ゴマ由来ピペリトール／セサミン合成酵素 CYP81Q1 を発現させたシロイヌナズナに含まれるリグナン関連化合物のプロファイリング

大阪大学大学院工学研究科
生命先端工学専攻生物学コース細胞工学領域　　堀　遂人

［背景・目的］

リグナン類とは、植物中で二分子のフェニルプロパノイドが二量体化することによりできる二次代謝産物である。リグナン類に含まれる化合物の中には、制ガン作用や抗酸化作用などの生理的作用を有しているものがあり、機能性食品の素材や医薬品として利用できる可能性がある。その中でもゴマ（Sesamum indicum）種子中に含まれているセサミンは、抗酸化作用（Nakai et al., 2003）や、アルコールの代謝促進（Lee et al., 2004）、脂肪酸代謝の調節（Chen et al., 2005）に代表される有用生理機能をもつことが明らかにされており、機能性食品として利用されている。しかし、セサミンの原料素材として供給可能であるのは、ゴマ油製品類の精製工程での副産物であり、ゴマ油製品類の需要の変動により供給が困難となることが危惧される。また、ゴマ種子中にセサミンなどの有用天然物質は 1%に満たない量しか含有されていない（Ono et al., 2006）。さらに、原材料であるゴマ種子の殆どは輸入に依存している。以上のような事実から、今後、セサミンの需要が増加した場合、安定的な原材料の供給源の確保が課題となる。

この問題に対する解決策として、ゴマ以外のリグナン類高含有植物へ、リグナンの一種であるピノレジノールを起点とするセサミン代謝経路を導入し、さらに、環境条件を最適化した閉鎖型植物工場において、セサミンを大量生産することが考えられる。現在当研究グループでは、閉鎖系植物工場でのリグナン類高含有植物であるレンギョウ（Forsythia suspensa）の遺伝子組換え体を用いたセサミンの大量生産を目指している。セサミンはピノレジノールを前駆体として合成されるため、ピノレジノールを始めとしたリグナン類を多く含んでいるレンギョウに、ゴマ由来ピペリトール／セサミン合成酵素をコードしている遺伝子 CYP81Q1（Ono et al., 2006）を導入、発現させると同時に、競合経路の代謝を抑制させることでセサミンを大量生産できるのではないかと考えている。レンギョウにおけるリグナンの主な代謝経路に関しては、以前から盛んに研究が行われており、CYP81Q1 を導入、発現させることでセサミン生産能を付与したレンギョウの培養細胞による、セサミンの合成にも成功している（Kim et al., 2009）。しかし、リグナンには代謝中間体や類縁体が数多く存在し、その代謝経路も複雑なものと予想され、遺伝子組換え植物を用いたセサミンの大量生産を行うには情報が未だ不十分である。

近年、リグナン類の一種であるラリシレジノールが、シロイヌナズナ（Arabidopsis thaliana）から検出され（Nakatsubo et al., 2008）、モデル植物であるシロイヌナズナ中のリグナン代謝経路の存在が示された。シロイヌナズナはモデル植物として植物の研究分野において幅広く利用されており、ゲノム情報の解読が完了しているだけでなく、遺伝子組換えを簡便に行う手法が確立しているなど、各種実験系が整備されている。以上の理由から本植物をリグナンの研究分野にも適応することができれば、本分野の研究が格段に進歩するものと考えられる。しかし、シロイヌナズナ中のリグナン類は微量であり、関連化合物を網羅的に分析することは困難であった。

そこで本研究では、網羅性があり、かつ微量分析も可能なリグナン類分析系の確立を目的として、高感度検出が可能なキャピラリー LC/ESI/MS によるリグナン分析系の構築を試み、シロイヌナズナに含まれるリグナン関連化合物のプロファイリングを行うことで、シロイヌナズナのリグナン研究への適用を試みた。また、ゴマのピペリトール／セサミン生合成遺伝子 CYP81Q1 を導入したシロイヌナズナ中におけるリグナン関連化合物のプロファイリングを行うことで、ピペリトール／セサミン生合成酵素がリグナン代謝経路に及ぼす影響を明らかにし、植物工場でのセサミンの大量生産に繋がる基礎的な知見を得ることを目的とした。

[方法]

サンプル準備

キャピラリーLC-ESI-IT-MS分析系構築に用いた標準品は、(+)-ピノレジノール（pinoresinol)、(-)-マタイレジノール（matairesinol)、(+)-ラリシレジノール（lariciresinol)、(-)-セコイソラリシレジノール（secoisolariciresinol)、(-)-アルクチゲニン（Arctigenin)、(-)-アルクチン（Arctiin)、エピピノレジノール（epipinoresinol)、ピノレジノールグルコシド（pinoresinol glucoside)、エピピノレジノールグルコシド（epipinoresinol glucoside)、ピノレジノールメチルエーテルグルコシド（pinoresinol methyl ether glucoside)、フィリリン（phillyrin)、フィリゲニン（phillygenin）の11種類のリグナン類を準備した。内部標準物質にはビスフェノールA（bisphenol A）を選択した。UPLC分析系構築に用いた標準品は、上記のリグナン類に加え、セサミン（sesamin）を準備した。

実験に用いたシロイヌナズナは、野生株（Wild)、CYP81Q1発現株（CYPox)、CYP81Q1発現させ、RNAiによりAtPrR1,AtPrR2を抑制させた株（CYPox+PLR-RNAi）の三種類を用いた。それぞれの種子をMS寒天培地に播種し、暗所4℃の条件で2日間処理し、16時間日長の下で3週間育成を行った。育成したサンプルは地上部、地下部に分けて回収し液体窒素で凍結後、凍結乾固を行った。抽出にはメタノールを用い、固層抽出にてサンプルの精製を行った。さらに親水性、孔径0.45μmのメンブレンフィルターでろ過した後、キャピラリーLC/ESI/MSに供した。UPLCに供するサンプルはさらにβ-グルコシダーゼにより全ての配糖体を無糖体に変換して分析を行った。

LC/ESI/MSシステム

キャピラリーLCはUltimate、Swithos II、Famos（LC packings,Amsterdam,Netherlands)、質量分析計はEsquire 3000 plus（Bruker Daltonics, Billerica,MA, USA)を用いた。LCにはプレカラムとして300μm i.d.×5mm、粒子径5μm Inertsil ODS-3 C18 column（Dionex, Sunnyvale,CA,USA）を、カラムにはキャピラリーLC column, 300μm i.d. × 150mm、粒子径3μm Inertsil ODS-3 C18カラム（GL Sciences）を用いた。移動相には蒸留水/アセトニトリル/酢酸（95/5/0.05, v/v/v),(A)、とアセトニトリル/水/酢酸（95/5/0.05, v/v/v),(B)を用いた。流速はCAP-200 splitter（Dionex）を用いて4μl min^{-1}に設定した。サンプルは分析器に1μl注入した.

UPLC蛍光検出器システム

UPLCシステムはACQUITY UPLC（Waters, Milford, MA, USA)、蛍光検出器はACQUITY UPLC FLR Detector（Waters, Milford, MA, USA)を用いた。サンプルは1μlを分析器に注入した。分析用カラムはACQUITY UPLC HSS T3 1.8μm(2.1 × 100mm, Waters, Milford, MA, USA）を用い、カラム温度は40℃に設定した。リグナン分析の溶離液は、水/アセトニトリル/酢酸（95/5/0.05, v/v/v), (A)、とアセトニトリル/水/酢酸（95/5/0.05, v/v/v),(B）を用いた。流量は0.3mLmin^{-1}に設定し、蛍光検出器の励起波長と蛍光波長はそれぞれ280nm,339nmに設定した。一方、セサミン分析の溶離液は、A液に水、B液にメタノールを用いた。流量は0.25mLmin^{-1}に設定し、蛍光検出器の励起波長と蛍光波長はそれぞれ280nm、340nmに設定した。

[結果・考察]

バリデーション

全ての標準品（1pmol）をそれぞれ質量分析器に直接注入し、それぞれの化合物のフラグメントパターンを分析した。ここで得た各化合物のフラグメントパターンを用いて、MRMメソッドを構築した。質量分析器とキャピラリーLCの分析条件を最適化することによって、11種類の化合物を分離することに成功した（**図1**)。溶出時間と最も高かったMS/MSフラグメント（m/z=356）が同じであったために、アルクチゲニンとフィリゲニンを371>356のMRMメソッドで分離することができなかった。しかし、371>295という新たなMRMメソッドを適用することによりアルクチゲニンのみを分析することに成功した。続いて11種類の標準品の混合液を繰り返し分析することで、溶出時間の再現性の確認を行った（n=18)。全ての化合物の相対標準偏差（RSD）は15.6%以下であった（**表1**)。また、シグナル/ノイズ比（S/N）が3となる物質量を検出限界とし、それぞれの化合物の検出限界を分析した結果、本分析系の検出限界が0.5fmol（フィリゲニン）から11.6fmol（マタイレジノール）となった(**表1**)。検量線の直線性を示す相関係数(r^2)は0.9825となり、定量性が高い検量線を作成することができた。

表 1　メソッドバリデーション

Compounds	Transition	Retention time		Dynamic range	LOD	r^2
		min	RSD (%)		(fmol)	
Pinoresinol	357.0 > 150.6	16.7	5.5	10 fmol - 5 pmol	8.7	0.9902
epiPinoresinol	357.0 > 150.6	18.4	5.1	50 fmol - 5 pmol	11.3	0.9940
Matairesinol	357.0 > 209.6	19.5	4.9	50 fmol - 1 pmol	11.6	0.9825
Arctigenin	370.8 > 294.8	23.5	4.0	10 fmol - 5 pmol	4.5	0.9973
Pnoresinol glucoside	518.7 > 356.8	7.7	14.3	10 fmol - 1 pmol	2.7	0.9996
epiPinoresinol glucoside	578.8 > 356.8	8.5	15.6	10 fmol - 1 pmol	2.1	0.9969
Secoisolariciresinol	361.0 > 165.0	10.9	13.9	10 fmol - 1 pmol	4.4	0.9975
Arctiin	592.8 > 370.8	11.1	15.3	10 fmol - 1 pmol	1.6	0.9970
Pinoresinol methylester glucoside	592.8 > 370.8	12.2	14.4	10 fmol - 1 pmol	1.2	0.9995
Phillyrin	592.8 > 370.8	12.7	13.5	1 fmol - 1 pmol	0.5	0.9967
Phillygenin+Arctigenin	370.8 > 355.8	23.1	6.3	10 fmol - 1 pmol	2.0	0.9954
Lariciresinol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

以上の結果から、高感度でかつ定量性の高いリグナン分析系を構築できたことを示している。

シロイヌナズナ中のリグナン関連化合物のプロファイリング

新たに構築した分析系の下で、シロイヌナズナの地上部と地下部にリグナンが含まれているかを分析した結果、MRM を用いることで数種類のリグナン類を検出することに成功した(**図 1**)。標準品との比較の結果、地下部から検出された 6 個のピークはそれぞれピノレジノール、エピピノレジノール、アルクチゲニン、ピノレジノールグルコシド、エピピノレジノールグルコシド、フィリゲニン＋アルクチゲニンであることが分かった。地上部からは 3 個の主要なピークを得ることができ、標準品との比較の結果、ピノレジノールグルコシド、エピピノレジノールグルコシド、フィリゲニンであることが分かった。アルクチゲニンは地上部では 371>295 の MRM メソッドを用いて検出することができなかったため、地上部の Rt=24.4min のピークはフィリゲニンであると考えられる。これら 6 種のリグナン類は、シロイヌナズナから今回新たに検出されたものである（**図 2**)。以上の結果からキャピラリー LC-ESI-IT-MS を用いた新たな高感度分析系によって、シロイヌナズナのようにリグナン類が微量にしか含有されていない植物でも、配糖体と無糖体を同時に検出、定量できることが示された。

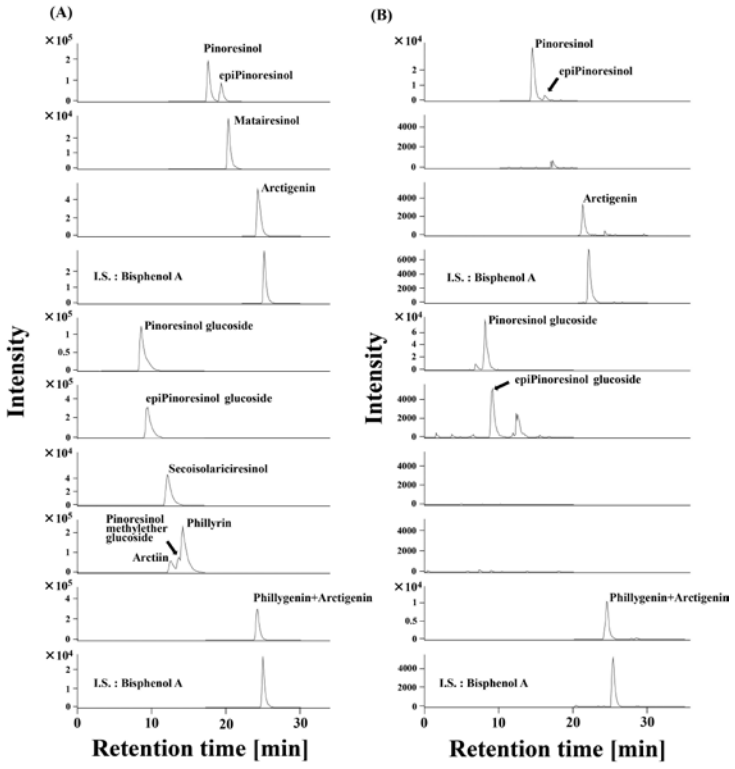

図 1. 標準品とシロイヌナズナ野生株の分析結果。（A）: 標準品のクロマトグラム、（B）: シロイヌナズナ地下部の抽出物のクロマトグラム、内部標準物質としてビスフェノール A を添加している。

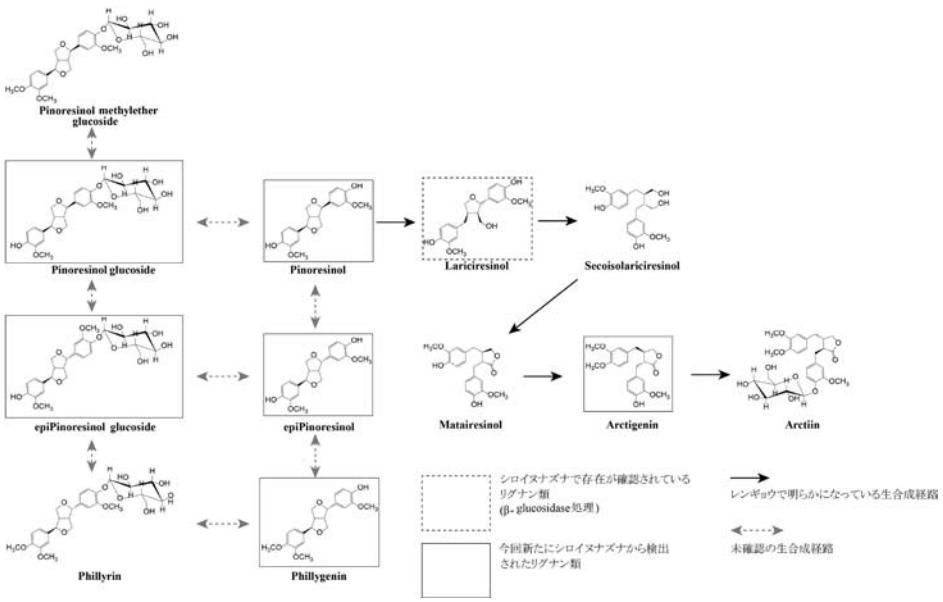

図 2. 今回シロイヌナズナから検出できたリグナン類と，予想されるリグナン代謝経路
実線囲いで示した 6 種のリグナン類が、今回新たにシロイヌナズナから検出された。
本分析系を用いることで、配糖体と無糖体を同時に検出、定量することができる。

セサミンを蓄積するよう代謝改変を行ったシロイヌナズナに含まれるリグナン関連化合物のプロファイリング

シロイヌナズナに CYP81Q1 を導入、発現させることによって、リグナン代謝経路にどのような影響があるかを調べるために、Wild CYPox,CYPox+PLR-RNAi それぞれに含まれるピノレジノール、ラリシレジノール、セサミンの含有量の測定と、ピノレジノールからラリシレジノールの代謝に関わる遺伝子 AtPrR1,2 そしてピノレジノールからセサミンの代謝に関わる遺伝子 CYP81Q1 の発現量解析を行った。

UPLC 蛍光検出器を用いたシロイヌナズナ中のセサミンの分析では、Wild では検出されなかったセサミンのピークが CYPox,CYPox+PLR-RNAi の各ラインで確認することができた（**図 3**）。*CYP81Q1* をシロイヌナズナで発現させることにより、本来シロイヌナズナでは生合成されないセサミンが、シロイヌナズナ内

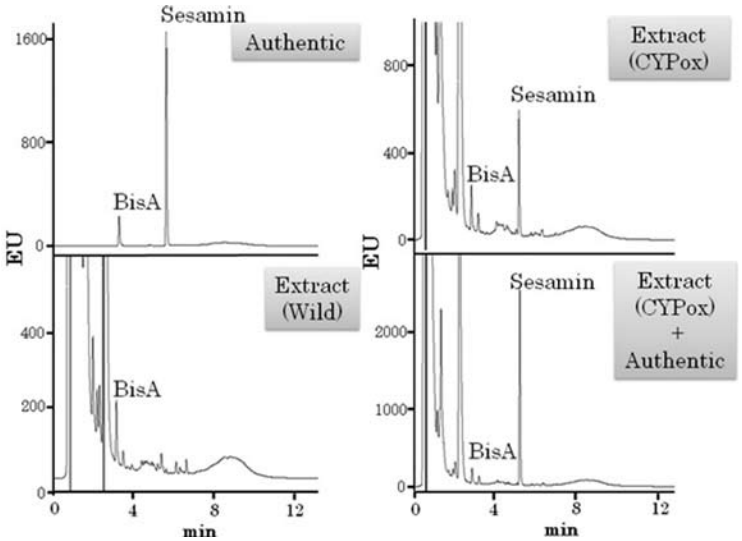

図 3. セサミンの検出。それぞれ標準品、Wild の抽出物、CYPox9 の抽出物、スパイク実験のクロマトグラム。内部標準物質としてビスフェノール A（BisA）を添加し、スパイクを行うことでピーク同定を行っている。Wild では見られなかったセサミンのピークが、CYPox9 のクロマトグラムで確認できる。

のピノレジノールを前駆体として生合成されたと考えられる。

Wild,CYPox,CYPox+PLR-RNAi の AtPrR1,2, と CYP81Q1 の発現量解析の結果、CYP81Q1 を発現させた CYPox では、AtPrR1 の発現量が Wild での発現量の 6~9 倍程度に上昇していた（**図 4**）。一方で、RNAi の効果により CYPox+PLR-RNAi では AtPrR1 の発現量は Wild と同程度まで抑えられていた。CYPox15 と

比較してCYP81Q1が高発現したCYPox9では、より多くのピノレジノールをセサミンへと代謝したことで、CYPox15と比較してセサミンの含有量が高くなり、ピノレジノールの含有量が減少したと考えられる。一方、CYPox+PLR-RNAiの各ラインでは、CYP81Q1の発現量の強弱に関わらず、CYPox9に匹敵するセサミンの蓄積量となった。以上の結果から、シロイヌナズナでCYP81Q1を発現させることによりセサミンを生合成させることができ、さらにPLR-RNAiによってAtPrR1,2を抑制することで、セサミンの含有量がCYP81Q1の発現量に関わらず安定したことから、CYP81Q1を発現させると同時にAtPrR1,2を抑制させることで、安定してセサミンを生産できると考えられる。

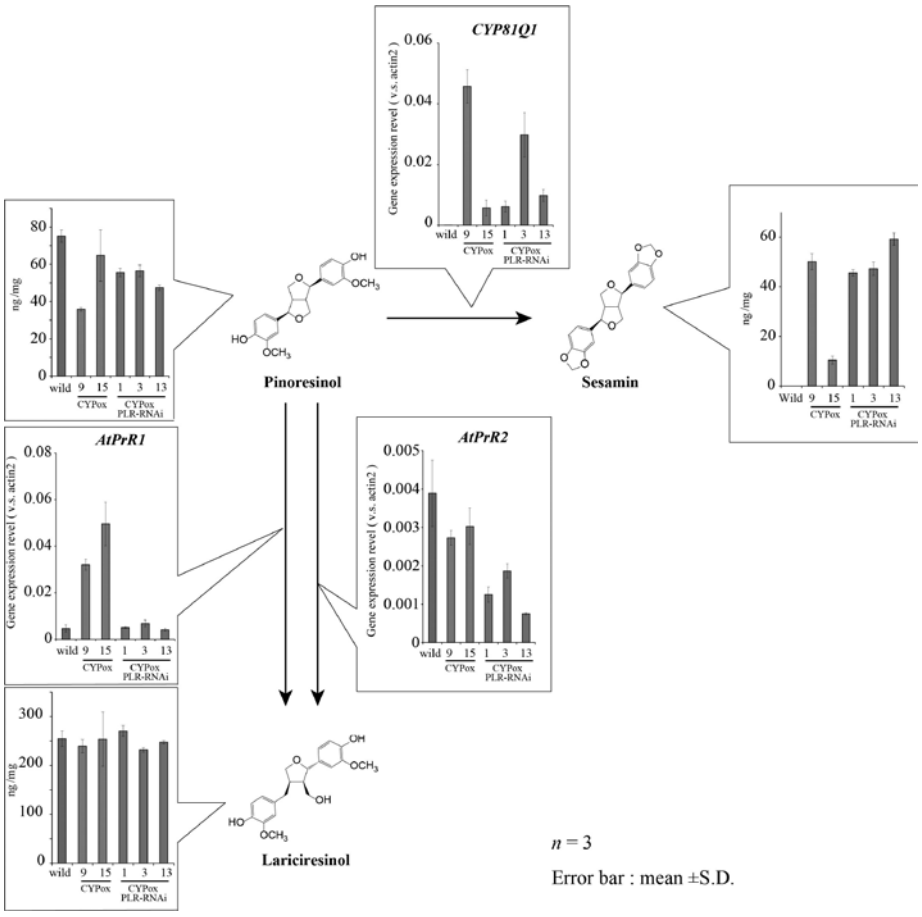

図4. 地下部での各生合成ステップに関わる遺伝子の発現量解析の結果と各化合物の定量結果。
RNAi抑制の効果でCYPox+PLR-RNAiの各ラインのAtPrR1の発現量がCYPoxの各ラインと比較して減少していることから、CYPox+PLR-RNAiではセサミンへと変換されるピノレジノールの量が増加していると示唆される。そのため*CYP81Q1*の発現量の強弱に関わらず、セサミンを高いレベルで安定的に蓄積していると考えられる。

[結論]

今回構築した分析系を用いることで、サンプル量の少ない変異体や遺伝子組換え体であっても、リグナン類の分析を行うことができ、シロイヌナズナをリグナン研究に適用できることが示された。また、CYP81Q1をシロイヌナズナに導入することにより、シロイヌナズナでは本来生合成されないセサミンを合成させることに成功した。さらにCYP81Q1を導入すると同時に、競合する代謝経路を抑制させることにより、安定的にセサミン蓄積させることができた。このことにより、植物中の複雑な二次代謝経路を制御し、植物工場におけるセサミンの大量生産のための重要な知見を得ることができた。また本研究を応用することで、リグナン類を始めとした有用物質の生産に繋がる知見を得ることができると考えられる。

＜参考文献＞

Chen, P. R., K. L. Chien, T. C. Su, C. J. Chang, T.-L. Liu, H. Cheng & C. Tsai （2005） Dietary sesame reduces serum cholesterol and enhances antioxidant capacity in hypercholesterolemia. Nutrition Reserch, 25, 559-567.

Eiichiro Ono, Masaaki Nakai, Yuko Fukui, Namino Tomimori, Masako Fukuchi-Mizutani, Masayuki Saito, Honoo Satake, Takaharu Tanaka, Masumi Katsuta, Toshiaki Umezawa and Yoshikazu Tanaka （2006） Formation of two methylenedioxy bridges by a sesamum CYP81Q protein yielding a furofuran lignan, （+）-sesamin. The National

Academy of Sciences of the USA, 103, 10116-10121.
Kim, H. J., E. Ono, K. Morimoto, T. Yamagaki, A. Okazawa, A. Kobayashi & H. Satake (2009) Metabolic engineering of lignan biosynthesis in Forsythia cell culture. Plant and Cell Physiology, 50, 2200-2209.
Lee C.-C., P.-R. Chen, S. Lin, S.-C. Tsai, B.-W. Wang, W.-W. Chen, C. E. Tsai & K.-G. Shyu (2004) Sesamin induces nitric oxide and decreases endothelin-1 production in HUVECs: possible implications for its antihypertensive effect. Journal of Hypertension, 22, 2329-2338.
Nakai M., M. Harada, K. Nakahara, K. Akimoto, H. Shibata, W. Miki & Y. Kiso (2003) Novel antioxidative metabolites in rat liver with ingested sesamin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 1666-1670.
Nakatsubo, T., M. Mizutani, S. Suzuki, T. Hattori & T. Umezawa (2008) Characterization of Arabidopsis thaliana pinoresinol reductase, a new type of enzyme involved in lignan biosynthesis. The Journal of Biological Chemistry, 283, 15550-15557.

不二製油株式会社
品質保証部
食品安全分析センター
危害物質分析法開発担当

（応用生物　平成 20 年卒業　22 年前期）

平成 22 年度『大阪大学工業会賞』受賞者決定

平成 22 年度大阪大学工業会賞の審査委員会（委員長：藤井宏一副会長）が 3 月 15 日に開催され、以下の方々の受賞が決定しました。

早川　純平　応用自然科学分野（応用化学専攻）
テーマ：「クロラミン塩と単体ヨウ素によるオレフィン類の立体および位置選択的な水系ヨードアミド化」
指導教員：南方　聖司　先生

吉村　英敏　環境・エネルギー工学分野（環境・エネルギー工学専攻）
テーマ：「生体組織内分子のイメージングに向けたレーザーイオン化顕微質量分析技術の開発」
指導教員：粟津　邦男　先生

秀川　貴彦　地球総合工学分野（地球総合工学専攻）
テーマ：「杭－地盤系の非線形性を考慮した杭基礎建物の地震応答性状」
指導教員：宮本　裕司　先生

古川　直樹　応用理工学分野（マテリアル生産科学専攻）
テーマ：「OMVPE 法による Eu 添加 GaN の大気圧成長と高輝度赤色発光ダイオードへの応用」
指導教員：藤原　康文　先生

長谷川 大介　応用自然科学分野（生命先端工学専攻）
テーマ：「並行複発酵によるバイオエタノール生産を目指した高温耐性酵母 Tj14 の発酵性能評価」
指導教員：原島　俊　先生

応募者には、工業会が指定したキーワード［22 年度：「グローバル化に対する若者の役割」］について 1,000 字以内にまとめていただき、併せて選考資料といたしました。