

氏 名	か とう のぶ ひこ 加 藤 伸 彦
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 108 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 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	生 命 科 学 研 究 科 統 合 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	イソキノリンアルカロイド生合成系を制御する転写制御因子 <i>CjWRKY1</i> 遺伝子の同定と機能解析

論文調査委員	(主 査) 教 授 佐 藤 文 彦	教 授 河 内 孝 之	教 授 荒 木 崇
--------	----------------------	-------------	-----------

論 文 内 容 の 要 旨

細胞選抜によって確立されたオウレン培養細胞は、抗菌活性を示す有用イソキノリンアルカロイドであるベルベリン (Ber) を多量に生産するが、Ber 高生産性の分子基盤については未解明であった。本研究では、Ber 高生産性オウレン培養細胞を用いて Ber 高生産性の基盤となる Ber 生合成遺伝子の高発現を制御する因子の同定と機能解析を行なった。

第 1 章では、Ber 生産性の異なる培養細胞、植物組織を用いて生合成遺伝子の発現量を Northern 解析し、Ber 生産性と Ber 生合成遺伝子の発現量の間に相関性が認められること、かつ全ての生合成遺伝子が協調的に発現制御されている可能性を示唆する結果を得た。Ber 生合成遺伝子を包括的に制御する因子が存在するとの想定のもと、制御遺伝子を単離する目的で、Ber 高生産株より調製された 1014 クローンの EST 配列から、生合成遺伝子の転写制御に関わると予想される EST を 24 クローン選抜した。さらに、これら EST クローンの発現を Ber 生合成遺伝子の発現と比較し、Ber 生合成遺伝子と正もしくは負の相関を示す EST を 5 つ見い出した。

2 章では、得られた転写制御因子候補遺伝子が実際に Ber 生合成系遺伝子の発現制御に関与することを明らかにするため、オウレン 156-S 株由来プロトプラストを用いた一過的 RNAi 法による解析系の開発を行なった。候補遺伝子に対して合成した 2 本鎖 (ds) RNA を、PEG 法によってオウレンプロトプラストに導入することで、これら転写制御因子候補の発現を効果的かつ特異的に抑制できることを認めた。引き続き、各々の候補遺伝子の発現抑制が Ber 生合成遺伝子 3'-hydroxy *N*-methylcoclaurine 4'*O*-methyltransferase (4'OMT) の発現量に及ぼす効果を解析した結果、多くの候補因子の dsRNA は 4'OMT の発現に効果を示さなかったが、*CjWRKY1* の発現抑制によって、4'OMT 遺伝子の発現量が顕著に低下することが明らかになった。*CjWRKY1* の構造解析により *CjWRKY1* は高度に保存された WRKY ドメインと DNA 結合性の C₂-H₂ 型 zinc finger モチーフをもち、WRKY グループ II-C ファミリーに属するものであることが明らかとなった。さらに、4000 の EST を解析し、同ライブラリー中に存在した *CjWRKY2-4* についても同様に機能解析したところ、4'OMT の発現抑制効果を示すものは *CjWRKY1* のみであることが明らかとなった。

3 章では、*CjWRKY1* による Ber 生合成系遺伝子群の発現制御をより詳細に解析した。その結果、*CjWRKY1* の一過的 RNAi により、解析した全ての Ber 生合成遺伝子の発現量が顕著に低下することが明らかとなった。一方、*CjWRKY1* の一過的 RNAi は、解糖系やチロシンの生合成経路など一次代謝関連遺伝子、あるいは防御遺伝子の発現には影響しなかった。さらに、*CjWRKY1* の過剰発現の効果を検討した結果、*CjWRKY1* の過剰発現によってベルベリン生合成系遺伝子転写産物のみが約 4 ~ 20 倍増大することを認めた。以上、*CjWRKY1* 遺伝子が Ber 生合成遺伝子の発現を特異的かつ包括的に転写制御している可能性が示された。さらに *CYP80B2* 遺伝子のプロモーター：ルシフェラーゼ (LUC) を用いて *CjWRKY1* の活性を解析した結果、*CjWRKY1* の過剰発現により *CYP80B2* プロモーターからの LUC の発現が誘導されることが明らかとなった。

以上のように、これまで研究が困難であった薬用植物の二次代謝の分子生物学的研究において有用な転写制御因子の単離

・解析系を確立するとともに、イソキノリンアルカロイドの1つ Ber 生合成系を包括的、網羅的に制御する転写制御因子として *CjWRKY1* をはじめて単離した。一方、*CjWRKY1* の機能は異なる細胞株においては、効果が異なったことから、イソキノリンアルカロイド生合成系の発現制御には、より複雑な制御ネットワークが存在することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

細胞選抜によって確立されたオウレン培養細胞は、抗菌活性を示す有用イソキノリンアルカロイドであるベルベリン (Ber) を多量に生産するが、Ber 高生産性の分子基盤については未解明であった。本研究では、Ber 高生産性オウレン培養細胞を用いて Ber 高生産性の基盤となる Ber 生合成遺伝子の高発現を制御する因子の同定と機能解析を行なった結果をまとめたものであり、その評価できる内容は以下のとおりである。

- 1) Ber 生産性の異なる培養細胞、植物組織を用いて生合成遺伝子の発現を解析し、Ber 生産性と Ber 生合成遺伝子の発現量の相関性、かつ全ての Ber 生合成遺伝子が協調的に発現制御されている可能性を示している。
- 2) Ber 高生産株より調製された1014クローンの EST 配列、ならびに EST クローンと Ber 生合成遺伝子の発現比較から、生合成遺伝子の転写制御に関わると予想される EST を5つ見い出している。
- 3) 得られた転写制御因子候補遺伝子が実際に Ber 生合成系遺伝子の発現制御に関与することを明らかにするため、オウレン 156-S 株由来プロトプラストを用いた一過的 RNAi 法による解析系を確立している。すなわち、2本鎖 (ds) RNA の導入による標的遺伝子発現の抑制とともに、Ber 生合成遺伝子 3'-hydroxy *N*-methylcoclaurine 4'-O-methyltransferase (4'OMT) の発現量を解析することにより、転写候補遺伝子の機能評価が可能であることを示している。その結果、*CjWRKY1* の発現抑制によって、4'OMT 遺伝子の発現量が顕著に低下することを明らかにしている。
- 4) *CjWRKY1* は高度に保存された WRKY ドメインと DNA 結合性の C₂-H₂ 型 zinc finger モチーフもち、WRKY グループ II-C ファミリーに属するものであり、EST ライブラリーから新たに単離した *CjWRKY2-4* との比較から、4'OMT の発現抑制効果を示すものは *CjWRKY1* のみであることを明らかにしている。
- 5) *CjWRKY1* の一過的 RNAi、ならびに、一過的過剰発現系を用いて、*CjWRKY1* は、解析した全ての Ber 生合成遺伝子の発現量を包括的に制御しうること、一方、解糖系やチロシンの生合成経路など一次代謝関連遺伝子、あるいは防御遺伝子の発現には影響しないことを明らかにしている。
- 6) また、CYP80B2 遺伝子のプロモーター：ルシフェラーゼ (LUC) を用いて、*CjWRKY1* の過剰発現により、WRKY の標的となる W-box を含む CYP80B2 プロモーターからの LUC の発現が誘導されることを明らかにしている。
- 7) さらに、*CjWRKY1* の機能を異なる細胞株において検証し、その効果が異なることから、イソキノリンアルカロイド生合成系の発現制御には、より複雑な制御ネットワークが存在することを示唆している。

以上の結果は、これまで研究が困難であった薬用植物の二次代謝の分子生物学的研究において有用な転写制御因子の単離・解析系を確立するとともに、イソキノリンアルカロイドの1つ Ber 生合成系を包括的、網羅的に制御する転写制御因子として *CjWRKY1* をはじめて単離したものであり、植物分子生理学に寄与するところが大きい。よって、本論文は博士 (生命科学) の学位論文として価値あるものと認めた。

なお、平成19年1月23日、論文内容とそれに関連した分野にわたり口頭試問した結果、博士 (生命科学) の学位を授与される学力が十分にあるものと認めた。