

マングローブ由来の有用テルペノイド 生合成関連酵素の同定

大阪大学大学院工学研究科

生命先端工学専攻 細胞工学領域

中村 美月

1. 背景と目的

マングローブは熱帯や亜熱帯の塩性湿地に生息する植物の総称であり、現地では古くから民間薬として用いられているものも多い。しかしこれらが含有する個々の代謝産物の生理活性や、植物体中において有用成分がどのように合成されるのかについての研究はほとんどされていない。

Figure 1. *Avicennia marina*

Xuan Thuy 国立公園 (ベトナム) のマングローブ自生地にて撮影。

マングローブ種のひとつに、*Avicennia marina* がある (Figure 1)。*A. marina* が生息する沿岸国では、木材やタンニン、樹脂、飼料や薬などの材料として利用されてきた。薬の用途としては、リウマチや梅毒、潰瘍などの治療が挙げられる^{[1][2][3]}。

これまで、*A. marina* からはさまざまな代謝物が検出されている。また、近年の研究では、本植物の葉抽出物が薬理効果を示すことが報告されている。例えば、抗炎症作用、抗ウイルス作用、抗がん作用、抗糖尿病作用、抗アンドロゲン作用といったものである^{[4][5][6][7][8]}。しかし、こういった化合物に起因してこれらの薬理効果が示されたのかはほとんど未解明であった。

ところで、植物が産生する代謝産物は他の生物に比べて著しく多様である。それらは一次代謝産物と特化代謝産物に大別される。特化代謝産物のグループのひとつとして、テルペノイドが知られている。炭素数5であるイソプレン単位の倍数を基本骨格としており、なかでも、イソプレン単位6つからなる鎖状化合物である2,3-オキシドスクアレンが多様な環化様式で環化した後、様々な修

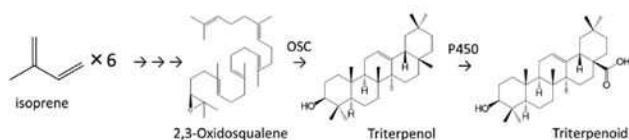
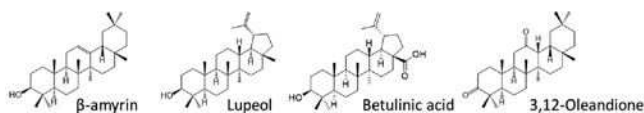


Figure 2. トリテルペノイド生合成の概略図

飾を受けて生成する化合物はトリテルペノイドと呼ばれる。それらの環化反応にはオキシドスクアレン環化酵素 (OSC) が、酸化修飾反応にはシトクロム P450 モノオキシゲナーゼ (P450) が関与している (Figure 2)。これまでトリテルペノイドはさまざまな薬理効果を示すことが報告されており、*A. marina* について先に述べた薬理効果にもトリテルペノイドが関与している可能性がある。現に、*A. marina* に β -アミリンやベツリン酸といったトリテルペノイドが含まれていることが報告されている (Figure 3)^[9]。しかし、*A. marina* が生成するトリテルペノイド、および、それらの生合成経路やそれに関与する酵素遺伝子については多くが明らかになっていないままである。

こういった背景から、本研究では *A. marina* が産生するトリテルペノイドのプロファイリング、および、それらの生合成に関与している P450 の同定を目的とした。

Figure 3. *A. marina* から検出されているトリテルペノイド
先行研究において *A. marina* から検出されたトリテルペノイド。

2. 実験方法

(a) *A. marina* に含まれるトリテルペノイドの分析

ベトナム、ハノイ近郊のマングローブ自生地にて6月に採取した植物サンプルの葉抽出物をガスクロマトグラフィー質量分析装置 (GC-MS) で分析し、含有されているトリテルペノイドのプロファイリングを行った。

(b) 有用トリテルペノイドの生合成に関与する酵素の同定

上記の葉サンプルから RNA を抽出し、発現遺伝子データベースを作製した。それを基に、トリテルペノイドの生合成に関与していると考えられる候補 P450 遺伝子を選抜した。これらの酵素機能を確認するため、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) が内在産生する 2,3-オキシドスクアレンを基質として利用した P450 の機能評価系を構築した (Figure 4)。選抜した P450 遺伝子を OSC と共に酵母に導入し、酵母細胞内で各種トリテルペン骨格に対する酵素活性を評価できるようにしたものである。この系を用いて生産された化合物を GC-MS で分析した。

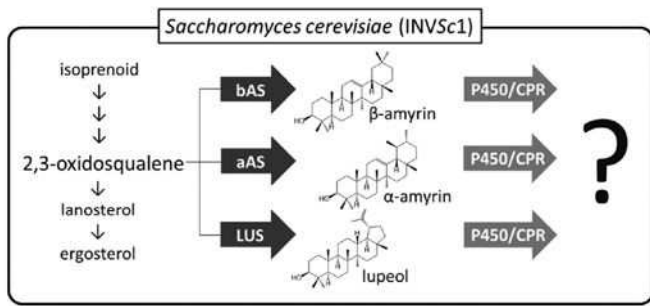


Figure 4. 本実験で用いたトリテルペノイド生産系の概観図
bAS: β -amyrin synthase, aAS: α -amyrin synthase, LUS: Lupeol synthase, CPR: Cytochrome P450 reductase

3. 結果と考察

(a) *A. marina* に含まれるトリテルペノイドの分析

トリテルペノイド分析の結果、 β -アミリン、 α -アミリン、ルベオール、エリスロジオール、ウバオール、ベツリン、オレアノール酸、ベツリン酸、ウルソール酸、マスリン酸、コロソリン酸が *A. marina* の葉から検出された (Figure 5)。

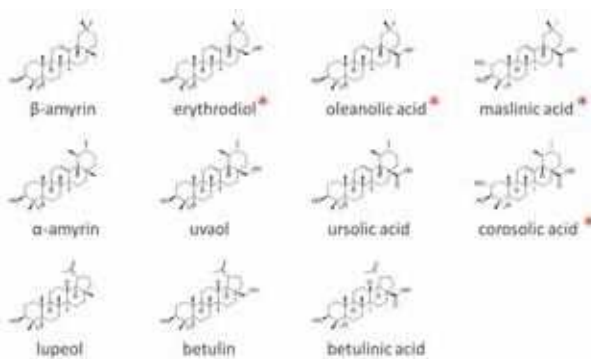


Figure 5. *A. marina* の葉から検出されたトリテルペノイドプロファイリングの結果検出された11種類のトリテルペノイドの構造式。
*本研究で初めて検出された化合物。

今回初めて検出されたもののうち、マスリン酸は、先行研究においてリウマチの治療に効果を示すことが報告されている^[10]。先に述べたように、*A. marina* は民間薬としてリウマチの治療に使われてきたという報告がある。加えて、関節リウマチの疾患モデルラットを用いた先行研究において、*A. marina* の葉の抽出物が関節リウマチの症状を緩和したという報告もある^[7]。これらの先行研究と、本研究の結果より、*A. marina* 抽出物のリウマチに対する薬理効果の少なくとも一部はマスリン酸に起因すると考えられる。

コロソリン酸は“植物インスリン”とも呼ばれ、抗インスリン抗体を増加させることなくインスリン様の機能を示すことが報告されている^[11]。インスリンは糖尿病の治療に用いられているが、抗インスリン抗体の増加による副作用が問題となっている。コロソリン酸はこういった副作用の問題を解決するものとして近年注目されている。*A. marina* の葉の抽出物もまた、糖尿病モデルラットを用いた先行研究において抗糖尿病の作用を示すことが

報告されている^[4]。これらの先行研究と、本研究の結果より、*A. marina* 抽出物が示す抗糖尿病作用の少なくとも一部はコロソリン酸に起因すると考えられる。

(b) 有用トリテルペノイドの生合成に関与する酵素の同定

A. marina の RNA を用いて作製した遺伝子データベースから、5つの候補P450遺伝子、*CYP716A259*、*CYP716A260*、*CYP716C53*、*CYP716C54*、*CYP716D59* を選抜した。これらの酵素機能を検証したところ、*CYP716A259* と *CYP716C53* の2つが酵母細胞内で Figure 6 に示すトリテルペン酸化反応を触媒し、マスリン酸およびコロソリン酸を生成することが判明した。葉抽出物の分析で検出された化合物と、*CYP716A259* および *CYP716C53* によって酵母内で生成する化合物が一致することから、これらの酵素が *in planta* においてもマスリン酸およびコロソリン酸の生合成に関与していることが強く示唆される。

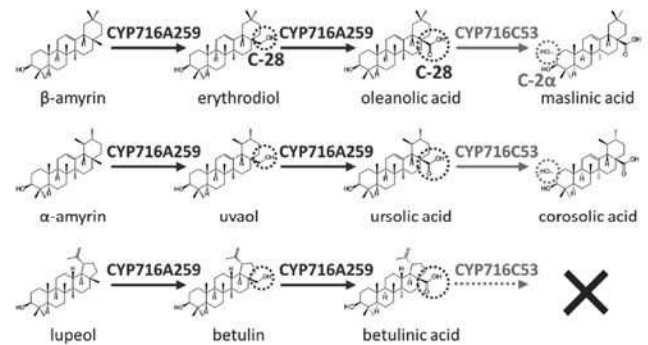


Figure 6. *CYP716A259* および *CYP716C53* が触媒する反応

4. 謝辞

本研究は、ベトナム科学技術アカデミー (VAST) との共同研究として実施しました。

また、本研究の一部は、JSPS 二国間交流事業共同研究 (ベトナム) (2015-2017年度)、「熱帯植物由来テルペノイドの有用機能評価と生産系構築に向けた基盤研究」の援助をうけて行ないました。

本研究を行うにあたり、ご指導やご鞭撻を賜りました村中俊哉教授、關光准教授、福島エリオデット准教授、および、ご協力いただいた皆様に心より御礼申し上げます。

投稿論文

Nakamura, M., Tran, M.L., Le, Q.L., Suzuki, H., Nguyen, C.M., Vu, H.G., Tamura, K., Nguyen, V.T., Suzuki, H., Misaki, R., Muranaka, T., Ninh, K.B., Fujiyama, K., and Seki, H. (2018) Transcriptome sequencing and identification of cytochrome P450 monooxygenases involved in the biosynthesis of maslinic acid and corosolic acid in *Avicennia marina*. *Plant Biotechnology* 35, 341-348.

参考文献

- [1] Bandaranayake, W.M., *Mangroves and Salt Marshes*, 2: 133-148 (1998)
- [2] Pattanaik, C. et al., *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 7: 598-603 (2008)
- [3] Thatoi, H. et al., *Front Life Sci.*, 9: 267-291 (2016)
- [4] Babuselvam, M. et al., *WJPR*, 3: 11-18 (2013)
- [5] Beula, M. et al., *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 1: 570-573 (2012)
- [6] Jain, R. et al., *Molecules*, 19: 6809-6821 (2014)
- [7] Shafe, M. et al., *Bull. Environ. Pharmacol. Life Sci.*, 2: 32-37 (2013)
- [8] Sukhramani, P.S. et al., *Pharm. Sin.*, 4: 125-130 (2013)
- [9] Basyuni, M. et al., *Journal of Oceanography*, 63: 601-608 (2007)
- [10] Fukumitsu, S. et al., *Mol. Nutr. Food Res.*, 60: 399-409 (2016)
- [11] Sivakumar, G. et al., *Biotechnol. J.*, 4: 1704-1711 (2009)



株式会社コスモスモア
ファシリティ事業部

オフィス内装工事のプロジェクト
マネジメントや施工管理に従事。