

審査の結果の要旨

氏名 森田 真代

高等植物には、ステロール前駆体となるサイクロアルテノールの他に、共通の前駆体オキシドスクアレンより生合成される β -アミリン、 α -アミリン、ルペオール等のトリテルペンが存在し、生薬の有効成分であるサポニン等の前駆体となっている。ステロール類は真核生物において必須の化合物であり、哺乳動物のコレステロール生合成系については精力的な研究が進んでが、植物のトリテルペンやサポニンは二次代謝産物に分類され、これらの生合成調節機構及び生理的役割に関してはほとんど解明されていない。ステロールとトリテルペンの生合成は、サイクロアルテノール合成酵素（一次代謝系）及びトリテルペン合成酵素（二次代謝系）の段階で分岐しており、トリテルペン合成酵素は、両代謝系の制御研究や、有用植物二次代謝産物大量供給系開発のための鍵酵素と考えられる。本論文の著者は、植物のトリテルペンやサポニンの生理的機能の解明を目指し、(1) エンドウ由来新規トリテルペン合成酵素のcDNAクローニング、(2) エンドウ発芽時におけるトリテルペン生合成の経時変化解析、(3) ルペオール合成酵素アンチセンスDNAによる形質転換シロイヌナズナの作製、を行っている。

(1) エンドウ由来トリテルペン合成酵素のcDNAクローニング

トリテルペン生合成の経時変化解析に先立ち、先ず、エンドウ (*Pisum sativum*) から新規トリテルペン合成酵素cDNAのクローニングを行った。エンドウ種子には β -アミリンと α -アミリンが主トリテルペン成分として存在しており、当研究室において、サイクロアルテノール合成酵素および β -アミリン合成酵素精製の酵素源に用いられている。すでにサイクロアルテノール合成酵素cDNA (PSX) は修士課程の研究でクローニングしているが、トリテルペン合成酵素cDNAは未だ得られていなかった。トリテルペン合成酵素cDNAとして β -アミリン合成酵素cDNA以外に、新規な α -アミリン合成酵素cDNAが得られる可能性があり、既知のオタネニンジン由来 β -アミリン合成酵素cDNA (PNY) の配列情報を用いて、縮重入りプライマーをデザインし、RT-PCR法によるクローニングを行った。

その結果、トリテルペン合成酵素cDNAの断片と思われるクローンPSYとPSMが得られ、各クローンについてRACE法を用いて伸長し全長配列を決定した。ついで、各クローンを酵母で発現させることにより、PSYが β -アミリン合成酵素、PSMが複数の生成物を与える多機能型新規トリテルペン合成酵素であることを明らかにした。各種スペクトルの詳細な解析により、PSMの生成物は、主に α -アミリンと β -アミリンであり、これ以外に7種類のトリテルペン生成物が同定された (Fig. 1.)。 α -アミリンを生成するトリテルペン合成酵素はこれが最初の報告であり、PSMをエンドウの混合アミリン合成酵素 (Mixed amyrin synthase) と命名し

ている。天然物として80種以上の異なる骨格のトリテルペンが報告されているが、骨格の数に対応する生成物特異的酵素が存在するわけではないこと、また、多くの植物において α -アミリンが β -アミリンと共に単離されることから、PSM型の酵素が植物界に普遍的に存在することが考えられ、天然トリテルペンの多様性の起源を探る上で重要な知見である。また、PSMの生成物として同定された微量トリテルペンは、全てオキシドスクアレンから α -アミリンが生成する過程において想定される中間体カルボカチオンから派生しており、環化反応の際の中間体カルボカチオンの存在を支持するものである。

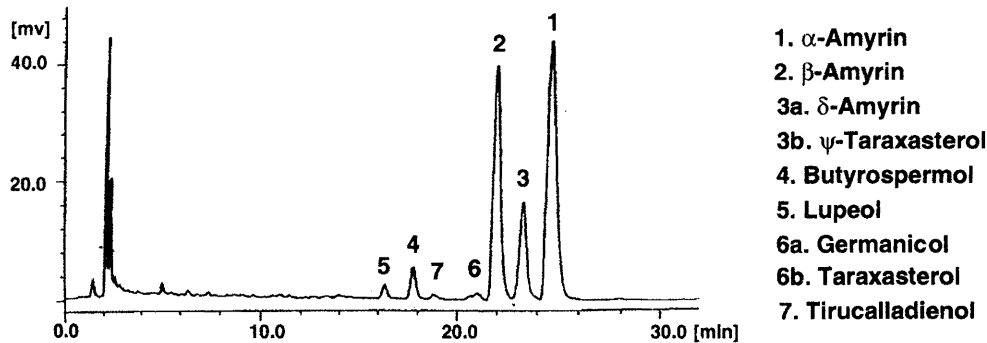


Fig. 1. HPLC profile of PSM products

(2) エンドウ発芽時におけるトリテルペン生合成の経時変化解析

植物種子の発芽過程では劇的な形態変化が起こっており、この過程における二次代謝の発現制御にも注目される。そこで、エンドウ発芽過程における一次代謝及び二次代謝の活性化の変化を、ステロール及びトリテルペン生合成の経時変化により解析することを計画し、エンドウ由来サイクロアルテノール合成酵素及び(1)で得たトリテルペン合成酵素cDNAを用いノーザン解析を試みた。

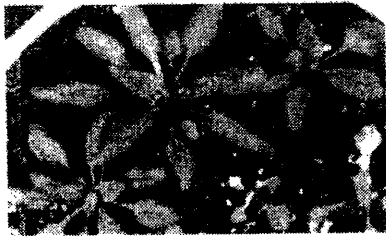
エンドウのサイクロアルテノール合成酵素(*PSX*)、 β -アミリン合成酵素(*PSY*)、混合アミリン合成酵素(*PSM*)各cDNAから調製したRNAプローブを用いたノーザン解析の結果、*PSX*及び*PSM*のmRNA蓄積量が発芽後わずかな増加傾向を示したのに対し、*PSY*mRNA蓄積量は、発芽後1日目で著しく増大することを明らかにした。次いで、ミクロソーム画分における*in vitro*の酵素活性の解析から、 β -アミリン合成酵素活性が水浸2日目に顕著に上昇することを明らかにした。また、この間の種子中のトリテルペン画分を分析し、内生総トリテルペン量はほぼ一定であり β -アミリンと α -アミリンが約5:1の比で存在していること、サイクロアルテノールはほとんど検出されず速やかに植物ステロールへと代謝されていることを示している。

発芽過程において、*PSY*mRNA蓄積量及び β -アミリン合成酵素活性が増大するのに対し、 β -アミリン蓄積量がほとんど変化しないことは、 β -アミリンがさらにサポニン等へ代謝されている可能性を示唆しており、発芽時に β -アミリンに由来するサポニン生合成が活性化され植物内で防御物質として働いている可能性を議論している。

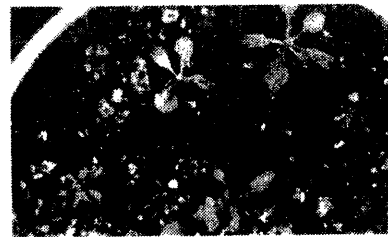
(3) トリテルペン合成酵素アンチセンスシロイヌナズナの作製

分子生物学的なアプローチが最も進んでいるシロイヌナズナをモデル植物として、トリテルペン合成酵素遺伝子のアンチセンス形質転換植物を作成し、植物トリテルペンの生理的役割の解明を試みた。導入したトリテルペン合成酵素は同植物由来のルペオール合成酵素LUP1であり、アンチセンスシロイヌナズナのphenotype及びchemotypeを解析している。

LUP1 ORFを、植物形質転換用のアグロバクテリウムのベクターpBIXの35 Sプロモータ下流にアンチセンス方向で導入し、このプラスミドで形質転換したアグロバクテリウムGV3101pMP90を用いた湿潤法によりシロイヌナズナを形質転換した。LUP1アンチセンス植物体第一世代 (T1) はコントロールに比し著しい矮性を示した (Fig. 2)。次いで、T2世代における内生トリテルペン量を分析し、LUP1アンチセンス植物体ではルペオール蓄積量が検出限界以下であることを確認している。このことから、ルペオールの欠損と矮性形質が対応していることが証明され、LUP1により生合成されるルペオールあるいはその代謝物が、植物の正常な発育に何らかの形で関与することを明らかにした。



pBIX (void vector)



pBIX-LUP1A (LUP1 antisense)

Fig. 2. Phenotype of T1 progeny

以上本研究は、 α -アミリンをはじめとする多種類のトリテルペン生成物を与える新規トリテルペン合成酵素cDNAを初めて単離するとともに、エンドウ発芽時におけるトリテルペン生合成の経時変化及びトリテルペン合成酵素アンチセンスシロイヌナズナの作製により、植物トリテルペン及びサポニンの生理的役割に迫ったもので、今後の植物二次代謝産物生合成の制御及び有用二次代謝産物の効率的生産系開発のため極めて有用な知見であり、天然物化学、薬用植物学の発展に寄与するところが大きく、博士 (薬学) の学位に値する研究であると認めた。