

審査の結果の要旨

氏名 張 紅

植物において、 β -シトステロールなどの植物ステロールは細胞膜の構成成分やホルモンの前駆体として極めて重要な化合物である。一方、植物にはステロールの他に、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、ルペオール等の多様な骨格をもったトリテルペンが二次代謝産物として存在しており、これまで、80種以上のトリテルペン骨格が知られている。これらの骨格はすべてオキシドスクアレン閉環酵素により形成される。本論文はトリテルペン骨格多様性の起因を解明し、合理的なデザインによる新規トリテルペン骨格を持つ非天然型天然化合物の創出を目指し、(1) シラカンバ培養細胞由来オキシドスクアレン閉環酵素のcDNAクローニング、(2) オキシドスクアレン閉環酵素の分子進化の解析、(3) オキシドスクアレン閉環酵素の活性部位の標識の検討、を行ったものである。

1. シラカンバ培養細胞由来オキシドスクアレン閉環酵素のcDNAクローニング

シラカンバ(*Betula platyphylla* var. *japonica*)の葉には主にダンマラン骨格を持ったベチュラフォリエントリオール (*Betulafolienetriol*)、樹皮にはルパン骨格を持ったベチュリン (*Betulin*) とオレアナン骨格を持ったオレアノール酸 (*oleanolic acid*) などのトリテルペンが存在することが知られている。このように一つの植物中に見いだされるトリテルペン骨格は複数個あるものの、これまで一つの植物から生成物特異性の異なる複数個のトリテルペン合成酵素がクローニングされた例はない。そこで、同一植物中に存在する複数個のトリテルペン骨格は複数個のトリテルペン合成酵素の共存によりもたらされている事を証明するために、シラカンバ培養細胞よりトリテルペン合成酵素のクローニングを行った。その結果、4種類のクローンを得、酵母での発現による機能解析を行ったところ、それらは、2種のサイクロアルテノー

ル合成酵素 (BPX1、BPX2)、ルペオール合成酵素 (BPW)、 β -アミリン合成酵素 (BPY) であることが判明した。以上の結果から、シラカンバではルペオールと β -アミリンはそれぞれ固有の酵素により生成することが明らかになった。また、1種の植物から2種のサイクロアルテノール合成酵素をクローニングしたのは最初の例であり、それぞれが植物内で異なった役割をもっている可能性が示唆された。

2. 分子進化の解析

今回得られた4個のクローンを含め、これまで得られたオキシドスクアレン閉環酵素と機能未同定の閉環酵素の配列に対して、これらのクローン間の相同性を計算し、系統樹を作成した。

その結果、幾つかの未同定のクローンがあるが、起源植物が異なっても酵素機能が同一のものは一つの分枝を形成していることが明らかとなった。同一の機能をもったクローンが一つの分枝を形成するのは他のモノテルペン、ジテルペン、セスキテルペン閉環酵素においては見られず、トリテルペン合成酵素において特徴的である。また、分子進化と酵素機能の間に相関を見だし、新規トリテルペン骨格創出への手がかりを得たものと考えられる。

3. オキシドスクアレン閉環酵素の活性部位の検討

これまでオキシドスクアレン閉環酵素のX線結晶解析はなされておらず、活性部位の構造は明らかになっていない。今後、酵素機能の改変を行うには活性部位の同定が必須であり、基質類縁体の酵素活性部位への結合による活性部位の同定を試みることにした。基質類縁体である24-メチル基をビニル基に置換した24-メチリデンオキシドスクアレン(24-MOS)をデザイン合成した。このリガンドが、5環性トリテルペン合成酵素の活性部位に取り込まれ、本来の基質と同様に反応が進行すると、ルペニルカチオンに対応するアリルカチオン中間体が生成し、これが活性中心近傍に存在する求核性アミノ酸残基の求核攻撃を受け、共有結合を形成し酵素反応を阻害するものと予想した。各酵素に対する阻害活性を検討したところ、サイクロアルテノール合成酵素には全く阻害活性を示さなかったが、ルペオール合成酵素、 β -ア

ミリン合成酵素に対しては、強い阻害活性が見られた。サイクロアルテノールの生成では末端二重結合は閉環反応に関与しないため阻害活性がみられないと推測され、また、ルペオール合成酵素、 β -アミリン合成酵素に対しては、24-MOSが予想どおりに反応し、阻害活性をもたらしたものと、推測される。また、ルペオール合成酵素、 β -アミリン合成酵素の阻害活性のプリインキュベーションに対する時間依存性を調べたところ、阻害活性が時間依存的に増強され、24-MOSが活性部位の求核性アミノ酸残基と結合することにより阻害している可能性が示唆された。さらに、トリチウム標識した24-MOSを用いた解析より、24-MOSがルペオール合成酵素タンパクへ共有結合していることが強く示唆された。

以上、シラカンバ培養細胞より、4種のオキシドスクアレン閉環酵素のcDNAクローニングに成功した。この結果により同一植物中に生成物特異性の異なる複数のトリテルペン合成酵素が共存していることを証明した。系統樹作成によるオキシドスクアレン閉環酵素の分子進化の解析を行い、反応機構と分子進化に相関関係を見だし、今後の分子生物学手法による非天然型トリテルペン骨格の創出への大きな手がかりを得た。また、24-MOSのルペオール合成酵素と β -アミリン合成酵素に対する選択的な阻害活性を見だし、活性部位との共有結合の可能性を示唆する結果を得た。本研究により見出された高等植物におけるトリテルペン生合成機構についての新知見は、天然物化学、薬用植物学の発展に大きく寄与するものであり、本論文は、博士（薬学）の学位論文として十分価値あるものと認定した。