

論文内容の要旨

申請者氏名 Naconsie Maliwan

タバコの主要アルカロイドであるニコチンはオルニチンとアスパラギン酸をそれぞれ出発アミノ酸として生合成される *N*-メチルピロリニウムカチオンとニコチン酸が縮合して生成する。このカチオンは生物に普遍的なジアミンであるプトレッシンから2段階で合成され、2段階目の酵素反応を触媒する酵素が *N*-メチルプトレッシン酸化酵素 (MPO) である。MPO1は *N*-メチルプトレッシンを好んで基質として利用して、酸化的脱アミノ反応を触媒し、銅結合性ジアミン酸化酵素ファミリーに分類される。タバコ植物の進化において、MPO1がどのように生まれたのか、これまで不明であった。本研究では、タバコにおいて MPO1 と相同性の非常に高い類似酵素 (これまで MPO2 と呼ばれていた) を比較対象に選ぶことにより、MPO の分子進化について考察したものである。

本研究の実験結果に基づき、MPO2を DAO1 と改名したので、以下この改変名称を用いる。まず、タバコ植物における両遺伝子の発現パターンを比較したところ、MPO1は他のニコチン生合成酵素と同様に、根で発現し、傷害ホルモンであるジャスモン酸によるシグナル伝達系およびニコチン生合成特異的な ERF 型転写因子により発現制御を受けた。一方、DAO1 はタバコ植物体の多くの組織で低レベルに構成的に発現しており、ジャスモン酸や ERF 型転写因子による制御を受けなかった。

大腸菌で発現させた組換え酵素を用いて基質特異性を調べたところ、MPO1が *N*-メチル化されたジアミンに対して親和性が高いのに対して、DAO1は *N*-メチル化されていないジアミンを好んで基質とした。MPO1と DAO1において異なるアミノ酸残基に着目して、これらの残基を入れ替えた変異型酵素の活性を調べたところ、その一部は基質特異性に寄与していることが判明した。

MPO1と DAO1は共にペルオキシソームに局在することを見出した。両酵素はカルボキシ末端にペルオキシソーム局在モチーフを持っており、このモチーフによりペルオキシソームに運ばれることが明らかとなった。MPO1の低発現によりニコチンが生合成されないタバコ BY-2 培養細胞に野生型の MPO1を発現させるとニコチン生合成が回復するが、ペルオキシソーム局在モチーフを欠失させた変異型 MPO1を発現させてもアルカロイド生合成に変化が起きないことから、ペルオキシソーム局在性が MPO1の機能に必須であることを証明した。

以上のことから、ペルオキシソームにおいてジアミンの酸化的分解経路において機能している DAO から、基質特異性と発現様式を変化させることにより MPO が分子進化したと考察した。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Naconsie Maliwan

アルカロイドなどの植物二次代謝産物（種特異的天然物）の生合成を担う酵素は、一次代謝などの基礎代謝経路の酵素から進化したと考えられる。一方、真核生物は細胞内に種々の細胞内小器官（オルガネラ）を持っており、オルガネラ内においても代謝経路や代謝酵素は存在する。オルガネラの代謝酵素から進化した二次代謝酵素は、その二次代謝経路全体に組み込まれるために、オルガネラ間の代謝中間体の移動が必要となる。このような代謝酵素の分子進化とオルガネラ局在は、いくつかの代謝酵素で研究されているが、ニコチン生合成においてはまだ良くわかっていなかった。

申請者は銅結合性ジアミン酸化酵素ファミリーに属するアミノ酸配列相同性が非常に高い2つのタバコ酵素（MPO1とDAO1）について、両酵素の基質特異性、細胞内局在性、遺伝子発現パターン、タバコ培養細胞を用いた機能相補性実験を行った。これら一連の実験結果より、両酵素はどちらもペルオキシソームに局在するが、MPO1は*N*-メチル化されたジアミンに対して親和性が高いのに対し、DAO1は非メチル化されたジアミンをより好んで基質とすることを見出した。また、DAO1遺伝子は構成的に低レベルで発現しているのに対して、MPO1遺伝子は根でジャスモン酸誘導的に発現が上昇し、ニコチン生合成に特化した発現様式を示すことを明らかにした。さらに、相補実験により、ペルオキシソーム局在がMPO1機能に重要であることを示した。

DAOは他の植物種にも存在することから、ペルオキシソームにおいてジアミンを酸化脱アミノ化することにより、ジアミンの分解経路に機能していると推測される。脱アミノ化に際して発生する過酸化水素を分解するために、ペルオキシソームに局在する利点がある。一方、MPO1はナス科植物が誕生する時点で、DAO遺伝子の重複により生まれた後に、基質特異性と発現様式を変化させることにより、ニコチン生合成経路で機能するように分子進化したものと考察された。また、基質特異性の変化は数少ないアミノ酸残基の変異によりもたらされたものと考えられる。

MPO反応による生成物は細胞内では電荷を持ったカチオン分子として存在すると予想されることから、ペルオキシソーム膜を通過するには輸送体が必要となる。または、このカチオンがペルオキシソーム内で電荷を持たない膜透過性の代謝中間体に変換される可能性もある。

以上のように、本論文はタバコにおいてアルカロイド生合成酵素とジアミン代謝酵素を分子生物学や生化学を用いて解析し、それらの分子進化を考察したもので、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（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。