

薬用植物ムラサキのシコニン生合成を担う 4-クマロイル CoA リガーゼに関する研究

中西 浩平

2024

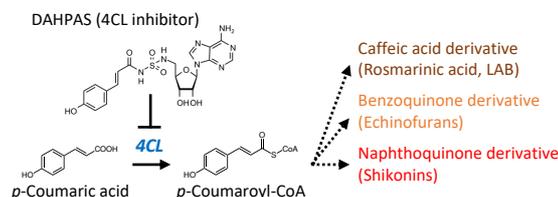
序論

植物は固着生活を営むため、発芽したその場所で一生を終える。故に、様々な環境ストレスや食害から身を守り、また繁殖するための生存戦略として植物特有の代謝機能(二次代謝または特化代謝と呼ぶ)を獲得してきた。植物二次代謝に由来する多様な代謝産物の種類は 100 万種にも及ぶと言われ、植物内で生合成された後、特定の部位に蓄積、あるいは組織外に分泌されることにより、環境中の微生物や昆虫、または他植物との高度なコミュニケーションツールとして重要な役割を果たしている。一方で、ヒトに対して有用性を持つ化合物も多く、医薬品や香料、嗜好品、天然色素などとして人々の生活において古くから利用され、また活発な研究の対象にもされてきた。

植物の二次代謝産物は、生合成経路と構造上の特徴からフェノール類、テルペノイド類、アルカロイド類の 3 つのグループに大別される。特に、フェノール性化合物の中には植物の生長に密接に関わるものも多く、それらの多様な代謝経路の上流に位置するのがフェニルプロパノイド経路である。4-Coumaroyl-CoA ligase (4CL) は、フェニルプロパノイド誘導体の生合成において共通に関わる酵素ファミリーである。薬用植物ムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon*) の根が特異的に生産する二次代謝産物のシコニン誘導体(以下、シコニンと称す)は、フェニルアラニン由来の *p*-hydroxybenzoic acid を重要中間体として生合成されることから、シコニン生合成への 4CL の関与が予想されてきた。しかしながら、その関与を実験的に示した例はなく、また、ムラサキゲノムには少なくとも 8 コピーの 4CL 遺伝子が保存されており、それぞれの機能特性や役割分担は十分に明らかにされていない。そこで本研究では、シコニン生合成を担う 4CL 遺伝子の同定およびムラサキ二次代謝における役割分担の解明を目的とした。

第1章 ムラサキ二次代謝における 4-coumaroyl-CoA ligase の機能解析

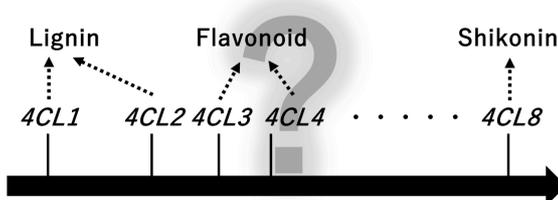
ムラサキ二次代謝には、4CL を介して合成される二次代謝産物として、シコニン以外にもエキノフラン誘導体やカフェー酸誘導体 (ロスマリン酸、リトスペルミン酸 B) が存在する。そこで本章では、4CL



活性の強力な阻害剤である *N*-(5'-deoxyadenosin-5'-yl)-*N'*-[(*E*)-3-(4-hydroxyphenyl)acryloyl]sulfamide を用いたムラサキ培養細胞への投与実験により、ムラサキ二次代謝全般における 4CL の機能解析を行った。

第2章 ムラサキのシコニン生合成を担う 4-coumaroyl-CoA ligase の探索と機能特性

本章では、ムラサキゲノムに保存されている 8 コピーの 4CL 遺伝子からシコニン生産に貢献するメンバーを同定すべく、シコニン生産の誘導条件と同調した発現プロファイルを示す 4CL 遺伝子を絞



り込んだ結果、3つの候補遺伝子が見出された。そこで、分子系統解析および細胞内局在解析から、それら3遺伝子がコードするタンパク質の機能特性を解析した。

第3章 ムラサキゲノム編集系の確立とシコニン生合成を担う 4-coumaroyl-CoA ligase の同定

本章では、候補として見出された3つの 4CL 遺伝子をターゲットに、シコニン生合成を担うメンバーを同定すべく、CRISPR/Cas9 による変異導入を利用したゲノム編集毛状根を作製し、導入された変異のパターンを次世代シーケンス解析により同定した。次いで、各ゲノム編集毛状根におけるシコニン生産量を定量し、ベクターコントロールと比較することで、シコニン生産を担うメンバーを同定した。また、代謝物解析では第1章と同様に、エキノフラン誘導体およびカフェー酸誘導体の生産量に対する影響も解析した。