論文内容の要旨

申請者氏名 庄司 翼

タバコ属植物に蓄積するアルカロイドであるニコチンはその毒性から虫害に対する防御化合物として機能していると考えられている。申請者は分子生物学的な手法を用いてニコチン生合成の発現調節に関して以下の4点を明らかとした。

1) 生合成経路の初発酵素であるプトレッシン N-メチル基転移酵素(PMT)に関して *Nicotiana glauca* の3つの PMT 遺伝子(*NsPMT1*, *NsPMT2*, 及び *NsPMT3*) を単離し、それらの 5'-上流領域を含む塩基配列を決定した。これら3つの遺伝子は互いに高い相同性を示し、翻訳開始点から約 250bp にわたる 5'-上流領域は高度に共通した配列を有していた。*NsPMT1*, *NsPMT2*, 及び *NsPMT3* では 11 アミノ酸残基を単位とした配列がそれぞれ 2 回、5 回、及び 9 回繰り返すリピート領域がスペルミジン合成酵素様のタンパク質の N 末端に付加されていた。3種のタバコ属植物の PMT 遺伝子に関してこの繰り返し配列を比較したところ種間で繰り返し数が変化していることが示され、これら配列は遺伝的に不安定であると考察した。

2) 生合成酵素であるオルニチン脱炭酸酵素、PMT 及び A622 の各遺伝子の発現はジャスモン酸(JA)によって同調的に誘導された。また、それらの JA 応答性はエチレンを同時に処理すると完全に抑えられることが分かった。3つの *NsPMT* 遺伝子と *NsA622* 遺伝子の 5'-上流領域をそれぞれ β -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子に連結し、*N. glauca* に導入したところ、全ての導入遺伝子は JA 処理により誘導され、またその誘導はエチレンにより抑制された。3つの *NsPMT* 遺伝子間で高度に保存された約 250bp の 5'-上流領域がこれらホルモンによる制御に必要であることが示された。

3) ニコチン蓄積量は2つの遺伝子座 *Nic1* と *Nic2* によって制御されている。*Nic* 遺伝子座の変異は複数の JA 応答性のニコチン生合成遺伝子の転写産物量を減少させることから *NIC* 遺伝子はニコチン生合成の制御遺伝子である可能性が示された。PMT と A622 遺伝子に関して *Nic* 依存的な発現に必要な領域を検討したところ、JA 応答性や組織特異的発現に機能する *NsPMT2* (0.25 kb) 及び *NsA622* (1.3 kb) の 5'-上流領域が必要であることが明らかとなった。

4) ニコチン生合成の細胞、組織特異性をウエスタン法、免疫組織化学法、及びプロモーター::GUS 遺伝子を用いた形質転換植物で発現解析した。タンパク質及びプロモーター活性のいずれの場合も PMT と A622 遺伝子はともに根の皮層、内皮、及び木部で特異的に発現していることが明らかとなった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 庄司 翼

高等植物に由来する多種多様な二次代謝産物の中で、特にアルカロイドとして分類される含窒素塩基性化合物は動物に対する薬理活性をもつものが多く、古来より医薬、毒薬、嗜好品として利用されてきた。本論文が研究対象としたタバコ属植物のニコチンも喫煙において習慣性の快感を与える主要アルカロイドとして古くから知られている。本論文はタバコを用いてニコチン生合成酵素の遺伝子発現をいくつかの制御因子に関して詳細に解析してもので、生合成経路の全体的な調節機構を理解するための基本的な知見を与えるものである。

申請者は経路の初発酵素であるプトレッシン N-メチル基転移酵素(PMT)のゲノム遺伝子を *Nicotiana sylvestris* から新たに単離し、構造や発現様式を解析している。酵素遺伝子はしばしば遺伝子ファミリーを形成するが、*N. sylvestris* PMT の場合も3つの遺伝子がファミリーを構成している。本論文ではそれら全ての遺伝子に関して解析を行い、3遺伝子に共通したホルモン応答性や組織特異的発現には遺伝子間で高度に保存された約 250bp の 5'-上流領域が必要であることを明らかにしている。これらの制御領域をさらに解析することにより発現制御に必要な DNA シス配列や転写制御因子の同定につながることを期待される。

ニコチンを蓄積することによってタバコは昆虫などの食害に対する防御に役立っている。ニコチンも他の防御物質と同様に昆虫からの攻撃に反応して蓄積量が増大するが、その情報伝達には傷害ホルモンであるジャスモン酸が機能している。本論文では植物体や毛状根を直接ジャスモン酸で処理することにより複数のニコチン生合成酵素遺伝子が発現誘導されてくることを示すとともに、これらのジャスモン酸応答性がもう1つのストレスホルモンであるエチレンによって完全に抑制されること、これらの生合成遺伝子は共通した遺伝的制御を受けることなどを明らかにした。これらの知見は従来研究されてきたジャスモン酸応答性遺伝子の場合とは部分的に異なっており、ニコチン生合成に特異的な制御機構の存在を示唆している。

本論文はまた、ニコチン生合成酵素 PMT と A622 に関して免疫組織化学やレポーター遺伝子を用いたプロモーター解析によって両遺伝子の細胞、組織特異性を詳細に調べており、ニコチン生合成の場を明らかにした点でも評価できる。

以上のように、本論文はタバコ属植物におけるニコチンアルカロイド生合成遺伝子の発現制御を解析したもので、他のナス科薬用植物が生合成する類似アルカロイドの分子育種にも有用な知見を与えるもので、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。