

氏名・(本籍)	てらもと 寺 本	すすむ 進
学位の種類	博 士 (理 学)	
学位記番号	理 第 9 8 3 号	
学位授与年月日	平 成 4 年 3 月 10 日	
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当	
最 終 学 歴	昭和59年 3 月 熊本大学大学院理学研究科 (修士課程) 生物学専攻修了	
学位論文題目	Suppression mechanisms of 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) accumulation in cultured cells of <u>Stizolobium hassjoo</u> . (ハッシュウマメ培養細胞における3,4-ジヒドロオキシフェニルアラニン(DOPA)蓄積の抑制機構)	
論文審査委員	(主査) 教 授 駒 嶺 穆 教 授 四 釜 慶 治 助 教 授 福 田 裕 穂	

論 文 目 次

論文内容要旨

近年、植物培養細胞を用いて2次代謝産物などの有用物質を効率よく生産しようという多くの試みがなされている。しかしながら、一般に脱分化状態にある培養細胞では、有用物質の含有量は親植物と比べ著しく低下しているため、成功した例はわずかである。したがって、培養細胞における有用物質生成の抑制機構を解明できれば、培養細胞を用いての有用物質大量生産が可能となるばかりでなく、植物細胞の分化という現象を物質生産という代謝的側面から捉えることにもなる。

亜熱帯性のマメ科植物であるハッシュウマメ (*Stizolobium hassjoo*) は、その全草に2次代謝産物の一つである非タンパク性アミノ酸の3,4-ジヒドロオキシフェニルアラニン (DOPA) を、乾燥重量当たり5~10%という非常に高い割合で含んでいる。植物においてDOPAは、赤色色素のベタレインや非タンパク性アミノ酸のスチゾロビン酸とスチゾロロニン酸、アルカロイド類、あるいはメラニンなどの前駆物質となっており、動物でも神経伝達物質の前駆体になっている重要な2次代謝産物である。また、パーキンソン病の治療薬としても需要が高い。

ところでハッシュウマメの親植物に著量に含まれるDOPAは、その黄化発芽種子の上胚軸から誘導された培養細胞系では、含有量は蛍光分光的に初めて検出できる程度まで低下しており、これまで報告された多くの2次代謝産物の例と同じである。また、DOPA生合成は、芳香族アミノ酸であるチロシンの水酸化反応という一段階の反応で進行すると推測される。したがって、このハッシュウマメ培養細胞系は、培養細胞系における2次代謝産物生合成の抑制機構を解明する上で、よいモデル系である。

そこで、DOPA蓄積という現象に対して、際立った反応の違いを示すハッシュウマメ培養細胞系(脱分化系)と、親植物としての上胚軸(分化系)を材料に用いて、培養細胞におけるDOPA蓄積の抑制機構を解明するために5つの仮説を立て研究を行った。

【第1章】

1番目の可能性として、DOPAの前駆物質の生合成系であるシキミ酸経路について調べた。

まずシキミ酸経路に含まれる、シキミ酸デヒドロゲナーゼ、キナ酸デヒドロゲナーゼ、コリスミン酸ムターゼ、プレフェン酸デヒドロゲナーゼ、プレフェン酸デヒドラターゼ、アントラニル酸シンテターゼの6酵素について、培養細胞と上胚軸とにおける各酵素の活性を比較した。その結果、いずれの酵素活性も培養細胞のほうが低く、特にプレフェン酸デヒドロゲナーゼは、上胚軸の42%にまで低下していた。

次に、シキミ酸経路に働くファインコントロールについて調べた。ブランチングエンザイムであるコリスミン酸ムターゼは、その活性が最終産物であるチロシンとフェニルアラニンによってフィードバック阻害を受け、トリプトファンではフィードバック促進を受けることで酵素活性は厳密に制御されており、シキミ酸経路の鍵酵素の一つであることが多くの植物で報告

されている。ハッシュウマメの培養細胞と上胚軸の場合も、チロシンとフェニルアラニンによって強いフィードバック阻害を受けこれまでの報告と一致したが、トリプトファンによるフィードバック促進は受けなかった。次にシキミ酸デヒドロゲナーゼは、培養細胞においてのみチロシンによって非常に強く阻害され、トリプトファンでも阻害された。プレフェン酸デヒドロゲナーゼとプレフェン酸デヒドラターゼは、このような制御は受けなかった。したがってハッシュウマメの培養細胞では、シキミ酸経路のプレフェン酸デヒドロゲナーゼ活性が低下してプレフェン酸からチロシンへの流れが抑えられており、さらにシキミ酸デヒドロゲナーゼがチロシンによって強いフィードバック阻害を受ける結果、シキミ酸経路におけるチロシンへの代謝の流れが強く抑制されていた。この結果、培養細胞ではチロシンの生合成が抑えられるため、DOPA 蓄積量が低下すると考えられる。

次に第 2 番目の可能性として、培養細胞においてチロシンから DOPA への代謝の流れが、チロシンアンモニアリアーゼ (TAL) によってフェニルプロパノイド代謝系へシフトしていることを考えた。しかしながら、培養細胞における TAL 活性は検出されず、代謝の流れがフェニルプロパノイド代謝系へシフトしているという 2 番目の可能性はないことが示唆された。

【第 2 章】

本章では、第 3 番目の可能性として、培養細胞でチロシンが DOPA へ流れずタンパク合成に使われることを検討した。培養細胞と上胚軸に ^{14}C -チロシンを与えて 1N の NaOH 可溶性画分、80%EtOH 可溶性画分、 CO_2 それに培地の 4 画分に取り込まれた放射能を調べた。その結果、タンパク相当画分である 1N の NaOH 可溶性画分に、培養細胞において高い取り込みが見られた。したがって、培養細胞では上胚軸に比べて、チロシンがタンパク合成系へ活発に流れれており、DOPA 蓄積量の抑制の一因と考えられる。また、80%EtOH 可溶性画分への放射能の取り込みが上胚軸で高いことも観察されたが、これもチロシンから DOPA への流れが存在しそれが上胚軸で高いことを示唆し上記の推論を支持している。

【第 3 章】

本章では、第 4 番目の可能性として、DOPA を酸化して DOPA キノンを生成する反応を触媒している DOPA オキシダーゼについて調べた。培養細胞における DOPA オキシダーゼ活性と DOPA 量の経時的変化は、ミラーイメージになっているので、DOPA 量の消長に酸化酵素が関与していることが予想された。しかしながら、培養細胞の DOPA オキシダーゼ活性は、上胚軸の活性の 5 分の 1 しかなく、培養細胞において DOPA が活発に酸化されているという結果は得られなかった。さらに、DOPA と DOPA オキシダーゼの細胞内局在性は厳密に区分化されているはずで、第 4 番目の可能性は考えられない。また、この DOPA オキシダーゼは、チロシンヒドロキシダーゼ活性は持っていなかった。

最後の可能性として、チロシンから DOPA への水酸化反応、つまりチロシンヒドロキシラー

ゼ活性による制御について検討した。高等植物における同酵素については、2, 3の報告があるものの未だ単離されていない。そこで、本章では同酵素の活性の検出を試み、その酵素によるDOPA生成の制御機構について調べた。培地にチロシンを添加すると、培養細胞に含まれるDOPA量は著しく増加することから、チロシンからDOPAへの代謝経路の存在が予想された。そこで、上胚軸と培養細胞における ^{14}C -チロシンの取り込み実験を行ったところ、両者でDOPA画分に放射能が検出されたが、特に上胚軸で高かった。したがって、*in vivo*においては、チロシンからDOPAへの経路は存在し、しかも上胚軸で特に活発に流れていることがわかった。チロシンヒドロキシラーゼ活性は、ナトリウムリン酸緩衝液に0.5Mの塩化ナトリウムを加えた高濃度の塩溶液で抽出することで分光光度的に検出することに成功した。さらに、確証を得るために ^{14}C -チロシンを用いて、*in vitro*実験を行った。上胚軸から抽出した酵素液を用いて、0時間に1規定塩酸で酵素反応を止めたコントロールではDOPA分画に放射能は検出されないが、15分間反応させたものでは高い ^{14}C -DOPAのピークがみられた。これに対し、培養細胞ではDOPA分画に放射能は検出されなかった。したがって、今回の実験によりチロシンヒドロキシラーゼの存在が確認され、その活性は上胚軸にみられることから、上胚軸では高いチロシンヒドロキシラーゼ活性によりDOPAが活発に生成されており、強い還元状態にあると思われる生体内でDOPAの著量の蓄積が起これると考えられる。一方培養細胞においては、*in vivo*での取り込みは確認されているので、チロシンからDOPAへの流れはあるものの、チロシンヒドロキシラーゼ活性が極めて低く抑えられている結果、DOPA蓄積量も上胚軸に比べ非常に少ないことが示唆され、第5番目の可能性が高いことがわかった。さらに、上胚軸において検出されたチロシンヒドロキシラーゼは、動物のチロシンヒドロキシラーゼと異なって各種プテリン系試薬を要求せず、ゲル濾過により部分精製した酵素標品は、DOPAオキシダーゼ活性も持っており、チロシナーゼ型と考えられる。

以上の結果から、ハッシュウマメの培養細胞におけるDOPA蓄積の抑制機構としては、シキミ酸経路におけるチロシンの代謝が抑えられた結果、DOPAの基質のチロシンの生成が強く抑制を受けていること、培養細胞でチロシン代謝の流れがタンパク合成に強くシフトしていること、DOPA生成に直接関与するチロシンヒドロキシラーゼの活性が低下していることなどの総合的な結果であることが明らかにされた。

今後の展望としては、チロシンヒドロキシラーゼの精製、遺伝子のクローニングを行い、この酵素の活性がどの段階で制御されているのかを明らかにすることが重要であろう。

論文審査の結果の要旨

本論文は、DOPA 蓄積という現象に対して、際立った反応の違いを示すハッシュウマメ培養細胞系(脱分化系)と親植物としての上胚軸(分化系)を材料に用い、培養細胞における DOPA 蓄積の抑制機構を解明することを目的としたもので、次の 5 つの仮説を立て研究を行っている。

【第 1 章】 1 番目の可能性として、DOPA の前駆物質の生合成系であるシキミ酸経路に含まれるいくつかの酵素について調べた。その結果、いずれの酵素活性も培養細胞の方が低く、特にプレフェン酸デヒドロゲナーゼは、上胚軸の 40% にまで低下していた。次にシキミ酸素デヒドロゲナーゼは、培養細胞においてのみチロシンによって非常に強く阻害され、トリプトファンでも阻害された。したがって、ハッシュウマメの培養細胞では、シキミ酸経路におけるチロシンへの代謝の流れが強く抑制される結果、基質が不足し、DOPA 蓄積量が低下すると考えられる。

次に第 2 番目の可能性として、培養細胞においてチロシンからの代謝の流れが、チロシニアソニモニアリナーゼ (TAL) によってフェニルプロパノイド代謝系へシフトしていることを考えたが、培養細胞における TAL 活性は検出されず、2 番目の可能性はないことが示唆された。

【第 2 章】 本章では、第 3 番目の可能性として、培養細胞でチロシンが DOPA へ流れずタンパク合成に使われることを検討した。培養細胞と上胚軸に ^{14}C -チロシンを与えて、1M の NaOH 可溶性画分、80%EtOH 可溶性画分、 CO_2 それに培地の 4 画分に取り込まれた放射能を調べた。その結果、タンパク相当画分である 1M の NaOH 可溶性画分に、培養細胞において高い取り込みが見られた。したがって培養細胞では上胚軸に比べて、チロシンがタンパク合成系へ活発に流れており、DOPA 蓄積量の抑制の一因と考えられる。

【第 3 章】 本章では、第 4 番目の可能性として、DOPA の酸化反応を触媒している DOPA オキシダーゼについて調べた。培養細胞における DOPA オキシダーゼ活性と DOPA 量の経時的変化は、ミラーイメージになっているので、DOPA 量の消長に酸化酵素が関与していることが予想された。しかしながら、培養細胞の DOPA オキシダーゼ活性は上胚軸の活性の 5 分の 1 しかなく、培養細胞において DOPA が活発に酸化されているという結果は得られなかった。

さらに、DOPA と DOPA オキシダーゼの細胞内局在性は厳密に区別化されているはずで、第 4 番目の可能性は考えられない。

最後の可能性として、チロシンから DOPA への水酸化反応、つまりチロシンヒドロキシラーゼ活性による制御について検討した。高等植物における同酵素は、2, 3 の報告はあるものの未だ単離されていない。そこで、本章では同酵素の活性の検出を試み、その酵素による DOPA 生成の制御機構について調べた。コールド及び ^{14}C でラベルしたチロシンの取り込み実験より、*in vivo* においてはチロシンから DOPA への経路は存在し、しかも上胚軸で特に活発に流れていることがわかった。チロシンヒドロキシラーゼ活性は、上胚軸から 0.1M, pH6.0 のナトリウムリン酸緩衝液に 0.5M の塩化ナトリウムを加えた高濃度の塩溶液で抽出することで、分光光度

的に検出することに成功した。さらに確証を得るために ^{14}C -チロシンを用いて *in vitro* 実験を行ったところ、上胚軸から抽出した酵素液では、高い ^{14}C -DOPA のピークがみられたが、培養細胞では検出されなかった。したがって、今回の実験によりチロシンヒドロキシラーゼの存在が確認され、その活性は上胚軸にみられることから、上胚軸では高いチロシンヒドロキシラーゼ活性により DOPA が活発に生成されており、強い還元状態にあると思われる生体内で DOPA の著量の蓄積が起これると考えられる。一方培養細胞においては、チロシンヒドロキシラーゼ活性が極めて低く抑えられている結果、DOPA 蓄積量も上胚軸に比べ非常に少ないことが示唆され、第 5 番目の可能性が高いことがわかった。

以上の結果から、ハッシュウマメの培養細胞における DOPA 蓄積の抑制機構としては、シキミ酸経路におけるチロシンの生成が抑えられた結果 DOPA の基質のチロシンの生成が強く抑制を受けていること、チロシン代謝の流れがタンパク合成に強くシフトしていること、DOPA 生成に直接関与するチロシンヒドロキシラーゼの活性が低下していることなどの総合的な結果であることが明らかにされた。

これらの結果は、植物生理学における重要な新発見で、博士論文の内容に値するものである。

以上寺本進提出の論文は本人が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。

よって寺本進提出の論文は博士(理学)の学位論文として合格と認める。