

論文の内容の要旨

論文題目

Study on Triterpene Biosynthesis in *Panax ginseng*
-cDNA Cloning and Functional Analysis of Dammarenyol-II Synthase-
(薬用ニンジンにおけるトリテルペンサポニンの生合成研究
-ダンマレンジオール合成酵素のクローニングと機能解析-)

氏 名

Tansakul Pimpimon

重要な薬用植物の有効成分となっているトリテルペンサポニンは多彩な生物活性を示し、生物活性の多様性は構造の多様性に起因している。薬用ニンジンに含まれるトリテルペンサポニンはジンセノサイドと称されており、ジンセノサイド Rb-1 などのダンマラン骨格をもつものと、ジンセノサイド Ro などのオレアナン骨格をもつものに大別され、ダンマラン骨格をもつジンセノサイドを多く含む薬用ニンジンが高品質であるとされている (Fig.1)。これら 2 種のジンセノサイドの生合成の分岐点はオキシドスクアレンの閉環反応にあり、ダンマレンジオール-II (ダンマラン骨格) 合成酵素と β -アミリン (オレアナン骨格) 合成酵素の発現制御が高品質薬用ニンジン創出の鍵となるものと考えられる。そこで、私は、薬用ニンジンの品質改良を最終目的とし、ダンマレンジオール合成酵素のクローニングを行なった。また、新規トリテルペンの創出を目的に、分子生物学的手法によるダンマレンジオール-II 合成酵素の機能解析を行った。

1. オタネニンジン毛状根由来ダンマレンジオール-II 合成酵素の cDNA クローニング

これまで当研究室の久城らにより、オタネニンジン (*Panax ginseng*) 毛状根から、真正サボゲニンであるプロトパナキサジオールとプロトパナキサトリオールが共通して有する骨格を与える酵素 (ダンマレンジオール-II 合成酵素) のクローニングが相同性を利用した PCR 法に

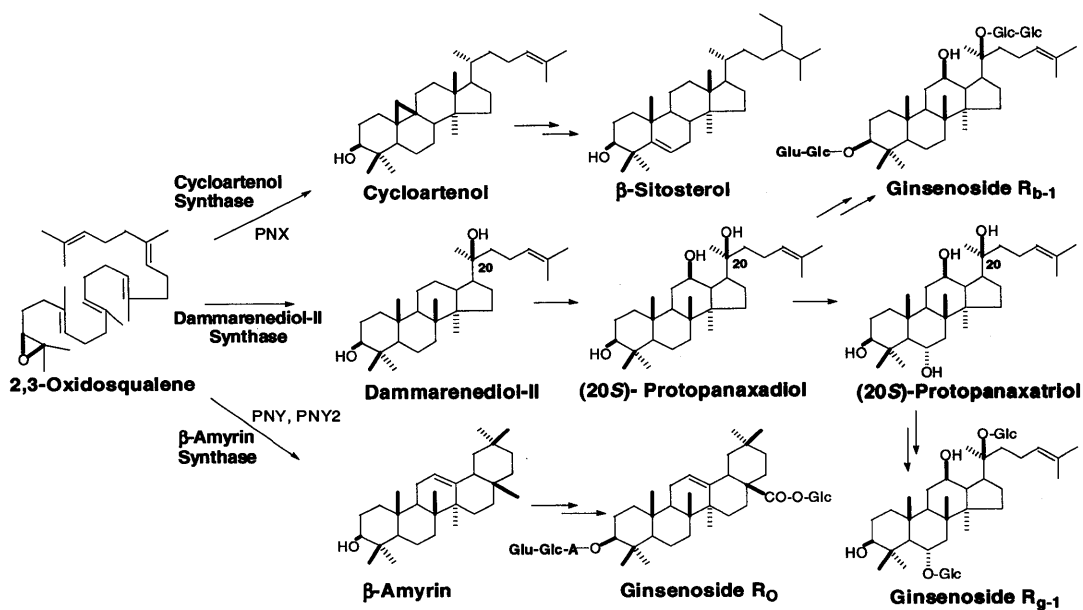


Figure 1 Cyclization of 2,3-oxidosqualene in *Panax ginseng*

より試みられたが、これまで得られたものは、サイクロアルテノール合成酵素と β -アミリン合成酵素のみであった。そこで、私は、RNAの調製時期、及び、プライマーの組み合わせに改良を加え、ダンマレンジオール-II合成酵素のクローニングを試みることにした。久城らのクローニングではジンセノサイドRb-1の蓄積量が増加し始めた直後の植継ぎ21日目の毛状根からRNAを調製したが、目的のRNAの量が必ずしも最大ではなかった可能性があり、本研究では1週間遅らせ28日目にRNAを調製した。また、久城らは、既知オキシドスクアレン閉環酵素に保存されている配列を基にデザインしたプライマー2組のプライマーセットによるNested-PCRで行ったが、私は、プライマーの複数種の組合せによるSingle-PCRで行った。逆転写した一本鎖DNAを鋳型にPCRを行い、生成物を大腸菌ベクターにサブクローニングし、塩基配列を決定した。その中に既知の配列と異なったクローンを見いだした。このクローンの全塩基配列をRACE法により決定し、PCRにより全長クローンを得た(PNAと命名)。PNAを酵母の発現ベクターpYES2に組み込み酵母のラノステロール合成酵素欠損株GIL77で発現させ、生成物をLC-APCIMSで分析したところ、標品のダンマレンジオール-IIと保持時間、及び、開裂様式が一致した。さらに、形質転換酵母を6L培養し、生成物を単離し $^1\text{H-NMR}$ 、及び、 $^{13}\text{C-NMR}$ を測定したところ、文献値と完全に一致した。これらの結果から、PNAをダンマレンジオール-II合成酵素と同定した。

2. オリーブ培養細胞由来複合アミリン合成酵素のcDNAクローニング

オタネニンジン毛状根からのクローニングと並行して、ダンマレン骨格のトリテルペンを成分として含むことが知られているオリーブ(*Olea europaea*)から、ダンマレンジオール-II合成酵素のクローニングを試みた。同様の手法により、新規クローンを得た(OEAと命名)。PNAと

OEA は 74%のアミノ酸配列の
 相同性を示した。また、系統
 樹解析においても、同一の分
 枝を形成し、同一の機能をも
 つものと推定された。OEA を
 酵母のラノステロール合成
 酵素欠損株 GIL77 で発現させ、
 生成物を LC-APCIMS で調べた
 ところ、意外にも、 β -アミ

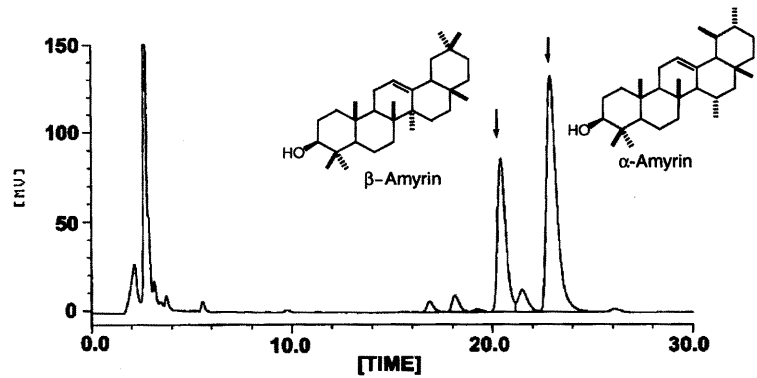


Figure 2 HPLC profile of OEA

リンと α -アミリンを主生成物として与える混合アミリン合成酵素であることが判明した (Fig. 2)。これまで、エンドウ由来混合アミリン合成酵素 (PSM) がクローニングされているが、PSM とは相同性は 55%程度であり、系統樹解析においても別の分枝に含まれた。このような混合アミリン合成酵素が系統樹の中に散在することは、ある単一生成物を与える酵素が他の単一生成物を与える酵素へ進化する過程のもととも考えられ、トリテルペン合成酵素の分子進化を考える上で非常に興味深い。

3. ダンマレンジオール合成酵素の機能解析

β -アミリン合成酵素などの他のトリテルペン合成酵素の反応はプロトンの脱離で終止するが、ダンマレンジオール-II 合成酵素の反応では水の付加で反応が終止する (Fig. 3)。水の付加で反応が終止し、単一生成物としてジオール型のトリテルペンを与える酵素のクローニングは、今回のダンマレンジオール-II 合成酵素が初めてである。これまでオキ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。そこで、ダンマレンジオール-II 合成酵素 (PNA) とアミノ酸配列の相同性の高い複合アミリン合成酵素 (OEA) を用いて、分子生物学的手法により酵素活性部位を探ることにした。

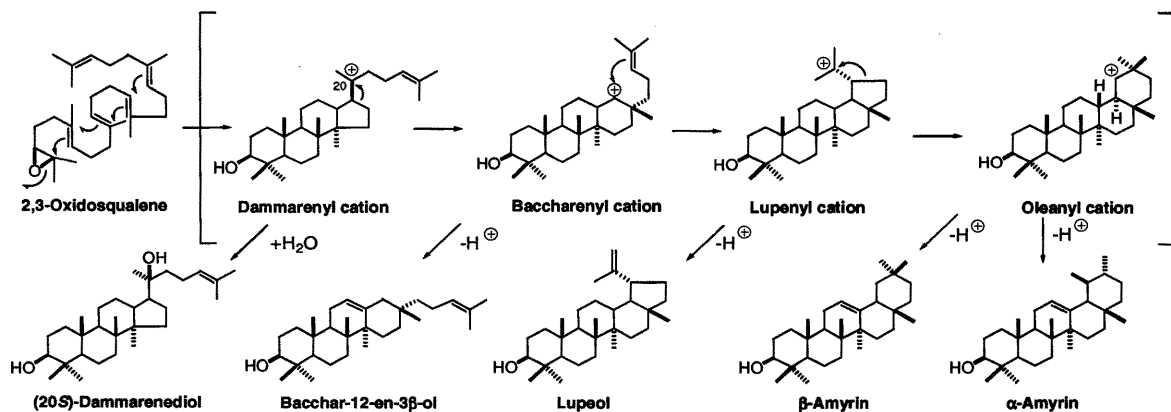


Figure 3 Cyclization of Oxidosqualene into Triterpenes

まず、3箇所の制限酵素部位を利用したキメラ体6種を作製した。形質転換酵母での生成物をLC-MSで分析したところ、3種のキメラタンパクでは生成物を検出できなかったが、他の3種のもので生成物が確認された。キメラ1はトリテルペンモノアルコール（OEAと同一の生成物）を与え、キメラ2はダンマレンジオール-IIを生成物として与えた。このことから2番目（*CpoI*-*Bgl*II）の領域が生成物の作り分けに重要であることが示唆された（Fig. 4）。

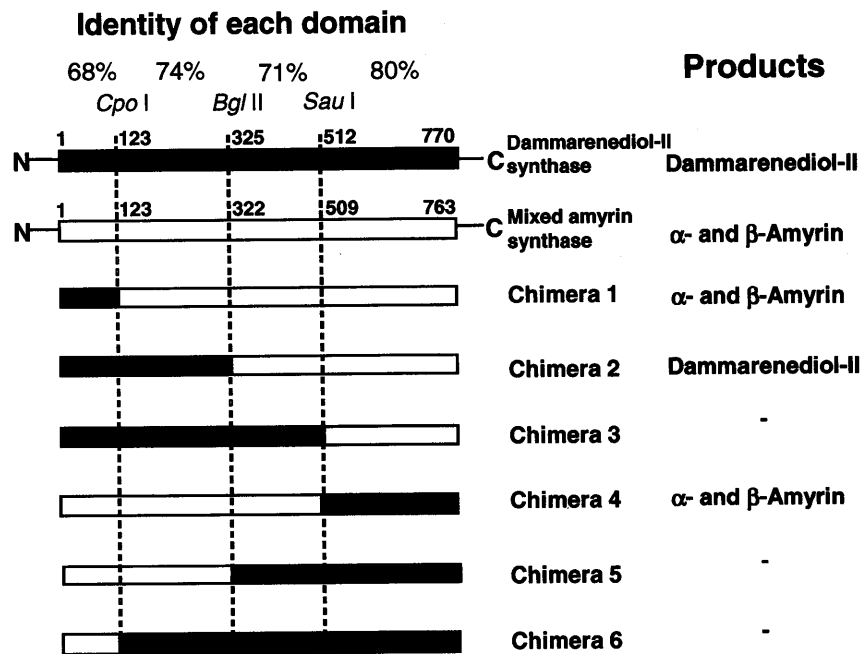


Figure 4 Products of Chimeric Enzymes

この領域にはオタネニンジン由来 β -アミリン合成酵素（PNY）において活性部位を構成していることが判明しているMWCYC(258-262)配列が含まれている。PNYの261番目のTyrをHisに改変したタンパク（PNY-Y261H）が β -アミリンを全く生成せず、新たにダンマラジエノールを生成物として与えることが既に報告されており、OEA、及び、PNAにおいてもこのTyrが活性部位の一部を構成しプロトンの脱離に関与しているかを検証するために2種の点変異酵素OEA-Y260H、PNA-Y263Hを作製し生成物を分析した。

PNA-Y263Hは全く生成物を与えなかったが、OEA-Y260Hは3種のダンマラジエノール（Fig. 5, (1), (2), (3))を5:3:1の比で与えた。このことから、OEAにおいてもこのTyrがダンマレニルカチオンの20位の近傍に位置していると考えられた。そこで、次に、このTyr近傍のアミノ酸残基を改変した22種の変異タンパクを作製し生成物を分析した。しかしながら、何らかの理由で全ての変異タンパクは全く生成物を与えなかった。

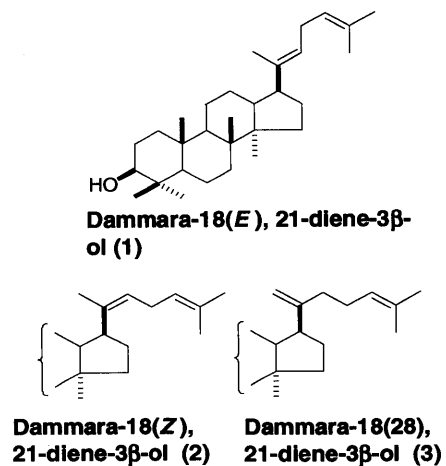


Figure 5 Products of OEA Y260H

次に、これまでクローニングされているオキシドスクアレン閉環酵素のアミノ酸配列の相同性を検討し、活性部位の一部を構成していることが示唆されている DCTAE 配列の近傍の改変を含め、18 種の変異タンパクを作製した。そのうち、14 種の改変酵素は全く生成物を与えなかったが、4 種は野生型の酵素と同様の活性を示した。その中で OEA-FY169LH は、野生型酵素と同一の生成物に加え、微量ながら新たな生成物を与えることが TLC で確認された。10 L の形質転換酵母培養から、生成物をシリカゲルカラム、HPLC で分離し、2 種のフラクション P608-1 (0.9 mg)、P608-2 (0.13 mg) を得た。P608-1 は GCMS、¹H-NMR によりダンマレンジオール-II と同定した。一方、P608-2 はさらに 2 種以上の類縁体を含んだ混合物であり、構造決定には至らなかったが、TLC、HPLC、GC の挙動からトリテルペンジオールであることが考えられた。OEA-FY169LH はダンマレンジオール-II を含むトリテルペンジオール類を生成物として与えるが、主生成物として野生型と同様の生成物を与えること、及び、PNA においてこの位置のアミノ酸配列は FY であることから、169-170 番目のアミノ酸が水の添加に直接関与するとは考えにくく、これらのアミノ酸の改変がタンパクのコンフォメーションを微妙に変化させ、活性部位内の水分子の位置を変化させたものと考えるのが妥当と思われる。一方、これらのアミノ酸は前述の 2 番目の領域に含まれており、2 番目の領域が、生成物制御において重要であることを支持している。

4. まとめ

薬用ニンジンの真正サポゲニンであるプロトパナキサジオールとプロトパナキサトリオールの骨格を与えるダンマレンジオール-II 合成酵素のクローニングに成功した。ダンマレンジオール-II 合成酵素のクローニングの成功により、今後の分子生物学的手法による薬用ニンジンの改良へ向けて大きく前進したものと思われる。また、同時に得られた相同性の高いオリーブ由来混合アミリン合成酵素を用いて反応機構の解析を行った。水添加に関与するアミノ酸を特定することはできなかったが、第 2 領域 (123 番目から 326 番目のアミノ酸の領域) が生成物制御において重要であることを見いだすことができた。今後、この領域にある水添加に関与するアミノ酸残基を特定し、活性部位内の水分子の位置を制御することが可能になれば、新規トリテルペンジオール創出が可能になると考えられる。