

氏 名	もり 森 重 敬
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1283 号
学位授与の日付	平 成 14 年 5 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	農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Molecular characterization of <i>O</i> -methyltransferases involved in isoquinoline alkaloid biosynthesis in <i>Coptis japonica</i> (オウレンにおけるイソキノリンアルカロイド生合成系の <i>O</i> -メチル化酵素の分子生物学的解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 佐 藤 文 彦 教 授 關 谷 次 郎 教 授 島 田 幹 夫

論 文 内 容 の 要 旨

オウレンやキハダが生産するイソキノリンアルカロイド、ベルベリンは、抗菌性、抗炎症作用を持つ健胃薬、整腸剤である。ベルベリンの生合成においては、類似した化合物が順序よくメチル化、水酸化、環化等され、最終産物の生産に至る。このような特異的な生合成反応を理解することは、生命現象を高度に利用する上で重要である。ベルベリンの生合成経路には3種の *O*-メチル化酵素 (OMT), norcoclaurine 6-*O*-methyltransferase (6-OMT), 3'-hydroxy-*N*-methylcoclaurine 4'-*O*-methyltransferase (4'-OMT), scoulerine 9-*O*-methyltransferase (SMT) が存在し、その活性により生合成が制御されている。本論文はオウレン細胞におけるイソキノリンアルカロイド生合成 OMT を対象として、一群の OMT の基質認識および反応特異性と一次構造との関係を明らかにするとともに、新規な反応特異性を有する酵素の創造と代謝制御の基盤を築くことを目的としたものである。その内容は以下の通りである。

第1章では大腸菌発現系を用い4'-OMT, 6-OMT cDNA を新規に同定し、また、組換えタンパク質を用い4'-OMT の酵素化学的解析を行った結果を記述している。これまでの生化学的解析では、4'-OMT と6-OMT の活性を完全に分離することは困難であった。一方、4'-OMT 活性を含む高度に精製した6-OMT に対応する2つのcDNA が単離されていた。これらのcDNA がそれぞれ4'-OMT, 6-OMT に対応し、1つの酵素が2つの活性をもつものではないことを大腸菌発現系とHPLCおよびLC/MSによる解析により明らかにした。さらに精製組換え酵素を用い、これまで解析が困難であったオウレン4'-OMT の酵素化学的特性を解析した。その結果、4'-OMT の基質特異性は6-OMT, SMT と明らかに異なっていること、特に、イソキノリン環の窒素のメチル化により、大幅な活性の増大が認められ、また基質アルカロイドの3'位の水酸基が活性に必須であることを示し、秩序だった生合成において4'-OMT が重要な役割を果たしていることを示した。なお、金属イオン、およびSH試薬の影響は6-OMT と類似しており、SMT とは大きく異なっていた。

第2章ではイソキノリンアルカロイド生合成系の OMT の構造についてさらなる知見を得るため、ベルベリン生合成から分岐するパルマチン生合成系の columbamine *O*-methyltransferase (CoOMT) のcDNA 単離と機能解析を行った結果を記述している。ベルベリン高生産オウレン培養細胞から作製したEST library の中より、6-OMT と相同性を有する新規 OMT 遺伝子を見出した。その全長cDNA を単離し、大腸菌で発現した結果、本cDNA がCoOMT をコードしていることを明らかにした。また、このCoOMT が従来知られているよりも幅広い基質特異性を持つことを明らかにし、従来の生合成経路の再検討が必要であることを示唆した。一方、CoOMT のアミノ酸配列は6-OMT, 4'-OMT と40%の相同性を有しているが、構造が類似した化合物を基質とするSMT との相同性は21%と低いことを明らかにした。

第3章ではベルベリン生合成系の3種の OMT (6-OMT, 4'-OMT, SMT) のキメラ酵素作製とそれらの反応特性の解析を記述している。まず、反応特異性の異なる3種の OMT 間で、相同性の低いN末端側と、保存性の高いC末端側を組換えたキメラ酵素、6種を作製し、その解析を行った。LC/MSによる活性測定の結果、6-OMT のN末端側と4'-OMT のC末端側からなるキメラ酵素が6位の水酸基へのメチル化を触媒することを明らかにし、N末端領域が基質アルカロイ

ドに対する反応特異性を決定していることを示した。

基質認識の特異性を決定するアミノ酸残基を特定するため、4'-OMT と 6-OMT の N 末端側をより細分化したキメラ酵素を 7 種作製し、大腸菌で発現させた。LC/MS 解析により、各キメラ酵素の反応特異性を解析し、N 末端に存在する約 90 アミノ酸残基がメチル化の反応特異性を決定していることを明らかにした。また、すでに 3 次元構造の決定されているイソフラボノイド OMT との比較を行い、アルカロイド OMT の構造と反応特性について考察した。

論文審査の結果の要旨

高等植物はアルカロイドやテルペノイドをはじめとする多様な二次代謝産物を生産する。ベルベリンやモルヒネに代表される一群のイソキノリンアルカロイドは、いずれも強力な薬理活性を有しており、その生合成について盛んに研究が行われている。本研究は、このイソキノリンアルカロイドの生合成における O-メチル化酵素 (OMT) の役割を解明し、OMT を用いた代謝工学の基盤を築くために、オウレン由来の OMT (norcoclaurine 6-O-methyltransferase (6-OMT), 3'-hydroxy-N-methylcoclaurine 4'-O-methyltransferase (4'-OMT), scoulerine 9-O-methyltransferase (SMT), および columbamine O-methyltransferase (CoOMT)) の分子生物学的解析を行ったものであり、その評価できる内容は以下の通りである。

1. オウレン培養細胞から 6-OMT, 4'-OMT をコードする cDNA を同定し、これらの酵素がそれぞれ別の遺伝子に由来することを明らかにしている。また、これまで植物細胞からの精製では分離が困難であった 6-OMT, 4'-OMT を、大腸菌内での発現により、両活性の混在のない精製酵素として調製している。
2. 組換え精製 4'-OMT を用いた酵素化学的解析により、その活性には基質アルカロイドの窒素のメチル化が重要であり、また、基質の 3' 位の水酸基が必須であることを明らかにし、本酵素が生合成の制御において重要な役割を果たしていることを示している。
3. オウレン培養細胞より CoOMT cDNA を単離し、大腸菌で発現した組換えタンパク質を用いてその酵素活性を同定するとともに、本 CoOMT が従来知られているよりも幅広いメチル基転移活性を持つことを明らかにし、従来考えられていたパルマチン生合成経路について再検討の必要性を示している。
4. オウレン OMT 間で、保存性の低い N 末端側と保存性の高い C 末端側を組換えたキメラ酵素を 6 種作製し、N 末端側が基質アルカロイドの認識に重要であることを示している。さらに、N 末端側をより細分化させたキメラ酵素を 7 種作製し、N 末端側の 90 アミノ酸残基により、基質認識が決定されていることを明らかにしている。
5. 作製したキメラ酵素の解析により、これら OMT は構造の可塑性が比較的高く、新規な反応特異性を有する酵素の創造が可能であることを示している。

以上のように本論文は、イソキノリンアルカロイド生合成系の OMT の一次構造と反応特性を明らかにし、さらに、その生合成における重要性ならびに基質認識に必要な一次構造を初めて明らかにしたものであり、植物の二次代謝の分子生物学並びに分子代謝工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 14 年 3 月 19 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。