

氏名	し たん のぶ かず 士 反 伸 和
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1323 号
学位授与の日付	平成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	農学研究科応用生命科学専攻
学位論文題目	Structural and functional analyses of an ABC protein in isoquinoline alkaloid-producing plant cells (イソキノリンアルカロイド生産性植物細胞における ABC タンパク質の構造とその機能解析)
論文調査委員	(主査) 教授 佐藤文彦 教授 關谷次郎 教授 矢崎一史

### 論 文 内 容 の 要 旨

高等植物は極めて多彩な化学構造の二次代謝産物を生成し、そのための複雑な生合成経路を有する。これら植物二次代謝産物の中には、色素や香料、医薬品等として汎用されているものも多く、植物培養細胞を活用した物質生産系の確立や分子育種による生産が試みられてきた。しかしながら、その生合成酵素やそれをコードする遺伝子の研究が盛んに行われているのに対し、最終産物の集積や輸送機構、あるいは組織局在化に関するタンパク質や遺伝子に関する研究は極めて少ない。キンボウゲ科に属する薬用植物オウレン (*Coptis japonica* Makino) は、整腸剤等として汎用される黄色のイソキノリン系アルカロイド、ベルベリンを根において生産し、根茎に蓄積する。オウレンの選抜培養細胞は多量のベルベリンを生産してこれを液胞に特異的に蓄積するが、さらに培地中に添加されたベルベリンをも積極的に吸収し、液胞内に蓄積する性質を有する。本論文は、オウレン培養細胞を材料にベルベリン輸送の実体を明らかとし、その生化学的・生理的機能を解明しようとしたものである。その内容は以下の通りである。

第 1 章では、オウレン培養細胞におけるベルベリン輸送活性について解析した結果をまとめている。阻害剤実験により、培養細胞におけるベルベリンの取り込みは ATP に依存的であること、ガン細胞の多剤耐性の原因とされる ABC (ATP binding cassette) タンパク質の一種、MDR (multidrug resistance protein) に対する複数の阻害剤で強く抑制されることを明らかとし、ベルベリンの輸送に MDR 様 ABC タンパク質が関与する可能性を示した。

第 2 章では、関与が示唆された MDR 様 ABC タンパク質の cDNA のクローニングとその発現解析の結果をまとめている。培養細胞より *mdr* 様遺伝子 2 種類 (全長約 4.2kb) をクローニングし、*Cjmdr1, 2* (*Coptis japonica* multidrug resistance) と命名した。*Cjmdr1, 2* は DNA レベルで約 80%、アミノ酸レベルで約 82% の相同性を有し、予想アミノ酸配列から、ヒト MDR1 同様、12 回の膜貫通領域と 2 個の ATP 結合領域からなるリピート構造を有することが予想された。植物体各組織における発現解析の結果、両遺伝子ともにベルベリン高蓄積部位である根茎に高発現し、その他の組織ではほとんど発現していないことを明らかとした。

第 3 章では、ヘテロ発現系を用いた *CjMDR1* の機能解析の結果をまとめている。アフリカツメガエル卵母細胞において発現させた結果、*CjMDR1* がベルベリンの取り込み活性を有すること、さらに阻害剤実験により、ベルベリンの輸送活性が *CjMDR1* の ABC トランスポーター活性によることを明らかとした。卵母細胞及び酵母細胞の発現系において *CjMDR1* の基質特異性を調べた結果、*CjMDR1* はヒト MDR1 のような広い基質特異性は示さず、比較的限られたイソキノリンアルカロイドを選択的に輸送するものであると考えられた。

第 4 章では、*CjMDR1, 2* の発現部位解析についてまとめている。二層分配法、不連続ショ糖密度勾配法の二法を用い、*CjMDR1* タンパク質が細胞膜に局在することを明らかとした。*Cjmdr1, 2* の組織内の発現部位について *in situ* hybridization による解析を行い、両遺伝子は根茎維管束道管付近において強く発現していることを明らかとした。この知見より *CjMDR1* はベルベリンの道管を介した輸送に関与していると考えられた。

以上の結果を総合し、植物体における CjMDR1 の生理的役割を以下の様に推定した。

「ベルベリンは根で生合成された後、道管を經由して根茎に輸送される。根茎の道管組織の細胞膜で高発現している CjMDR1 タンパク質が、道管内腔からベルベリンを細胞内にトラップし、根茎におけるベルベリンの高蓄積に関与している。」

#### 論文審査の結果の要旨

植物二次代謝産物は様々な生理活性を有し、色素や香料、医薬品として汎用されているものも多い。その需要から安定かつ大量な供給を目的として、生合成に関与する酵素や遺伝子の研究が数多く報告されているが、輸送・蓄積機構に関する研究は極めて少ない。本論文は、有用医薬品であるイソキノリンアルカロイド、ベルベリンを生合成する薬用植物オウレン及びその培養細胞を用いて、本植物におけるベルベリンの輸送体を明らかとするとともに、その生化学的・生理学的機構を解明しようとしたものであり、その評価できる内容は以下の通りである。

1. オウレン培養細胞を用いて、培地からのベルベリンの取り込みが ATP に依存していること、ABC タンパク質の一種 MDR に対する阻害剤で強く阻害されることを明らかとし、本輸送に MDR 様 ABC タンパク質が関与している可能性を示している。

2. オウレン培養細胞より *mdr* 様遺伝子 2 種類 (*Cjmdr1*, 2) をクローニングし、その全塩基配列を決定するとともに、両遺伝子の相同性が DNA レベルで 80%、アミノ酸レベルで 82% であること、アミノ酸配列から、CjMDR1, 2 が 12 回の膜貫通領域と 2 個の ATP 結合領域をもつリピート構造を有することを予想している。

3. ノーザン解析により、*Cjmdr1*, 2 がベルベリン蓄積部位である根茎に特異的に発現しており、他の組織ではほとんど発現していないことを明らかとしている。

4. アフリカツメガエル卵母細胞における機能解析により、CjMDR1 はベルベリンを基質として細胞内に輸送する活性を示すこと、また、典型的な ABC タンパク質と類似した生化学的特性を示すことを明らかとしている。さらに、卵母細胞、酵母細胞を用いた機能解析により、CjMDR1 はヒト MDR1 のような広い基質特異性は示さず、比較的限られたイソキノリンアルカロイドを選択的に輸送するものであることを示している。

5. 二層分配法、及び不連続ショ糖密度勾配法により細胞内膜の分離を行い、オウレン培養細胞における CjMDR1 の局在部位が細胞膜であることを明らかとしている。

6. 各遺伝子の 3'-UTR を用いた *in situ* hybridization により、*Cjmdr1*, 2 が根茎維管束、特に道管近傍の細胞において発現していることを明らかとしている。以上の結果を総合して、CjMDR1 タンパク質が道管内腔からベルベリンを細胞内にトラップし、根茎におけるベルベリンの高蓄積に関与していると予想している。

以上のように本論文は、オウレン植物体におけるベルベリンの輸送体をクローニングし、その機能を明らかとするとともに、植物体内における二次代謝産物の転流に対する輸送体の関与を初めて明らかとしたものであり、二次代謝産物の輸送、蓄積に対する植物細胞生物学、植物分子生物学の発展に寄与するところが大きい。

よって本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 15 年 2 月 14 日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。