

論文の内容の要旨

論文題目：植物組織培養によるジテルペンの生合成研究

氏名：楊 金 璋

植物が生産する二次代謝産物は医薬、香料、色素などとして人間に広く利用されているため、植物体内での生合成が注目されている。植物成分の生合成研究の材料として、植物組織培養は環境制御、材料の入手及び投与物質の吸収性などの点で原植物より優れ、植物成分の生合成研究によく利用されている。一方、ジテルペンは四つの isopentenyl diphosphate (IPP) ユニットからなる geranylgeranyl diphosphate (GGPP) を共通の前駆体として生合成される炭素数 20 の化合物群であり、植物界に広く分布している。ジテルペンの多くは環状化合物として存在し、多種類の閉環反応はその環状骨格の多様性に寄与している。そこで、私は A 環と B 環が $5\alpha\text{-H}$, $10\beta\text{-CH}_3$ になるよう環化された normal type ジテルペンと $5\beta\text{-H}$, $10\alpha\text{-CH}_3$ になるよう環化された *ent* type ジテルペンに注目し、チャボガヤとヤマトリカブトの培養組織を用い、アビエタン型とアコナン型のジテルペンの生合成研究を行った。

第 1 部 チャボガヤ (*Torreya nucifera* var. *radicans*) 組織培養によるアビエタン型ジテルペンの生合成研究

アビエタン型ジテルペンは A 環と B 環が $5\alpha\text{-H}$, $10\beta\text{-CH}_3$ になるよう環化された 3 環性で isopropyl 基を持つことを特徴とするジテルペンであり、樹脂の主成分としてよく知られている。一方、チャボガヤはイチイ科カヤ属に分類される裸子植物で、カヤ (*Torreya nucifera*) の変種である。チャボガヤの葉からカルスを誘導し、誘導されたカルスを D10CCM-NH_4^+ 液体培地で培養し、その液体培

養細胞は hinokiol を代表とする七つのアビエタン型ジテルペンを生産することを明らかにした。

Hinokiol を例とすると、一般にアビエタン型ジテルペンの生合成は Fig. 1 に示すように考えられている。すなわち、IPP とその異性体 DMAPP の縮合により GGPP を生成した後、末端二重結合のプロトネーションにより、最初の A 環と B 環が $5\alpha\text{-H}$, $10\beta\text{-CH}_3$ になるよう環化した(+)-CDP を経て、さらに脱リン酸による C 環の環化の後、メチル基がシフトすることにより生合成される。しかし、その IPP 単位の生合成由来及びアビエタジエン閉環酵素の反応機構などについてはまだ明らかにされていない。

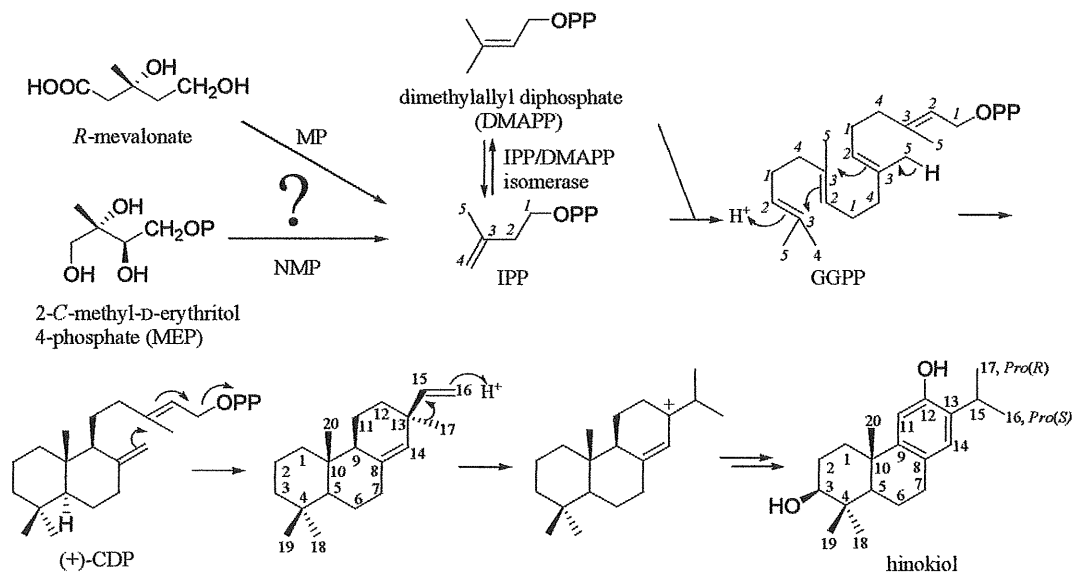


Fig. 1. Biosynthetic pathway of hinokiol. The numbers in italic represent the carbon positions in IPP; the numbers in roman represent the carbon positions in hinokiol.

構成単位 IPP の生合成

IPP 構成単位の由来：IPP は従来メバロン酸経路 (MP) により生合成されると考えられてきたが、近年メバロン酸の代わりに MEP を経由する、いわゆる非メバロン酸経路 (NMP) が真菌などのバクテリアに発見された。一方、高等植物においては、MP と NMP がともに存在するが、それぞれ色素体と細胞質に局在すると考えられ、色素体で生成されるジテルペンの IPP が MP ではなく、NMP 由来である例も報告されている。なお、この二つの経路は ^{13}C ラベルのグルコースと酢酸ナトリウムの投与実験により、IPP への ^{13}C の取込みパターンの違いから区別することができる。

チャボガヤ培養細胞に ^{13}C ラベルのグルコースと酢酸ナトリウムを投与したところ、hinokiol の四つの IPP 単位には MP と NMP の両方に由来する取込みパターンを示し、MP と NMP がともに関与することが明らかになった。さらに、4 番目の IPP (終端 IPP) は前の三つの IPP (farnesyl diphosphate, FPP) と比べて、NMP 由来の割合が高く、MP 由来の割合が低いため、GGPP の生合成において終端 IPP と FPP 部分が異なっていると考えられる (Fig. 2)。

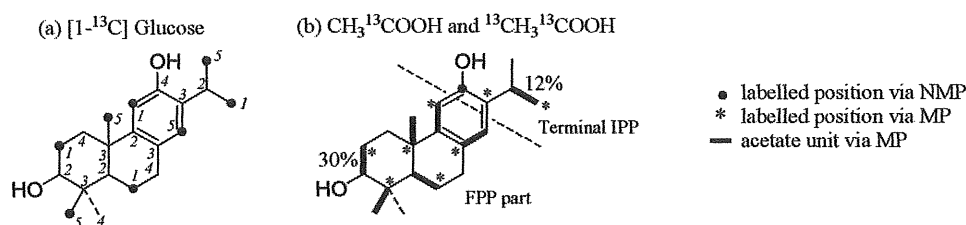


Fig. 2. ^{13}C labelling patterns of hinokiol from $[1-^{13}\text{C}]$ glucose (a), $\text{CH}_3^{13}\text{COOH}$ and $^{13}\text{CH}_3^{13}\text{COOH}$ (b) via MP and NMP. %: ^{13}C -coupled satellite signal intensity relative to the overall ^{13}C intensity.

Abietane synthase (AS) の cDNA クローニング

GGPP からアビエタン骨格までの一連の生成反応がオオモミとイチョウにおいては一つの酵素 (AgAS と GbAS) で触媒され、さらに脱プロトンの位置の違いにより多種類の生産物を与えると報告されている。そこで、私は AgAS と GbAS のアミノ酸配列よりプライマーをデザインし、チャボガヤ培養細胞から AS の cDNA クローニングを試みた。クローニングされた cDNA (TnX) の ORF は 2586bp であり、アミノ酸レベルで AgAS、GbAS とそれぞれ 65%、57% の高い相同性を示し、AS をコードしていることが示唆された。

結果及び考察

チャボガヤ培養細胞におけるアビエタン型ジテルペンを構成する IPP 単位の生合成にはメバロン酸経路と非メバロン酸経路の両方が関与することを明らかにした。さらに、末端 IPP は FPP 部分と比べ、メバロン酸経路由来の割合が少なく、非メバロン酸経路由来の割合が多く、末端 IPP と FPP 部分が生合成上異なっていると考えられた。この結果から、細胞質でメバロン酸経路により生合成される IPP 及び FPP の色素体への移行速度の違いが示唆された。一方、チャボガヤ培養細胞からクローニングされた TnX は既知の AS と高いアミノ酸相同性を示したため、AS をコードすると考えられる。今後、TnX の機能同定に伴って、アミノ酸残基の役割及びアビエタン型ジテルペンの生合成経路のさらなる解明が期待される。

第 2 部 ヤマトリカブト (*Aconitum japonicum*) 組織培養によるアコナン型ジテルペンアルカロイドの生合成研究

アコナン型ジテルペンアルカロイドはジテルペンの 20 個の炭素のうち 1 個が失われた 19 個の炭素を基本骨格とし、A、B 環が $5\beta\text{-H}$ 、 $11\alpha\text{-CH}_3$ になるよう環化され、七員環 1 個、五員環 2 個と六員環 3 個よりなる六環式の構造を持つアルカロイド群である。一方、ヤマトリカブトはキンポウゲ科に属する多年草であり、その毒性はアコナン型ジテルペンアルカロイド由来である。ヤマトリカブトの葉から培養根を誘導し、誘導された培養根を NK 液体培地で培養し、その培養根から *transaconitine A* が主なアコナン型ジテルペンアルカロイドとして単離された。アコナン型ジテル

ペンアルカロイドは毒成分としてよく知られているが、その生合成については炭素骨格の転位によるアコナン骨格の生成、N の由来及び閉環反応酵素などを含めて、まだ明らかにされていない。

ジテルペン骨格及び置換基の生合成：

(1) アコナン骨格の転位：[1-¹³C]グルコースを投与したところ、アコナン骨格を構成する IPP 単位には NMP 由来の ¹³C の取込みパターンが観測され、さらにこの取込みパターンから Fig. 3 に示した GGPP からアコナン骨格までの炭素転位を推測することができる。

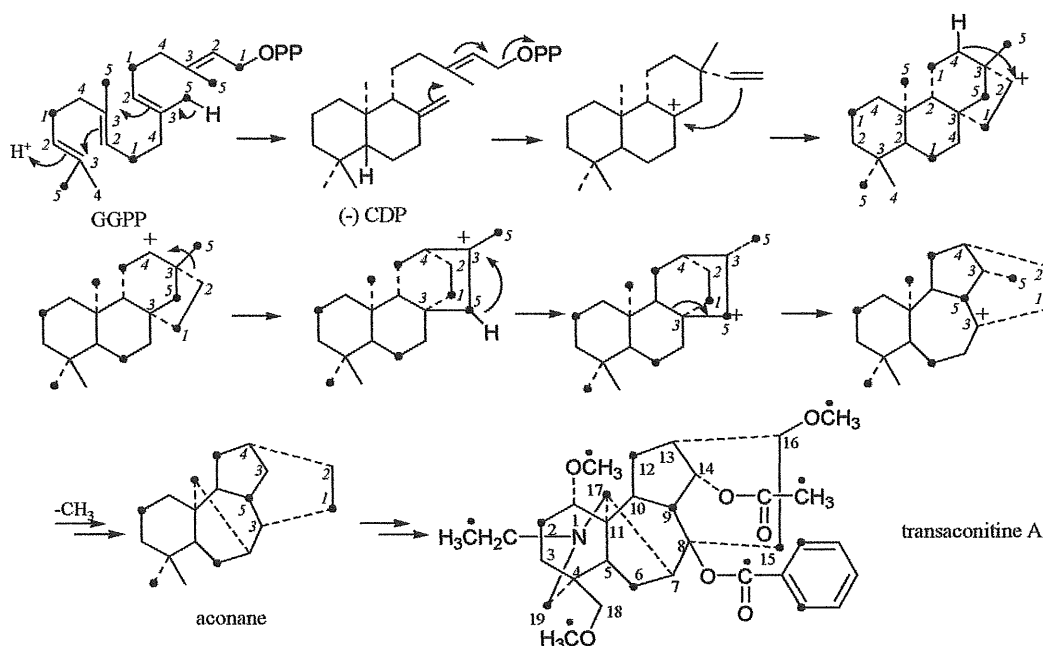


Fig. 3. Proposed biosynthetic pathway and labelling pattern of transaconitine A from [1-¹³C] glucose. The numbers in italic represent the carbon positions in IPP; the numbers in roman represent the carbon positions in transaconitine A.

(2) 置換基の生合成：¹³C ラベルのグルコース、酢酸ナトリウム及びメチオニンの投与実験から、14-COCH₃基は CH₃CO-S-CoA 由来、1-, 16-と 18-OCH₃基はメチオニン由来、8-benzoyl 基はシキミ酸経路由来であることを明らかにした。

(3) N-CH₂-CH₃ の生合成：¹³C ラベルのアラニンの投与実験では N-CH₂-CH₃ への ¹³C の取込みが観測されず、アラニン由来ではないと分かった。一方、¹³C ラベルのグルコースの投与実験では N-CH₂-CH₃ 中の -CH₃ のみが ¹³C にラベルされ、さらに[methyl-¹³C]メチオニンの投与実験よりこの -CH₃ がメチオニン由来であることを明らかにした。この結果より、N-CH₂-CH₃ は炭素骨格に N-CH₃ の付加とその後のメチル化により生合成されることが考えられ、今後ラベル体のグリシンを投与し、N-CH₃ の起源を解明する予定である。

GGPP からアコナン骨格までの閉環反応に関わる酵素の cDNA クローニング

アコナン型ジテルペンアルカロイドのアコナン炭素骨格は植物ホルモンジベレリンの前駆体 *ent*-kaurene と同じように、最初の A と B 環が 5β -H と 10α -CH₃ になるよう環化されているため、GGPP から末端二重結合のプロトネーションにより (-)-CDP を生成する反応までは共通であると考えられる (Fig. 4)。ヤマトリカブト培養根から RT-PCR により CPS の cDNA をクローニングしたところ、それぞれ 792 と 783 アミノ酸をコードする 2 種類の cDNA, AJX と AJY を得た。AJX と AJY はそれぞれ *Lactuca sativa* の CPS と 44%, 47%, *Zea mays* 由来の CPS と 38%, 40% のアミノ酸の相同性を示しており、いずれもプロトネーションによる閉環反応の DXDD モチーフが保存されていたため、AJX と AJY が両方とも CPS をコードすると考えられる。AJX を大腸菌で発現させ、*in vitro* assay により CPS であると同定できたが、AJY の酵素活性について現在検討中である。

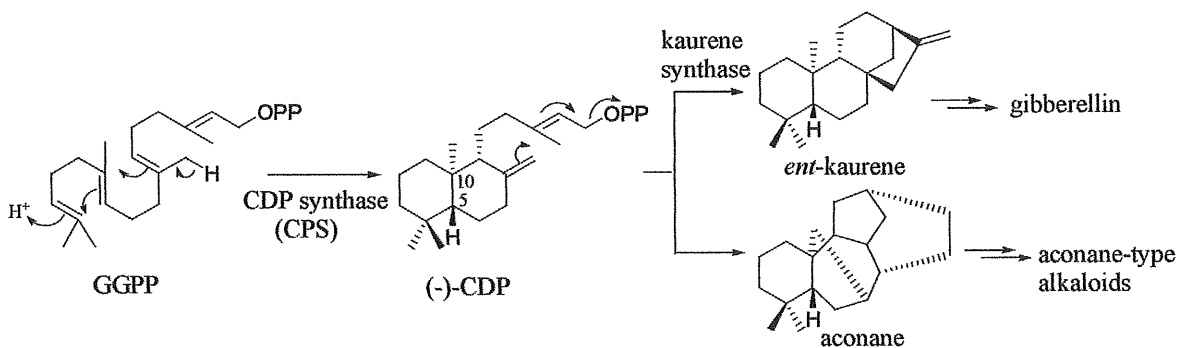


Fig. 4. (-)-CDP is a common intermediate to gibberellin and aconane-type alkaloids

結果及び考察

アコナン骨格を構成する IPP 単位の生合成には非メバロン酸経路が関与することを明らかにした。さらにその取り込みパターンより、GGPP からアコナン骨格までの炭素骨格の複雑な転位反応を推測することができた。次に、*transaconitine A* のアセチル基、メトキシル基及びベンゾイル基はそれぞれアセチル CoA, メチオニン及びシキミ酸経路由来であることを明らかにした。また、その窒素の由来についてはアコナン骨格に N-CH₃ の導入とその後のメチル化により生合成されると考えられ、今後、ラベル体のグリシンの投与実験を行い、N-CH₃ の生合成由来を解明する予定である。一方、ヤマトリカブトの培養根からクローニングされた AJX と AJY はアミノ酸レベルで既知の CPS と高い相同性を示し、両者は CPS をコードすると考えられる。大腸菌での発現及び *in vitro* 酵素活性の検討から、AJX がヤマトリカブトの CPS であると同定できたが、AJY については現在検討中である。なお、GGPP から (-)-CDP までの閉環反応は植物ホルモンジベレリンと共通であり、ジベレリンの生合成に関わる CPS は発現の量、部位及び時期などが厳しくコントロールされていると考えられ、二つの CPS の存在によりアコナン型ジテルペンアルカロイドとジベレリンの生合成が別々の CPS により触媒されると考えられる。