

氏名	さい とう しげ き 齋 藤 茂 樹
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1521 号
学位授与の日付	平成 17 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	農学研究科応用生命科学専攻
学位論文題目	Studies on (+)-Abscisic Acid 8'-Hydroxylase, a Key Enzyme in the Catabolism of Abscisic Acid (アブシジン酸不活性化酵素, アブシジン酸 8'-位水酸化酵素に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 坂田 完三 教授 矢崎 一史 教授 宮川 恒

論 文 内 容 の 要 旨

アブシジン酸 (ABA) はセスキテルペン型植物ホルモンであり, 種子の登熟, 休眠, 発芽, 気孔の開閉, 環境ストレスへの適応等に関与する。これらの生理現象は内生 ABA 量により調節されるので, 生合成と代謝 (不活性化) のバランスが非常に重要となる。これまでシロイヌナズナやトウモロコシを中心とした様々な突然変異体の解析から ABA 生合成に関わる酵素・遺伝子の多くが特定され, 主要な生合成経路がほぼ確定している。一方, ABA の不活性化は, 8'-位への水酸基の導入とそれに続く環化による (-)-ファゼイン酸 (PA) の形成, そしてジヒドロファゼイン酸 (DPA) への還元によりなされる。不活性化の第一段階である ABA の 8'-位水酸化は一原子酸素添加酵素であるシトクロム P450 (P450) によって触媒されることが知られているが, 関与する酵素・遺伝子は特定されていない。これは植物には P450 遺伝子が多いため (モデル植物のシロイヌナズナゲノム上には全ゲノム遺伝子の約 1% に相当する 246 分子種もの P450 遺伝子が存在する), これらの中から特定の機能を同定することが困難なためである。本論文では, 植物 P450 遺伝子の進化系統樹解析と各種植物ホルモンに対する発現応答から ABA 不活性化に関わる P450 遺伝子を推定し, 生化学的手法により ABA 8'-位水酸化酵素遺伝子の単離同定を行った。また, ABA 8'-位水酸化酵素の阻害剤探索を行い, これまでジベレリン (GA) 生合成阻害剤として知られているウニコナゾール-P が ABA 8'-位水酸化酵素活性を強く阻害することを確認したものであり, その内容は以下のようにまとめられる。

1) 植物 P450 遺伝子の分子進化解析の結果, ABA と同じテルペン型植物ホルモンであるブラシノステロイド (BR) や GA 生合成に関わる P450 遺伝子が, 85 clan でクラスターを形成していることが判った。また, 85 clan の P450 遺伝子のうち *CYP707A* 遺伝子の発現レベルは ABA 処理により顕著に増加することが RT-PCR の結果判った。植物を ABA 処理すると過剰な ABA を不活性化するために ABA 8'-位水酸化酵素活性が上昇することが知られており, このことから *CYP707A* が ABA 8'-位水酸化酵素であると予想した。

2) *CYP707A1* および *A3* cDNA をシロイヌナズナ cDNA ライブラリーから, *CYP707A2* および *A4* cDNA を RT-PCR によりそれぞれ単離し, バキュロウィルス-昆虫細胞発現系を用いて組換え酵素を作製した。*CYP707A* を発現している昆虫細胞に (+)-ABA を投与したところ, 微量の 8'-ヒドロキシ ABA (8'-OH ABA) とそれが異性化して生じる PA が検出され, *CYP707A* が ABA を代謝することが明らかとなった。

3) *CYP707A3* を発現させた昆虫細胞からミクロソームを調製し本酵素の特性を調べた結果, 本酵素は補酵素として NADPH を要求すること, 非天然型である (-)-ABA を基質としないことが明らかとなった。組換え *CYP707A3* 酵素の (+)-ABA に対する速度論定数は, $K_m=1.3 \mu\text{M}$, $k_{cat}=15 \text{ min}^{-1}$ であり, (+)-ABA を効率的に代謝することが確かめられた。

4) *CYP707A* が 8'-OH ABA から PA への異性化反応も触媒するかどうかを調べた。高濃度 (2 mg/mL) に *CYP707A3* ミクロソームを含む反応液を直接 HPLC 分析したところ, 8'-OH ABA が PA よりも多く生成していることが

判った。このことから CYP707A が ABA 8'-位水酸化反応のみを触媒し、8'-OH ABA から PA への異性化を触媒しないことが直接的に示された。

5) 可溶化した CYP707A3 ミクロソームに (+)-ABA を添加したところ、基質結合スペクトル (Type I 差スペクトル) が観測され、濃度依存的に (+)-ABA と結合することが判った ($K_s=3.5 \mu\text{M}$)。また代謝産物が確認できなかった (-)-ABA では Type I 差スペクトルも観測されず、酵素の基質として認識されないことが確かめられた。

6) RT-PCR を行ったところ、CYP707A ファミリーの全てが花、蕾で、また CYP707A2 は茎でも、CYP707A3 はロゼット葉と根でも、それぞれ強く発現していることが判った。さらに CYP707A ファミリーの全てが高塩類、高浸透圧、乾燥ストレスで誘導されることが明らかとなった。

7) CYP707A 特異的阻害剤の設計を目指し、市販 P450 阻害剤の中からリード化合物の探索を行った。昆虫細胞で発現させた CYP707A3 ミクロソームを用いて市販 P450 阻害剤をスクリーニングした結果、パクロブトラゾール、テトシクラシス、ウニコナゾール-P が強い阻害活性を示した。5 μM (+)-ABA 存在下における IC_{50} 値はそれぞれ 3000, 370, 67 nM であった。特にウニコナゾール-P は K_i 値 8.0 nM を示し、本酵素の強力な阻害剤であることが明らかになった。

8) ウニコナゾール-P が植物体内でも ABA 8'-位水酸化酵素活性を阻害するかどうかを調べた。シロイヌナズナをウニコナゾール-P で処理したところ、内生 ABA 量の増加がみられた。また、乾燥ストレスを与えたところ、対照区と比較して強い耐性が認められた。この乾燥耐性は GA を同時に与えた場合にも観察され、このとき内生 ABA 量は増加し PA 量は減少していた。このことからウニコナゾール-P は ABA 8'-位水酸化酵素による ABA 不活性化を *in vivo* でも強く阻害していることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

植物 P450 遺伝子の進化系統樹解析と各種植物ホルモンに対する発現応答の組み合わせから ABA 不活性化 P450 遺伝子を予想し、CYP707A が ABA の不活性化の鍵酵素であることを生化学的実験により証明した。本酵素が高塩、高浸透圧、乾燥ストレス条件下において速やかに誘導されることを示した。また、ジベレリン (GA) 生合成阻害剤としてこれまで知られて来たウニコナゾール-P が ABA 8'-位水酸化酵素の強力な阻害剤であることを明らかにした。そしてウニコナゾール-P 処理したシロイヌナズナが ABA を蓄積し、乾燥耐性を示すことを確認した。したがって、本研究はこれまで同定の待ち望まれていた ABA 8'-位水酸化酵素遺伝子を単離同定し、その酵素学的解析と、応用に向けた基礎的実験が行われたものであり、評価される主な点は以下の通りである。

1) 植物生理学的に報告が待ち望まれていた ABA の不活性化を行う P450 遺伝子を同定した。ABA の生理機能は内生 ABA 量により制御されるため、生合成と代謝 (不活性化) のバランスが非常に重要であると考えられている。本酵素の同定によりこれまで不明な点の多かった内生 ABA 量の調節の仕組みを分子レベルで解明することが可能となった。

2) 本酵素に関する詳細な速度論データを報告するとともに、ABA 8'-位水酸化酵素が (+)-ABA のみを基質とし (-)-ABA を基質としないこと、および 8'-OH ABA から PA への異性化は触媒しないことを証明した。

3) 本酵素が高塩、高浸透圧、乾燥ストレス条件下において速やかに誘導されることを示した。この結果はストレス応答において ABA 内生量が生合成と代謝の微妙なバランスの上に成り立っていることを示すとともに、本酵素がストレス耐性作物の創出・育成の標的酵素として有望なものであることを示している。

4) これまで GA 生合成阻害剤として様々な生理学的実験に用いられて来たウニコナゾール-P が、ABA 8'-位水酸化酵素の強力な阻害剤であることを明らかにし、ウニコナゾール-P 処理による表現型の解釈に ABA の蓄積という視点を与えた。

5) ABA 8'-位水酸化経路が乾燥ストレス条件下の主要な ABA 不活性化経路であることを明らかにした。ABA の不活性化経路には CYP707A の関与する ABA 8'-位水酸化経路の他に 7'-位水酸化経路や配糖体化経路など複数の経路が知られているが、ウニコナゾール-P 処理したシロイヌナズナに乾燥ストレスを与えたところ、内生 ABA 量が増加し、代謝産物である PA 量が減少したことから、乾燥ストレス条件下では主に ABA 8'-位水酸化経路で ABA が不活性化されることが示された。

6) CYP707A の阻害剤が植物生長調節剤として有効であることを示した。ウニコナゾール-P 処理したシロイヌナズナは ABA を蓄積し、葉からの水分蒸散を抑え、乾燥耐性を示した。この結果は、本酵素がストレス耐性作物の創出・育成の標的酵素として有望なものであることを示すとともに、本酵素を標的とした阻害剤が植物に乾燥耐性を付与する新規植物生長調節剤となる可能性を示唆している。

7) 植物二次代謝産物の生合成・代謝に関わる P450 遺伝子は表現型として現れ難いので、突然変異体を用いたスクリーニングから目的とする P450 遺伝子を単離同定することは困難である。本研究ではゲノム情報を活用し、進化系統樹解析や遺伝子発現解析から CYP707A の機能の推定を行い、生化学的手法によりその機能を証明した。このことはゲノム情報を活用したスクリーニングが P450 遺伝子の機能解析を進める上で有効な手段であることを示す結果である。

以上のように、本論文は種類が多いために同定の困難な植物 P450 遺伝子の中から、ABA 不活性化に関わる P450 遺伝子を進化系統樹解析と各種植物ホルモンに対する発現応答を用いて推定し、そのうちシロイヌナズナの CYP707A が (+)-ABA 8'-位水酸化酵素であり、内生 ABA 量の調節の鍵酵素であることを明らかにした。また、ABA 8'-位水酸化酵素を標的とする阻害剤が、ABA 生理機能の解明や農業分野への応用に有効であることを示唆した。これらの点で本論文は、植物生理学、植物生化学、ならびに酵素化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成17年4月19日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。