

## 論文審査の結果の要旨

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

審査委員：（主 査） 教授 松崎 桂一

（副 査） 教授 飯島 洋 教授 四宮 一総

教授 内山 武人

生体内の網羅的な成分、すなわち全代謝産物を検出することを目的とするメタボローム解析（メタボロミクス）は、従来の分析化学手法に加えて、情報生物学（バイオインフォマティクス）の手法が融合した研究領域である。これは豊富な各種化合物データベースを利用するアノテーション（化合物の情報付加）の概念を加えることにより、植物からの創薬・食品・化粧品の各分野に効率的な研究開発を加速する技術として注目されている。

申請者は、植物の二次代謝産物について、網羅的に研究可能な液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS）を用い、モデル植物のヒメツリガネゴケとミヤコグサ、実用植物としてパパイヤのメタボローム解析を行った。液体クロマトグラフィー質量分析法（LC/MS）は従来、植物中の目的成分を決めるターゲット分析に用いられてきたが、メタボロミクスの視点から LC/MS を活用し、植物由来の機能性二次代謝産物の代謝経路を明らかにした。

最も初期に陸上植物になったコケ植物は、紫外線によるフリーラジカル産生を防御するために、抗酸化作用を有す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。ヒメツリガネゴケ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ンリ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<sup>TM</sup>-MS を用いたメタボローム解析を行った。ヒメツリガネゴケの茎葉体の無菌培養株を培養することで、各安定同位体元素（<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>18</sup>O, <sup>34</sup>S）による標識を行い、代謝物の LC/MS を行った。非標識サンプルの分析データから、661 本の有効なピークを抽出し、さらに精密質量値から理論組成式の推定を行ない、217 本のピークについて単一理論組成式、3 本のピークについては複数の理論組成式を見出した。また、既知化合物データベース検索から、47 本のピークが二次代謝産物としてアノテーションされた。さらに、組成式の差分析プログラムの ShiftedIonsFinder を用いて 13 種類のフラボノイド誘導体の存在を推定した。そのうち 2 本のピークが機能性物質であるフラボン骨格を有するルテオリンと推定した。更に、安定同位体の標識情報および標準品との比較により、ヒメツリガネゴケで初めてルテオリンおよび関連フラボン異性体を新たに同定した。ヒメツリガネゴケのゲノムには、既知のフラボン合成酵素遺伝子（FNSI, FNSII）の相同遺伝子が存在しないことから、フラボン生合成経路が存在しないと考えられていた。しかし、本研究結果はフラボンの新規生合成経路の存在を提唱するものであり、LC/MS 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されなかった二次代謝物の代謝経路推定を実現した。

マメ科のミヤコグサ (*Lotus japonicus*, accession Miyakojima MG-20) の花、葉、茎、根と器官ごとの LC/MS メタボローム解析を実施し、花卉の色素形成に関与するフラボノイドプロファンリグ分析結果から、黄色の花弁にゴシペチン（8 位の水酸化ケルセチン）の 3 位配糖体 (gossypetin 3-*O*-glucoside および gossypetin 3-*O*-galactoside) が特異的に蓄積していることを明らかにした。また、アラゲシュンギクの花において、補因子の FAD および NADH の存在下、フラボノイド 8 位水酸化酵素活性 (F8H) が報告されており、花卉特異的な F8H 遺伝子発現が予測された。そこで、花卉の色素形成に関与しているゴシペチンの生合成経路に寄与している水酸化酵素遺伝子の単離を目的に、EST データベースおよびゲノム配列の解析を行った。74,472 ク

ローンの EST データから、つぼみ或いは花で特異的に発現している 320 本のクローンを選抜した。各遺伝子配列の翻訳アミノ酸配列の機能予測で *oxidase-relate gene* と記載があるクローンは花で 1 個、つぼみで 3 個であり、そのうち NADPH および FAD 結合モチーフを持つものはつぼみ由来の 1 クローン(MFB088d08)のみであった。そのクローンの全塩基配列を決定し、本酵素 (LjF8H と略す) 遺伝子を得ることに成功した。ゲノム解析の結果から、*LjF8H* は 6 つのエキソンからなる染色体 III 上の単一コピー遺伝子であった。系統学的解析は、LjF8H がフラビンモノオキシゲナーゼ (FMO) 群のメンバーに属しているが、他の既知 FMO とは明らかに異なる新しい分類を形成していることを示唆した。LjF8H の大腸菌組換え発現酵素は活性を示さなかったが、酵母組換え発現酵素は NADPH および FAD 依存的活性を示し、LjF8H がケルセチンの 8 位に水酸化 (8-ヒドロキシル化) を触媒することが明らかになった。また、ナリングニン、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 LjF8H の基質として作用し、LjF8H は他の植物の既知 F8H とは異なり、幅広い基質特異性を示した。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は、酵素反応の副産物として 6 位の水酸化体 (6-ヒドロキシルフラボノイド) を産生した。さらに、LjF8H は、フラバノンであるナリングニンの 2*S*-異性体のみを受け入れ、基質の立体構造が反応生成物の特異性に影響を与える可能性を見出した。一方、シロイヌナズナおよびペチュニアにおける植物細胞での LjF8H の異種発現実験では、それぞれゴシペチンおよび 8-ヒドロキシカエンフェロールを合成し、LjF8H が植物細胞において機能的であったことを示した。結論として、この研究は、ゴシペチン生合成経路に関する F8H の遺伝子の単離および機能解析の最初の成果であり、LC/MS メタボローム解析が機能性二次代謝産物の代謝経路に関する遺伝子単離へと導く、生合成経路の予測を可能にした実例である。

農作物などの実用植物としてパパイアの廃棄される果皮と未熟果実と完熟果実の成分の包括的なノンターゲット解析が可能な LC-Orbitrap<sup>TM</sup>-MS を用いたメタボローム解析を行った。その結果、16 種類の LC/MS L ピーク検出およびアライメントを行った後、6536 本の成分ピークを抽出し、複数の化合物データベース検索から 692 本の成分ピークをアノテーションすることにより、16 種類の代謝産物の分類を行った。未熟果皮と完熟果皮を比較して、機能性成分であるジトリペプチド候補を含むアミノ酸類およびフェノール類の成分の種類が完熟果皮で増加し、登熟課程で代謝経路が活性化していることを推定した。また、全成分を用いた多変量解析の一つである主成分分析および Venn diagram による共通成分の抽出から Volcano plot 解析による差分解析を行った。その結果、主成分分析の score plot から、果皮の成分比較の方が果肉の成分比較よりもその変化が大きいことを見出した。主成分分析の loading plot から、成分変化の大きい 10 種の成分を抽出し、実験データ解析および文献調査から 8 種類がカルパイン関連物質であることを明らかにした。カルパインは、パパイア葉の苦味成分であり、心血管効果を有し、強力な抗ウイルスおよび抗プラズマ活性を有するアルカロイドである。一方、Venn diagram および Volcano plot 解析では、完熟果皮・果肉しか検出されていない成分の数が未熟果皮・果肉しか検出されていない成分の数よりも多く、登熟課程での成分の分解 (酸化プロセス) による多様化を意味していると推定した。さらに、カルパイン関連物質間の関係を理解するために、化学組成式を基に、8 種類のカルパイン関連物質の推定代謝ネットワークを構築し、Volcano plot 解析による各物質の量的関係性を同じ代謝経路に図示した。その結果、登熟課程の果皮において、カルパインが減少し、カルパミン酸が増加した。このことは、果実の熟成中のカルパインの分解経路の存在、または完熟果皮でのカルパミン酸からのカルパインの生合成の抑制を示唆している。今回、本研究では、初めての LC/MS メタボローム解析を実施し、代謝経路の新規の中間産物の発見も含めて、未だ生合成経路が未解明のカルパミン酸およびカルパインの代謝経路において貴重な情報を得ることができた。

以上のように、申請者は LC/MS メタボローム解析法を用いた植物の機能性二次代謝産物の代謝経路の探索を 3 例報告した。それぞれ、植物の新規成分の発見、代謝経路の推測および関連代謝酵素遺伝子の単離へと発展する可能性を見出す知見であり、今後の天然物の探索および生合成経路の研究における新たな方向性を示すことになった。

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

以 上