

1-Benzyltetrahydroisoquinoline 型アルカロイドの *O*-methyl 化について

○土井 康裕<sup>1</sup>, 岩佐 衣子<sup>1</sup>, 守安 正恭<sup>1</sup>, 竹村 知也<sup>2</sup>, 佐藤 文彦<sup>2</sup> (<sup>1</sup>神戸薬大, <sup>2</sup>京大院生命科学)

【目的】我々は生物活性を有するイソキノリン型アルカロイドを得るために植物細胞を用いた二次代謝研究を行っている。今回、ケシ科のキケマンとキンポウゲ科のオウレンに光学活性な 1-benzyltetrahydroisoquinoline 型アルカロイドを投与し、*O*-methyl 化代謝産物の生成効率から 3'-hydroxy-*N*-methyl coclaurine 生合成系の種特異性を解析した。また、キケマンの亜種であるムラサキケマンを使って 4'-*O*-methyltransferase の全長配列の取得を試みた。これらの結果を報告する。

【方法】投与実験に関しては各化合物をカルスに投与した後、キケマンは 25°C 4 週間、オウレンは 25°C 5 週間静置培養し、常法に従って抽出操作を行った。*O*-methyl 化代謝産物は LC/MS-MS 分析により同定した。ムラサキケマンの 4'-OMT の cDNA は、ひげ根より調整した cDNA を鋳型として既知の 4'-OMT の保存配列、ケシ科植物のコドンの使用頻度を基にし、作成したプライマーを用いた degenerate PCR 法、Nest PCR 法及び RACE 法による単離を行った。

【結果及び考察】投与実験の結果、生成効率に関して差があるが、キケマンとオウレンで生合成系に種特異性の大きな差は見られないことが明らかとなった。一方、1-benzyltetrahydroisoquinoline 型アルカロイドの *O*-methyl 化に 4'-OMT、6-OMT が関与していることが示唆された。オウレン組み換え酵素を用いた酵素活性測定の結果もこの推測を裏付けた。生成効率の差を明らかにするため、ムラサキケマンの OMT を degenerate PCR 法、Nest PCR 法により単離した。得られた部分配列のアミノ酸配列から同配列がケシの 4'-OMT のアミノ酸配列と極めて相同性の高い配列であることが分かった。現在、全長配列を試みており、酵素活性測定により 4'-OMT の種特異性を検討する予定である。