

氏 名	の 野 下 浩 二
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1526 号
学位授与の日付	平 成 17 年 7 月 25 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	農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	コナダニ類の分子系統及びモノテルペン生合成の酵素化学的解析

論文調査委員 (主 査) 教 授 西 田 律 夫 教 授 宮 川 恒 教 授 坂 田 完 三

論 文 内 容 の 要 旨

コナダニ類は後胴体部腺と呼ばれる分泌腺より、モノテルペン、炭化水素、芳香族化合物など多様な揮発物質を分泌する。特に、モノテルペンはフェロモン活性を持つものが多く、コナダニ類の生活環において重要な役割を果たしていると考えられる。これらコナダニ類の分泌成分組成は種特異的であり、種同定に利用できる可能性が示唆されている。一方、コナダニ類は形態的特徴が乏しく、分類に関する基礎的な知見はきわめて少ない。本研究は、分子系統分類、形態分類、分泌化合物を用いた化学分類を統合することにより、系統進化をより反映した分類体系の再構築を目指している。さらに、コナダニ類の系統進化に密接に関連した多様なモノテルペン化合物の前駆体と考えられる neral の生合成経路を明らかにした。また、neral の生合成に関与する geraniol dehydrogenase (GeDH) の酵素化学的諸性質及び一次構造を明らかにした。主な内容は以下の通りである。

第1章では、コナダニ類10科20属49種73検体(産地の異なる同種個体群を含む)について、核内 rDNA 領域の ITS2 領域の塩基配列を決定した(塩基長は 282-592 bp)。その塩基配列は種特異的であり、産地の異なる個体群間で差異は見られなかった。したがって、ITS2 領域はコナダニ類の種同定における有効な指標になり得ることを明らかにした。一方、得られた ITS2 領域の塩基配列をもとに分子系統樹を作成したところ、亜科以下の低次分類群において有効であることが示唆された。

第2章では、コナダニ類6科14属18種について、ITS2 領域よりも保存性の高い核内 rDNA 領域の 18S rDNA 領域を用いて分子系統解析を行い、コナダニ類の高次分類群での分類体系の再構築を行った。18S rDNA 領域を用いた分子系統解析結果と形態形質を比較したところ、脚部先端の歩行器の構造と相関が見られた。土壤中に生息するコナダニ類の歩行器は爪状の構造が発達しており、寄生性のコナダニ類では爪状の構造はなく、吸盤状の構造をしているなど歩行器の構造はコナダニ類が多様な環境へ適応していった結果を反映しているものと考えられる。また、18S rDNA 領域をもとに得られた分子系統樹と分泌化合物のプロフィールを比較したところ、モノテルペン生産能と相関がみられた。モノテルペンにはフェロモンや抗菌活性を持つ化合物が多数含まれ、コナダニ類の生存に重要な役割を持つと考えられる。したがって、歩行器の構造やモノテルペン生産能は、コナダニ類の系統進化を考察する上で重要な形質であることが示唆された。

第3章では、コナダニ類の系統進化を考察する上で重要と示唆されたモノテルペン生産能に着目し、特に、モノテルペンの基本骨格を有する neral の生合成経路を酵素レベルで明らかにした。サトウダニ粗酵素液を用いた結果、まず、geraniol の酸化により、geranial が生成し、次いで、geranial が異性化を受け、neral が生成することが明らかになった。この geraniol から neral への反応には、geraniol に高い親和性を示す NAD⁺ 依存型 geraniol dehydrogenase (GeDH) ならびに geranial を neral へ変換する異性化酵素が関与することが明らかになった。GeDH の動物からの報告はこれが最初のものである。

第4章では、サトウダニ *Carpoglyphus lactis* から GeDH (*C. lactis* GeDH) を精製し、その酵素化学的機能及び一次構

造を明らかにした。*C. lactis* GeDH は、分子量約42800の単量体、至適 pH9.5、至適温度 25°C、geraniol に対する K_M 値 51.0 μ M、NAD⁺ に対する K_M 値 59.5 μ M であった。*C. lactis* GeDH は geraniol には高い活性を示すものの、その幾何異性体である nerol にはほとんど活性がなく、きわめて高い基質特異性を持つことが示された。その高い基質特異性から、*C. lactis* GeDH はサトウダニの警報フェロモンである neral の生産に特化した酵素であると考えられる。さらに、N 末端アミノ酸シーケンシングならびに 3'RACE 法により、*C. lactis* GeDH の推定全アミノ酸配列を決定した。この推定全アミノ酸配列は、ダチョウや魚類の zinc-dependent alcohol dehydrogenase と相同性がみられた。GeDH はレモングラスなど数種の植物や糸状菌で存在が明らかとなっているが、一次配列など構造に関する情報はまったく分かっていない。GeDH の一次構造情報は本研究結果が最初の報告となる。

論文審査の結果の要旨

本研究では、核内 rDNA 領域の ITS2 領域及び 18S rDNA 領域の分子系統解析から種間相互の関係を明らかにし、形態形質や分泌化合物群の情報を統合することにより、コナダニ類の分類体系を再構築している。さらに、コナダニ類の系統進化を反映するモノテルペン生合成経路に着目することにより、分子系統と化学分類との関連付けを試みている。コナダニ類の分泌するモノテルペンにはフェロモン活性を持つものが多く、化学生態学的ならびに進化生物学的観点から重要な知見が多く得られている。特に、その基本骨格を有する neral の生合成経路を明らかにし、その生合成に関与する geraniol dehydrogenase (GeDH) の酵素化学的諸性質及び一次構造を解明している。本論文の評価すべき点は次のとおりである。

1. 形態的特徴の少ないコナダニ類の種同定を分泌化合物による化学分類だけでなく、分子系統解析を加えることにより、さらに確実なものとした。
2. 分子系統分類、形態分類、分泌化合物を用いた化学分類を統合することにより、コナダニ類の系統進化をより反映した分類体系を再構築した。コナダニ類の系統分類に分子系統解析を用いた例はこれが最初である。また、コナダニ類の分泌化合物の中で、コナダニ類の系統進化を反映した形質を抽出し、系統分類に利用した例も最初のものである。
3. サトウダニ *Carpoglyphus lactis* より GeDH (*C. lactis* GeDH) を精製し、その酵素化学的諸性質及び一次構造を明らかにした。動物を起源とする GeDH の発見と、GeDH の一次構造の決定は本研究が初めての例である。
4. *C. lactis* GeDH が単量体として活性を持つことを明らかにした。*C. lactis* GeDH は alcohol dehydrogenase (ADH) に分類される酵素であるが、単量体として活性を持つ ADH はきわめて珍しく、サトウダニ以外では 1 例しか知られていない。
5. サトウダニにおいて、*C. lactis* GeDH が geraniol にのみ高い基質特異性を持つことを示し、本酵素が警報フェロモン neral の生合成に特化していることを見出している。*C. lactis* GeDH の基質特異性は、生存に有利な neral をより効率的に生産する方向に選択圧がかかった結果と考えられ、生態情報物質の適応性がその生合成系に反映されていることを示唆するものとして注目される。

以上のように、本論文は分子系統解析を導入してコナダニ類の分類体系を総合的に明らかにする一方、モノテルペン生合成系に関わる特異的酵素を解明したものであり、化学生態学、分子系統分類学ならびに酵素化学の各分野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、平成17年6月21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。