

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	山村 正臣
論文題目	Stereochemical Mechanisms of Norlignan Biosynthesis (ノルリグナン生合成の立体化学機構)		
(論文内容の要旨)			
木質の大部分を占める二次木部は、樹木においては二次細胞壁形成と心材形成を経て完成するが、フェニルプロパノイド生合成は両過程における主要代謝である。すなわち、二次細胞壁形成ではリグニン生合成が、心材形成ではリグナンやノルリグナンの生合成が主要な働きを果たしている。ノルリグナンはC₆-C₅-C₆型の炭素骨格を有する化合物の総称である。多くのノルリグナンは抗菌性などの生理活性を有しており、ヒノキなどの針葉樹では幹の中心部に存在する心材に特異的に蓄積し、心材腐朽の防止に寄与していると考えられている。従って、ノルリグナン生合成機構の解明は、心材形成の機構解明につながるとの観点から興味を持たれてきた。しかし、ノルリグナンの生合成には不明な点が多く、特に立体化学制御機構は全く不明である。本論文では、ノルリグナン生合成経路の初発化合物であるヒノキレジノールの生成反応における立体化学制御について検討すると共に、ヒノキレジノール生合成の代謝工学の研究基盤の整備も進めた。 第1章では、まず、アスパラガスのヒノキレジノール合成酵素（HRS）をコードするcDNAのクローニングを行い、2種類の推定cDNA（HRSα、HRSβ）を単離した。次いで、両cDNAをそれぞれ大腸菌で発現させることにより調製した組換えタンパク質（recHRSα、recHRSβ）の機能解析を行った。recHRSα 或いはrecHRSβ をそれぞれ単独で4-クマル酸 4-クマリルを基質として反応させたところ、アスパラガスからは単離されていないtrans-型の(E)-ヒノキレジノールが生成したが、recHRSα 及びrecHRSβ の等量混合タンパク質を同じ基質と反応させると、アスパラガスが産生する異性体であるcis-型の(Z)-ヒノキレジノールのみが生成した。従って、HRSα 及びHRSβ がHRSをコードすることが確認された。またHRSα 及びHRSβ がアスパラガスHRSを構成する2つのサブユニットであり、これらのサブユニット組成を変化させることにより、ヒノキレジノール生成反応におけるcis/trans選択性を制御し得ることが示された。 一方、スギ培養細胞はアスパラガスとは異なり(E)-ヒノキレジノールを産生するが、この培養細胞より(E)-ヒノキレジノールを生成させるHRS活性を検出した。すなわち、アスパラガスHRSとスギHRSは、異なるcis/trans異性体のヒノキレジノールを同一の基質から生成させることが示された。 ヒノキレジノールは、cis/trans異性に加え7位の不斉炭素原子によるエナンチオ異性を示す。第2章では、HRSが触媒するヒノキレジノール生成反応における7位の立			

体化学に関する選択性について検討した。recHRS α 及びrecHRS β の等量混合タンパク質を用いた場合に生成した(*Z*)-ヒノキレジノールは、アスパラガスから得られたものと同様、光学的に純粋な(7*S*)-体であったのに対し、recHRS α 或いはrecHRS β を単独で用いた場合に生成した(*E*)-ヒノキレジノールのエナンチオマー過剰率はいずれも低い値(9.0~20.6 % e. e.)を示した。以上により、アスパラガスHRSを構成する2つのサブユニット組成を変えることにより、ヒノキレジノール生成反応における*cis/trans*選択性の制御のみならず、エナンチオ選択性をも制御し得ることが示された。本成果は、*cis/trans*及びエナンチオ選択性の制御に関する全く新規な知見である。

第3章では、HRSの異種発現による遺伝子組換え植物の作出に向けた基礎的な検討を行った。HRSを異種発現させると、抗菌活性をもつヒノキレジノールの蓄積による木質の耐朽性向上が期待される。しかし、同時に、ヒノキレジノール生合成のみならずリグニン生合成を始めとするフェニルプロパノイド代謝が広範に攪乱される可能性がある。さらに、組換え植物の実用化においては、多数の組換え体について、代謝攪乱の評価も含めた実質的同等性の検証が必須である。しかし、リグニンの迅速分析法は未だ殆ど確立されておらず、リグノセルロースやフェニルプロパノイドの代謝工学研究開発の隘路の一つとなっている。そこで、本論文ではまず、ミクロスケール高精度ハイスループットニトロベンゼン酸化法を確立し、微量多検体の組換え植物のリグニン芳香核構造の迅速解析を可能にした。さらに、本法をモデル植物であるシロイヌナズナT87培養細胞に適用し、その有効性を検証すると共に、これまで未解明であったシロイヌナズナT87培養細胞のリグニンの特徴を詳細に解析した。以上により、HRSの異種発現によるリグニンの代謝変動をモデル植物において網羅的に評価する基盤が整った。

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)

ノルリグナンは、天然物化学、木質科学、植物生理学、薬学などの分野で有用生理活性物質の生産や心材形成機構解明などの観点から興味を持たれているフェニルプロパノイド系二次代謝産物である。ノルリグナンの生合成には未解明な点が多く残されており、特に立体化学制御機構については全く不明であった。本論文はノルリグナン生合成経路の初発化合物であるヒノキレジノールの合成酵素 (HRS) の機能を調べ、ノルリグナン生合成の立体化学制御に関する新知見を得ると共に、ヒノキレジノール生合成の代謝工学の基盤整備について成果を得たものであり、評価すべき点は以下の通りである。

- 1) アスパラガス培養細胞よりHRSをコードする2種類のcDNA (*HRS* α 、*HRS* β) を初めて単離した。また、両者の組換えタンパク質の機能解析を行うことにより、*HRS* α 及び*HRS* β がアスパラガスHRSを構成する2つのサブユニットであることを示した。また、そのサブユニット組成を変化させることによりヒノキレジノール生成反応における*cis/trans*選択性及びエナンチオ選択性を制御し得ることを示した。
- 2) スギ培養細胞より初めて(*E*)-ヒノキレジノールの合成酵素活性を検出し、アスパラガスHRSとスギHRSは、同一の基質からヒノキレジノールの異なる*cis/trans*異性体を生成させることを示した。
- 3) ヒノキレジノールと生合成経路上で近縁に位置するリグニンにつき、マイクロスケール高精度ハイスループット芳香核構造解析法を確立した。さらに、この方法などを用い、代謝解析のモデル植物であるシロイヌナズナT87培養細胞のリグニンの性質を詳細に解明した。これらにより、*HRS*の異種発現による遺伝子組換え植物作出における実質的同等性を検証するための評価基盤を整備した。

以上のように本論文は、天然物生合成における*cis/trans*選択性及びエナンチオ選択性の制御に関する新知見を得ると共に、ヒノキレジノール合成酵素遺伝子組換え植物の実質的同等性検証のための基盤整備につき報告したものであり、その成果は、植物化学、天然物化学、植物生理学、及び木質科学の発展に寄与するところが多い。

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23年4月22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。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開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