

氏 名	か い こう すけ 甲 斐 光 輔
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1634 号
学位授与の日付	平 成 19 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	Biosynthesis of coumarins in <i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナにおけるクマリン類縁体の生合成)

論文調査委員 (主 査) 教 授 坂 田 完 三 教 授 梅 澤 俊 明 教 授 矢 崎 一 史

論 文 内 容 の 要 旨

植物は、糸状菌、細菌、ウイルスによる感染をはじめとする様々なストレスに常にさらされている。植物は、これらのストレスに対して種々の抵抗反応を誘導することが知られ、その一つに抗菌活性や抗酸化活性を持つ二次代謝産物の蓄積誘導がある。クマリン類縁体はそのような二次代謝産物の一つで、植物の病害抵抗性に関与していると考えられている。クマリン類縁体は、植物体内ではフェニルプロパノイド経路由来の桂皮酸類を前駆体として、水酸化やメチル化などの修飾を経て生合成される。クマリン骨格はベンゼン環とラクトンからなり、ラクトンは桂皮酸類のオルト位が水酸化されたのち、シス-トランス異性化、ラクトン化により形成すると推定されている。特に、桂皮酸類のオルト位水酸化反応は不可逆的であり、フェニルプロパノイド経路からクマリン骨格を生成する経路への分岐点となるため、クマリン類縁体の生合成経路を解明する上で鍵となる重要なステップである。しかしながら、オルト位水酸化反応をはじめとする一連のクマリン生合成反応に関わる酵素および遺伝子は、植物から未だ単離されていない。このため、それぞれの反応がどのような中間体を基質として進行し、最終的にクマリン類縁体を与えるのか、つまり、桂皮酸からクマリン類縁体へ至る生合成経路は依然として不明のままである。

本論文は、植物材料にモデル植物であるシロイヌナズナを用いて、鍵酵素である桂皮酸類のオルト位水酸化酵素および一連の生合成酵素の遺伝子を単離同定し、各酵素反応の基質特異性の解析結果から生合成経路の全貌を明らかにしたものであり、その内容は以下のようにまとめられる。

1) 種々のデータベースや T-DNA 挿入変異株が利用できるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いて、HPLC-蛍光検出器によりクマリン類縁体を定量したところ、スコボレチンの β -グルコシドであるスコポリンが根において非常に高いレベルで蓄積していることを見出した。一方、地上部では通常、根の 1% 程度の含量でしか蓄積されていないが、2, 4-D 処理および、植物病原菌処理によりスコポリンの蓄積が誘導されることが明らかとなった。

2) フェニルプロパノイド経路由来の主要代謝物であるリグニンの生合成において、桂皮酸類の 3'-位水酸化反応を触媒する *p*-クマル酸エステル 3'-位水酸化酵素 (*C3'H*) に着目し、本遺伝子のスコボレチンおよびスコポリン生合成への関与を調べた。*C3'H* 遺伝子の T-DNA 挿入変異株中のクマリン類縁体を分析したところ、*C3'H* 変異株ではスコボレチンおよびスコポリンは野生株の約 5% に減少していることから、スコボレチンおよびスコポリンの生合成は *C3'H* に強く依存していることが明らかとなった。

3) リグニン生合成において桂皮酸類の 3'-位水酸基のメチル化反応を触媒するメチル化酵素 (*CCoAOMT*) 7 種のうち、根において発現量が最も多い *CCoAOMT1* に着目し、*CCoAOMT1* 遺伝子の T-DNA 挿入変異株のスコボレチン、スコポリン内生量を分析したところ、野生株の約 15% に減少していることからスコボレチンの生合成は、*CCoAOMT1* に強く依存していることが明らかとなった。

4) 大腸菌で発現させた *CCoAOMT1* の組換えメチル化酵素を用いて、基質特異性を調べたところ、カフェー酸 CoA

エステルに対して高い選択性を示したが、カフェー酸およびエスクレチンはよい基質ではなかった。このことからスコポレチンの6-位メトキシ基の導入は、桂皮酸類のラクトン化の前であり、鍵酵素である桂皮酸類のオルト位水酸化反応は、カフェー酸 CoA エステルの3'-位メチル化反応の直後に位置すると予想した。

5) スコポレチンへの $^{18}\text{O}_2$ 取り込み実験を行なったところ、クマリン骨格の1位に ^{18}O が導入されたことから、オルト位の水酸化は分子状酸素を利用する酸素添加酵素により触媒されると推定した。公開されている各種アレイデータベースをもとに *CCoAOMT1* 遺伝子の発現様式と強い相関を示し、根で特異的に発現している酸素添加酵素遺伝子をオルト位水酸化酵素の候補遺伝子として全ゲノム遺伝子から選抜した。

6) オルト位水酸化酵素の候補遺伝子の T-DNA 挿入変異株におけるスコポレチンおよびスコポリンを定量し、野生株に比べて内生量が大きく減少した変異株をスクリーニングしたところ、スコポリンの内生量が野生株の約0.5%に減少している2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ遺伝子の変異株を見出した。RT-PCR で確認したところ、この遺伝子の発現部位、発現様式はスコポレチンおよびスコポリンの蓄積パターンと一致したことから、本遺伝子はスコポレチンの生合成に深く関与していることが明らかとなった。

7) 大腸菌を用いてオルト位水酸化酵素候補遺伝子の組換え酵素を作製し、*CCoAOMT1* の反応生成物であるフェルラ酸 CoA エステルを基質として酵素活性を検討したところ、オルト位(6'-位)が水酸化された反応生成物を確認した。さらに、フェルラ酸およびそのキナ酸エステルを基質として用いたが、よい基質とはならなかった。また、桂皮酸類の CoA エステルに対する基質特異性を調べたところ、フェルラ酸 CoA エステルを特異的に水酸化することが明らかとなった。このことからクマリン類縁体の生合成における桂皮酸類のオルト位水酸化は、2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ(*feruloyl CoA 6'-hydroxylase, F6'H*)により触媒され、CoA エステルを基質とすることが明らかとなった。

8) シロイヌナズナの112個のグルコシルトランスフェラーゼ(UGT)について、遺伝子発現量を部位別に示したデータベース(MPSS)およびUGT触媒活性を網羅的に解析した報告をもとに、スコポレチン配糖化酵素の候補遺伝子を絞り込んだ。候補遺伝子の T-DNA 挿入変異株におけるスコポリンを定量した結果、根において強く発現しているUGTの一つであるUGT71C1の欠損変異株では、スコポリン蓄積量が野生株の約35%に減少していることを見出した。さらに本遺伝子の組換え酵素を用いて酵素活性を検討したところ、スコポレチンに対する選択的なグルコース転移活性を確認した。これらのことから、シロイヌナズナ根においてはUGT71C1がスコポレチンを配糖化する主たる酵素であることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

本論文は、植物二次代謝産物クマリン類縁体の生合成において鍵となる桂皮酸類のオルト位水酸化酵素を中心に、クマリン類縁体生合成酵素を初めて明らかにしたものである。桂皮酸類のオルト位水酸化は、フェニルプロパノイド経路からクマリン類縁体特異的な経路への分岐を不可逆的に触媒する重要なステップであることから、本研究は、不明な点が多く残されているクマリン類縁体の植物体内における生理作用を解明する上で重要な知見を与えるものである。評価される主な点は以下の通りである。

1) クマリン類縁体スコポレチンの β -グルコシドであるスコポリンがシロイヌナズナの根に高いレベルで蓄積していることを示した。

2) スコポレチンの6-位メトキシ基は、リグニンの生合成酵素である桂皮酸類3'-位水酸化酵素(*C3'H*)および3'-位水酸基メチル化酵素(*CCoAOMT1*)により形成されることを明らかにした。

3) クマリン骨格の形成が6-位メトキシ基の形成よりも後であること、すなわち桂皮酸類のオルト位水酸化酵素が*CCoAOMT1*よりも下流であることを示した。

4) スコポレチンの生合成が、 $^{18}\text{O}_2$ 取り込み実験および公開されている各種アレイデータベースから推定した、桂皮酸類のオルト位水酸化酵素候補遺伝子である、2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ(*2OGD*)に強く依存することを示した。

5) オルト位水酸化酵素候補である*2OGD*が、フェルラ酸の CoA エステルのオルト位(6'-位)を特異的に水酸化する

ことを生化学的に証明した。

6) UGT71C1 がスコボレチンを配糖化する主たる酵素であることを示した。

以上のように、本論文はモデル植物であるシロイヌナズナにクマリン類縁体が蓄積していることを足掛かりにし、公開されている各種アレイデータベースや T-DNA 挿入変異株を利用してクマリン類縁体生合成において鍵酵素となる桂皮酸類のオルト位水酸化酵素を同定し、その機能を生化学的に明らかにした。クマリン類縁体生合成酵素を同定することにより、古くから放射性同位体標識化合物の取り込み実験のみから推定されてきた生合成経路の全貌を確かなものとすることができた。これらの点で本論文は、天然物化学、植物生化学、ならびに酵素化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19年2月8日、論文なら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。