

氏 名	いけ ざわ のぶ ひろ 池 澤 信 博
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 106 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	イソキノリンアルカロイド生合成系におけるシトクローム P450 遺伝子の構造と機能
論文調査委員	(主 査) 教 授 佐 藤 文 彦 教 授 山 本 憲 二 教 授 小 堤 保 則

論 文 内 容 の 要 旨

高等植物は多様な二次代謝産物を生産するが、それらの生合成経路には多くのシトクローム P450 (P450) が関与している。イソキノリンアルカロイド生合成にも、P450によって担われる反応が存在し、かつ、興味深いことにオルト-メトキシフェノール構造の環化反応であるメチレンジオキシ環形成反応や分子内の炭素-炭素間の結合を形成する C-C フェノールカップリング反応等、一般的な P450 の反応である一原子酸素添加反応とは異なる特異な反応が含まれることが示されている。そこで、イソキノリンアルカロイド産生植物から、これら特異な反応を触媒する P450 遺伝子を単離し、機能解析を行ない、これら P450 の一次構造と機能の関係についての知見を得ることを試みた。

まず、ベルベリン高生産性を有するオウレン培養細胞を用いて単離されていた P450 遺伝子 (*CYP719A1*) を酵母発現系で発現させ、同組換え *CYP719A1* が (*S*)-tetrahydrocolumbamine [(*S*)-THC] を基質としてメチレンジオキシ環形成反応を触媒し、(*S*)-tetrahydroberberine [(*S*)-canadine] を生成する新規な P450 であり、ベルベリン生合成系における canadine synthase であることを明らかとした。なお、*CYP719A1* は (*S*)-THC に対して高い基質特異性と基質親和性を有する一方、(*S*)-scoulerine を基質とせず、cheilanthifoline をも基質としなかったことから、(*S*)-scoulerine から (*S*)-cheilanthifoline を生成する cheilanthifoline synthase (CHS) や (*S*)-cheilanthifoline から (*S*)-stylopine を生成する stylopine synthase (STS) は別に存在することが明らかになった。

次いで、オウレンとは異なるイソキノリンアルカロイドを生産するハナビシソウを材料に *CYP719A1* と類似した一次構造を持つ *CYP719A2*, *CYP719A3* を単離し、その機能を解析した。その結果、*CYP719A2*, *CYP719A3* 共にサンギナリン生合成経路上のメチレンジオキシ環形成酵素である STS の活性を示すことを明らかとした。ハナビシソウ植物体組織における発現やメチルジャスモン酸に対する応答から、*CYP719A2*, *CYP719A3* は共に、STS として機能している可能性が示唆された。

再度、新規な P450 遺伝子を単離すべく、オウレン培養細胞の EST ライブラリーを探索した結果、*CYP80G2* を見出し、その機能解析を行った。その結果、*CYP80G2* は (*S*)-reticuline を基質として (*S*)-corytuberine を生成する初めての分子内 C-C フェノールカップリング反応を触媒する P450 であることが明らかとなった。(*S*)-corytuberine は酵素的に magnoflorine に変換できたことから、*CYP80G2* は magnoflorine 生合成系へ関与すると考えられた。

以上のようにイソキノリンアルカロイド生合成系において特異な反応を触媒する P450 遺伝子4種の単離と機能解析を行った結果、これら P450 の一次構造は全体としては基質となる化合物の構造と良い対応を示すことが示唆された。また、単離した4種の P450 遺伝子では P450 の反応に関わるとされるヘリックス I 領域中の保存度の高いアミノ酸が特異なアミノ酸に置換されており、それら特異なアミノ酸残基が P450 の特異な反応性に関わっている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

高等植物は多様な二次代謝産物を生産するが、それらの生合成経路には多くのシトクローム P450 (P450) が関与している。イソキノリンアルカロイド生合成にも、P450 によって担われる反応が存在し、かつ、これらの P450 には、一般的な P450 の反応（一原子酸素添加反応）とは異なるメチレンジオキシ環形成反応や C-C フェノールカップリング反応等、特異な反応が含まれることが示されている。本研究は、イソキノリンアルカロイド産生植物から、これら特異な反応を触媒する P450 遺伝子を単離し、機能解析した結果をまとめたものであり、その評価できる点は以下のとおりである。

- 1) ベルベリン高生産性を有するオウレン培養細胞を用いて単離されていた P450 遺伝子 (*CYP719A1*) を酵母発現系で発現させ、同組換え *CYP719A1* が (*S*)-tetrahydrocolumbamine [(*S*)-THC] を基質としてメチレンジオキシ環形成反応を触媒し、(*S*)-tetrahydroberberine [(*S*)-canadine] を生成する新規な P450 であり、ベルベリン生合成系における canadine synthase であることを明らかにした。
- 2) *CYP719A1* は (*S*)-scoulerine を基質とせず、cheilanthifoline をも基質としなかったことから、(*S*)-scoulerine から (*S*)-cheilanthifoline を生成する cheilanthifoline synthase (CHS) や (*S*)-cheilanthifoline から (*S*)-stylopine を生成する stylopine synthase (STS) は別に存在することを明らかにしている。
- 3) ハナビシソウを材料に *CYP719A1* と高い配列相同性を持つ *CYP719A2*, *CYP719A3* を単離、機能解析し、*CYP719A2*, *CYP719A3* 共にサンギナリン生合成経路上のメチレンジオキシ環形成酵素反応 (STS の活性) を示すことを明らかにしている。また、その発現解析から、両 P450 は共に、STS として機能している可能性を示唆している。
- 4) オウレン培養細胞の EST ライブラリーを探索し、*CYP80G2* を新規に見出し、その機能解析の結果、*CYP80G2* は (*S*)-reticuline を基質として (*S*)-corytuberine を生成する初めての分子内 C-C フェノールカップリング反応を触媒する P450 であることを明らかにしている。また、(*S*)-corytuberine は酵素的に magnoflorine に変換できることから、*CYP80G2* は magnoflorine 生合成系へ関与していることを示唆している。

以上の結果は、イソキノリンアルカロイド生合成系において特異な反応を触媒する P450 遺伝子4種の単離と機能解析によって、その1次構造と機能により相関のあること、また、特異的な反応性に関与するアミノ酸残基を示唆するなど重要な知見であり、植物二次代謝の生化学ならびに分子生物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24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。