

2S-Da05 機能性低分子としてのプレニル化ポリフェノールと生合成工学○矢崎 一史
(京大・生存研)

【目的】フラボノイド等ポリフェノールのプレニル化体は、抗腫瘍活性、抗菌活性、抗チロシナーゼ活性等の生理活性を有し、機能性食品などの原料として価値が高い。しかし天然では複雑な混合物となっている、含量が低い、また稀少植物起源である等の理由で、安定供給は現在不可能な状態である。近年ポリフェノール類を基質とするプレニルトランスフェラーゼとして、放線菌から可溶性の、また植物から膜結合型の酵素をコードする遺伝子が相次いでクローニングされ、生合成工学によるプレニル化ポリフェノールの生産が漸く現実のものとなった。そこで本研究では、プレニルトランスフェラーゼ遺伝子を植物に導入して、これら機能性低分子であるプレニル化ポリフェノールを生産するための生合成工学デザインの構築を行った。

【方法】本研究では、広い基質特異性を持つ可溶性蛋白である放線菌のプレニルトランスフェラーゼと、基質特異性が高く膜結合型である植物由来のプレニルトランスフェラーゼを用いた。前者においては天然から単離例のない新奇な化合物を生産できる可能性があり、一方後者ではターゲットを絞った物質生産が可能という利点がある。まずモデル実験として、放線菌由来のプレニルトランスフェラーゼを用い、酵素蛋白質が局在する細胞内のコンパートメントを改変して、どのオルガネラが物質生産に最も有利かを検討した。具体的には、野生型(細胞質)、トランジット・ペプチド(TP)をN-末端に付加してプラスチド局在としたもの、ミトコンドリア輸送シグナルをつけたコンストラクトの3種を作成し、それぞれ植物に導入してmRNA、蛋白質レベルの発現、さらに化合物の生産性を調べた。ホスト植物にはモデル植物であるミヤコグサ及びトマトを選択した。

【結果と考察】放線菌の遺伝子3種、Orf2、HypSc、NovQをそれぞれ細胞質、プラスチド、ミトコンドリアに局在するようエンジンアリングし、マメ科のモデル植物ミヤコグサに導入した。その結果、HypScではプラスチド局在としたときのみで蛋白質が検出され、ナリンゲニンやゲニステインを投与した時にそれらがプレニル化されることが明らかとなった。Orf2に関しては、どのコンパートメントに移行させた場合でも蛋白質は検出されたが、基質投与をした際にそのプレニル化体の生成が認められたのはプラスチド型のみであった。NovQに関しては、蛋白質レベルの発現に問題が認められたため、コドンユースエージを植物用に改変したNovQ (M)を作成し、プラスチド局在型コンストラクトとしてミヤコグサに導入した。その結果、明確な蛋白質の蓄積が認められ、基質としてナリンゲニンを投与した際にプレニル化体の生成が認められた。

ナス科のモデル植物であるトマトをホストとした実験では、導入遺伝子をHypScとN8DTに絞り、果実特異的なE8プロモータを用いて形質転換体を作成した。その結果、いずれの形質転換体でも、基質投与なしでプレニル化ナリンゲニンを生産していることが明らかとなった。ただし、両遺伝子でプレニル化される位置は異なっていた。これらのパラメータを整理することで、プレニル化ポリフェノールの生産に適した代謝工学デザインが確立されるものと期待される。

2S-Da06 植物の代謝多様性を利用した非天然型テルペノイドの創製○關 光, 村中 俊哉
(阪大院・工・生命先端)

高等植物が生産する代謝産物は20万種を越えるとされ、動物のそれを遙かにしのぐ構造多様性を示す。これら植物低分子化合物は、医薬品原料、色素、香料や、近年では機能性食品やサプリメントなどの形で利用されている。私たちは、多様な構造を持つマメ科トリテルペノイドおよびキク科セスキテルペノイドに注目し、その構造多様化の機構を生合成酵素遺伝子の発現、酵素機能の分化の解析を通して理解するとともに、組換え酵母において植物由来生合成経路を再構築/デザインすることで天然・非天然化合物を生産・創製することを試みている。

マメ科トリテルペノイドの生産: 薬用植物カンゾウのグリチルリチン、チョウセンニンジンジンのジンセノサイドなどに代表されるトリテルペノイド配糖体は、医薬品資源として重要な化合物群である。マメ科植物はグリチルリチンやソヤサポニンなどβ-アミリンを基本骨格に持つ多様なトリテルペノイドを生産する。その構造多様化には、炭素骨格の酸化修飾を担うチトクロームP450モノオキシゲナーゼ (P450) が大きく寄与している。私たちは、グリチルリチン生合成酵素として、CYP88D6 (β-アミリン 11位酸化酵素)⁽¹⁾およびβ-アミリンの30位炭素の酸化を触媒するCYP72A3 プファミリーP450を同定した。さらに、これら2種のP450遺伝子をβ-アミリン合成酵素(ステロイド類およびトリテルノイド類の共通基質であるオキシドスクアレンを環化しβ-アミリンに変換するオキシドスクアレン環化酵素の一種) 遺伝子とともに酵母に導入することで、微量ながらも内在のオキシドスクアレンからグリチルレチン酸(グリチルリチンの非糖部で、薬理活性本体)とその類縁化合物を生産することに成功した⁽²⁾。また、β-アミリンの24位あるいは28位の酸化を触媒するP450もそれぞれ特定しており、これら複数のP450を様々な組み合わせでβ-アミリン生産酵母に導入することで、これまでに分離精製の報告がないβ-アミリン派生物を生産させることができた。

キク科セスキテルペノイドの生産: キク科ヨモギ属 (*Artemisia*) 植物は、多様なセスキテルペノイドを生産する。なかでも*A. annua*が特異的に生産するアルテミシニン³は、抗マラリア薬原料として極めて重要な化合物である。その生合成酵素としてアモルファジエン合成酵素 (ADS: ファルネシル二リン酸を環化しセスキテルペン骨格であるアモルファジエンを生成) およびアモルファジエンの12位炭素を酸化するCYP71AV1がすでに同定されていた。私たちは、CYP71AV1と90%以上のアミノ酸配列同一性を示すP450がアルテミシニン(およびその前駆物質であるアモルファジエン)を生産しないヨモギ属植物にも広く分布することを明らかにした。これらアルテミシニン非産生種から得られたCYP71AV1ホモログをアモルファジエン生産酵母で発現させたところ、*A. annua*からは検出されないアモルファジエン酸化物が得られた。このように、生合成酵素のナチュラルバリエーションを利用することで非天然型セスキテルペノイドを生産することができた。同時に、バリエーション間の配列比較から、CYP71AV1の反応特異性制御に重要なアミノ酸残基の特定、酵素機能改変を行う上で重要な情報が得られた。

以上、植物のトリテルペノイド、セスキテルペノイド生合成に関わる酵素遺伝子のバリエーションを利用した組換え酵母でのテルペノイド生産の例を示した。このような手法により、植物材料からの分離精製や有機化学合成では十分量を得られず生理活性評価が困難であった化合物や非天然型テルペノイドを生産することで新規創薬資源の提供に貢献できるものと考えられる。

1) Seki, H. et al. PNAS, 105: 14204-14209 (2008).

2) 關ら、化学と生物47: 714-716 (2009).

Biosynthetic engineering of prenylated polyphenols as functional small molecules.○Kazufumi YAZAKI
(Res. Inst. Sustain. Humanosphere, Kyoto Univ.)**Key words** prenylated polyphenols, prenyltransferase, biosynthetic engineering, transgenic plant**Microbial synthesis of non-natural terpenoids by exploiting metabolic diversity in plants**○Hikaru SEKI, Toshiya MURANAKA
(Dept. Biotechnol., Osaka Univ.)**Key words** plant, terpenoid, synthetic biology