

氏 名	古 本 強
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1061 号
学位授与の日付	平 成 11 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	C <sub>4</sub> 光合成を支える新規タンパク質の遺伝子側からの探索

(主査)

論文調査委員 教授 泉井 桂 教授 古澤 巖 教授 遠藤 隆

## 論 文 内 容 の 要 旨

トウモロコシに代表されるC<sub>4</sub>植物は、C<sub>4</sub>光合成と呼ばれる低二酸化炭素濃度、乾燥に適応した光合成を行う。C<sub>4</sub>光合成は葉肉細胞と維管束鞘細胞の二種類の細胞の機能分担の上に成立し、葉肉細胞では大気中の二酸化炭素の捕集及び濃縮が、維管束鞘細胞ではカルビン回路による炭酸同化が行われる。このような炭素代謝に関与する主要な酵素はタンパク質や遺伝子のレベルで明らかにされている。しかし、これらの酵素の活性調節に関わる酵素タンパク質や、代謝産物の輸送に関わるタンパク質など、存在が示唆されているにも関わらず明らかにされていないものも多い。本研究では、遺伝子側からこれらの未知のタンパク質を単離解析することを試みた。主な内容は以下に示すとおりである。

1. ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) はC<sub>4</sub>植物における初期炭酸固定酵素であり、その活性は昼夜でリン酸化/脱リン酸化を介して調節される。このリン酸化反応にはカルシウム非依存性タンパク質リン酸化酵素に加えてカルシウム依存性タンパク質リン酸化酵素 (CDPK) の関与が示されてきた。しかし、リン酸化酵素は量的に少なく精製が困難である。そこでCDPKのアミノ酸配列の保存性を利用してCDPK分子種のクローニングを試みた。その結果、複数のCDPK種のcDNAの単離に成功し、それらの解析を行った。ZmCRK 3と名付けた遺伝子は近年単離されたCRK遺伝子と近縁の遺伝子であった。この遺伝子のコードするタンパク質はCDPKの構造的特徴であるC末端側のカルモジュリン構造において多様化しており、その活性のカルシウム依存性に疑問がもたれた。組換え体酵素の酵素活性を調べ、その活性にカルシウムを必要としないことを示した。この結果から、本酵素が酵素学的に新規なタンパク質リン酸化酵素であることが明らかとなった。リン酸化の基質として、PEPCのリン酸化部位近傍配列よりも他の配列を好むことが明らかとなり、葉における発現レベルも低いことから、本酵素がPEPCリン酸化酵素として働き得ないことが示唆されたが、植物のリン酸化酵素の多様性を示すことができた。

2. C<sub>4</sub>光合成の葉肉細胞と維管束鞘細胞の機能分担には多くの未知タンパク質が関わっていることが推定される。これらのタンパク質を解析するために、これら二種類の細胞を分離精製し、各々から調製したRNAを用いてディファレンシャルスクリーニングを行った。この結果、既知の遺伝子と共に、葉肉細胞特異的遺伝子として種々の光合成電子伝達系タンパク質遺伝子を、維管束鞘細胞特異的遺伝子としてホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PCK) 遺伝子 (*Pck*)、メタロチオネイン遺伝子、老化時発現遺伝子 (*SEE 9*) を、師管特異的遺伝子として塩ストレス誘導性タンパク質ホモログ遺伝子などを、新たに同定した。葉肉細胞は、明反応による還元力の生成を担っているが、従来の知見以上に多くの電子伝達関連タンパク質がこの機能分化に寄与していることを示した。また多くのストレス応答性タンパク質遺伝子が維管束鞘細胞特異的に発現していたことから、維管束鞘細胞が光合成炭素代謝のみならず、様々な環境ストレスに応答する場であることを示唆した。

3. 2に述べた新規遺伝子の中でも特に維管束鞘細胞特異的遺伝子として単離された*Pck*に注目した。本酵素のトウモロコシにおける生理的役割は不明である。この遺伝子発現をノザン分析により調べたところ、mRNAレベルは日中に高く夜間

に低くなることが明らかとなり、本酵素が、NADP依存性リンゴ酸酵素に加えて、維管束鞘細胞における脱炭酸酵素として、光合成炭素代謝に関与することが強く示唆された。また、これまでは植物の本酵素は抽出中に部分分解を受けることから、インタクトな酵素の性状解析がなされていなかった。本研究において初めて活性のあるインタクトな組換え体酵素およびN末端の一部を切除した酵素の調製に成功し、これを用いて植物のPCKに特有のN末端配列が酵素活性の調節に寄与していることを示唆するとともに、本遺伝子が確かに生体内で活性のある酵素をコードし得ることを示した。

## 論文審査の結果の要旨

C<sub>4</sub>光合成植物には、主要作物であるトウモロコシだけでなくメヒシバのような畑作における強雑草も含まれる。この光合成様式は主に炭素代謝について研究され、その主要経路はほぼ明らかにされた。しかし、代謝酵素以外の輸送体膜タンパク質や活性調節タンパク質など活性測定が困難か、もしくは量的に少ないタンパク質については研究が遅れているのが現状である。C<sub>4</sub>光合成様式の統括的な理解や、この光合成様式の一部をC<sub>3</sub>植物に付与して光合成能を増強した有用作物を作出する試み、そしてC<sub>4</sub>強雑草を除去するための効果的な農薬の開発などのために、C<sub>4</sub>光合成に必須な未知のタンパク質を探索することは重要である。本論文では、一貫して遺伝子クローニング法を用いてこれらのタンパク質を探索している。評価すべき主な点は以下の通りである。

1. 新規なタンパク質リン酸化酵素ZmCRK3遺伝子のクローニングに成功した。さらに、組換え体酵素の性状解析から、カルシウム依存性タンパク質リン酸化酵素と一次構造上は似ているが、その活性にカルシウムを要求しない新規な酵素であることを明らかにした。

2. C<sub>4</sub>光合成に不可欠な葉肉細胞と維管束鞘細胞の機能分化に注目し、両細胞に特異的に発現している遺伝子を探索した。その結果、多くの光合成電子伝達関連遺伝子が葉肉細胞に特異的に発現していることを見出し、従来から知られている以上に、多くの光合成膜タンパク質が葉肉細胞の機能分化に寄与していることを示した。また、多くのストレス応答性遺伝子が維管束鞘細胞に特異的に発現していたことから、この細胞が外界の環境シグナルに応答する場でもあることを新たに示唆した。

3. 上記の探索により、維管束鞘細胞特異的遺伝子としてホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PCK) 遺伝子を単離した。そのmRNAの日周変動の様子から光合成に関与する炭素代謝に寄与することを示唆し、トウモロコシに代表されるNADP-リンゴ酸酵素型C<sub>4</sub>植物において知られている炭素代謝経路に加えてPCKの関与する新規な経路が存在することを示唆した。また、植物では初めて、活性のある状態での組換え体酵素の作製に成功し、その性状解析から植物PCKにのみ存在するN末端配列が酵素活性に寄与する可能性を示した。

以上のように、本論文は、新規なタンパク質リン酸化酵素遺伝子と共に、葉肉細胞と維管束鞘細胞の機能分化に必要な新規タンパク質遺伝子を明らかにしたものである。中にはPCKのように、従来のトウモロコシにおけるC<sub>4</sub>炭素代謝経路に改訂をせまるものも含まれており、植物生理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11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。