

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	中西 浩平
論文題目	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		
(論文内容の要旨)			
<p>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。植物の4-coumaroyl-CoA ligase (4CL) は、多様なフェニルプロパノイド誘導体の生合成に関わる重要な酵素ファミリーである。薬用植物ムラサキ (<i>Lithospermum erythrorhizon</i>、ムラサキ科) が、根特異的に生産するナフトキノン系二次代謝産物のシコニン誘導体 (以下、シコニンと表記する) は、フェノールカルボン酸誘導体の<i>p</i>-hydroxybenzoic acid (PHB) を重要中間体として生合成されることから、4CLがシコニン生合成に関与すると推定されてきた。しかしながら、その推定を実験的に示した例はなく、またムラサキゲノム上には少なくとも8個の4CL遺伝子が存在しており、各4CLメンバーの生理的な役割分担は明らかにされてこなかった。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、およびシコニンを含むムラサキ二次代謝における機能分担の解明を目的とし、下記の研究を行った。</p>			
1. 第1章では、シコニン生合成への4CLの関与を実験的に示すことを目的に、4CLの反応中間体をミミックした特異的阻害剤である <i>N</i> -(5'-deoxyadenosin-5'-yl)- <i>N'</i> -[(<i>E</i>)-3-(4-hydroxyphenyl)acryloyl]sulfamide (DAHPAS) を用いたムラサキ培養細胞への投与実験を行った。ムラサキ培養細胞はシコニンに加えて、ベンゾキノン系のメロテルペン誘導体であるエキノフラン類と、さらにフェニルプロパノイド経路に由来する代謝産物として数種のカフェー酸誘導体を高生産するため、それら多様な代謝産物を一斉に分別定量可能な高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) の分析系を確立した。これを利用して、DAHPAS投与による代謝物生産への影響を解析した結果、シコニン生産に対する濃度依存的な阻害効果が認められ、他のフェニルプロパノイド誘導体に対する同様の生産阻害も認められた。また、DAHPAS存在下においてメロテルペン生合成の中間体であるPHBの添加実験を行った結果、シコニン生産の回復は認められなかった一方で、シコニンと共通の生合成中間体である3''-hydroxygeranylhydroquinone (GHQ-3''-OH) から分岐するエキノフラン生産の回復が認められた。これらの結果から、4CLがムラサキ二次代謝において直接的な関与を果たしており、少なくともシコニン生合成中間体のGHQ-3''-OHの生成に関与することを <i>in vivo</i> で明らかにした。			
2. 第2章では、ムラサキゲノム上に存在する8個の4CL遺伝子のうち、どの4CL遺伝子がシコニン生産を担うかを特定するため、発現プロファイル解析から候補遺伝子を絞り込んだ。シコニンはムラサキの根のみで特異的に生産され、その生産は			

光照射によって強く抑制される。また、ムラサキ科においてはシコニンを生産する種と全く生産しない種が存在する。そこで、これらの特徴に着目し、8個の4CL遺伝子の発現プロファイルを解析評価した結果、*Le4CL3*および*Le4CL4*がシコニン生産と密接に同調した発現プロファイルを示すことが明らかとなった。これら2遺伝子に加え、シコニン生産の場である根での発現が顕著に高かった*Le4CL5*も次段階の解析候補として加えた。植物4CLの分子系統解析から、*Le4CL3*および*Le4CL4*がシロイヌナズナにおいてユビキノン代謝に寄与するとされるクレードに分類され、*Le4CL5*はリグニン代謝に寄与するとされるclass I に分類されることを見出した。さらに、緑色蛍光タンパク質を利用した細胞内局在解析により、*Le4CL3*および*Le4CL4*がペルオキシソームに局在することを明らかにした。一方、*Le4CL5*はサイトゾル局在であることを示唆した。

3. 第3章では、絞り込んだ3個の4CLメンバーのシコニン生産に対する関与を明らかにすべく、それぞれを標的としたゲノム編集毛状根を作製することとした。これまでムラサキでは、ゲノム編集を利用した表現型解析の報告例がなかったため、まずCRISPR/Cas9システムを利用した標的遺伝子への変異導入によるゲノム編集毛状根の作製方法を確立した。次いで、作製したゲノム編集毛状根ラインにおいて、シコニンなど一連の代謝物の生産性を解析したところ、*Le4CL3*および*Le4CL4*のゲノム編集ラインにおいて、空ベクター導入の対照毛状根と比較してシコニン生産量が顕著に減少することを示した。一方で、*Le4CL5*のゲノム編集ラインでは、シコニン生産の有意な減少を示さなかった。また、シコニンの生合成中間体であるPHB、および4CLの基質である*p-coumaric acid*を用いた相補試験を*in vivo*で行ったところ、*Le4CL3*および*Le4CL4*のゲノム編集ラインに対するPHB投与によりシコニン生産が回復し、*p-coumaric acid*の投与では回復しないことを示した。以上の結果から、ペルオキシソーム局在型である*Le4CL3*および*Le4CL4*がシコニン生産を担う4CLであることを明らかにした。

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)

薬用植物ムラサキが生産する種特異的な二次代謝産物のシコニン¹は、医薬品や天然色素として長年利用されてきた有用物質であるが、その生合成経路の全容は明らかになっていない。本論文は、シコニン生合成の重要前駆体であるPHBの供給経路に着目し、フェニルプロパノイド系路の4CLに対する特異的阻害剤を用いた*in vivo*解析、シコニン生産の特徴を利用した発現プロファイル解析、候補として絞り込んだ4CL分子の細胞内局在、およびゲノム編集技術を利用した表現型の解析における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通りである。

1. 4CLの特異的阻害剤を用いたムラサキ培養細胞への投与実験から、ムラサキにおけるPHB生合成に4CLが直接関与し、本酵素がシコニンはじめとする多様なムラサキ二次代謝産物の生合成において、極めて重要な役割を果たしていることを*in vivo*で示した。
2. ムラサキゲノム上に8個存在する4CL遺伝子のうち、シコニン生産と同調した発現プロファイルを示す3個の4CL遺伝子を見出した。分子系統解析および細胞内局在解析から、その内ユビキノン生合成遺伝子のクレードに分類されたLe4CL3およびLe4CL4がペルオキシソーム局在であること、またリグニン生合成遺伝子のクレードに分類されたLe4CL5はサイトゾルに局在すること明らかにした。
3. 絞り込んだ3個の4CL遺伝子のシコニン生産に対する関与を*in vivo*で明らかにすべく、ムラサキにおいて報告例のなかったCRISPR/Cas9によるゲノム編集の実験系を確立した。それぞれ3個の4CL遺伝子を標的としたゲノム編集毛状根を作製し、そのシコニン生産量の比較解析から、ペルオキシソーム局在型のLe4CL3およびLe4CL4が、シコニン生産を担う4CLであることを明らかにした。

以上のように本論文は、生化学、分子生物学、遺伝子工学的解析を通して、ムラサキが有する複数の4CL遺伝子のうち、種特異的な二次代謝産物であるシコニンの生産を担う4CLメンバーを特定し、ムラサキ二次代謝において、4CLが発現プロファイルおよび細胞内局在の違いにより機能分担していることを解明したものである。本論文の成果は、植物代謝生化学、植物生理学、および分子細胞生物学研究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6年1月24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)