

審査の結果の要旨

氏名 河野 徳昭

ステロイドサポニンとは、多様な化学構造および生理活性を有し、薬用資源として有望な天然化合物群である。しかしながら、その生合成機構に関する知見は限られており、これまで遺伝子・酵素レベルで研究が行われたのは、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) の一例にすぎない。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が、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産物の生産制御の機構は不明であった。

本論文の著者は、dioscin や gracillin などのステロイドサポニンを大量に生産する熱帯産単子葉植物 *Costus speciosus* (Costaceae) を材料に、ステロイドサポニン生合成経路の鍵酵素探索、とくに一次および二次代謝系の分岐点の解明を目的とした研究を展開した。まず、ステロイド骨格形成に関わる鍵酵素と考えられる oxidosqualene 閉環酵素 (OSC) の一種である cycloartenol 合成酵素のクローニングおよび機能解析、さらにそのコピー数の検討および発現解析を行っている。次いで、ステロール側鎖のアルキル化レベルの制御に関わる鍵酵素と考えられるステロールメチル転移酵素 (SMT) のクローニングを行い、その機能解析のため、また、代謝工学への応用の可能性を提示するため、cycloartenol 合成酵素と本植物由来 SMT の酵母における共発現系を構築しステロイド生合成経路の部分的再構成を試みた。

1 . Cycloartenol 合成酵素(CSI1)のコピー数の検討および発現解析

Cycloartenol 合成酵素はステロイド骨格形成の初期段階に関わる鍵酵素のひとつと考えられ、本植物においては本酵素において一次および二次の両代謝系が分岐していると予想された。そこで、本植物より OSC のクローニングを行い、cycloartenol 合成酵素(CSI1)と複数のトリテルペン類を生成物として与える multifunctional triterpene synthase (CSV) の 2 種のクローニングおよび lanosterol 合成酵素欠損酵母 GIL77 における機能発現・同定に成功している。

つぎに、ステロイドサポニンの骨格形成に関与すると考えられる 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

を行っている。ゲノム DNA を鋳型に CSI1 特異的なプライマーで PCR を行い、ゲノム上の CSI1 の相同遺伝子の intron を含む部分を直接増幅し、その塩基配列の比較によりコピー数を検討する方法を考案し、本植物に CSI1-G1, G2 の 2 タイプの cycloartenol 合成酵素のゲノムコピーが存在することを明らかにした。また、これらのステロイドサポニン生合成への関与を検討するため、本植物のステロイドサポニン生産系である *in vitro* plantlet および非生産系であるカルス培養細胞における CSI1-G1 および G2 に対応する mRNA の発現解析を行い、カルスを含むすべての培養系において CSI1-G1, G2 の両者が発現していることを明らかにした。このことは、CSI1 がステロイドサポニン生合成系の制御に直接は関わっておらず、一次および二次代謝系の制御が OSC の下流で行われていることを示唆するものであると判断している。

2 . ステロールメチル転移酵素(SMT)の cDNA クローニングおよび機能解析

つぎに著者は、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ている。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* を得、系統樹解析からその機能をステロール側鎖の C24 位にメチル基を転移する SMT1 と予想した。さらに *CsSMT1* 型のサブタイプ 2 種、また SMT2 型と相同性の高い *CsSMT2* 型のサブタイプ 4 種の計 7 クローンを獲得している。

CsSMT1-1 の機能解析においては、cycloartenol が植物ステロール生合成経路における SMT1 の本来の基質と考えられることから、酵母 GIL77 株において CSI1 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方法を考案した。すなわちこれらの共発現により 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)。

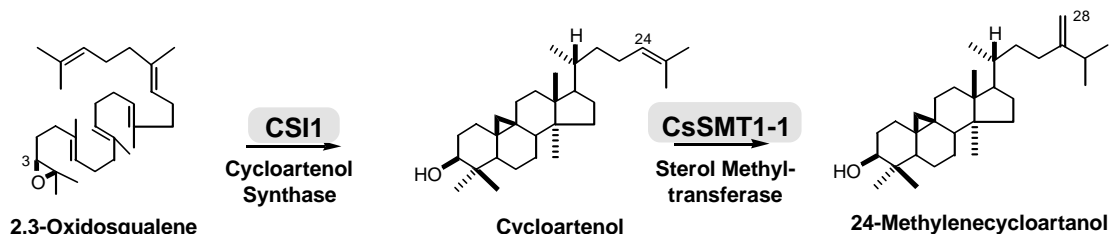


Fig. 1. Two Steps Conversion from Oxidosqualene to 24-Methylenecycloartanol via Cycloartenol in GIL77/p_{PGK}CSI1-GAL1CsSMT1-1

CSII 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、CsSMT1-1 をガラクトース誘導性の GAL1 プロモーター制御下に配置した共発現プラスミド pPGKCSII-GAL1CsSMT1-1 を構築し GIL77 を形質転換した。恒常的に発現する CSII により cycloartenol の生産を行っておき、ガラクトース添加の有無による 24-MC の生成の有無を検討し、GC/EI-MS 分析によりガラクトース添加時にのみ 24-MC 標品と保持時間および EI-MS フラグメントパターンの一致する化合物の生成を検出した。これより、CsSMT1-1 の反応生成物を 24-MC、また CsSMT1-1 の機能を SMT1 と同定している。同様に、他の CsSMT クローンについても CSII との共発現を行い、CsSMT2 型については 24-MC の有意な生産を確認している。

ここで用いた、機能未知遺伝子を機能既知遺伝子と共発現することにより機能同定を行う手法は、基質供給の困難なステロイド生合成経路の遺伝子群の逆遺伝学的解析における有力なツールとなるものと考えられる。

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

当初構築された共発現系において CsSMT1-1 の機能同定の目的は達したが 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ている。CSII と CsSMT1-1 の共発現系における発現プロモーターに検討を加え、両者を PGK プロモーターにより恒常的かつ同調的に発現させることで 24-MC の生産量の大幅な向上に成功した。

また、酵母における ergosterol 生合成経路の酵素群による cycloartenol の代謝について検討を加えており、C-4 位の脱メチル化に関わる酵素群(ERG25, 26, 27)による cycloartenol の代謝が 24-MC の生産量低下の一因であると考察しており、24-MC の生産量向上のため、それらの欠損酵母株の構築の必要性を論じている。

以上本研究は、ステロイドサポニン生合成経路における鍵酵素の探索を行い、それらの一次および二次代謝産物の生産制御への寄与について検討を加え、一次および二次代謝系の分岐に関する新たな知見を得たものである。さらに、ステロイド生合成に関わる複数の遺伝子の共発現および最終目的産物の高効率生産に成功しており、酵母におけるステロイド系二次代謝産物生産への応用の可能性を示している。これらの成果は、今後の天然物化学、薬用植物における代謝工学の発展に寄与するところが大きく、博士(薬学)の学位に相応しいものと認めた。