

審査結果の要旨

氏名 篠崎 淳一

維管束隠花植物であるシダ類植物は孢子で繁殖し、地上で最も古い植物の一つである。これまでのシダ類植物の二次代謝産物の研究から、シダ類植物は顕花（高等）植物にはみられない特徴的な構造をもつ化合物を生産することが明らかになっている。トリテルペン为例にあげれば、シダ類植物は高等植物と同一の骨格をもつトリテルペンに加え、シダ類植物固有の骨格のトリテルペンも生産し、一部の例外を除いてほぼ全てのトリテルペンが 3 位に酸素官能基を欠くことなどが大きな特徴である。また、高等植物においては稀少であるセスタテルペンが、ある特定のシダ類植物においては比較的多く含まれているなどの特徴もある。このような違いが何に起因するのかは興味深く、また、それらの構造多様性の起源の解明は、生合成工学による非天然型天然物の創出へ応用可能であると考えられる。本論文の著者は、シダ類植物が生産するトリテルペンとセスタテルペン (Fig. 1) に注目してその生合成の解析を行い、(1) トリテルペン合成酵素のクローニングと機能解析 (2) トリテルペン合成酵素によるセスタテルペンの生成について述べている。

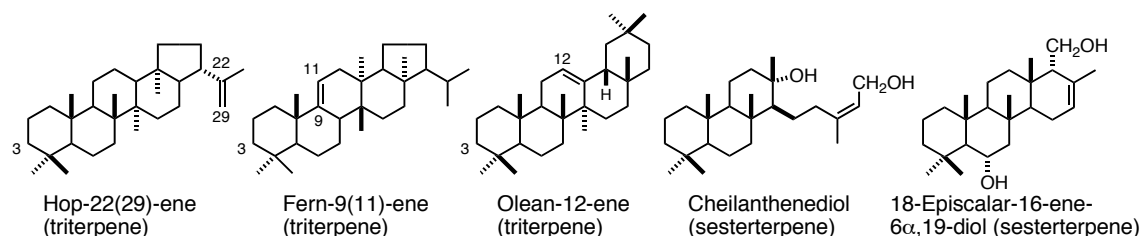


Fig. 1. Triterpenes and sesterterpenes from ferns.

1. トリテルペン合成酵素のクローニングと機能解析

トリテルペンは鎖状の squalene あるいは (3*S*)-2,3-oxidosqualene を共通の前駆体として、複数の不斉中心をもつ多様なトリテルペン骨格を構築する反応により生合成される。このトリテルペン骨格の多様性を生み出しているのがトリテルペン合成酵素である。トリテルペン合成酵素は基質の違いにより、以下の 2 種類に大別することができる。一つは、(3*S*)-2,3-oxidosqualene を基質として主に 4 環性あるいは 5 環性化合物を与えるオキシドスクアレノ閉環酵素 (oxidosqualene cyclase, OSC) であり、高等植物、哺乳類、菌類、酵母などに存在している。他方は、squalene を基質として主に 5 環性化合物を与えるスクアレノ

ン閉環酵素 (squalene cyclase, SC) であり、微生物や一部の原生動物に存在している。

1-1. OSC のクローニングと機能解析

高等植物の生産するトリテルペンは 3 位に酸素官能基を有しており、2,3-oxidosqualene を共通の前駆体として生合成される。この反応を触媒するトリテルペン合成酵素をコードする cDNA については、これまでに当研究室で数多くクローニング、機能解析されている。シダ類植物が生産する 3 位に酸素官能基のないトリテルペンもこれら高等植物の酵素とタンパクの一次構造が類似していると想定し、ホウライシダ(*Adiantum capillus-veneris* L.)から相同性を利用した PCR によるクローニングを行い、一種のクローン (ACX と命名) を得た。ラノステロール合成酵素欠損酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) GIL77 株を用いた機能解析により、ACX はサイクロアルテノール合成酵素をコードしていることが明らかとなった (Fig. 2)。ACX は高等植物由来サイクロアルテノール合成酵素と 68 – 72 % と比較的高い相同性を示した。サイクロアルテノールは植物ステロールの前駆体であり、この結果から、シダ類植物においてもステロール生合成は高等植物と類似した進化をたどったものと推測された。しかしながら、得られたクローンはこの一種のみであり、目的のトリテルペン合成酵素は得られなかった。このことから、シダ類植物のトリテルペン合成酵素は高等植物のものとは異なった一次構造をもつものと示唆された。

1-2. SC の一次構造に類似した酵素

数種の微生物から squalene を基質として 5 環性トリテルペン hop-22(29)-ene を主生成物として与えるホペン合成酵素 (squalene-hopene cyclase; SHC) をコードする遺伝子のクローニングが報告されている。

そこで、シダ類植物のトリテルペン合成酵素はこの微生物型のトリテルペン合成酵素と一次構造が類似していると仮定してクローニングを行った。これら酵素間でよく保存されている領域を基に縮重入りプライマーをデザインし、cDNA を鋳型とした PCR により DNA 断片の増幅を行った。得られた cDNA 断片の塩基配列を解析したところ、ホウライシダから 1 種 (ACH)、アオネカズラ(*Polypodiodes niponica* (Mett.) Ching)から 3 種 (PNT, PnSC2, 3)、オシダ(*Dryopteris crassirhizoma* Nakai)から 2 種 (DCD, DcSC2) のクローニングが得られた。それらの配列に特異的なプライマーをデザインし、3'- および 5'-RACE 法により ACH, PNT, DCD の全長塩基配列を決定した。これらは微生物由来のトリテルペン合成酵素とアミノ酸配列において 34 – 40 % の相同性をもつ一方、シダ類植物由来サイクロアルテノール合成酵素 ACX とは 19 % の相同性しか示さなかった。

次にこれら 3 種のクローニングがコードするタンパクの酵素機能を同定するため、酵母 (S.

cerevisiae) 発現系を用いて機能発現を行った。各クローンを酵母発現ベクター pYES2 のガラクトース誘導性プロモーター制御下に配置した発現プラスミド pYES2-ACH、pYES2-PNT、pYES2-DCD を作成し *S. cerevisiae* INVSC2 株を形質転換した。誘導培養時にスクアレンエポキシダーゼ阻害剤である *terbinafine* を培地に添加し、*squalene* を酵母内に蓄積させ、発現酵素タンパク質の内在基質として反応させた。ヘキサン抽出物を GC-MS により分析した。生成物は微量であったが、標品との比較により生成物を、それぞれ *hydroxyhopane*、*tirucalla-7,21-diene*、*dammara-18(28),21-diene* と同定した。以上の結果から、ACH はヒドロキシホパン合成酵素、PNT はチルカラジエン合成酵素、DCD はダンマラジエン合成酵素と同定した。微生物 *Alicyclobacillus acidocaldarius* 由来のホペン合成酵素は生成物として、*hop-22(29)-ene* と *hydroxyhopane* を与えるが、今回得られた ACH は *hydroxyhopane* のみを与えた。シダ類植物からスクアレンを基質とするトリテルペン合成酵素がクローニングされたのはこれが最初の例である。以上の結果から、シダ類植物には微生物型 SC と、高等植物型のサイクロアルテノール合成酵素 (OSC) の存在が明らかとなった (Fig. 2)。

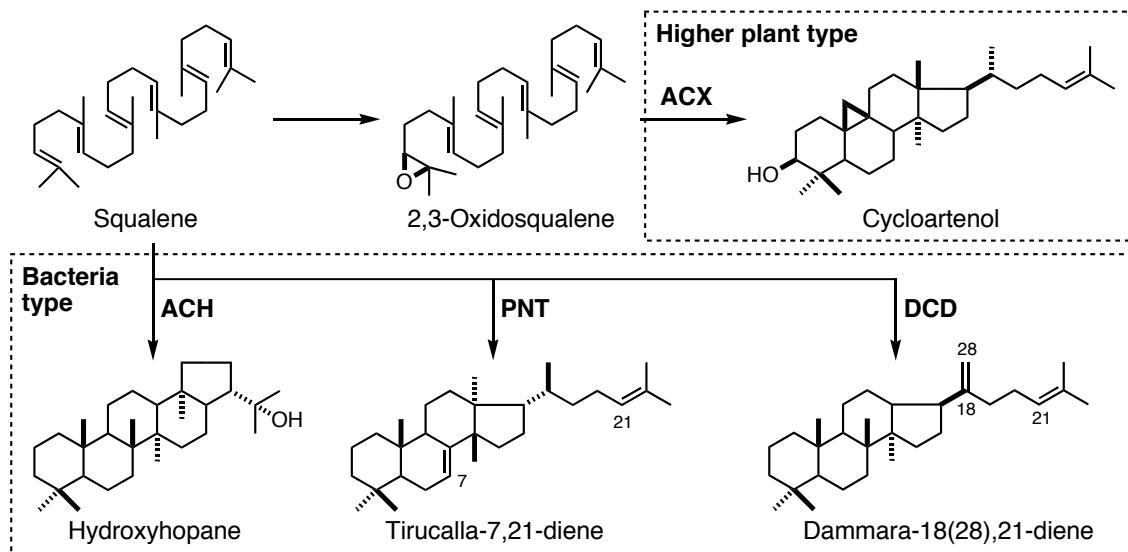


Fig. 2. Two types of triterpene synthases in ferns

2. トリテルペン合成酵素によるセスタテルペン生成

セスタテルペンはイソプレン単位 5 個からなる C_{25} のテルペンである。高等植物においては、単離されたものの種類が少なく、その生合成に関しては不明な点が多い。一部の *Aleuritopteris* 属シダ類はトリテルペンに加え、*cheilanthane* および *episcalarane* 骨格のセスタテルペンを生産することが知られており、それらの閉環様式はトリテルペンの閉環様式に類似している (Fig. 3)。

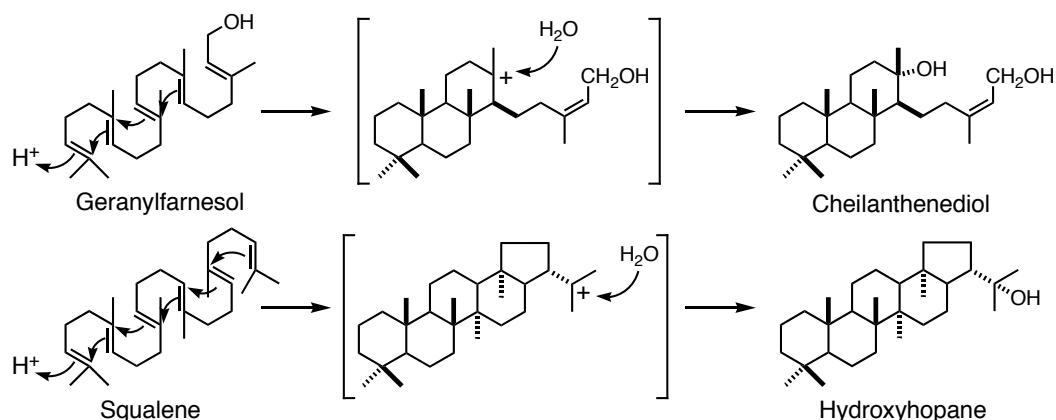


Fig. 3. Polycyclization of geranylarnesol and squalene into cheilanthenediol and hydroxyhopane, respectively.

そこで、*Aleuritopteris* 属シダ類の生産する一部のセスタテルペンはトリテルペン合成酵素が生合成しているとの仮説を立て、その可能性を検証した。大腸菌において大量発現させて得た微生物 (*A. acidocaldarius*) 由来ホペン合成酵素をセスタテルペンの共通の前駆体である geranylarnesol と *in vitro* で反応させた。酵素反応生成物を TLC で分析したところ、複数のスポットを検出した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離精製後、各種スペクトルにより構造解析を行い、生成物の一つを新規単環性セスタテルペンと構造決定した (Fig. 4)。今回の実験で用いた酵素は微生物由来のトリテルペン合成酵素であるが、トリテルペン合成酵素が geranylarnesol とも基質として反応することが明らかとなり、シダ類植物ではトリテルペン合成酵素がトリテルペンだけでなくセスタテルペンの生合成にも関与している可能性が示された。

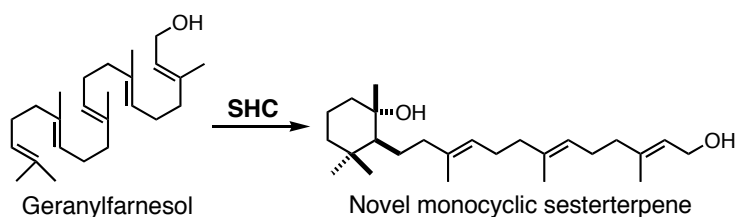


Fig. 4. Enzymatic cyclization of geranylarnesol to novel monocyclic sesterterpene by bacterial SHC.

以上本研究は、シダ類植物より、オキシドスアレンを基質とするサイクロアルテノール合成酵素に加え、スクアレンを基質とする3種のトリテルペン合成酵素 (ハイドロキシホパン合成酵素、チルカラジエン合成酵素、ダンマラジエン合成酵素) を初めてクローニングし酵素機能を同定したものである。また、微生物由来トリテルペン合成酵素が geranylarnesol を環化させ、新規単環性セスタテルペンを与えることを明らかにしたものである。本研究により、シダ類植物は微生物型の二次代謝産物生成能と高等植物型の一次代謝産物生成能

を併せ持つことが明らかとなり、またシダ類植物においてセスタテルペンがトリテルペン合成酵素により生成する可能性が示された。本研究の成果は、シダ類植物由来トリテルペン合成酵素を用いた生合成工学による非天然型天然物の創出の可能性を明示しており、天然物化学、医薬品化学の進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。