

氏名	なか がわ とも み 中 川 知 己
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1341 号
学位授与の日付	平成 15 年 3 月 24 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	農学研究科応用生物科学専攻
学位論文題目	マメ科植物の根粒におけるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) の発現調節および活性調節機構の解析
論文調査委員	(主 査) 教授 泉 井 桂 教授 遠 藤 隆 教授 奥 野 哲 郎

論 文 内 容 の 要 旨

マメ科の植物は、根粒菌を根粒という特殊な器官に共生させて窒素固定を行わせるので、窒素源を含まない土壌でも生育できる。共生状態の根粒菌は宿主植物から供給される有機酸によって呼吸その他の炭素代謝を行っている。本研究の第 1 章では、ダイズの根粒で高発現し炭素代謝の中心的な役割を果たしているホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) 遺伝子の発現制御機構を追究し、次いで第 2 章では、材料を、小規模の栽培で実験が可能なミヤコグサ (*Lotus japonicus*) に切り替えて、酵素活性制御機構の解析を試みた。主な内容は次の通りである。

1. ダイズには、根粒において非常に高いレベルで発現する PEPC 遺伝子 *GmPEPC7* 及びこれと非常に高い相同性を有しながら根粒でほとんど発現していない *GmPEPC15* が存在する。また、両遺伝子はプロモーター領域においても高い相同性を示した。そこでこれらのプロモーターを比較解析して、*GmPEPC7* の根粒特異的発現を可能にするシス領域の同定を試みた。それぞれのプロモーターに β -グルクロニダーゼ (GUS) レポーター遺伝子をつないで毛状根形質転換法によりダイズに導入したところ、根粒におけるプロモーター活性は mRNA 発現レベルとほぼ対応した。さらに *GmPEPC7* プロモーターの loss-of-function 実験により、DNA の転写開始点上流 -466~-400 ヌクレオチド (nt) の領域 (SR) が根粒における高発現に重要であるという知見を得た。SR は、*GmPEPC15* の対応する領域と 14nt のパンドローム配列を除いてほぼ同一の配列をもつので、この配列が SR の機能を担っていると考えられた。一方、*GmPEPC7* の SR より下流の -400~-318nt (AR) 領域に対しては、特異的に結合するタンパク質を根粒核抽出液から検出した。そこで次に、*GmPEPC15* プロモーターの対応する領域に SR 及び AR を移植する gain-of-function 実験を試みた。SR のみを移植した *GmPEPC15* プロモーターは、根粒において低いながらも有意な活性を発揮した。しかし SR と共に AR を移植した場合は、根粒特異性を維持したまま非常に強い活性がみられた。AR だけではプロモーター活性を示さないことから、*GmPEPC7* の SR は根粒特異的な発現を規定しており、AR の領域はこの発現を増幅することが明らかとなった。また AR 領域には、*GmPEPC15* には存在しない 40nt の配列があるので、この特徴的な配列が AR の機能を担うと考えられる。

2. 植物の PEPC は N 末端付近のセリン残基が可逆的にリン酸化され、リンゴ酸によるフィードバック阻害を受けにくくなることが知られている。このリン酸化を触媒するリン酸化酵素 PEPC-PK の同定が長年試みられていたが、1999年に CAM 植物で初めて cDNA が同定されると、その後 C4 植物や他の CAM 植物における報告が相次いだ。しかしマメ科植物根粒で機能する PEPC-PK の cDNA は単離されておらず、遺伝子レベルでの解析が遅れていた。そこで本研究では、マメ科のモデル植物であるミヤコグサから PEPC-PK を同定して解析した。単離して *LjPEPC-PK* と名付けた cDNA は、277アミノ酸残基からなる蛋白質をコードし、既知の PEPC-PK 同様、ほぼキナーゼドメインのみからなることが判明した。大腸菌を宿主として *LjPEPC-PK* の組換え体酵素を作製し、*in vitro* においてトウモロコシ PEPC の N 末端側から 15 番目のセリン残基を特異的にリン酸化することを証明した。また *LjPEPC-PK* は根粒において特に高い発現を示した。根粒で発現するアイソフォームが他に見つからないことから、この分子種が根粒における PEPC のリン酸化を担っていると結論

した。ミヤコグサ根粒の PEPC が地上部の光合成環境によってリン酸化-脱リン酸化される現象が見られたので、*LjPEPC-PK* の発現解析を行ったところ、mRNA レベルと酵素活性の挙動が一致した。以上の結果から、マメ科植物根粒の PEPC のリン酸化は PEPC-PK 遺伝子の発現を介して制御されていると推測した。

論文審査の結果の要旨

マメ科植物は、根粒における共生窒素固定により、窒素肥料のない土壌でも正常に生育できる。PEPC は根粒で高発現しており、根粒における炭素代謝の中心的な役割を果たしている酵素である。本論文ではこの PEPC に着目し、根粒特異的 PEPC 遺伝子の発現制御機構および翻訳後の PEPC 活性調節機構について研究を行っている。評価すべき点は以下の通りである。

1. ダイズの根粒特異的な PEPC 遺伝子 *GmPEPC7*、ならびにこれと非常に相同性の高いプロモーターをもちながら根粒でほとんど発現していない *GmPEPC15* とを比較解析するという精度の高い手法を用いて、プロモーター解析を行った点は高く評価できる。いわゆる loss-of-function 実験と gain-of-function 実験を組み合わせることにより、*GmPEPC7* の根粒特異的な発現が 2 つのシス領域、SR と AR によって協調的に制御されていることを明らかにしている。また、本来は house-keeping な役割を果たしている *GmPEPC15* 遺伝子が、プロモーターのわずかな変異により根粒で機能しうることが明らかにした。すなわち、本研究はマメ科植物のみが共生能力を獲得した進化の過程を分子レベルで検証する糸口を見いだしたといえる。さらに、AR に特異的に結合する根粒核タンパク質の検出に成功している。根粒特異的な発現に関わる転写因子はほとんど同定されていないため、将来この因子の性状解析を通じて、根粒内の転写調節機構の詳細な解明に大いに寄与するものと期待される。

2. 根粒内の PEPC は可逆的なリン酸化によって活性制御されていることが知られている。本論文では、マメ科植物の根粒でこのリン酸化を担っている酵素の cDNA をミヤコグサから世界で初めて単離・解析し、この組換え体酵素が植物由来の PEPC の N 末端側に保存されているセリン残基を特異的にリン酸化することを示し、たしかに PEPC-PK であることを明らかにした。また、ミヤコグサ根粒内の PEPC リン酸化活性が、地上部からの光合成産物の転流量によって制御されるという考えを支持する知見を得た。さらに、*LjPEPC-PK* の mRNA 量と根粒内の PEPC リン酸化活性が良い相関を示すことも明らかにしている。

以上のように、本論文は根粒の炭素代謝において重要な PEPC の制御機構を、遺伝子発現と翻訳後調節の両面から解析したものである。特に、ほとんど未解明な根粒内の転写制御機構や根粒形成遺伝子の分子進化機構を理解する上で本研究は重要な発見を含み、植物生理学、植物分子生物学ならびに植物-微生物共生学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15年2月17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。