(oxidoagarochromoneA, -B, -C)が増加した後、1～数ヶ月後には、テトラヒドロクロモンやエポキシ基を含まないクロモン類、酸化型セスキテルペン類が蓄積することが示された (Figure 2)。一方、市販の沈香からは、エポキシクロモン類はまったく検出されないか、含まれていても極少量であった。また、質が良いとされる沈香は、セスキテルペン類の含量が高いという特徴が見られた。

(2) 健全な沈香基原に含まれる成分の詳細分析：

傷害を加えていないジンコウノキの材からは、sucroseをはじめ、acacetin

5-methyl ether, genkwanin, genkwanin 5-O- β -D-primeveroside, luteolin, 3',4',7-trimethyl ether, mangiferin, β -sitosterol, stigmast-4-ene-3,6-dione, syringaresinol, syringaresinol-4''-O- β -D-glucopyranoside, syringin, syringinoside, などが単離、同定できた (Figure 3)。これらの化合物はフラボンやリグナン、ステロール、ベンゾフェノンとそれらの配糖体であるが、セスキテルペン類、あるいはその配糖体はまったく単離されなかった。

(3) 沈香基原より誘導した培養細胞を用いた樹脂成分生成誘導実験：

ジンコウノキの液内培養細胞に、植物細胞に対するエリシターとして機能したと報告がある化合物をそれぞれ投与したところ、生成量の多少はあるものの、いずれの場合も、 α -guaiene, δ -guaiene, α -humulene、およびクロモン類とシリנגアレジノールなどを生成することが確認できた。投与した化合物の中で、反応が安定して顕著に現れたのは、メチルジャスモン酸であり、他にもイソマルトオリゴ糖、 β -グルカンなども一定の範囲で濃度依存的に樹脂成分の生成量が増加する傾向がみられた。また、エリシター様物質投与後の樹脂成分生成のタイムコースをみた実験では、投与後2週間程度の培養後期に成分が増加する様子が観察された。この結果を基に、現在、細胞生存率と成分生成との関係を検討している。

(4) 培養細胞からの樹脂成分生成関連酵素遺伝子のクローニングと機能解析：

ジンコウノキの培養細胞にメチルジャ

スモン酸を投与すると、 α -guaiene, δ -guaiene, α -humuleneが生成されることから、これらセスキテルペンの生合成に関与する酵素の遺伝子の単離を試みた。サブトラクションライブラリに含まれる配列から、テルペン合成酵素に特徴的な配列を含むものを探索した結果、いわゆるトランジットペプチド部分を持たない、セスキテルペン合成酵素と予測される配列が得られた。この遺伝子がコードするタンパク質を大腸菌を使った発現系を用いて過剰発現させ、機能解析をおこなったところ、ファルネシルジフosphateを基質として加えた酵素反応で、生成物を与えた。この反応生成物のSPM-GC-MSのパターンから生成物はセスキテルペンと予想されたが、化合物の同定には至らなかった (Figure 4)。

D. 考察

(1) および (2) の、沈香に含まれる成分の詳細な分析から、傷害がきっかけで樹脂成分の生合成が開始される場合には、生成される化合物が経時的に変化することが示された。特に、クロモン類については、新たな成分としてエポキシクロモン類を見出し、その構造を決定した。エポキシクロモン類の消長の様子から、これらがクロモン類生合成の中間産物である可能性も考えられるが、現段階ではこれを決定付ける実験的証拠は得られていない。今後、トレーサー実験や生合成関連遺伝子の解明などにより、クロモン類の生合成経路を明らかにしていく必要がある。また、傷害を与えないジンコウノキの材からは、多くの配糖体が単離さ

れたが、その中に syringaresinol の配糖体が多く含まれていることが明らかとなった。人為的な傷害により、短時間のうちに多くの syringaresinol が生成されることが明らかとなったが、これはもともと材に含まれていた配糖体が加水分解されて生成するものと考えられる。クロモン類の生合成前駆体は現時点では不明であるが、syringaresinol の場合と同様に、クロモン類の生合成材料 (パーツ) も材の中に配糖体の形で含まれており、傷害などの刺激によって糖部分が外れたものが、生合成に利用されるとも考えられる。

培養細胞を用いた実験では、培養細胞においても沈香と同じ成分の生成が観察され、沈香成分の生合成研究に培養細胞系が利用できることが示された。今回、エリシターを加えた細胞で特異的に発現している遺伝子の中からセスキテルペン合成酵素遺伝子をクローニングし、この遺伝子がコードするタンパク質によってファルネシルジフosphateから生成する酵素反応生成物を捕らえたものの、その物質の同定には至らなかった。今後、発現や酵素反応の条件を最適化して生成物の構造を決めていく予定である。

E. 結論

本研究には、成分の詳細な分析により、沈香成分の生合成に関する化合物のダイナミズムの一部を明らかにした。ここで得られた情報は、発現遺伝子の解析やトレーサー実験による生合成中間体の同定などの次のステップの研究の基盤となるものであり、沈香の主要な香り成分

を構成するクロモン類とセスキテルペン類の生合成経路に含まれる関連化合物並びに生合成関連酵素遺伝子の解明に道を拓くものである。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) H. Takemoto, M. Ito, T. Shiraki, T. Yagura, G. Honda, Sedative effects of vapor inhalation of agarwood oil and spikenard extract and identification of their active components, *J. Natural Medicines*, submitted.

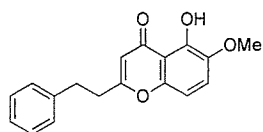
2. 学会発表

- 1) ゴハリ・アフマッド、セイドニア・スーダベー、矢倉徹、伊藤美千穂、本多義昭、沈香木 (*Aquilaria sinensis*) 非樹脂部より得られた新規ベンゾフェノン配糖体(日本生薬学会第53回年会、埼玉、2006).
- 2) 矢倉徹、伊藤美千穂、本多義昭、傷害を加えた*Aquilaria*属植物および沈香に含まれる香気成分(日本薬学会第127年会、富山、2007).

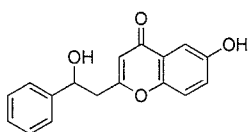
G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

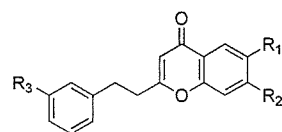
Chromones



5-hydroxy-6-methoxy-
2-(2-phenylethyl)chromone

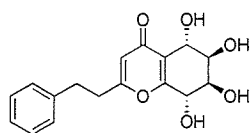


6-hydroxy-
2-(2-hydroxy-2-phenylethyl)chromone

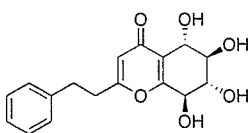


flindersiachromone : $R_1 = R_2 = R_3 = H$
 AH₃ : $R_1 = OH, R_2 = R_3 = H$
 AH₄ : $R_1 = OMe, R_2 = R_3 = H$
 AH₅ : $R_1 = R_3 = OMe, R_2 = H$
 AH₆ : $R_1 = R_2 = OMe, R_3 = H$

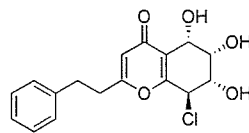
5,6,7,8-Tetrahydrochromones



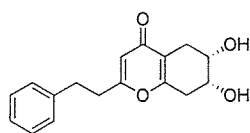
agarotretol



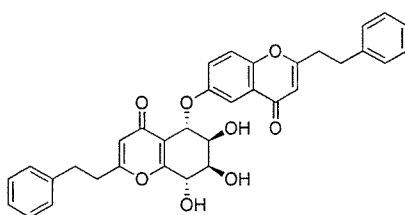
isoagarotretol



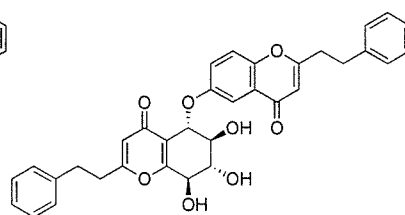
8-chloro-2-(2-phenylethyl)-
5,6,7-trihydroxy-5,6,7,8-tetrahydrochromone



6,7-dihydroxy-2-(2-phenylethyl)-
5,6,7,8-tetrahydrochromone

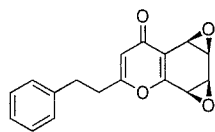


AH₁₀

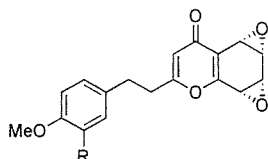


AH₁₄

Oxidoagarochromones



oxidoagarochromone A



oxidoagarochromone B : $R = H$
 oxidoagarochromone C : $R = OH$

Figure 1. Structures of Chromones and Related Compounds

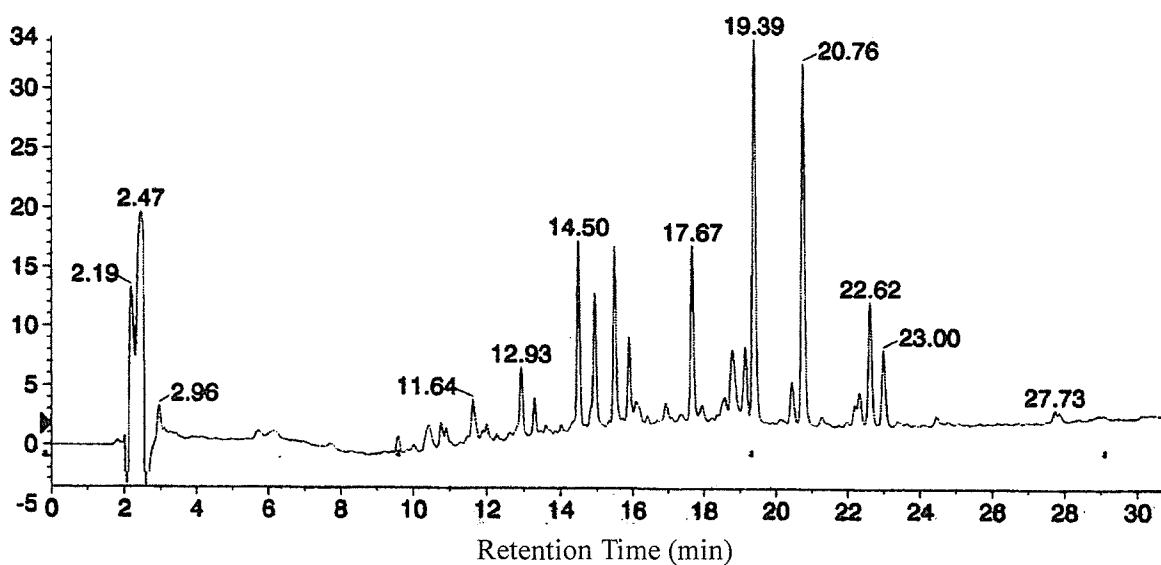


Figure 2. HPLC Pattern of Resin Fraction Obtained from Injured Wood (16 weeks)

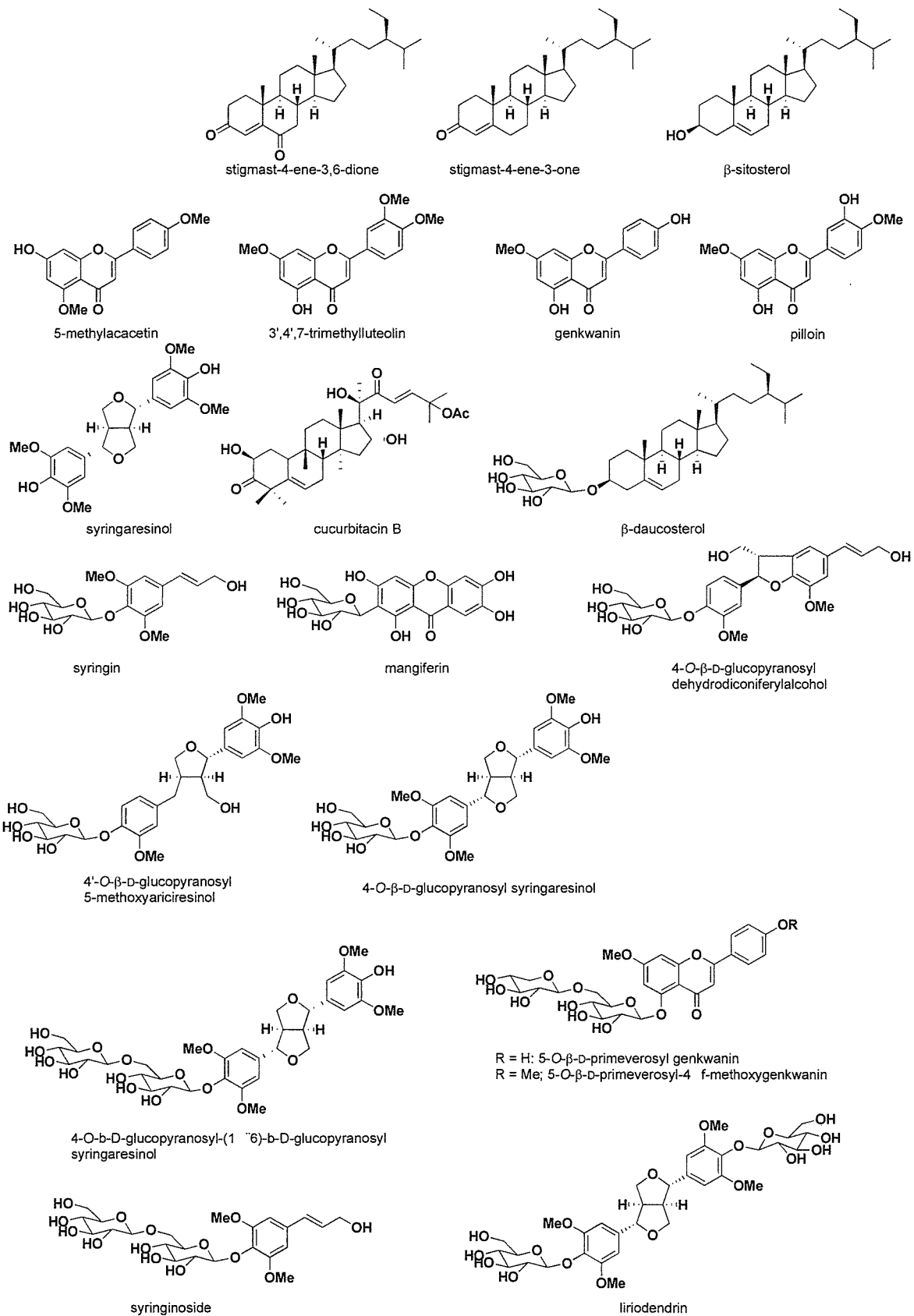


Figure 3. Compounds Isolated from Intact Wood of *Aquilaria sinensis*

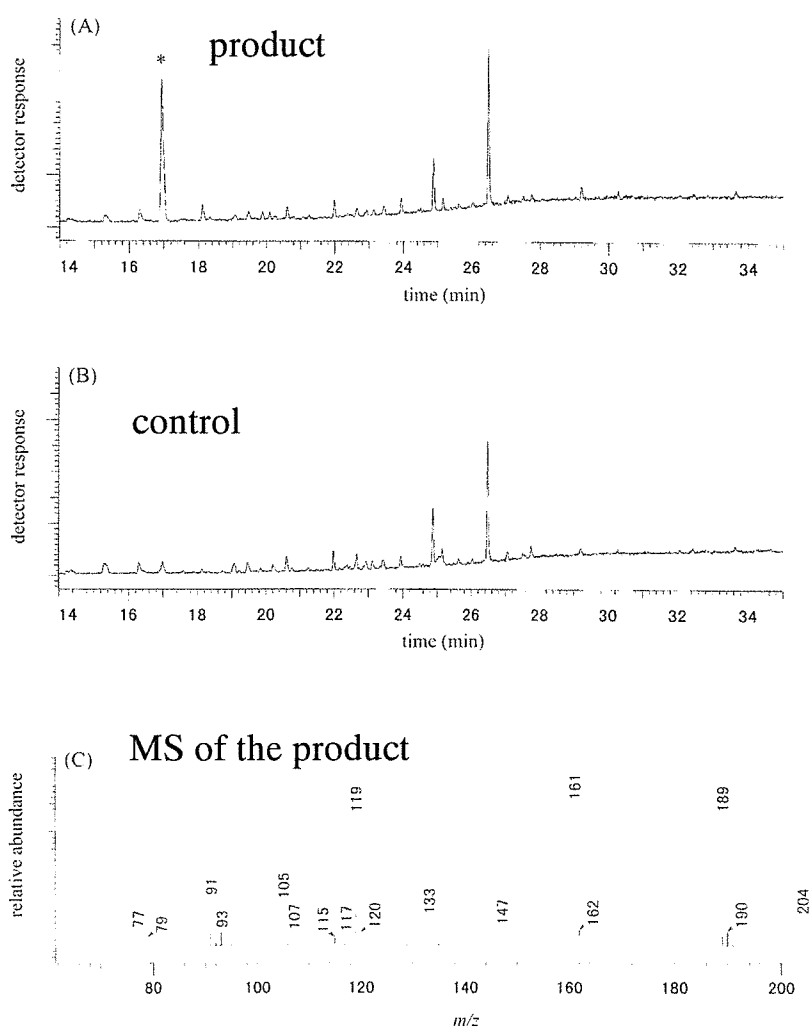


Figure 4. GC-MS of the Reaction Product

薬用植物の遺伝子解析に関する研究

分担研究者 野口 博司

所属・職 静岡県立大学 薬学部・教授

要旨：カルコン合成酵素（CHS）スーパーファミリーを形成するⅢ型ポリケタイド合成酵素（PKSⅢ）は、ナフトレン等の骨格を構築する酵素も含まれる高等植物ポリフェノール生合成に関わる巨大な一群である。クロモンやアントラキノン等複数のポリケタイドを生産する薬用植物であるダイオウ（*Rheum palmatum*）はこれら新規酵素遺伝子資源として期待される。ダイオウより得られた C6-C4 骨格を構築するベンザルアセトン合成酵素（BAS）を導入したシロイヌナズナの種子を昨年確保した。本年この酵素は生体内でキノリノンアルカロイドを生成する可能性の有ることを新たに見いだした。

一方、ダイオウと並んで緩下剤として知られるアロエ（*Aloe arborescens*）から得られたペンタケタイドを生成する酵素遺伝子の組換え体を作成したところ高等植物由来 PKSⅢ として初めてナフトレン誘導体を生成した。これは活性部位空間を拡張するようにアミノ酸を組み換えるに従って、C2 単位の縮合数が 5, 8, 9 と増大したものである。

A. 研究目的

1) 遺伝子組換え植物の環境に及ぼす影響の検討：BA (phenyl butanone) 型の植物ポリフェノールを生合成する高等植物は限られており、ダイオウの他にはラズベリー、生薬基源植物としては生姜やウコンなど限られた単子葉植物が中心である。シロイヌナズナではこれまで知られている限り BA 型の、即ち C6-C4 型の化合物を生産することは知られていない。一方ダイオウ(*Rheum palmatum*)由来の BAS 遺伝子(*bas*)が導入され発現した場合、i) 本酵素の基質は *p*-coumaroyl CoA、malonyl CoA でありシロイヌナズナに常在するフラボノイド類生合成に係るカルコン合成酵素(CHS)基質と同一である、ii) *bas* は約 1.4Kb の大きさで、*chs* スーパーファミリーとしては平均的なものである。同一ファミリー内の酵素のフォールディング形状は一般的に類似しており、補酵素等の要求性もない、iii) 通常細胞質で機能する。iv) 知られている限り BA の蓄積は直接細胞の生存を脅かすことはない。v) BAS は単一酵素で抗炎症作用本体とされ、もしくはラズベリーの香気成分となる骨格を構築できる——これらの点から、BAS が細胞中で生成すれば、細

胞内に BA が蓄積される可能性が極めて高く、しかもそれが導入遺伝子によるものであることが容易に判別されるという利点がある。シロイヌナズナは多くの蔬菜となる植物を含むアブラナ科に属し、その知見を広範な農業分野に応用できる可能性が高い。またシロイヌナズナを用いれば年 4 回程度の経代が可能であり、短期間に遺伝的変化を追跡することができる。そこでダイオウより単離した *bas* をシロイヌナズナに導入し、その発現によって招来されるシロイヌナズナ個体及びその遺伝的・生理的変化並びにその土壌への影響を調査研究することとした。BAS 遺伝子組換えシロイヌナズナを方法の項に記した通り実施しヘテロ植物体を選抜した。本年はホモ形質転換シロイヌナズナを目指した。

2) BASは前述のように、カルコンの生成と同じ基質を利用してダイオウの抗菌作用活性本体と目されている *lindleyin* の C6-C4 部分を構築する。本酵素は通常の条件では malonyl CoA を開始基質とすることはないが、本 *bas* がシロイヌナズナに導入された際に生体内成分を基質として生成する可能性のあるものを予め種々 CoA エステルを用いて検討し、分析の準備

を行った。

3) BASの活性中心の空間体積を拡大した際の酵素機能変化を検討した。この時BASは malonyl CoAを開始基質としないので、malonyl CoAを開始基質とする例としてキダチアロエ (*Aloe arborescens*)に含まれる、ペンタケタイド合成酵素 (PCS) のアミノ酸残基を組換えた際の産物と比較検討する。

B. 研究方法

本学薬用植物園で栽培されているダイオウ *Rheum palmatum* 苗の葉及び根より、AGPC法を用いて得られたtotal RNAをから得られたbasを実験材料とした¹⁾。キダチアロエからも同様にしてCHSとアミノ酸レベルで50%程度と低い相同性しか示さないペンタケタイド合成酵素遺伝子 (*pcs*) が得られて malonyl CoAを開始基質としていることが判明している²⁾。これらを実験材料として1) これまで単離されたクローンのコードする酵素タンパクに、多様なCoAエステルを作用させ、生成した化合物を単離構造決定する。2) これまで得られた酵素タンパクの中で、X線解析の結果から、キャビティ構造に関わり、ポリケタイド鎖の伸長に関わるアミノ酸残基を入れ替えることにより、ポリケタイド鎖の進展数を制御して新規化合物を生成させる。

酵素反応は、アセチル CoA、クマロイル CoA とマロニル CoA を精製酵素と共に 30 °C、20 分以上インキュベートすることにより行い、塩酸の添加により反応を停止し、酢酸エチルで反応生成物を抽出し、逆相の HPLC による分析を行った。

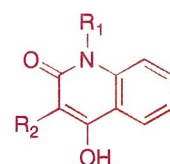
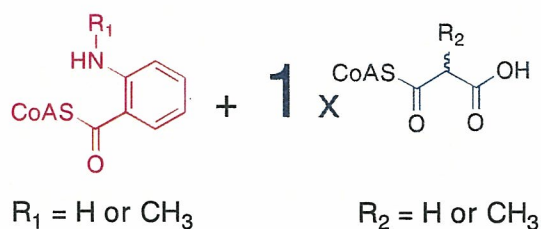
C. 研究結果

各種アシル CoA エステルをこれまでクローニングした酵素タンパクに適用したところ、今回ダイオウ由来III型ポリケタイド合成酵素

(PKS) の一つで、ベンザルアセトン(BA)を生成するベンザルアセトン合成酵素 (BAS) が、アントラニル CoA を開始基質として受容し、86%という工学的水準の収率で生理活性キノリノンアルカロイド(4-ヒドロキシ-2-キノリノン)を生成した。さらにポリケタイド鎖伸長単位として一般的には効率の悪い methylmalonyl CoA を基質としたところ更に収率が高かった。そこで本件について特許を出願し、論文(論文発表1)として発表した。また、本酵素にメチルマロニル CoA のみを作用させた場合にも、メチルマロニル CoA の3分子縮合による非天然型ラクトン化合物を生成することも見出した。BASにおいて特徴的に置換されている活

性中心キャビティを構成するアミノ酸残基 Cys¹⁹⁷, 及び, Gly²⁵⁶, Ser³³⁸に部位特異的変異を導入し、生成物特異性や、酵素反応キネティクスに及ぼす影響を詳細に検討した。その結果、S338Vの導入でベンザルアセトン生成能が2倍に改善されること、また、C197Gでは活性が劇的に変化し、5分子の malonyl-CoA からペンタケタイド 5,7-dihydroxy-2-methylchromone を生成することなどを見出した。

アロエ由来で、マロニルCoAを受容し、上記クロモグリク酸の部分構造に相当する2-メチルクロモンを生成するペンタケタイド合成酵素であるIII型PKSについて、その活性中心キャビティを構成しているアミノ酸残基のうち、アルファルファのCHSIIのアミノ酸配列番号で、207番目のメチオニン (M) をより嵩高さの少ないグリシン(G)に置換すると、ポリケタイド鎖が2単位分、即ち炭素4つ分伸長が進み、オクタケタイド化合物を生成することが分かった。さらに82番目のチロシンと80番目のフェニルアラニンとともにアラニンとすることで、これまで植物由来III型PKSでは得られたことのない、縮合環系であるナフタレンが上記組換え酵素で得られた。



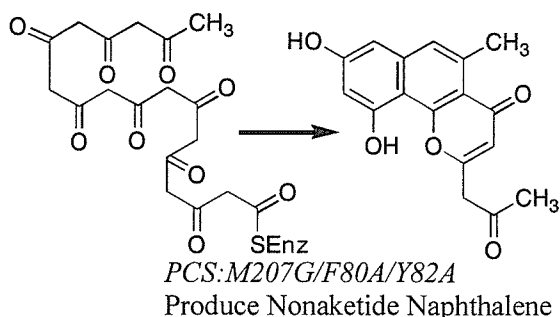
N-Methylquinolinone

- 1: $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{H}$ (4%)
- 2: $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{H}$ (12%)
- 3: $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{CH}_3$ (80%)
- 4: $R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{CH}_3$ (86%)

D. 考察

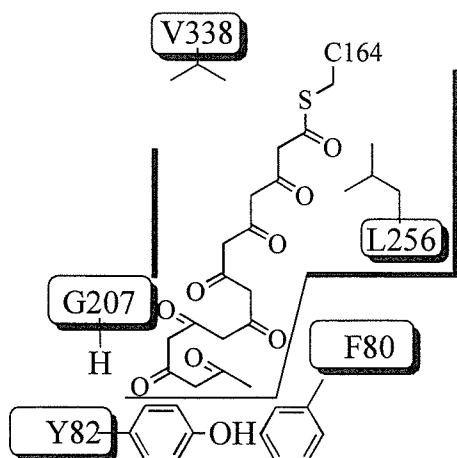
天然には *N*-メチルアントラニル CoA と3分子のマロニル CoA の縮合によりアクリドンを生産するヘンルーダ (*Ruta graveolens*) 由来III型PKSが知られているが、マロニル CoA の1分子縮合によるキノリノンアルカロイドの酵素合成としてはこれが最初である。この酵素の K_m, k_{cat} は *N*-methylanthranlyl-CoA に対して $K_m=23.7 \mu\text{M}$ $k_{cat}=1.48 \text{ min}^{-1}$ であり、必ずしも効率の良さを伺わせるものではない。本来の基質で

ある *p*-coumaroyl-CoA に対しては $K_m=10.0 \mu\text{M}$ and $k_{cat}=1.79 \text{ min}^{-1}$ である。そこでこの反応の進行には基質の安定性等が大きな意味を持つことが予想される。4-ヒドロキシ-2-キノリノンには、NMDA やセロトニンレセプターに対するアンタゴニスト作用などが知られており、医薬品開発の見地からも注目を集めている。



放線菌由来の PKS typeIII では、縮合環系を有するポリケタイドの生成が知られており、X線構造解析の結果から、グローバルコンフォーメーションと活性部位に保存されるいくつかのアミノ酸残基は共通であることが知られていた。しかし高等植物由来 PKS typeIII とは 25~30% 程度の配列相同性しか示さず、どのアミノ酸残基を組み換えれば、放線菌由来の PKS typeIII で示されていたナフタレンの生成が生じるか定かではなかった。今回アロエのクロモン合成酵素 (PCS) を基本にして、組換え酵素を作り初めて縮合環系の生成に成功したことは化合物ライブラリーの多様性が拡張されたことを示している。下図(B)において 207 位の通常メチオニン (M) を嵩の小さなグリシンとすることでポリケトメチレン鎖の伸長が可能となった。更に底面のフェニルアラニン(F)とチロシン(Y)をアラニン(A)とすることでナフタレン環が誕生した。

(B) PCS M207G



E. 結論

ダイオウ由来の BAS は基質受容性が一般的 CHS に比べて異なっていること、マロニル基のかわりに、メチルマロニル基を用いても縮合反応が成就するという 2 つの特色を利用し、アントラニル CoA を基質として、種々の生理作用が期待されるキノリノンアルカロイド骨格の酵素生成を 86% の収率で成功させた。アロエ由来ペンタケタイド合成酵素の活性部位 3 アミノ酸残基変更で、ナフタレン環の酵素生成に成功した。(現在発表準備中)

引用文献

- 1) I. Abe, Y. Takahashi, H. Morita, and H. Noguchi ; Benzalacetone synthase: a novel polyketide synthase that plays a crucial role in the biosynthesis of phenylbutanones in *Rheum palmatum*, *Eur. J. of Biochem.*, 268, 3354-3359 (2001)
- 2) I. Abe, S. Oguro, Y. Utsumi, Y. Sano, and H. Noguchi; Engineered Biosynthesis of Plant Polyketides: Chain Length Control in an Octaketide-Producing Plant Type III Polyketide Synthase, *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (36), 12709- 12716, (2005)

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) I. Abe, T. Abe, K. Wanibuchi, and H. Noguchi; Enzymatic Formation of Quinolone Alkaloids by a Plant Type III Polyketide Synthase, *Org. Lett.*, 8(26), 6063-6065 (2006).
- 2) T. Abe, H. Noma, H. Noguchi and I. Abe, Enzymatic formation of an unnatural methylated triketide by plant type III polyketide synthases, *Tetrahedron Lett.*, 47, 8727-8730 (2006).
- 3) H. Morita, S. Kondo, T. Abe, H. Noguchi, S. Sugio I. Abe and T. Kohno; Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a novel plant type III polyketide synthase that produces pentaketide chromone; *Acta Crystallographica Section F COMMUN.* 62, 899-901 Part 9 (2006).
- 4) I. Abe, T. Watanabe, H. Morita, T. Kohno and H. Noguchi; Engineered Biosynthesis of Plant Polyketides: Manipulation of Chalcone Synthase, *Org. Lett.*, 8(3), 499-502, (2006).
- 5) I. Abe, T. Watanabe, W. Lou, H. Noguchi; Active site residues governing substrate selectivity and polyketide chain length in aloesone synthase, *FEBS Journal*, 273, 208- 218, (2006).

2. 学会発表

- 1) 阿部郁朗, 渡辺達也, 小黒聡史, 安部剛史, 野口博司: 植物ポリケタイド合成酵素の生合成工学 第126回 日本薬学会年会(仙台), 要旨集4, p.91, 2006年3月30日
- 2) 森田洋行, 近藤伸, 小黒聡史, 野口博司, 杉尾成俊, 阿部郁朗, 河野俊之: ペンタケタイドクロモン合成酵素の X 線結晶構造解析: 第126回 日本薬学会年会(仙台), 要旨集4, p.92, 2006年3月30日
- 3) 安部剛史, 森田洋行, 塩川健一, 阿部郁朗, 星野敦, 飯田滋, 野口博司: マルバアサガオ (*Ipomoea purpurea*) 由来 CHS-A と CHS-B の酵素機能解析: 第126回 日本薬学会年会(仙台), 要旨集4, p.92, 2006年3月30日
- 4) 鰐淵清史, 安部剛史, 小黒聡史, 野口博司, 阿部郁朗: 植物ポリケタイド合成酵素を用いた非天然型アルカロイドの創出, 平成18年度日本薬学会東海支部大会(静岡), 2006年7月1日
- 5) 安部剛史, 鰐淵清史, 野口博司, 阿部郁朗: 植物ポリケタイド合成酵素を用いたキノリノンアルカロイドの生産: 日本生薬学会第53回年会(埼玉), 要旨集, p.162, 2006年9月30日
- 6) 鰐淵清史, 張萍, 安部剛史, 野口博司, 陳国神, 阿部郁朗: *Huperzia serrata* 由来新規 III 型ポリケタイド合成酵素のクローニングと機能解析, 日本生薬学会第53回年会(埼玉), 要旨集, p.164, 2006年9月30日
- 7) 阿部郁朗, 小黒聡史, 渡辺達也, 内海依子, 佐野幸恵, 野口博司: アロエ由来新規 III 型ポリケタイド合成酵素におけるポリケタイド鎖長及び生成物特異性の制御, 第48回天然有機化合物討論会(仙台), 要旨集, p.2006年10月11日-13日
- 8) 安部剛史, 鰐淵清史, 野間久史, 野口博司, 阿部郁朗: 植物 III 型ポリケタイド合成酵素を用いた生理活性アルカロイド骨格の創出, 第16回天然薬物の開発と応用シンポジウム(札幌), 要旨集, p.208-211, 2006年11月17日
- 9) 鰐淵清史, 張萍, 安部剛史, 陳国神, 野口博司, 阿部郁朗: 植物由来 III 型ポリケタイド合成酵素の探索と機能解析, 第16回天然薬物の開発と応用シンポジウム(札幌), 要旨集, p.212-215, 2006年11月17日

G. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願AB06019J 2006-172160 平18年6月22日科学技術振興機構

薬用植物の遺伝子組換え技術の開発と有用成分の生合成遺伝子解析

分担研究者 吉松嘉代

医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 筑波研究部 育種生理研究室長

協力研究者 河野徳昭

医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 筑波研究部

過去に実施例の少ない、薬用植物をターゲットとした有用形質の付加、および有用二次代謝産物の生合成能の改変を志向した遺伝子組換え体の作出に関わる基盤技術確立のため、新規遺伝子組換え体作出法の開発、そして、アルカロイドを中心とする有用成分の生合成経路の解明、ならびに生合成能の改変に関する研究を行った。

まず、2種類のレポーター遺伝子を用い、ケシ、オニゲシ、マルバダイオウ及びニチニチソウ形質転換法の確立を試みた。次に、新規遺伝子導入法である、種子への遺伝子導入法の薬用植物への適用について、ケシを材料として検討を行うとともに、レポーター遺伝子を発現する薬用植物の作出を行った。また、ケシのモルヒネ生合成経路の未同定部分の解明のため、モルヒネ生合成能に変異を示すケシのリゾビウム T-DNA 挿入型形質転換体を材料に、その原因遺伝子の探索ならびに、アヘンアルカロイド生合成能の解析を行った。

A. 研究目的

近年、植物における遺伝子組換え技術は長足の進歩を遂げ、スイス連邦工科大学(ETH)において開発されたベータカロチンに富む“ゴールデンライス”や、サントリー(株)の花色素変換技術による「青いバラ」などに代表されるように、穀類や花卉分野を中心とした農作物において、その具体的な成果が現れてきている。

しかしながら、薬用植物分野においては安定供給、大量供給に対する需要の高さにもかかわらず、遺伝子組換え技術を実際に応用し産業化などに結実した例はない。その主たる原因として、高等植物のなかでも、とくに薬用植物への外来遺伝子導入技術が未成熟であることが

挙げられる。

そこで、薬用植物をターゲットとした有用形質の付加、および有用二次代謝産物の生合成能の改変を志向した遺伝子組換え体の作出のため、それらの基盤技術となる薬用植物への外来有用遺伝子の高効率導入法の開発、および、アルカロイドを中心とする薬用植物の有用成分の生合成経路の解明を目標とし、以下の研究を行った。

1. 薬用植物への新規外来遺伝子導入法の適用に関する研究

植物への遺伝子導入法としては、リゾビウムを介したバイナリーベクター法や、パーティクルガンを用いる方法が一般的