

審査の結果の要旨

氏名 叶 忠峰

本研究は、イネにおける主要なジテルペン型ファイトアレキシンとして知られる momilactone や phytocassane の生合成経路を明らかにすることを目的として、それらの生合成中間体であると考えられているジテルペン炭化水素の ^{13}C 標識体を作成し、イネへの投与によって植物体内における真の生合成経路の解析を行ったものである。

本研究の背景と目的を述べた第1章に続き、第2章では、 ^{13}C 標識されたメバロン酸 ($[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{mevalonate}$) を出発物質として、momilactone の前駆体として $[\text{U-}^{13}\text{C}_{20}] \text{syn-pimara-7,15-diene}$ を、また、phytocassane の前駆体として $[\text{U-}^{13}\text{C}_{20}] \text{ent-cassa-12,15-diene}$ を試験管内の酵素変換により作製した。得られた標識化合物の化学構造を GC-MS および NMR により確認し、変換効率が 60% 以上であることから、効率的に標識ジテルペン化合物の供給が可能な手法の確立に成功した。

続く第3章では、酵素合成した $[\text{U-}^{13}\text{C}_{20}] \text{ent-cassa-12,15-diene}$ と $[\text{U-}^{13}\text{C}_{20}] \text{syn-pimara-7,15-diene}$ をイネ植物体に投与し、最終産物である momilactone と phytocassane に ^{13}C 標識が導入されることを確かめた。その際、標識化合物の取り込み効率が最適な実験条件を、植物体組織の種類、投与の濃度と回数などについて検討し、イネの幼苗を用いる方法とリーフディスクを用いる方法の2つの方法で、効率的な標識化合物の取り込みが起こることを示した。投与実験の結果から、 $[\text{U-}^{13}\text{C}_{20}] \text{ent-cassa-12,15-diene}$ が主要な phytocassane である phytocassane B, C, E に、また、 $[\text{U-}^{13}\text{C}_{20}] \text{syn-pimara-7,15-diene}$ が momilactone A, B にまで植物体内で変換されることを LC-MSMS 分析により示し、これらの前駆体ジテルペン炭化水素から最終産物であるファイトアレキシンにつながる生合成経路が、植物体内に確かに存在することを証明した。

第4章においては、第3章までに確立した投与実験の系を、phytocassane の生合成能が変化したシトクロム P450 酸化酵素遺伝子の抑制株に対し利用することで、未知の生合成中間体探索を行った。まず、全ての phytocassane の生産が認められないイネ *CYP76M7/M8* RNAi 抑制株に $[\text{U-}^{13}\text{C}_{20}] \text{ent-cassa-12,15-diene}$ を投与することで、蓄積が予想される生合成中間体を GC-MS 分析により探索したところ、野性型株には存在せず、抑制株で顕著に蓄積する化合物 (compound I, compound II) のシグナルを認めた。これら2つの化合物のマスペクトル解析

の結果、compound I は、CYP701A8 による試験管内変換で *ent*-cassa-12,15-diene から与えられることが報告されていた *3 α* -hydroxy-*ent*-cassadiene であることが判明した。また、compound II についても、*3 α* -hydroxy-*ent*-cassadien-2-one の既知マススペクトルと一致したことから、これらの2つの化合物が CYP76M7/M8 RNAi 抑制株において蓄積しており、CYP76M7/M8 が *phytocassane* 生合成経路において、これらの化合物の生産を担う可能性が強く示唆された。また、蓄積したこれらの化合物のほとんどはネイティブな ^{12}C からなる化合物であると考えられたが、[U- $^{13}\text{C}_{20}$] *ent*-cassa-12,15-diene の特徴的なマスフラグメンテーションを用いた selected ion monitoring を行うことで、これらの化合物には確かに ^{13}C 標識体が含まれることを示し、*ent*-cassa-12,15-diene から、*3 α* -hydroxy-*ent*-cassadiene、*3 α* -hydroxy-*ent*-cassadien-2-one を経て生合成される、*phytocassane* 生合成経路の初期段階の詳細を明らかにした。同様な手法により、*phytocassane* 生合成に関与する他の変異体系統 (*cyp71z7T*-DNA ライン) への[U- $^{13}\text{C}_{20}$] *ent*-cassa-12,15-diene 投与実験を行い、*phytocassane* 生合成の中間体候補である 1-deoxy*phytocassane* C と 2-deoxy*phytocassane* A についても生合成中間体である可能性を強く示唆し、*phytocassane* 生合成経路の解明に大きく寄与する結果を得た。

第5章では、ジテルペン型ファイトアレキシンを生産する栽培イネ以外の非モデル植物を対象として ^{13}C ジテルペン炭化水素の投与実験を行い、生合成経路の遺伝子情報が少ない蘚類ハイゴケ *Hypnum plumaeforme* における momilactone 生合成経路、また、*Oryza* 属の近縁他属植物である *Leersia perrieri* における *phytocassane* 生合成経路が、栽培イネと同様に *syn*-pimara-7,15-diene と *ent*-cassa-12,15-diene を経由すること示し、本研究で構築した ^{13}C 標識ジテルペン化合物を用いた実験系の非モデル植物への応用の有効性を示した。

最後に第6章にて、研究の総括と、今後の展望・課題について議論を行った。

以上、本研究は、 ^{13}C 標識ジテルペン化合物の作製と投与系の構築を基盤として、モデル植物である栽培イネおよび非モデル植物におけるジテルペン型ファイトアレキシン生合成経路の解明を大きく進めたものである。これらの研究成果は、学術上、応用上寄与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（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。