

# オレオレジンの有効利用に向けたモノテルペン合成酵素遺伝子の機能解析

島根大学総合理工学部 加藤定信

## はじめに

針葉樹に含まれているオレオレジンとは、木の香り成分や、松ヤニなどをまとめたものの名前で、テルペノイド（天然物最大のグループ）に属する、モノテルペンやセスキテルペン、ジテルペンといった化合物群によって構成されています<sup>1, 2)</sup>。針葉樹は2億年以上前に出現し、無数の昆虫や病原菌などの攻撃にさらされながらも、現在まで様々な進化を続けてきたわけですが、その悠久の流れの中で、防御物質として多種多様なテルペノイド化合物と、それらの絶妙なブレンドが生まれました。ですからオレオレジンの中に含まれている成分には、昆虫を遠ざけたり、殺菌したりする性質を持っているものが数多くあります。さらに驚くべきことに、草本植物では、自分の葉っぱを食べる外敵から身を守ってくれる味方（肉食性のダニや寄生バチ）を、モノテルペン成分を使って呼ぶものもいます（相利共生作用）<sup>3)</sup>。このようにオレオレジンは本来、植物の防御・コミュニケーション物質であるわけですが、商業的にも高い価値を持っていて、医薬、農薬、溶媒、香料、接着剤、製紙用サイズ剤、印刷インキ等の原料として利用されています。木の利用といえば、細胞壁の集合体である木材を連想しますが、木材が出来るまでには、まず木から枝葉が取り除かれ、製材の際には端材や鋸屑が生まれます。木材（特に針葉樹材）を作った後の残り物と思われる枝葉や鋸屑には、たくさんのオレオレジンが含まれているので、それを抽出・利用することで木をより有効に利用することが出来ます。さらにオレオレジンの中には抗ガン作用等の非常に有効な薬理作用を示す成分も含まれているので、そのような成分を取り出すことで木に大きな付加価値をつけることも出来ます。

人間には十人十色といわれるように、様々な性格の人がおられますが、オレオレジン成分も同様に、同一種（たとえばヒノキならヒノキ）の中に様々な成分割合を示すもの（キモタイプ）があります<sup>4-7)</sup>。図1は、200本

のヒノキの針葉から放出された主なモノテルペン成分を示したのですが、サビネンというモノテルペン成分の割合が、あるヒノキでは5%で、またあるヒノキでは80%というように、非常に大きな個体差（キモタイプ）が存在することを示しています。モノテルペン成分には様々な生理活性を示すものがありますので、そのモノテルペン成分の割合が異なるということは、ある昆虫や微生物に対する抵抗性などが個体によって異なるということになります。もちろん木を攻撃する昆虫や微生物は1種類ではないので、個体によって、ある昆虫には強く、ある昆虫には弱いということがおきます。このような同一種における多様性が存在すると、ある敵対昆虫が大発生して多くの個体が被害を被っても、中には抵抗性のある個体が存在して生き残るので、その個体群（種）における抵抗性が高まることになります。

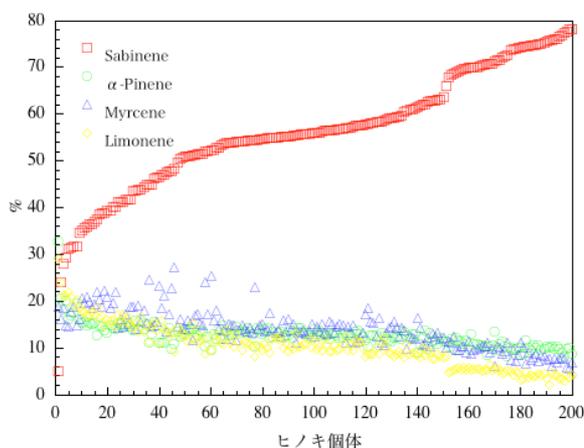


図1 ヒノキ針葉のヘッドスペース成分

テルペノイド天然物化学の世界では、最近医薬や農薬、その他商用製品の原料としてテルペノイドを工業的に利用するための研究が盛んに行われています<sup>8)</sup>。その主流となっているのが、テルペノイド生合成の効率を向上させるための、分子制御に関する遺伝子工学的研究です。我々は上述のモノテルペン組成における多様性に以前から興味を抱いており、その多様性がどのように制御されているのかを分子生物学的に解明しようとしています。

本研究により、モノテルペン組成の制御機構が明らかになれば、テルペノイドを工業スケールで利用するための研究に応用できますし、病虫気象害に抵抗性のある樹木を生み出すことも容易になると思われます。また、分子生物学的研究と並行して、現在未利用のままの枝葉や鋸屑を有効利用することも視野に入れており、テルペノイドの有効利用に関して、現状を改善しながら、近未来に機能的利用が実現出来ればと考えています(図2)。

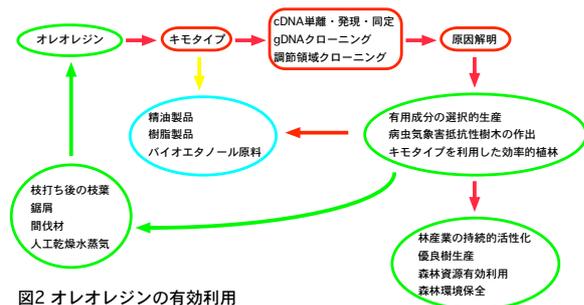


図2 オレオレジンの有効利用

## ヒノキにおけるモノテルペン組成制御機構の解明

モノテルペン化合物は、モノテルペン合成酵素が、前駆物質であるゲラニルニリン酸(GPP)をモノテルペン生成物に変換することにより生まれるわけですが、この生合成系の制御機構を解明するためには、まず第一にモノテルペン合成酵素を暗号化(コード化)している遺伝子を単離しなければなりません。この遺伝子は相補DNA(cDNA)と呼ばれ、メッセンジャーRNA(mRNA)の塩基配列情報を(相補的に)DNA情報として持っています。このcDNAをプラスミドという環状DNAに組み込み、そのプラスミドを大腸菌に導入して、cDNAにコードされている酵素を大腸菌

内で作り出し、得られた酵素をGPP(前駆物質)とともに培養するとモノテルペン生成物が得られます。得られた生成物を分析することにより、どのようなモノテルペン化合物を生成するための酵素なのかがわかります<sup>9)</sup>。このようにして、まず、あるモノテルペン組成を示すヒノキ個体に含まれる、一種類のモノテルペン合成酵素遺伝子を明らかにした後、それとは異なるモノテルペン組成を示す個体(異なるキモタイプ)から、同じ遺伝子を取り出します。その後それらの遺伝子の塩基配列やアミノ酸配列を詳しく調べ、キモタイプによって酵素のアミノ酸配列がどのように異なるのかを明らかにします。現在ヒノキから、部分的に単離されているものも含めて8種類のモノテルペン合成酵素遺伝子と推定される断片が得られていますので、それぞれの遺伝子について詳しく調べています。

cDNAが得られたら、今度はその塩基配列情報を基にゲノムDNAを単離し、cDNAには含まれないイントロンや、対立遺伝子などの情報を、各遺伝子、各キモタイプで詳しく調査します。現在は数個の遺伝子についてゲノムDNAが得られており、それらのイントロン情報が明らかになっています。

ゲノムDNA情報が明らかになれば、次にそのDNAの前後にある塩基配列情報を調べます。遺伝情報が埋め込まれているDNAの付近には、その遺伝子の発現を調節する領域があります。この調節領域は、いわばDNAからmRNAが転写されるためのスイッチで、様々な要因によってスイッチが入ったり、切られたりします。この塩基配列情報を、各遺伝子、各キモタイプで詳細に調査します。

このようにして、cDNAの塩基(アミノ酸)配列情報、ゲノムDNAのイントロン、対立遺伝子情報、調節領域の塩基配列情報を、総合的に詳しく調査することにより、何故同一種に多様なモノテルペン組成が存在するのかを明らかにすることが出来ます(図3)。

## モノテルペン合成酵素遺伝子の単離・発現・同定

**遺伝子の単離** 図4に遺伝子の単離・発現・同定を行うためのプロセスを示します。目的のcDNAを単離するためには、まず、生命活動を営んでいる細胞の中に存在するmRNAを

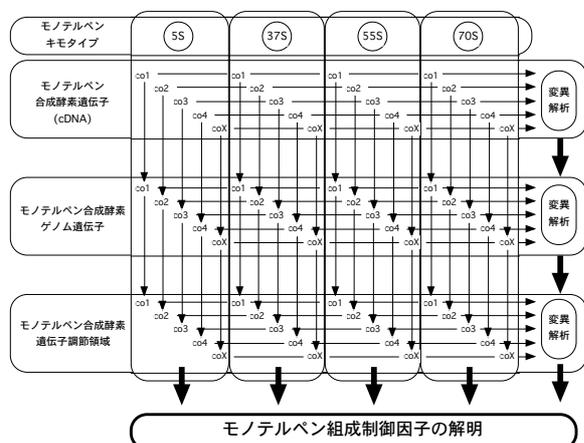


図3 研究計画

全て取り出します。その後すぐに逆転写酵素を用いて mRNA から cDNA を合成します。次に、すでに他種から得られているモノテルペン合成酵素遺伝子<sup>10, 11)</sup>の塩基配列を基に、目的の cDNA が含まれていると推定される短い塩基配列（プライマー）を、2カ所推定して作製します。その後 PCR という、2種類のプライマーで挟まれた DNA 断片を指数関数的に増幅することが出来る方法を用いて、目的

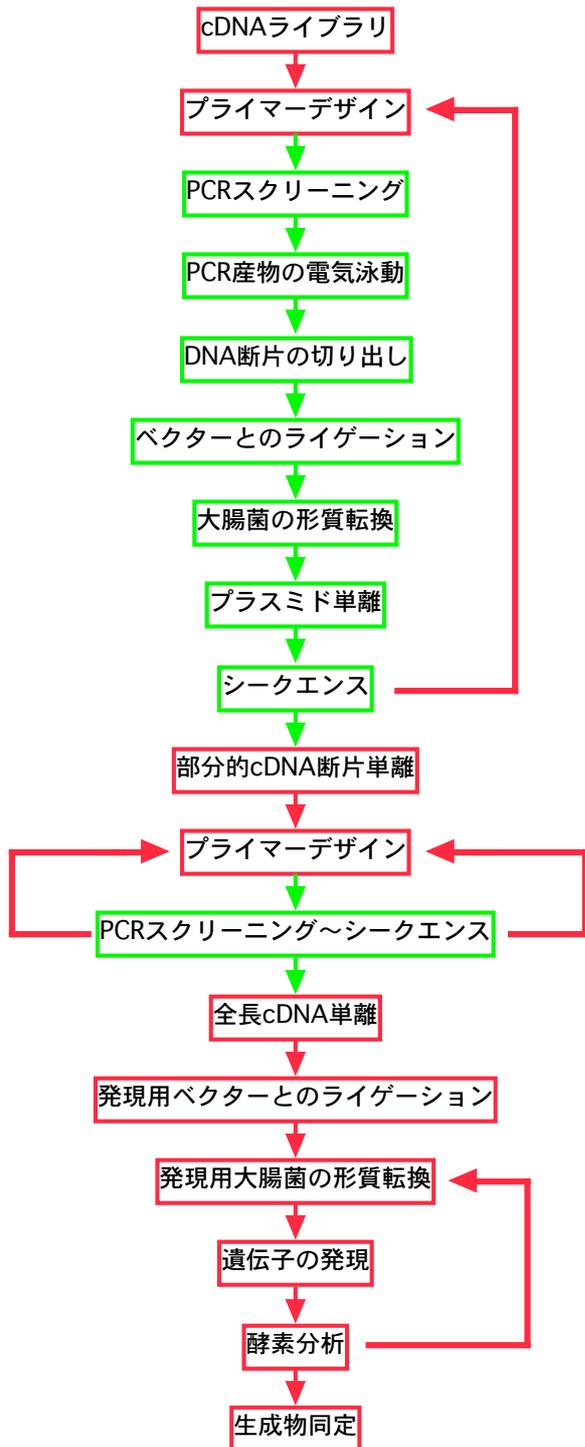


図4 遺伝子の単離・発現・同定プロセス

の DNA 断片を増幅します。得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し、推定される塩基長の DNA が得られていれば、その DNA 断片をゲルから切り出し、精製した後に、プラスミドに連結します。そのプラスミドを大腸菌に導入・培養してプラスミドを大量に複製し、得られた部分的な DNA 断片の塩基配列情報を取得（シークエンス）するのに使います。得られたシークエンス情報を DNA データベースで検索して、モノテルペン合成酵素遺伝子と推定されれば、今度は得られた塩基配列情報を用いてプライマーをデザインし、予め cDNA 作製の際に DNA の端に付加してあるアダプタープライマーとの組み合わせで、先端側と末端側の PCR を行い、cDNA の両端を含んだ領域を増幅します。その後、電気泳動からシークエンスまでの一連の実験を行い、再度 DNA データバンクで検索して、それらの塩基配列情報が目的の遺伝子のものであるかどうかを調査します。このようにして cDNA の両端の情報が得られたら、両端の塩基配列情報を基にプライマーをデザインして、一連の実験を行うことで完全長の cDNA が得られます（図 5）。完全長 cDNA が単離されたら、その全塩基配列を明らかにします。

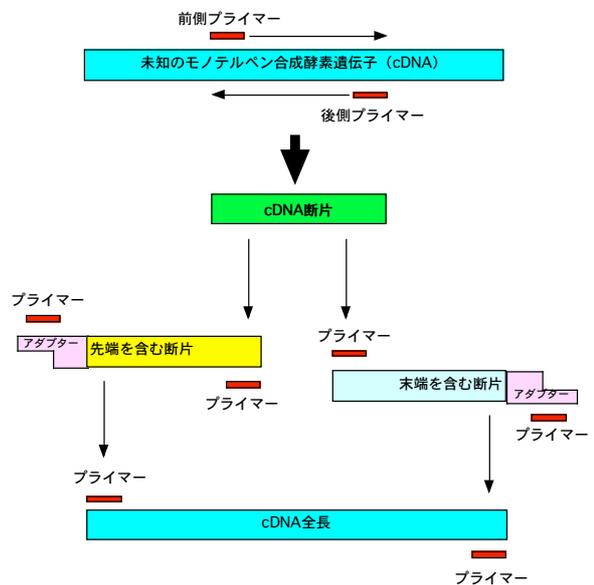


図5 cDNAクローニングプロセス

**遺伝子の発現・同定** 完全長 cDNA が得られたら、その cDNA を遺伝子の発現に適したプラスミドベクターに連結し直します。プラスミドを増やして単離・精製した後、発現用の

大腸菌にプラスミドを導入し、培養・増殖した後、低めの温度で培養しながら酵素を生成させます (図 6)。酵素が出来たら、酵素が失活しないような緩衝液に大腸菌を移し、超音波で細胞を砕いて酵素を取り出します。精製した後、前駆物質である GPP とともに酵素を培養すると、生成物が出てきます。その生成物をガスクロマトグラフで分析すると、どのようなモノテルペン生成物が出来たのかが明らかとなります。

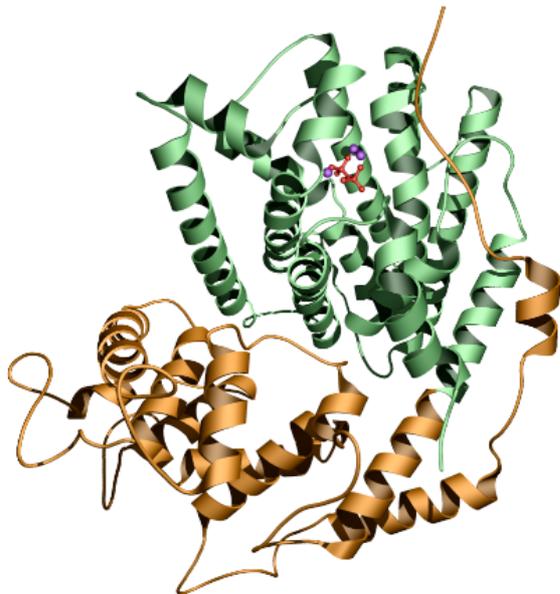


図6 モノテルペン合成酵素の推定構造 (*Abies grandis* リモネン合成酵素)

**ゲノム遺伝子・調節領域の単離** cDNA が単離されたら、今度はゲノム DNA を鋳型に、cDNA の両端プライマーを用いて PCR を行い、ゲノム遺伝子を増幅し、cDNA の単離と同様に遺伝子を単離します。ゲノム遺伝子には cDNA にはないイントロン領域が含まれていますので、適宜新たにプライマーを作製して全長の塩基配列を明らかにします。

ゲノム遺伝子が明らかとなれば、今度は既知配列近傍の未知領域を PCR で増幅する方法を用いて、遺伝子の前後にある調節領域を単離します。

## おわりに

モノテルペン合成酵素遺伝子の単離・発現・

同定について、簡単に紹介させていただきましたが、このような分子生物学実験を行っている時、時に原因不明の失敗に出くわします。従来は簡単に成功していた実験が、ある日突然失敗して、実験が先に進まなくなると言うことが起こります。DNA や酵素といったものは目に見えませんし、一連の実験で多くの試薬や機器を使うことから、失敗の原因を特定することが非常に困難で、解決に多くの時間を費やすこととなります。また、実験プロセスが長いこともあり、一つの遺伝子の機能を明らかにするためには多くの時間と労力が必要となりますが、その分、得られた遺伝子がどのような生成物を生み出すかが明らかとなったときの喜びは一入です。

我々が行っていることは、樹木の繁栄に利用されている昆虫が行っていることと、さほど変わらないように思いますが、我々の研究が、一日でも早く森林の発展につながり、さらには森林資源の有効利用、人類の健やかなる発展につながればと、切に思っております。

## 参考文献

1. Croteau R, Johnson MA (1985) In: Higuchi T (ed) Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components. Academic Press, Orlando, pp 379-439
2. Steele CL, Katoh S, Bohlmann J, Croteau R (1998) Plant Physiol 116:1497-1504
3. Takabayashi J, Dicke M (1996) Trends in Plant Science, 1:109-113
4. Katoh S, Croteau R (1998) Phytochemistry 47:577-582
5. Katoh S, Furuno T (2000) J Wood Sci 46:381-384
6. Katoh S, Noda A, Furuno T (2006) J Wood Sci 52:84-89
7. Katoh S, Furukawa T, Mizuguchi A, Furuno T (2006) J Wood Sci 52:466-469
8. Croteau R, Davis EM, Ringer KL, Wildung MR (2005) Naturwissenschaften 92:562-577
9. Katoh S, Hyatt D, Croteau R (2004) Arch Biochem Biophys 425:65-76
10. Bohlmann J, Steele CL, Croteau R (1997) J Biol Chem 272:21784-21792
11. Bohlmann J, Phillips M, Ramachandiran V, Katoh S, Croteau R (1999) Arch Biochem Biophys 368:232-243