

(論文内容の要旨)

リグニン及びリグナンは、ケイヒ酸／モノリグノール経路を経て生合成される。従来、この経路に関する研究は、主にリグニン生合成との関連で進められてきた。一方リグナンは、代表的な心材物質であると共に、抗腫瘍活性など有用な生理活性を持つものが多いものの、その生合成については未解明な点が多く残されていた。例えばリグナン生合成経路の酵素のうち、遺伝子が単離されているものは数種のみであった。また、リグニンとリグナンは同じ前駆体から合成されるが、リグナン生合成がエナンチオ選択的であるのに対し、リグニン生合成は立体化学的制御を受けていない。従って、リグニン生合成機構との比較の観点も含め、リグナン生合成機構の解明を進めることは、重要である。

本論文では、まず、リグニンとリグナンを同時に生成する系であるベニバナ (*Carthamus tinctorius*) 登熟中種子を用い、両者の生合成における鍵酵素である *O*-メチルトランスフェラーゼ (OMT) 及び当該遺伝子の機能解析を行った。

第1章では、ベニバナ登熟中種子における、ケイヒ酸／モノリグノール経路の鍵酵素、caffeoyl CoA O-methyltransferase (CoAOMT) と 5-hydroxyconiferaldehyde O-methyltransferase (CAldOMT)、の機能を検討した。その結果、6種のCoAOMT (CtCoAOMT1 ~ CtCoAOMT6) と1種のCAldOMT (CtCAldOMT1)のうち、CtCoAOMT3 とCtCAldOMT1 がベニバナにおけるリグニン生合成に関与していることを示した。また、CtCAldOMT1 の最も良い基質が5-ヒドロキシコニフェリルアルデヒドであることを示した。

第2章では、ベニバナのCtCAldOMTホモログの探索を行ったところ、ベニバナ種子cDNAライブラリーから、新規OMTをコードするcDNAが得られたので、その特性解明を行った。すなわち、組換え酵素の生化学的解析および遺伝子発現解析の結果に基づき、本OMTがシリギルリグニン生合成に与ることを強く示唆する結果を得た。なお、本OMTの組換え酵素は、5-ヒドロキシコニフェリルアルデヒドと5-ヒドロキシコニフェリルアルコールに高い活性を示すものの、5-ヒドロキシフェルラ酸には活性を示さなかった。この基質特異性は、本OMTと同様にシリギルリグニン合成に関わることが知られているCAldOMTのそれとは全く異なることから、本OMTを5-hydroxyconiferaldehyde/5-hydroxyconiferyl alcohol OMT (CtAAOMT) と命名した。

第3章では、ベニバナのリグナンメチル化酵素matairesinol OMT (CtMROMT) との相同性

が高いベニバナのOMT (CtMROMT-L) の機能を解析した。その結果、CtMROMT-L は、リグナンのメチル化には関与せず、フラボノイドの生合成に関わる新規 flavonoid OMT (CtFOMT) であることを示した。

ここで、ベニバナを含めリグナン産生植物については、形質転換・個体再生系が確立されておらず、形質転換体を用いた遺伝子機能解析へ研究を展開することができなかった。そこで、次章以下では、形質転換・個体再生系を含め様々な研究リソースの完備しているモデル植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を実験材料として、リグナン生合成機構の検討を行った。

第4章では、まずシロイヌナズナにおけるリグナンの有無を検索し、同植物におけるリグナン産生を初めて確認した。次にリグナン生合成の立体化学機構について検討した結果、従来シロイヌナズナの pinoresinol/lariciresinol reductase (PLR) をコードするとアノテートされてきた遺伝子の実体は、ピノレジノールには強い活性を示すが、ラリシレジノールにはほとんど活性を示さない新規PLR をコードするものであることを示し、この酵素を pinoresinol reductase (PrR) と命名した。さらに、T-DNA 挿入変異株を用いた当該遺伝子の機能解析の結果、及び組換え酵素の生化学的特性解析の結果に基づき、基質のエナンチオマーに関する選択性の異なる複数のPrR (PLR) アイソフォームの発現量の違いが、当該植物中のリグナンのエナンチオマー組成を決定するという従来からの仮説を、遺伝子発現レベルで初めて実証した。

第5章では、シロイヌナズナAt5g54160遺伝子の機能解析を行った。At5g54160遺伝子は、AtCA1dOMTとして一旦アノテーションが付けられたが、その後そのアノテーションが否定され、機能未確定であった。同遺伝子の組換え酵素の生化学的解析及びT-DNA 挿入変異株の化学表現型解析の結果、At5g54160によりコードされたOMTは、シロイヌナズナにおけるシリングルリグニン合成に関わる CA1dOMT であることを実証した。また、この酵素は、CA1dOMT 活性に加え、フラボノイド (ケルセチン) OMT活性を併せ持つことを示した。

(論文審査の結果の要旨)

リグニン及びリグナンは、木質科学、天然物化学、樹木生理学などの分野でバイオ燃料生産や有用生理活性物質の生産などの観点から興味を持たれている。これらの化合物の生合成の分子機構に関する研究は近年かなり進展しているものの、未解明な点が多々残されていた。本論文は、ベニバナとシロイヌナズナにおけるリグニンとリグナンの生合成に関わる *o*-メチルトランスフェラーゼ (OMT) 及びピノレジノールレダクターゼ (PrR) の機能を詳細に調べ、リグニン及びリグナンの生合成に関する新知見を得たものであり、評価すべき点は以下の通りである。

- 1) 従来、CAldOMT の基質特異性は詳細には調べられていなかった。本論文では、ベニバナ CtCAldOMT の組換え酵素の活性を、ケイヒ酸／モノリグノール経路上の、OMT の基質となり得るすべての化合物 (8 種) を用いて詳細に検討すると共に、阻害実験を行うことにより、CtCAldOMT の最も良い基質が 5-ヒドロキシコニフェリルアルデヒドであることを示した。また、シロイヌナズナの AtCAldOMT をコードする遺伝子を初めて確定した。
- 2) ベニバナの新規 OMT (CtAAOMT) を見出した。この OMT は、従来シリギルリグニンの生合成に与るものとして知られてきた CAldOMT とは相同性が低く、基質特異性も異なるが、CAldOMT と同様にシリギルリグニンの生合成に関与していることが強く示唆された。
- 3) ベニバナ種子は登熟過程において、リグナンやフラボノイドなど様々な二次代謝物を蓄積する。従来リグナンのメチル化に関わる OMT として CtMROMT が同定されていたが、CtMROMT と高い相同性を示す CtMROMT-L が、リグナンのメチル化には関与せず、フラボノイドのメチル化を触媒する新規 OMT (CtFOMT) であることを示した。
- 4) シロイヌナズナがリグナンを産生することを初めて示すと共に、シロイヌナズナの PLRとされてきた酵素の実体が、PrRであることを示した。さらに、基質のエナンチオマーに対する選択性の異なるリグナン合成酵素アイソフォームの発現状況の違いにより、リグナンのエナンチオマー組成が変動することを初めて実証した。

以上、本論文は高等植物におけるリグニンとリグナンの生合成におけるOMT類の新たな機能の解明や、リグナン生合成におけるエナンチオマー組成の決定機構の解明について報告したものであり、植物代謝化学、木質バイオマス形成科学、天然物化学及び植物生理学への発展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20年8月20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。