

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	韓俊文
論文題目	植物の芳香族基質プレニル化酵素の触媒機構に関する酵素学的研究		
(論文内容の要旨)			
植物のプレニル化フェノール類は二次代謝産物の一グループで、これまでに約4,000種が構造決定されてきた。これらは、病害虫に対する化学防御など植物にとって重要な生理機能を担うものが知られ、人の健康の維持向上に資する生理活性物質も多く含まれる。こうした生理活性の発現には、フェノール母核上のプレニル基の存在が重要であるため、フェノール骨格にプレニル基を転移させるプレニル基転移酵素 (PT) が鍵となる生合成反応を担う。植物PTの大きな特徴の一つとして、基質認識及びプレニル化位置に対して非常に高い特異性を示すことが挙げられる。この特性は、植物が種特異的な化学防御壁を確立する上での基礎となっている。しかし、植物PTがいかにして特異性の高いプレニル化反応を触媒できるのかは不明であった。そこで本研究では、近年豊富になってきたPTリソースを活用して、植物PTの特異性を担う触媒機構研究に最適なPTペアを選定し、構造予測プログラムのAlphaFold2を組み合わせるアプローチにより、種々のキメラ酵素を利用した生化学的解析とタンパク質3D構造予測とを結合し、総合的なプレニル化酵素機能の解析を目的として下記の研究を行った。			
1. 第1章では、最初のフラボノイド特異的PTの発見以来 (2008年)、様々な植物系統から同定されてきた多数のPT遺伝子の配列と触媒機能の情報を整理し、活性の報告がある60個の植物PTの配列から1,770のPTペアを比較した。その結果、アミノ酸配列の相同性が高く (約70 %)、酵素反応の生産物特異性が異なるPTペアとして、セリ科植物パースニップ (<i>Pastinaca sativa</i>) 由来のPsPT1とPsPT2を見出した。これらはいずれもクマリン類のumbelliferoneをプレニル化アクセプター基質とし、dimethylallyl diphosphate (DMAPP) をプレニル化ドナー基質として反応するPTであるが、PsPT1は、umbelliferoneの6位に、一方 PsPT2はumbelliferoneの8位に優先的にプレニル基を付加し、それぞれdemethylsuberosin (U6DT活性) とosthenol (U8DT活性) を生合成する。そこでPsPT1とPsPT2との間で4つのシャッフリングポイントを選択し、10個の単ドメイン置換体を含む30個のドメイン置換キメラ酵素を作成してそれらの酵素学的特性を調べた。その結果、ドメイン2がプレニル化部位特異性に最も大きな影響を有することを見出した。さらに、ドメイン2におけるミスマッチ部位に着目した点変異導入を行い、8番目の部位 (D2P8) のアミノ酸 (T/A) が6位と8位の特異性制御に大きな役割を果たしていることを明らかにした。AlphaFold2 を使用した3D モデルを用いて2つの基質の結合をシミュレーションした結果から、PsPT1ではDMAPPとumbelliferoneの6位のプレニル化位置との距離は3.81 Åで、プレニル化位置8位との距離である5.90 Åより小さいモデルが得られ、上記の生化学的解析を支持する結果が得られた。PsT2のモデルでは、6位プレニル化位置の距離は5.66 Å、8位プレニル化位置距離は3.63 Åと、U8DTとして妥当なモデルが得られた。			

2. 第2章では、パースニップで認められたプレニル化部位制御機構が、セリ科全体で共通するかを評価した。セリ科 (Apiaceae) には、およそ400属3,700種の植物が含まれる。そこで、D2P8 位置 (1st D-rich motifのN-末端側4番目のアミノ酸) がPT の共通のプレニル化部位特異性の制御位置であるか、セリ科の他植物におけるPTを取得してその酵素特性を調べるとともに、特にD2P8位置に着目してこのアミノ酸の生産物特異性に対する貢献が広くセリ科PTに共通であるかを検証した。プレニル化化合物の有無を指標に、新鮮材料が入手可能であった5種類、すなわちボタンボウフウ (*Peucedanum japonicum*)、ミツバグサ (*Pimpinella diversifolia*)、ノダケ (*Angelica decursiva*)、ヒュウガトウキ (*Angelica furcijuga*)、ハマゼリ (*Cnidium japonicum*) を得て、それぞれからRNAを抽出し、データベース上の遺伝子情報を利用してこれら植物からPTをコードするcDNAを調製した。PTの機能的発現にはベンサミアナタバコを宿主とした一過的発現系を利用した。その結果、ボタンボウフウからはU6DTとU8DTが、ノダケからは2種、ハマゼリからは1種のPTが得られたが全てがU6DTであった。ヒュウガトウキとミツバグサのPTは、いずれもU8DTであった。これら新たに取得したPTのアミノ酸配列を見たところ、第1章で見出したD2P8 位置のアミノ酸について、U6DTではほぼ全てがThr、U8DTでは全てがAlaであった。さらにこれらセリ科PTに対しても部位特異的変異導入実験を行い、生産物特異性を決定する制御機構はセリ科PTで高く保存されていることを示唆した。
3. 第3章では、プレニル化フラボノイドを生産する薬用植物が多いメギ科 (Berberidaceae) のイカリソウ属 (*Epimedium*) を材料に、クマリン類以外の代表的フェノールであるフラボノイドに対するPTを取得した。これらの触媒機能を調べることで、第1章および第2章で詳細に明らかにしたプレニル部位特異性の制御位置が、セリ科植物PTのみならず、他科植物のクマリン類以外の基質に対するPTにおいても普遍的に論じられるか、検証を行った。新鮮材料が入手可能であったイカリソウ (*E. grandiflorum*)、キバナイカリソウ (*E. koreanum*)、ホザキイカリソウ (*E. sagittatum*) の3種から新規PTのcDNA 6種を単離し、フラボノイドを基質としてその酵素機能を解析した。これらイカリソウPTをセリ科 PTと比較したところ、上記D2P8の近傍に新たなミスマッチが見出された。アミノ酸の点変異導入実験の結果、新たなプレニル化部位特異性の制御位置である可能性を持つアミノ酸残基を見出した。

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)

プレニル化フェノール類は植物の化学防御物質として、また人の健康の維持向上に資する生理活性物質として、これまでに約4,000種が知られる植物二次代謝産物である。これら生理活性の発現にはプレニル基の存在が特に重要である。植物のプレニル化酵素 (PT) は基質及びプレニル化位置に対して高い特異性を示すが、その分子機構は未解明であった。本研究では、クマリン基質PTからモデル分子を選び、ドメイン置換と点変異導入を駆使した網羅的な生化学的解析と、AlphaFold2を利用したタンパク質3D構造予測とを組み合わせ、総合的な酵素機能解析における一連の研究成果をまとめたものである。本論文の評価すべき点は以下の通りである。

1. 植物PTの網羅的インシリコ解析から、umbelliferone を基質にその6位 (U6DT活性) あるいは8位 (U8DT活性) にプレニル基を転移するPT 2 種 (*PsPT1*、*PsPT2*) をセリ科のparsnipから選び出し、ドメイン置換、アミノ酸の点変異、3Dモデリングの解析を組み合わせ、プレニル化部位特異性の制御機構を明らかにした。
2. Umbelliferoneのプレニル化部位の相違は、最終産物のフラノクマリン類がリニア型かアングラー型かを運命づけるため、セリ科植物と天敵昆虫との共進化において極めて重要である。そこで広くセリ科植物から*PsPT1/2*のホモログを新規に多数取得して解析し、上記で見出したプレニル化部位特異性に関する制御機構が、セリ科植物において普遍的に適用できることを示した。
3. プレニル化部位特異性の制御機構がクマリン基質のPTに限定されないことを検証するため、メギ科のイカリソウ属に着目し、フラボノイド基質のPTを6種取得し、生化学的解析および3Dモデリング解析を通じて、プレニル化部位特異性に関する共通ルールを見出した。

以上のように本論文は、膜結合酵素である植物PTの網羅的な生化学解析およびタンパク質3D構造予測を通じ、クマリン基質のPTにおいてプレニル化反応産物特異性を制御するドメインと、そこで中心的な役割を果たす制御アミノ酸を特定し、その制御機構がセリ科一般に普遍的であることを解明したもので、さらに知見を他植物科のフラボノイド基質のPTにまで発展させた研究である。本論文の成果は、植物代謝生化学、酵素化学、および植物生理学の発展に寄与するところが大い。

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、令和 6 年 1 月 24 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。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表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（学位授与日から3ヶ月以内）