

ツバキ油に含まれるトリテルペンの生合成研究

東京大学大学院薬学系研究科

渋谷 雅明

Camellia oil is used as a base material in oil-based cosmetics, and rates high quality oil due to high composition of oleate glycerides. In addition to fatty acid glycerides, camellia oil contains triterpenes as minor constituents. Although effectiveness of triterpenes in camellia oil is uncovered yet, triterpenes specific for camellia oil likely characterize camellia oil as a good material in cosmetics, which are *seco*-triterpenes, camelliol A, B, sasanquol, etc. Biosynthesis of these *seco*-triterpenes was unknown. Recent study on *Arabidopsis thaliana* oxidosqualene cyclase (OSC), however, revealed that *seco*-triterpenes are directly biosynthesized by OSC. In order to clarify the biosynthesis of triterpenes in *Camellia japonica*, cDNA cloning of OSC from seeds of *C. japonica* was carried out by homology-based PCR in this study. Presence of eleven OSC homologues (named as cj-01, -02, ---- and -11) was revealed by analysis of the sequence of core DNA fragments. Sequences of three full-length OSCs (cj-01, 08, 11) were obtained by RACE, although none of the other eight OSCs was unfortunately obtained. Three full-length OSCs (cj-01, 08, 11) were obtained by PCR, and ligated into yeast expression vector pYES2. Resulting expression vectors were transferred into *ERG7* (lanosterol synthase gene) deficient yeast strain GIL77. After cell lysis and extraction with hexane, extracts were subjected to GC-MS analysis, which revealed that extract from cj-01 transformant contained β -amyrin as a sole product, that of cj-08 α -amyrin and β -amyrin, and that of cj-11 also α -amyrin and β -amyrin. Minor products by these three transformants were extensively surveyed, but no trace of camelliol A, B and sasanquol was detected. From these result, it is concluded that none of the obtained OSCs (cj-01, 08, 11) in this study was involved in the biosynthesis of camelliol A, B and sasanquol.

1. 緒言

1-1 ツバキ油

ツバキ (*Camellia japonica*) は日本原産の樹木である。古事記や万葉集にツバキの記載があり、観賞用として古くから日本人に親しまれてきた。また、ツバキの種子を圧搾して得られるツバキ油は、毛髪への吸収が優れていることや毛髪へ弾力性を与える長所のゆえ、奈良時代の頃から宮中の女性たちの黒い垂髪を整える髪油として使用され始め、その後、大衆にも普及した。化粧品の油性基剤として用いられている植物性不乾性油の中でも、植物性油脂としての安定性や品質の高さを示す指標に用いられるオレイン酸含量は 85 – 90% であり、オリーブ油 (オレイン酸の含有量は 54 – 83%) を大きく引き離している。明治時代の西洋文明の導入、さらに、戦後の石油化学技術を基盤とした工業製品の汎用は、化粧品にも及び、一時期、ツバキ油への関心は薄らいでいたが、近年の国民の自然志向、環境問題への配慮からツバキ油への関心が高まり始めている。

1-2 ツバキ油の成分

ツバキ油、オリーブ油などの植物油は、主成分として脂

肪酸のグリセライドを含むが、数パーセントの含量でトリテルペンを含んでいる。オレイン酸が高含量であることが髪油としての有用性の高さと考えられてきたが、それ以外に微量に含まれるトリテルペンが、ツバキ油の髪油としての有用性 (安定性、吸収性、弾力性の向上など) を高めている可能性も十分考えられる。実際、近年の研究から、ツバキ油やサザンカ油には、 β -アミリン(1)、 α -アミリン(2)、ルペオール(3)などの植物界に広く分布するトリテルペンに加えて、カメリオール A(4)、カメリオール B(5)、カメリオール C(6)、サザンクオール(7)などのツバキ油特有のトリテルペンが含まれていることが判明した(引用文献 1)。

1-3 トリテルペンの生合成、オキシドスクアレン閉環酵素

トリテルペンは植物ステロール生合成の中間体であるオキシドスクアレン(8)から分岐して生合成される。トリテルペンの骨格はこの分岐反応を触媒する酵素 (オキシドスクアレン閉環酵素 (oxidosqualene cyclase, OSC)、あるいは、トリテルペン合成酵素と呼ぶ) によって作り出される。これまで β -アミリン合成酵素をはじめとして、複数の高等植物から 20 種を超える OSC がクローニングされている。近年、我々によってシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) からセコアミリン合成酵素が同定された(引用文献 2)。この酵素は、「OSC は直線状の基質から環構造をつくり出す酵素である。」というこれまでの概念に反し、開裂反応により一旦構築した環構造を破壊し、新骨格を創出する酵素であった。もし、このような OSC が普遍的に



Studies on the Biosynthesis of Triterpenes in Camellia Oil

Masaaki Shibuya

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

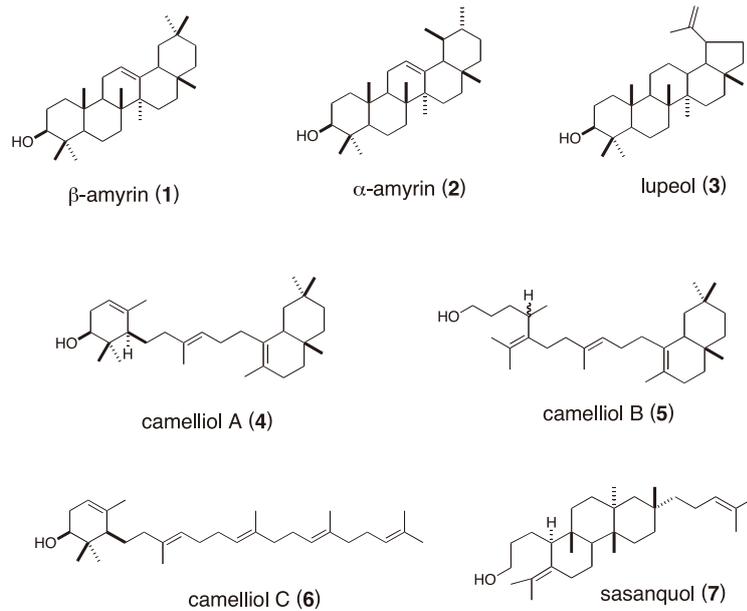


図1 ツバキ油に含まれるトリテルペン

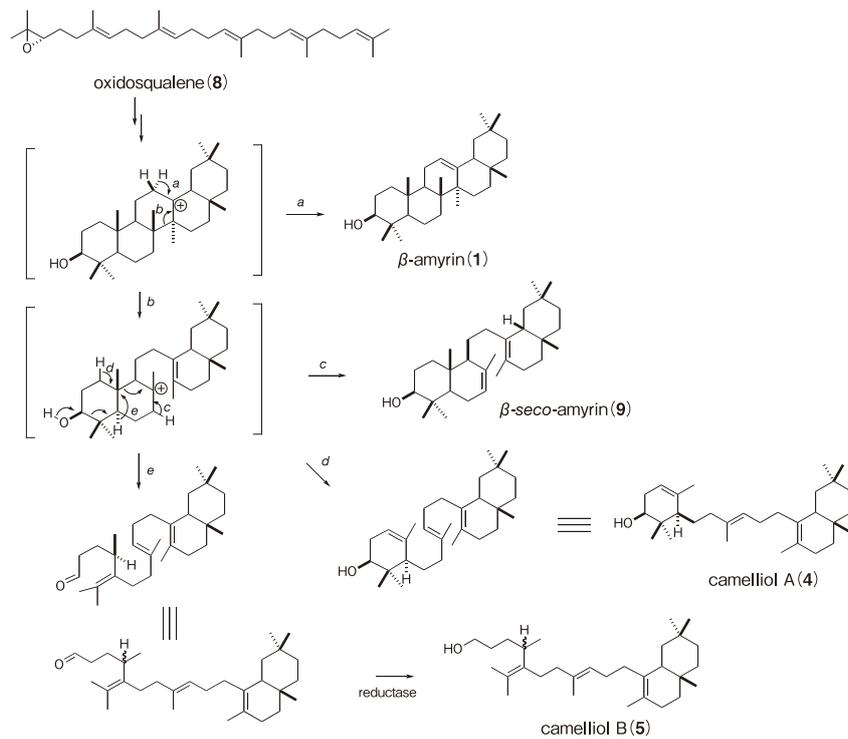


図2 セコトリテルペンの生合成機構

分布するならば、ツバキ油に含まれる開裂型トリテルペンであるカメリオール A、Bなどは、OSCにより直接生合成されるものと考えられる(図2)。すなわち、ツバキ種子には、シロイヌナズナ由来のセコアマリリン合成酵素と類似した反応を触媒するOSCが存在していると考えられる。しかし、これまでツバキのOSCに関する研究はなされていないため、ツバキにおけるトリテルペン生合成機構は全く不明である。

1-4 本研究の目的

ツバキのトリテルペンの生合成機構を明らかにできれば、生合成酵素遺伝子の高発現、あるいは抑制により、従来のものとはトリテルペンの種類と含量が異なったツバキ油を調製することが可能となる。本研究においては、ツバキの形質転換による品種改良を視野にいれ、ツバキ種子からトリテルペン合成酵素のクローニングを行う。

2. 実験、結果

2-1 ツバキ種子の収穫

平成18年7月に、東京大学本郷キャンパスに植樹されているツバキから種子を収穫した。種皮を剥皮後、直ちに液体窒素で凍結し、 -80°C にて保存した。

2-2 ツバキ種子から RNA の調製、及び、逆転写反応による cDNA の調製

凍結保存されていたツバキ種子を、液体窒素を加えながら乳鉢・乳棒を用いて粉碎した。破砕物からフェノールクロロフォルム法で Total RNA を調製した。さらに、GE 社の RNA purification kit を使用して精製し、mRNA を調製した。

この mRNA を鋳型とし、dT primer と superscript II を用いて逆転写反応を行った。得られた産物を以下の PCR の鋳型として用いた。

2-3 Nested PCR による中央部の増幅

既知 OSC に保存されているアミノ酸配列に基づいて 10 種のオリゴ DNA を合成した。

これらプライマーを組み合わせて上記 cDNA を鋳型に PCR を行なった。PCR 生成物をプラスミドベクターにサブクローニングし、総数 72 個のクローンの塩基配列を決定した。その結果、11 種にグループ分けすることができ、各クローンを CJ-01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11 と命名した。

2-4 RACE 法による塩基配列の決定

各クローンについて RACE 法 (引用文献 3) による塩基配列の決定を試みた。11 種のうち、8 種については何らかの理由により PCR の産物が全く得られなかった。PCR 産物が得られた cj-01, 08, 11 の 3 種のクローンについて RACE 法による塩基配列の決定を進めた。その結果、全 ORF の塩基配列を決定することができた。

2-4 全長クローンの取得、及び酵母での発現

cj-01, 08, 11 の 3 種のクローンの N 末、及び C 末に対応するオリゴ DNA を合成し、それらを用いて PCR を行い、3 種の OSC の全長クローンの DNA 断片を得た。それらを酵母発現ベクター pYES2 (Invitrogen) に組み込んだ。得られたプラスミドをラノステロール合成酵素欠損酵母株 GIL77 に導入した。

各プラスミドで形質転換した GIL77 を培養し、ガラクトース添加で導入遺伝子の発現を誘導した。

2-5 生成物の同定

GIL77 は、ラノステロール合成酵素が欠損しているために、ラノステロール合成酵素の基質となるオキシドスクアレンを酵母内に蓄積させる。GIL77 内で発現した OSC は、この蓄積したオキシドスクアレンと反応し生成物を与えるので、酵母に蓄積する生成物の構造を決定することにより、導入 OSC の機能を同定することができる。

ガラクトース添加で導入遺伝子の発現を誘導した酵母 (20 ml の培養) を遠心により集菌し、アルカリ添加後加熱により容菌した。ヘキササンで抽出し、抽出物を GCMS で解析した。

cj-01 は単一生成物を与え、GC の保持時間と MS の開裂様式が標品の β -アミリンと完全に一致したことから、生成物を β -アミリンと同定した。一方、cj-08 は、複数の生成物を与えた。GCMS で最も強度の大きかった生成物は、GC の保持時間と MS の開裂様式が標品の α -アミリンと完全に一致した。また次に強度が強かったものは、同様に標品との比較から β -アミリンと同定した。cj-11 の生成物は、cj-08 の生成物と同一であった。cj-08、及び cj-11 の生成物の組成は、これまで報告のある混合アミリン合成酵素のものとは一致していた。

以上の結果から、cj-01 を β -アミリン合成酵素、cj-08、及び cj-11 を混合アミリン合成酵素と同定した。

2-5 cj-01, -08, -11 の Minor 成分の検索

本研究においてツバキには少なくとも 11 種の OSC クローンが存在することが明らかになった。これまでのところ、3 種の OSC (cj-01: β -アミリン合成酵素、cj-08、及び cj-11: 混合アミリン合成酵素) を同定したが、残りの 8 種の OSC は得られていない。これら得られていない 8 種の OSC のいずれかがカメリオール A、及び B などのセコトリテルペンを生産する可能性が高いが、ツバキ油に含まれるセコトリテルペンの含量はごく微量 (引用文献 1) であるので、cj-01、cj-08、及び cj-11 が、微量ながらカメリオール A、及び B を生産する可能性も否定できない。そこで、酵母で発現した cj-01、cj-08、及び cj-11 の生成物の微量成分中にカメリオール A、及び B が含まれているかどうかを調べることにした。

各形質転換酵母を 1L 培養し、同様にアルカリ添加後加熱により容菌した。ヘキササンで抽出し、生成物を抽出した。抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラムで分離し、 β -アミリンを major に含むフラクションの前後のフラクションを GCMS で解析した。カメリオール A、及び B の標品を入手することが困難であったため、MS の開裂様式の文献値と比較して、カメリオール A、及び B が存在するかどうかを調べた。しかしながら、カメリオール A、及び B に相当するトリテルペンは検出できなかった。以上の結

果から、cj-01、cj-08、及びcj-11はカメリオール A、及び B の生合成に関与していないことが強く示唆された。

3. まとめと考察

ツバキ油に含まれるトリテルペン、特にセコ型トリテルペンの骨格生成に関与する OSC のクローニングをめざして、ツバキ種子から OSC のクローニングを行なった。既知 OSC に保存されているアミノ酸配列を利用して合成したプライマーを用いて PCR を行なったところ、11 種の OSC クローンの存在が明らかとなった。これらのうち、cj-01、cj-08、cj-11 の 3 種のクローンについて、RACE 法により全長配列の決定に成功した。これら 3 種の全長クローンを PCR により得、酵母酵母発現ベクターに組み込み、ラノステロール合成酵素欠損酵母株 GIL77 で異種発現させた。生成物を GCMS で解析し、cj-01 を β -アミリン合成酵素、cj-08 と cj-11 を混合アミリン合成酵素と同定した。cj-01、cj-08、及びcj-11 の酵母における微量生成物を調べたが、カメリオール A、及び B に相当するトリテルペンは検出できず、cj-01、cj-08、及びcj-11 はカメリオール A、及び B の生合成に関与していないと思われる。

クローニングが成功しなかった 8 種の OSC の中にカメリオール A、及び B の生合成に関与する OSC が含まれる可能性が高い。ツバキ油のカメリオール A、及び B の

含量は少なく、もしこれら 8 種の中に目的の OSC が含まれているとしたならば、そのツバキでの発現量は含量に比例して極めて少ないと予想される。発現量の少なさが RACE 法による DNA 断片の増幅を困難にしている可能性が高いと思われる。本研究期間の後半では、そのような視点に立ち、微量 RNA を効率的に増幅可能な改良 RACE 法 (Clontech 社の SMART RACE cDNA 増幅キットなど) を用いて未クローニングの 8 種の OSC のクローニングを試みたが、成功することができなかった。

考えられるクローニング未成功のもう一つの理由として、種子の収穫時期とカメリオール A、及び B の生合成時期の相違、あるいは RNA 調製に用いた部位と生合成の場所との相違が考えられる。種子の収穫時期の変更、葉など種子以外からの RNA の調製などの試行が必要と思われる。

カメリオール A、及び B を生成物として与える OSC のクローニングの未成功は、「OSC はセコトリテルペンに関与しないのでは？」という疑念を生じさせる。すなわち、 β -アミリンなどの閉環産物を基質として、その二重結合にプロトネーションシカルボカチオンを生じさせて反応を進行させる異性化酵素が存在し、その異性化酵素がカメリオール A、及び B の生合成に寄与している可能性を考慮する必要性が生じる。

本研究と独立して、セコトリテルペンであるヘリアノ

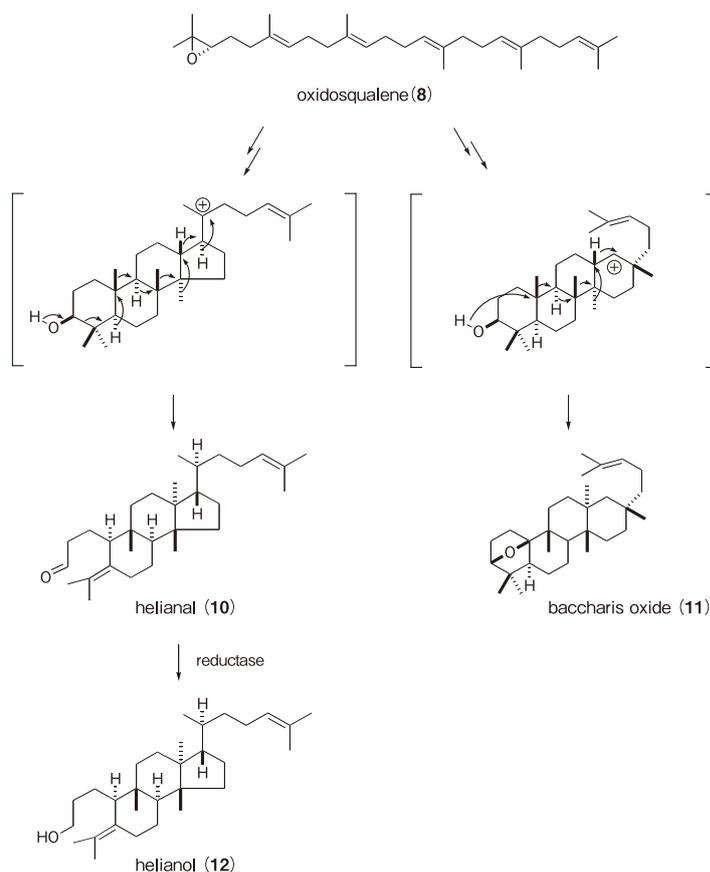


図3 ヘリアノールおよびバックカリスオキサイドの生合成

ール(12)の単離が報告されているヒマワリ (*Helianthus annuus*)の管状花、及びB環開裂型オレアナン骨格のトリテルペンが報告されている *Stevia viscida* 及び *Stevia eupatoria* (引用文献4)の同族植物 *Stevia rebaudiana* の根から、本研究と同様の手法によりセコテルペン合成酵素のクローニングを試みた。

その結果、*S. rebaudiana* からはバッカリスオキシド合成酵素(引用文献5)、ヒマワリからはヘリアナール合成酵素のクローニングに成功した。バッカリスオキシド(11)はセコトリテルペンではないが、ヘリアナールは標的としたセコトリテルペンである。ヒマワリ由来ヘリアナール合成酵素は、セコトリテルペンを生成物として与えるシロイヌナズナ由来以外OSCの初めての例である。このことから、セコトリテルペンを生成物として与えるOSCは、セコトリテルペン生産植物に存在することが強く示唆される。ツバキにおいても、セコトリテルペンの生産に関与す

るOSCが存在しているものと思われる。早期にクローニングを成功させ、ツバキの形質転換の足場を築きたいと考えている。

(引用文献)

- 1) T. Akihisa, K. Koike, Y. Kimura, et. al., *Lipids*, 34, 1151-1157 (1999).
- 2) M. Shibuya, T. Xiang, Y. Katsube, et.al., *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 1450-1455 (2007).
- 3) M.A. Frohman, M.K. Dush, et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8998-9002 (1988).
- 4) L.U.Roman, D.Guerra-Ramirez, et. al. *Org. Lett.* 6, 173-176 (2004).
- 5) M. Shibuya, A. Sagara, et. al., *Org. Lett.*, 10, 5071-5074 (2008).