

|  |                           |    |        |
|--|---------------------------|----|--------|
| 京都大学   | 博士 (薬科学)                  | 氏名 | 馬場 まり子 |
| 論文題目   | シソのフェニルプロペン型精油成分生合成に関する研究 |    |        |
| <p>(論文内容の要旨)</p> <p>化学構造にフェニルプロパノイド骨格をもつ精油成分は、香料として以外にも医薬品や健康食品としても有用な化合物である。例えば、主な精油成分としてミリスチシンを含むナツメグは、香辛料としてだけでなくニクズクの生薬名で芳香性健胃薬としても利用される。これらの成分については薬理作用や毒性の研究が進められてはいるが、報告が少ない化合物も多い。生合成経路についてもほとんど明らかとなっておらず、多様な位置や数の置換基の形成に関わる生合成酵素遺伝子のクローニングは少ない。</p> <p>シソ (<i>Perilla frutescens</i> Britton var. <i>crispa</i> W. Deane) は主な精油成分にモノテルペノイドであるペリラルデヒドを含むものが中国や日本で薬用とされているが、精油成分の生合成経路は遺伝的に制御されており、モノテルペノイドを含まずフェニルプロパノイドを主成分とするシソも存在する。所属研究室では自家受粉を繰り返すことで数千のシソの純系を確立しており、これらの系統は精油の主成分の化学構造からモノテルペン型とフェニルプロペン (PP) 型の二つに大きく分けることができ、それぞれ主成分名によりさらに細かく数種類ずつに分類できる。これらの分類を精油型と呼び、PP型の系統にはミリスチシンとディラピオールを主成分とするPP-md型などが存在する。</p> <p>本研究では、シソの精油型に着目して作成したexpressed sequence tag (EST) ライブラリーをもとにPP型精油成分の生合成に関わる酵素遺伝子を探索した。</p> <p>第1章 ディラピオール生合成に関わるシトクロムP450のクローニングと機能解析</p> <p>シソのPP型精油成分は構造にメトキシ基やメチレンジオキシ基をもち、これらの生合成にはP450の関与が予想される。そこで、ESTライブラリーからディラピオールを精油中に含むシソ系統で発現量の多いP450類似配列を選抜、rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法により全長配列を決定し、<i>Pf-49487</i> (CYP71D558) を得た。酵母を用いた異種発現により得られたミクロソーム画分で酵素反応を行い、GC-MSで生成物を確認した。酵素反応の基質には、ディラピオールの前駆体物質として予想されるPP型精油成分であるミリスチシンなどを与えた。生成物として得られると予想される基質の一水酸基付加体やその位置異性体は、分析データがなく標品も市販されていなかったため、先行研究を参考に合成し同定のための標品として用いた。その結果、得られた酵素タンパク質Pf-49487はミリスチシンに位置特異的に水酸基を付加することでディラピオールへの中間体を生成するP450であり、メチルオイゲノールやエレミンも水酸化できることが示された。</p> |                           |    |        |

## 第2章 ノトアピオール生合成に関わるシトクロムP450のクローニングと機能解析

ノトアピオールを精油中に含む系統で発現量の多いP450類似配列を、第1章と同様の方法により選抜、全長配列を決定し*Pf-18428* (CYP71D623) を得た。酵母による異種発現で得られた酵素タンパク質*Pf-18428*はディラピオールやアピオールに水酸基を付加しノトアピオールへの中間体を生成することが確認され、前述の*Pf-49487*と同様にミリスチシンも水酸化した。しかし、*Pf-18428*は*Pf-49487*とは異なりミリスチシンを基質としたときに微量の位置異性体を生成した。

以上の結果から、シソのPP型精油成分であるディラピオールは*Pf-49487*によるミリスチシンの水酸化とそれに続く*O*-メチル基転移酵素の働きによるメトキシ基の形成により生成することが示唆された。一方ノトアピオールは、*Pf-49487*と*Pf-18428*によるミリスチシンの水酸化により生じた二つの位置異性体から*O*-メチル基転移酵素によりディラピオールとアピオールが生成し、これらの*Pf-18428*による水酸化と続くメトキシ基の形成を経て生成されることが推測される。*Pf-18428*を発現する系統の精油中には多量のディラピオールと少量のアピオールが含まれるが、*Pf-18428*の酵素反応の結果、アピオールはディラピオールよりも選択的に水酸化されると示唆された。従って、これはアピオールが*Pf-18428*によってより多く消費されディラピオールがあまり消費されず蓄積するためと考えられる。

また、本研究でクローニングした二つの配列*Pf-49487*と*Pf-18428*はどちらもCYP71Dに分類され、これらはセスキテルペノイドの環に水酸基を導入するプレムナスピロジエンオキシゲナーゼと相同性が高く55%程だった。*Pf-49487*と*Pf-18428*は相同性が77%と高いにも関わらず基質特異性や位置特異性に異なる特徴が見られた。配列の比較から、推定される基質認識部位にアミノ酸の置換は複数あり、*Pf-49487*の三つの連続したAlaは*Pf-18428*ではSer-Ser-Thrとなっているなど、特異性への関与が推測される部位が示された。

以上のように、申請者はシソのPP型精油成分であるディラピオールやノトアピオールの生合成に関与する水酸化酵素であるP450をクローニングした。本研究は、多用されているにも関わらず有用性などが研究途中であるフェニルプロパノイド骨格をもつ精油成分の生合成経路解明につながり、植物が生成する有用化合物の遺伝的な制御にも寄与できると考えられる。また、本研究でクローニングした配列のように反応の基質や位置が特異的である酵素は、医薬品となり得る複雑な化合物の選択的な合成や、生物合成による天然香料の生産への応用も期待される。

(論文審査の結果の要旨)

本論文では、シソ純系を用いて作製した発現遺伝子配列断片 (EST) ライブラリーをもとにして、フェニルプロペン (PP) 型のシソに特徴的に発現するシトクロムP450類似配列を選抜し、PP型精油成分であるディラピオールとノトアピオールの生合成に関わるP450の遺伝子をそれぞれクローニングした。また、生合成反応の中間体と予想される化合物を合成して標品として用いて解析を行い、PP型のシソ系統の精油成分分析の結果と併せて生合成経路について考察している。

第1章では、ディラピオールを精油中に含むシソ系統で発現量の多いP450類似配列をESTライブラリーから選抜して全長配列を決定し、*Pf-49487* (CYP71D558) と名付けた。ディラピオールの前駆体物質と予想されるさまざまな化合物を基質として用いて、酵母を用いて発現させた酵素タンパク質Pf-49487と反応させることによって、Pf-49487がミリスチシンに位置特異的に水酸基を導入するP450であることを示した。また、メチルオイゲノールやエレミシンに関しても、対応する位置に水酸基を導入できることを示した。

第2章では、第1章と同様にして、ノトアピオールを精油中に含むシソ系統で発現量の多いP450類似配列をクローニングして全長配列を決定し、*Pf-18428* (CYP71D623) と名付けた。酵母で発現させた酵素タンパク質Pf-18428を用いた解析によって、Pf-18428がディラピオールやアピオールに水酸基を導入して、ノトアピオールへの中間体を生成することを示した。ただし、Pf-18428はPf-49487とは異なり、ミリスチシンを基質としたときに、水酸基の導入に関して微量の位置異性体を生成することも示した。これらの結果をもとにして、Pf-18428とPf-49487が関与し、ミリスチシンから分岐してノトアピオールに至る二つの生合成経路があると予想した。さらに、Pf-18428とPf-49487を、既知の植物P450の配列と比較することによって、基質特異性や水酸基の導入に関する位置特異性の考察を行った。

よって、本論文は博士 (薬科学) の学位論文として価値あるものと認める。また、令和3年2月17日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 2021年 3月 24日以降

〔注〕

1. (記述例1)を参考に、論文審査の結果の要旨の結句には学位論文の審査についての認定を明記するとともに、試問の結果の要旨を付け加えること。
2. 論文の公表方法について、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断され、かつその旨を「論文審査の結果の要旨」に記載する場合は、(記述例2)を参考に記述すること。
3. 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、欄外の「要旨公表可能日」欄に、公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内となる。)