

氏名	なかのよしひろ 中野善公
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	農博第1546号
学位授与の日付	平成18年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	農学研究科応用生命科学専攻
学位論文題目	Diversity and Function of $\gamma$ -Glutamyltransferase in Brassicaceae Plants (アブラナ科植物の $\gamma$ -Glutamyltransferase の多様性と機能)
論文調査委員	(主査) 教授 関谷次郎 教授 矢崎一史 教授 梅澤俊明

### 論文内容の要旨

グルタチオン (GSH) の異化は、細胞の GSH 恒常性の維持, 含硫アミノ酸であるシステインの供給, 生体異物抱合体 (GSX) の分解など GSH の機能と関連して重要な役割を果たしている。哺乳動物や微生物では、 $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ (GGT) が GSH 異化の初発酵素であり、その特性が明らかにされている。しかし植物では、GSH 異化経路の詳細はいまだ十分に解明されていない。また GGT に関して、植物では可溶型および結合型 GGT が報告されているが、それらの性質および GSH 異化との関連などは未解明である。本研究は、植物 GGT の多様性とそれらの性質および機能などについて検討し、GGT と GSH 異化との関連を明らかにすることを目的として行われた。主要な内容は以下の通りである。

1. ダイコンやシロイヌナズナなどの多くの高等植物には低イオン強度の抽出液で抽出される可溶型 GGT と、高イオン強度の抽出液で可溶化される結合型 GGT があることを示し、植物 GGT の多様性、すなわち同一植物に少なくとも可溶型および結合型 GGT の両者が存在することを明らかにした。結合型 GGT はこれまで報告されていた細胞膜とは異なり細胞壁に結合していることを見出した。

2. 可溶型および結合型 GGT をダイコン子葉よりそれぞれ2種類を均一に精製し、それらの構造と性質について検討した。可溶型2種類は分子量63,000のヘテロダイマー (サブユニットの分子量42,000と21,000) であり、結合型2種類は分子量61,000のモノマーであった。可溶型 GGT2種類あるいは結合型 GGT2種類の間では、酵素科学的性質はよく似ていたが、可溶型と結合型の間では性質が異なっていた。GSH, 酸化型 GSH, GSX はいずれの GGT も基質としたが、ミカエリス定数などは異なっていた。至適 pH は8であったが、pH6でも約50%の活性が残存していた。

3. 細胞内局在性が不明であった可溶型 GGT の局在性と機能について検討した。ダイコンのプロトプラストを調製し、これをさらにミニプラスト, バキュオプラスト, 単離液胞などに分画した。可溶型 GGT 活性はバキュオプラストと液胞画分において、液胞の指標酵素である  $\alpha$ -マンノシダーゼとともに回収され、大部分が液胞に局在していることを示した。また GSH の異化生成物などの分析から、可溶型 GGT が GSH や GSX の異化に関与していることを明らかにした。

4. ダイコンのヘテロダイマー型 GGT 遺伝子のクローニングを行い、配列の解析を行った。これまでに全ゲノムが解読されたシロイヌナズナには3種類のヘテロダイマー型 GGT をコードしていると推定される遺伝子 (*AtGGT1*, *AtGGT2*, *AtGGT3*) が存在するが、ダイコンよりそれら3種類のオーソログ (*RsGGT1*, *RsGGT2*, *RsGGT3*) をクローニングした。シロイヌナズナおよびダイコンの全てのヘテロダイマー型 GGT ホモログは、翻訳後プロセッシングに必須のアミノ酸残基および基質との結合に必要と推定されているアミノ酸残基を保存していた。また、RT-PCR によって、それぞれのホモログは器官特異的な発現をしていることを示した。*RsGGT1* あるいは *RsGGT2* を導入した形質転換タバコは GGT を過剰発現するが、これを解析して *RsGGT1*, *RsGGT2* は結合型 GGT をコードしていることを明らかにした。

5. シロイヌナズナの GGT 遺伝子が欠損した変異株 (*atggt1*, *atggt2*, *atggt3*) を用いて GGT の性質と GSH 異化への関与について検討した。*atggt1* 変異株は結合型 GGT を欠損しており、*atggt2* 変異株はさやで特異的に発現する可溶型

GGT を欠損していた。 *atggt3* 変異株では有意な GGT 活性の変化は認められなかった。 *atggt1* の定常状態での GSH 含有量は野生株と同じであったが、GSH 合成を阻害することで GSH 異化速度が減少していることを明らかにした。

6. 以上、ダイコンからヘテロダイマーの可溶性 GGT2 種類、モノマーの結合型 GGT2 種類を単離した。またダイコンにはヘテロダイマータイプの結合性 GGT をコードする遺伝子が 2 種類、シロイヌナズナには可溶性 GGT および結合性 GGT をコードする遺伝子が少なくとも 1 種類ずつ存在することを示し、高等植物の GGT の多様性の一端を明らかとした。

### 論文審査の結果の要旨

GSH は生物界に広く存在し、細胞内の酸化還元状態の調節、GSH 抱合体の形成、システインの貯蔵体などの役割を果たしている。植物ではさらにフィトケラチン前駆体などとしての機能を有している。GSH の異化はその合成とともに細胞の GSH 恒常性の維持などに重要な役割を果たしているが、植物においては異化経路や関与する酵素について十分な知見が得られていない。本論文は、植物 GGT の多様性とその性質や機能などを明らかにし、GGT が GSH の異化に果たす役割を評価することを目的として行われた一連の研究の成果をとりまとめたもので、評価すべき主な点は以下のとおりである。

1. ダイコンやシロイヌナズナなど多くの高等植物には、可溶性および結合型 GGT が存在し、可溶性 GGT のほとんどが液胞に、結合型は細胞壁に局在することを明らかにした。これまで可溶性 GGT と結合型 GGT は別の植物から単離されていたが、本研究で同一の植物に共存していることを示した。

2. 可溶性および結合型 GGT をダイコン子葉より均一に精製し、可溶性 GGT は分子量 63,000 のヘテロダイマーであり、結合型は分子量 61,000 のモノマーであることを明らかにしている。可溶性 GGT と結合型 GGT の間では性質はかなり異なっていた。GSH、酸化型 GSH、GSX はいずれの GGT も基質としたが、ミカエリス定数などは異なっていた。

3. 可溶性 GGT の局在性と基質特異性、異化生成物の解析から可溶性 GGT は液胞での GSH や GSX の異化に関与していることを示唆した。

4. これまでに全ゲノムが解読されたシロイヌナズナには 3 種類のヘテロダイマー型 GGT をコードしていると推定される遺伝子 (*AtGGT1*, *AtGGT2*, *AtGGT3*) が存在するが、これを基にダイコンから 3 種類 (*RsGGT1*, *RsGGT2*, *RsGGT3*) の GGT をコードしている cDNA をクローニングした。これらはいずれも翻訳後プロセッシングや基質との結合に必要とされるアミノ酸残基を保存していた。*RsGGT1* あるいは *RsGGT2* をタバコに導入した形質転換タバコは GGT を過剰発現し、いずれも結合型 GGT をコードしていることを明らかにした。またダイコン、シロイヌナズナのそれぞれのホモログは器官特異的な発現を示した。

5. シロイヌナズナの GGT 遺伝子の欠損した変異株 (*atggt1*, *atggt2*, *atggt3*) を解析し、*atggt1* 株は結合型 GGT を欠損、*atggt2* 株はさやで特異的に発現する可溶性 GGT を欠損していることを明らかにした。

以上のように、本論文はアブラナ科植物を用いて植物 GGT の多様性とその機能、および GSH 異化とのかかわりについて明らかにしたものであり、植物生化学、植物分子生物学などの発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 18 年 2 月 13 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。