

氏 名	いぬい 乾 たか 貴 ゆき 幸
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 107 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 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	生 命 科 学 研 究 科 統 合 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	オウレンの <i>O</i> -メチル化酵素遺伝子を用いたハナビシソウ培養細胞におけるベンジルイソキノリンアルカロイド生合成系の分子育種
論文調査委員	(主 査) 教 授 佐 藤 文 彦 教 授 山 本 憲 二 教 授 河 内 孝 之

論 文 内 容 の 要 旨

高等植物の生産する二次代謝産物は、その強い生理活性から、医薬品などとして利用されている。しかし、植物個体における生産性は十分でなく、培養細胞系を用いた培養条件の最適化や高生産細胞株の選抜による生産性の向上が試みられてきているが、十分な生産性を示すものは限られている。一方、生合成関連遺伝子のクローニングおよび遺伝子導入技術の進展に伴い、近年、これら遺伝子を用いた代謝工学により有用物質の生産性を人為的に改変することが可能となってきた。本研究では、多くの重要な医薬品原料を含み、かつ、生合成酵素遺伝子の単離および生合成制御に関する研究が進んでいるベンジルイソキノリンアルカロイド (BIA) 生合成系をモデルに有用二次代謝産物の代謝工学による生産性向上の可能性について検証を行った。

BIA 生合成系の初期酵素、特に *O*-メチル化酵素 (OMT) の活性と生産性には相関性が認められたことなどから、1 章では、オウレン (*Coptis japonica*: *Cj*) 由来の 2 種の *O*-メチル化酵素, norcoclaurine 6-OMT (6OMT) および 3'-hydroxy-*N*-methylcoclaurine 4'-OMT (4'OMT) cDNA をハナビシソウ (*Eschscholzia californica*: *Ec*) に導入し、これら遺伝子の過剰発現が BIA 生産性に与える効果を評価した。まず, *Cj*OMT 遺伝子を高発現するハナビシソウの形質転換培養細胞を確立し、アルカロイド含量の解析を行ったところ, *Cj*6OMT の高発現株でのみ、野生株の平均に比べて最大 7.5 倍と顕著なアルカロイド総含量の増加を認めた。また、形質転換細胞における *Cj*6OMT の転写産物量とアルカロイド含量との間により相関性があることを明らかとした。一方、これら形質転換細胞では内在の BIA 生合成系遺伝子の発現が活性化されている可能性を示唆する結果も得られた。しかし、これら内在性遺伝子の活性化はアルカロイド生合成能の増大にはつながっておらず、ハナビシソウの BIA 生合成においては, *Cj*6OMT 遺伝子の過剰発現が律速の解除に大きく寄与していることが明らかとなった。

2 章では、ハナビシソウ BIA 生合成系における律速段階であると考えられた 6OMT について、ハナビシソウからの遺伝子単離と機能解析を試みた。しかし、PCR, EST 解析による *Ec*6OMT 遺伝子の単離は困難であり、ハナビシソウにおいては特異的 6OMT を欠いている可能性、すなわち、他の OMT が 6OMT として機能している可能性が示唆された。そこで、ハナビシソウより 4'OMT cDNA を単離し、その詳細な機能解析を行った結果, *Ec*4'OMT が従来知られていた 4'OMT 活性のみならず 6OMT 活性をも有することをはじめて明らかとした。同様の活性は *Cj*4'OMT でも検出されたが, *Cj*6OMT には 4'OMT 活性は検出されなかった。以上、ハナビシソウにおいては 4'OMT が 6OMT としても機能している可能性が示唆された。また, *Ec*4'OMT の 6OMT としての比活性は *Cj*6OMT の比活性と比べ非常に低く、ハナビシソウへ導入した *Cj*6OMT 遺伝子がアルカロイド含量の増大に有効であったことの要因と考えられた。さらに 4'OMT と 6OMT の関係について、分子系統樹ならびに遺伝子のゲノム構造を解析した結果, 6OMT は 4'OMT そのもの、あるいは、それに近い祖先酵素から、重複と特異的 6OMT への分化によって進化してきた可能性があるとし唆された。

前述のように、6OMT の機能分化は、BIA 生産性に大きく影響することから、BIA 生合成系の進化において 6OMT と

4'OMT の機能分化が重要なステップであると考えられた。

論文審査の結果の要旨

高等植物の生産する二次代謝産物は、その強い生理活性から、医薬品などとして利用されている。しかし、植物個体における生産性は十分でなく、さらなる生産性の向上が試みられている。近年、生合成関連遺伝子のクローニングおよび遺伝子導入技術の進展に伴い、これら遺伝子を用いた代謝工学により有用物質の生産性を人為的に改変することが可能となってきたが、未だ、その戦略基盤は十分に検討されていない。本研究では、多くの重要な医薬品原料を含み、かつ、生合成酵素遺伝子の単離および生合成制御に関する研究が進んでいるベンジルイソキノリンアルカロイド（BIA）生合成系をモデルに有用二次代謝産物の代謝工学による生産性向上の可能性について検証を行った結果をまとめたものであり、その評価できる内容は以下のとおりである。

- 1) オウレン (*Coptis japonica*: *Cj*) 由来の 2 種の *O*-メチル化酵素, norcoclaurine 6-OMT (6OMT) および 3'-hydroxy - *N*- methylcoclaurine 4' - OMT (4'OMT) cDNA を用い、形質転換系の確立していたハナビシソウ (*Eschscholzia californica*: *Ec*) に導入し、*Cj*OMT 遺伝子を高発現するハナビシソウの形質転換培養細胞を確立している。さらに、これら細胞のアルカロイド含量の解析を行ない、*Cj*6OMT の高発現によりアルカロイド含量が顕著に増加すること、また、形質転換細胞における *Cj*6OMT の転写産物量とアルカロイド含量との間により相関性があることを明らかとしている。
- 2) 形質転換細胞では内在の BIA 生合成系遺伝子の発現全体が活性化されている可能性を示唆するとともに、これら内在遺伝子の活性化はアルカロイド生合成能の増大にはつながっておらず、ハナビシソウの BIA 生合成においては、*Cj*6OMT 遺伝子の過剰発現が律速の解除に大きく寄与していることを明らかとしている。
- 3) 引き続き、ハナビシソウから *Ec*6OMT 遺伝子の単離を試み、ハナビシソウにおいては特異的 6OMT を欠いている可能性を示唆するとともに、ハナビシソウ *Ec*4'OMT の詳細な機能解析から、*Ec*4'OMT が従来知られていた 4'OMT 活性のみならず 6OMT 活性をも有することを始めて明らかとしている。
- 4) *Cj*4'OMT においても同様に 6OMT 活性を持つこと、一方、*Cj*6OMT は 4'OMT 活性を持たないことを確認し、ハナビシソウにおいては 4'OMT が 4'OMT のみならず、6OMT としても機能している可能性を示唆している。
- 5) さらに、分子系統樹ならびに遺伝子のゲノム構造の解析から、6OMT は 4'OMT そのもの、あるいは、それに近い祖先酵素から、重複と特異的 6OMT への分化によって進化してきた可能性を示唆するとともに、BIA 生合成系の進化において 6OMT と 4'OMT の機能分化が重要なステップであるとの仮説を提案している。

以上の結果は、イソキノリンアルカロイド生合成系の律速段階、ならびに、その生合成系酵素の進化について大きく寄与する重要な知見であり、植物分子生理学に寄与するところが大きい。よって、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。

なお、平成19年1月23日、論文内容とそれに関連した分野にわたり口頭試問した結果、博士（生命科学）の学位を授与される学力が十分にあるものと認めた。