

論文の内容の要旨

論文題目 ステロイドサポニンの生合成研究

氏 名 河野 徳昭

Costus speciosus (Costaceae)は、dioscin や gracillin などのステロイドサポニンを大量に生産する単子葉植物である。当研究室では本植物を用いステロイドサポニン生合成経路における鍵酵素探索を基軸とした研究を展開しており、これまでに、furostan 型配糖体から spirostan 型配糖体への変換を触媒する furostanol glycoside 26-O- β -glucosidase (CsF26G)のクローニングなどに成功している¹⁾。本植物のステロイドサポニンの生合成初期段階は植物に普遍的に存在する β -sitosterol など植物ステロールと共通と考えられる。しかしながら植物ステロールとステロイドサポニンの生産調節、すなわち一次代謝系と二次代謝系の分岐点に関する知見は未だ得られていない。

そこで、ステロイド生合成経路の鍵酵素と考えられるいくつかの酵素に着目し、それらの分子生物学的性状を調べることにより、一次代謝系と二次代謝系の分岐点を解明することを目指し、ステロイド生合成遺伝子群の分子クローニングを行うこととした。また、獲得した遺伝子群の機能解析のため、それらの酵母における共発現系を構築することによりステロイド生合成経路の部分的再構成を試みた。

Cycloartenol 合成酵素の cDNA クローニングおよび機能解析

Cycloartenol 合成酵素は oxidosqualene 閉環酵素(OSC)の一種であり、ステロイド骨格形成の初期

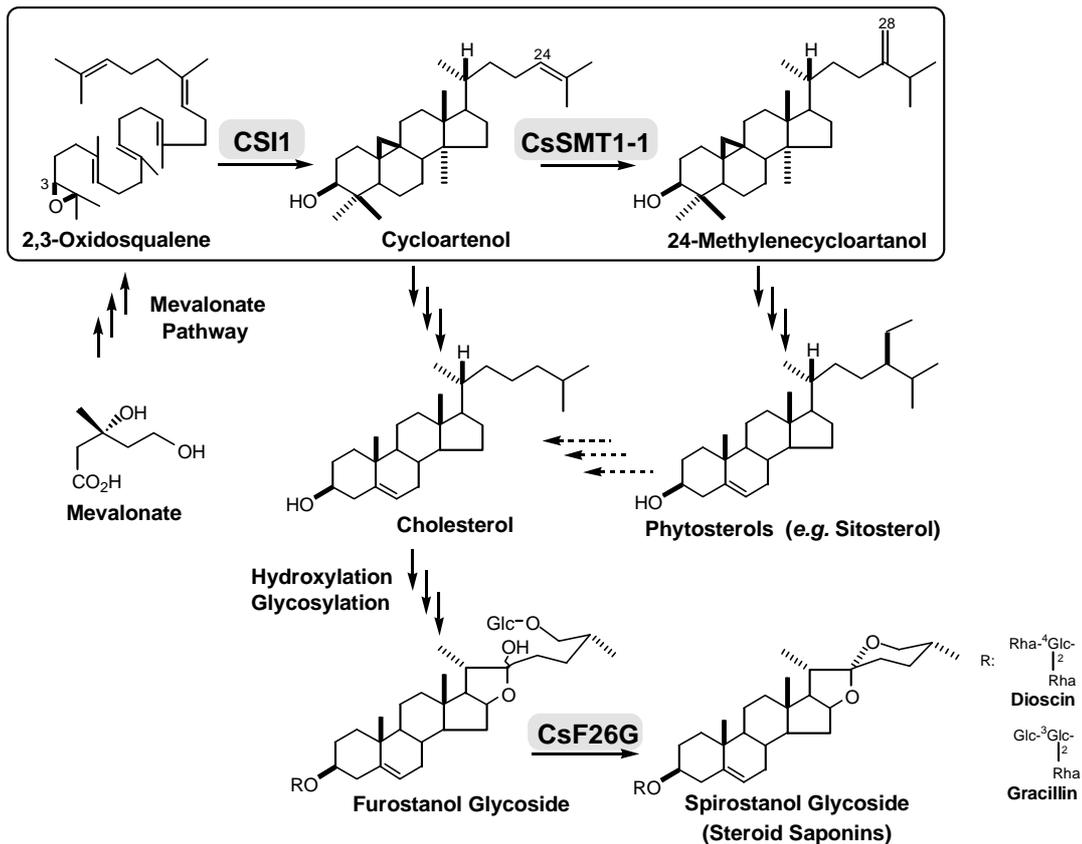


Fig. 1. Proposed Biosynthetic Pathway of Steroid Saponins and Related Metabolites in *Costus speciosus*

Multiple arrow indicates multiple steps. Dotted arrow indicates putative dealkylation steps of phytosterols to cholesterol. CSI1: Cycloartenol Synthase, CsSMT1-1: Sterol Methyltransferase 1, CsF26G: Furostanol Glycoside 26-O- β -Glucosidase, Box: Initial conversion steps of steroidogenic pathway reconstituted in yeast expression system in this study.

段階に関わる鍵酵素のひとつと考えられる。本植物においては一次および二次代謝系が OSC において分岐している可能性が考えられたので、まず OSC のクローニングを行った。その結果、cycloartenol 合成酵素 CSI1 と lupeol や germanicol など複数のトリテルペン類を生成物として与える multifunctional triterpene synthase の 2 種のクローニングおよび lanosterol 合成酵素(ERG7)欠損酵母 GIL77 における機能発現・同定に成功した。

CSI1 のコピー数の検討および発現解析

つぎに、ステロイドサポニン生合成に関与する可能性のある CSI1 が本植物において唯一の cycloartenol 生産に関わる酵素であるか調べるためそのコピー数の検討を行った。PCR によりゲノム DNA を鋳型に CSI1 特異的なプライマーで CSI1 の N 末端部(660 bp)を増幅し、intron を含む増幅産物(1.7 kbp)の塩基配列を比較した結果、CSI1-G1, G2 の 2 タイプのゲノムコピーが存在することが判明した。

また、これら 2 種の CSI1 コピーのステロイドサポニン生合成への関与を明らかにするため、本

植物のステロイドサポニン生産系である *in vitro* 培養植物体および非生産系であるカルス培養細胞におけるこれらに対応する mRNA の発現解析を行った。CSI-G1, G2 の exon 部分(660 bp)には制限酵素 *Bsr*I のサイトが G1 には 2 箇所、G2 には 3 箇所存在し、判別が可能であった。そこで、各種培養系から調製した cDNA 鋳型に N 末部分の増幅を行い、増幅産物を T-vector にクローニングし、単離したプラスミド DNA を鋳型に再び同じプライマーで増幅を行い、その PCR 産物を *Bsr*I で処理した。その結果、カルスを含むすべての培養系において CSI-G1, G2 の両者が発現していることが判明した。これは CSI がステロイドサポニン生成系の制御に直接関わっておらず、一次および二次代謝系の制御が OSC の後段階で行われていることを示唆するものと考えられる。

ステロールメチル転移酵素(SMT)の cDNA クローニング

つぎに、OSC の下流に存在する両代謝系の制御因子の候補として、ステロイドサポニン (サポゲニン) と植物ステロールの側鎖のアルキル化レベルの差違に着目し、その制御因子と考えられる SMT のクローニングを行った。

相同性をベースとした RT-PCR 法および RACE 法の組み合わせにより SMT をコードすると推定される全長 cDNA、*CsSMT1-1* (1038-bp, 345 アミノ酸)を得た。*CsSMT1-1* のコードするタンパクは系統樹解析からステロール側鎖の C24 位にメチル基を転移する SMT1 と予想された。また *CsSMT1* 型のサブタイプ 2 種、そして SMT2 型と相同性の高い *CsSMT2* 型のサブタイプ 4 種の計 7 クローンが得られた。

CSI との共発現による *CsSMT* の機能解析

CsSMT1-1 の機能解析には酵母 GIL77 株において CSI と共発現を行い、その反応生成物である cycloartenol を基質として利用することとした。Cycloartenol は植物ステロール生合成経路における SMT1 の本来の基質であり、CSI と共発現することにより 2,3-oxidosqualene から 24-methylenecycloartanol (24-MC)までの 2 段階の反応の進行が期待された(Fig. 1)。

CSI を恒常的発現プロモーターである PGK プロモーター制御下に、また、*CsSMT1-1* をガラクトース誘導性プロモーターである GAL1 プロモーター制御下に配置した共発現プラスミド p_{PGK}CSI1-GAL1*CsSMT1-1* (Fig. 2)を構築し、GIL77 を形質転換した。

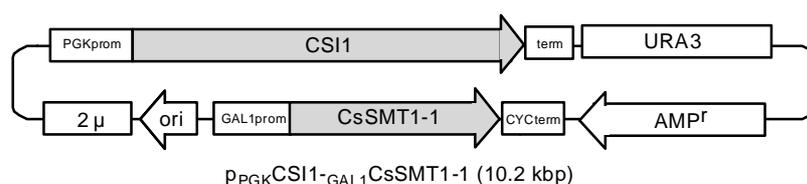


Fig. 2. CSI1, *CsSMT1-1* Co-expression Plasmid

恒常的に発現する CSI1 により cycloartenol の生産を行った上でガラクトース添加の有無による CsSMT1-1 の GAL1 プロモーター発現制御下での 24-MC の生成の有無を検討した。形質転換酵母をガラクトース添加、または非添加条件下で培養を行い、ヘキサン抽出で得られた総ステロールを TLC で分画し 4,4-dimethylsterol 画分を GC/EI-MS 分析に供した。TIC によりモニターしたところ、ガラクトース添加時(Fig. 3C)に 24-MC 標品と保持時間の一致する生成物が検出された。この化合物の EI-MS フラグメントパターンは 24-MC 標品と完全に一致し、CsSMT1-1 の反応生成物を 24-MC、また CsSMT1-1 の機能を SMT1 と同定した。同様に、他の CsSMT クローンについても共発現解析を行い、CsSMT2 型については 24-MC の有意な生産が確認された。

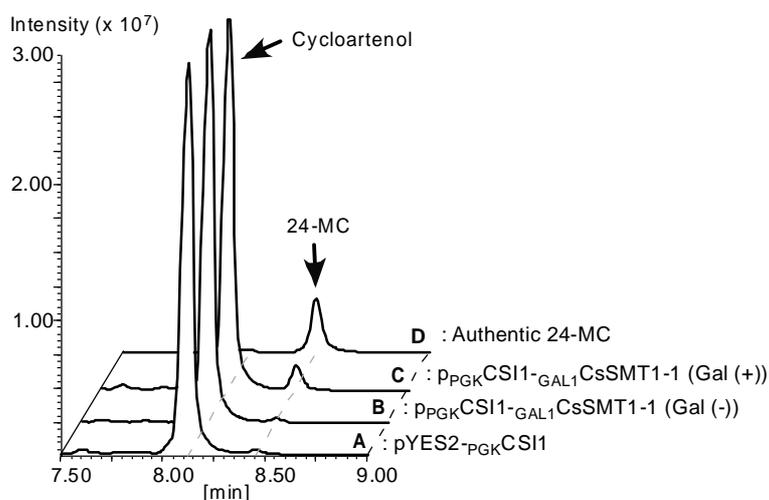


Fig. 3. GC/EI-MS Analysis of Products from Yeast Transformants

CSI1, CsSMT1-1 の同調的共発現による 24-MC 生産量の改善

上述のように CsSMT1-1 の機能同定に成功し、その逆遺伝学的な目的は達したが 24-MC の生産量は低いものであった。そこで、有用二次代謝産物の大量生産を志向した代謝工学的な視点から、24-MC の生産量の向上を試みた。両酵素の発現プロモーターに検討を加え、両者を GAL1 プロモーターもしくは PGK プロモーターで同調的に発現させたところ、恒常的に同調発現させた後において 24-MC の大幅な生産量の向上に成功した(Fig. 4 (C))。

酵母発現系における副反応経路の検討

酵母発現系における ergosterol 生合成経路の酵素群による cycloartenol の代謝について検討を行った。Cycloartenol 合成酵素を発現する形質転換酵母においては 4,4-dimethylsterol に加え 31-norcycloartenol などの 4α -methylsterol の蓄積が観察された。これは ergosterol 生合成経路の C-4 位の脱メチル化に関わる酵素群(ERG25, 26, 27)により cycloartenol が代謝されていることを示すものであり、CsSMT1-1 との共発現における 24-MC の低生産量の一因となっていると考えられる。

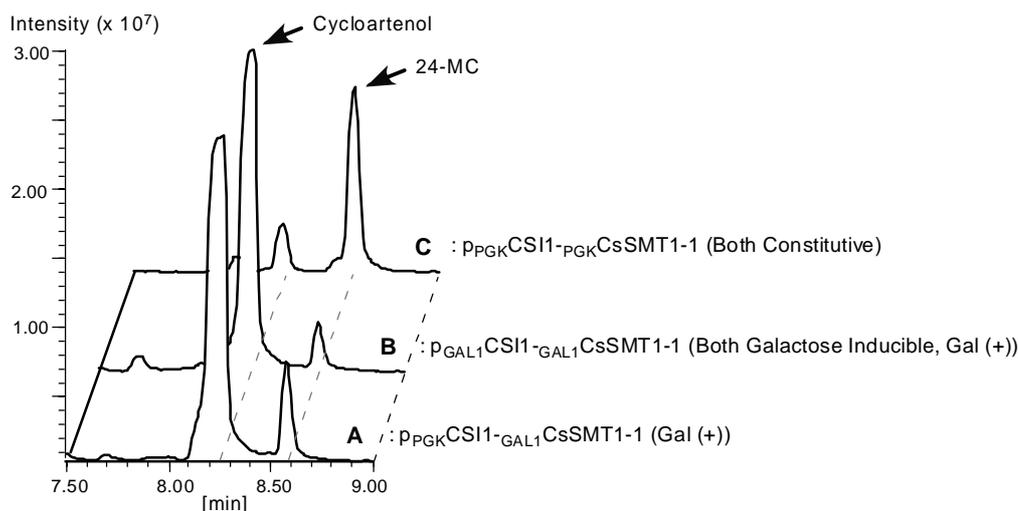


Fig. 4. GC/EI-MS Analysis of Products from Yeast Transformants Expressing CSI1, CsSMT1-1 Simultaneously

また、CSI1 のみの発現においても cycloeucaenol が蓄積することから、酵母の SMT である ERG6 による 31-norcycloartenol の代謝も 24-MC の生産量低下の一因であると推察された。したがって、24-MC の生産量向上のためには、発現宿主として C-4 脱メチル化に関わる酵素群ならびに ERG6 を欠損させた酵母株の使用が望ましいと考えられる。

まとめ

C. speciosus よりクローニングした cycloartenol 合成酵素 CSI1 のコピー数の検討及び発現解析を行い、それらのステロイドサポニン生合成の制御への関与を検討したところ、一次および二次代謝系の制御は CSI1 の下流で行われていることが示唆された。また、本植物より 7 種の SMT 様遺伝子のクローニングを行い、CSI1 と共発現させ 24-MC の生産をモニターすることにより、それらの機能解析を行った。その結果、CsSMT1-1 の機能を SMT1 と同定した。

本植物由来 SMT のステロイドサポニン生合成への直接的な寄与に関しては現在のところ未解決であるが、上記のように酵母において植物ステロール生合成経路の 2 段階の反応の進行が確認されたことは、本技術がステロイド生合成遺伝子群の逆遺伝学的解析に有用であることを示すものである。また、両遺伝子の恒常的な共発現により 24-MC の生産量の増大に成功したことは、代謝工学的な視点から、酵母における多重遺伝子発現によるステロイドサポニンやトリテルペンサポニンなどの有用薬物資源生産への応用の可能性を示すものであると言える。

参考文献

- 1) K. Inoue, M. Shibuya, K. Yamamoto, and Y. Ebizuka., *FEBS Lett.* **389**, 273-277 (1996)
- 2) N. Kawano, K. Ichinose, and Y. Ebizuka., *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 477-482 (2002)