

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	異 奏
論文題目	薬用植物ムラサキのシコニン生産系をモデルとした脂質分泌機構の研究		
(論文内容の要旨)			
<p>植物は自らをとりまく環境に適応するため、個々に特徴的な生存戦略を獲得してきた。その代表例が、複雑な化学構造を有する二次代謝産物の生合成能力である。これら二次代謝産物が的確にその生理機能を発揮するためには、厳密な時空間的制御が重要であり、実際多くの植物において二次代謝産物は、決められた細胞・組織に輸送、あるいは蓄積されるようプログラムされている。しかし、これら高度に制御された輸送・蓄積の分子機構は未だに不明な点が多い。特に脂溶性物質の蓄積機構は、液胞に蓄積する多くの水溶性代謝産物に比して、知見が少ないのが現状である。</p> <p>薬用植物ムラサキ (<i>Lithospermum erythrorhizon</i>) は、根の表皮細胞で脂溶性のナフトキノン系赤色色素であるシコニンを生産し、細胞外に分泌する。本研究では、ムラサキの培養細胞と毛状根を用い、高いシコニン生産性と視認性、さらに光照射や培地成分など明確な生産制御因子が知られている利点を活かし、シコニン生産系を分泌型脂溶性二次代謝産物のモデルと位置づけ、その輸送機構の解明を目的とした。</p>			
<p>1. ムラサキのシコニン生産系においては、種々のオミクス解析を組み合わせることで、シコニンの生合成および分泌に関与することが期待される候補遺伝子がリストアップされている。その一方で、高効率の遺伝子導入法が従前確立されておらず、分子生物学的アプローチによる研究推進の障壁となっていた。そこで、これら遺伝子のシコニン生産系における機能を解析評価するために、ムラサキを用いた高効率の安定形質転換系の確立を目指した。遺伝子を導入するためのキャリアとしては、国内の関連機関との共同研究展開も視野に入れ、国産の菌である <i>Rhizobium rhizogenes</i> A13株を選定し、ムラサキ無菌シュートから毛状根を誘導することで、外来遺伝子を約60%の効率で導入する手法を確立した。さらに、導入した遺伝子の転写誘導系として、デキサメタゾンおよびエストラジオールを用いた発現誘導系をムラサキ毛状根において構築することで、クローン間によってばらつきが大きいシコニン生産を同一クローン内で定量し、標的遺伝子の寄与を精度よく評価することが可能となった。今後、本手法を用いることによって、分子遺伝学的なアプローチによるシコニンの生合成酵素の生化学的機能、ならびに輸送因子の分子実態が解明されることが期待される。</p> <p>2. シコニンを生産・分泌する際に起こる細胞内イベントを明らかにするために、ムラサキ毛状根を用いて以下の一連の解析を行った。まず、シコニンの輸送経路のスタート地点を明らかにすべく、既知のシコニン生合成酵素 LePGT (<i>p</i>-hydroxybenzoate geranyltransferase) の細胞内局在解析を行った。その結果、小胞体への局</p>			

在が認められ、シコニンの基本炭素骨格を形成する反応は小胞体で行われることが示唆された。さらに、ムラサキ毛状根の電子顕微鏡観察から、シコニン生産が特異的に認められる細胞層である表皮細胞において、小胞体が顕著に発達することを見出した。これらの結果を従前の細胞外分泌研究の知見と合わせて解釈すると、シコニンはその輸送過程で小胞体の持つ分泌機能を利用して、細胞外へ放出されていることが推測された。シコニンは疎水性物質であり、細胞内では油滴状のコンパートメントに局在する。そこで、シコニンが小胞体から蓄積部位であるアポプラストへ輸送される経路において、どのようなタンパク質因子が関与するかを明らかにするため、小胞輸送の中でも細胞外方向へ向かうエキソサイトーシスに着目し、ムラサキ毛状根を用いてシコニン分泌に影響を与える阻害剤を調べた。その結果、ARF/GEFの阻害剤である brefeldin A (BFA) をムラサキ毛状根に処理した際にシコニン分泌が抑えられ、その自家蛍光がBFAボディと思われる細胞内構造に蓄積した。また一方で、アクチン重合阻害剤である cytochalasin D を処理した場合には、シコニン分泌が抑制されるとともに、細胞内に一様にシコニンが蓄積する様子が観察された。これらの結果から、シコニンは、少なくとも部分的に膜交通経路の一種であるエキソサイトーシス経路を共有して、アクチンフィラメント依存的に細胞外へと分泌されることが示唆された。

3. 本項では、化合物としてのシコニンがその疎水性から水系の溶媒中では速やかに結晶化し、固体として沈殿するのに対し、細胞から分泌されたシコニンは、細胞膜の外側あるいは細胞壁表面に赤い油滴として蓄積することに着目し、その蓄積に関与する脂質分子を明らかにすることを目指した。上記のシコニンの特性を考慮すると、細胞外に分泌されるためには何らかのマトリクス脂質が共存すると予測された。さらに前項で得られた膜交通経路に関する知見と併せて考えると、シコニンの細胞外分泌は、ムラサキ細胞内の脂質代謝と密接な関連を持っていることが推測された。そこでムラサキ培養細胞を用いて詳細な脂質分析を行なった。シコニン生産時あるいは非生産時におけるムラサキの脂質プロファイルをLC-MSにより網羅的に比較するリポドーム解析、ならびにGC-FIDを用いた詳細な定量分析の結果から、シコニンとともに細胞外へ輸送される脂質分子を同定した。さらに、シコニン存在下 *in vitro* でリポソームを作成することで、実際にマトリクス脂質がシコニンを可溶化し、赤色のリポソームを形成することを示した。これら一連の解析から、シコニンの細胞外蓄積に関与する脂質動態を明らかにした。

注)論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

植物は環境ストレスに適応する機能の一つとして、自らを守る種々の代謝産物を生合成し、特に疎水性物質に関しては組織の最外層に蓄積するという生存戦略を発達させてきた。しかし、脂溶性物質が細胞外に分泌される現象は数多く知られながら、それがどのようなマシナリーにより輸送・分泌されているのか、その分子実態には不明な点が多い。本論文は、薬用植物ムラサキの脂溶性色素であるシコニンの生産系を用いて、その分泌機構を生化学的かつ細胞生物学的に解析した一連の研究成果をまとめたものである。本論文の評価すべき点は以下のとおりである。

1. 薬用植物ムラサキにおいて毛状根の系による安定形質転換法を構築した。本手法の特徴として、国内における制限の少ない国産の*Rhizobium rhizogenes* A13株を用いてムラサキから高効率で毛状根を発生させたこと、また約60%という高い遺伝子導入効率を達成したことが挙げられる。さらにこの系を利用し、ムラサキにおいて転写誘導系を構築したことで、標的遺伝子の機能を同一クローン内で精度よく評価することを可能とした。
2. シコニン生合成における鍵酵素の細胞内局在解析、およびムラサキ毛状根の電子顕微鏡解析からシコニン生産・分泌系における小胞体の重要性を示した。また、阻害剤実験により小胞体で生合成されたシコニンが、エキソサイトーシスと一部共通の経路を利用して、アクチンフィラメント依存的に細胞外に分泌されることを明らかにした。
3. シコニンの疎水性物質としての特徴から、その細胞外分泌にはマトリクス脂質の共存が必要との仮説を立て、網羅的脂質分析ならびに *in vitro* におけるリポソーム再構成系の実験により、シコニンの分泌において重要な役割を果たす脂質を同定し仮説の実証を行った。

以上のように、本論文は分泌脂質であるシコニンの細胞外輸送機構の分子メカニズムの一端を明らかにし、従前陸上植物が普遍的に有しながらこれまで不明な点の多かった脂質の細胞外分泌機構に新規な知見を与えた。これらの成果は、植物生理学、代謝生化学、及び細胞生物学の発展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、令和2年2月7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。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）