

機能性フラボノイド配糖体の醗酵生産



研究ノート

大橋 貴生*

Development of a Platform for Microbial Fermentation Production of Functional Flavonoid Glycoside

Key Words : Fission Yeast, Naringin, UDP-Rhamnose

はじめに

フラボノイドはポリフェノールの一種であり、ヒトに対して様々な有用な機能性を持つことが知られている。例えば、グレープフルーツに豊富に含まれる機能性フラボノイドであるナリンギンには抗酸化作用を始めとする、動脈硬化予防効果、血流改善効果（冷え性対策）、抗アレルギー効果および抗ウイルス効果等の機能が報告されている。超高齢化社会の到来に伴う、健康志向の高まりも相まって、機能性フラボノイドは、特に高齢者を含むヒトの健康維持・増進に資する機能性食品成分として注目が高まっている。

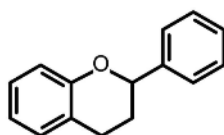


図1 フラバン基本骨格

これらフラボノイドは化学構造的には2つのベンゼン環が3つの炭素で繋がったフラバンを基本骨格とし（図1）、複数のフェノール性水酸基による修飾を受けている。これらフェノール性水酸基は、さらに多種多様な糖による配糖化を受け、フラボノイド配糖体の構造多様化に大きく寄与している（図2）。

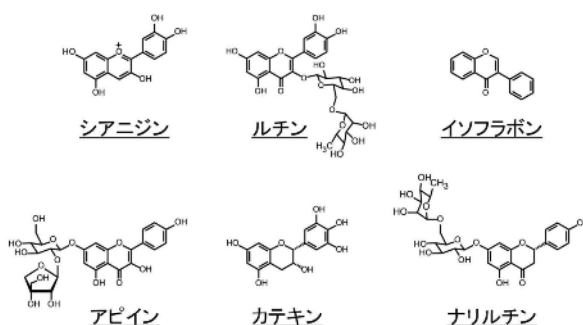


図2 多種多様なフラボノイドの構造

柑橘類に豊富に含まれるナリンギンとナリルチンは互いに構造異性体であり、ナリンゲニン骨格の7位の水酸基にラムノース (Rha) - グルコース (Glc) 二糖が結合した構造をしている。これらの異性体では非還元末端の Rha の結合位置のみが異なっており、ナリンギンでは α 1,2-結合、ナリルチンでは α 1,6-結合で Rha が Glc に結合している（図3）。この末端 Rha の結合位置の違いのみで、ナリルチンは無味なのに対して、ナリンギンは苦味を呈する。このように、フラボノイド配糖体の微細な糖鎖構造は食品として口にしたときの味覚に大きな影響を及ぼす。他にも糖鎖構造の違いにより、フラボノイド配糖体の生体吸収性等の機能性に影響を及ぼすことが知られており、フラボノイド配糖体の糖鎖構造はその機能性に非常に重要である。



* Takao OHASHI

1978年12月生
大阪大学 大学院理学研究科 化学専攻
博士後期課程修了（2007年）
現在、大阪大学生物工学国際交流センター 助教 博士(理学) 糖鎖工学
TEL : 06-6879-4085
FAX : 06-6879-7454
E-mail : ohashi@icb.osaka-u.ac.jp

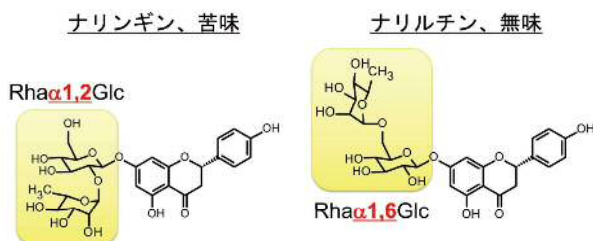


図3 ナリンギンとナリルチンの構造

そこで我々はフラボノイド配糖体の天然型の糖鎖構造を非天然型へ変えることで、苦味を甘味に変えたり、その甘味の強度を増強したり、生体吸収性を高めたり、さらには抗アレルギー効果を付与したりできるのではないかと考えた。これらの仮説を検証するには、糖鎖を非天然型へ変えた人工フラボノイド配糖体を作ることが必要である。そこで我々は培養工学的な知見が蓄積されており、遺伝子工学ツールが完備されている分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を生産宿主としてフラボノイド配糖体の醱酵生産を試みることにした。分裂酵母は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に並ぶモデル酵母として汎用されており、高等動植物と遺伝子の転写・翻訳機構の共通性が高いため、動植物由来タンパク質のより良好な発現宿主として期待されている¹⁾。モデル生産化合物にはネオヘスペリドース (Rha α 1,2-Glc) 糖鎖を有する苦味フラボノイド配糖体であるナリンゲニンを選択し、天然型フラボノイド配糖体を分裂酵母で醱酵生産させることから始めた。

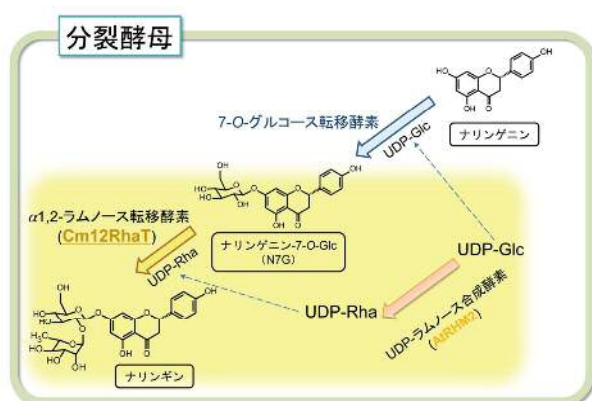


図4 分裂酵母に導入するナリンゲニン合成経路
ナリンゲニンを出発物質としたナリンゲニン合成経路を示す。まずナリンゲニンの7位の水酸基にUDP-Glcをドナー基質として、7-O- β -グルコース転移酵素の作用により、Glcが付加される。AtRHM2酵素の作用により分裂酵母細胞内に豊富に存在するUDP-GlcからUDP-Rhaが合成され、Cm1,2RhaTの作用によりN7G内Glc残基の2位の水酸基にRhaが付加され、ナリンゲニンが合成される。黄色帯のハイライトは本稿で紹介するN7Gを基質としたナリンゲニン合成経路を示す。

UDP-ラムノースの合成

柑橘類等の植物において、ナリンゲニンの糖鎖部分(ネオヘスペリドース)は(1)ナリンゲニン骨格の7位の水酸基にGlcを転移するフラボノイド7-O- β -グルコース転移酵素、(2)転移されたGlcの2位の水酸基にRhaを転移する α 1,2-ラムノース転移酵素

(α 1,2RhaT)によって、それぞれ植物細胞内で別途合成される活性化ドナー基質であるUDP-GlcおよびUDP-Rhaより、ナリンゲニンに順次付加される。分裂酵母はUDP-Glc合成系を除き、これらの糖転移酵素およびUDP-Rha合成系を持たない。UDP-Rhaは現在に至るまで試薬として販売されておらず、他のラムノース転移酵素を扱う研究者への貢献度も高いと考え、分裂酵母に植物由来のUDP-Rha合成酵素を導入することにより、UDP-Rha合成を行った。導入遺伝子にはシロイヌナズナ由来のAtRHM2遺伝子を用いた。本遺伝子産物は1つのタンパク質が3つの触媒活性(UDP-Glc 4,6-デヒドラターゼ、UDP-4-ケト-6-デオキシ-Glc 3,5-エピメラーゼ、UDP-4-ケト-Rha 4-レダクターゼ)を持ち、UDP-GlcからUDP-Rhaを合成することが報告されている²⁾。分裂酵母にAtRHM2遺伝子を導入した結果、活性を持った組換えAtRHM2酵素を生産させることに成功し、組換え酵素を用いた試験管内の反応でUDP-GlcからUDP-Rhaを合成することができた。また、生育させたAtRHM2遺伝子発現分裂酵母株から直接UDP-Rhaを抽出することにも成功し、組換え分裂酵母を生体触媒として用いて、培地内のGlcを基質としたUDP-Rhaの醱酵生産が可能であることも示した³⁾。

ラムノース転移酵素の同定と機能性配糖体ナリンゲニンの酵母醱酵生産

前述の通り、分裂酵母はネオヘスペリドース合成に必要な α 1,2RhaTを持っていないため、分裂酵母を用いたナリンゲニン合成には α 1,2RhaTを分裂酵母に導入する必要がある。ブンタン *Citrus maxima* 由来遺伝子のタバコ培養細胞における過剰発現株の表現型解析により、 α 1,2RhaT候補(Cm1,2RhaT)遺伝子が報告されていたが、本遺伝子産物が α 1,2RhaT活性を持ち、直接ネオヘスペリドース合成に関与するかは不明であった⁴⁾。そこで、分裂酵母を用いて組換えCm α 1,2RhaT酵素を生産し、本組換え酵素がRhaT活性を持っていることを直接示すため、試験管内RhaT活性を調べた。ドナー基質に前述の方法で合成したUDP-Rha、アクセプター基質にナリンゲニン骨格の7位の水酸基にGlcが付加したナリンゲニン-7-O-Glc(N7G)を用いて、組換えCm α 1,2RhaT酵素を作用させたところ、ナリ

ンギンを試験管内反応で合成することができ、*Cm α 1,2RhaT* 酵素がナリンギン合成に直接関わる α 1,2RhaT であることを初めて示した³⁾。また、本酵素の UDP-Rha 以外のドナー基質の利用可能性について調べたところ、UDP-Rha に加えて、UDP-キシロースおよび UDP-Glc にも作用し、本酵素はより広範なドナー基質特異性を持つことが分かり、本酵素の人工フラボノイド配糖体合成への応用可能性を示した。

次に、*AtRHM2* および *Cm1,2RhaT* 遺伝子を共発現させた分裂酵母株を生体触媒として用いて、ナリンギンの醗酵生産を試みた。N7G を生体触媒基質として培地に加え、ナリンギン合成反応を行ったところ、培地上清に醗酵生成物であるナリンギンが検出され、組換え分裂酵母を用いた醗酵生産が可能であることが示された³⁾。大腸菌や出芽酵母を生体触媒とした用いたフラボノイドの単糖付加型フラボノイド合成の報告はあるものの⁵⁾、ナリンギンのような二糖付加型フラボノイドを微生物を用いて醗酵生産した例は、本研究が初めてである。

おわりに

本稿では、機能性フラボノイド配糖体であるナリンギンの分裂酵母を用いた醗酵生産について、特に N7G からの二糖目の Rha 転移について焦点を当てて紹介した。二糖目転移の微生物を用いた醗酵生産では本研究が初めての報告ではあるが、現状の生産系では変換率が低く、工業生産への応用には、収率面等を含めまだまだ課題が多い。また、高価な N7G を醗酵生産基質としているため、コスト面の課題も残っている。今後は、ナリンゲニン骨格に直接付加した一糖目の Glc 転移経路およびアグリコンであるナリンギンの合成経路を分裂酵母に導入することにより、より単純で安価な基質である Glc やア

ミノ酸を出発材料としたナリンギンの醗酵生産系を構築すると共に、導入する糖転移酵素を変えることにより人工的な糖鎖を持ったフラボノイド配糖体の醗酵生産系を構築して行きたい。

参考文献

- 1) Takegawa K, Tohda H, Sasaki M, Idiris A, Ohashi T, Mukaiyama H, Giga-Hama Y, Kumagai H. Production of heterologous proteins using the fission-yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) expression system. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 53, 227-235 (2009)
- 2) Oka T, Nemoto T, Jigami Y. Functional analysis of *Arabidopsis thaliana* RHM2/MUM4, a multidomain protein involved in UDP-D-glucose to UDP-L-rhamnose conversion. *J. Biol. Chem.* 282, 5389-5403 (2007)
- 3) Ohashi T, Hasegawa Y, Misaki R, Fujiyama K. Substrate preference of citrus naringenin rhamnosyltransferases and their application to flavonoid glycosides production in fission yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 687-696 (2016)
- 4) Frydman A., Weissshaus O, Bar-Peled M, Huhman DV, Sumner LW, Marin FR, Lweinsohn E, Fluhr R, Gressel J, Eyal Y. Citrus fruit bitter flavors: isolation and functional characterization of the gene *Cm1,2RhaT* encoding a 1,2 rhamnosyltransferase, a key enzyme in the biosynthesis of the bitter flavonoids of citrus. *Plant J.* 40, 88-100 (2004)
- 5) Trantas E, Koffas MAG, Xu P, Ververidis F. When plants produce not enough or at all: metabolic engineering of flavonoids in microbial hosts. *Front Plant Sci.* 6, 1-16 (2015)