

氏 名	お 小 原 かず あき 朗
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1562 号
学位授与の日付	平 成 18 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	農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	植物プレニルトランスフェラーゼの機能解析と代謝工学への応用

(主 査)
論文調査委員 教 授 矢 崎 一 史 教 授 關 谷 次 郎 教 授 梅 澤 俊 明

論 文 内 容 の 要 旨

天然に数多く存在する有機化合物の中において、炭素数5のイソプレンを基本構造単位とするイソプレノイドは、ステロイドホルモン、色素、生体膜の構成成分等として生命活動に広く関与し、その複雑な化学構造や様々な生理活性から、最も多様な天然有機化合物の一群を形成しているとされる。イソプレノイド生合成において、その構造多様性を担っているのがプレニルトランスフェラーゼと呼ばれる一群の酵素である。中でもプレニル基を芳香族中間体に転移する酵素である芳香族基質プレニルトランスフェラーゼのグループは、光合成に必須なクロロフィルやプラストキノン、ミトコンドリアでの電子伝達に必須なユビキノン、あるいはビタミンEなど、生命活動において重要な役割を果たす生体成分の生合成上、鍵となる酵素反応を担っている。また、植物の二次代謝産物には、プレニルフラボノイド類、プレニルクマリン類あるいはナフトキノン類など芳香族中間体がプレニル化されて生成するものが多数挙げられ、本反応は二次代謝産物の構造や生理活性の多様性に対しても大きな寄与を果たしている。本研究では、この酵素ファミリーの中でも膜タンパク質である *p*-ヒドロキシ安息香酸プレニルトランスフェラーゼ (PPT) サブファミリーを対象として、その生理学的役割、酵素化学的性質を明らかにするとともに、有用化合物であるユビキノン-10の代謝工学に応用し、膜結合型プレニルトランスフェラーゼを用いた植物代謝工学の基盤を築くことを目的とした。得られた成果の概要は以下の通りである。

- (1)モデル植物であるシロイヌナズナ並びにイネからユビキノン生合成上の鍵反応を担う PPT 遺伝子をクローニングし、生化学的な解析を行い、高等植物のユビキノン生合成に関する基礎知見を得た。シロイヌナズナ及びイネの PPT の発現は、酵母ユビキノン生合成 PPT 欠損株のユビキノン生合成能力を相補すること、及び組換え酵素の生化学的性質 (K_m , 二価カチオン要求性) は植物種を超えてよく保存されていること、また緑色蛍光タンパク質 (GFP) との融合タンパク質の一過的発現実験から、その細胞内局在部位はミトコンドリアであることを明らかにした。
- (2)高等植物の二次代謝に関わる PPT として最初に cDNA がクローニングされた *LePGT* をモデルとして、その基質認識機構及び酵素反応メカニズムに関する詳細な解析を行った。部位特異的変異導入酵素の生化学的解析により、極めて保存性の高い4つのアスパラギン酸 (D87, D91, D208, D212) が酵素活性において中心的な役割を果たしていること、N 末端側の親水性ループ中の R76, N83, R96 などが芳香族基質である *p*-ヒドロキシ安息香酸との結合に、C 末端側の親水性ループの S219, K229 がプレニル基質であるゲラニル二リン酸との結合にとって重要な役割を果たしていることを解明した。これら以外の高保存性のアミノ酸をアラニンに置換した場合、 K_m には大きな変化が見られないものの、全ての変異体でタンパク質当りの酵素活性値が減少した。この結果から、これら高保存性のアミノ酸は反応活性中心の形成に重要な役割を果たしていることが推察された。
- (3)実用的な物質生産に向けた代謝工学のモデルとして、膜結合性酵素の遺伝子を利用するに先立ち、まず可溶性のプレニルトランスフェラーゼであるリモノン合成酵素 (LS) を用いて、生合成酵素の細胞内局在部位のエンジニアリングが物質の生産性にどのような影響を与えるか調べた。植物細胞は、プラスチド内に非メバロン酸経路を、細胞質にはメバロン酸経路

を有しており、モノテルペノイドは通常前者によって生合成される。元来リモネンを生産しないタバコをホストとして、そのプラスチド、あるいは細胞質にLSを局在させたところ、いずれの場合においても、形質転換タバコは新規にリモネンを生産した。このことから、外来タンパク質の発現により、どちらのコンパートメントにおいても、プレニル二リン酸の *in vivo* での利用が可能であることが示された。しかし、そのリモネン蓄積性には相違がみられ、細胞質型の方が生産したリモネンのうち、比率としてより多くを（色素体型の6倍）を空气中に放出していた。次いで、膜結合型のPPTである酵母のユビキノシン合成酵素（*COQ2* 遺伝子）を用いて、高等植物におけるユビキノシンの代謝工学を試みるとともに、ユビキノシン高蓄積植物の酸化ストレス抵抗性についての解析を行った。ホスト植物をタバコとし、*COQ2* を本来の局在部位とされるミトコンドリアと、非天然型の小胞体に強制発現させたところ、形質転換タバコの内在性ユビキノシン-10含量が、最大で野生型の6倍にまで増加した。さらに *COQ2* の高発現によってユビキノシン-10含量を増加させたタバコは、メチルピオロゲンや塩に対する抵抗性が明確に向上することを見出した。この形質転換タバコでは、内在の活性酸素種の蓄積量が野生型に比べ半分以下に減少していた。これらの結果より、ユビキノシンが高等植物の酸化ストレス回避に重要な寄与をしていることを初めて明らかとした。

論文審査の結果の要旨

膜結合型の芳香族基質プレニルトランスフェラーゼは、光合成に必須なクロロフィルやプラストキノン、ミトコンドリアでの電子伝達に必須なユビキノシン、あるいはビタミンEなど、生命活動において重要な役割を果たす生体成分の生合成上、鍵となる酵素反応を担っている。加えて植物の二次代謝産物には、プレニルフラボノイド類、プレニルクマリン類あるいはナフトキノシン類など芳香族中間体がプレニル化されて生成するものが多数挙げられ、本反応は二次代謝産物の構造や生理活性の多様性に対しても大きな寄与を果たしている。本論文では、膜結合型の芳香族基質プレニルトランスフェラーゼであるPPTの酵素化学的性質、生理学的役割に関する基礎知見を得るとともに、植物代謝工学への応用を行っている。

本論文で評価すべき主要な点は以下の通りである。

- (1) 高等植物においてこれまで全く明らかにされていなかった、ユビキノシン生合成経路上の鍵酵素PPTの遺伝子をシロイヌナズナ及びイネから初めてクローニングし、酵母発現系により得られた組換えタンパク質を用いてその生化学的諸性質を明らかにした。
- (2) 高等植物の二次代謝に関わる膜結合型PPTとして最初にcDNAがクローニングされた *LePGT* をモデルとし、その基質認識機構及び酵素反応メカニズムに関する詳細な解析を行った。部位特異的変異導入酵素の生化学的解析により、極めて保存性の高い4つのアスパラギン酸（D87, D91, D208, D212）が酵素活性において中心的な役割を果たしていること、N末端側の親水性ループ中のR76, N83, R96などが芳香族基質である *p*-ヒドロキシ安息香酸との結合に、C末端側の親水性ループのS219, K229がプレニル基質であるゲラニル二リン酸との結合において重要な役割を果たしていることを解明した。
- (3) 可溶性プレニルトランスフェラーゼであるリモネン合成酵素を用いて、酵素の細胞内局在部位のエンジニアリングが有用物質の生産、蓄積性に大きな影響を与えることを実証した。次いで、膜結合型であるユビキノシン合成酵素、PPTの酵母遺伝子 *COQ2* を用いて、ユビキノシン高蓄積植物を作出するとともに、本物質が高等植物の酸化ストレスの耐性に重要な役割を果たしていることを初めて明らかにした。

以上のように本論文は、膜結合型プレニルトランスフェラーゼの生化学的性質を明らかにし、その基質認識並びに反応機構の解明に向けた基礎的知見を得た上で、さらに有用化合物であるユビキノシン-10の代謝工学により、植物におけるユビキノシン-10の生理学的役割についての新規な知見を得たもので、植物生理学、酵素化学及び植物代謝工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18年2月13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。