

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	モハマド バシュニ
題 目	マングローブにおけるテルペノイド生合成に関する研究 (Studies on Terpenoid Biosynthesis of Mangrove Tree Species)
<p>マングローブは熱帯・亜熱帯の汽水域に生育する耐塩性の強い植物であり、種々の炭素骨格のテルペノイドを含有していることが知られている。しかしながら、これらのテルペノイドの生理学的役割については不明な点が多い。そこで、本研究はマングローブにおけるテルペノイドの生合成と耐塩性との関わりについて追究し、テルペノイドの生理学的役割の解明に寄与することを試みた。</p> <p>まず、沖縄に自生するマングローブのテルペノイド組成を明らかにするため、7種のマングローブの葉と根から調整した不ケン化物のテルペノイド組成を分析した。不ケン化物は主にテルペノイドと植物ステロールによって占められていた。テルペノイドと植物ステロールはそれぞれ11種と6種の成分より成り、テルペノイドではルペオール、<math>\beta</math>-アミリン、タラキセロール、植物ステロールでは<math>\beta</math>-シトステロール及びスチグマステロールが主要な成分であった。根のテルペノイド組成は必ずしも葉に類似しておらず、根のテルペノイドは葉からの輸送ではなくその場で合成されているものと考えられた。さらに、根においては内側より外側でテルペノイド濃度が高く、何らかの保護機能を有していることが示唆された。</p> <p>次いで、メヒルギ、オヒルギ、ヤエヤマヒルギから5つのテルペノイド合成遺伝子をクローニングし、それぞれ <i>KcMS</i>、<i>BgbAS</i>、<i>BgLUS</i>、<i>RsM1</i>、<i>RsM2</i> と名付けた。これらの遺伝子を酵母変異株 (GIL 77) に導入して、遺伝子の機能発現解析を行った。その結果、<i>BgbAS</i> と <i>BgLUS</i> はそれぞれ<math>\beta</math>-アミリンとルペオール合成酵素であることが、<i>RsM1</i> はジャーマニコール、<i>RsM2</i> はタラキセロール、<i>KcMs</i> はルペオールをそれぞれ主に産生する多機能型テルペン合成酵素であることが明らかになった。これらの遺伝子の分子進化系統解析において、<i>BgbAS</i> と <i>RsM1</i> は<math>\beta</math>-アミリン合成酵素と高い相同性を示し、系統樹上<math>\beta</math>-アミリン合成酵素のグループに配置された。一方、<i>BgLUS</i> と <i>KcMS</i> は<math>\beta</math>-アミリン合成酵素に近い新しいルペオール合成酵素に分類され、<i>RsM2</i> はルペオール合成酵素から<math>\beta</math>-アミリン合成酵素に進化する最初の段階の多機能型酵素のグループに配置された。</p> <p>続いて、植物ステロールの合成酵素をコードしていると期待される遺伝子をメヒルギとヤエヤマヒルギからクローニングし、<i>KcCAS</i> と <i>RsCAS</i> と命名した。これらの遺伝子は、機能発現解析により両者ともシクロアルテノール合成酵素であることが明らかになった。</p> <p>最後に、これらの遺伝子の発現と塩濃度との相関について検討した。メヒルギのテルペノイド合成遺伝子 <i>KcMS</i> の mRNA レベルは塩濃度上昇に伴い増加した。同様にオヒルギの <i>BgLUS</i> と <i>BgbAS</i> の mRNA レベルも塩負荷により上昇した。しかしながら、植物ステロール生合成遺伝子 <i>KcCAS</i> の mRNA レベルは塩濃度の影響を受けず、テルペノイドが耐塩性形質に寄与していることが示唆された。さらにオヒルギとメヒルギ苗木のテルペノイドの絶対濃度は塩分負荷により上昇し、耐塩性におけるテルペノイドの関与を支持しているものと考えられた。</p>	

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	Mohammad Basyuni
題 目	Studies on Terpenoid Biosynthesis of Mangrove Tree Species (マングローブにおけるテルペノイド生合成に関する研究)
<p>Mangroves plants are distributed in the inter-tidal zone of tropical or sub-tropical area and prosperous sources of triterpenoids alcohols mostly derived from oleanane, lupane, and ursane type of terpenoids. Despite the ubiquitous distribution of terpenoids in mangrove trees, their physiological functions are not well understood. The present study thus sheds the light on the biosynthesis of terpenoid with the special emphasis on its relevance to salt tolerance.</p> <p>First of all, nonsaponifiable lipid composition (NSL) of Okinawan mangroves were analyzed to characterize their terpenoid profile. Triterpenoids and phytosterols comprised the major proportion of NSL. The terpenoids and phytosterols mainly consisted of 11 and 6 compounds, respectively. The major components were lupeol, <math>\beta</math>-amyrin and taraxerol for terpenoids, and were <math>\beta</math>-sitosterol and stigmasterol for phytosterols. Terpenoid compositions of the root are not always similar to that of leaf, suggesting that terpenoids in the root are produced by biosynthesis in situ, not a translocation of the synthate from the leaf. Terpenoids existed in greater proportion in the outer parts of the root, suggesting the protective roles of terpenoids in mangrove.</p> <p>The diversity in the NSL composition has been noted with mangrove species for both leaves and roots, implying the occurrence of divergent enzyme systems for biosynthesis. Despite diversity in the carbon skeleton, all triterpenes and phytosterols are biosynthesized from a common precursor substrate 2,3-oxidosqualene <i>via</i> oxidosqualene cyclases (OSCs). To get more insight into the physiological significance of terpenoid, gene cloning of terpenoids synthase was attempted. Five OSC cDNAs were cloned from young root of <i>Kandelia candel</i> and the leaves of <i>Bruguiera gymnorrhiza</i> and <i>Rhizophora stylosa</i> by a homology-based PCR method. The open reading frames (ORFs) of full-length clones termed <i>KcMS</i>, <i>BgbAS</i>, <i>BgLUS</i>, <i>RsM1</i> and <i>RsM2</i> were ligated into yeast expression plasmid pYES2 under the control of the <i>GAL1</i> promoter. Expression of <i>BgbAS</i> and <i>BgLUS</i> in a lanosterol synthase deficient <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Erg7) strain GIL77 resulted in the production of <math>\beta</math>-amyrin and lupeol. This showed that the gene encoded <math>\beta</math>-amyrin and lupeol synthase, respectively. Furthermore, <i>RsM1</i> produced germanicol, <math>\beta</math>-amyrin, and lupeol in the ratio of 63:33:4, whereas <i>RsM2</i> produced taraxerol, <math>\beta</math>-amyrin, and lupeol in the proportions 70:17:13. The <i>KcMS</i> transformant accumulated a mixture of lupeol, <math>\beta</math>-amyrin and <math>\alpha</math>-amyrin in 2:1:1 ratio. These results indicated that these were multifunctional triterpene synthases. Phylogenetic analysis and sequence comparisons revealed that <i>BgbAS</i> and <i>RsM1</i> showed high similarities to <math>\beta</math>-amyrin synthases, and were located in the branch of <math>\beta</math>-amyrin synthase. <i>BgLUS</i> and <i>KcMS</i> formed a new branch for lupeol synthase that was closely related to the <math>\beta</math>-amyrin synthase cluster, while <i>RsM2</i> was found in the first branch of the multifunctional triterpene synthase evolved from lupeol to <math>\beta</math>-amyrin synthase.</p> <p>Furthermore, cDNAs expected to encode the OSCs for phytosterol biosynthesis were cloned from roots of <i>K. candel</i> and leaves of <i>R. stylosa</i>: <i>KcCAS</i> and <i>RsCAS</i>. Functional expression of these genes found that both <i>KcCAS</i> and <i>RsCAS</i> encoded cycloartenol synthase.</p> <p>Finally, correlation between mRNA expression of these genes and salt concentration was examined. mRNA level of <i>KcMS</i> was increased with salt concentration in both roots and leaves of <i>K. candel</i>. Similarly, salt stress increased the mRNA levels of <i>BgLUS</i> and <i>BgbAS</i> in the root of <i>B. gymnorrhiza</i>. In contrast to these observations, the mRNA level of <i>KcCAS</i> was not modulated by salt stress in the roots, and decreased in the leaves. These results therefore suggest that the terpenoid but phytosterols are playing important role to cope with the salt stress in mangrove root. The concentration and proportion of terpenoids increased with salinity in the seedling of <i>K. candel</i> and <i>B. gymnorrhiza</i>, providing additional evidence for the protective role of terpenoids against salt stress.</p>	

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏名	モハマド バシュニ
審査委員	主査 琉球 大学・教授 屋 宏典
	副査 琉球 大学・教授 金城 一彦
	副査 佐賀 大学・教授 野瀬 昭博
	副査 琉球 大学・教授 馬場 繁幸
	副査 鹿児島大学・教授 徳永 正雄
審査協力者	
題 目	Studies on Terpenoid Biosynthesis of Mangrove Tree Species (マングローブにおけるテルペノイド生合成に関する研究)
<p>マングローブは熱帯・亜熱帯の汽水域に生育する耐塩性の強い植物であり、種々の炭素骨格のテルペノイドを含有していることが知られている。しかしながら、これらのテルペノイドの生理学的役割については不明な点が多い。そこで、本研究はマングローブにおけるテルペノイドの生合成と耐塩性との関わりについて追究し、テルペノイドの生理学的役割の解明に寄与することを目的とした。</p> <p>まず、沖縄に自生するマングローブのテルペノイド組成を明らかにするため、7種のマングローブの葉と根から調整した不ケン化物のテルペノイド組成を分析した。不ケン化物の主要な脂質成分はテルペノイドと植物ステロールであった。テルペノイドと植物ステロールについてはそれぞれ11種と6種の成分が検出され、テルペノイドではルペオール、<math>\beta</math>-アミリン、タラキセロール、植物ステロールでは<math>\beta</math>-シトステロール及びスチグマステロールが主要成分であった。根のテルペノイド組成は必ずしも葉に類似しておらず、このことは根のテルペノイドがその場で合成されているとことを示していると考えられた。さらに、根においては内側より外側でテルペノイド濃度が高く、何らかの保護機能を有していることが示唆された。</p>	

次いで、メヒルギ、オヒルギ、ヤエヤマヒルギから5つのテルペノイド合成遺伝子 *KcMS*、*BgbAS*、*BgLUS*、*RsM1*、*RsM2* をクローニングした。これらの遺伝子を酵母変異株 (GIL 77) に導入して、遺伝子の機能発現解析を行った。その結果、*BgbAS* と *BgLUS* はそれぞれ  $\beta$ -アミリンとルペオール合成酵素であることが、*RsM1* はジャーマニコール、*RsM2* はタラキセロール、*KcMs* はルペオールをそれぞれ主に産生する多機能型テルペン合成酵素であることが明らかになった。これらの遺伝子の分子進化系統解析において、*BgbAS* と *RsM1* は  $\beta$ -アミリン合成酵素と高い相同性を示し、系統樹上  $\beta$ -アミリン合成酵素のグループに属していた。一方、*BgLUS* と *KcMS* は  $\beta$ -アミリン合成酵素に近い新しいルペオール合成酵素に分類され、*RsM2* はルペオール合成酵素から  $\beta$ -アミリン合成酵素に進化する過程における最初が多機能型酵素のグループに配置された。

続いて、植物ステロールの合成酵素をコードしている遺伝子をメヒルギとヤエヤマヒルギからクローニングし、*KcCAS* と *RsCAS* と命名した。これらの遺伝子は、機能発現解析により両者ともシクロアルテノール合成酵素であることが確認された。

最後に、これらのテルペノイド或いは植物ステロール合成酵素の遺伝子発現と塩濃度との関連について検討した。メヒルギのテルペノイド合成遺伝子 *KcMS* の mRNA レベルは塩濃度上昇に伴い増加した。同様にオヒルギの *BgLUS* と *BgbAS* の mRNA レベルも塩負荷により上昇した。しかしながら、植物ステロール生合成遺伝子 *KcCAS* については塩濃度依存的な mRNA レベルの上昇は観察されず、テルペノイドが耐塩性形質に選択的に寄与していることが示唆された。さらにオヒルギとメヒルギ苗木のテルペノイドの絶対濃度も塩分負荷により上昇し、耐塩性形質へのテルペノイドの関与を支持しているものと考えられた。

本研究は沖縄に分布する7種類のマングローブにおけるテルペノイド組成を明らかにするとともに、その生合成が塩分により制御されていることを初めて指摘する知見を得ている。これらは植物におけるテルペノイドの生理学的役割の解明に寄与する優れた成果と考えられ博士 (農学) の学位を授与するに足る十分な業績と判断した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	モハマド バシュニ
審査委員	主査 琉球 大学・教授 屋 宏典
	副査 琉球 大学・教授 金城 一彦
	副査 佐賀 大学・教授 野瀬 昭博
	副査 琉球 大学・教授 馬場 繁幸
	副査 鹿児島大学・教授 徳永 正雄
審査協力者	
実施年月日	平成20年1月15日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <span style="float: right;">(口答)・筆答</span>	
<p>主査、副査及び審査協力者は、平成20年1月15日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	モハマド バシュニ
<p>[質問1] マングローブへの塩ストレスはどのようにかけたのか？（塩ストレスの条件は？）</p> <p>[回答1] 胎性種子を憶首川から採取してこれをポットに植え、5ヶ月間塩濃度の異なる条件で栽培しました。塩濃度は0から3%レベルまで変化させました。</p> <p>[質問2] エンストレスをかける時に一般的は純粋な塩化ナトリウムが使われるが、この実験では塩混合物（Red salt）を使用しているのはどのような理由によるのか？</p> <p>[回答2] Red saltは市販製品であり、海水に近い塩組成となっている。より自然の条件に近づけるために塩混合物を使用いたしました。また実際、海水を汲んできて実験をするのが困難であるという実験上の都合もあります。</p> <p>[質問3] 塩混合物の塩化ナトリウム以外のミネラルの影響についてはどうか？</p> <p>[回答3] 海水の組成に近い塩混合物を使用しているのも、より自然に近い状況を作り出せているのではないかと考えている。したがって、他のミネラルの影響も考慮したうえでの全体としての塩ストレスと考えている。なお、塩濃度については塩分計で濃度を定期的に採取し、水道水由来のミネラルの影響を排除するため蒸留水で濃度を所定の濃度に調節いたしました。</p> <p>[質問4] 提唱されているテルペノイドの機能は本当か？</p> <p>[回答4] 膜成分としての機能を提唱しているが、現在までのところ確証は得ていない。ただ、テルペノイドが脂質膜モデルであるリポソームにとりこまれることは確認している。今後、より詳細に検討したい。</p> <p>[質問5] 葉の塩分濃度については測定していないのか？計っていないのであれば測定すべきではないのか？</p> <p>[回答5] 測定していない。ただ根と葉におけるテルペノイド合成の挙動が異なるのは組織中の塩濃度による可能性もあるので今後可能な限り測定したい。</p> <p>[質問6] 酵素機能の解析に酵母変異株を使っているがどのような株か？</p> <p>[回答6] オキシドスクワレンサイクラーゼを欠損しているため、エルゴステロール要求性の変異株です。細胞内にオキシドスクワレンが蓄積され、これに酵素遺伝子を導入することにより、オキシドスクワレンを基質とした反応産物を解析することができます。</p> <p>[質問7] アミノ酸配列のコンセンサス配列のうちQWモチーフはどのような機能をもっているのか？</p> <p>[回答7] QWモチーフはオキシドスクワレンサイクラーゼに共通した配列ということ以外に現時点では機能については明らかではありません。ただ、酵素反応産物の特異性を規定するような領域ではないようです。</p> <p>[質問8] 大腸菌を用いた場合の発現はどうか？</p> <p>[回答8] 酵素発現は可能と考えられるが機能解析ができないため、本実験には適していないと考えている。</p> <p>[質問9] テルペノイドのリポソームへの取込を調べたと本論文には書かれているが、具体的にはどの成分を用いたのか？</p> <p>[回答9] テルペノイドとしてはルペオール、植物ステロールとしては<math>\beta</math>-シトステロールを用いてリポソームへの取込を比較しました。</p>	

[質問 10] テルペノイドと植物ステロールの細胞内局在については解っているのか。

[回答 10] 現時点までは明らかではありません。幾つかの方法を例えば抗体を使って組織学的な分布を調べようと試みたのですが、抗体作製が困難で最終的な確認に至っておりません。

[質問 11] テルペノイドの化学構造と耐塩性とのあいだには何か関連が認められるのか。

[回答 11] マングローブに含まれるテルペノイドは化学構造上オレアナン、ルパン、ウルサン型に大きく分類されるが、構造と耐塩性との関連は明らかではありません。

[質問 12] マングローブの種類によって酵素が単機能型と多機能型にわかれているのは非常に興味深いと思われるがいかがか？

[回答 12] 確かに、生育環境に応じた進化学的な適応の結果だと思われる。論文でも触れているが、この点については今後も耐塩性形質の獲得と進化との関連で注目していきたい。