

(論文内容の要旨)

イソプレノイド類は、炭素数 5 のイソプレンを基本単位とする天然有機化合物群である。植物におけるイソプレノイドの生合成経路には、細胞質に局在するメバロン酸経路とプラスチド局在のメチルエリスリトールリン酸 (MEP) 経路の二種あるが、植物を特徴づける二次代謝産物の多くは後者に由来する dimethylallyl diphosphate (DMAPP) から生合成される。MEP 経路で合成される二次代謝系イソプレノイドの炭素フラックス中、最大とされるものに揮発性ヘミテルペンのイソプレン生合成がある。イソプレンは広葉樹などの植物種から、莫大な量 (年間 500 Tg) が大気中に放出されていると言われるが、その生理学的意義は未解明であった。大量のイソプレン生産の一方で、イソプレノイド鎖 (プレニル基) は非常に多くの芳香族化合物の修飾に使われている。中でもプレニルフラボノイドは極めて多彩な生理活性を持ち、天然医薬品や機能性食品の原料として大きな注目を集めているが、その生合成において鍵となる酵素、フラボノイドプレニル基転移酵素遺伝子の単離例は皆無であった。本研究では、プラスチドで生じる植物二次代謝系イソプレノイドの二つの大きな未解明領域、すなわち (1) イソプレン生合成の植物における生理学的意義、(2) フラボノイドプレニル基転移酵素遺伝子の単離及び分子生物学的解析、に焦点を絞り研究を行った。得られた成果の概要は以下の通りである。

(1) イソプレン放出種であるギンドロ (*Populus alba*) から RT-PCR により *isoprene synthase* 遺伝子 (PaIspS) を単離し、大腸菌発現系を用いてイソプレン合成酵素活性を確認した。本遺伝子の発現解析を行ったところ、葉のみで発現していること及び強光や高温条件下でその発現は増大し、逆に暗黒下ではほとんど発現が起こらないことを認めた。この結果は、日中で高く夜は起こらない植物のイソプレン放出の日周変動をよく説明しており、植物におけるイソプレンの放出が、主に遺伝子の転写レベルで制御されていることを明らかにした。

(2) PaIspS 発現シロイヌナズナを作成し、様々な環境ストレス条件下での表現型解析、特に強光と熱を独立に負荷する実験を行った。毒性を示すレベルの強光照射下で、両者の間に顕著な差は認められなかった一方、弱光下で高温ストレス処理 (60°C、2時間半) を行った場合、形質転換体は野生株と比較して明確な高温耐性を示すことが分かった。形質

転換体が高温耐性を獲得した原因を解明するため、高温処理中の植物体の葉面温度をモニターした結果、形質転換体の葉面温度は野生株よりも5 – 8°C 低いことが分かった。外部からのイソプレン添加実験では、高温耐性に明確な差がみられなかったことから、イソプレンの生合成及び植物からの放出が何らかの機構により葉面温度を低下させ、高温耐性に寄与していると考えられる。以上より、植物から夏の日中に活発に放出されるイソプレンは熱ストレスから植物を守る意義があることを明らかにした。

(3) プレニルフラボノイドを多量に含有するマメ科植物クララ (*Sophora flavescens*) 培養細胞から、EST データを用いたインシリコスクリーニングと、酵母発現系を用いた機能スクリーニングを組み合わせることで、初めてのフラボノイド特異的プレニル基転移酵素 *naringenin 8-dimethylallyltransferase* (SfN8DT-1) 遺伝子を単離した。形質転換酵母の膜面分を用いた酵素活性測定の結果、SfN8DT-1 は 7 位に水酸基を有するフラバノンとDMAPP のみを基質にし、イソフラボンやカルコンなど他のフラボノイドは基質にしないことが示された。Northern blot 法などによる発現解析の結果、SfN8DT-1 はプレニルフラボノイドが局在している根皮特異的に発現していることが判明した。このことから、クララにおける抗菌性のプレニルフラボノイドは根の外層に存在し、土壤中で病害虫の攻撃から根を守る防御物質としての役割を果たしている可能性が示唆された。さらに、プレニルフラボノイドを生産しないシロイヌナズナに SfN8DT-1 を導入し、本遺伝子がヘテロな植物内でも機能を持ち、プレニルフラボノイドを形質転換体で生産させ得ることを示した。

(4) クララ培養細胞 EST 情報から SfN8DT-1 と相同性を有する cDNA 断片を選出し、更に RT-PCR 及び RACE 法を組み合わせ、新規なフラボノイドプレニル基転移酵素の候補遺伝子を合計 8 種単離した。酵母発現系を用いた酵素活性のスクリーニングにより、その中にイソフラボン骨格を有する genistein の6位を特異的にプレニル化する活性を有するものが1クローン見出された。*Genistein 6-dimethylallyltransferase* (SfG6DT) と命名した本クローンを含め、フラボノイドプレニル基転移酵素ファミリーはいずれもプラスチド局在性の膜タンパク質であり、分子進化系統樹を作成したところ、ビタミンEやプラストキノン生合成に関与するホモゲンチジン酸プレニル基転移酵素から分子進化し、独自のクラスターを形成することが示された。

(論文審査の結果の要旨)

プラスチドに局在する MEP 経路由来の DMAPP は、様々な植物二次代謝産物の生合成に使われている。この二次代謝系イソプレノイドには人間生活と密接に関わるものが多く、香料や着色料のほか、医薬品や機能性食品の原料などにも応用可能な化合物が少なくない。本論文では、MEP 経路由来の DMAPP から生合成される二次代謝産物の中で、最大の炭素フラックスを占めるイソプレンの生合成及びその放出の生理学的意義を解明したものである。加えて、同じく MEP 経路に由来する DMAPP を基質として生合成され、多彩な生理活性や化学構造多様性を有するプレニルフラボノイド類に着目し、その生合成において鍵となるプレニル基転移酵素遺伝子を初めて取得して、その特性を生化学的及び分子生物学的手法により解析した。

本論文で評価すべき主要な点は以下の通りである。

(1) イソプレン放出種であるギンドロ (*Populus alba*) からイソプレン合成酵素遺伝子を単離した。本遺伝子の発現は熱や光によって顕著に誘導されることを明らかにし、植物におけるイソプレン放出の概日周期がイソプレン合成酵素遺伝子の転写レベルで制御されていることを示した。

(2) イソプレン合成酵素発現シロイヌナズナの表現型解析から、植物からのイソプレン放出は、葉面温度の低下を介した高温耐性に寄与していることを初めて明らかにした。

(3) インシリコスクリーニングと機能スクリーニングを組み合わせることにより、クララ (*Sophora flavescens*) からフラボノイドを基質とする初めてのプレニル基転移酵素遺伝子 (SfN8DT-1) を単離し、その遺伝子産物がフラバノンと DMAPP を特異的に認識する膜結合型酵素であることを証明した。

(4) SfN8DT-1 の配列情報を元にしたホモロジーベースのスクリーニングにより、イソフラボン特異的なプレニル基転移酵素 (SfG6DT) 遺伝子をクララから単離し、これらフラボノイドのプレニル基転移酵素がビタミン E 生合成酵素ファミリーから分子進化したことを示唆した。

以上のように本論文は、プラスチド局在型イソプレノイド系二次代謝において DMAPP を共通の基質とする二種類の代謝酵素の遺伝子を明らかにし、それらの生化学的機能、生理学的意義、および分子進化についての新たな知見を導き出したもので、その成果は、植物生理学、酵素化学、および植物分子生物学の発展に寄与する所が大きい。

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 21年 2月 19 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。