

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	Ajuga毛状根のステロイド生合成にかかわる酵素遺伝子の機能解析
Title(English)	
著者(和文)	塚越裕樹
Author(English)	Yuki Tsukagoshi
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10386号, 授与年月日:2017年1月31日, 学位の種別:課程博士, 審査員:江口 正,豊田 真司,小松 隆之,後藤 敬,工藤 史貴
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10386号, Conferred date:2017/1/31, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(論文博士)

論文要旨 (和文2000字程度)

報告番号	乙 第	号	氏 名	塚 越 裕 樹
(要 旨) 近年、天然有機化合物の生合成研究分野では有機化学的な手法に加えて分子生物学的な手法も駆使し、生体内分子の機能や反応を多角的な視点で捉えることで様々なことが明らかになりつつある。本論文では、このような視点から高等植物のステロイド化合物のうち、特に、昆虫の脱皮変態ホルモンと同じ構造でありながら植物にも含まれる20-hydroxyecdysone (20-HE) および特徴ある構造の植物ステロール類を有するシソ科キラソウ属<i>Ajuga reptans</i> var. <i>atropurpurea</i>のステロール化合物の生合成に焦点を当てた研究を行い、反応にかかわる酵素遺伝子の同定ならびにその酵素遺伝子による触媒反応の機構を調べたものである。本論文は、“<i>Ajuga</i>毛状根のステロイド生合成にかかわる酵素遺伝子の機能解析”と題し、5章より構成されている。 第1章「緒論」では、本研究で対象としたステロイド化合物のこれまでの生合成研究について概説し、本研究の意義および目的について述べている。 第2章「<i>Ajuga</i>の$\Delta 24$-ステロール還元酵素 (DWF1) の反応機構」では、<i>Ajuga</i>毛状根のESTライブラリーから$\Delta 24$-ステロール還元酵素遺伝子ホモログ<i>ArDWF1</i>を見出し、出芽酵母ならびにショウジョウバエ胚細胞で異種発現し、還元反応機構を精査した結果について述べている。従来知られている$\Delta 24(28)$の$\Delta 24(25)$への異性化を含む反応機構とは異なり、<i>ArDWF1</i>は$\Delta 24(28)$を直接還元する新たな反応機構で還元反応が進行することを見出している。さらに、この酵素反応の生成物および<i>Ajuga</i>毛状根のステロール成分の分析を行い、24-methylcholesterolとしてcampesterolのみが同定されたことを述べている。 第3章「<i>Ajuga</i>のステロールメチル基転移酵素 (SMT1およびSMT2) の機能解析」では、<i>Ajuga</i>属植物に含まれる特徴ある構造の24-アルキルステロール生合成にかかわる生合成遺伝子のクローニングと機能解析について述べている。上記のESTライブラリー中に見出された<i>SMT1</i>および<i>SMT2</i>のクローニングを行い、出芽酵母へと導入し、それぞれの機能を調べ、<i>SMT1</i>は$\Delta 24$-ステロールに対して第一段階目のメチル基転移反応を触媒して24-methylenecholesterolを生成するのに対し、<i>SMT2</i>は第二段階目および第一段階目のメチル基転移反応を触媒してclerosterolおよびcodisterolを生成することを示している。また、<i>SMT2</i>の三次元構造モデリングに基づき基質結合ドメインおよびその近傍にあるTyr78とTyr85が<i>SMT2</i>の反応の最終段階の脱プロトン化に関与している可能性を想定し、これらをPheへと置換して酵母での<i>in vivo</i>でのアッセイを行っている。この結果、いずれの場合も酵素活性の低下が認められるが、完全な活性の消失は確認できなかったことから、両Tyrが塩基として直接脱プロトン化にかかわっている可能性は否定されると述べている。				

第4章「*Ajuga*の20-hydroxyecdysone生合成にかかわる酵素遺伝子の同定と機能解析」では、*Ajuga*毛状根のESTライブラリーからの20-HE生合成にかかわるP450遺伝子の同定と生合成経路について述べている。すなわち、上記ESTライブラリー中で、発現量の高い5つのP450遺伝子を選択し、クローニングして出芽酵母にて異種発現し、3 β -hydroxy-5 β -cholestan-6-one (5 β -ketone)を基質として生成する水酸化された代謝物について調べている。この結果、CYP71D443のみが水酸化された化合物を与え、この化合物が(22*R*)-hydroxy-5 β -ketoneであることを合成標品との比較により決定している。さらに、重水素標識(22*R*)-hydroxy-5 β -ketoneが*Ajuga*毛状根で効率よく20-HEへ変換されることを示している。以上の結果より、*Ajuga*毛状根での20-HEの生合成は、(22*R*)-hydroxy-5 β -ketoneを経由する可能性を指摘している。

第5章「総括」では、各章において得られた結果を総括し、本論文の結論としている。

以上、本論文は、*Ajuga*毛状根に含まれる特徴ある植物ステロールおよび20-HEの生合成にかかわる酵素遺伝子の機能解析に関する研究を行い、新たなcampesterolの生成機構を見出し、SMT2がclerosterolを生成することを実験的に示し、さらに、植物からはじめて20-HEの生合成にかかわる遺伝子の同定と機能解析に成功したものである。

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(論文博士)

論 文 要 旨 (英 文)

(300語程度)

(Summary)

報告番号	乙 第	号	氏 名	塚 越 裕 樹
(要 旨) <i>Ajuga reptans</i> var. <i>atropurpurea</i> (Lamiaceae) is an interesting plant in the light of sterol biosynthesis since it contains unique $\Delta 25$-sterols (e.g., clerosterol) as well as 20-hydroxyecdysone (20-HE), an insect molting hormone. The present study deals with identification of genes associated with the biosynthesis of 20-hydroxyecdysone and plant sterols and their reaction mechanisms. The reaction mechanism of the $\Delta 24$-sterol reductase (DWF1) of the <i>Ajuga</i> plant, which was identified in an EST data set of the <i>Ajuga</i> hairy roots, was investigated using heterologous expression systems of yeast and <i>Drosophila</i> S2 cells in comparison with that of <i>Oryza sativa</i> DWF1. The <i>Ajuga</i> DWF1 was found to catalyze the direct reduction of a $\Delta 24(28)$-sterol to give only campesterol in contrast to the well-known mechanism involving the double-bond isomerization to $\Delta 24(25)$ as found in <i>Oryza</i> DWF1. It is of note that the <i>Ajuga</i> DWF1 product from 24-methylenecholesterol was only campesterol. The functions of two sterol methyltransferases (SMT1 and SMT2), which were also identified in the EST data set, were investigated. The SMT2 was found to catalyze the formation of the unique $\Delta 25$-sterols, clerosterol and codisterol, rather than isofucosterol. Furthermore, Y78F and Y85F mutated SMT2s were prepared and their catalytic effects were explored to gain insight into an amino acid residue associated with deprotonation from the methyl group. Five candidate P450 genes with a high expression level deduced from the EST data set were screened for a possible involvement in 20-hydroxyecdysone biosynthesis using yeast with 3β-hydroxy-5β-cholestan-6-one (5β-ketone) as a substrate. CYP71D443 was found to catalyze the formation of (22R)-hydroxy-5β-ketone, thus establishing that the P450 gene encodes a C-22 hydroxylase responsible for the 20-HE biosynthesis. The hydroxylated compound was proved to be converted to 20-HE efficiently. These results suggested the presence of a new biosynthetic pathway of 20-HE involving a C-22 hydroxylated intermediate at early steps in the <i>Ajuga</i> plant. CYP71D443 is the first functionally characterized gene associated with 20-hydroxyecdysone biosynthesis in plants.				

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).