

(様式 5)

指導教員 承認印	
-------------	--

平成 24 年 12 月 11 日

学位（博士）論文の和文要旨

論文提出者	工学府博士後期課程 生命工学 専攻 平成 24 年度入学 学籍番号 12831104 氏名 西崎 雄三 印
主指導教員 氏 名	小関 良宏
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)
<p>植物色素の一種であるアントシアニンは、糖や有機酸によって修飾されることで植物細胞の液胞において多種多様な色彩を呈する。アントシアニンの配糖化は、UDP-sugar dependent glycosyltransferase (UGT)、アシル化は acyl-CoA dependent acyltransferase によって触媒されることが数多くの植物種から報告されており、またこれらの反応の場は細胞質であることも明らかとなっている。近年、いくつかの植物種から液胞局在型のアシル基転移酵素が報告された。これらはアシルグルコースをアシル基供与体とする acyl-glucose dependent acyltransferase (AGAT) であることが明らかにされている。一方、当研究室では、カーネーションにおけるアントシアニン 5 位の配糖化とデルフィニウムにおける 7 位の配糖化が AGAT と同じく、液胞局在型の糖転移酵素によって触媒されることを明らかにした。さらに、これらもまたアシルグルコースを糖供与体とすることから acyl-glucose dependent anthocyanin 5/7-O-glucosyltransferase (AA5/7GT) と命名された。このように近年、液胞局在型の修飾酵素が注目されているが、これまでの報告は、AGAT あるいは AAGT のどちらか一つに着目したものであった。</p> <p>デルフィニウムは青い花として人気があるが、その色彩はアントシアニンの 7 位が AA7GT によってグルコースが修飾された後、そのグルコースに対してさらに複数の芳香族有機酸である <i>p</i>-hydroxybenzoic acid (pHBA) とグルコースが交互に結合しているポリアシル化アントシアニンを合成することで、青色化している。AA7GT が液胞局在型の修飾酵素であることを考慮すると、その後のアシル化と配糖化も液胞局在型の AGAT と AAGT によって触媒されると考えられた。そこで本研究では、当研究室で単離されたカーネーションにおける新規の AA5GT 遺伝子のゲノム解析と、そしてデルフィニウムにおける AA7GT 反応後のアシル化と配糖化に関わる AGAT と AAGT に着目して解析をおこなった。</p>	

本論文は以下の五章から構成されている。

第一章「General introduction」では、植物に特有な二次代謝経路の役割とアントシアニン生合成に関連したこれまでの知見を示し、本研究の目的と意義を記した。

第二章「Structure of the acyl-glucose-dependent anthocyanin 5-*O*-glucosyltransferase gene in carnations and its disruption by transposable elements in some varieties」では、カーネーションにおける *AA5GT* 遺伝子のゲノム解析を行った。解析の結果、5 位が配糖化されたアントシアニンを蓄積する品種においては、12 のエキソンと 11 のイントロンで構成される *AA5GT* ゲノム配列であることを明らかにした。一方で、アントシアニンの 5 位が配糖化されていない品種においては、*AA5GT* ゲノム配列の第 10 エキソンに *Ty1/copia* 様のレトロトランスポゾンである *Ty1dic1* が挿入された *AA5GT/Ty1dic1* ゲノム配列と、別の品種においては、第 5 イントロンに LINE 様レトロトランスポゾンの *Retdic1* が挿入された *AA5GT/Retdic1* ゲノム配列が単離された。さらに *AA5GT* ゲノム配列をプローブとしてサザンブロッティングを行った結果、*AA5GT* 遺伝子は、ゲノム内に 1 コピーのみであり、*AA5GT/Ty1dic1*, *AA5GT/Retdic1* は正常型の *AA5GT* と対立遺伝子であることが明らかとなり、当研究室で単離された新規の *AA5GT* 遺伝子は、遺伝学的、分子生物学的に間違いなくアントシアニンの配糖化に関わる酵素遺伝子であることを明らかにした。

第三章「*p*-Hydroxybenzoyl-glucose is a Zwitter donor for the biosynthesis of 7-polyacylated anthocyanin in delphinium」では、酵素合成によって調製したアントシアニン 7 位配糖体を受容体、アシルグルコースの一種である *p*-hydroxybenzoyl-glucose (pHBG) を供与体として、デルフィニウム萼片から抽出した粗酵素液を用いて酵素反応を行ったところ、まず 7 位に結合しているグルコースに pHBA が結合し、次にその pHBA に二つ目のグルコースが結合し、そして、この二つ目のグルコースに対してさらに pHBA が結合する計三つのアシルグルコース依存的な新たな反応を検出することに成功した。先に報告された *AA7GT* を含めて計四つのこれらの反応には、pHBG が必要不可欠であり、pHBG は、AGAT と AAGT の共通の供与体、Zwitter donor であることを明らかにした。さらに今回見出した三つの反応を触媒する各々の酵素遺伝子を単離同定することに成功した。

第四章「Identification of the glucosyltransferase gene supplying *p*-hydroxybenzoyl-glucose required to 7-polyacylation of anthocyanin in delphinium」では、pHBG の生合成について着目した。アントシアニンの 7 位がポリアシル化されていない、モーブ色のデルフィニウムを 5 品種見出した。その内の 1 品種は、*AA7GT* が機能しておらず、その結果、アントシアニンの 7 位がポリアシル化されないことを明らかにした。残りの 4 品種については、*AA7GT* は正常に機能しているが、アントシアニン 7 位のポリアシル基の供与体である Zwitter donor の pHBG が蓄積しておらず、これは pHBA を受容体として pHBG を合成する *UGT* 遺伝子の発現が、正常型のデルフィニウム品種に対して消失もしくは著しく低下した結果であることを明らかにした。

第五章「General discussion」では、本研究を総括し、今後の展望を記した。