

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 趙 銀 敏

本論文は、高等植物における生体防御機構に関する研究の一環として行なった、イネ液体培養細胞におけるジテルペン系ファイトアレキシン生合成に関与するジテルペン環化酵素遺伝子の単離・機能解析に関するもので、4章からなる。

第1章では、研究の背景と目的について述べている。

第2章では、イネ液体培養細胞におけるジテルペン系ファイトアレキシン生合成に関与するジテルペン環化酵素遺伝子の単離について述べている。これまでに様々な植物およびカビから単離されてきたジテルペン炭化水素環化酵素の保存配列に基づいて設計した縮重プライマーを用いた PCR により、エリシター処理しファイトアレキシン生合成を誘導したイネ培養細胞からジテルペン環化酵素のクローニングを試みた。その結果、植物由来のジテルペン環化酵素のものと相同性を示す2種類の cDNA 断片が増幅された。これら2種の遺伝子を *OsDTC1*、*OsDTC2* と命名しそれぞれの cDNA 全長を単離するため 5' -RACE と 3' -RACE を行なったところ、*OsDTC1* については、ORF 全長を含む cDNA クローニングに成功し、それが 830 アミノ酸残基をコードすることが明らかになった。*OsDTC2* については、N 末端を含む 553 アミノ酸残基をコードする cDNA 断片が取得されている。

OsDTC1、*OsDTC2* にコードされるタンパク質の推定アミノ酸配列を他のテルペン環化酵素と比較したところ、テルペン環化酵素の中でジテルペン環化酵素においてのみ極めて高度に保存され、モノテルペン、セスキテルペン、トリテルペン等の環化酵素には見られない SAYDTAW モチーフが *OsDTC1*、*OsDTC2* の両酵素に存在しており、copalyl diphosphate (CDP) などの基質由来のリン酸基と酵素との二価金属イオン (Mg^{2+}) を介した複合体形成に重要な役割を担っていると考えられる DDXXD モチーフが *OsDTC1* に見出された。*OsDTC2* は cDNA 全長がクローニングされていないため DDXXD モチーフが存在しているかどうかは明らかではない。一方、geranylgeranyl diphosphate (GGDP) の環化に関与することが知られている DXDDTA モチーフは *OsDTC1* にも *OsDTC2* にもともに存在しなかった。以上より、*OsDTC1*、*OsDTC2* ともに GGDP を基質とする環化反応には関与せず、CDP、*ent*-CDP、あるいは *syn*-CDP を基質とする環化反応を触媒する可能性が示唆された。*OsDTC1*、*OsDTC2* ともに N 末端側にトランジットペプチド様配列が存在しており、これらの酵素はリボゾーム上で生合成されたのちプラスチドに移行し、成熟酵素タンパク質としてプラスチド内に局在しているものと考えられる。イネ培養細胞における *OsDTC1*、*OsDTC2* mRNA の発現解析を RT-PCR により行なったところ、*OsDTC1*、*OsDTC2* ともにエリシター処理後 8 時間で極大を示し、以後漸減することが示された。イネ液体培養細胞において、エリシターを処理すると処理後 8 時間くらいからジテルペン系ファイトアレキシンの生産が始まり、24-48 時間後で集積量が最大に達することが知られている。したがって、*OsDTC1*、*OsDTC2* はともにジテルペン系ファイ

トアレキシンの生産が始まる時期に合成されプラスチドへ移行して安定に機能しているものと考えられた。

第3章では、cDNA 全長が得られた *OsDTC1* の機能解析について述べている。*OsDTC1* の ORF 全長を pGEX ベクターに連結し、グルタチオン S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質 (GST-*OsDTC1*) となるように発現ベクターを設計した。得られたプラスミド (pGEX-*OsDTC1*) を大腸菌に導入し 30°C で培養した。組換えタンパク質の生産誘導は、1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加することによって行なった。菌体破碎液の可溶性画分を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なったところ、pGEX-*OsDTC1* プラスミドを持つ大腸菌抽出物から GST-*OsDTC1* タンパク質と思われるバンドを検出することができた。そこで、Glutathione Sepharose 4B アフィニティーカラムにより精製し、得られたタンパク質の N 末端アミノ酸配列を決定したところ、予想される融合タンパク質のものと一致したことから、GST-*OsDTC1* の生産が確認された。

OsDTC1 のジテルペン炭化水素環化酵素活性を調べるために、GST-*OsDTC1* を含む大腸菌の抽出物と基質として GGDP 及び CDP (CDP、*ent*-CDP、あるいは *syn*-CDP)、コファクターとして 500 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ を加えて 30°C で 1 時間インキュベーションした。反応液を *n*-ヘキサンにより抽出し、得られた抽出物をガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリーにより分析した。*OsDTC1* は GGDP を基質とした変換実験では変換活性を示さなかったが、CDP 及びその異性体を基質とした場合は変換活性を示した。CDP を基質にした場合には収率 10% でジテルペン炭化水素 P1、*ent*-CDP を基質にした場合も収率 10% でジテルペン炭化水素 P2、1% 未満で *ent*-pimara-8, 15-diene への変換が認められた。P1、P2 は、お互いに鏡像体であると考えられるが、まだ同定するには至っていない。一方、*syn*-CDP を基質とした場合は、収率 1% 未満で pimara-8, 15-diene と aphidicol-15-ene への変換が認められた。P1 (あるいは P2) を含む上記変換物はいずれもエリシター処理によりイネ液体培養細胞において生産が顕著に促進される内生のジテルペン炭化水素であることから、以上の事実は、*OsDTC1* がイネにおけるジテルペン系ファイトアレキシンの生合成酵素の一つとして機能していることを強く示唆するものと考えられた。

第4章では、本研究で得られた結果を総括し今後の展望について述べている。

以上、本論文はイネのジテルペン系ファイトアレキシンの生合成に関与するジテルペン炭化水素環化酵素遺伝子を単離した初めての例になると考えられ、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。