

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	山田 泰之
論文題目	イソキノリンアルカロイド生合成系に特徴的な bHLH 型転写因子の機能解析		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>高等植物が生産するアルカロイドは、生産する植物種が限定され、その生合成系の発現制御に関する知見は少ない。オウレンが生産するイソキノリンアルカロイド (IQA)、ベルベリンの生合成系は比較的よく解析されており、WRKY 型転写因子 (CjWRKY1) と bHLH 型転写因子 (CjbHLH1) の 2 種類が機能していることが報告されているが、CjbHLH1 によるベルベリン生合成系の制御の詳細は不明であった。本研究では、動植物に広く一般的な bHLH 型転写因子の IQA 生合成系における機能とその制御機構を明らかにすることを目的に、第 1 章でオウレンの CjbHLH1、第 2 章でハナビシソウの CjbHLH1 ホモログの詳細な解析を行った。</p> <p>第 1 章では、<i>CjbHLH1</i> ホモログの BLAST 検索の結果から、IQA 産生植物種にのみ <i>CjbHLH1</i> ホモログが広く分布していることを明らかとした。また、ベルベリン高生産性の培養細胞 156-S 株のプロトプラストを用いた <i>CjbHLH1</i> の一過的過剰発現がベルベリン生合成酵素遺伝子の発現に及ぼす影響を経時的に解析し、<i>CjbHLH1</i> 導入 6 時間後において生合成酵素遺伝子群の発現が上昇することを認めた。いくつかの生合成酵素遺伝子プロモーターを用いた一過的ルシフェラーゼレポーターアッセイでも同様に CjbHLH1 の転写促進活性が認められ、CjbHLH1 が転写活性化因子として機能していることが示された。また、細胞内局在性の解析から CjbHLH1 が核に移行し機能していること、CjbHLH1 抗体を用いたクロマチン免疫沈降により CjbHLH1 がいくつかの生合成酵素遺伝子プロモーターに直接結合し、転写を促進していることが明らかとなった。さらに、<i>CjbHLH1</i> 遺伝子がメチルジャスモン酸 (MeJA) に対する応答性を示すことから、CjbHLH1 がジャスモン酸 (JA) シグナル伝達系で機能する転写因子であることを示唆した。一方、JA シグナル伝達系の中心的役割を担うと報告されている MYC2 と CjbHLH1 の構造は大きく異なり、オウレンには MYC2 とは別に、CjbHLH1 を介した JA シグナル伝達経路が存在する可能性が示唆された。</p> <p>第 2 章では、IQA 産生植物種に特徴的な CjbHLH1 ホモログの機能を、代謝工学に適したハナビシソウを用いて解析した。ハナビシソウから 2 種類の CjbHLH1 ホモログ、<i>EcbHLH1-1</i>、<i>EcbHLH1-2</i> を単離するとともに、これらがともに核に移行すること、サンギナリン生合成酵素遺伝子プロモーターを用いた一過的発現系において転写促進活性を有することを明らかとし、<i>EcbHLH1</i> が CjbHLH1 の機能的なホモログとして、冗長的にサンギナリン生合成系を制御している可能性を示唆した。一方、組織別発現解析の結果から、両遺伝子の発現組織の違いが明らかとなった。そこで、RNAi により <i>EcbHLH1-1</i>、<i>EcbHLH1-2</i> 遺伝子の特異的発現抑制を行った。RNAi 株におけるサンギナリン生合成酵素遺伝子の発現量やサンギナリン蓄積量を解析し、<i>EcbHLH1</i> の発現抑制により、一部の生合成酵素遺伝子の発現抑制の傾向を認めた。さらに、それぞれの遺伝子発現量、サンギナリン蓄積量を相関解析した結果、<i>EcbHLH1-2</i> の発現量とサンギナリンの蓄積量、ならびに、一部のサンギナリン生合成酵素遺伝子の発現量との間に有意な相関性を認めた。また、<i>EcbHLH1-1</i> の発現量と一部のサンギナリン生合成酵素遺伝子の発現量との間にも相関性を認め、<i>EcbHLH1-2</i> とともに <i>EcbHLH1-1</i> も IQA 生合成系の制御因子として機能していると推測した。</p> <p>以上の結果から、CjbHLH1 ホモログが IQA 生合成酵素遺伝子の発現調節を介して IQA 産生を制御していることを示唆した。本研究において明らかとなった IQA 産生植物種に特徴的な bHLH 型転写因子は、IQA 生合成系の分子進化と多様性を理解する上で重要であると考えられる。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

高等植物は様々な二次代謝産物を産生するが、アルカロイドは生産する植物種が限定され、その生合成系の発現制御に関する知見は少ない。本研究では、研究が進んでいるオウレンにおいて単離されていた bHLH 型転写因子 (CjbHLH1) について、その IQA 生合成系における機能とその制御機構を明らかにすることを目的に、オウレン、ならびにハナビシソウの CjbHLH1 ホモログの詳細な解析を行ったものであり、以下のような価値ある新規な知見をえている。

1) *CjbHLH1* ホモログが IQA 産生植物種にのみ局在していることを明らかとするとともに、*CjbHLH1* の一過的過剰発現系を用いて、CjbHLH1 の転写促進活性を直接証明した。

2) 細胞内局在性の解析から CjbHLH1 が核に局在していることを示すとともに CjbHLH1 抗体を用いたクロマチン免疫沈降により CjbHLH1 がいくつかの生合成酵素遺伝子プロモーターに直接結合し、転写を促進していることを明らかにした。

3) *CjbHLH1* 遺伝子のメチルジャスモン酸 (MeJA) 応答性を示し、従来知られていた JA シグナル伝達系の中心的因子 MYC2 とは構造的に異なる CjbHLH1 が JA シグナル伝達経路に関与する可能性を示唆した。

4) ハナビシソウから 2 種類の CjbHLH1 ホモログ、*EcbHLH1-1*、*EcbHLH1-2* を単離するとともに、核局在性、サンギナリン生合成酵素遺伝子プロモーターを用いた転写促進活性を明らかにした。

5) *EcbHLH1-1*、*EcbHLH1-2* 遺伝子の組織別発現解析から、両遺伝子の発現組織が異なることを明らかにし、その機能的役割分担の可能性を示唆した。

6) RNAi 法により *EcbHLH1-1*、*EcbHLH1-2* 遺伝子の特異的発現抑制を行うとともに、サンギナリン生合成酵素遺伝子の発現量やサンギナリン蓄積量への影響を解析した結果、*EcbHLH1-2* の発現量と一部のサンギナリン生合成酵素遺伝子の発現量、さらには、サンギナリンの蓄積量との間に有意な相関性があることを認めた。また、*EcbHLH1-1* の発現量と一部のサンギナリン生合成酵素遺伝子の発現量との間にも相関性を認め、*EcbHLH1-2* とともに *EcbHLH1-1* も IQA 生合成系の制御因子として機能していると推測した。

以上、IQA 生合成系の転写調節に関わる因子として、CjbHLH1 ならびに *EcbHLH1* の機能と局在を詳細に解析し、その役割を明らかにした。また、CjbHLH1 と *EcbHLH1-1* *EcbHLH1-2* の機能的な分化についても明らかとし、植物の二次代謝研究、有用物質生産系の理解と制御に貢献するところが大きい。

なお、本論文は、植物の天然物代謝研究において重要な生命科学に関する高度で幅広い学識と、申請者の優れた研究能力に裏打ちされ、生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見を論理的かつ一貫性をもって記述しており、博士 (生命科学) の学位論文として価値あるものと認めた。

また、平成 26 年 10 月 1 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、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。(ただし、学位規則第 8 条の規定により、猶予期間は学位授与日から 3 ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 平成 27 年 2 月 24 日