

## 審査の結果の要旨

氏名 楊 金 璋

植物二次代謝産物の生合成研究の材料として、植物培養組織はその実験再現性および投与物質のとりこみなどの点で原植物より優れている。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。楊はA環とB環の閉環様式が $5\alpha\text{-H}$ ,  $10\beta\text{-CH}_3$ であるnormal typeジテルペンとしてチャボガヤ培養細胞より得られるアビエタン型ジテルペンに、A環とB環の閉環様式が $5\beta\text{-H}$ ,  $10\alpha\text{-CH}_3$ であるent typeジテルペンとしてトリカブト培養根より得られるアコナン型ジテルペンアルカロイドにそれぞれ着目し、その生合成研究を行った。論文はこの2種類の化合物について第1部と第2部に分けて記述されている。

### 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

まず、チャボガヤの葉から誘導された培養細胞が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。この培養細胞に $^{13}\text{C}$ ラベルのグルコースと酢酸ナトリウムを投与することにより、得られたhinokiolへの $^{13}\text{C}$ ラベルの取り込みからその生合成経路を推定することができる。

### 構成単位IPPの生合成

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。

チャボガヤ培養細胞に $^{13}\text{C}$ 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由来の割合が低い場合、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た。

### 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ヨ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、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。

## 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。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、*transaconitine A*を主なアコナン型ジテルペンアルカロイドとして単離した。トリカブト属植物より多種類のアコナン型ジテルペンアルカロイドが単離・構造決定されているが、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、まったく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- $^{13}\text{C}$ ]グルコース投与実験より、アコナン骨格を構成するIPP単位はNMP由来の $^{13}\text{C}$ の取込パターンが観測された。さらに、この取込みパターンよりGGPPからアコナン骨格までの骨格転位を推測することができた。

各種 $^{13}\text{C}$ ラベル前駆体の投与実験から、14-位アセチル基はアセチルCoA由来、1-, 16-と18-位メトキシル基はメチオニン由来、8-位ベンゾイル基はシキミ酸経路由来であることを明らかにした。

N- $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ の生合成については $^{13}\text{C}$ ラベルのアラニンが取り込まれないこと、 $^{13}\text{C}$ ラベルグルコース、[methyl- $^{13}\text{C}$ ]メチオニンの投与実験よりN- $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ の中の- $\text{CH}_3$ のみが $^{13}\text{C}$ にラベルされること等より、N- $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ は炭素骨格にN- $\text{CH}_3$ 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た。

### 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、A環とB環が $5\beta\text{-H}$ と $10\alpha\text{-CH}_3$ 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(-)-copalyl diphosphate (CDP)を生成する反応までは共通であると考えられる。ヤマトリカブト培養根からRT-PCRにより(-)-copalyl diphosphate synthase (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はそれぞれレタスのCPSと44%, 47%, トウモロコシ由来の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た。AJXを大腸菌で発現させ、*in vitro* assayによりCPSであると同定した。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。

以上まとめると、楊は閉環様式の異なる2種類のジテルペン化合物に着目し、その生合成を安定同位体標識前駆体投与実験により明らかにした。また、それぞれの生合成初期段階である閉環反応を触媒する酵素遺伝子のクローニングに成功し、その一部については遺

伝子産物の*in vitro*での酵素活性も検出し、機能を同定した。とくに、アコナン型ジテルペンアルカロイドの生合成研究は多くの研究者の試行・断念が繰り返されており、これらの点からも薬用植物学への貢献も大きく、博士（薬学）に相応しいものと判定した。