

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 平野 啓

Salicylic acid (SA)は植物において開花の誘導や ethylene 等の植物ホルモンの生合成阻害から、systemic acquired resistance のような防御機構におけるシグナル因子としての機能等、多岐に渡る作用を示すフェノール化合物である。SA は他の hydroxybenzoic acid 類と同様に高い毒性を示すことも知られており、植物は一般にこれを配糖化することで毒性を低下させ、細胞中に貯蔵するものと考えられてきた。

一方、ペラドンナ (ナス科)の毛状根が、SA を投与された場合にこれをモノメチル化、さらにジメチル化して methyl salicylate (MSA)および methyl-*O*-methoxybenzoate (MMB)を生成し、配糖体に関しては一切生成しない、ユニークな応答を示すことが報告されている。SA 添加に対するこの応答様式は配糖体の形成が全く見られない点でも興味深い、生理活性の高い SA およびその派生物の代謝経路としてもユニークな例であると言える。

そこで本研究ではこの SA に対する応答反応を、応答様式そのものを詳細に分析する視点と、応答を構成する酵素とその司る反応を分析する分子生物学的な視点の二面から追い、この応答反応の機構・意義を解明する上での基礎的知見を得ることを目的とした。

第1章では、前者の視点に基く分析を行なった。

まず、この応答反応に関してより詳細に検討したところ、ペラドンナによる芳香族化合物のメチル化は SA とその派生物(salicyl alcohol, acetyl salicylic acid, MSA)に限られることが示された一方で、MSA, MMB が与えられた場合には SA への逆変換が観察された。このことはペラドンナにおいて SA とその派生物の代謝および再利用の系としてメチル化が機能していることを示唆している。また、SA とその派生物に特化したシステムであることから、植物における SA の機能に関係の深いものであると考えられた。

また、この応答が *Agrobacterium* の感染による影響を受けての現象とも考えられたが、不定根においても同様の応答が見られることから、ペラドンナに固有の性質であることが示された。

第2章では、上記の現象に関与する酵素について検討を進めた。

Crude cell extract を用いた *O*-methyltransferase 活性測定の結果からは、SA→MSA と MSA→MMB を触媒する酵素が異なることが予想された。後者(MSA methyltransferase: MSAMT)については、adenosine-agarose gel を用いた affinity chromatography によって部分精製され、38k Da のタンパク質がそれであることが確認された。MSAMT は MMB を生成する methyltransferase としては初めての例である。

一方で前者(SA methyltransferase: SAMT)については精製を進めることができなかったが、*Clarkia breweri* (アカバナ科) の SAMT (*CbSAMT*) のホモログとして *AbSAMT1* が本研究とは別に取得・解析されており、その recombinant protein と crude cell extract との SAMT 活性の比較から両者の性質が類似したものであったことから、*AbSAMT1* がこれを担っていると考えられる。

この2つの酵素によって一連のメチル化反応が担われていることが、両酵素および crude cell extract の基質特異性に関する解析結果から示された。

以上、本論文はベラドンナの毛状根が、サリチル酸を投与された場合にこれをモノメチル化、さらにジメチル化してゆく一連のメチル化反応を酵素レベルで解明し、有用な知見を示したもので、学問上応用上貢献するところが少なくない。よって、審査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。