

京都大学	博士（薬学）	氏名	増本 直子
論文題目	シソ属植物におけるモノテルペン化合物生合成酵素および反応機構と構造に関する研究		
(論文内容の要旨)			
シソ (<i>Perilla frutescens</i>) は生薬「蘇葉」および「蘇子」の基原であり香味野菜としても多用される一年生草本である。その香気には十種類以上の精油型が存在し、その違いは精油の成分組成に由来している。成分の多くはモノテルペン化合物であり、香料・食品や医薬品の風味付けなどに利用されるが、抗菌活性や抗腫瘍活性を示すものも多く薬学分野でも重要な化合物群のひとつである。しかしその生合成の詳細は不明な点が多い。立体制御機構を含めた精油成分生合成の全容を明らかにすることは、有機合成への応用や有用二次代謝産物の人工的な生産制御への応用が期待され、また植物の進化や遺伝学的考察にも大きく寄与することが予想される。 日本のシソ属植物には栽培種であるシソのほかに 3 種の野生種が存在するが、栽培種のシソは 2 種の野生種の複二倍体である可能性が高く、栽培種の成立過程で精油成分などの二次代謝についても混成や淘汰が起こっていたと考えられる。シソ属植物には多様な精油型があるが、それらについて生合成酵素を比較することは、栽培種の成立過程を分子遺伝学的に考察することにもつながっている。本研究では、モノテルペン型精油成分のひとつであるシトラールの生合成経路について、立体制御機構の詳細を含めて明らかにし、遺伝的背景なども含めて考察することを目的とした。			
第 1 章 シソ属野生種由来モノテルペン合成酵素遺伝子のクローニングと機能解析			
シソ属植物の精油成分のうち、非環状モノテルペンであるゲラニオールとリナロールは、それぞれゲラニオール合成酵素とリナロール合成酵素によって、生合成経路の初期ステップでモノテルペン共通前駆体であるゲラニル二リン酸 (GDP) から合成される。本研究では、シソ属野生種のひとつであるトラノオジソ (<i>P. hirtella</i>) から両合成酵素遺伝子のクローニングを試みた。得られた PhTps-5073G と PhTps-5073L はモノテルペン合成酵素に高度に保存されている配列モチーフを有しており、シソ属他種からクローニングされたゲラニオール合成酵素、リナロール合成酵素と非常に高い相同性を示した。PhTps-5073G と PhTps-5073L の発現蛋白はそれぞれ GDP をゲラニオールとリナロールへ変換した。 以上により、GDP を基質とするふたつの異なる酵素遺伝子が同一個体に存在することが示された。ゲラニオールとリナロールの合成反応では共通の中間体を経由するが、水酸基導入位置が前者は 1 位、後者は 3 位と異なる。両合成酵素遺伝子のアミノ酸レベルでの相同性は 70%以上であるが、その機能的な違いは水酸基導入位置のみであり、この違いを生み出す領域の解明は酵素学的に非常に興味深い。そこで、シソ属植物由来のゲラニオール、リナロール両合成酵素遺伝子における水			

酸基導入の位置選択性とアミノ酸配列の特徴について、ドメインスワッピングとアミノ酸の部位特異的変異の手法を用い、酵素の構造上の特徴からその制御機構の検討を行った。酵素遺伝子を 10 のドメインにわけ 28 のキメラ酵素遺伝子を作成したところ、とくに合成酵素の J-K loop 付近に存在する 5 つのアミノ酸側鎖が、共通の反応中間体であるカルボカチオンの電子局在化に寄与し、結果として水酸基の導入位置が決定されていることが推察された。

第 2 章 シソ属植物由来シトラール生合成関連遺伝子のクローニングと *in vitro* 連続反応系の構築

第 1 章では、シソ属植物精油成分の生合成初期段階を触媒するモノテルペン合成酵素の配列と機能について明らかにした。本章では、生合成関連遺伝子のさらなる探索を行い、ゲラニオールからシトラールへの反応を触媒していると考えられる 2 種のアルコール酸化酵素 PsAR と PcGeDH を見いだした。両者のアミノ酸配列は大きく異なるものの、大腸菌を用いた発現実験ではともにゲラニオールをシトラールに変換した。また、ペリラルアルコールも基質としペリラルデヒドを生成した。しかし第二級・三級アルコールや、ケトン・アルデヒドなどは基質としなかった。

シトラールを主成分とする精油型をもつシソ属植物では、GDP からゲラニオールを経てシトラールが生合成されると推測される。そこで、ゲラニオール合成酵素と 2 種のうちいずれかのアルコール酸化酵素を加え、GDP を基質とした連続酵素反応を行ったところ、PsAR と PcGeDH のどちらを用いた場合でもシトラールが生成した。しかし、PsAR と PcGeDH では検出されたシトラールと中間産物であるゲラニオールの割合が大きく異なっていた。PcGeDH を用いた連続反応生成物の割合の方が、植物中に見いだされる両成分の比により近似しており、PsAR より PcGeDH の方が精油成分生合成に大きく寄与しているのではないかと推測された。

以上、申請者は、シソ属植物における GDP からシトラールへの生合成経路を明らかにし、*in vitro* での連続反応によりシトラール生合成を再現した。GDP からゲラニオールへの変換反応については、同様に GDP を基質とするリナロール合成反応とドメインスワッピングによる比較を行い、水酸基導入位置に特定のアミノ酸側鎖と中間体との相互作用が寄与していると考えられることを明らかにした。また、連続反応後半のゲラニオール脱水反応を担う酵素は、基質特異性が低いため精油成分中に基質となりうる化合物が複数存在している可能性が高く、シソ属植物の精油型の多様性に寄与したことが推察された。

本研究では、シソ属植物の精油型の多様性を、精油成分生合成機構の面から考察する一助となる知見を得た。これらは天然資源における生合成研究や生理活性研究に有益であるだけでなく、将来的には有機合成への応用や有用二次代謝産物の人工的な生産制御を含む分子細胞工学的な応用研究につながると考えている。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、さまざまなタイプがあるシソの精油成分について、その生合成経路と関連酵素を明らかにする一連の研究のなかで、特にゲラニルニリン酸を基質とする2種類の酵素(ゲラニオール合成酵素およびリナロール合成酵素)について、クローニングと大腸菌を用いた機能解析、さらにドメインスワッピングによる構造と機能の関係解析を行い、両者の触媒反応を特徴づける領域を明らかにした。ゲラニオール合成酵素については、その反応生成物であるゲラニオールをシトラール(ネラール+ゲラニール)に変換する酵素をもシソからクローニングし、試験管内連続反応を試行している。植物の二次代謝に関しては、代謝物が医薬品原料や香料などに多く利用されるものの、それらの生合成経路またそれらを司る酵素遺伝子についての知見は動物のそれに比べるとかなり少なく、さらに、申請者が行った精油成分生合成関連遺伝子群は、植物の分化した極限られた器官(腺鱗)のみに発現している特殊性が高いものであるが、遺伝的背景が整った研究材料をうまく活用することで、的確な結果を得られるよう研究をデザインし、遂行している。ドメインスワッピング実験では、1つ1つの実験結果を見ながら細かく組み合わせを替えた変異体を多数作成して解析を積み上げて結果を導いており、丁寧な仕事ぶりであるといえる。研究材料の特性と実験スキルのコンビネーションという点で独自性が高い研究であるといえる。

シソ科植物の精油成分は特に香料素材として汎用されるが、近年はペリラアルコールのように抗癌剤として臨床試験が進むものや、リモネンのように発泡スチロール溶解剤や洗剤原料など工業製品素材として活用されるものもある。このような応用範囲が広い天然化合物について、その生合成経路や生合成酵素の構造特徴と反応生成物の関係を明らかにすることは将来的な応用研究への展開がじゅうぶんに期待される内容である。

よって本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成25年2月27日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

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、公表とする。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、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 26年 5月 1日以降