

氏 名	こ だん あつ し 小 段 篤 史
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1277 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 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	Structural and Functional Diversity of Stilbene Synthases from Japanese Red Pine (<i>Pinus densiflora</i>) (アカマツのスチルベン合成酵素の構造的および機能的多様性)
論文調査委員	(主 査) 教 授 酒 井 富 久 美 教 授 坂 田 完 三 教 授 島 田 幹 夫

論 文 内 容 の 要 旨

マツの心材成分であるピノシルビン¹はファイトアレキシンとしても知られ、強力な殺線虫活性を保持する。ピノシルビンはシンナモイル CoA に 3 分子のマロニル CoA が順次縮合してテトラケタイド鎖が構築され、アルドール縮合による閉環に至るまでの多段階反応を経て形成される。スチルベン合成酵素 (STS) は、単一でこの多段階反応を連続的に触媒し、ピノシルビンを生成する。そのため、STS は植物の防御を司っているともいえる。また、STS はフラボノイド生合成の鍵酵素であるカルコン合成酵素 (CHS) とアミノ酸配列で 65% 以上の相同性を有することから、CHS スーパーファミリーに分類され、さらに、植物進化の過程で CHS より進化したと推定されている。本論文は、アカマツ STS を対象として、cDNA 構造、大腸菌での異種発現と酵素学的特性、さらにその多様性の意義を検討したものである。

第 1 章では、アカマツ芽生えの根より構築した cDNA ライブラリーを STScDNA 断片プローブを用いてスクリーニングした。この結果、3 種類の全長 STScDNA クローン (PDSTS1, PDSTS2, PDSTS3) と 1 種類の全長 CHS cDNA クローン (PDCHSX) の単離に成功した。3 種類の STS cDNA クローンは約 1.2kb のサイズであり、塩基配列は互いに約 95% という極めて高い相同性を保持していた。これらのクローンには、活性部位である 167 番目のシステイン残基とその隣接アミノ酸残基が高度に保存されていた。さらに、推定アミノ酸配列をもとに分子系統樹を作成した結果、3 種類の STS は欧州アカマツの STS と同じグループに分類されることが判明した。また、STS cDNA の 3' 非翻訳領域の多様性により、12 種類の STS cDNA 断片を単離した。これらは大きく 7 つのサブクラスに分類され、そのうち 5 つは新規メンバーであった。3 種類の全長 STS cDNA クローンはいずれも新規メンバーに属していた。以上の結果より、アカマツの STS が多様な遺伝子族を形成し、かつ、芽生えの根において 12 種類の STS 遺伝子が同時に発現していることを見いだした。

第 2 章では、3 種類の全長 STS cDNA クローンを大腸菌で発現させ、リコンビナント酵素を精製した。基質特異性を検討した結果、3 種類の STS は、いずれもシンナモイル CoA に対し *p*-クマル酸 CoA よりも高い基質特異性を示し、シンナモイル CoA を基質とした時の反応産物はピノシルビンであった。この結果、単離した 3 種類の STS がピノシルビン合成酵素であることが判明した。PDSTS3 はフレームシフト変異により C 末端側の 81 アミノ酸残基を欠失していたが、大腸菌で大量発現した。そのリコンビナントタンパク質の大部分は不溶性であり、STS の C 末端配列は本酵素が正しく折りたたまれ、安定的に可溶性タンパク質を形成するために重要であることが推察された。しかし、完全長酵素よりも高い触媒効率を示したことから、PDSTS3 は変異型のピノシルビン合成酵素であることが明らかになった。

第 3 章では、ピノシルビン生合成の制御について検討した結果をとりまとめた。リコンビナント PDSTS2 により得られた STS 抗体は 3 種類のリコンビナント STS を認識したが、CHS は認識しなかった。本抗体を用いてアカマツ植物体内の STS を検出した結果、42kDa の完全長 STS (PDSTS1, PDSTS2) 以外に 37.5kDa、35kDa のバンドが認められた。35kDa のバンドは C 末端配列が欠失している PDSTS3 のサイズと一致していた。また、37.5kDa の未知の STS の存在が示唆された。以上の結果より、植物体内では分子量の異なる複数の STS メンバーによりピノシルビン生合成が制御されて

いることが示唆された。STS の反応産物であるピノシルビン、CHS の反応派生産物であるピノセンブリンによる阻害実験を行った。この結果、STS、CHS は共にこれら反応産物により阻害された。変異型酵素である PDSTS3 は反応産物阻害をほとんど受けないことを見だし、PDSTS3 がマツの心材中にみられるピノシルビンの蓄積に関与していることが示唆された。PDCHSX に対して 3 種類の STS (PDSTS1, PDSTS2 & PDSTS3) をそれぞれ等モルずつ混合して酵素反応を行い PDCHSX 活性を調べた。この結果、PDSTS1 あるいは PDSTS2 では PDCHSX 活性に有意な変化は認められなかったが、PDSTS3 では PDCHSX 活性が半減した。*in vitro* において PDSTS3 が PDCHSX 活性を抑制したことより、PDSTS3 は植物体内におけるフラボノイド生合成の抑制にも関与している可能性を示した。

論文審査の結果の要旨

マツのステルベノイド化合物であるピノシルビンは殺線虫活性を有し、病害に対する生体防御機構を考える上で重要な物質である。ピノシルビンの合成を触媒するステルベン合成酵素 (STS) は、フラボノイド生合成の鍵酵素であるカルコン合成酵素 (CHS) と同じ基質を触媒し、CHS から進化したと推定されている。本論文は、アカマツの STS 遺伝子およびそのリコンビナント酵素について構造並びに機能の解析を行ったもので、評価すべき主な点は以下の通りである。

1) 完全長の 3 種類の STS cDNA クローン (PDSTS1, PDSTS2, PDSTS3), およびアミノ酸配列で STS と 70% の相同性をもつ CHS の全長 cDNA クローン (PDCHSX) の単離に成功し、それらの 1 次構造を明らかにした。また、分子系統樹により、3 種類の日本アカマツ STS はいずれも新規メンバーであることを示した。

2) STS cDNA の 3' 非翻訳領域の多様性解析から、cDNA ライブラリーには 12 種類の STS cDNA クローンが含まれ、それらは 7 つのサブクラスに分類されること、および 5 つは新規メンバーであることを示した。アカマツ STS 遺伝子がファミリーを形成し、12 種類の STS が同時に発現していることを明らかにした。また、STS 特異抗体による解析から、マツ植物体内で分子量の異なる複数の STS メンバーによるステルベン生合成の制御を示した。

3) 全長の 3 種類 STS クローンを大腸菌で発現させ、リコンビナント酵素を精製し、その酵素活性からいずれもステルベン合成酵素であると同定した。PDSTS3 は、フレームシフト変異により C 末端の 81 塩基を欠き、ほとんどが不溶性タンパク質となることから、STS の C 末端配列が酵素タンパク質の折りたたみと可溶性タンパク質の形成に重要であることを示した。また、本酵素は高触媒効率をもち、反応産物阻害を受けない変異型酵素であることを見だし、マツのステルベン蓄積への関与を示唆した。

4) リコンビナント STS および CHS を用いた酵素反応における相互作用の解析結果から、PDSTS3 のみが PDCHSX 活性を抑制することを見だし、PDSTS3 は植物体内におけるフラボノイド生合成の抑制にも関与する仮説を示した。

以上のように、本論文はマツの STS についてその遺伝子と酵素タンパク質を詳細に解析し、STS の多様性と進化に関する新たな知見を示したものであり、木質生化学、生体分子機能学および植物分子生物学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 14 年 2 月 14 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。