

グアイアノライドセスキテルペンラクトン生産酵母の作出

關 光

大阪大学大学院 工学研究科

研究の目的

セスキテルペノイドは3つのイソプレン単位からなるファルネシルニリン酸 (FPP) を共通前駆体とするテルペノイドの一群で、その構造多様性はテルペノイドの中で最大、かつ多くの有用化合物を含む。Guaianolide Sesquiterpene Lactones (GSL) は、5員環-7員環-ラクトン環が縮合した基本構造を持つ植物セスキテルペノイドの一群であり、抗ガン剤として使用される Arglabin などを含む。がん幹細胞に対する選択的な細胞毒性を発揮する化合物は非常に少ないが、幾つかの GSL は急性骨髄性白血病幹細胞に対する選択的な細胞毒性を発揮するため医薬品リード化合物として注目されている¹⁾。しかしながら、その構造は複雑なため植物から抽出した前駆体からの半合成により供給されている。そこで本研究では、組換え酵母を用いた GSL の微生物生産に向けた基盤研究として、組換え酵母内における GSL 生合成経路の再構築に利用可能な GSL 生合成酵素遺伝子を取得すべく、植物トランスクリプトームデータから候補となる酵素遺伝子を探索し、その機能を同定することを目的とした。

方法

組換え酵母細胞内に再構築しようとする GSL 基本構造の生合成経路を図1に示す。

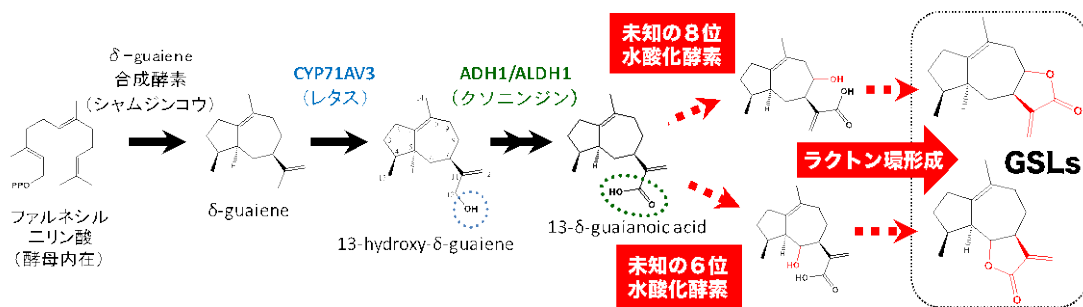


図1. 生合成酵素遺伝子導入による GSL 生合成経路再構築の概念図

セスキテルペン環化酵素、シトクロム P450 モノオキシゲナーゼおよび2種のデヒドロゲナーゼ遺伝子の導入により酵母内在のファルネシルニリン酸から δ -guaianic acid を生成する経路を構築した。

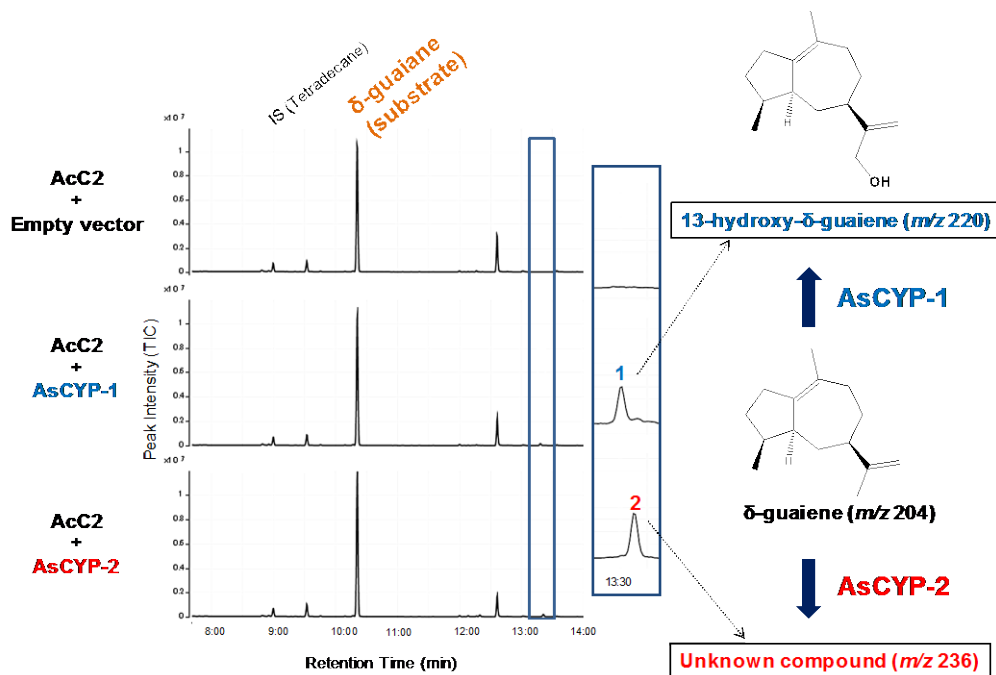
すでに単離されていたシヤムジンコウ由来セスキテルペン環化酵素 (δ -guaiene 合成酵素)、レタス由来シトクロム P450 モノオキシゲナーゼ (CYP71AV3)、クソニンジン由来アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH1) およびアルデヒドデヒドロゲナーゼ

(ALDH1) を組換え酵母内で同時発現させることで δ -guaiene の 13 位選択的にカルボキシ基を導入し GSL 生合成中間体と推定される δ -guaienoic acid を生成することに成功した (図 1)。そこで、未同定の酸化酵素により δ -guaiene の 6 位あるいは 8 位に水酸基を導入できれば、分子内のヒドロキシ基とカルボキシ基の脱水縮合によるラクトン環形成が進行し GSL の基本構造を生成できると予想した。目的とする δ -guaiene の 6 位あるいは 8 位水酸化酵素の候補遺伝子のソースとして、GSL を産生し、かつ、公開トランスクリプトームデータ (発現遺伝子の配列および発現パターンの網羅的情報) が得られるシナジンコウ (*Aquilaria sinensis*) を選定した。得られた配列データから、GSL を産生すると予想される組織において転写量の多いシトクロム P450 遺伝子を選抜した。選抜した候補 P450 遺伝子を人工合成し酵母発現コンストラクトを作成した。これらの候補 P450 遺伝子を δ -guaiene 合成酵素遺伝子とともに FPP 高生産酵母株に導入し発現させた。ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) により、組換え酵母株の代謝物を分析し候補 P450 が δ -guaiene に対する酸化活性を示すかを評価した。

結果

A. sinensis のトランスクリプトーム解析に関する 3 つの論文のデータベースを使用した。Ye らは、ギ酸処理した *A. sinensis* の幹から、white wood part、the transition part between agarwood and white wood、the agarwood part (セスキテルペノイドを多く蓄積する部分) および rotten wood part をサンプリングしトランスクリプトーム情報を取得している²⁾。Wang らは、塩ストレス処理したカルスにおけるトランスクリプトーム情報を取得している³⁾。Xu らは傷処理した茎のトランスクリプトーム情報を取得している⁴⁾。これらの塩基配列情報を Sequence Read Archive からダウンロードし、統合後アセンブルすることによって Contig 配列と同時に、各遺伝子の発現量の指標となる fragments per kilobase of exon per million reads mapped (FPKM) 値の情報を得た。上記の統合データベースから候補遺伝子の探索を行った結果、GSL 生合成が最も活発に行われていると予想される agarwood part において著しく発現が増高 (300~1600 倍) する 5 種のシトクロム P450 を見出した (以後、AsCYP-1 から 5 とする)。これらの遺伝子を人工合成し δ -guaiene を生産するように改変した出芽酵母に導入後、培養液の溶媒抽出物を GC-MS 分析に供した結果、2 種の P450 が δ -guaiene に対する酸化活性を示すことが判明した。そのうち 1 種 (AsCYP-1) は、 δ -guaiene の 13 位の水酸化酵素である事が判明した。もう一方の P450 (AsCYP-2) については、その反応生成物の構造は未確定であるものの、生成物の質量から δ -guaiene の 2 箇所を酸化する活性を示すと推測される (図 2)。

図 2. δ -guaiene 合成酵素と候補 P450 を共発現する酵母の代謝物分析



AcC2 (δ -guaiene 合成酵素) と候補 P450 を共発現する酵母培養液の溶媒抽出物を GC-MS で分析した。新たな δ -guaiene 派生物 (ピーク 1 およびピーク 2) が検出された。

結論

今回、目的とする δ -guaiene の 6 位あるいは 8 位水酸化酵素の候補遺伝子のソースとして *A. sinensis* に着目し、GSL 合成が最も活発に行われていると予想される agarwood part において著しく発現が増高する 5 種のシトクロム P450 を見出した。その内、2 種が δ -guaiene に対する酵素活性を示し、13-hydroxy- δ -guaiene あるいは構造未同定の δ -guaiene 派生物を生成することが判明した。今後、生成物の単離・精製・構造決定を行う必要がある。結論として、本研究では、目標である組換え酵母における GSL 生成には至らなかった。しかしながら、 δ -guaiene に対する酸化活性を示した 2 種の P450 はいずれも CYP71 ファミリーに属する P450 と考えられることから、今後、*A. sinensis* 以外の GSL 生産植物からも相同遺伝子をさらに探索することで、目的とする活性を示す P450 遺伝子を取得できる可能性が高い。

文献

- 1) Zhang, Q., et al. (2012) Guaianolide sesquiterpene lactones, a source to discover agents that selectively inhibit acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *J. Med. Chem.* **55**:8757-8769.
- 2) Ye, W., et al. (2016) Transcriptome sequencing of chemically induced *Aquilaria*

sinensis to identify genes related to agarwood formation. *PLOS ONE*. **11**:e0155505.

- 3) Wang, X., et al. (2016) Salinity stress induces the production of 2-(2-phenylethyl)chromones and regulates novel classes of responsive genes involved in signal transduction in *Aquilaria sinensis* calli. *BMC Plant Biology*. **16**:119.
- 4) Xu, Y., et al. (2013) Identification of genes related to agarwood formation: transcriptome analysis of healthy and wounded tissues of *Aquilaria sinensis*. *BMC Genomics*. **14**:227.