

氏 名	たか ばたけ れ お な 高 畠 令 王 奈
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1190 号
学位授与の日付	平成 13 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	農学研究科応用生物科学専攻
学位論文題目	高等植物および出芽酵母におけるミトコンドリアリン酸輸送体の研究

論文調査委員 (主査) 教授 泉 井 桂 教授 奥野哲郎 教授 西岡孝明

### 論 文 内 容 の 要 旨

ミトコンドリアリン酸輸送体はミトコンドリアの内膜に局在し、ATP合成の基質であるリン酸をミトコンドリアマトリクス内に供給するという、生物のエネルギー生産において、極めて重要な役割を担っている膜タンパク質である。本論文の内容は、草本植物の本輸送体遺伝子の解析と出芽酵母における本輸送体様タンパク質の解析という2つの研究に大きく分けることが出来る。それぞれの研究内容は以下に示すとおりである。

1. 植物細胞においては、葉緑体にくらべて、ミトコンドリアの研究は極めて遅れており、主要な役割を担うタンパク質をコードする遺伝子なども、あまり研究されていない。本研究では、ミトコンドリアリン酸輸送体遺伝子を草本植物から初めて単離することに成功した。ノーザン解析によって、本遺伝子は分裂組織において高い発現レベルを維持していることが示された。また、動物や出芽酵母の本遺伝子は、ゲノム中に一種類しか存在していないが、植物では、単子葉植物においても、双子葉植物においても、ゲノム中に複数の分子種が存在していることが示唆された。さらに、人工リン脂質二重膜であるリポソームに本輸送体の組換えタンパク質を再構成させ、*in vitro*でのリン酸輸送活性の検出にも成功した。動物の本輸送体は、*N*-エチルマレイミド (NEM) によって不活化し、これが特定のシステイン残基 (ウシ由来の本輸送体の場合 Cys-42) の修飾によるものであることがよく知られている。しかし、植物の本輸送体が NEM 感受性であるかどうかに関しては、これまで議論が分かれていた。本研究により、Cys-42 に相当する残基は植物の本輸送体においても保存されており、植物の本輸送体も NEM に感受性であることが示された。一方、すでに全ゲノムの解読が終了しているシロイヌナズナにおいて、本輸送体遺伝子のアイソフォームを検索したところ、*AtMPT1*, 2 および 3 の 3 種類のアイソフォーム候補が見出された。本遺伝子は、カバの木の一つ *Betula pendula Roth* において、オゾンストレスによって著しい mRNA の蓄積が認められるという報告がある。そこで、オゾンによる酸化ストレスを模して、パラコートや過酸化水素による酸化ストレスを施した植物体内での *AtMPT1*, 2 および 3 の発現量の変化を調べたところ、*AtMPT2* では、それらの酸化ストレスによって著しい mRNA の蓄積がみられることが明らかとなった。

2. 出芽酵母のゲノムの解読により、出芽酵母には、従来報告されてきたミトコンドリアリン酸輸送体 (*MIR1*) にくらべ、はるかに他の生物の本輸送体に相同性の高い配列を有する遺伝子 (*YER053C*) の存在することがわかった。*YER053C* 遺伝子は、*MIR1* 遺伝子と同様に好気条件下で恒常的に発現しており、その発現レベルは嫌気条件下に移すと著しく抑制されることが明らかとなった。これはミトコンドリアにおける酸化的リン酸化に関与する遺伝子によく見られる発現パターンである。しかしながら、*YER053C* 破壊株は呼吸欠損株にはならず、*MIR1* 破壊株に対して *MIR1* 遺伝子プロモーター制御下で *YER053C* 遺伝子を過剰発現させても *MIR1* の機能を相補しなかった。さらに、組換えタンパク質を用いた再構成実験において、*MIR1* が高いリン酸輸送活性を示したのに対して、*YER053C* のリン酸輸送活性は極めて低いことが明らかとなった。以上の結果から、*YER053C* がリン酸輸送体である可能性は極めて低くなった。さらに、*YER053C* の細胞内での局在性を調べるために免疫電子顕微鏡観察を依頼したところ、*YER053C* はミトコンドリアではな

く液胞に局在しており、さらに、液胞内で分解を受けていることが明らかとなった。

以上の実験結果から、YER053Cは生合成されるもののミトコンドリアリン酸輸送体としての機能を有していないことが結論された。

このような現象が見出された理由として、本来ミトコンドリアリン酸輸送体であったYER053Cが進化の過程でその機能を失い、MIR1が代わりにその役割を担うようになったためではないかと推測された。

### 論文審査の結果の要旨

著者は、本論文の前半では高等植物のミトコンドリアリン酸輸送体遺伝子について、後半では出芽酵母におけるミトコンドリアリン酸輸送体様タンパク質 YER053C について解析を行った。評価すべき主な点は以下の通りである。

1. 著者は、偶発的にはあるものの、草本植物から本輸送体遺伝子を初めて単離することに成功し、さらに組換えタンパク質を用いて遺伝子産物がリン酸輸送体であることを証明した。
2. 高等植物の本輸送体は、組織から単離・精製されリン酸輸送活性が検出された例が過去にいくつか報告されていたが、そのリン酸輸送活性がN-エチルマレイミド (NEM) に感受性であるのか、それとも NEM に非感受性であるかに関しては議論が分かれていた。そこで著者は、動物の本輸送体において NEM の修飾を受けやすいと考えられている Cys 残基が植物の本輸送体にも保存されていたことに着目し、組換えタンパク質を用いた解析を行って、植物の本輸送体が NEM に感受性であることを示した。
3. 植物以外の真核生物では本輸送体遺伝子は全て単一コピーであると報告されているが、著者らは複数の植物に対してゲノミックサザン解析を行い、植物では本遺伝子はゲノム中に複数コピー存在する可能性が高いことを示した。
4. 全ゲノムの解読が終了したシロイヌナズナにおいて、その遺伝子データベースを活用し、本遺伝子の三種類のアイソフォーム候補を見出した。さらに、これら三種類のアイソフォーム候補の mRNA の発現レベルを解析し、酸化ストレスによって著しく発現が誘導される分子種が存在することを見出した。
5. 出芽酵母の遺伝子 YER053C の産物は、他の真核生物のミトコンドリアリン酸輸送体に高い相同性を持つにもかかわらず、リン酸輸送体としての機能を有していないことを分子生物学的手法により明らかにした。
6. YER053C の mRNA の発現量が酸素濃度依存的に変動することや、YER053C の遺伝子産物が翻訳後速やかに液胞に送られ、液胞内で分解を受けているなどの実験結果から、本来ミトコンドリアリン酸輸送体であった YER053C が進化の過程でその役割を失い、MIR1が代わりにその役割を担うようになったのではないかと、という仮説を提唱している。

以上のように本論文は、植物および酵母におけるミトコンドリアリン酸輸送体に関する先駆的な知見を得たものであり、植物生理学、分子生物学、生物生産学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13年2月15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。