

## 論文の内容の要旨

氏名：平 賀 靖 英

博士の専攻分野の名称：博士（薬学）

論文題名：

### メタボローム解析技術による植物二次代謝産物の代謝経路の探索

種子植物（顕花植物）は、地球上に 22 万～26 万種存在すると考えられ、地球上の植物成分の総数は、約 100 万個存在すると見積もられている [1]。調査された植物種が全体の 10%未満（約 3 万 1 千種）である事を考慮すると、地球上には、まだ人類が知らない植物成分が多く存在する可能性を秘めている。また、新薬の約 6 割は天然有機成分からの構造情報を利用している調査結果を考慮すると、今後、未利用の植物種から新規の機能性（生理活性）成分の発見が期待される [2]。

質量分析機器（MS）或いは核磁気共鳴機器（NMR）を用いたメタボローム解析技術（網羅的な成分解析）は、天然物化合物の探索、生合成経路の発見及び生理機能の研究に革新的な影響（変化）を与える技術として発展してきた。そして、現在、多くの研究者がメタボローム解析技術に注目して利用している。

本研究では、植物二次代謝産物を網羅的に研究可能な LCMS（液体クロマトグラフィー連結型質量分析機器）を用いて、モデル植物および実用植物でメタボローム解析を行った。LCMS は従来、植物成分のターゲット分析（目的成分を決める分析）に用いられてきたが、それとは全く異なる視点から LCMS を活用した結果、植物由来の機能性二次代謝産物の代謝経路の探索の成果報告（3 例）が得られたので、ここに報告する。

#### (1) ヒメツリガネコケ (*Physcomitrella patens*) の LCMS メタボローム解析によるルテオリンの検出 (図 1) [3]

コケ植物は、最も初期に出現した陸上植物（非維管束植物）であり、太陽の紫外線から自身を保護（フリーラジカル産生の防御機能）するために、抗酸化作用を有する二次代謝産物であるフラボノイドの生合成経路を進化の過程で獲得したと考えられている。ヒメツリガネコケ (*Physcomitrella patens*) は、ゲノム解析され、無菌培養、遺伝子操作の確立が進んでいるモデルコケ植物である。*P. patens* の紫外線応答に関しては、ケルセチン誘導体および未知の代謝産物の蓄積が報告されている程度で、網羅的なフラボノイドプロファイリング解析は行われていなかった。そこで本研究では、高精度・高分解能を誇る LC-Orbitrap-MS を用いたメタボローム解析を行った。*P. patens*（英国 Gransden Wood 株）の茎葉体の無菌培養株を密閉系ガラスボトルシステムで培養することで、各安定同位体元素 ( $^{13}\text{C}_6\text{-glucose}$ ,  $^{13}\text{CO}_2$ ;  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$ ,  $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ ;  $^{18}\text{O}_2$ ;  $\text{Mg}^{34}\text{SO}_4$ ) による標識を行った。培養した茎葉体から 80%メタノールで代謝物を抽出後、LCMS 分析データを取得した。非標識サンプルの分析データから、661 個の有効なピークを抽出した。それら 661 個の精密質量値について質量精度 2ppm 以内で理論組成式推定を行ったところ、217 個のピークについて単一理論組成式、3 個のピークについては複数の理論組成式が提示された。また、既知化合物データベース検索では、47 個のピークが二次代謝産物としてアノテーション（化合物情報および化合物分類情報の付与）された。さらに、ShiftedIonsFinder（組成式の差分解析プログラム）を用いてフラボノイド誘導体候補を探索することで、最終的に 13 種類のフラボノイド誘導体の存在が示唆された。その多くはフラボノイド 2 量体と推測されたが、2 個のピークが組成式 ( $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$ ) を持つフラボノイドであると推測された。更に、標準品分析及び安定同位体分子状酸素 ( $^{18}\text{O}_2$ ) 標識検体と非標識検体の比較（同位体による質量シフト）から、*P. patens* で初めてルテオリンの同定に成功した（図 1）。本研究以前の時点では、*P. patens* のゲノムには、既知のフラボン合成酵素遺伝子 (FNSI, FNSII) の相同遺伝子の存在は報告されていないことから、フラボン生合成経路が存在しないと考えられていた。本研究成果は、フラボンの新規生合成経路（代謝経路）の存在を提唱するものであり、LCMS メタボローム解析によって、ゲノム解析からのアプローチでは発見することができなかった機能性二次代謝産物の代謝経路推定を実現したものである。

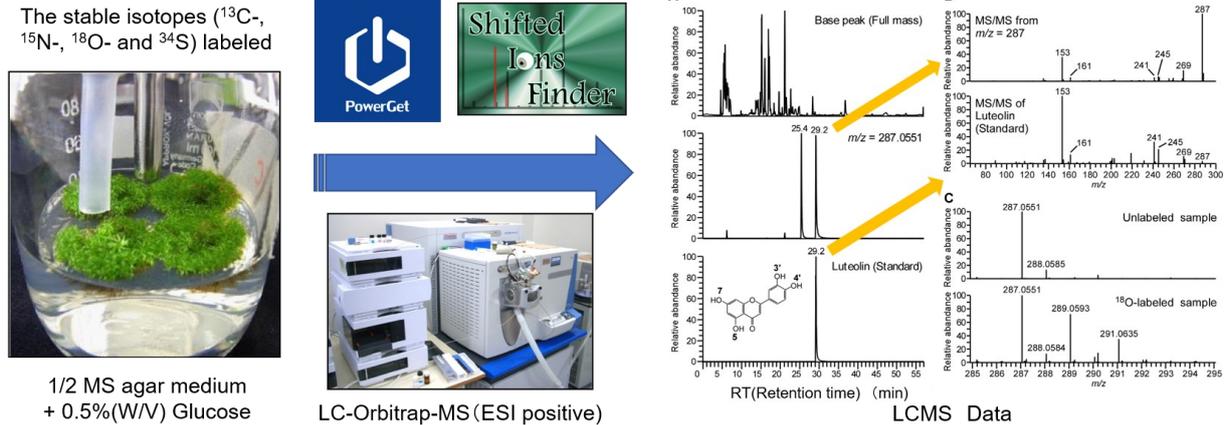


図1 モデルコケ植物ヒメツリガネコケ (*Physcomitrella patens*) の LCMS メタボローム解析  
 A. 非標識検体のイオンクロマトグラム B. RT(29.2min)の Full MS C. RT(29.2min)の MSMS

(2) モデルマメ科植物ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) の LCMS メタボローム解析を利用した新規の合成酵素遺伝子の単離及び代謝経路の推測 (図2-4) [4]

フラボノイドは、花色に関与しているものも多い。特に、構造内の水酸基の数や位置の違いによって吸収波長が異なるため、フラボノイドの構造多様性は、花色の多様性をもたらす。既往の研究で、マメ科のモデル植物であるミヤコグサ (*Lotus japonicus*) の黄色花卉には、ゴシペチン (ケルセチンの8位水酸化体) の3位配糖体が特異的に蓄積していることを報告している[5]。本研究では、*L. japonicus* の器官別の LCMS メタボローム解析から作成したフラボノイドプロファイリング結果に基づき、花卉に、ゴシペチン合成酵素 (フラボノイド8位水酸化酵素、F8H) 遺伝子の存在を推測し、以下の実験を実施した。*L. japonicus* の EST データベースを利用して、まず、74,472 クローンの EST データから、蕾や花で特異的に発現している 320 個のクローンを選抜した。次に、NADPH 及び FAD 結合モチーフを持つものを探索したところ、蕾由来の 1 クローンのみが選抜された。そのクローンの全塩基配列を決定することで、*L. japonicus* 由来 F8H (LjF8H と略す) 遺伝子を得ることに成功した。

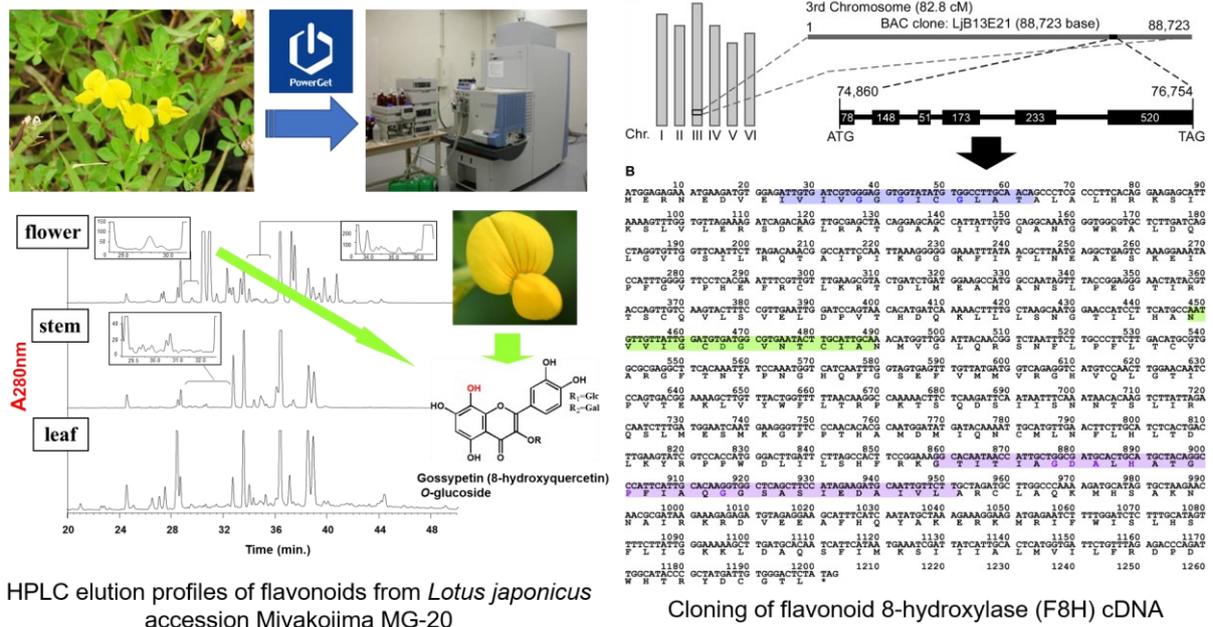


図2 ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) 由来の黄色の色素分布[5]及び LjF8H の遺伝子解析  
 A. LjF8H のゲノム構造；黒字は、エキソン領域  
 B. LjF8H の塩基配列と推定アミノ酸配列；青色の配列は、FAD/NADPH binding motif、緑色の配列は、GD motif、紫色の配列は、GD motif

分子系統学的解析から、LjF8H は既知の植物由来フラビンモノオキシゲナーゼ (FMO) 群とは異なる系統分類に属することが明らかとなった (図3)。LjF8H の形質転換酵母から調製したマイクロソーム画分を用いた酵素活性測定で、LjF8H がゴシペチン合成活性を有することを同定し、ミヤコグサ に F8H 遺伝子が存在することを証明した。また、LjF8H は、ナリンゲニン、エリオディクチオール、アピゲニン、ルテオリン、タクシフォリン、およびケンフェロールなどの他のフラボノイドも基質とし、それぞれの8位の水酸化体を合成した。興味深いことに、フラボノイドのC環の2位と3位でC-C結合が飽和した化合物であるフラバノンとフラバノールを基質とした場合に、酵素反応の副産物として6位の水酸化体も産生した。さらに、LjF8H は、ナリンゲニン(フラバノン)の2S-異性体のみを受け入れ、基質の立体構造状態が反応生成物の特異性に影響を与える可能性を示唆した (図4)。LjF8H を異種発現させたシロイヌナズナ及びビペチュニアにおいて、それぞれ対照実験では検出されないゴシペチン及び8-ヒドロキシケンフェロールが新たに検出されたことから、LjF8H が植物細胞内において機能的であることが示唆された。本研究は、ゴシペチン生合成経路に関与するF8H遺伝子を初めて同定した成果であり、LCMSメタボローム解析と遺伝子発現情報を組み合わせることで、二次代謝産物の生合成経路の予測から遺伝子単離を可能にした実例である。

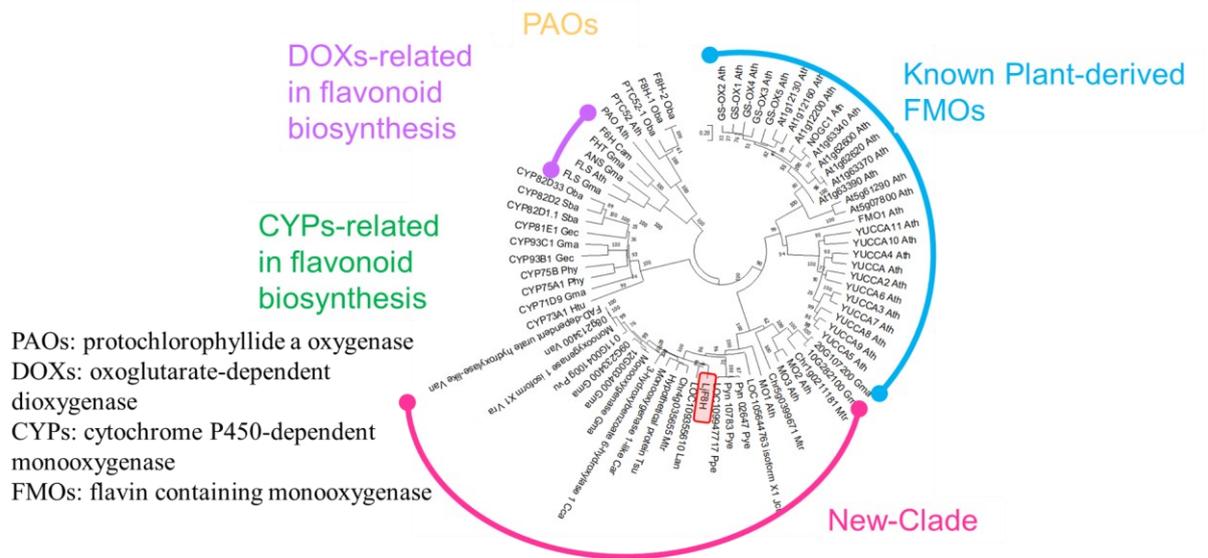
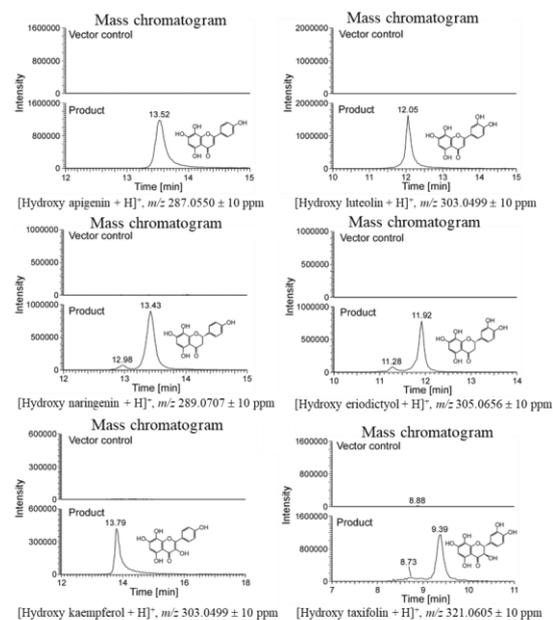
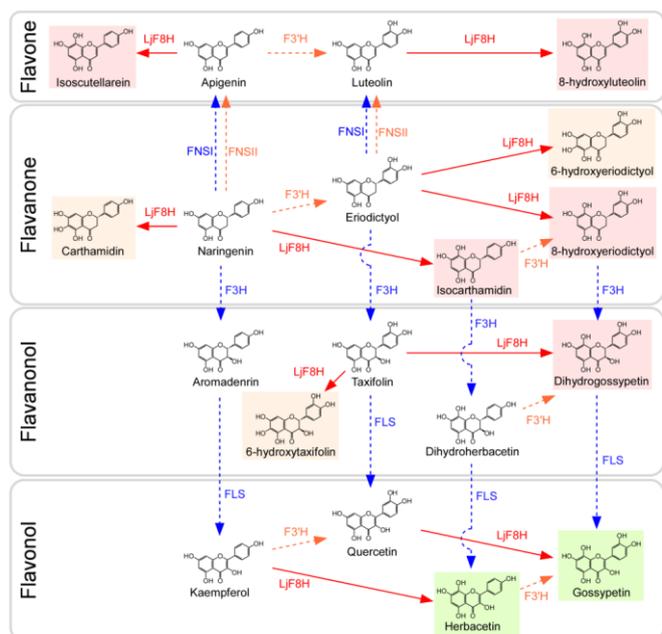


図3 LjF8H の系統学的解析



LCMS analysis of by the recombinant LjF8H with various flavonoids as substrates.



Schematic representation of the broad substrate acceptance of LjF8H

図4 異種発現系を用いた LjF8H の酵素機能解析及び代謝経路の予測

左図の構造式は、8-Hydroxynaringenin 以外全て推定構造である。

(3) 農作物のパパイヤ(*Carica papaya* L.)のLCMS メタボローム解析を利用したカルパイン代謝経路の推測 (図5) [6]

近年、日本の関東地域でもパパイヤ(*Carica papaya* L.)が栽培されているが、越冬できないために果実以外の部分の多くが廃棄され、食材のパパイヤの果皮も廃棄されている。本研究では、未利用部位も含む青パパイヤの利用促進に向けて、メタボローム解析を行った。未熟(青)パパイヤの果実(果皮・果実)及び完熟果実(果皮・果実)を実験材料として、LCMS メタボローム解析を行った。その結果、6,536個の成分ピークを抽出し、化合物データベース検索から692個の成分ピークのアノテーション(化合物情報および化合物分類情報の付与)を行った。また、主成分分析(PCA)の結果、未熟果皮と完熟果皮の成分比較の違いが未熟果肉と完熟果肉の成分比較の違いよりも変化が大きいことが示唆され、選抜された特徴的な10個の成分中、8種類が既知有効成分のカルパインの関連成分と推定された。化学組成式を基に、8種類のカルパイン関連成分の推定代謝ネットワークを予測したところ、登熟過程の果皮においてカルパイン誘導体が減少し、カルパム酸(カルパイン誘導体の前駆体、図5中の化合物5)が増加した(図5)。このことは、果実の熟成中にカルパインの分解が活性化している、または完熟果皮でカルパインの合成が抑制されていることを示唆している。本研究は、LCMS メタボローム解析によって、新規の中間産物の検出(発見)も含めて、未解明のカルパイン代謝経路を予測することに成功した初めての事例である。また、青パパイヤ果実を乾燥粉末に加工しても、機能性成分であるベンジルグルコシノレート(BG)、ポリフェノール及びタンパク質分解酵素(乳液成分のパパインを含む)活性が残存することを示した。加えて、パパイヤの茎および根には、マカ植物と同等級及びそれ以上のBGが含まれることを示し、パパイヤの未利用部位を機能性成分の原材料として利用可能なことを示唆した。

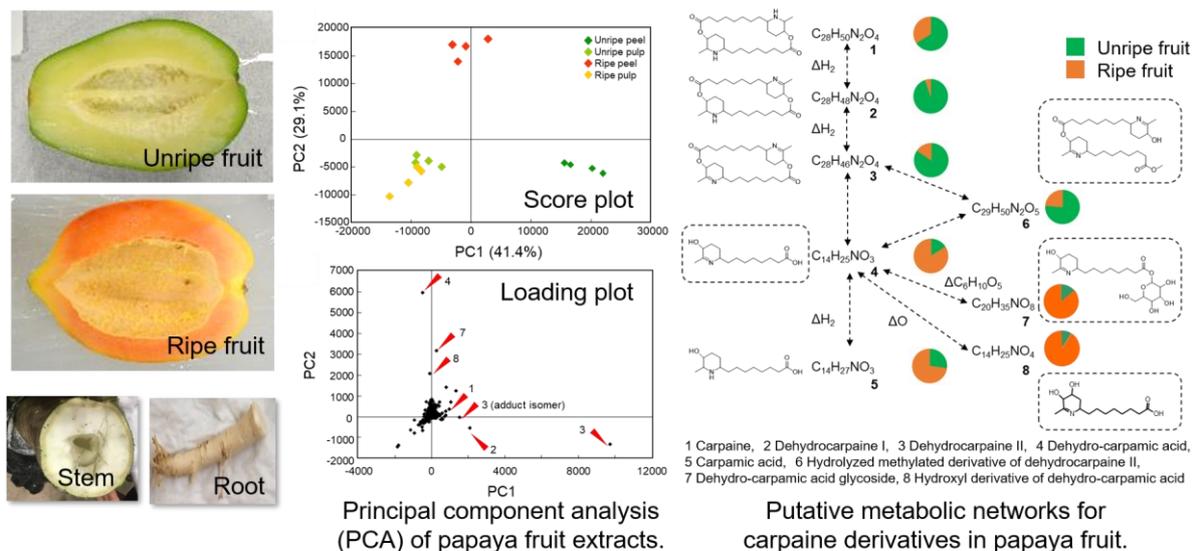


図5 パパイヤ科植物パパイヤ(*Carica papaya* L)のLCMS メタボローム解析及びカルパイン誘導体の代謝経路の予測 右図の構造式は全て推定構造である。点線の構造式は、新規成分である。

今回、天然物化合物の探索及び生合成経路の研究における基盤技術としてLCMS メタボローム解析技術を用いることで、植物由来の二次代謝産物としての新規成分(既知成分も含め)の発見、代謝経路の推測及び関連代謝酵素遺伝子の単離を行うことができた。今後、メタボローム解析技術を用いて、地球上の未利用植物資源等にも注目して、植物成分の全容解明のための大規模な成分情報の収集及び新規の機能性成分の発見のための代謝経路の解明が可能になると考えられる。

文献: 1) Afenfi *et al*, *Plant & Cell Physiology*, **53**, e1, 2012; 2) 斉藤和季、植物はなぜ薬を作るのか(文春新書); 3) Hiraga *et al*, *Plant Biotechnology* (Tokyo), **37**(3): 377-381, 2020; 4) Hiraga *et al*, *Plant & Cell Physiology*, **62**(3): 411-423, 2021; 5) Suzuki *et al*, *Phytochemistry*, **69**(1): 99-111, 2008; 6) Hiraga *et al*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **85**(5): 1194-1204, 2021