

審査の結果の要旨

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。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- (ダンマラン骨格) 合成酵素と 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。本論文の著者は、薬用ニンジンの品質改良を最終目的として、(1) オタネニンジン由来ダンマレンジオール- 合成酵素のクローニング、(2) オリーブ由来混合アミリン合成酵素のクローニングを行い、さらに、新規トリテルペンの創出を目的に(3) ダンマレンジオール- 合成酵素の機能解析を行ない、それらの結果について記載している。

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

オタネニンジン (*Panax ginseng*) 毛状根からこれまでサイクロアルテノール合成酵素と アミリン合成酵素の 2 種の遺伝子が相同性を利用した PCR 法により得られているが、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- 合成酵素) のクローニングはなされていなかった。そこで、RNA の調製時期 (週間遅らせ 28 日目の毛状根から RNA を調製) 及び、プライマーの組み合わせ (Nested-PCR を行わず Single-PCR の生成物をサブクローニング) に改良を加え、ダンマレンジオール- 合成酵素のクローニングを試みた。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- と保持時間、及び、開裂様式が一致した。さらに、形質転換酵母を大量培養し、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- 合成酵素と同定した。

2. オリーブ培養細胞由来混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-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、 α -アミリンと β -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。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。

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-合成酵素の反応では水の付加で反応が終止する。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-合成酵素が初めてである。そこで、ダンマレンジオール-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。

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- 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. 1)。

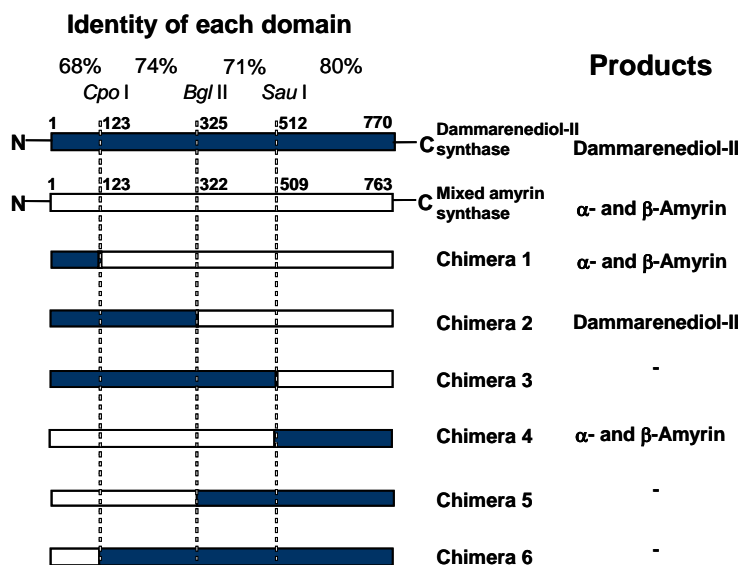


Figure 1 Products of Chimeric Enzymes

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. 2, (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。

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。形質転換酵母を大量培養し、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、P608-2 を得た。P608-1 は GCMS、 $^1\text{H-NMR}$ によりダンマレンジオール- と同定した。OEA の 169-170 番目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られる。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。

以上本研究は、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- 合成酵素を初めてクローニングしたものである。ダンマレンジオール- 合成酵素のクローニングの成功は、今後の分子生物学的手法による薬用ニンジンの改良へ大きく貢献するものであり、また、今回同時に得られた相同性の高いオリーブ由来混合 β -アミリン合成酵素と合わせて、新規トリテルペン骨格創出にも大きく貢献するものであり、生薬学、天然物化学、医薬品化学の進展に寄与することが大きく、博士 (薬学) の学位に相応しいものと認めた。

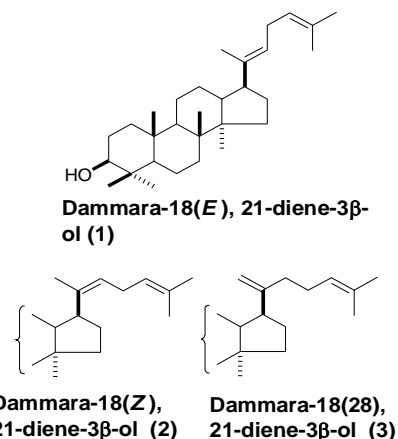


Figure 2 Products of OEA Y260H