

ツバキ油に含まれるトリテルペンの生合成研究

東京大学大学院薬学系研究科

渋谷 雅明

目的・背景

ツバキ (*Camellia japonica*) は日本原産の樹木である。ツバキの種子を圧搾して得られるツバキ油は、毛髪への吸収が優れていることや毛髪へ弾力性を与える長所のゆえ、奈良時代の頃から宮中の女性たちの黒い垂髪を整える髪油として使用され始め、その後、大衆にも普及した。

ツバキ油、オリーブ油などの植物油は、主成分として脂肪酸のグリセライドを含むが、数パーセントの含量でトリテルペンを含んでいる。オレイン酸が高含量であることが髪油としての有用性の高さと考えられてきたが、それ以外に微量に含まれるトリテルペンが、ツバキ油の髪油としての有用性（安定性、吸収性、弾力性の向上など）を高めている可能性も十分考えられる。実際、近年の研究から、ツバキ油やサザンカ油には、 β -アミリンなどの植物界に広く分布するトリテルペンに加えて、カメリオール A、B などのツバキ油特有のトリテルペンが含まれていることが判明した。

トリテルペンは植物ステロール生合成の中間体であるオキシドスクアレンから分岐して生合成される。トリテルペンの骨格はこの分岐反応を触媒する酵素（オキシドスクアレン閉環酵素 (oxidosqualene cyclase, OSC)、あるいは、トリテルペン合成酵素と呼ぶ）によって作り出される。これまでツバキの OSC に関する研究はなされていないため、ツバキにおけるトリテルペン生合成機構は全く不明である。

ツバキのトリテルペンの生合成機構を明らかにできれば、生合成酵素遺伝子の高発現、あるいは抑制により、従来のもとはトリテルペンの種類と含量が異なったツバキ油を調製することが可能となる。本研究においては、ツバキの形質転換による品種改良を視野にいれ、ツバキ種子からトリテルペン合成酵素のクローニングを行う。特に、ツバキ油に特徴的に含まれるトリテルペンの生合成に関与すると推定されるセコ型トリテルペンの骨格生成に関与する OSC のクローニングをめざす。

結果・考察

東京大学本郷キャンパスに植樹されているツバキから種子を収穫 mRNA を調製した。この mRNA と既知 OSC に保存されているアミノ酸配列に基づいて合成した 10 種のオリゴ DNA を用いて PCR を行なった。その結果、11 種の OSC ホモログを得、各クローンを CJ-01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11 と命名した。

これらのうち、cj-01, cj-08, cj-11 の 3 種のクローンについて、RACE 法により全長配列の決定に成功した。これら 3 種の全長クローンを PCR により得、酵母酵母発現ベ

クターに組み込み、ラノステロール合成酵素欠損酵母株 GIL77 で異種発現させた。生成物を GCMS で解析し、cj-01 を β -アミリン合成酵素、cj-08 と cj-11 を混合アミリン合成酵素と同定した。cj-01、cj-08、及び cj-11 の酵母における微量生成物を調べたが、カメリオール A、及び B に相当するトリテルペンは検出できず、cj-01、cj-08、及び cj-11 はカメリオール A、及び B の生合成に関与していないと思われる。

クローニングが成功しなかった 8 種の OSC の中にカメリオール A、及び B の生合成に関与する OSC が含まれる可能性が高い。ツバキ油のカメリオール A、及び B の含量は小さく、もしこれら 8 種の中に目的の OSC が含まれているとしたならば、そのツバキでの発現量は含量に比例して極めて少ないと予想される。発現量の少なさが RACE 法による DNA 断片の増幅を困難にしている可能性が高いと思われる。本研究期間の後半では、そのような視点に立ち、微量 RNA を効率的に増幅可能な改良 RACE 法 (Clontech 社の SMART RACE cDNA 増幅キットなど) を用いて未クローニングの 8 種の OSC のクローニングを試みたが、成功することができなかった。

考えられるクローニング未成功のもう一つの理由として、種子の収穫時期とカメリオール A、及び B の生合成時期の相違、あるいは RNA 調製に用いた部位と生合成の場所との相違が考えられる。種子の収穫時期の変更、葉など種子以外からの RNA の調製などの試行が必要と思われる。

ツバキから、セコトリテルペンの生産に関与する OSC を早期にクローニングし、ツバキの形質転換の足場を築きたいと考えている。