

氏名

Muhammad Zubair Khan
(ムハンマド ズベイル カーン)

(論文内容の要旨)

Functional Analysis of Carotenoid Biosynthesis Genes in Sweetpotato *Ipomoea batatas*
(サツマイモ *Ipomoea batatas* 由来カロテノイド生合成遺伝子の機能解析)

サツマイモ (*Ipomoea batatas*) はヒルガオ科 (family convolvulaceae) に属する6倍体の農作物であり、栽培面積は食用作物の中では世界で7番目である。その食用部分である塊根には β -carotene が含まれていることはわかっていたが、サツマイモにおけるカロテノイド生合成の知見はほとんど存在していなかった。そこで私は、生物資源工学研究所において既に形質転換系が確立されている2つの栽培品種、すなわち、ホワイトスター ('White Star' ; WS と省略) と W71 に着目し、まず、これらの葉及び塊根に含まれるカロテノイドについて詳細な化学分析 (各種クロマト分析と NMR などの機器分析) を行った。その結果、これら2品種の塊根には、 β -carotene や lutein といった他の農作物にも広く見られるカロテノイドだけでなく、 β -carotene-5,6,5',8'-diepoxide や β -carotene-5,8-epoxide のようなサツマイモに特異的なカロテノイドが含まれることがわかった。次に私は、これら2品種からカロテノイド生合成遺伝子の単離を試みた。具体的には、lycopene β -cyclase と lycopene ϵ -cyclase をコードすると思われる2種類の環化酵素遺伝子配列を、RT-PCR と RACE によって単離することを試みた。その結果、WS と W71からそれぞれ、2つ及び3つの lycopene β -cyclase 遺伝子配列が単離されたので、*IbLCYb1*, *IbLCYb2* 遺伝子 (WS 由来) 及び *IbLCYb3*, *IbLCYb4*, *IbLCYb5* 遺伝子 (W71由来) と名付けた。一方、lycopene ϵ -cyclase をコードすると思われる環化酵素遺伝子については、WS と W71から1遺伝子配列のみが単離され、両者は全く同じ遺伝子配列だったので、*IbLCYe* 遺伝子と命名した。次に、これらの遺伝子の各々を、lycopene 合成用プラスミド pACCRT-EIB (細菌 *Pantoea ananatis crtE*, *crtB*, *crtI* を含む) を持つ大腸菌に導入し、組換え大腸菌が作る色素を HPLC-PDA により分析した。その結果、*IbLCYb1-4* 遺伝子を含む大腸菌からは β -carotene が検出されたので、これらの遺伝子は lycopene β -cyclase 遺伝子であると同定された。なお、*IbLCYb5* 遺伝子は機能しないことがわかった。一方、*IbLCYe* 遺伝子を lycopene 合成用プラスミド pACCRT-EIB を持つ大腸菌に導入したところ、一方のみが ϵ -環になった δ -carotene が生成されたので、*IbLCYe* 遺伝子は lycopene ϵ -(mono) cyclase をコードすると同定された。また、*IbLCYb1* または *IbLCYb2* 及び *IbLCYe* 遺伝子の2つを大腸菌内で同時に働かせると、 α -carotene が生成することがわかった。さらに、得られたサツマイモ由来 β -cyclase (*IbLCYb1*) 及び ϵ -cyclase (*IbLCYe*) 遺伝子について、葉や塊根における発現解析を行った。その結果、両遺伝子は葉では強く発現していたが、塊根では *IbLCYe* 遺伝子の発現レベルは低く抑えられていた。さらに、私は、 β -carotene から zeaxanthin を合成する酵素や α -carotene から lutein を合成すると思われる酵素遺伝子配列を単離した。現在、機能解析中である。

氏名

Muhammad Zubair Khan
(ムハンマド ズベイル カーン)

(論文審査の結果の要旨)

Muhammad Zubair Khan 氏 (以下、Zubair 氏) は、母国での修士論文研究として、パキスタンでは貴重な栄養源の1つであるアキグミ (*Elaeagnus umbellata* Thunb.) の実に含まれる機能性物質の分析研究を行った。Zubair 氏は、修士終了後、Habib 銀行の農業ファイナンス管理者等として6年9ヵ月の間、ビジネス経験を積んだ後、日本外務省 (及び文科省) による公募 Japanese Government (MEXT) Research Scholarship for Ph.D. に応募して見事採択された。アキグミの実には赤色カロテノイドのリコペンという抗酸化物質が含まれていたことから、Zubair 氏は、カロテノイドの生合成や代謝工学研究を志願した。彼は、平成26年4月に石川県立大学・生物資源環境学研究科生物機能開発科学専攻・博士後期課程 (3年間) に国費留学生としての入学が認められ、植物遺伝子機能学研究室に配属された (石川県立大学初の国費留学生)。Zubair 氏は、博士論文研究の対象として、パキスタンでは主要穀物であるサツマイモ (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) に着目した。サツマイモは、乾燥・貧栄養土壌でも生育可能な農作物であることから、パキスタンだけでなく、南アジアや東南アジアの国々では貴重な農作物である (世界で6番目の主要穀物)。なお、サツマイモは、これらの発展途上国ではβ-カロテンの主要供給源でもある。それにもかかわらず、サツマイモのカロテノイド生合成や代謝工学研究はこれまで、ほとんど行われてこなかった。そこで、Zubair 氏は、博士論文テーマとして、サツマイモにおけるカロテノイドの生合成・代謝工学研究を選び、日夜、研究に従事してきた。彼は博士後期課程の3年間に、サツマイモから主要なカロテノイド生合成遺伝子を単離し、各々の遺伝子の機能解析を行ってきた。すでに、論文発表を行った成果としては、リコペンからβ-カロテン及びα-カロテンを作る2種類の環化酵素遺伝子 (*IbLCYb* 及び *IbLCYe*) の単離と機能の同定である (M. Zubair Khan et al, *Z. Naturforsch. C, e-pub*, 2016)。さらに Zubair 氏は、この論文で、サツマイモの葉とイモ (塊根) に含まれるカロテノイドを詳細に分析し、サツマイモの塊根には、高等植物には通常見られない独自のカロテノイド (β-カロテン-5,8-エポキシド等) が含まれることを明らかにしている。

当研究室ではまた、ケト基導入酵素遺伝子 (*crtW*) を利用した代謝工学により、アスタキサンチンを生産する組換えサツマイモをすでに作製していたのであるが、Zubair 氏は、この組換えサツマイモの塊根において、独自のカロテノイド (β-カロテン-5,8-エポキシド等) がさらにケト化され、これまで世の中に存在していなかった新規なカロテノイド (エキネノン-5',8'-エポキシド等) が生成していることを見出した (T. Maoka, M. Otani, M. Zubair Khan et al, *Tetrahedron Lett.*, 57: 4746-4748, 2016)。

当研究室は、これらの研究成果により、サツマイモのカロテノイド生合成・代謝工学研究で世界のトップレベルに立つことができた。このことは、Zubair 氏の高い研究能力と勤勉性を表している。

よって、本論文は博士 (生物資源環境学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成29年2月21日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。