

論文内容の要旨

氏名	余 豊年
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農第128号
学位授与の日付	平成20年9月15日
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当
学位論文題目	Molecular characterization of sesquiterpene synthases from shampoo ginger (<i>Zingiber zerumbet</i> Smith) (ハナショウガ由来セスキテルペン合成酵素遺伝子のクローニングと機能解析)
論文審査委員(主査)	教授 内海 龍太郎
(副主査)	教授 重岡 成
(副主査)	教授 松田 一彦

シャンプージンジャーにおけるゼルンボン生成の酵素として考えられる、 α -フムレン合成酵素遺伝子の単離と機能解析

本論文では、縮重プライマーを用いた RT-PCR の手法によって初めてシャンプージンジャーから新しいセスキテルペン合成酵素遺伝子の単離を行ったことを報告する。ZSSI 命名されたこの遺伝子は、548 アミノ酸残基をコードする 1644 bp の ORF を持ち、推定分子量は 64.5 kDa で、以前から明らかとなっている他の種のセスキテルペン合成酵素遺伝子と相同性を持っていた。アミノ酸配列は被子植物のセスキテルペン合成酵素とホモログであり、土ショウガのゲルマクレン D 合成酵素と 63% と一番高い相同性を示し、次いで、アブラヤシのセスキテルペン合成酵素と 50% の相同性を示した。エクソン・イントロン構造に基づいた分類において ZSSI はテルペンシクターゼ III (TPS・III) に分類される。大腸菌を用いたタンパク質発現とファルネシルピリン酸を基質として用いた *in vitro* の酵素アッセイで、組換え酵素は主生成物として α -フムレンを 95%、副生成物として β -カリオフィレンを 5% 生成することが示された。ZSSI の転写は根茎においてほぼ独占的に検出され、ジャスモン酸を処理した後では、葉と根茎の両方で転写量が増加した。これはシャンプージンジャーでの生理学的な機能を示唆している。

α -フムレンとゼルンボンが構造と電子の配置上、非常に似ているということは、 α -フムレンがゼルンボン生成でのオレフィン系セスキテルペン中間体の候補であることが示唆された。このように、この研究は、ゼルンボン生成のさらなる研究の基礎として位置づけられる。

シャンプージンジャー由来 β -オイデスマール合成酵素遺伝子の機能解析と大腸菌を用いた代謝工学的生産

本論文で我々は、シャンプージンジャー由来のもう一つのセスキテルペン合成酵素遺伝子(ZSS2)の単離と機能解析について報告する。全長 cDNA は 554 アミノ酸残基をコードする 1662 bp の ORF を持ち、推定分子量は 64.4 kDa であった。進化系統学的な解析では ZSS2 のアミノ酸配列は単子葉類のグループであることが示された。また、単子葉類のセスキテルペンのグループにおいて、ZSS1 と ZSS2 と土しょうがから単離されたゲルマクレン D 合成酵素は明確に、ショウガ科を形成している。大腸菌で発現させた組み換え酵素は、 β -オイデスマールを主生成物として含むいくつかのセスキテルペンを FPP から生産した。

ZSS2 の酵素活性のさらなる解析と、代謝工学的手法を用いた大腸菌での β -オイデスマールの生産を評価するために我々は、メバロン酸経路の 6 種の酵素をコードするオペロンを構築し、ZSS2 と共発現させた。代謝工学的手法によって改変された大腸菌は、*in vitro* での酵素アッセイと比較して、比率はわずかに異なるが、同様のセスキテルペンの混合物を生成し、 β -オイデスマールの収量は 100 mg/L に達した。

季節による発現パターンの変動を解析するために、我々は根茎が成長する間の ZSS2 の転

写量を、定量リアルタイム PCR によって調べた。その結果、ZSS2 の転写量は夏に急速に増加し、8 月の始めにピークに達し、秋から冬にかけて急激に減少した。このことは、地中の環境における ZSS2 の生理学的に重要な役割を示唆している。

シャンプージンジャーの根茎はテルペノイドが存在するために、特徴的で爽快な良い香りがする。また、切り傷、擦り傷、歯痛、頭痛や胃痛に対する伝統的な薬として長い間用いられてきた。近年、シャンプージンジャーは薬理的に重要視されているゼルンボンが存在することから、科学的にも注目されてきている。シャンプージンジャーにのみ存在し、非常に著量含有されているゼルンボンは、いくつかの癌、炎症、白血病に対する治療薬として有望視されている。

テルペノイドは、天然物としては少量しか生産されていないものが多く、植物からの抽出では収量が悪く純度も低い。構造が複雑であるため、古くからの化学合成法では合成が難しくコストも高い。そのため、ここ 10 年間での目覚ましい生物学の発展によってテルペノイドノ生産の方法が、収量を高く、かつコストを低くするために、遺伝子工学的に改変された大腸菌を用いた手法に移行してきた。しかし、この手法には生合成経路、酵素反応とその酵素をコードする遺伝子の詳細な理解が求められる。

本論文では、セスキテルペン、特にシャンプージンジャー中のゼルンボンの生合成経路の解明と、微生物を用いた、薬理的に重要なセスキテルペンの生産量を増加させることに成功した。異なる骨格を持つテルペノイドも、生合成における最初の段階は、テルペン合成酵素によって触媒されるため、本論文はまず、シャンプージンジャーのセスキテルペン合成酵素遺伝子の単離と機能解析を行い、それらの遺伝子を用いたセスキテルペンの代謝工学的な生産に成功した。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経たうえ、平成 20 年 7 月 15 日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。