

論文審査の結果の要旨

氏名：藤 佑志郎

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：ゴマ草におけるフェニルエタノイド配糖体の局在部位と生合成機構の解明

審査委員：（主 査） 教授 松藤 寛

（副 査） 教授 窪田 聡

（副 査） 教授 青木 俊夫

ゴマ(*Sesamum indicum* L.)は、ゴマ科ゴマ属の一年生の草本で、アフリカやアジア、南米の熱帯から亜熱帯地域において広く栽培されている。葉は、アフリカやアジアでは一部食用として、または痛み緩和の伝承薬として利用されているが、ゴマは利用価値の高い種子の供給を目的として栽培されており、葉などは大量の農業廃棄物のため、ゴマ葉へ注目は低く、報告例も極めて少ない。このような中、わが国でも健康志向と相まって、ゴマ若葉の粉末が健康食品素材として市場に出回るようになった。ゴマ若葉粉末はポリフェノールを豊富に含む(1.3–1.8%)とされるが、その成分は不明であることから、当研究室ではその分析化学的研究に取り組み、主要ポリフェノールはアクテオシド(Act; 1.2%乾燥重量)であることを見出した。

Act は、C6-C2 のグルコース配糖体を基本骨格とするフェニルエタノイド配糖体(PhGs)であり、多くの薬用植物に含まれる。PhGs は様々な薬理作用をもち、医薬品としての利用が期待されているが、代表的な PhGs の Act でさえ、大量生産系が確立されておらず、疾病治療に用いるための量産化が課題となっている。化学合成や高含有植物を用いたバイオ生産研究はあるものの、Act の特異的な構造のため、化学合成は多段階のステップが必要で低収率であり(15 ステップ, 4.4–7.1%)、バイオ生産も生合成関連遺伝子や酵素が不明なため、効率的な高生産細胞株が入手できず、生産量が少ない(160 mg/L)。生産性の低い細胞では、関連遺伝子や酵素の発現量が低く、また夾雑物由来の妨害により、詳細な生合成経路の解明が困難になっていると予想される。

研究を進めていく中で、ゴマ草は優れた Act 生産能をもつことが判明したことから、本研究では、ゴマ草とその培養細胞を用い、未だ不明な Act 生合成経路を、メタボローム解析やトランスクリプトーム解析、酵素活性試験を通して、明らかにすることとした。

第 1 章 ゴマ若葉に含まれる機能性成分の同定と抗酸化及び抗糖化活性

先行研究にて、Act 以外の HPLC で検出される成分の詳細は不明であった。そこで、各成分のスペクトル解析及び旋光度測定を行い、Act(P5)以外に、3 種のイリドイド類(I1, I2, I3)、7 種のポリフェノール類(P1, P2, P3, P4, P6, P7, P8)の化学構造を明らかにした。このうち、I1, I3, P2, P8 は *Sesamum* 属から初めて見出され、P3 は報告例のない新規化合物であった。2013 年

から 2016 年にかけて同一種子(Myanmar Black Sesame)を異なる地域で栽培したゴマ若葉中の含量分析の結果，産地や年度で含量は異なるが，**I1**(0.29–1.75%)，**I2**(0.38–0.87%)，**I3**(0.04–1.07%)，**P4**(0.01–2.05%)，**P5**(0.13–4.86%)が主成分であり，さらに同定した全成分の抗酸化活性と抗糖化活性を調べた結果，Act がゴマ若葉の主活性成分であることを明らかにした．含有されるポリフェノールやイリドイド成分が判明したことから，今後これら化合物が有する機能に基づいた，ゴマ若葉の新たな機能性の解明並びに関与成分が明示された食品の開発が期待される．

第 2 章 ゴマ草の栽培とストレス環境における葉中 Act 含量の変化

これまでは九州や島根県の圃場から乾燥試料を入手していたため，新鮮試料の入手や厳密な実験条件設定に制約があったが，2015 年より本学部生命農学科窪田教授の指導の下，日大農場でのゴマ草の栽培が可能となった．植物ポリフェノールは環境ストレス下で含量変化が起こることから，まずゴマ草栽培中の根に冷却ストレスを与えることによる Act 含量の変化について検討した．5 月～8 月にかけて無加温区(根域平均温度 32℃)と冷却区(根域平均温度 27℃)で栽培した結果，草丈約 30 cm のゴマ葉中の Act 含量は，無加温区(6.62±2.5%)と比べて冷却区(9.65±0.91%)で有意に増加した．しかし，冷却区では，地上部での伸長抑制や葉面積の縮小，主根の肥大化が観察された．このような形態変化は水分不足の乾燥ストレスがかかるときに起こることから，次いで水撒きの際の水分量を調節し，乾燥ストレスによる葉中 Act 含量の変化を検討した．土中水分量の指標である pF 値が一定(pF2.0：適度な水分量，pF2.2：軽度な乾燥ストレス，pF2.4：重度な乾燥ストレス)となるように水撒きを行い，また植物が乾燥ストレスに晒された際に，水分蒸散を抑えるために気孔を閉鎖するときに分泌される植物ホルモンのアブシジン酸も同時に分析した．結果，アブシジン酸量は pF2.2 試験区と pF2.4 試験区の両試験区で有意に増加したのに対して，Act 含量は pF2.4 試験区でのみ有意に増加した．試験区の細かい設定が困難であり，アブシジン酸誘導との相関関係は不明であるが，乾燥ストレスによって Act 含量は増加することが判明した．

第 3 章 生育段階における葉中 Act 含量の変化とゴマ草中の Act の局在部位

食品利用されるゴマ若葉は，播種後およそ 40–60 日(草丈 30–70 cm)の柔らかい葉のときに摘み取り利用される．一方，およそ 90 日(草丈 70–90 cm)で花が咲き，120–150 日(草丈 90–130 cm)で成熟した種子を形成する．そこで，草丈約 10 cm の幼若期から成熟種子を形成する草丈約 125 cm までを 6 段階に分け(それぞれ $n=9$)，生育段階における葉中 Act 含量の変化について検討した(2016 年 5–8 月栽培)．結果，生育とともに葉中 Act 含量は増加し，開花時期である第 4 ステージ(74.7±9.7 cm)で Act 含量が 12.9%と最大となり，その後減少した．Act を 12%以上も含む植物は報告例がなく，ゴマは Act を高生産する稀有な植物であることが判明した．

Act は，20 科 77 属 150 種以上の薬用植物に存在し，植物によって葉，根，茎，花など局在部位が異なる．そこで，ゴマ草を再度栽培し(2017 年 6–8 月)，葉部(葉身と葉柄)，莖部(表皮，表層，維管束)，根部，花部，未熟種子および成熟種子中の Act 及び前駆体を HPLC 及び LC-MS/MS

にて分析した。結果、Act は葉身(12.3%)、葉柄(3.1%)、花(2.7%)に存在し、その他の器官では痕跡量(<0.003%)もしくは未検出であった。従って、ゴマ草では葉が Act を最も蓄積する器官であることが判明した。また、葉柄から葉身にかけて増加したことから、葉柄及び葉身内で Act は合成され、葉に蓄積すると考えられた。カテコール構造をもつ化合物を蛍光染色して存在部位を可視化できる DPBA(diphenylborinic acid 2-aminoethyl ester)を用いて、葉を蛍光染色し、蛍光顕微鏡で観察したところ、Act-DPBA 複合体に由来する青色蛍光体が葉脈と葉全体に存在するトライコーム(毛状突起)に観察された。以上のことから、ゴマ葉中の Act は、葉柄及び葉身内で合成され、葉脈を通してトライコームに蓄積することを初めて明らかにした。一方、多くの Act を合成するにもかかわらず、前駆体はいずれの器官においても検出されなかった。そこで、Act の生合成機構の解明を試みることにした。

第 4 章 ゴマ培養細胞株を用いた Act 生合成機構の解明

ゴマ草は夏場にかけてしか栽培できないため、新鮮葉を用いる検討には限界がある。そこで、本学部応用生物科学科の青木教授、明石准教授の指導の下、ゴマ葉の組織培養を試みた結果、ゴマ葉中に存在するイリドイドやフラボノイド類は生産せず、Act を優先的に生産する培養細胞株を確立できた。さらに、様々なストレス誘導に関連した既知のエリシター5種を用いて、Act 生産量に及ぼす影響を調べた結果、傷害ストレスで誘導されるジャスモン酸メチル(MeJA)の添加で Act 生産量が処理 72 h 後に 5.5 倍増加することが判明した(0 h, 36.2 mg/L; 72 h, 199.6 mg/L)。他の夾雑物の影響を受けずに、Act 生合成関連酵素遺伝子のみが高発現誘導されていると考えられたことから、RNA-seq 解析に供した。得られた配列データについて、CLC Genomics Workbench による *de novo* アセンブリを行い、62,008 の Contig を得た。増加した Contig の抽出及び Blast 解析を行った結果、Act 推定経路における Tyr 代謝経路、Phe 代謝経路の関連酵素遺伝子が見出され、さらに配糖体化に関わる UDP-グルコーストランスフェラーゼ(UGT)と思われる候補遺伝子が 5 つ選抜できた。UGT は PhGs の基本骨格を形成する重要な酵素であるが、Act 生合成経路においては見出されていない。UGT は糖供与体と糖受容体の基質特異性に加え、受容体のどの位置に配糖体化するかという結合位置の特異性も有する。そのため、数多くの酵素遺伝子が存在し、種々の配糖体を生じる細胞を用いた場合、無数の UGT 候補遺伝子が見つかり、結果的にどの候補遺伝子が Act 生合成に関わっているのか不明となる。本ゴマ培養細胞株においてはこれが 5 つに絞り込まれた。酵素活性試験法は確立できていることから、今後クローニングを行い、得られる 5 つの発現酵素の機能解析を行う予定である。また、酵素や関連遺伝子が特定できれば、阻害剤やノックアウト実験により、Act 生合成経路の完全解明が可能になることが期待される。

本研究により、ゴマ若葉中の 3 種のイリドイドと 8 種のポリフェノールが同定され、主要な抗酸化及び抗糖化成分は Act であること(第 1 章)、ゴマ若葉の栽培で根域冷却及び乾燥ストレスを与えることで、葉中 Act 含量を増加させることが可能であること(第 2 章)、生育とともに葉中

Act 含量は増加し、花が咲く第 4 ステージで葉中含量が最大 12%以上となり、ゴマ草は Act を高生産する稀有な植物であること、また葉が Act の局在部位であり、葉柄及び葉身で合成され、トリコームに蓄積することを見出した(第 3 章)。さらに、Act を優先的に生産するゴマ培養細胞株を確立し、MeJA 処理で Act を高生産できること、トランスクリプトーム解析により、Act の骨格形成に重要な配糖体化酵素の存在を見出すことに初めて成功し、生合成機構の一端を解明した(第 4 章)。

以上、本論文は、分析化学、栽培科学、分子細胞生物学的アプローチによって、ゴマ草に含まれる Act の局在部位と生合成経路を明示したものであり、関与成分を明示したゴマ若葉健康食品や Act 高含有食品の開発、生合成機構解明による Act や他の PhGs の大量バイオ生産システムの構築と、それによる Act や PhGs の医薬品としての利用やリード化合物の創出といった創薬研究、加えて、なぜ多くの薬用植物中に特異的な構造の Act が広く存在するのかという化学系統分類学的疑問が解決されるなど、様々な研究への発展が期待される。

よって本論文は、博士（生物資源科学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成 31 年 2 月 21 日