

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	嵯峨 寛久
学位授与の日付	平成24年3月31日	
論文名	Studies on regulation mechanisms of biosynthetic pathways producing defense metabolites derived from aromatic amino acids in plants (植物が産生する芳香族アミノ酸由来生体防御物質に関する研究)	
論文審査委員	主査	太田 大策
	副査	乾 隆
	副査	小泉 望

論文要旨

緒論

植物は陸上進出に伴う進化の過程で **20** 万種以上ともいわれる多様な二次代謝産物を発達させてきた。二次代謝産物を構成する大きなグループであるアルカロイドやフェノール性物質は、芳香族アミノ酸を前駆体とする化合物で、病原体感染や食害動物、紫外線や乾燥などの環境ストレスに対する化学的な防御手段として機能する。これらの二次代謝産物は植物の生命活動に必須の一次代謝物であるアミノ酸から生合成されることから、二次代謝への資源の振り分けの制御や二次代謝経路の獲得は、植物の生存戦略上極めて重要なものである。本研究では、芳香族アミノ酸由来生体防御物質の生合成やその制御機構についての新規の知見を得ることを目的とした。

第 **1** 章では、シロイヌナズナが産生する代表的なトリプトファン由来二次代謝産物であるカマレキシンとインドールグルコシノレート (**iGS**) に着目し、これら複数の二次代謝経路の調節に関わる新規の転写調節因子を同定し、転写調節因子による代謝制御機構についての解析を行った。第 **2** 章では発現相関解析からトリプトファン由来二次代謝経路に関与すると考えられた遺伝子の変異体を用いて、メタボロミクス的手法により **iGS** の組成決定に関わる新規の代謝酵素遺伝子を明らかにした。第 **3** 章では、幅広く維管束植物に存在するフェニルアラニン由来の二次代謝産物であるリグニンの生合成に

ついて、コケ植物における桂皮酸モノリグノール生合成経路の分子進化的視点から解析した。

第1章 トリプトファン由来二次代謝経路を制御する新規転写調節因子遺伝子の同定と機能解析

カマレキシシンおよび **iGS** は共にトリプトファンに由来する二次代謝産物であり、病原体感染や昆虫食害などに対する生体防御物質として機能する。近年、これらの個々の生合成経路に関与する代謝酵素遺伝子の大部分が解明されてきたが、多様に変化するストレス環境に応答して、これら複数の二次代謝経路が包括的に制御される分子機構は明らかではない。本章ではこれらのトリプトファン由来二次代謝産物生合成を制御する新規の転写調節因子を同定することを目的とした。

公開されている約 **5000** のアレイデータを元にした遺伝子発現相関解析から、カマレキシシン生合成遺伝子 (**CYP71A12**, **CYP71A13**, **CYP71B15**) および **iGS** 生合成のポジティブレギュレーター (**MYB51**, **MYB122**) と高い発現相関を示した転写調節因子遺伝子 **ANAC042** を同定した。**ANAC042** は植物特異的な転写調節因子ファミリータンパク質で、**DNA** 結合に関わるドメインが高度に保存されており、**ANAC042-GFP** 融合タンパク質が核に局在したことから、転写調節因子として機能することが示唆された。**ANAC042** の **T-DNA** 挿入ノックダウン系統 **anac042** を確立し、カマレキシシン生合成を誘導するエリシター処理を行ったところ、**anac042** 変異体におけるカマレキシシン蓄積が低下していた。また **anac042** 変異体は植物病原菌 *Alternaria brassicicola* に対する抵抗性の低下も示した。カマレキシシン蓄積量の減少はエリシターとして活性酸素発生試薬を用いた場合に顕著であり、活性酸素を介したカマレキシシン誘導に **ANAC042** が深く関与していることが示唆された。リアルタイム **PCR** による発現解析から **anac042** 変異体の根ではカマレキシシン生合成に関与する **P450** 遺伝子、とりわけ **IAOx** 以降の反応ステップを触媒する **P450** 遺伝子の発現量が低下しており、**anac042** 変異体が示すカマレキシシン蓄積の欠損は、これらの **P450** の遺伝子発現低下が原因であると考えられた。さらに、エリシター処理時の **anac042** 変異体の根では、**iGS** のポジティブレギュレーターである **MYB51** および **MYB122** の転写産物が減少していたことから、インドールグルコシノレート生合成への関与も示唆された。

次に **ANAC042pro:GUS** 植物系統を作出し、**ANAC042** の発現誘導機構の解析を行った。エリシターである細菌鞭毛由来ペプチド **Flg22** を処理したところ、根端伸長帯 (**EZ**) での組織特異的な **ANAC042** の発現誘導が観察された。**EZ** は根圏へのカマレキシシンなどの二次代謝産物の滲出部位であることが知られており、**anac042** 変異体の根滲出物におけるカマレキシシン量が減少していたことから、**EZ** におけるカマレキシシンの生合成や分泌に **ANAC042** が関与していることが明らかになった。**EZ** における発現誘導はカル

シウムキレーターやプロテインキナーゼの阻害剤により顕著に阻害されたことから、カルシウム依存的プロテインキナーゼの活性化を受けていることが示唆された。また植物ホルモン変異体との交配実験やホルモン生合成阻害剤添加実験から **Flg22** 依存的な **EZ** での遺伝子発現はエチレン経路に強く依存していることが明らかとなった。これらの **EZ** における同様の発現誘導がカマレキシン生合成遺伝子 **CYP71A12** や **iGS** の転写調節因子 **MYB51** でも報告されており、**ANAC042** が根圏における複数のトリプトファン由来二次代謝物生合成の制御に関与すると考えられた。

第2章 インドールグルコシノレート生合成に関与する新規代謝酵素遺伝子の同定

シロイヌナズナは主要な **iGS** として **Indole-3-yl-methyl glucosinolate (I3M)**, **4-methoxy-indole-3-yl-methyl glucosinolate (4MOI3M)**, および **1-methoxy-indole-3-yl-methyl glucosinolate (1MOI3M)** を蓄積する。**4MOI3M**, **1MOI3M** とも **I3M** の水酸化とメチル基転移反応により生合成されることが考えられており、**4MOI3M** の生合成はシトクロム **P450** 分子種である **CYP81F2** が **I3M** の 4 位の水酸化を触媒することで生成されるが、**1MOI3M** の生合成については明らかとなっていない。本章では **1MOI3M** 生合成に関わる代謝酵素遺伝子の同定を目的とした。既に同定されている **CYP81F2** は **iGS** のポジティブレギュレーターである **MYB51** と高い発現相関を示すことから、**1MOI3M** 生合成遺伝子も同様に **iGS** 生合成のポジティブレギュレーターと共発現している **P450** であると考えられた。そこで発現相関解析を行ったところ、**iGS** 生合成の活性化因子 **MYB34** と高い発現相関を示す **P450** として **CYP81F4** を同定した。まず **CYP81F** サブファミリー遺伝子の発現プロファイリングを行ったところ、**CYP81F4** は根で特異的に発現していた。これは **1MOI3M** が根に多く含まれていることと一致した。**CYP81F4** の T-DNA 挿入変異系統 **cyp81f4** を確立し、根に含まれる **iGS** を定量した結果、**cyp81f4** 変異体では **1MOI3M** が完全に消失しており、前駆体である **I3M** や **4MOI3M** が増加していたことから、**I3M** から **1MOI3M** の反応段階に **CYP81F4** が関与することが強く示唆され、シロイヌナズナの根における **iGS** 組成の決定に **CYP81F4** が決定的な役割を担っていることが明らかとなった。

第3章 フェニルアラニン由来桂皮酸モノリグノール経路の分子進化的解析

高等植物に広く存在するリグニンは植物体に物理的強度を付与する他、病原体や昆虫に対する生体防御物質としても機能する。リグニンモノマーは、フェニルアラニン由来のフェニルプロパノイド経路から分岐する桂皮酸モノリグノール経路によって生合成

される。桂皮酸モノリグノール経路はシダ植物以上の維管束植物に存在するが、維管束を持たないコケ植物においては、本生合成経路の存在、および関連酵素の活性は明らかにされていない。しかし近年、一部のコケ植物や藻類においてリグニンやリグニン様物質が蓄積していることが報告され、これらの原始的な植物においても桂皮酸モノリグノール経路が存在することが示唆される。そこで本章では、コケモデル植物であるヒメツリガネゴケにおける桂皮酸モノリグノール経路代謝酵素の活性解析から、陸上植物の進化に伴う桂皮酸モノリグノール経路の獲得について議論した。

陸上植物間の比較ゲノム解析から、コケモデル植物であるヒメツリガネゴケのゲノム中にモノリグノール生合成遺伝子であるヒドロキシシシナモイル **CoA:シキミ酸/キナ酸** ヒドロキシシシナモイルトランスフェラーゼ (**HCT**) や桂皮酸 **3'水酸化 P450 (CYP98A)** などのホモログが存在することが分かった。モノリグノール生合成の第一段階である **HCT** ホモログをクローニングしたところ、興味深いことにヒメツリガネゴケ **HCT (PpHCT)** は、高等植物型 **HCT** には見られないアミノ酸配列 (**149** 残基) が挿入されており、高等植物型 **HCT** とは明らかに異なる特徴的な一次構造の相違点を持っていた。この挿入配列はコケ植物であるゼニゴケ **HCT** ホモログでも同様であったことからコケ植物型 **HCT** に特異的な特徴であると考えられた。ホモロジーモデリングの結果、コケ植物型 **HCT** の **N** 末端側と **C** 末端側のドメインの立体構造は高等植物型 **HCT** と酷似しており、両ドメインには含まれた挿入配列はループ状構造を取り、タンパク質立体構造の外部に露出していると予測された。大腸菌発現系により調製した組換えタンパク質を用いた酵素反応の結果、組換え **PpHCT** はシロイヌナズナ **HCT** と同様に、**p-coumaroyl CoA** を基質とし、**p-coumaroylshikimate** および **p-coumaroylquininate** を生成するアシルトランスフェラーゼ活性を有した。次に **HCT** の次の反応段階であると考えられる **CYP98A** による桂皮酸 **3'位水酸化** 活性について、昆虫細胞発現系により調製した組換え **PpCYP98A34** を用いて、桂皮酸モノリグノール経路再構成系での酵素反応を行った。その結果、組換えシロイヌナズナ **CYP98A3** で検出された反応生成物である **caffeoylshikimate** および **caffeoylquininate** が組換え **PpCYP98A34** を用いた反応では検出されなかったことから、**PpCYP98A34** は桂皮酸 **3'位水酸化** 活性を持たないことが示唆された。以上のことからコケ植物であるヒメツリガネゴケでは、桂皮酸 **3'位水酸化** 以降の反応が不完全である可能性があるものの、桂皮酸モノリグノール経路が部分的に保存されていることが明らかとなった。

総括

第一章ではトリプトファン由来の異なる二次代謝産物であるカマレキシンと **iGS** の生合成の調節に関与する新規の転写調節因子遺伝子として **ANAC042** を同定した。また根端における **Flg22** による発現誘導機構から **ANAC042** がカマレキシン生合成遺伝子や **iGS** 生合成活性化因子と協調的に機能していることが示唆された。

第二章ではシロイヌナズナに含まれる主要な3種の **iGS** の組成を決定する代謝酵素遺伝子として **CYP81F4** を同定した。近年、個々の **iGS** の特異的な細胞生理機能が報告されており、それらの部位特異的、組織特異的な **iGS** プロファイルが知られていることから、今後 **CYP81F4** の発現制御に関するさらなる研究が望まれる。

第三章ではリグニンを蓄積しないとされているコケ植物において、桂皮酸モノリグノール経路が部分的に保存されていることを初めて明らかにした。これは陸上植物の進化過程における桂皮酸モノリグノール経路獲得が、コケ植物において生じたとされる従来の考えを支持するものである。

審査結果の要旨

植物は時々刻々と変化する環境ストレスに対する化学的防御手段として多様な二次代謝産物を生合成する。これらの二次代謝産物は植物の生命活動に必須である一次代謝物を出発物質として、様々な酵素反応による修飾を経て生合成される。特に芳香族二次代謝化合物の生合成には、炭酸固定に由来する植物バイオマス生産の **30~40%**以上が利用されている。本論文は、植物病原体や食害動物に対する生体防御物質として機能する芳香族アミノ酸由来二次代謝産物に着目し、その生合成経路と制御機構に関する新規の知見を得ることを目的とした。

第1章では、アブラナ科モデル植物であるシロイヌナズナが生産する生体防御物質であるカマレキシンとインドールグルコシノレート (**iGS**) の生合成調節に関与する新規の転写調節因子を同定した。カマレキシンおよび **iGS** は、トリプトファンを生合成前駆体とする生体防御物質である。それぞれの生合成に関わる代謝酵素遺伝子の大部分が明らかにされてきているが、カマレキシンと **iGS** が、多様な環境ストレスに応答して適切に生合成される分子機構は明らかにされていない。本研究ではこれら複数のトリプトファン由来二次代謝経路の調節に関与する新規の転写調節因子 **ANAC042** を同定した。**ANAC042** はカマレキシン生合成誘導因子により顕著に発現が誘導される。**ANAC042** のノックダウン系統はカマレキシン生合成に欠損を示し、植物病原性真菌 **Alternaria brassicicola** の感染に対する抵抗性が低下した。定量PCRによる発現解析の結果から、**ANAC042** はカマレキシン生合成に関与する **P450** 遺伝子、**CYP71A12**、**CYP71A13** および **CYP71B15** の発現制御に関わることを明らかにした。**ANAC042pro:GUS** 植物を用いた発現解析によって、**A. brassicicola** の感染では感染部位特異的に **ANAC042** の発現誘導が起こるのに対し、病原性細菌である **Pseudomonas syringae DC3000** の感染は根の伸長部位 (**EZ**) 特異的に発現を誘導することを示した。細菌鞭毛由来の病原体

由来分子認識パターン (PAMP) である **Flg22** を用いた実験によって, **EZ** におけるカマレキシン生合成に **ANAC042** が関与すること, その発現誘導は植物ホルモンであるエチレンの情報伝達経路が関与する事を明らかにした. 以上, **ANAC042** はトリプトファン由来二次代謝経路の調節に関与する新規の転写調節因子であり, **ANAC042** を介した二次代謝経路の制御機構のさらなる研究は, 多様な環境ストレスに対する植物の化学的防御機構の理解につながるものである.

第2章では, シロイヌナズナの **iGS** の生合成に関わるシトクロム **P450** 遺伝子 **CYP81F4** を同定した. シロイヌナズナは主要な **iGS** として **indol-3-yl-methyl glucosinolate (I3M)**, **4-methoxy-indole-3-yl-methyl glucosinolate (4MOI3M)**, および **1-methoxy-indole-3-yl-methyl glucosinolate (1MOI3M)** を蓄積する. **4MOI3M** と **1MOI3M** は, **I3M** が **P450** による水酸化とそれに続くメチル基転移反応を経て生合成される. 先行研究で **4MOI3M** の生合成に関わる **P450** として **CYP81F2** が同定されている. 一方, **1MOI3M** の生合成経路に関与する酵素遺伝子は不明であった. **1MOI3M** は主に根に蓄積することから, 根で特異的に発現する **CYP81F** サブファミリー遺伝子 **CYP81F4** に着目した. **CYP81F4** は **iGS** のポジティブレギュレーター **MYB34** と高い発現相関を示した. **T-DNA** 挿入変異系統 **cyp81f4** を確立し, メタボローム解析と **LC-MS** による **iGS** 定量を行った. その結果, **cyp81f4** 変異体では主要な代謝変動として **1MOI3M** の欠損とともに, 前駆体である **I3M** や **I3M** に由来する **4MOI3M** の蓄積量が増加した. 以上のことから **CYP81F4** が **I3M** から **1MOI3M** の水酸化を触媒することが示された.

第3章では, 芳香族アミノ酸由来の二次代謝産物であるリグニンの生合成について, コケ植物における桂皮酸モノリグノール生合成経路の分子進化的視点から解析した. リグニンは植物体に物理的強度を付与する他, 病原体や昆虫に対する生体防御物質としても機能する. その前駆体を供給する桂皮酸モノリグノール経路はシダ植物以上の維管束植物に存在する. 近年, 一部のコケ植物や藻類においてリグニンやリグニン様物質が蓄積していることが報告されているが, その生合成の由来は解明されていない. 比較ゲノム解析から, ヒメツリガネゴケゲノムに桂皮酸モノリグノール経路遺伝子であるヒドロキシシンナモイル **CoA**:シキミ酸/キナ酸ヒドロキシシンナモイルトランスフェラーゼ (**HCT**) や桂皮酸 3'水酸化 **P450 (CYP98A)** のホモログ遺伝子が存在することが分かった. ヒメツリガネゴケ **HCT (PpHCT)** と **CYP98A34** の **cDNA** クローニングを実施し, 組換えタンパク質を発現させた. 組換え **PpHCT** は **p-coumaroyl CoA** を基質とし, **p-coumaroylshikimate** および **p-coumaroylquininate** を生成する高等植物型アシルトランスフェラーゼ活性を有していたが, 組換えコケ **PpCYP98A34** 反応では高等植物型の反応生成物 (**felroylshikimate** および **caffeylquininate** の生成) は検出されなかった.

以上より、コケ植物であるヒメツリガネゴケは **HCT** 反応段階までの高等植物型の桂皮酸モノリグノール経路を保有するが、**CYP98A** による桂皮酸 **3'**位水酸化以降の反応段階が進行しない可能性が示唆された。これは桂皮酸モノリグノール経路がコケ植物に存在することを酵素学的に示した初めての報告であり、陸上植物の進化過程における桂皮酸モノリグノール経路獲得が、コケ植物において生じたとされる従来の考えを支持するものである。

以上、本研究の結果は、芳香族由来二次代謝産物の生合成やその制御に関する新規の転写調節因子、新規代謝酵素遺伝子、さらに植物バイオマス資源として有望視されるリグニン生合成の進化的獲得過程の考察に新規の知見を与え、応用生命科学分野の発展に寄与するものであると考えられる。よって、最終試験の結果とあわせて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。