

氏名	おおにしとしゆき 大西利幸
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	農博第1576号
学位授与の日付	平成18年5月23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	Studies on Cytochromes P450 in Brassinosteroid Biosynthesis and Catabolism (ブラシノステロイド生合成および代謝経路におけるシトクロム P450 の研究)
論文調査委員	(主査) 教授 坂田完三 教授 宮川 恒 教授 梅澤俊明

論文内容の要旨

ブラシノステロイド (BR) は植物の生長, 分化, 形態形成, 光応答において重要な役割を担う植物ホルモンである。最も生理活性の強いブラシノライド (BL) は C₂₈-ステロイドで, 他の生合成類縁化合物とともに広く植物界に存在する。BR の研究は, 植物より BR を単離同定する分析化学的手法, BR の化学合成を行う有機化学的手法, そして BR 生合成欠損変異株の探索を行う遺伝学的手法により推し進められてきた。その結果, BR 生合成欠損変異株の原因遺伝子として多数のシトクロム P450 (以下 P450 と略す) 遺伝子が単離同定され (CYP85A1, 90A1, 90B1, 90C1 および 90D1), また分析化学的手法によりそれら P450 が BR 生合成経路の多くの酸化反応 (C-2 位, C-3 位, C-6 位, C-22 位および C-23 位の酸化および水酸化反応) に関与していることが推定されている。しかし, CYP85A1 が触媒する C-6 位酸化反応以外, 未だ BR 生合成に関与する P450 の酵素活性は証明されていない。一方, BR 代謝経路についての研究は, 分析化学的手法により活性型 BR であるカステステロン (CS) や, BL が水酸化, エステル化または異性化された BR 類縁体が単離同定されているのみでほとんど未解明のままである。

そこで本論文は, 従来の BR 研究とは異なる生化学的手法を用いることにより BR 生合成および代謝系に関わる P450 酵素の機能を酵素学的に明らかにするとともに, BR 新規生合成経路の存在も明らかにした。

1) モデル植物シロイヌナズナの新規 BR 生合成経路の確立

化学的および遺伝学的解析により BR 生合成経路は推定されている。しかし, BR 生合成に関与する P450 酵素の発現や活性測定が困難であるため, 未だ生化学的な証明がなされておらず BR 生合成経路は確立されていない。そこでシロイヌナズナ CYP90A, 90B, 90C, 90D およびトマト CYP724B の 5 種の P450 について, クローニングおよび昆虫細胞や大腸菌での発現系を確立し, 生化学的なアプローチからそれぞれの P450 酵素の酵素機能を実証するとともに酵素反応速度論解析を行った。P450 の酵素活性測定には, P450 酵素に NADPH-450 還元酵素を加えた再構成系を用いた。基質および生成物標品を合成し, 酵素反応物の構造は GC-MS, LC-MS 分析により決定した。

① C-22 位水酸化酵素 CYP90B1 の酵素学的解析

CYP90B1 はステロールの C-22 位水酸化酵素であることを生化学的に実証した。また CYP90B1 の反応速度論解析から基質特異性を示す k_{cat} / K_m は, カンベスタノール (CN) に比べカンベステロール (CR) が約 300 倍高く, CR は CYP90B1 の良い基質となることが明らかとなった。また植物体内の CR および CN の内生量分析の結果, CRの方が CN より約 50 倍多かった。以上より, 植物体内では早期 C-22 位水酸化経路が BR 生合成経路の主要経路であることを示した。

② CYP90C1 および CYP90D1 の酵素学的解析

CYP90C1 および CYP90D1 は 6-デオキシキャサステロン (6-deoxoCT) およびキャサステロンの C-23 位水酸化反応を触媒して, 6-デオキシティーステロンおよびティーステロンをそれぞれ生成した。このことから CYP90C1 と CYP90D1 はともに C-23 位水酸化酵素であり, 酵素機能が重複していることを明らかにした。また酵素反応速度論解析の結果, 従来基

質として提唱されていた 6-deoxoCT は非常に悪い基質であったのに対し、早期 C-22 位水酸化経路上の BR 生合成中間体は良い基質となり k_{cat} / K_m を比較すると 6-deoxoCT の 60-120 倍高いことが明らかとなった。以上より、CYP90C1 と CYP90D1 により早期 C-22 位水酸化経路上の BR 生合成中間体から直接 6-デオキソ-3-デヒドロティーステロンおよび 6-デオキソティファステロンへとそれぞれ C-23 位水酸化される新規 BR 生合成経路の存在を明らかにした。

③ CYP90A1 の酵素学的解析

従来 CYP90A1 が BR C-23 位水酸化酵素であると推定されていたが、上記のように CYP90C1 および CYP90D1 が C-23 位水酸化酵素であることを生化学的に証明した。そこで CYP90A1 の生化学的解析を行った結果、CYP90A1 は (22*S*)-22-ヒドロキシカンベステロール (22-OHCR) および (22*R*, 23*R*)-22,23-ヒドロキシカンベステロール (22,23-OHCR) の C-3 位酸化反応を触媒することを明らかにした。さらに CYP90A1 の酵素反応速度論解析を行い、CYP90A1 の 22-OHCR および 22,23-OHCR に対する k_{cat} / K_m を比較すると 22,23-OHCR に対する k_{cat} / K_m が 13 倍高いことを明らかにした。

④ 新規 P450 ファミリー CYP724B の酵素活性の解明

機能未知な新規 P450 ファミリー CYP724 は BR 生合成に関与する可能性が高いと推定された。そこでトマト由来の新規 P450 である CYP724B2 cDNA を単離し、その機能解析を行なった。その結果、CYP724B2 は CR, (24*R*)-エルゴスト-4-エン-3-オン, (24*R*)-5 α -エルゴスタン-3-オン, CN を基質として C-22 位水酸化反応を触媒する酵素であることが明らかとなった。またトマトには、従来の C-22 位水酸化酵素である CYP90B3 も存在し、同じ反応を触媒することを明らかにした。

2) ブラシノステロイド代謝に関わる P450 の酵素機能の解明

BR 代謝に関わる P450 は CYP734A ファミリーに属することが知られているが具体的な酵素活性は不明であった。そこで、トマト由来 CYP734A7 cDNA をクローニングし、*in vitro* および *in vivo* の両面から機能解明を行った。CYP734A7 を過剰発現させた組換えタバコ植物は、典型的な BR 欠乏症の表現型と類似していた。そこで GC-MS 分析により BR 内生量を定量した結果、CS が顕著に減少した。また CYP734A7 を用いて酵素解析を行った結果、CS の C-26 位水酸化活性を示し、BL に対しても同様の活性を示した。以上、CYP734A7 は C-26 位水酸化酵素であり、BR 不活性化に重要な酵素であることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

本論文は、従来のブラシノステロイド (BR) の研究とは異なる生化学的手法を用いることにより BR 生合成および代謝系に関わる P450 酵素の機能を酵素学的に明らかにするとともに、BR 新規生合成経路の存在を示したものである。本研究は植物にとって必須ホルモンである BR の農業や食料増産への応用研究を行うために重要な生化学的知見を与えるものである。評価される主な点は以下の通りである。

1) CYP90B1 が C-22 位水酸化酵素であることを生化学的に証明するとともに、カンベスタノールの前駆体であるカンベステロールが C-22 位水酸化される早期 C-22 位水酸化経路が生合成経路の主要経路であることを示した。

2) BR C-2 位水酸化酵素、C-3 位酸化酵素であると予想されていた CYP90C1 と CYP90D1 は、ともに実は C-23 位水酸化酵素であり、酵素機能が重複していることを明らかにした。

3) CYP90C1 と CYP90D1 により早期 C-22 位水酸化経路上の BR 生合成中間体から直接 6-デオキソ-3-デヒドロティーステロンおよび 6-デオキソティファステロンへとそれぞれ C-23 位水酸化される BR 新規生合成経路の存在を明らかにした。

4) CYP90A1 が BR C-3 位酸化酵素であることを明らかにした。その結果、従来 C-23 位水酸化酵素であると提唱されていた CYP90A1 の酵素機能が誤りであることが実証され、真の酵素機能が明らかとなった。

5) トマトには 2 つの異なる P450 ファミリーに属する CYP724B2 と CYP90B3 が存在し、CYP724B2 と CYP90B3 がともに C-22 位水酸化酵素であることを明らかにした。

6) CYP734A7 は活性型 BR であるブラシノライドおよびカスタステロンの C-26 位水酸化酵素であり、BR 不活性化にとって重要な酵素であることを明らかにした。

以上のように、本論文はBRの生合成・代謝に関わる9種のP450遺伝子を単離・同定し、そのP450酵素の活性（基質、代謝物、酵素反応速度）を解析することにより、BRの生合成および代謝について遺伝子、酵素、化合物の3つの側面から分子レベルで解明したものである。その結果は、BRの生理機能の解明や農業分野への応用に役立つことを示唆している。これらの点で本論文は、植物生理学、植物生化学、ならびに酵素化学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18年4月13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にあるものと認めた。