

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 高 光 旭

イネにおいては、植物ホルモンであるジベレリンや抗菌性二次代謝産物であるファイトアレキシンなどのユニークな生物活性を有するさまざまなジテルペンが単離同定されてきた。これらのジテルペンは、共通の前駆体であるゲラニルゲラニルニリン酸から二段階の環化とそれに続く数段階の酸化によって生合成されると考えられている。しかしながら、それらの生合成に関与する重要酵素のいくつかについては機能解析が行われておらず、生合成の制御機構についても不明な点が少ない。そこで、本研究においては、ジベレリンやファイトアレキシンの生合成において重要な機能を果たしている P450 酵素の機能解析を行った。また、病原菌誘導のファイトアレキシン生産に関するシグナル伝達系に植物ホルモンであるサイトカイニンが関与する可能性についても追究した。

本研究の背景と目的を述べた第 1 章に続いて、第 2 章ではイネのジベレリン生合成経路における *ent*-カウレンから *ent*-カウレン酸までの 3 段階の酸化反応を触媒する P450 酵素の機能同定について述べている。この酸化反応は CYP701A6 (OsK02) が担うことがイネの *d35^{tan-sinbozu}* 矮性変異体の研究により示唆されているが、*in vitro* での酵素反応による確認はなされていなかった。そこで、イネ CYP701A6 遺伝子とカビ由来 P450 reductase 遺伝子の両方をメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* の染色体内に導入した形質転換体酵母を作製した。メタノール添加により両タンパク質の生産を誘導した酵母からマイクロソーム画分を調製し、*ent*-カウレン及び [²H₂] *ent*-カウレノールを基質として *in vitro* で反応させ、それぞれ、*ent*-カウレン酸、[²H₂] *ent*-カウレン酸への変換を GC-MS により確認した。こうして、OsK02 が *ent*-カウレン酸化酵素として機能することを実証し、また、イネの P450 酵素の機能解析に *P. pastoris* が有用なツールとなる可能性を示した。

第 3 章では、イネのジテルペン型ファイトアレキシンの生合成に関与すると考えられる 2 種の P450 酵素 (CYP99A2、CYP99A3) の機能解析を行った。イネの主要なジテルペン型ファイトアレキシンであるモミラクトン類の生合成に関与するジテルペン環化酵素遺伝子である *OsCPS4* と *OsKSL4*、およびデヒドロゲナーゼ遺伝子 (AK103462) が 4 番染色体上で近接して存在し、さらにその周辺に 2 種の P450 遺伝子 (*CYP99A2/CYP99A3*) が存在している。また、これらの 5 種の遺伝子はイネ培養細胞においてキチンオリゴ糖エリシター処理後同調的に発現が誘導されることも示されていた。そこで、*CYP99A2/CYP99A3* の二重発現抑制株を作製し、得られたセルラインにおけるエリシター処理後のファイトアレキシン集積量を LC-MS/MS により定量した。その結果、*CYP99A2/CYP99A3* 二重発現抑制株においては特異的にモミラクトン類の集積が抑制されていることが示され、CYP99A2 と CYP99A3 の両方、あるいはいずれかがモミラクトン生合成に関与していることが明らかとなった。こうして、4 番染色体に 4 つあるいは 5 つの遺伝子からなるモミラクトン生合成遺伝子クラスターが存在することを明らかにすることができた。高等植物において単一物質の生合成酵素遺伝子がクラスターを形成している例はいくつか知られているが、いずれも構成的に発現

しているものであり、誘導的に発現される遺伝子クラスターはモミラクトン生合成遺伝子クラスターが初めての例と思われる。

第4章では、ジテルペン型ファイトアレキシンの生産誘導に植物ホルモンのサイトカイニンが関与する可能性について追究した。ファイトアレキシンの生産はイネにおける代表的な防御応答の一つであるが、イネの small GTP 結合タンパク質を発現させたタバコ形質転換体では内生サイトカイニンが増加し、病害抵抗性遺伝子の発現誘導が起こることが報告されている。そこで、本章ではイネのファイトアレキシンの生産に対するサイトカイニンの関与を検証するため、ベンジルアデニン (BA) 処理後のイネ培養細胞におけるファイトアレキシンの生産を調べた。その結果、BA 処理により各種ファイトアレキシンの生産誘導、およびその生合成酵素遺伝子群の発現誘導が観察された。またイネ植物体を用いた場合でも同様の結果が得られた。イネいもち病菌が感染したイネにおいてはサイトカイニンの集積量が増加していくことが示されていることを考え合わせると以上の結果は、ファイトアレキシンの生産誘導に至るシグナル伝達経路において、サイトカイニンがシグナル分子として機能していることを示唆している。

以上、本論文は、ジベレリンやファイトアレキシンのイネのジテルペンの生合成において重要な機能を果たしている P450 の機能解析を進めるとともに、ファイトアレキシンの生産制御機構に関する新規知見を提供し、ジテルペンの生合成経路の解明とその制御機構の総合的理解に貢献するものであり、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。