

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	竹村 知也
論文題目	オウレン <i>scoulerine-9-O-methyltransferase</i> 遺伝子を導入したハナビシソウ培養細胞におけるイソキノリンアルカロイド生合成系の解析		

(論文内容の要旨)

植物が産生する多様な二次代謝産物は医薬品や香辛料などとして利用されて、その生合成系ならびに代謝工学に関しての活発な研究がなされている。イソキノリンアルカロイドはモルヒネやベルベリンなどの有用医薬品を多く含み、その生合成系の分子レベルでの解析が最も進展していることから、その代謝工学も盛んに研究されている。本研究では *scoulerine-9-O-methyltransferase* (SMT)を発現せず、通常プロトベルベリン型のアルカロイドを産生しないハナビシソウに、オウレン *SMT(CjSMT)* 遺伝子を導入・発現させることにより、ハナビシソウのイソキノリンアルカロイド生合成系がどのように改変されるかを解析し、イソキノリンアルカロイド代謝工学の基盤的知見を得ることを目的とした。

まず、*CjSMT* 遺伝子を導入したハナビシソウ培養細胞株を 17 株確立し、*CjSMT* の発現とアルカロイドプロファイルの変化を解析した。その結果、*CjSMT* の発現に伴い、既報の *columbamine* (SMT 反応の生成物である *tetrahydrocolumbamine*, THC の酸化物)や THC などプロトベルベリン型アルカロイドの蓄積以外に、ハナビシソウ野生株では通常認められない *allocryptopine*、*10-hydroxychelerythrine* などの *benzophenanthridine* アルカロイドの蓄積を同定した。一方、野生株に見られる *sanguinarine* 等の *benzophenanthridine* アルカロイドは激減していた。新たに生成した *benzophenanthridine* アルカロイドは野生株の化合物の対応する位置が *O*-メチル化されたものであることより、オウレン SMT の発現により新たに生成した THC は内在の *benzophenanthridine* 生合成酵素により変換され、野生型細胞株とは大きく異なる代謝産物が産生されると推定した。

引き続き、*CjSMT* 発現株におけるアルカロイドプロファイルを比較したところ、株間に大きな体細胞変異が観察されたことより、アルカロイドプロファイルの多様化をクラスター解析することとした。まず、解析手法を確立するとともに、クラスター解析により *CjSMT* 導入により、アルカロイドプロファイルが *protoberberine* 型、*protopine* 型、*benzophenanthridine* 型に多様化することが明らかとなった。さらに生合成酵素遺伝子発現との統合的解析により、代謝産物蓄積と生合成酵素の発現に相関があることを明らかとした。

以上の結果をもとに *benzophenanthridine* アルカロイド生合成系において未同定であった *protopine-6-hydroxylase* (P6H) 遺伝子候補を推定するとともに、酵母発現系を用いてその機能同定を行った。すなわち、クラスター解析において、その発現が、基質となる *allocryptopine* と高い逆相関を示した *CYP82N2v2* を酵母において発現させ、解析した結果、*CYP82N2v2* は、*allocryptopine* を *dihydrochelerythrine* に、また、野生株における相当する基質である *protopine* を *dihydrosanguinarine* へと変換できることが明らかになった。このことは、*SMT* 遺伝子発現により新たに生成した基質が内在する酵素により変換されることを実証するものであった。

今回の解析により、一遺伝子の導入によっても二次代謝産物の多様化が誘導される可能性が明らかになった。特に、内在の生合成酵素の発現の変動により代謝プロファイルが多様化することが示されたことは、創薬素材の開発、ならびに、二次代謝の進化を考える上で良い実例と考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

植物が産生する多様な二次代謝産物の生合成系を理解するうえで、代謝工学的解析は有用と考えられる。本研究はモルヒネやベルベリンなどの有用医薬品を多く含むイソキノリンアルカロイド生合成系を対象に、通常はプロトベルベリン型のアルカロイドを産生しないハナビシソウに、オウレン由来の *scoulerine-9-O-methyltransferase (CjSMT)* 遺伝子を発現させることにより、ハナビシソウのイソキノリンアルカロイド生合成系の可塑性を解析し、以下のような研究成果を得ている。

1) *CjSMT* 遺伝子を導入したハナビシソウ培養細胞株を確立し、*CjSMT* の発現に伴い、SMT の反応生成物である tetrahydrocolumbamine(THC)、columbamine (THC の酸化物) などプロトベルベリン型アルカロイドの蓄積以外に、ハナビシソウ野生株では通常認められない allocryptopine、10-hydroxychelerythrine などの benzophenanthridine アルカロイドが蓄積することを同定し、オウレン SMT の発現により新たに生成した THC は内在の benzophenanthridine 生合成酵素により変換され、野生型の細胞株とは大きく異なる代謝産物が産生されることを明らかにしている。

2) *CjSMT* 発現株間のアルカロイドプロファイルの多様性に着目し、クラスター解析により多様化の解析方法を確立するとともに、*CjSMT* 導入によりアルカロイドプロファイルが protoberberine 型、protopine 型、benzophenanthridine 型に多様化することを明らかとしている。さらに、これらの多様化が、生合成酵素の発現と高い相関があることを明らかとしている。

3) 代謝プロファイル解析に基づき、benzophenanthridine アルカロイド生合成系において未同定であった protopine-6-hydroxylase (P6H) 遺伝子 (*CYP82N2v2*) を同定している。また、*CYP82N2v2* は、allocryptopine を dihydrochelerythrine に、また、protopine を dihydrosanguinarine へと変換できることから、SMT 遺伝子発現により新たに生成した基質が内在する酵素群により変換されることを実証している。

以上のように、本研究により、既存の生合成系にはない分岐経路遺伝子の導入によって二次代謝産物の多様化が誘導されることを実証しており、植物の二次代謝工学、植物由来の新規生理活性物質の開発、ならびに、二次代謝の進化を考える上で重要な知見を与えている。

以上のように、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。

また、平成22年12月6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： 年 月 日