

氏名	まる やま たく ろう 丸 山 卓 郎
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 479 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 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	薬学研究科創薬科学専攻
学位論文題目	リモネン生合成における立体選択性に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 本多義昭 教授 藤井信孝 教授 富岡 清

### 論 文 内 容 の 要 旨

イソプレンを基本単位とするテルペン類は、二次代謝物の主要な一群であり膨大な数が天然に存在する。その中には有用な生物活性を持つものも数多く、医薬資源として重要な化合物群である。近年、分子生物学的技術を用いてこのテルペン類の生合成酵素の遺伝子も数多くクローニングされるようになってきているが、モノ、セスキ、ジテルペンの各生合成酵素遺伝子は互いに高い相同性を示すことが明らかになっている。しかし、これらの酵素の構造と生合成能との関係については多くの未知の領域が残されている。

本研究では、テルペノイド類の中で最も単純な構造で、不斉炭素原子を有する環状モノテルペンの limonene に着目し、立体選択的環化反応の機構解明を試みた。

#### 第一編 *d*-リモネン合成酵素遺伝子のクローニング

これまでにクローニングされているリモネン合成酵素はいずれも *l*-limonene の合成酵素であり、その起原の多くはシソ科植物である。そこで同じシソ科植物であるケイガイ及びカワミドリより *d*-リモネン合成酵素遺伝子をクローニングし、その推定アミノ酸配列を *l*-リモネン合成酵素のものと比較した。

##### 第一章 ケイガイからの *d*-リモネン合成酵素遺伝子のクローニング

開花最盛期のケイガイの花穂より調製した cDNA を鋳型とし、各種テルペン合成酵素に保存性の高い配列を基に設計した縮重プライマーを用いて PCR を行った。その結果、リモネン合成酵素遺伝子のコア配列を得、RACE 法を用いて各末端領域の配列を解析することにより、全長配列をクローニングした。

次に、ウサギ網状赤血球を用いた *in vitro* 転写/翻訳系によりこの遺伝子の組み替えタンパクを発現させた。得られた酵素タンパクについて GPP (geranyl pyrophosphate) を基質として酵素反応を行い、生成物を GC-MS により分析した結果、*d*-limonene が確認された。

##### 第二章 カワミドリからの *d*-リモネン合成酵素遺伝子のクローニング

カワミドリの新鮮葉を用いて cDNA を調製し、ケイガイとほぼ同様の手法により *d*-リモネン合成酵素遺伝子をクローニングした。

ケイガイ及びカワミドリから得られた *d*-リモネン合成酵素遺伝子の推定アミノ酸配列を既知の *l*-リモネン合成酵素のものと比較した結果、両者は非常に高い相同性を示した。このことから、リモネン合成酵素における立体選択性の制御はごく少数のアミノ酸残基に担われていることが示唆された。

#### 第二編 遺伝子工学的手法による立体制御部位の解析

##### 第一章 Domain swapping 法によるキメラ遺伝子の構築と酵素活性

立体制御に関わるアミノ酸配列を絞り込む目的で、ケイガイ由来 *d*-リモネン合成酵素とシソ由来 *l*-リモネン合成酵素をほぼ均等に 4 領域に分け、それぞれを組み合わせたキメラ遺伝子を構築し、タンパク発現させ、その酵素反応生成物を GC

-MSにより解析した。しかし、これら14種のキメラ遺伝子由来のタンパクには酵素活性が見られなかった。

## 第二章 Site-directed mutagenesis 法による変異遺伝子の構築と酵素活性

GPP から limonene への環化反応は、カルボカチオン中間体を經由すると考えられることから、立体選択性の制御にはカチオン中間体を捕捉する酵素タンパクの三次構造が重要であると予想される。そこで、カチオン中間体と相互作用をし得るアミノ酸、すなわち芳香族アミノ酸及び酸性アミノ酸を中心に site-directed mutagenesis のターゲットとして選び、これらを変異させた13個の変異体を構築し、その酵素活性を検討した。その結果、6種の変異体において酵素活性が消失し、5個のアミノ酸 (F<sup>227, 392</sup>, L<sup>312</sup>, E<sup>584</sup>, Y<sup>596</sup>) が酵素活性に重要な役割を担っていることが示された。この5個のアミノ酸は一次構造中の広い範囲に分布しており、この結果は domain swapping 法においてキメラ遺伝子全てが酵素活性を失った事実と矛盾しない。

上記の結果から、リモネン生合成における立体選択性の制御は、酵素内の基質受容ポケットの立体的な形状そのものを変えることによって基質の配座を固定しているか、あるいはポケットの空間的な大きさや形状は変化せずに、複数のアミノ酸によってカチオン中間体の配座のみを変えることによって行われていると考えられる。

以上、本研究は立体異性を有するモノテルペンの合成酵素の異同を分子生物学的手法により明らかにしたものであり、本研究結果は植物における二次代謝制御機構、特にテルペン類の生合成に関する立体制御機構の解析に基礎的な知見を加えるものである。

## 論文審査の結果の要旨

イソプレンを基本単位とするテルペン類は、二次代謝物の主要な一群であり、また、医薬資源としても重要な化合物群である。近年、分子生物学的手法を用いてこのテルペン類の生合成酵素の遺伝子も数多くクローニングされるようになってきているが、これらの酵素の構造と生合成能との関係については多くの未知の領域が残されている。本研究は、テルペノイド類の中で最も単純な構造で、不斉炭素原子を有する環状モノテルペンの limonene に着目し、立体選択的環化反応の機構解明を試みたものである。

これまでにクローニングされているリモネン合成酵素はいずれも *l*-limonene の合成酵素であり、その起原の多くはシソ科植物であることから、著者は同じシソ科植物であるケイガイ (*Schizonepeta tenuifolia*) 及びカワミドリ (*Agastache rugosa*) より *d*-リモネン合成酵素遺伝子をクローニングし、その推定アミノ酸配列を *l*-リモネン合成酵素のものと比較することにより、これらの生合成酵素が生成物の立体化学とは無関係に高い相同性を示すことを明らかにした。

次いで、著者は立体制御部位の特定を目的に、ケイガイ及びシソ (*Perilla frutescens*) 由来の *d*-、*l*-リモネン合成酵素遺伝子を用いた domain swapping 実験及び site-directed mutagenesis 実験を行い、酵素活性の発現に重要な役割を担っているアミノ酸5個を特定し、これらのアミノ酸が一次構造中に散在して分布することを見出した。

さらに、ケイガイ由来 *d*-リモネン合成酵素の三次元モデルにおける上記のアミノ酸の分布からこれらのアミノ酸残基の役割を推定し、リモネン生合成における立体化学の制御が、次の2つの機構、すなわち1) 活性ドメイン内での電気的相互作用を介して基質分子をホールディングする、2) 活性ドメイン自身の立体的な形状の違いによって基質分子を固定する、によってなされている可能性を示した。

以上、本研究は、リモネン合成酵素を例に、立体異性を有するモノテルペンの生合成に関係する合成酵素の異同を分子生物学的手法により明らかにしたものであり、その成果は植物における二次代謝制御機構、特に多様な生理性を有するテルペン類の生合成に関する立体制御機構の解析に基礎的な知見を加えるものである。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成14年2月28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。