

論文の内容の要旨

氏名：米山 恵介

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：マメ科植物のポリフェノール生合成に関わるプレニル基転移酵素遺伝子の機能と分子進化に関する研究

1. 序論

ポリフェノールは、基本骨格に複数の芳香環と多数のヒドロキシ基をもつ植物二次代謝産物で、フラボノイド、イソフラボノイド、スチルベノイド等に分類される。その大多数には抗酸化活性をはじめとする様々な生物活性が見られ、有害な紫外線からの防御、花粉媒介者の誘引、病原微生物に対する抗菌活性など植物の生態生理に重要な役割を果たす。また抗腫瘍活性、エストロゲン様活性などヒトにとって有用な生物活性をもつものもある。プレニル化ポリフェノールは、プレニル基と総称されるイソプレノイド鎖を構造中にもつもので、植物界に約 1,000 種類以上存在すると推定されている。特にマメ科には、ストレス誘導性抗菌物質のファイトアレキシンとしてプレニル化ポリフェノールを生産する植物が数多く知られている。疎水性のプレニル基は、生体膜への透過性の向上やタンパク質との親和性の変化などをもたらすため、プレニル基の付加により生物活性が増強された、あるいは新規の生物活性を示すプレニル化ポリフェノールは様々な分野への応用が期待されている。プレニル化合物生合成の鍵酵素となるのが、dimethylallyl diphosphate (DMAPP) などのプレニル二リン酸をプレニル基供与体として転移反応を触媒するプレニル基転移酵素 (PT) である。PT 遺伝子の機能解析は、病害抵抗性を増強したマメ科作物の作出や組換え微生物による有用物質生産などの応用につながると期待される。本研究では、プレニル化ポリフェノールをファイトアレキシンとして生産する 3 種のマメ科作物を対象にした PT 遺伝子の同定、酵母を用いたプレニル化ポリフェノール生産法の改良、およびプレニル化ポリフェノールの多様性をもたらした PT 遺伝子の分子進化的要因について報告する。

2. *Glycine max* のイソフラボノイド生合成系の PT 遺伝子の同定

ダイズのファイトアレキシンである glyceollin は、イソフラボノイドの (-)-glycinol に対するプレニル基 (ジメチルアリル基) の付加と続く環化反応を経て生合成され、プレニル基の付加位置と環化様式の違いから、主に 3 種類の異性体 (glyceollin I, II, III) が存在する (図 1)。Glyceollin I の生合成に関わる (-)-glycinol の 4 位へのプレニル基転移酵素 (G4DT) はすでに同定されていたが、glyceollin II, III の生合成に関わる 2 位への転移酵素 (G2DT) は未同定であった。またダイズでは glyceollin 以外のプレニル化イソフラボノイドも報告されており、基質特異性が異なる複数の PT が存在すると想定された。そこで本研究では G2DT を含むイソフラボノイド生合成系の PT 遺伝子の同定を行った。先行研究にならい、ダイズゲノムデータベースを検索し、ビタミン E の生合成に関わる PT (homogentisate phytyltransferase) をコードするシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の *AtVTE2-1* 遺伝子と配列が類似した遺伝子を選抜し、さらに転写物データベースの検索により 4 遺伝子を候補とした。ダイズ培養細胞の cDNA を鋳型にした RT-PCR もしくは人工遺伝子合成により、それらのコード配列を取得した。組換え酵母発現系で酵素タンパク質を発現させそれらの触媒機能を解析し、G2DT と、イソフラボン・クメスタンなどを基質とする 3 種の PT を同定した。エリタター (CuCl₂ 水溶液) 処理したダイズの葉では、glyceollin II, III の蓄積に先立ち G2DT 遺伝子の発現が一過的に上昇したことから、同遺伝子が glyceollin II, III の生合成に関与することが強く示唆された。

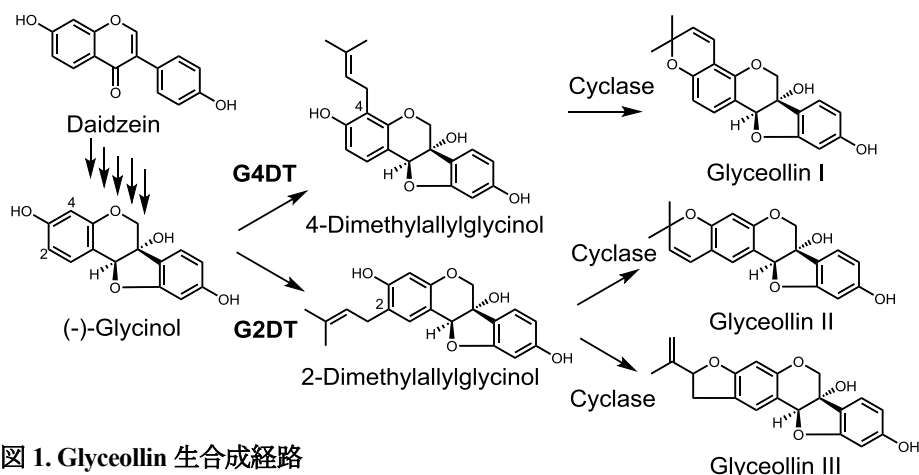


図 1. Glyceollin 生合成経路

G4DT; (-)-glycinol 4-dimethylallyltransferase. G2DT; (-)-glycinol 2-dimethylallyltransferase.

3. インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) のイソフラボノイド, ラッカセイ (*Arachis hypogaea*) のスチルベノイド生合成系の PT 遺伝子の同定

インゲンマメはプレニル化イソフラボノイドの kievitone, phaseollin, ラッカセイはプレニル化スチルベノイド (e.g. arachidin-3, arahypin-5) をファイトアレキシンとして生産することが知られている. これらの生合成に関わる PT 遺伝子はいずれも未同定であった.

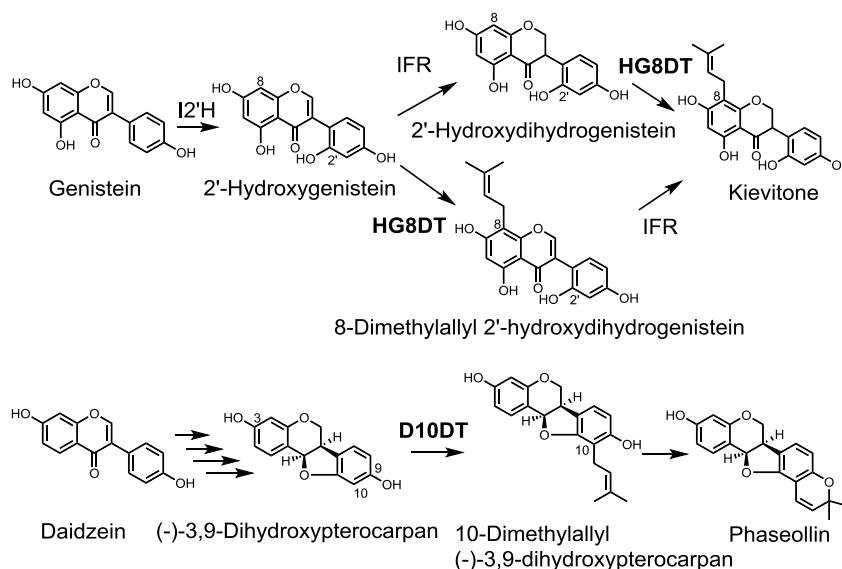


図 2. Kievitone, phaseollin の生合成経路

IFR; isoflavone reductase, I2'H; isoflavone 2'-hydroxylase, HG8DT; 2'-hydroxy(dihydro)genistein 8-dimethylallyltransferase, D10DT; (-)-3,9-dihydroxypterocarpan 10-dimethylallyltransferase.

ダイズ PT 遺伝子の同定と同様の手法を用いて, インゲンマメの kievitone および phaseollin の生合成に関与する 2'-hydroxygenistein 8-dimethylallyltransferase (HG8DT) および (-)-3,9-dihydroxypterocarpan 10-dimethylallyltransferase (D10DT) をコードする遺伝子を同定した (図 2). また, ラッカセイの arachidin-3 および arahypin-5 の生合成に関与すると予想される *trans*-resveratrol 4-dimethylallyltransferase (R4DT) と, 同

じ基質の3'位にジメチルアリル基を転移する R3'DT の遺伝子を同定した (図 3)。それぞれの培養細胞をエリシター (酵母抽出物) で処理し、ファイトアレキシンの蓄積と同定した遺伝子の転写レベルを調べた結果、いずれの遺伝子もファイトアレキシンの蓄積に先立ち発現が一過的に上昇したことから、これらの遺伝子がファイトアレキシシン生合成に関与していることが示唆された。

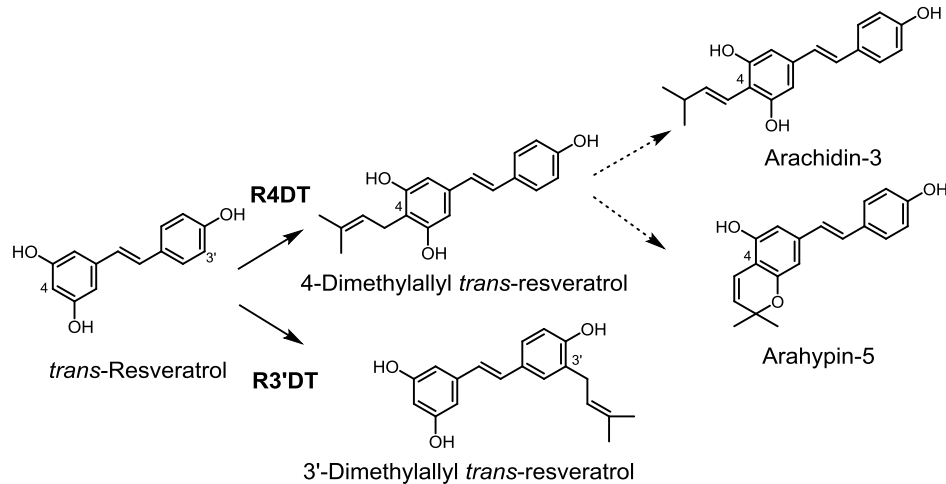


図 3. プレニル化スチルベノイドの推定生合成経路

R4DT; *trans*-resveratrol 4-dimethylallyltransferase, R3'DT; *trans*-resveratrol 3'-dimethylallyltransferase.

点線矢印は推定生合成経路.

4. PT 遺伝子を導入した酵母でのプレニル化ポリフェノール生産

有用な生物活性をもつプレニル化ポリフェノールは、様々な分野への応用が期待されるが、植物体での蓄積量が微量なものもあり、利用には安定的な生産系の確立が不可欠である。近年、組換え微生物を用いた発酵生産が試みられている。酵母はプレニル基供与体である DMAPP を内在の代謝系で生産するため、原理的には、プレニル基受容体のみを PT 発現酵母培養液に加えればプレニル化合物が得られる。しかし、実際に酵母を用いたプレニル化合物の生産量は微量であった。この理由として、DMAPP がステロールなど生育に必須なイソプレノイド代謝物の生合成に使用されてしまうため、導入した異種 PT が利用できる DMAPP 量が少ないことが考えられた。続く研究で、イソプレノイド生合成で DMAPP の下流に位置する farnesyl diphosphate synthase (FPPS) の活性を変異導入で抑えた酵母を宿主にすると、PT 産物の生産量が増加するという知見が得られ、FPPS 活性の抑制がプレニル化合物の生産に効果的であることが示唆された。本研究では、先行研究よりもさらに簡便な方法を用いたプレニル化ポリフェノールの発酵生産を実現するため、FPPS の阻害剤であるビスフォネート系化合物の利用を検討した。ラッカセイの R4DT をコードする *AhPT2* 遺伝子のコード配列を導入した組換え酵母に、基質を加えタンパク質発現誘導を行い、培養液を回収し HPLC で分析した。FPPS 阻害剤の濃度を最適化すると生産量は約 20 mg/L に達し、これは先行研究と同程度の生産量だった。酵母でプレニル化ポリフェノール生産性を向上させる手段として、FPPS 阻害剤の投与も有効であることがわかった。

5. ポリフェノール PT の分子系統関係と分子進化過程

芳香族化合物を基質とする PT は、ビタミン E (トコフェロール, トコトリエノール), ユビキノン, プラストキノンなど一次代謝産物の生合成に関わる PT と、二次代謝産物であるポリフェノールの生合成に関わる PT に大別できる。分子系統解析から植物のプレニル化ポリフェノールの多様性をもたらした PT 遺伝

子の機能分化の時期を推定したところ、一次代謝系の PT の機能分化の時期は植物の科や目の分岐前と推定され、被子植物の進化の初期に機能が確立したことが示唆された。一方、二次代謝系の PT の機能分化の時期は、植物の科の分岐よりも後で、進化上比較的最近であることが推定された。また植物の科が異なると、二次代謝系の PT の起原となる一次代謝系の PT が異なることが示唆された。本研究で同定したダイズ、インゲンマメ、ラッカセイのファイトアレキシン生合成に関与する PT 遺伝子の染色体上の配置を公共データベースを用いて調べると、タンデムクラスターもしくは周辺の遺伝子の配列が類似したシンテニー構造がみられ、局所的遺伝子重複や全ゲノム重複により生じた余剰遺伝子への変異の蓄積により多様な触媒機能をもつ PT 遺伝子が生じ、それがプレニル化ポリフェノールの構造多様化に繋がったことが示唆された。