

# 植物セスキテルペノイドの生産制御研究

The study of metabolic regulation of sesquiterpenoids in plants

小 森 彩<sup>1</sup>、村 中 俊 哉<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>横浜市立大学木原生物学研究所、<sup>2</sup>大阪大学大学院工学研究科)

## はじめに

植物は多様な物質を生産することから、食糧としてだけではなく香料や薬の原料として広く利用されてきた。生活に深く関わってきた植物は、古くから研究対象とされ多種多様な有機化合物を生産することが明らかにされている。植物が含有する化合物のうち、全ての植物種に見いだされ、植物にとって必須とされる糖、タンパク質、脂質、核酸などを一次代謝産物と呼ぶのに対し、一次代謝系で生産される中間代謝産物から代謝され、植物種の違いによりプロファイルが異なる物質群を二次代謝産物と呼び、その構造からテルペノイド、アルカロイド、フェニルプロパノイドなどに分類される。植物が生産する二次代謝産物は5万~10万種ともいわれる (Roberts *et al.*, 1998; zhang *et al.* 2004; Makkar *et al.*, 2007; Zhong, 2002)。植物は、微生物、昆虫、捕食者などによる生物学的ストレス、紫外線、低温/高温、乾燥、塩などの非生物学的ストレス、受粉に際しての昆虫の誘因などにおいて、これらの物質を巧みに操ることにより、「自ら動くことができない」最大の不利を克服し、環境適応や外界との相互作用を行っていると考えられている。二次代謝産物のうちテルペノイド (イソプレノイドともいう) は、最も構造多様性に富むといわれ、およそ2万5千種が存在する (Buckingham, 1994)。本稿では、植物が産生するこれらテルペノイド、特にセスキテルペノイドに着目し、私たちの研究を含めその生産制御研究について紹介する。

## 医薬品資源としてのテルペノイド

テルペノイドは、炭素数5個の分子単位 (イソプレン単位) が結合して生じた一群の天然有機化合物の総称で、イソプレン単位の数によりモノテルペン (C<sub>10</sub>)、セスキテルペン (C<sub>15</sub>)、ジテルペン (C<sub>20</sub>)、セスタテルペン (C<sub>25</sub>)、トリテルペン (C<sub>30</sub>)、テトラテルペン (カロテノイド) (C<sub>40</sub>)、ポリテルペン (C<sub>40</sub><) に分類される。植物体内においてテルペノイドの生合成経路は細胞質でのMevalonate (MVA) 経路と色素体内でのmethylerythritol phosphate (MEP) 経路の二つの経路からなる。細胞質のMVA経路では、主にセスキテルペンやトリテルペンのよ

うなC<sub>15</sub>から派生したテルペンが、MEP経路ではモノテルペン、ジテルペン、テトラテルペンなどが合成される (図1) (Croteau *et al*, 2005)。

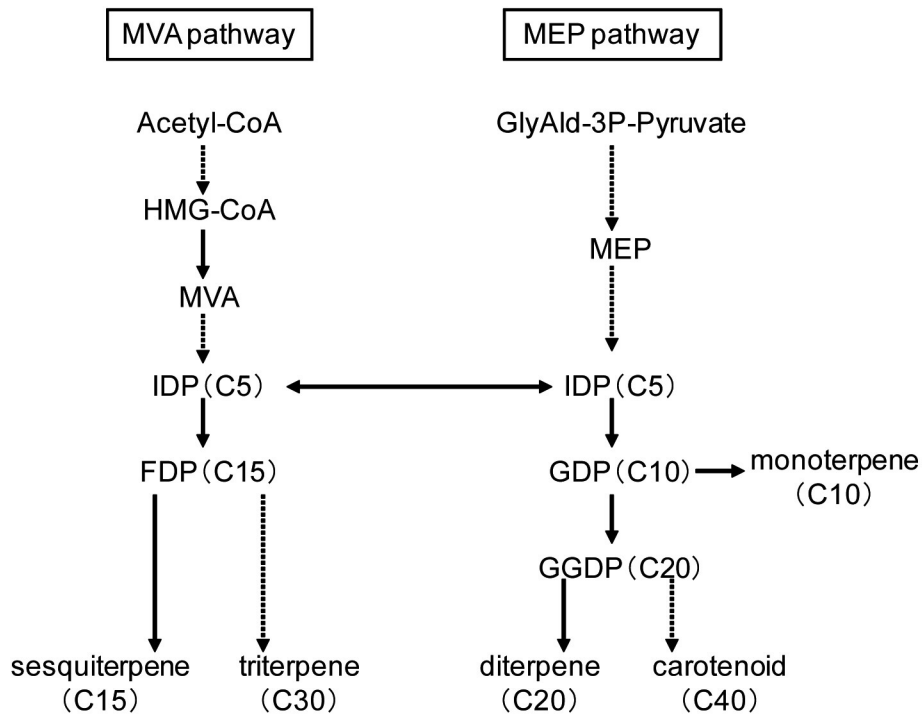


図1 テルペノイドの生合成経路

HMG-CoA: hdroxymethylglutaryl-CoA、MVA: mevalonic acid、IDP: isopentenyl diphosphate、FDP: farnesyl diphosphate、GlyAld-3P: glyceraldehyde-3-phosphate、MEP: methyl erythritol phosphate、GDP: geranyl diphosphate、GGDP: geranylgeranyl diphosphate

現在までに様々なテルペノイドが単離、同定されその生理活性が明らかにされている。例えば、*Tanacetum parthenium*が生産するセスキテルペノイドの一種 parthenolideは抗ガン活性を有する (Guzman *et al*. 2005; Nakshatri *et al*, 2004; Won *et al*, 2004; Yip-Schneider *et al*, 2005)。また、*Taxus brevifolia*が生産するジテルペノイドの一種であるTaxol (paclitaxel) は有用な抗ガン剤として利用され (Goldspiel 1997)、*Glycyrrhiza*属植物のストロンで生産されるGlycyrrhizin (トリテルペノイドの一種) は、天然の甘味料として広く世界中で利用されている他、抗炎症作用、抗アレルギー作用、抗腫瘍活性など多様な薬理作用が報告されている (Matsui *et al*, 2004; He *et al*, 2001; Park *et al*, 2004)。他にも抗HIV活性を示

すbetulinic acid (Asres *et al*, 2005)、抗ガン作用が報告されるLycopene (Giovannucci *et al*, 1995) などテルペノイドは多様な生理活性を持つ。

このように、植物が生産するテルペノイドには生理活性を有するものが多く、その利用価値は高い。実際、これらの物質のいくつかは医薬品としてすでに利用されている。現在、医薬品は化学合成が主流になってきているが、構造が複雑で完全な化学合成が困難な物質は植物に頼るところが大きく、未だ医薬品原料における植物資源の役割は大きい。しかし、植物が生産する有用物質は、大量に供給するには植物含有量が少ないことが多く、植物の乱獲による環境破壊も問題になっている。加えて、植物の成分は環境要因によって変化することが知られ、安定的に物質を供給することは難しい。その結果、植物における有用物質生産に関する研究が発展してきた。次に抗マalaria薬として利用されるartemisininを例に挙げ、その生合成研究について紹介する。

### 抗マalaria薬、artemisinin

マalariaは、蚊が媒介するマalaria原虫 (*Plasmodium*属) により引き起こされ、毎年およそ2百万人が感染し死亡している (Korenromp *et al*, 2005)。マalaria対策としてDDTによる蚊の発生の抑制、quinineやchloroquineを用いた治療などが行われてきたが、環境に対する負荷や薬剤耐性マalaria原虫の発生など問題が生じていた。

artemisininは1970年代、漢方薬の原料として利用される *Artemisia annua* より発見された (Liu *et al*, 1979)。セスキテルペノイドの一種である。artemisininは、それまで利用されてきた抗マalaria薬耐性原虫に対し効果を発揮したことから新たな治療薬として注目され、現在他の抗マalaria薬と併用する治療法が広く推奨されている (artemisinin-based combination therapies, ACTs; Mutabingwa, 2005)。しかし、*A. annua* におけるartemisinin生産量は乾燥重量で0.01-1.0% (Liu *et al*, 2006) と低く、需要に供給が追いついていない。そこで、*A. annua* におけるartemisinin生合成関連酵素の探索が精力的に行われた。

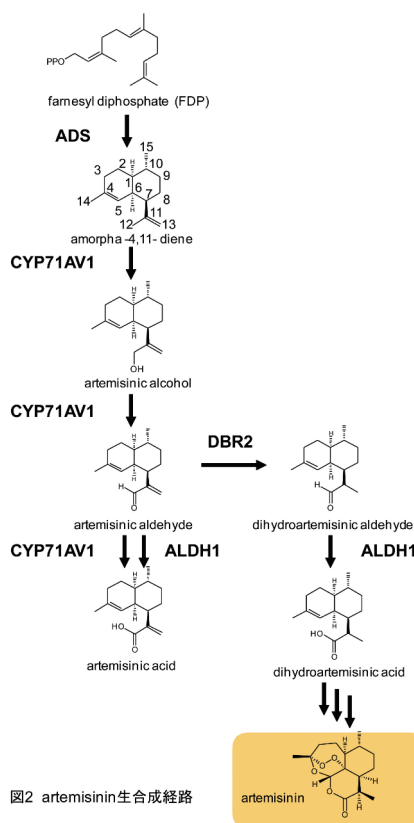


図2 artemisinin生合成経路

セスキテルペノイドは、植物が広く生産するC<sub>15</sub>の直鎖状のfarnesyl diphosphate (FDP) がセスキテルペン合成酵素により環化された後、酸化反応などの修飾を経て合成される。したがって、植物におけるセスキテルペノイド生合成メカニズムを解明するためには、FDP以降の生合成に関与する酵素の研究が必要である。artemisininは*A. annua*の葉と蕾のトライコームに蓄積することが知られている。トライコームに蓄積される化合物の分析より、artemisininの生合成中間体候補としてamorpha-4,11-diene、artemisinic alcohol、dihydroartemisinic alcohol、artemisinic aldehyde、dihydroartemisinic aldehyde、artemisinic acid、dihydroartemisinic acidなどが挙げられた。artemisinin生合成経路を図2に示す。artemisinin生合成関連酵素研究では、まずFDPを環化しamorpha-4,11-dieneを合成するタンパク質(amorpha-4,11-diene synthase, ADS) が単離された(Bouwmeester *et al*, 1999)。その後、既に単離されたテルペン合成酵素配列を元にADSをコードする遺伝子が単離され、大腸菌発現系を用いて活性が確かめられた(Chang *et al*, 2000; Mercke *et al*, 2000; Wallaart *et al*, 2001)。生合成中間体候補物質の構造から、artemisinin生合成にはシトクロームP450モノオキシゲナーゼ(P450)の関与が示唆された。このことから、トライコーム特異的に発現するP450の探索と単離が行われCYP71AV1が単離された(Ro *et al*, 2006; Teoh *et al*, 2006)。CYP71AV1はamorpha-4,11-dieneの12位炭素を選択的に酸化しartemisinic alcohol、artemisinic aldehydeを経てartemisinic acidを生成する。artemisininは、artemisinic acidを経て合成される系とdihydroartemisinic acidを経て生合成される系の二つの説が提唱されていた。トライコーム特異的に発現し、artemisinic aldehydeのΔ<sup>11</sup>(13)の二重結合を還元しdihydroartemisinic aldehydeを生成するDBR2が単離されたことから、後の説が定説となりつつある(Zhang *et al*, 2008)。また近年、artemisinic aldehydeならびにdihydroartemisinic aldehydeを酸化しartemisinic acidならびにdihydroartemisinic acidを生成するALDH1が新たに単離された(Teoh *et al*, 2009)。

これら生合成関連酵素遺伝子の知見は、artemisininをより簡便に得る方法の確立へとつながることが期待される。次に、これら知見を活かした中間体artemisinic acidの生産制御研究について述べる。

### 酵母を用いたartemisinic acidの生成

先に述べたように、artemisininは*A. annua*における生成量が少なく、またコスト面から全合成も難しい。そこで、微生物を用いた大量調製が注目されている。微生物は、生活サイクルが短く、容易に培養可能である。さらに、微生物内での

代謝経路に関する研究は植物に比べ進んでいることから、遺伝子を導入し物質を生産させるのに適した材料といえる。また、化学合成に比べ環境に対する負荷も少ない。

Roらは、CYP71AV1遺伝子の探索・単離を行うと同時に、微生物を用いた artemisininの半合成を目指し artemisinic acidを過剰量生産する改変酵母を作出した (Ro *et al*, 2006)。まず、MEV経路におけるFDP生合成上流遺伝子の過剰発現ならびに、下流遺伝子の発現抑制を行い、ADSの基質であるFDPを酵母内でより多く生産させた。その結果、これらMEV経路改変酵母では未改変の酵母と比較して約500倍の amorpha-4,11-dieneを生産した (153mg/L)。次に、これらの改変酵母でCYP71AV1を発現させることにより、約100mg/Lの artemisinic acidを生産する改変酵母を作成した。近年、さらなる改良によりその生成量は250mg/Lまで増加した (Ro *et al*, 2008)。さらに、改変酵母で生産された artemisinic acidは酵母細胞外へと排出された後、酵母表面へ保持され、精製処理が容易であることが示された。これは工業的観点から大きな利点である。これら改変酵母生産される artemisinic acid量は、*A. annua*における生産量と比較しはるかに高い。今後、さらなる研究の展開が期待される。

### artemisinin非産生 *Artemisia* (ヨモギ) 属植物におけるCYP71AV1ホモログ

ヨモギ属植物は北半球を中心におよそ250種が分布し、古くから民間薬や漢方薬の原料として利用されてきた。また、ヨモギ属植物は多様なテルペノイドを生産することからテルペノイド生合成研究の優れた研究材料と言える。しかし、*A. annua*など一部のヨモギ属植物を除きその生合成に関する分子遺伝学的知見はほとんどない。

私たちは、民間薬として利用される2種のヨモギ属植物 *A. afra* と *A. absinthium* の葉においてCYP71AV1と94%以上のアミノ酸相同性を示すホモログ (CYP71AV1ホモログ) が発現していることが明らかにした (Seki *et al*, 2007)。これら2種からはADSの発現ならびに artemisinic acid およびCYP71AV1の基質である amorpha-4,11-dieneは検出されないことから、これらCYP71AV1ホモログの機能は不明であった。

そこで、ADS発現酵母を用いてこれらCYP71AV1ホモログが amorpha-4,11-dieneを基質とし artemisinic acidを生産しうるか調べた。これら組換え酵母の培養液をGC-MSを用いて分析した結果、CYP71AV1ホモログを発現させた組換え酵母より artemisinic acidが検出された。このことからCYP71AV1ホモログはCYP71AV1と同様に amorpha-4,11-dieneの12位炭素の三段階酸化を触媒すること



が明らかになった。しかし興味深いことに、CYP71AV1ホモログを発現させた組換え酵母において、CYP71AV1を発現させた組換え酵母では酸化が速やかに進んだため痕跡量しか検出されなかったと推定されるartemisinic alcoholが蓄積する傾向があること、またCYP71AV1を発現させた酵母では検出されなかったセスキテルペン様アルコール物質生成されることが明らかとなった。このセスキテルペン様アルコール物質は推定分子量とマスフラグメントパターンならびにCYP71AV1ホモログのみを発現させた組換え酵母より検出されなかったことから、amorpha-4,11-dieneの12位炭素以外の部位が酸化された物質だと推定された。以上のことから、CYP71AV1ホモログはCYP71AV1と比較してamorpha-4,11-dieneに対する反応生成物特異性が低いことが示唆された。現在、CYP71AV1とそのホモログの酵素機能比較解析により、ホモログのアミノ酸残基に置換することでartemisinic acidではなくartemisinic alcoholを蓄積する傾向を示すCYP71AV1のアミノ酸残基の知見を得ている。

また、*A. afra*、*A. absinthium*以外11種のヨモギ属植物のゲノムDNAを鋳型とし、CYP71AV1全長コード領域を増幅させるプライマーを用いてPCRを行った。その結果、11種のうち10種で*A. annua*のゲノムDNAを鋳型としたときと同様に約2kbpのDNA断片の増幅が確認された(図3)。また、これらのDNA断片はCYP71AV1と83~93%のアミノ酸配列相同性を示した。このことからCYP71AV1ホモログはヨモギ属植物に広く存在することが明らかになった。今後、CYP71AV1ホモログとの比較を通してCYP71AV1の構造と機能の相関に関する新たな知見が得られることが期待される。これらの知見はartemisinin生産メカニズム解明につながるるとともに、新規有用物質生産に向けた改変酵素作出の基礎となるだろう。

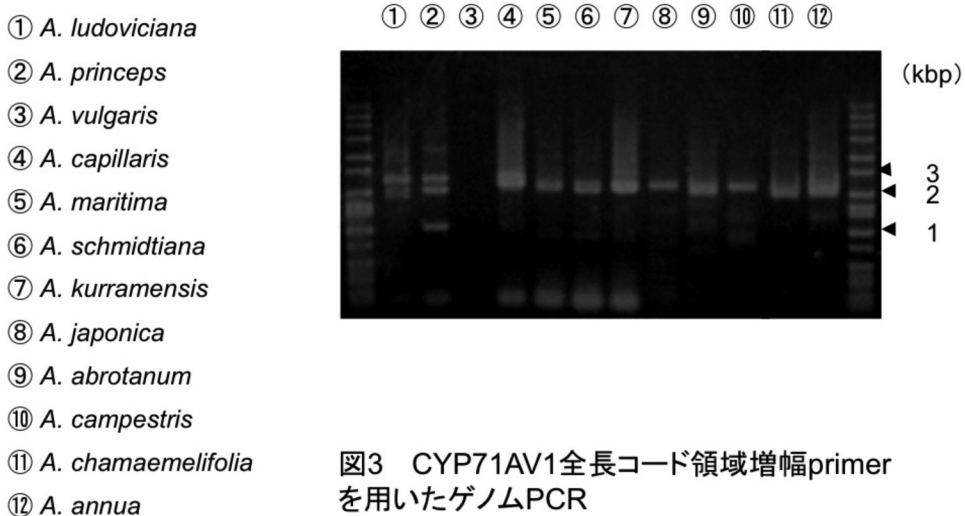


図3 CYP71AV1全長コード領域増幅primerを用いたゲノムPCR

## おわりに

1980年代に、「植物組織培養による有用物質生産」研究がブームとなった。しかし当時は、植物二次代謝産物の生合成経路がブラックボックスのまま、サイエンスが通じない「根性」による研究開発であったため本研究分野は衰退した。長いブランクの後、精密かつ包括的な代謝物分析、高速シーケンス技術の発達も相まって、植物が持つ代謝多様性、その元となる植物遺伝子が今、注目されている。本稿で紹介した抗マalaria薬artemisininの生合成研究、それを発展させた酵母による生産制御研究、さらには、私たちが展開しているナチュラルバリエーションによる新規有用物質生産に向けた研究は、その一例であると言える。日本は元々天然物化学を得意とする長い歴史がある。さまざまな境界領域の研究者が連携することにより、本研究分野が進展し、さらには新産業へと発展することを期待している。

## 引用文献

- Asres K., Seyoum A., Veeresham C., Bucar F. and Gibbons S. (2005) Naturally derived anti-HIV agents. *Phytother Res.* 19, 557-581.
- Bouwmeester H.J., Wallaart T.E., Janssen M.H., van Loo B., Jansen B.J., Posthumus M.A., Schmidt C.O., De Kraker J.W., König W.A., and Franssen M.C. (1999) Amorpha-4,11-diene synthase catalyses the first probable step in artemisinin biosynthesis. *Phytochemistry.* 52, 843-854.
- Buckingham J. (1994) *Dictionary of natural products.* Chapman and Hall.
- Chang Y.J., Song S.H., Park S.H. and Kim S.U. (2000) Amorpha-4,11-diene synthase of *Artemisia annua*: cDNA isolation and bacterial expression of a terpene synthase involved in artemisinin biosynthesis. *Arch Biochem Biophys.* 383, 178-184.
- Croteau R., Kutchan T.M. and Lewis N.G. (2005) ナチュラルプロダクト (二次代謝産物) 植物の生化学・分子生物学. 学会出版センター. 1132-1213.
- Giovannucci E., Ascherio A., Rimm E.B., Stampfer M.J., Colditz G.A. and Willett W.C. (1995) Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 87, 1767-1776.
- Goldspiel B.R. (1997) Clinical overview of the taxanes. *Pharmacotherapy.* 17, 110S-125S.
- Guzman M.L., Rossi R.M., Karnischky L., Li X., Peterson D.R., Howard D.S. and Jordan C.T. (2005) The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Blood.* 105, 4163-4169.

- He J.X., Akao T., Nishino T. and Tani T. (2001) The influence of commonly prescribed synthetic drugs for peptic ulcer on the pharmacokinetic fate of glycyrrhizin from Shaoyao-Gancao-tang. *Biol Pharm Bull.* 24, 1395-1399.
- Korenromp E., Miller J., Nahlen B., Wardlaw T., Young M. (2005) World malaria report 2005. World Health Organization (WHO), Roll Back Malaria Partnership.
- Liu C., Zhao Y. and Wang Y. (2006) Artemisinin: current state and perspectives for biotechnological production of an antimalarial drug. *Appl Microbiol Biotechnol.* 72, 11-20.
- Liu J.M., Ni M.Y., Fan J.F., Tu Y.Y., Wu Z.H., Wu Y.L. and Chou W.S. (1979) Structure and reaction of arteannuin. *Acta Chim Sin.* 37, 129-143.
- Makkar H.P., Siddhuraju P. and Becker K. (2007) Plant secondary metabolites. *Methods Mol Biol.* 393, 1-122.
- Matsui S., Matsumoto H., Sonoda Y., Ando K., Aizu-Yokota E., Sato T. and Kasahara T. (2004) Glycyrrhizin and related compounds down-regulate production of inflammatory chemokines IL-8 and eotaxin 1 in a human lung fibroblast cell line. *Int Immunopharmacol.* 4, 1633-1644.
- Mercke P., Bengtsson M., Bouwmeester H.J., Posthumus M.A. and Brodelius P.E. (2000) Molecular cloning, expression, and characterization of amorpho-4,11-diene synthase, a key enzyme of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Arch Biochem Biophys.* 381, 173-180.
- Mutabingwa T.K. (2005) Artemisinin-based combination therapies (ACTs): best hope for malaria treatment but inaccessible to the needy! *Acta Trop.* 95, 305-315.
- Nakshatri H., Rice S.E. and Bhat-Nakshatri P. (2004) Antitumor agent parthenolide reverses resistance of breast cancer cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand through sustained activation of c-Jun N-terminal kinase. *Oncogene.* 23, 7330-7344.
- Park H.Y., Park S.H., Yoon H.K., Han M.J. and Kim D.H. (2004) Anti-allergic activity of 18beta-glycyrrhetic acid-3-O-beta-D-glucuronide. *Arch Pharm Res.* 27, 57-60.
- Ro D.K., Ouellet M., Paradise E.M., Burd H., Eng D., Paddon C.J., Newman J.D. and Keasling J.D. (2008) Induction of multiple pleiotropic drug resistance genes in yeast engineered to produce an increased level of anti-malarial drug precursor, artemisinic acid. *BMC Biotechnol.* 8, 83.



- Ro D.K., Paradise E.M., Ouellet M., Fisher K.J., Newman K.L., Ndungu J.M., Ho K.A., Eachus R.A., Ham T.S., Kirby J., Chang M.C., Withers S.T., Shiba Y., Sarpong R. and Keasling J.D. (2006) Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*. 440, 940-943.
- Roberts M.F. and Wink M. (1998) Chemical ecology of alkaloids, in *Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications*. Springer. 265-300.
- Seki H, Suzuki M, Nishizawa T, Ziaratnia M, Meyer JJ. and Muranaka T. (2007) Comparative gene expression and sesquiterpenoid profiling in two closely related *Artemisia* species, *A. annua* and *A. afra*. TERPNET2007 Abstract book p56.
- Teoh K.H., Polichuk D.R., Reed D.W., and Covello P.S. (2009) Molecular cloning of an aldehyde dehydrogenase implicated in artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. *Botany*. 87, 635-642.
- Teoh K.H., Polichuk D.R., Reed D.W., Nowak G. and Covello P.S. (2006) *Artemisia annua* L. (Asteraceae) trichome-specific cDNAs reveal CYP71AV1, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the antimalarial sesquiterpene lactone artemisinin. *FEBS Lett*. 580, 1411-1416.
- Wallaart T.E., Bouwmeester H.J., Hille J., Poppinga L. and Maijers N.C. (2001) Amorpha-4,11-diene synthase: cloning and functional expression of a key enzyme in the biosynthetic pathway of the novel antimalarial drug artemisinin. *Planta*. 212, 460-465.
- Won Y.K., Ong C.N., Shi X. and Shen H.M. (2004) Chemopreventive activity of parthenolide against UVB-induced skin cancer and its mechanisms. *Carcinogenesis*. 25, 1449-1458.
- Yip-Schneider M.T., Nakshatri H., Sweeney C.J., Marshall M.S., Wiebke E.A. and Schmidt C.M. (2005) Parthenolide and sulindac cooperate to mediate growth suppression and inhibit the nuclear factor-kappa B pathway in pancreatic carcinoma cells. *Mol Cancer Ther*. 4, 587-594.
- Zhang W., Franco C., Curtin C. and Conn S. (2004) To stretch the boundary of secondary metabolite production in plant cell-based bioprocessing: anthocyanin as a case study. *J Biomed Biotechnol*. 5, 264-271.
- Zhang Y., Teoh K.H., Reed D.W., Maes L., Goossens A., Olson D.J., Ross A.R. and Covello P.S. (2008) The molecular cloning of artemisinic aldehyde Delta11(13) reductase and its role in glandular trichome-dependent biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua*. *J Biol Chem*. 283, 21501-21508.

Zhong J.J. (2002) Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes. J Biosci Bioeng. 94 , 591-599.