

論文内容の要旨

申請者氏名 Pakdeechanuan, Phattharaporn

ニコチンを代表とするタバコアルカロイドは *Nicotiana tabacum* (タバコ) の根で合成されたあと、地上部に輸送され、全草に蓄積する。タバコアルカロイドの合成と蓄積はタバコを用いてよく研究されているが、生合成機構の全貌と輸送機構はまだ明らかになっていない。本研究では、互いに近縁の二倍体野生種タバコである *N. alata* と *N. langsdorffii* を用いて、ニコチンの長距離輸送とニコチンからノルニコチンへの変換機構を主に遺伝学的に解析した。

N. langsdorffii 植物体は他の *Nicotiana* 属植物と同様に根でタバコアルカロイドを合成し、それらを葉に蓄積した。一方、*N. alata* 植物体は根でタバコアルカロイドを著量合成するが、葉にはアルカロイドの蓄積が見られなかった。両植物体の地上部と地下部を相互に接木したところ、*N. alata* の地下部をもつ植物のみ、地上部にアルカロイドは蓄積しなかった。両植物の茎から導管液を採取したところ、*N. langsdorffii* の導管液にのみアルカロイドが存在した。また、両植物由来の培養根を液体培養したところ、*N. langsdorffii* 培養根に比べ *N. alata* 培養根では根組織から培養液中に放出されるアルカロイド量が顕著に少なかった。これらの実験結果は、*N. alata* では根のアルカロイド生合成細胞から根の導管へのアルカロイド輸送が阻害されていることを示唆している。さらに、*N. alata* と *N. langsdorffii* の間の雑種を作製して、アルカロイド輸送の遺伝的要因を調べた。F1 では *N. alata* と同様に根から地上部へのアルカロイド転流が阻害されており、根にアルカロイドを保持する形質が優勢であった。F2 植物体集団と戻し交雑集団のアルカロイド解析の結果も、この結論を支持した。

次に、申請者は *N. alata* と *N. langsdorffii* の雑種を用いて、ノルニコチン合成機構を調べている。*N. alata* は他の多くの *Nicotiana* 属植物と同様に葉に著量のノルニコチンを蓄積するが、*N. langsdorffii* ではノルニコチンの蓄積は見られなかった。ノルニコチン生成の主経路は CYP82E サブファミリーに属する P450 モノオキシゲナーゼによるニコチンの脱Nメチル化によることがタバコにおける先行研究で明らかになっている。*N. alata* では4種の *CYP82E* 遺伝子が発現しており、それらは活性のあるニコチン脱Nメチル化酵素をコードしていた。一方、*N. langsdorffii* ゲノムには2種の *CYP82E* 遺伝子が見つかったが、1つはシス制御配列の変異により全く発現しておらず、他の1つはコード領域の1塩基欠失変異により短いタンパク質をコードする mRNA を若干量発現していた。これらの *CYP82E* 遺伝子とノルニコチン蓄積の相関を F2 植物体集団で解析したところ、*N. alata* と *N. langsdorffii* の遺伝子はそれぞれ対立する1遺伝子座に連鎖して存在しており、*N. alata* の *CYP82E* 遺伝子のみがノルニコチン蓄積に寄与していることが判明した。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Pakdeechanuan, Phattharaporn

Nicotiana 属は76以上の種から構成され、ナス科で6番目に大きな属である。南米原産のこの属は動物のアセチルコリン受容体アゴニストとして作用するニコチンを著量蓄積することで知られており、特に *Nicotiana tabacum* (タバコ) がシガレットや葉巻の原料として古くから栽培されている。*Nicotiana* 属野生種の一つである *N. alata* は豊富な花色をもつハナタバコとして近年観賞用に市販されている。ハナタバコはニコチンなどのタバコアルカロイドを地上部にほとんど含まないことが知られているが、なぜこの観賞用タバコ種がアルカロイドを蓄積しないのか不明であった。*N. alata* とその近縁種である *N. langsdorffii* は1910年台から交配され、主に花の形態や色、葉の形状などの形質について遺伝学的な考察がされてきたが、アルカロイドに関する遺伝学的研究はされていなかった。

申請者はこれら2種の *Nicotiana* 属野生種をアルカロイド組成と輸送の研究に始めて利用した。*N. alata* はニコチンとノルニコチンを根で合成するが、これらのアルカロイドは地上部へ転流されない。一方、*N. langsdorffii* はノルニコチンを合成せず、根で合成されたニコチンは効率よく地上部に運ばれる。すなわち、この2種は近縁であるにもかかわらず、アルカロイドの転流とノルニコチン生成という2つの形質に関して大きく異なっている。アルカロイドなどの二次代謝産物が生合成器官から他の器官へ長距離輸送する現象はこれまでにまったく研究されておらず、本研究が初めてである。本研究では、根の生合成細胞から根の導管へのアルカロイド輸送の段階が *N. alata* では阻害されており、この阻害作用は遺伝的に優勢形質として現れた。この転流に関する遺伝子座を特定するまでには至っていないが、将来、原因遺伝子が明らかにされ、器官間の物質輸送機構が解明されることが期待される。

一方、ノルニコチンはヒトの代謝により発がん性物質に変換されることが知られており、ノルニコチン生成機構は商用タバコ種においてよく研究されている。CYP82E型酵素によるニコチンの脱メチル化反応が主要生成経路であることが判明しているが、CYP82E遺伝子破壊変異タバコにおいても微量のノルニコチンが生成することから、副生成経路の存在が議論されている。本研究では *N. langsdorffii* の2種のCYP82E遺伝子が異なる変異機構で不活性化されることにより、この植物ではノルニコチンが全く生成されないことを証明し、副生成経路の存在を否定している。

以上のように、本論文は植物の天然生理活性物質の生合成と器官間輸送の研究に遺伝学的解析を導入し、新たな知見を得たものであり、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(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。