

(様式 11)

平成 26 年 2 月 20 日

学 位 論 文 審 査 要 旨 (課程博士)

東京農工大学大学院工学府長 殿

審査委員	主査	小関 良宏	印
	副査	早出 広司	印
	副査	宮浦 千里	印
	副査	長澤 和夫	印
	副査	中村 暢文	印
	副査	村上 ゆり子	印

学位申請者	生命工学専攻    平成 24 年度入学    学籍番号 12831104
	氏 名    西崎 雄三
申請学位	博 士 (工学)
論文題目	Contribution of acyl-glucose to anthocyanin modification in vacuole (アントシアニンの液胞内修飾におけるアシルグルコースの寄与)
論文審査要旨 (2000 字程度) 様々な花は、その多種多様な花色で私たちの生活を豊かにしてくれる。特に花色の中でも青色は多くの人々に好まれる色であるのに対し、青色を呈する花は少ない。このためバラやカーネーションにおいては遺伝子導入によって青色花の作出が試みられている。しかし、それら遺伝子組換えバラやカーネーションの花色は真の青色ではなく、紫色がかったものである。代表的な青色花の 1 つとしてデルフィニウムがある。本申請者は本論文において、デルフィニウムの花 (萼片) が青色を呈する原因を明らかにすることを主たる目的とした。 第 1 章においては、花において青色を呈する機構について、これまでの知見をまとめた。多くの青色を呈する色素分子はアントシアニンの一種であるデルフィニジン骨格を有し、さらにそのデルフィニジンの 7 位にグルコースが結合することを Matsuba ら (2010) が報告した。それを司る酵素は液胞型の acyl-glucose dependent anthocyanin glucosyltransferase (AAGT) であり、糖供与体は、これまでに報告されてきた細胞質型配糖化酵素のそれである UDP-glucose ではなく、acyl-glucose であり、カーネーションにおいてはアントシアニンの 5 位に、デルフィニウムにおいては 7 位に糖が転移されるのは、この AA5/7GT によるものであることを Matsuba ら (2010) が明らかにした。デルフィニウムにおいてはその 7 位にさらに <i>p</i> -hydroxybenzoic acid (pHBA) が、さらにその先に glucose が、さらにその先にもう 1 つ pHBA が直鎖状に結合し、その鎖状につながった側鎖が折れ曲がってアントシアニン分子の中において分子内スタッキングが生じて青色化することを既報の文献から明らかにし、液胞内におけるアントシアニンの修飾	

メカニズムについて解明することの重要性を明確にし、これを本論文の目的として設定した。

第 2 章においては、まずカーネーションにおいて生化学的、分子生物学的および逆遺伝学的に *AA5GT* がアントシアニンの 5 位への配糖化酵素遺伝子であることが Matsuba ら (2010) によって示されていたが、遺伝学的な証明が欠落していることを明確化した。そこで、様々なカーネーション変異品種をスクリーニングし、アントシアニンの 5 位への配糖化という生化学的な表現型を示さない変異体において、*AA5GT* がレトロトランスポゾンによって遺伝子破壊されていることを見だし、遺伝学的に *AA5GT* 遺伝子がその配糖化酵素の責任遺伝子であることを明らかにし、これまでに欠落していた証拠を提示したと認められた。

第 3 章において、青色デルフィニウム萼片から得た酵素抽出液において、酵素反応液の中に *p*-hydroxybenzoyl-glucose (pHBG) を加えておくことで、アントシアニンの 7 位の糖の次に pHBA、その次に 2 番目の glucose、さらにその次に 2 番目の pHBA がシーケンシャルに直鎖状に結合していくことを試験管内の反応において見いだした。そこで、その pHBA の結合を触媒している酵素として、3 つの serine carboxypeptidase like (SCPLP) 候補遺伝子 cDNA を獲得した。これに対し、pHBA を結合していない変異体品種を探し出し、そこにおいてはその 3 つの候補遺伝子の中の 1 つの遺伝子のエキソン内に stop codon となる塩基置換突然変異が生じており、その転写産物が変異体内において検出限界以下であるという分子生物学の証拠、さらに野生型品種においては、その遺伝子が萼片におけるアントシアニン合成時に特異的に発現が誘導されるという生理学的証拠を呈示し、組換えタンパク質による酵素活性の検出という生化学的証拠が得られていないものの、十分にここで得られた SCPLP 遺伝子が pHBA 転移の責任遺伝子であることを証明したものとと言える。また 2 番目の AAGT に対する cDNA を得て、組換えタンパク質において pHBA 残基に pHBG を糖供与体として glucose が結合することを生化学的に証明した。これらの結果から、pHBG はアントシアニン分子のアシル基修飾および糖修飾反応において、アシル基供与体と glucose 供与体として一物二役を果たしていることを示し、これを新たに “Zwitter donor” と命名して植物学最高権威の雑誌である *Plant Cell* に発表し、世界中に広く受け入れられた新しい概念を呈示したものであり、この点において審査員一同、高い評価をした。

第 4 章において、この Zwitter donor である pHBG 合成酵素について、pHBG の合成が細胞質内において UDP-glucose を糖供与体とする UDP-glucose dependent glucosyltransferase であることを示すとともに、その遺伝子について、変異体を用いた遺伝学的証拠および組換えタンパク質における酵素活性の解析という生化学的証拠から、これを同定することに成功した。すなわち Zwitter donor は細胞質で合成され、これが液胞に輸送されて、液胞内に存在しているアシル基転移酵素および糖転移酵素の共通の供与体になっていることを証明したものであり、この総合的な理解と機作の解明は高く評価された。

これらの研究成果を第 5 章において総括するとともに、遺伝子組換えによって真に青いバラ、青いカーネーションを産み出すことは、本論文で得られた遺伝子群を導入することによって可能となることを呈示し、応用面において重要な発見であることが評価された。

以上の審査結果から、博士 2 年生で早期博士号取得を目指した申請者において、本論文は十分に博士論文として十分に高い評価をできるものと審査員一同の意見が一致した。