

称号及び氏名	博士（農学） 森川 智美
学位授与の日付	平成18年9月30日
論文名	「植物ステロール側鎖不飽和化酵素(CYP710A)の同定と機能解析」
論文審査委員	主査 和田野 晃 副査 太田 大策 副査 北村 進一 副査 杉本 憲治

## 論文要旨

### 緒言

ステロールは真核生物の細胞膜の構成成分としてまた、ステロイドホルモンの前駆体として重要な役割を果たしている。植物ステロールは $\beta$ -シトステロール、スチグマステロール、コレステロール、カンペステロールなどから構成され、これまでシロイヌナズナにおけるステロール合成変異体解析により、ステロール生合成に関与する遺伝子の多くが明らかにされてきた。動物、植物、菌類などの生物種の違いにより側鎖の構造が異なるステロールが合成されるが、その中でも側鎖 C-22 不飽和結合を持つステロールは真核微生物(エルゴステロール) および植物 (スチグマステロール, ブラシカステロール) において特異的に存在する。酵母のエルゴステロール合成系では、シトクロム P450(CYP61)が C-22 側鎖不飽和化酵素として機能するが、高等植物における本反応の実体は不明であった。本研究では高等植物の膜ステロール生合成系路の最終段階において側鎖不飽和化反応を触媒すると考えられる P450 遺伝子の同定を目的とした。

シロイヌナズナには 246 種のシトクロム P450(P450)遺伝子が存在する。それらは A タイプおよび non A タイプに分類される。A タイプはリグニン、フラボノイド、アルカロイドなどの二次代謝産物の生合成に関与し、植物に特異的に存在する。non A タイプは、ステロール、脂肪酸合成などに関与し、生物種を越えて保存される分子種である。A タイプおよび non A タイプいずれにおいても、多くの P450 分子種の生理機能が不明である。本研究において、シロイヌナズナ non A タイプ P450 の進化系統樹解析および、基質認識部位における酵母 CYP61 とのアミノ酸配列相同性から植物 CYP710A 遺伝子をステロール側鎖不

飽和化に関与する P450 遺伝子として同定し、詳細な機能解析を行うことにより CYP710A の持つ酵素的性質を明らかにした。

## 第1章 *CYP710A* 遺伝子の単離，組換えタンパク質による酵素活性

シロイヌナズナ 2 番染色体には 4 種の *CYP710A* 遺伝子(*CYP710A1*, *CYP710A2*, *CYP710A3*, *CYP710A4*) が存在する。*CYP710A1* および *CYP710A2* はそれぞれ 495, 499 アミノ酸からなるタンパク質をコードし、*CYP710A1* と他の *CYP710A* との相同性はそれぞれ 81.9%(*CYP710A2*), 77.7%(*CYP710A3*), 76.1%(*CYP710A4*)である。*CYP710A1* のアミノ酸配列を基に The Institute for Genomic Research Gene Indices (TIGR)にて tBLASTn 検索を行い、トマト *CYP710A11* をコードすると予測される領域を含む EST クローンを同定した。これら *CYP710A* の酵素学的解析を行うため、シロイヌナズナ *CYP710A1*, *CYP710A2* およびトマト *CYP710A11* をバキュロウイルス・昆虫細胞系にて組換え酵素タンパク質を発現させた。還元型 P450 の一酸化炭素結合物の光吸収差スペクトルから、シロイヌナズナ *CYP710A1*, *CYP710A2*, トマト *CYP710A11* すべての組換えタンパク質において P450 に特徴的な 450nm のソーレー帯を確認した。

続いてこれらの酵素タンパク質を用いて各種ステロール ( $\beta$ -シトステロール, カンペステロール, 24-*epi*カンペステロール) を用いて酵素反応を行い GC-MSにて酵素活性を測定した。その結果、*CYP710A1*, *CYP710A2* および *CYP710A11* による  $\beta$ -シトステロールからスチグマステロールへの側鎖不飽和化活性を確認した。また *CYP710A2* に対して 24-*epi*カンペステロールを用いたところブラシカステロールの生成を確認した。 $\beta$ -シトステロールに対する  $K_m$ 値はそれぞれ 1.0  $\mu$ M (*CYP710A1*), 3.7  $\mu$ M (*CYP710A11*)であった。*CYP710A2* の  $\beta$ -シトステロールに対する比活性は 0.0027 nmoles/nmol P450/min, 24-*epi*カンペステロールに対する比活性は 0.028 nmoles/nmol P450/minであった。

## 第2章 *CYP710A* 過剰発現体および T-DNA 挿入変異体の解析

シロイヌナズナには C-22 不飽和ステロールとしてスチグマステロール, ブラシカステロール, またその C-24 位のメチル基の立体配置の違いによる異性体クリノステロールが存在する。なかでもブラシカステロールはアブラナ科植物に特異的に存在するがクリノステロールとの存在比は明らかにされていない。シロイヌナズナ植物体における *CYP710A* の持つ生理機能解明のため、*CYP710A* 過剰発現体の作出および解析を行った。まず、*CYP710A1*, *CYP710A2* および *CYP710A11* 遺伝子をカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターの制御下で発現させるコンストラクトを作製し、アグロバクテリウムによる形質転換を行った。形質転換体における導入遺伝子の発現量解析は RT-PCR により行い、それぞれの転写産物の恒常的に高い発現量を確認した。続いてこれらの形質転換体 T2 ホモ系統の内生ステロール分析を行った。播種後 3 週間のシロイヌナズナ植物体のロゼット葉より Brigh & Dyer 法を用いて全ステロールを抽出し、トリメチルシリル誘導体化を行い GC-MS を用い

て定量した。CYP710A1 および CYP710A11 過剰発現体においてはスチグマステロール、CYP710A2 過剰発現体においてはスチグマステロールとブラシカステロール/クリノステロールの顕著な蓄積を確認した。続いて、CYP710A2の T-DNA 挿入変異体(SALK\_001175 系統)について内生ステロール分析を行ったところ、ブラシカステロール/クリノステロールは検出されなかった。組換え酵素タンパク質による酵素活性の結果と合わせて、CYP710A2 が 24-*epi* カンペステロールからブラシカステロールへの C-22 位側鎖不飽和化活性を持つことを明らかにした。

### 第3章 シロイヌナズナにおける CYP710A 遺伝子の発現様式

シロイヌナズナにおける 4 種の CYP710A 遺伝子の発現様式を検討するため、組織別 RNA (根, 茎, 葉, 花, 鞘) を用いた半定量 PCR および, プロモーター : GUS 遺伝子発現解析を行った。その結果, CYP710A1 は葉の維管束組織, がく片, 根の先端部および維管束組織で, CYP710A2 は葉の葉肉組織, 鞘, 種子, 根の脈間組織において発現することを明らかにした。一方, CYP710A3 は根冠および花卉において, CYP710A4 は根における分裂組織以外の部分での発現が見られた。以上の結果から, シロイヌナズナにおいて CYP710A 遺伝子は厳密な組織特異的発現制御下にあり, 側鎖不飽和ステロールが発育段階特異的な生理機能を担う可能性を示した。

### 第4章 総括

本研究によりシロイヌナズナ CYP710A1, CYP710A2, トマト CYP710A11 がステロール側鎖不飽和化活性を有することを示し, これまで不明であった植物膜ステロール生合成の最終段階を解明した。CYP710 遺伝子は高等植物のみならず, ヒメツリガネゴケ, また単細胞緑藻であるクラミドモナスなどの真核光合成生物において広く保存されていることから CYP710 の持つ触媒機構は植物界において必要不可欠であると考えられる。

これまでのステロール生合成変異体の解析により, 個々の膜ステロールの存在比が胚発生, 形態形成, またオーキシン流出輸送体である PIN タンパク質の局在様式に極めて重大な作用を及ぼすことが報告されている。今後, CYP710A 発現抑制株・欠損株を解析するなどの分子遺伝学的, 分子生物学的研究により, C-22 位側鎖不飽和ステロールの持つ生理機能解明が可能となった。

## 審査結果の要旨

ステロールは動物, 植物, 真菌類に含まれている生命活動に必須の物質であり, 酵母, カビ等の真菌類ではエルゴステロールが, 植物ではシトステロール, カンペステロール, スチグマステロールが, 動物ではコレステロールが主ステロールとなっている。生物種の

違いにより側鎖の構造が異なるステロールが合成されるが、その中でも側鎖 C-22 不飽和結合を持つステロールは真核微生物（エルゴステロール）および植物（スチグマステロール、ブラシカステロール）において特異的に存在する。酵母のエルゴステロール合成系では、シトクロム P450(CYP61)が C-22 側鎖不飽和化酵素として機能することが報告されているが、高等植物における本反応の実体は不明であった。そこで本研究では基質認識部位において CYP61 と極めて高い相同性を持つ植物 *CYP710A* 遺伝子を同定とその発現生成物の酵素的性質の検討、それらの結果を踏まえ高等植物の膜ステロール生合成経路最終段階の機構解明を目的としている。

まず、バキュロウイルス・昆虫細胞系を用い、シロイヌナズナ *CYP710A1*, *CYP710A2* およびトマト *CYP710A11* の組換え酵素タンパク質の作製を行っている。調整したミクロソーム還元画分の一酸化炭素結合差スペクトルにおいて、シロイヌナズナ *CYP710A1*, *CYP710A2*, トマト *CYP710A11* すべての組換えタンパク質発現試料で P450 に特徴的な 450nm のソーレー帯が観測されたことより、これらが活性型 P450 として発現していると推定している。続いてこれらの組換えタンパク質を、各種ステロール ( $\beta$ -シトステロール、カンペステロール, 24-*epi*カンペステロール) を用いた酵素反応系に供し、その結果より、*CYP710A1*, *CYP710A2* および *CYP710A11* が $\beta$ -シトステロールからスチグマステロールへの、また *CYP710A2* が 24-*epi*カンペステロールからブラシカステロールへの側鎖不飽和化活性を持つこと確認している。

次にシロイヌナズナ植物体を用いて *CYP710A* 過剰発現体の作出を行い、シロイヌナズナに内在する C-22 不飽和ステロールであるスチグマステロール、ブラシカステロール、またその C-24 位のメチル基の立体異性体クリノステロールの蓄積量を検討している。*CYP710A* のシロイヌナズナ過剰発現体は、*CYP710A1*, *CYP710A2* および *CYP710A11* 遺伝子をカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターの制御下で構成的に発現させるプラスミッドを、アグロバクテリウムにより試料に導入し作製している。RT-PCR により形質転換体における導入遺伝子の発現量解析を行い、導入遺伝子の恒常的に高い発現を確認している。次にこれらの形質転換体より Brigh & Dyer 法を用いて抽出した全ステロールを GC-MS により定量した結果、*CYP710A1* および *CYP710A11* 過剰発現体におけるスチグマステロールの蓄積、*CYP710A2* 過剰発現体におけるスチグマステロールとブラシカステロール/クリノステロールの顕著な蓄積を検討し、シロイヌナズナ植物体における *CYP710A* の持つ側鎖不飽和化活性を確認している。続いて、*CYP710A2* の T-DNA 挿入変異体 (SALK\_001175 系統) についての解析を行い、ブラシカステロール/クリノステロールが検出されなかったことより、組換え酵素タンパク質による酵素活性ならびに *CYP710A2* 過剰発現体解析の結果と合わせて、*CYP710A2* が 24-*epi*カンペステロールからブラシカステロールへの C-22 位側鎖不飽和化活性を持つことを明らかにしている。

最後にプロモーター : GUS 遺伝子発現解析によりシロイヌナズナにおける 4 種の *CYP710A* 遺伝子の発現様式を検討している。その結果 *CYP710A1*-*CYP710A4* 遺伝子は組

織特異的な発現を示し、側鎖不飽和ステロールが発育段階特異的な生理機能を担うと考察している。

以上、本研究ではシロイヌナズナ CYP710A1, CYP710A2, トマト CYP710A11 がステロール側鎖不飽和化活性を有することを示し、これまで不明であった植物膜ステロール生合成の最終段階を解明した。これらの研究成果は、植物生理学・生化学の発展に寄与するものであり、最終試験の結果と併せて博士（農学）の学位を授与することを適当と認める。