

## 論文内容の要旨

申請者氏名 鈴木 賢一

申請者は有用トロパンアルカロイドであるスコポラミン生合成の細胞・組織特異性を解析し、スコポラミン生合成制御の全体像を解明することを目的として、スコポラミン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) と最終酵素であるヒヨスチアミン6 $\beta$ 水酸化酵素 (H6H) の2つの酵素の遺伝子単離と発現解析を行っている。

まず、申請者はナス科の薬用植物ベラドンナから2種のPMT遺伝子 (*AbPMT1*、*AbPMT2*) のcDNAと*AbPMT1*のゲノムクローンを単離した。予想される*AbPMT*アミノ酸配列にはタバコPMTに存在するアミノ末端の繰り返し配列は存在しなかったが、アミノ末端以外はタバコPMTと非常に類似したアミノ酸配列であった。ノザン解析、RT-PCRの結果からPMT遺伝子は根特異的に発現しており、その発現量は*AbPMT1*の方が、*AbPMT2*に比べて明らかに多いことが示された。In-situ hybridizationとプロモーター:: $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) 融合遺伝子を用いた形質転換毛状根での発現解析の結果から、*AbPMT1*遺伝子は根の内鞘細胞で特異的に発現しており、さらに5'上流領域約0.3kbに内鞘細胞特異的な発現に必要な情報が全て含まれることが明らかとなった。

次に、申請者はベラドンナから2種のH6Hゲノムクローンを単離し、1つは発現している*AbH6H*遺伝子であり、他方は発現していない偽遺伝子であることを示した。ノザン解析、RT-PCRの結果から*AbH6H*遺伝子は根特異的に発現しており、さらに葯でもその発現を検出した。In-situ hybridization、免疫組織化学、プロモーター:: $\beta$ -GUS融合遺伝子の発現解析の結果から、*AbH6H*遺伝子は根の内鞘細胞で特異的に発現しており、さらに葯のタペタム細胞と花粉母細胞でも発現が確認された。さらに、*AbH6H*遺伝子の5'上流領域約0.7kbはスコポラミンを生合成する薬用植物 (ベラドンナ及びヒヨス) において内鞘細胞特異的にGUSレポーターを発現させるが、スコポラミンを生合成しないタバコでは内鞘細胞での発現特異性が失われることを明らかにした。

本論文によりトロパンアルカロイド生合成経路の初発酵素PMTと最終酵素H6Hの両遺伝子が側根や培養根等の若い根の内鞘細胞で特異的に発現していることが明らかになった。このことから、申請者はトロパンアルカロイド生合成が内鞘細胞内で全て行われている可能性を示唆した。さらに申請者は、内鞘細胞で生合成されたスコポラミンなどのアルカロイドが内鞘細胞に隣接する導管組織に移動し、主根と茎の導管を經由して葉や花などの植物全体で蓄積するというモデルを提唱した。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 鈴木 賢一

高等植物が作り出す多種多様の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生理活性作用が強いものが多く、古来より毒・医薬・嗜好品として利用されてきた。ベラドンナを初めとするナス科薬用植物が蓄積するヒヨスチアミン（別名アトロピン）やスコポラミンは現在でも植物から抽出・精製して利用される汎用性の高い医薬アルカロイドである。スコポラミン生合成経路は初発酵素プトレッシンN-メチル基転移酵素（PMT）、中間段階の還元酵素、最終段階のヒヨスチアミン6 $\beta$ -水酸化酵素（H6H）が知られているが、特定の薬用植物で生合成酵素遺伝子群の発現調節を総括的に調べた研究はこれまでなかった。本論文ではスコポラミン生合成経路の初発並びに最終の酵素遺伝子の発現制御様式をベラドンナにおいて詳細に調べたもので、生合成経路全体の調節機構を理解する上で非常に重要であるばかりでなく、有用アルカロイドを高産生する薬用植物を分子育種する上でも有益な結果を含んでいる。

類似アルカロイドであるニコチンの生合成に係わるPMT遺伝子は既にタバコからクローニングされているが、本論文ではスコポラミン生合成に関与するPMT遺伝子を新たにベラドンナからクローニングし、その構造や発現制御様式をタバコPMT遺伝子と比較している。二次代謝の場合、同一の反応を触媒する酵素遺伝子であってもその反応に係わる最終二次代謝産物の種類により発現制御が大きく異なる可能性がある。実際、本論文で明らかになったベラドンナPMT遺伝子と従来報告されているタバコPMT遺伝子は根で発現するという点では類似しているが、根のどの細胞で発現しているのか、傷害ホルモンであるジャスモン酸で発現誘導されるか、などいくつかの点で顕著な違いが認められている。

ベラドンナPMT遺伝子は根では内鞘細胞特異的に発現しており、この発現特異性はベラドンナH6H遺伝子と同じである。すなわち、スコポラミン生合成経路の初発酵素と最終酵素が内鞘細胞に局在することから、生合成経路全体が内鞘細胞に局在していることを推察している。また、本論文では側根の内鞘細胞で生合成されたスコポラミンが隣接する導管を通して地上部に転流され、全草に蓄積するというモデルを提唱している。

本論文では最後にスコポラミン生合成経路の複数の酵素遺伝子の5'上流領域における保存配列について考察している。本論文では内鞘細胞特異的発現に関与する特定のDNAシス配列を同定するまでには至っていないが、本論文で得られたベラドンナPMT遺伝子とH6H遺伝子の塩基配列情報は、将来スコポラミン生合成に関与するDNAシス配列や特異的転写制御因子の同定に有用である。

以上のように、本論文は薬用植物ベラドンナにおいてスコポラミン生合成経路の2つの酵素遺伝子の発現制御を調べたもので、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。