

氏 名 (本 國 籍)	濱 田 勝 義 (鳥取県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 290 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 15 年 3 月 13 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学 位 論 文 題 目	シリングルリグニン生合成におけるケイヒ酸類の 関与
審 査 委 員 会	主査 静岡大学 教 授 西 田 友 昭 副査 静岡大学 教 授 滝 欽 二 副査 岐阜大学 教 授 篠 田 善 彦 副査 信州大学 教 授 徳 本 守 彦

論 文 の 内 容 の 要 旨

広葉樹に存在するシリングルリグニンの生合成においては、従来、フェルラ酸 (FA) がシナップ酸 (SA) へ変換された後、CoA エステル体を経てシナピルアルコールにまで変換されるとするケイヒ酸経路が提案されてきた。しかしながら、近年、*p*-クマール酸もしくはカフェー酸からケイヒアルデヒドもしくはケイヒアルコール経路を経てシナピルアルコールにまで変換されるとする経路が提案されるようになり、SA を経由するシリングルリグニンの生合成経路については疑問視されるようになった。そこで本論文では、ケイヒ酸類である FA 及び SA を経由するシリングルリグニン生合成経路が広葉樹に存在し得るのかを検討し、これらケイヒ酸類のシリングルリグニン生合成への関与を明らかにすることを目的とした。

FA あるいは SA をポプラカルスに投与した結果、投与した FA は効率的にグアイアシル及びシリングルリグニンへ取り込まれたことから、FA はリグニン前駆体となり得ることが示唆された。一方、投与した SA は直接リグニンへ取り込まれなかったことから、ポプラカルスにおいて、SA はリグニン前駆体になり得ないと判断された。しかしながら、SA 投与カルスにおいて顕著なシリングルリグニン量の増加が観察され、SA 投与がシリングルリグニン生合成を活性化する可能性を見いだした。そこで、SA 投与とシリングルリグニン生合成の関係を検討した結果、SA 投与によって FA に対する 4CL 活性が顕著に増加した。この結果と、FA が効率的にリグニンへ取り込まれた結果を合わせると、ポプラカルスにおいては FA からフェルロイル CoA を経由した後、ケイヒアルデヒドあるいはケイヒアルコール経路を経てシリングルリグニンが生合成

されるものと考えられた。さらに、SA 投与によってシリングルリグニン生合成に関与する酵素群の活性及び発現量が増加し、これらの酵素産生（遺伝子発現）を制御する MYB 発現量も著しく増加したことから、SA 投与はカーボンフローをシリングルリグニン生合成へ導き、シリングルリグニン生合成に関わる一連の遺伝子発現を活性化する可能性が示唆された。

一方、ニセアカシアにおいては、Developing xylem から調製した粗酵素によって、 ^{14}C ラベル SA がシナポイル CoA へ変換されることを明らかにし、さらには SA に活性を有する 4CL アイソザイムが 2 種類存在することを見いだした。また、ニセアカシアから調製した粗酵素によって、FA から SA への変換も確認された。これらの結果より、ニセアカシアにおいては FA がケイヒ酸レベルで SA に変換された後、シナポイル CoA を経てシナピルアルコールへ変換されるシリングルリグニン生合成経路が存在すると判断された。

以上の結果から、①広葉樹の樹種間でシリングルリグニンの生合成経路は異なる可能性、②ポプラカルスにおいては、SA がシリングルリグニン生合成を活性化する転写活性因子もしくは転写誘導物質として機能する可能性を見いだした。

審 査 結 果 の 要 旨

従来、シリングルリグニンの生合成においては、フェルラ酸 (FA) がシナップ酸 (SA) に変換された後、CoA エステル体を経てシナピルアルコールにまで変換されるというケイヒ酸経路の存在が提案されてきた。しかしながら、近年、*p*-クマール酸もしくはカフェー酸が、対応する CoA エステル体を経てケイヒアルデヒドあるいはケイヒアルコールに変換され、これらが水酸化及びメチル化を受けてシナピルアルコールにまで変換されるという経路が提案されるようになり、SA を経由するシリングルリグニンの生合成経路については疑問視されるようになった。そこで本論文では、ケイヒ酸類である FA 及び SA を経由するシリングルリグニンの生合成経路が広葉樹に存在し得るのかを検討し、これらケイヒ酸類のシリングルリグニン生合成への関与を考察している。

まず、FA と SA をポプラカルスに投与し、これらのケイヒ酸類がリグニン前駆体となりリグニンへ変換され得るのか（取り込まれるのか）を検証している。その結果、投与した FA は効率的にグアイアシル及びシリングルリグニンへ取り込まれたことから、FA はリグニン前駆体になり得るとしている。これに対して、投与した SA は直接リグニンへ取り込まれなかったことから、SA はリグニン前駆体になり得ないと結論しているが、SA 投与カルスにおいては顕著なシリングルリグニン量の増加が認められたことから、SA がシリングルリグニン生合成を活性化する可能性を見いだしている。

そこで次に、SA 投与によってシリングルリグニン生合成が活性化されるのかを、リグニン生合成に関与する酵素群の活性及び発現量とその遺伝子発現を制御する MYB の発現量を追跡することで検証している。ポプラカルスの 4CL (4-Coumarate:CoA ligase) は、*p*-クマール酸及び FA に高い活性を示し、カフェー酸及び SA には活性を示さないが、SA 投与によって FA に対する 4CL 活性が顕著に増加したことから、ポプラカルスにおいては FA からフェルロイル CoA を経由した後、ケイヒアルデヒドあるいはケイヒアルコール経路を経てシリングルリグニンが生合成されると考察している。なお、SA を投与することで PAL (Phenylalanine ammonia-lyase) 活性、C4H (Cinnamate 4-hydroxylase) 発現量、FA に対する 4CL 活性及び F5H (Ferulate 5-hydroxylase) 発現量が増加したことから、カーボンフローがシリングルリグニン生合成へ導かれ、シリングルリグニン生合成が活性化される可能性を指摘している。また、リグニン生合成関連遺伝子の発現を制御する MYB 発現量

も著しく増加したことから、SA は MYB の発現を直接またはシグナル伝達系を介して誘導し、シリングルリグニン生合成に関わる一連の遺伝子発現を活性化する可能性も見いだしている。

一方、ニセアカシアにおいては、SA がシリングルリグニンへ取り込まれると報告されていることから、ニセアカシアから SA に活性を有する 4CL の存在を検索し、SA を経由するシリングルリグニン生合成経路の存在を検討している。ニセアカシア Developing xylem から調製した粗酵素によって、 ^{14}C でラベルした SA がシナポイル CoA へ変換され、SA と他のケイヒ酸類が共存する場合でも、SA からシナポイル CoA への変換は阻害されないことを明らかにしている。次いで、Mono Q による 4CL アイソザイムの分画を行い、それらの画分の基質特異性を検討した結果、ニセアカシアには 3 種の 4CL アイソザイムが存在し、その内の 2 種は SA に活性を有することを見いだしている。さらに、ニセアカシアから調製した粗酵素によって、FA から SA への変換も確認されたことから、ニセアカシアにおいては FA がケイヒ酸レベルで SA に変換された後、シナポイル CoA を経てシナピルアルコールへ変換されるシリングルリグニン生合成経路が存在すると結論している。

これらの結果から、①ポプラカルスにおいては、FA から SA への変換とそれに続く SA からシナピルアルコールへの変換は起こらず、FA からフェルロイル CoA を経由するケイヒアルデヒドあるいはケイヒアルコール経路でシリングルリグニンが生合成される、②これに対してニセアカシアでは、FA より SA を経由するケイヒ酸経路でシリングルリグニンが生合成されると結論しており、広葉樹の樹種間でシリングルリグニンの生合成経路は異なることを明らかにしている。

以上のように、本論文はシリングルリグニン生合成におけるケイヒ酸類の役割について新規な知見を明らかにしていることから、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

基礎となる学術論文

- 1) Treatment of poplar callus with ferulic and sinapic acids I: incorporation and enhancement of lignin biosynthesis. J. Wood Sci.,(日本木材学会), in press.
- 2) Treatment of poplar callus with ferulic and sinapic acids II: effects on related monolignol biosynthetic enzyme activities. J. Wood Sci.,(日本木材学会), in press.