

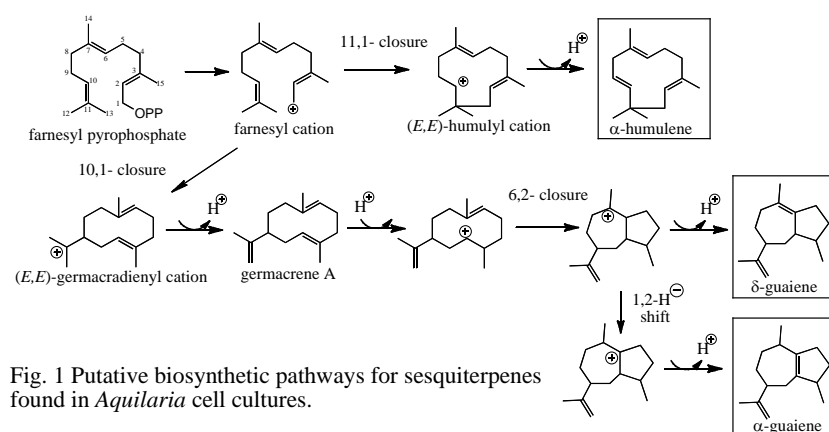
京都大学	博士 (薬学)	氏名	糸田 (奥寺) 幸恵
論文題目	<i>Aquilaria</i> 属植物におけるセスキテルペン生合成機構の解析		

(論文内容の要旨)

ジンチョウゲ科*Aquilaria*属植物に沈着した樹脂は沈香と呼ばれ、生薬および薫香料として用いられており、その主な香气成分はセスキテルペンである。テルペノイドは医薬品・香料などにも用いられる有用な天然物であり、その生合成研究には多くの関心が寄せられている。沈香に含まれるセスキテルペンは多様な骨格をもち、誘導型の生成パターンを示すためその生合成制御機構に興味をもたれるが、これまで分子レベルでの研究は行われてこなかった。そこで本研究では、*Aquilaria*属植物より誘導した培養細胞を実験材料として化合物の生成・蓄積とそれを担う酵素について分子生物学的観点から様々な実験を行った。

1. *Aquilaria*属植物培養細胞におけるセスキテルペンの生成

沈香樹脂は健全状態の植物体では生成されず、傷害や菌類の感染により生成が誘導されると考えられている。そこで、植物の防御反応の際のシグナル伝達物質として知られているメチルジャスモン酸 (MJ) を*Aquilaria*属植物の培養細胞に投与し、セスキテルペン生成の詳細な経時分析を行った。その結果、MJ投与により3種のセスキテルペン(α -guaiene, α -humulene, δ -guaiene) (Fig. 1)の生成が誘導され、生成量、蓄積量ともに投与後12時間で最大となり、投与後6時間付近では α -humuleneが、それ以降では δ -guaieneが主生成物であるが、 α -humuleneの多くは揮発してしまっていることが確認された。



2. セスキテルペン合成酵素のクローニングと機能解析

2-1. δ -Guaiene synthaseのクローニングと機能解析

MJを投与した培養細胞からのcDNA library作製とRACE法によりterpene synthaseのクローニングを試みたところ、相同性は非常に高いが数個のアミノ酸が異なるクローンを4つ得た。これらのクローンを大腸菌内で蛋白発現しfarnesyl pyrophosphate

を基質として機能解析したところ、4つのうち1つのクローンは全く活性がみられなかったが、3つのクローンはすべてMJ投与細胞から生成が誘導される3種のセスキテルペンを、 δ -guaieneを主生成物として生成した。これらはguaiane型のセスキテルペンを主生成物とする酵素としては初めてクローニングされたものである。

2-2. α -Humulene synthaseのクローニングと機能解析

次に、 α -humulene を主生成物とする酵素のクローニングを目的としてテルペン合成酵素に高度に保存されているアミノ酸の配列をもとに縮重プライマーを設計し、MJ投与細胞からRACE法にて δ -guaiene synthaseとは異なる配列を持つクローンを得た。このクローンの機能解析を行ったところ、 α -humuleneのみを主生成物として生成した。前述の結果と合わせ、培養細胞で生成される3種のセスキテルペンの生成に少なくとも2種類の酵素が関与していることが示された。

2-3. δ -Guaiene synthaseとその変異体の3次元構造予測

2-1でクローニングされた全く活性のないクローンと活性のあるクローンのアミノ酸配列を比較し、部位特異的変異処理を行うことにより活性回復に重要な役割をもつアミノ酸残基を4つ同定した。さらに3D-homology modeling解析を行い、これらの酵素においてN末端領域の構造は、酵素活性発現に必要なC末端領域の適切な折りたたみを促進する役割があることが予測された。

以上のように、申請者は*Aquilaria*属植物におけるセスキテルペン合成について培養細胞を用いた分子レベルでの検討を行い、MJ投与細胞から δ -guaiene synthase, および α -humulene synthaseをクローニングし、これらの働きにより3種のセスキテルペンが生成されることを示した。これらの酵素は*Aquilaria*属植物から初めてクローニングされた酵素であり、特に δ -guaiene synthaseは、guaiane型セスキテルペンを主生成物とする酵素としては初めてのものである。また、 δ -guaiene synthaseとその変異体の3次元構造予測により、N末端領域の構造の酵素活性発現に対する重要性が示唆された。本研究は、植物由来生理活性テルペノイド合成研究に重要な知見を与える新たな発見を含むものである。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

申請者は沈香樹脂の生成・蓄積メカニズムの解明を目的として研究を展開し、特に高級沈香に多く見出されるセスキテルペン成分が、ジンコウジュの防御反応機構に基づき植物が生成するものであることを、当該成分を生合成する酵素遺伝子のクローニングにより科学的に証明した。さらに、クローニングした酵素遺伝子について、その三次元構造と触媒機能についての解明にも挑戦し、テルペン合成酵素における重要な基礎的知見を明らかにした。これらの知見は、基原の絶滅が危惧されており (CITES appendix II list)、資源枯渇が深刻になりつつある沈香の、持続可能な利用にも寄与する成果であり、生薬学および薬用植物学的に価値のある研究成果である。また、沈香はその特殊性から基原を鑑別することが非常に困難な生薬の一つであり、国際的な取り締まりの上でもその鑑別方法の開発が強く望まれ続けている。申請者は、自身がクローニングした酵素遺伝子の配列がその鑑別手段に利用可能であることも、検討の末、報告した。これらは生薬学の幅広い研究領域と複眼的視点をうまく活用した研究展開であり、高く評価できるものである。

よって本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成23年2月22日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降