

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)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

論文審査の要旨及び審査員

(2000字程度)

報告番号	乙 第 号	学位申請者	塚越 裕樹	
論文審査員	氏 名	職 名	氏 名	職 名
	主査 江口 正	教授	工藤 史貴	准教授
	豊田 真司	教授		
	後藤 敬	教授		
	小松 隆之	教授		

本論文は、「*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」と題し、高等植物のステロイド生合成に関して、シソ科キランソウ属 *Ajuga reptans* var. *atropurpurea* の産するステロイド化合物の生成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って触媒される反応の機構を調べたものであり、全5章から構成されている。

第1章「緒論」では、本研究で対象としたステロイド化合物である 24-アルキルステロール類および 20-hydroxyecdysone (20-HE) 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「*Ajuga* の Δ 24-ステロール還元酵素 (DWF1) の反応機構」では、*Ajuga* 毛状根の EST ライブラリーから Δ 24-ステロール還元酵素遺伝子ホモログ *ArDWF1* 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、本酵素の還元反応の機構を精査した結果について述べている。シロイヌナズナなどにおいて従来知られている二重結合が Δ 24(28)から Δ 24(25)へ異性化した後に還元される機構とは異なり、*ArDWF1* では 24-メチレンコレステロールの Δ 24(28)が異性化を経ずに直接還元される新たな機構で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 *Ajuga* 毛状根のステロール成分を分析し、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「*Ajuga* 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、*Ajuga* 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した *SMT1* および *SMT2* のクローニングを行い、出芽酵母へと導入し機能を調べ、*SMT1* は Δ 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 24-methylenecholesterol を生成するのに対し、*SMT2* 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 を生成することを明らかにしている。さらに、*SMT2* の三次元構造モデリングに基づき、基質結合ドメイン近傍にある Tyr78 と Tyr85 が *SMT2* 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 *in vivo* 酵素活性を調べている。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、 3β -hydroxy- 5β -cholestan-6-one (5β -ketone)を基質として生成する水酸化された代謝物を GC-MS 分析により調べている。この結果、CYP71D443 のみが水酸化された化合物を与え、この代謝物が(22R)-hydroxy- 5β -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、(22R)-hydroxy- 5β -ketone の重水素標識体が *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。加えて、 5β -ketone 類縁化合物の CYP71D443 に対する基質特異性についても言及している。以上より、*Ajuga* 毛状根での 20-HE の生合成は、(22R)-hydroxy- 5β -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、今後の展望について述べている。

以上、本博士論文は、*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、 Δ 24-ステロール還元酵素 (DWF1) の新たな還元反応の機構ならびに特異的に campesterol のみが生成することを見出し、*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り、これらの成果は、植物のステロイド代謝に関して重要な知見を提供するものであり、理學上貢献するところが大きい。よって、博士 (理学) 論文として十分価値あるものと認める。