

氏名	崔 琴 富
学位(専攻分野)	博士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1218 号
学位授与の日付	平成 13 年 11 月 26 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	Biochemical and molecular analyses of coclaurine <i>N</i> -methyltransferase from cultured <i>Coptis japonica</i> cells (オウレン培養細胞のコクラウリン <i>N</i> -メチルトランスフェラーゼの生化学的・分子生物学的解析)
論文調査委員	(主 査) 教授 佐藤文彦 教授 關谷次郎 教授 大山莞爾

論 文 内 容 の 要 旨

イソキノリンアルカロイドは植物が生産するもっとも多様なアルカロイドである。その一つベルベリンは抗菌性を有し、抗菌性整腸剤として使用されている。一方、ベルベリンはその生合成経路が酵素レベルで解明された最初のアルカロイドである。ベルベリンの生合成系の酵素は構造的に類似した基質を厳密に認識する高い基質特異性を有し、酵素の構造と機能、さらには二次代謝産物の分子育種の観点から活発に研究が進められている。本論文はベルベリン生合成系で唯一存在する *N*-メチル化酵素、*S*-adenosyl-L-methionine:coclaurine *N*-methyltransferase (CNMT) の構造と機能を分子レベルで解明することを試みたものである。その内容は以下のとおりである。

第 1 章ではオウレン培養細胞からの CNMT の精製と生化学的解析を記述している。すなわち、ベルベリンを高生産するオウレン培養細胞から、粗酵素液を調製し、Phenyl Sepharose, Q-Sepharose, Mono Q, さらには Mono P カラムクロマトグラフィー法によって約 340 倍に CNMT を精製した。この精製標品は SDS-PAGE 分析において、2 本のバンドのみを示した。

この精製 CNMT を用いて、生化学的解析を行なった結果、CNMT は約 45kDa のサブユニットからなる四量体 (160kDa) であることがわかった。本酵素は天然の基質として (*S*)-coclaurine をメチル化するが、(*R*)-coclaurine を基質に用いた場合にもっとも高い酵素活性を示し、基質に対する立体特異性を持たないことが確認された。さらに、基質特異性を検討した結果、オウレン CNMT はこれまでに報告のあるメギ CNMT とは異なり、norlaudanoline や単純なイソキノリン誘導体である 6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, 1-methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline などを *N*-メチル化することを初めて明らかとした。なお、反応に無機イオンは必須でなく、 Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} の添加は阻害的であった。一方、*p*-chloromercuribenzoate や iodoacetamide は活性を阻害しなかった。また、CNMT は norreticuline と *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) に対して、典型的な Michaelis-Menten 型反応を示し、それぞれの基質に対する K_m 値は 0.38mM, 0.65mM と求められた。

第 2 章では、CNMT cDNA の単離と大腸菌における発現、ならびにその生化学的解析を記述している。まず、前述の最終精製標品には 2 本のバンドを認めていたが、クロマトグラフィーによる酵素活性の溶出パターンと SDS-PAGE の詳細な比較から、移動度の遅いバンドを CNMT と推測した。続いて、このタンパク質の N 末端アミノ酸を 33 残基決定した。このアミノ酸配列に基づいてプライマーを設計し、まず、N 末端部分の PCR による増幅を行なった。その結果、相当する配列が得られ、その配列を元に再度プライマーを設計し、PCR ならびに 5'RACE により全長と考えられる cDNA をクローニングした。得られた cDNA は 1274bp からなり、358 アミノ酸をコードしていた。

単離した cDNA が実際に CNMT をコードすることを明らかとするために、本 cDNA を大腸菌中で発現させ、その酵素活性を測定した。その結果、本 cDNA 産物が CNMT 活性を有することが HPLC ならびに LC-MS 分析により確認された。大腸菌で大量発現した組換え CNMT を用いることにより、培養細胞からの精製よりも 1 段階少ない精製ステップで単一タ

ンパク質にまで精製することが可能であった。

単一タンパク質にまで精製した CNMT を用いて、再度その生化学的性質を決定した。その結果、比活性の大幅な増加はあるが、組換え CNMT とオウレン培養細胞から精製した酵素は近似した基質特異性、基質親和性を示すことが明らかとなった。

CNMT の一次構造をこれまでに単離されたメチル化酵素と比較した結果、CNMT は、トマトの phosphoethanolamine *N*-メチル化酵素と低いながら相同性を示すが、他のアルカロイド生合成酵素との相同性は低いこと、また、*N*-メチル化酵素は *O*-メチル化酵素よりも多様な構造をもつことが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

チロシンから13段階の反応により生合成されるベルベリンの生合成系酵素は構造的に類似した基質を特異的に変換することにより、酵素の構造と機能、ならびに二次代謝産物の分子育種の観点から興味深い研究対象である。本論文はベルベリン生合成系で唯一存在する *N*-メチル化酵素であり、生合成の律速酵素でもある *S*-adenosyl-*L*-methionine: coclaurine *N*-methyltransferase (CNMT) の構造と機能を分子レベルで解明することを試みたものであり、その評価できる点は以下のとおりである。

1. CNMT をベルベリン高生産オウレン培養細胞から高度に精製し、その生化学的性質を初めて明らかにしている。すなわち、オウレン CNMT は45kDa のサブユニットからなる四量体であり、(*S*)-coclaurine に加えて、(*R*)-coclaurine, norreticuline, norlaudanosoline や単純なイソキノリン誘導体である 6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline など幅広い基質を *N*-メチル化することを初めて明らかとしている。

2. CNMT のクロマトグラフィー的挙動と SDS-PAGE の解析から、CNMT に相当するタンパク質を特定し、その *N* 末端アミノ酸配列を33残基決定することにより、CNMT をコードすると考えられる cDNA を単離することに成功している。さらに、本 cDNA の一次構造の決定から、単離された cDNA は358アミノ酸をコードし、トマトの phosphoethanolamine *N*-メチル化酵素と低いながら相同性を有することを明らかとしている。

3. 単離した cDNA を大腸菌中で発現させ、この cDNA が CNMT をコードすることを HPLC ならびに LC-MS 解析により明らかとしている。

4. 組換え CNMT はオウレン培養細胞からの精製よりも1段階少ない精製ステップにより単一タンパク質に精製でき、培養細胞由来精製酵素よりも高い比活性を示すが、培養細胞由来精製酵素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。

5. CNMT の一次構造から、CNMT はメチル化酵素に保存されているモチーフ A を持つが、*O*-メチル化酵素との共通性は低いこと、さらに、*N*-メチル化酵素の一次構造は *O*-メチル化酵素よりも多様であること等の知見を明らかとしている。

以上のように本論文は、ベルベリン生合成の律速酵素である CNMT の生化学的性質とその一次構造を明らかにし、さらに大腸菌で発現した組換え酵素が多様な化合物の物質変換に有用であることを初めて明らかにしたものであり、植物分子細胞育種学、植物分子細胞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13年10月18日、論文並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。