

氏名	小川紀之
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	論農博第2237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2項該当
学位論文題目	C ₄ 型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをリン酸化するカルシウム依存性プロテインキナーゼの研究

(主査)

論文調査委員 教授 泉井 桂 教授 古澤 巖 教授 西岡 孝明

論文内容の要旨

近年生体の情報伝達経路の研究が多方面で進められている。その中でも植物の情報伝達経路は植物独自の生理機能に関連して多くの注目を集めているものの、不明の部分が多い。本研究は、C₄光合成に関与する酵素、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) が光依存的に活性化されるという現象に着目し、この光シグナルから酵素の活性化に至る情報伝達メカニズムの解明を目的として実施したものである。本論文の内容は以下のように要約される。

序論では、生体内情報伝達の一般論、植物の情報伝達経路の研究の現状、およびC₄光合成とPEPCの研究の現状を紹介し、本論文における研究の目的および意義について述べている。

第1章では、疎水性クロマトグラフィーおよび陰イオン交換クロマトグラフィーによってトウモロコシPEPCを精製する新規な方法を開発したことについて述べている。さらに、精製の過程で緩衝液中に添加したエチレングリコールがPEPCを非常に安定化し、また、酵素の活性化剤であるかのようにふるまうことを示した。次に、これまでPEPCの活性に影響を与える因子として考えられていなかった炭酸水素イオンに着目し、炭酸水素イオンの濃度に応じてリンゴ酸による半阻害濃度が上昇すること、さらに、この効果はPEPCのリン酸化の有無に関わらず発現することを初めて見だし、炭酸水素イオンが生体内で調節リガンドとして働いている可能性を指摘した。

第2章では、PEPCの光依存的な可逆的リン酸化を司るプロテインキナーゼ (PEPC-キナーゼ) の実体の解明を試みている。元来トウモロコシのPEPC-キナーゼはカルシウム非依存性であるということが定説であったが、トウモロコシ葉細胞質画分のうちブルーセファロースより 0.5M NaClで溶出されるプロテインキナーゼはカルシウム依存性プロテインキナーゼであり、これがPEPCを効率よくリン酸化することを見いだした。さらに、トウモロコシ葉細胞質画分にはカルシウム依存性および非依存性の両方のプロテインキナーゼが存在し、どちらもPEPCをリン酸化し得ることを明らかにした。このうちカルシウム依存性キナーゼについて高度精製を試み、また、この酵素の諸性質を詳しく調べた。その結果、本キナーゼが約50kDaのポリペプチドをサブユニットとする二量体として存在すること、および本キナーゼは活性にカルシウムを必要とするがカルモジュリンの添加を必要としなかったことより、カルモジュリンを分子内に持つ、植物には存在するが動物には存在しないいわゆるCDPKファミリーに属することが示唆された。リン酸化部位の検討により、本キナーゼはPEPCの活性調節に関与しているものと思われたが、精製したキナーゼを用いてPEPCをリン酸化しても、リン酸化の程度が低かったこともあり顕著なPEPCの活性変化を認めるにはいたらなかった。合成ペプチドを用いた実験により、PEPCのリン酸化部位の配列以外の配列 (スクロースリン酸シンターゼや硝酸還元酵素のリン酸化部位) がPEPCよりも効率的にリン酸化されたことから、本キナーゼはPEPCのみに特異的な酵素ではないことが明らかとなった。

第3章では、カルシウム依存性PEPC-キナーゼがCDPKであるということをふまえて、このキナーゼを標的としたcDNAクローニングを行った結果について述べている。得られたcDNA (*ZmPK2*) はCDPKに類似しているが全く新規なプロテインキナーゼをコードしていた。CDPKとの相違点は、調節ドメイン中にはカルモジュリンにみられるような典型的なEF

ハンド構造は存在せず、EFハンドに類似した構造が1コピーのみ存在し、ZmPK2には自己阻害ドメインは存在しないことであった。

総合考察において、本研究において得られた結果をもとに、カルシウム依存性プロテインキナーゼの生理的役割等に関する考察が述べられている。

論文審査の結果の要旨

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) はC₄光合成において初期炭酸固定に関与する酵素であり、現在、地球的規模で解決が望まれる食糧問題や地球温暖化の問題等への効果的な応用が期待されている。しかしながら、本酵素の活性調節の分子機構は未だ不明な点が多く、さらなる基礎的研究が必要とされている。本論文は、このような背景のもとに光依存的なリン酸化によるPEPCの活性化機構の解明を目指し、リン酸化反応に関与する酵素であるカルシウム依存性PEPC-キナーゼの実体を明らかにしたものである。本論文の評価すべき点は次のとおりである。

1. 疎水性クロマトグラフィーと陰イオン交換クロマトグラフィーの組み合わせにより、トウモロコシ葉のリン酸化および脱リン酸化されたPEPCを迅速に高純度かつ高収率で精製する方法を開発した。

2. エチレングリコールがPEPCを非常に安定化し、また酵素の活性化剤であるかのようにふるまうことを示した。また、炭酸水素イオンが生体内で調節リガンドとして働いている可能性を初めて示した。

3. トウモロコシ葉の可溶性タンパク質中にはカルシウム依存性および非依存性の両方のプロテインキナーゼが存在し、そのいずれもがPEPCをリン酸化し得ることを明らかにし、光シグナルからPEPCのリン酸化にいたる情報伝達過程にカルシウムイオンが介在する可能性を初めて指摘した。

4. トウモロコシ葉のカルシウム依存性プロテインキナーゼの性格付けを行い、このキナーゼはカルモジュリン様の機能部位を分子内にもつCDPKファミリーに属するものであることを示唆した。さらに、このキナーゼは他の酵素もリン酸化し得たことから基質特異性の広い酵素であることを示した。

5. トウモロコシ葉中の新規なプロテインキナーゼのcDNA (ZmPK2) のクローニングを行い、このキナーゼが触媒ドメインにおいては既存のCDPKとホモロジーが高いものの、調節ドメイン中に典型的なEFハンド構造をもたず、EFハンドに類似した構造を1コピーのみもち、また、自己阻害ドメインはもたないことを明らかにした。

以上のように、本論文はこれまでにほとんど知見が得られていなかった、トウモロコシPEPCのリン酸化を行うカルシウム依存性プロテインキナーゼの実体を明らかにし、PEPCのリン酸化を介する活性調節機構の解明に道を開いたものとして評価できる。さらに、本論文の内容は、植物生理学や植物酵素化学の発展に寄与するものと認められる。

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18日、論文なら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。