

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	山崎 真一
論文題目	高等植物におけるグルタチオン類の生合成に関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>植物は、カドミウム (Cd) やヒ素 (As) などの有害元素が過剰に含まれる土壌では傷害を受ける。重金属を含む土壌で栽培されたシロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) では、グルタチオンが重合したペプチドであるファイトケラチン (PC) が誘導的に合成されて、カドミウムやヒ素への耐性に寄与する。PCは細胞内に侵入した重金属と抱合体を形成し、この抱合体が液胞に隔離される。一方、イネ (<i>Oryza sativa</i>) が栽培される嫌氣的な水田では、カドミウムやヒ素は好氣的な畑土壌とは異なる化学形態で存在する。このため細胞の感受性や防御機構がシロイヌナズナとは異なる可能性がある。ファイトケラチン合成酵素 (Phytochelatase; PCS) 遺伝子は多くの植物で複数コピー存在し、シロイヌナズナでは <i>AtPCS1</i> タンパク質が <i>in vivo</i> におけるPC合成に寄与する。<i>AtPCS1</i> の遺伝子発現は重金属によって影響されないがPCS1酵素タンパク質はカドミウム、ヒ素、銅イオンによって活性化され迅速にPCが合成される、という性質を持つ。</p> <p>第1章では、イネのファイトケラチン合成酵素ホモログ遺伝子を <i>AtPCS1</i> 配列との相同性に基づいて探索し、二つの遺伝子、<i>OsPCS1</i>、<i>OsPCS2</i> を見出した。両者の発現量を解析したところ、ヒ素に曝露されたイネで <i>OsPCS1</i> の発現量が上昇したが、<i>OsPCS2</i> の発現量は変化しなかった。カドミウムはどちらの遺伝子発現にも影響しなかった。さらに、これら二つの遺伝子産物の大腸菌組換えタンパク質を調製して酵素活性を検討したところ、どちらのPCSタンパク質の酵素活性もカドミウムとヒ素により活性化されたが、<i>OsPCS1</i> はヒ素による活性化が著しかったのに対して、<i>OsPCS2</i> はカドミウムによって強く活性化された。<i>OsPCS1</i> と <i>OsPCS2</i> の生理機能を知るため、RNAi法によって、<i>OsPCS1</i>、<i>OsPCS2</i> の発現を、野生型株 (WT) の10~20%に抑制した形質転換イネを作出した。<i>OsPCS1</i> 発現抑制イネでは、ヒ素やカドミウムを与えても生育にWTと有意な差はみられなかった。一方、<i>OsPCS2</i> 発現抑制イネではPC合成量が減少し、ヒ素によって生育が低下したが、カドミウムによる生育低下はなかった。以上の結果から、イネでは① <i>OsPCS2</i> が生体内でのPC合成およびヒ素への耐性に寄与する、② PCはカドミウム耐性に大きくは影響しないと判断した。</p> <p>第2章では、イネにおけるカドミウム耐性の機構を検討するため、グルタチオン (GSH) の生合成阻害剤 Buthionine Sulfoximine (BSO) を投与したイネでのカドミウム耐性を調べた。BSOだけを投与したイネでは、ここで用いた濃度では、生育に負の影響は見られなかったが、カドミウムやヒ素が共存すると生育は有意に低下</p>			

し、GSHがイネのカドミウムとヒ素への耐性に関わることが示された。イネのグルタチオン合成酵素（Glutathione Synthetase; GS）の遺伝子を同定するため、シロイヌナズナのグルタチオン合成酵素遺伝子と相同性の高い遺伝子をイネで探索したところ、3つのGSホモログ、*OsGS1*、*OsGS2*、*OsGS3*を見出した。*OsGS1*と*OsGS3*はカドミウムやヒ素への被曝で発現量が増加した。N末端のシグナル配列から、*OsGS1*と*OsGS2*はプラスチドに、*OsGS3*はプラスチドまたは細胞質に局在すると予測された。続いてRNAi法によってそれぞれの遺伝子に特異的な発現抑制イネを作出し、カドミウムを与えて生育への影響を調べた。*OsGS1*発現抑制イネではGSH含有率が減少し、カドミウムで生育が阻害されたが、*OsGS2*、*OsGS3*発現抑制イネではカドミウムの影響は見られなかった。これらの結果から*OsGS1*がGSH産生を介してイネのカドミウム耐性に寄与していることが判明した。

この一連のRNAi実験において、*OsGS2*発現抑制によってヒドロキシメチルグルタチオン(hmGSH)含有量が減少した。hmGSHはGSHのグリシンがセリンに置換された化合物でイネに著量含有されるが、その生合成経路は知られていなかった。そこで第3章では大腸菌組換えタンパク質*OsGS2*の酵素活性について検討した。*OsGS2*タンパク質に γ グルタミルシステイン(EC)とセリンを与えたところ、ATP依存的にhmGSHが生成した。また、大腸菌組換えタンパク質*OsGS1*と*OsGS3*はセリンを基質とせず、グリシンだけを γ ECに結合するGSH合成酵素であった。

ファイトケラチン合成を低減させた形質転換イネを用いた検討から、ファイトケラチンはヒ素耐性に機能しているが、カドミウム耐性にはあまり寄与していない可能性が示された。むしろ、イネのカドミウム耐性にはグルタチオンが寄与する可能性を、グルタチオン合成阻害剤実験、形質転換イネの栽培試験で示した。さらにグルタチオン合成酵素をコードする3つの遺伝子のうちの一つ、*OsGS2*がヒドロキシメチルグルタチオン合成酵素をコードすることを明らかにした。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

イタイイタイ病は亜鉛・鉛・山排水に混入したカドミウムが下流の水田でイネに吸収され、その米を摂取した農民にカドミウム過剰害が発生した公害病である。イネが低濃度のカドミウムに耐性を発揮して生育が阻害されなかったため、カドミウム含有米が流通してしまった。重金属が多量に細胞内に侵入すると、タンパク質のスルフィドリル (SH) 基に配位して、酵素タンパク質の触媒作用や立体構造維持能力を阻害する。そこで細胞は、SH基に富むタンパク質やペプチドを誘導的に合成して重金属との抱合体を生成し、傷害を抑制する。本研究は、イネの遺伝子発現を制御することによって、イネ細胞内のSH基含有化合物がイネの重金属耐性に与える影響について検討を進め、以下の知見をもたらした。

1. シロイヌナズナのSH基に富むペプチド、ファイトケラチン(PC)合成酵素遺伝子*AtPCS1*の相同遺伝子をイネ (*Oryza sativa*) ゲノムにおいて探索し、*OsPCS1*、*OsPCS2*を同定した。さらにこれらの発現を抑制した変異株を用いた検討から、PCはカドミウム毒性の軽減には寄与しないことを示した。
2. PCの単量体グルタチオンに着目し、イネのグルタチオン合成を阻害したところ、カドミウム毒性が亢進した。そこでグルタチオン合成酵素遺伝子を探索し、イネに三つの相同遺伝子*OsGS1*、*OsGS2*、*OsGS3*を見出した。
3. 3つのグルタチオン合成酵素遺伝子のそれぞれの発現量をRNAi法によって制御したところ、カドミウムの生育障害は*OsGS1*の発現を抑制した場合に最も顕著であり、カドミウム毒性に対する耐性が*OsGS1*によるグルタチオン合成によって発揮される可能性を示した。
4. イネはカドミウムやヒ素の過剰害を受けた時、グルタチオンの類縁体であるヒドロキシルメチルグルタチオン(hmGSH)を著量蓄積する。今回、同定した三つの遺伝子のうち、*OsGS2*の大腸菌組換えタンパク質がATP存在下で、生理的濃度のγグルタミルシステインとセリンからhmGSHを合成することを示した。

以上のように、本研究は植物栄養学、土壌肥料学、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31年1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。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)