



GENETIC ENGINEERING STUDIES ON CYTOCHROME P450 MONOOXYGENASES IN HIGHER PLANTS

山田, 隆志

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

1998-03-31

(Date of Publication)

2008-06-10

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1784

(JaLDOI)

<https://doi.org/10.11501/3141127>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001784>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	やま だ たか し 山 田 隆 志	(兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士(農学)	
学位記番号	博い第34号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成10年3月31日	
学位論文題目	GENETIC ENGINEERING STUDIES ON CYTOCHROME P450 MONOOXYGENASES IN HIGHER PLANTS (高等植物におけるチトクロームP450モノオキシゲナーゼに関する遺伝子工学的研究)	
審査委員	主査 教授 大川 秀 郎 教授 相 蘭 泰 生 教授 小 野 功 貴 教授 竹 田 真木生	

論文内容の要旨

【第1章】

<序論>

高等植物のチトクロームP450モノオキシゲナーゼ(P450モノオキシゲナーゼ)は、二次代謝産物の生合成・代謝、並びに、外来性薬物の代謝・分解などに係わる酸化反応を触媒している。本酵素系は細胞のミクロソームに局在し、多くのチトクロームP450(P450)分子種と1~2分子種のNADPH-チトクロームP450還元酵素(P450還元酵素)からなる複合酵素系を構成している。高等植物のP450分子種は種類は多いものの、おのおのの活性が低く、含量が少なく、しかも、不安定であるなどから生化学的研究が難しく、分子レベルでの研究は立ち遅れていた。そこで、本研究は遺伝子工学的手法を用いて高等植物の二次代謝及び外来性薬物の代謝に係わるP450分子種、並びに、P450還元酵素のcDNAをクローニングしてその塩基配列から一次構造を解明し、さらに、それらcDNAを異種細胞で発現して酵素機能を解明することを試みた。高等植物のP450モノオキシゲナーゼの構造と機能を明らかにすることは、植物の多様な二次代謝や薬物代謝の分子機構、並びに、植物の生物環境への適応機構などを理解するのに重要である。また、P450の多様な分子種が進化の過程でどのように生じ、植物の新たな機能の獲得にどのように関与してきたかを知る手がかりになる。また、P450遺伝子は植物の生長、病虫害や除草剤耐性、植物による残留農薬や環境汚染物質の代謝、分解に係わっており、それらの機能解明に極めて重要である。

【第2章】

<タバコ培養細胞のNADPH-チトクロームP450還元酵素の精製とその免疫化学的性質>

タバコ培養細胞(BY-2)のミクロソーム画分を可溶化した後、3種のカラムクロマトグラフィーを用いてP450還元酵素を精製した。みかけの分子量は約79,000であった。精製酵素は典型的なフラビンタンパク質のスペクトルを示した。タバコのチトクロームP450、即ち、トランスケイ皮酸4位水酸化酵素との再構成系において、相当する酵素活性を示した。また、調製した抗タバコP450還元酵素抗体

はウェスタンブロット分析においてタバコP450還元酵素と反応したが、酵母P450還元酵素とは反応しなかった。また抗タバコP450還元酵素抗体はタバコP450還元酵素の活性を阻害したが、酵母還元酵素の活性は阻害しなかった。

以上の結果から、タバコP450還元酵素の生化学的並びに免疫化学的性質が明らかになった。

【第3章】

＜タバコのNADPH-チトクロームP450還元酵素cDNAのクローニングと酵母での発現＞

タバコのP450還元酵素cDNAをクローニングし、その塩基配列から一次構造を明らかにした。その配列はタバコ培養細胞から精製したP450還元酵素で決定した部分アミノ酸配列を含んでいた。既報のP450還元酵素との比較から、推定されるFMN,FAD,NADPH結合ドメインが認められた。また、取得したcDNAを酵母で発現させた。本cDNAを持つ組換え酵母菌株のミクロソーム画分にはウェスタンブロット分析によりタバコP450還元酵素タンパク質が検出され、チトクロームc還元活性の上昇が認められた。さらに、酵母に発現させたタバコP450還元酵素とラットP4501A1を含む酵母ミクロソーム画分を用いた*in vitro*再構成系では7-エトキシマリンO-脱エチル化活性の上昇が認められた。

以上の結果から、タバコのP450還元酵素の一次構造とその機能を明らかにすることができた。

【第4章】

＜アラキドン酸で誘導したピーマン幼苗からのカタラーゼcDNAのクローニングと配列決定＞

ナス科植物のファイトアレキシンであるカプシジオールの生合成に關与する5-*epi*-aristolochene-3-hydroxylaseについてcDNAをクローニングし、塩基配列からその一次構造を明らかにした。アラキドン酸で処理したピーマン幼苗のミクロソーム画分から部分精製された本酵素の部分アミノ酸配列を決定した。次いで、cDNAをクローニングし、その塩基配列から推定したアミノ酸配列は植物のカタラーゼの配列と類似していた。即ち、アラキドン酸処理したピーマン幼苗から部分精製した酵素標品はカタラーゼであり、P450ではないことが判明した。カタラーゼの働きによって生じたO₂によってカプシジオールの前駆体が酸化されてカプシジオールが生成する可能性が示唆された。

以上の結果から、ナス科植物のファイトアレキシンであるカプシジオールの生合成に關係していると考えられている酵素の一次構造が明らかになった。

【第5章】

＜タバコ培養細胞の2,4-Dで誘導されるP450分子種のcDNAクローニングとその特性＞

高等植物の薬物代謝に係わるP450分子種の性質を明らかにするためタバコ培養細胞から2,4-Dで誘導されるP450分子種のcDNAをクローニングし、その機能の解明を試みた。2,4-D処理したタバコ培養細胞S401から4種類のP450cDNAを取得した。それぞれ、CYP71A11,CYP81B1, CYP81C1,CYP81C2と命名された。いずれもS401細胞を2,4-D処理することにより転写誘導され、このうち、強く持続的に誘導されたCYP71A11とCYP81B2のcDNAをそれぞれ酵母で発現させた。酵母発現したCYP71A11とCYP81B2は薬物代謝反応の一種である7-エトキシマリンO-脱エチル化活性を示した。CYP71A11とCYP81B2は除草剤クロトルロンを代謝し、CYP71A11はN-脱メチル体、環メチル水酸化体の両代謝物を、CYP81B2は環メチル水酸化体を生じた。

以上の結果から、植物の薬物代謝に關与する新規のP450分子種の一次構造と機能を明らかにすることができた。

【第6章】

<結論>

最初に植物のP450モノオキシゲナーゼ系の活性発現を支配するP450還元酵素のcDNAをクローニングし、その一次構造を明らかにした。一方、タバコ培養細胞から2,4-Dで誘導される新規のP450分子種についてcDNAをクローニングし、その一次構造を明らかにした。本P450モノオキシゲナーゼ系は薬物代謝に係わると考えられ、これまでに報告のない新規な酵素系であることが判明した。

以上のように、本論文は、遺伝子工学的手法を用いて高等植物のチトクロームP450モノオキシゲナーゼ系の新規P450分子種とP450還元酵素の構造と機能を解明したものであり、特に、高等植物の除草剤代謝に係わるP450分子種を明らかにしたことは、植物機能化学分野における新しい重要な知見の集積である。

論文審査の結果の要旨

高等植物のチトクロームP450モノオキシゲナーゼ(P450モノオキシゲナーゼ)は、二次代謝産物の生合成・代謝、並びに、外来性薬物の代謝・分解などに係わる酸化反応を触媒している。本酵素系は細胞のミクロソームに局在し、多くのチトクロームP450(P450)分子種と1~2分子種のNADPH-チトクロームP450還元酵素(P450還元酵素)からなる複合酵素系を構成している。高等植物のP450分子種は種類が多く、おのおのの活性が低くて、含量が少なく、しかも、不安定であるなど生化学的研究が難しい。そこで、本研究は遺伝子工学的手法を用いて高等植物の二次代謝及び外来性薬物の代謝に係わるP450分子種、並びに、P450還元酵素についてcDNAクローニングと塩基配列の決定による一次構造の解明、さらに、それらcDNAを異種細胞で発現して酵素機能を解明することを試みたものである。

第1章では、高等植物のP450モノオキシゲナーゼの種類、酵素活性、電子伝達構成成分、細胞内局在性、生理的役割などについてこれまでの知見をまとめた。次いで、高等植物のチトクロームP450モノオキシゲナーゼのうち、生体防御に関連する二次代謝及び薬物代謝に係わる酵素の構造と機能を解明することの重要性と意義を述べた。

第2章では、タバコ培養細胞からP450還元酵素を精製し、その酵素機能を明らかにした。タバコ培養細胞(BY-2)のミクロソーム画分を可溶化した後、3種のカラムクロマトグラフィーを用いてP450還元酵素を精製した。精製酵素は典型的なフラビンタンパク質のスペクトルを示し、みかけの分子量は約79,000であった。また、精製酵素はタバコのチトクロームP450、即ち、トランスケイ皮酸4位水酸化酵素との*in vitro*再構成系において、相当する酵素活性を示した。また、調製した抗タバコP450還元酵素抗体はウェスタンブロット分析においてタバコP450還元酵素と反応したが、酵母P450還元酵素とは反応しなかった。また、本抗体はタバコP450還元酵素の活性を阻害したが、酵母P450還元酵素の活性は阻害しなかった。

以上の結果から、タバコP450還元酵素の生化学的並びに免疫化学的性質が明らかになった。

第3章では、タバコP450還元酵素cDNAをクローニングし、その塩基配列から一次構造を明らかにした。そのアミノ酸配列はタバコ培養細胞から精製したP450還元酵素で決定した部分アミノ酸配

列を含んでいた。また、取得したcDNAを酵母で発現させたところ、組換え体酵母菌株のマイクロソーム画分にはウエスタンブロット分析によりタバコP450還元酵素タンパク質が検出され、チトクロームc還元活性の上昇が認められた。さらに、酵母に発現させたタバコP450還元酵素とラットP4501A1を含む酵母マイクロソーム画分を用いた*in vitro*再構成系では7-エトキシマリノO-脱エチル化活性の上昇が認められた。

以上の結果から、タバコのP450還元酵素の一次構造とその機能を明らかにすることができた。

第4章では、ナス科植物のファイトアレキシンであるカプシジオールの生合成に関与する5-*epi*-aristolochene 3-hydroxylaseについて、cDNAをクローニングし、塩基配列からその一次構造を明らかにした。まず、アラキドン酸で処理したピーマン幼苗のマイクロソーム画分から部分精製された本酵素の部分アミノ酸配列を決定した。次いで、cDNAをクローニングし、その塩基配列から推定したアミノ酸配列は植物のカタラーゼの配列と類似していた。即ち、アラキドン酸処理したピーマン幼苗から部分精製した酵素標品はカタラーゼであり、P450ではないことが判明した。カタラーゼの働きによって生じたO₂によってカプシジオールの前駆体が酸化されてカプシジオールが生成する可能性が示唆された。

以上の結果から、ナス科植物のファイトアレキシンであるカプシジオールの生合成に関係していると考えられている酵素の一次構造が明らかになった。

第5章では、タバコ培養細胞の2,4-Dで誘導されるP450分子種のcDNAクローニングとその酵素的性質を明らかにした。即ち、取得したcDNAの配列から2,4-D処理したタバコ培養細胞S401における4種類のP450cDNAは、それぞれ、CYP71A11, CYP81B1, CYP81C1, CYP81C2と命名された。いずれもS401細胞を2,4-D処理することにより転写誘導され、このうち、CYP71A11とCYP81B2は強く持続的に誘導された。そこで、これら2種類のcDNAをそれぞれ酵母で発現させた。組換え体酵母に発現したCYP71A11とCYP81B2は薬物代謝反応の一種である7-エトキシマリノO-脱エチル化活性を示し、その比活性はタバコ培養細胞S401の活性に比べて5~10倍高かった。また、CYP71A11とCYP81B2は除草剤クロトルロンを代謝し、N-脱メチル体、環メチル水酸化体を生じた。

以上の結果から、植物の除草剤代謝に関与する新規のP450分子種の一次構造と機能が明らかになった。

第6章では、本研究の結果をまとめて論議した。タバコのP450モノオキシゲナーゼ系を構成するP450還元酵素の一次構造と酵素機能を明らかにし、2,4-Dで誘導される新規のP450分子種について、その一次構造と酵素機能を明らかにした。本P450モノオキシゲナーゼ系は除草剤クロトルロンの代謝に関与し、除草剤の選択性と耐性の機構を分子レベルで解明することができた。

以上のように、本研究は、遺伝子工学的手法を用いて高等植物の生体防御に係わるチトクロームP450モノオキシゲナーゼ系の新規P450分子種とP450還元酵素の構造と機能を解明したものであり、高等植物の除草剤選択性と耐性の機構を分子レベルで明らかにしたことは、植物機能化学分野における新しい重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

よって、学位申請者山田隆志は博士(農学)の学位を得る資格があると認める。