

氏名	あおきひでゆき 青木秀之
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	農博第935号
学位授与の日付	平成9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	農学研究科農芸化学専攻
学位論文題目	ORGAN-SPECIFIC EXPRESSION AND STRUCTURE OF RICE FERREDOXIN-NADP ⁺ OXIDOREDUCTASE GENES (イネのフェレドキシン-NADP ⁺ オキシドレダクターゼ遺伝子の器官特異的発現および構造)
論文調査委員	(主査) 教授 浅田浩二 教授 駒野 徹 教授 關谷次郎

論文内容の要旨

フェレドキシン NADP⁺ オキシドレダクターゼ (FNR) は光合成電子伝達系の最終段階において還元型フェレドキシン (Fd) による NADP⁺ 還元を触媒するフラビン酵素である。FNR は植物の非光合成組織にも存在し、酸化的五糖リン酸経路で生成する NADPH による Fd 還元 (光合成 FNR の逆反応) を触媒すると考えられている。しかし非光合成型 FNR の一次構造, cDNA, 遺伝子構造, 誘導機構などについては不明であった。本論文ではイネの葉および非光合成組織の根, 胚に発現する FNR cDNA をクローニングし, その構造を明らかにし, さらに根 FNR ゲノム DNA の全塩基配列を決定した。その主な内容は以下の通りである。

1. イネ葉, 根, 胚の FNR cDNA のクローニング

イネ葉, 根および胚の cDNA ライブラリーから, それぞれ完全長の FNR cDNA クローンを単離した。イネ葉と根から FNR を精製し, それぞれの N 末端アミノ酸配列を決定し, トランジットペプチドと成熟蛋白質の部位を明らかにした。イネ葉 cDNA から推定される FNR のアミノ酸配列は双子葉植物の FNR と高い相同性をもっていたが, イネ根 FNR cDNA から推定されるアミノ酸配列とは 49% の相同性しかもっていなかった。一方, cDNA から推定されるイネ胚 FNR のアミノ酸配列はイネ根 FNR と 90% の相同性をもっていた。これらのことから, 光合成組織と非光合成組織には異なった FNR が発現し, 従属栄養型 FNR の存在が明らかになった。

2. イネ FNR ゲノム DNA のサザン解析

上記 3 種のイネ FNR cDNA をプローブとして, ゲノム DNA のサザン解析を行い, それぞれの cDNA に対応する遺伝子が 1 コピー存在することを明らかにした。

3. FNR の一次構造に基づく分類

植物, 藻類 FNR のアミノ酸配列は高等植物光合成型, 高等植物従属栄養型, 緑藻型, 藍藻型に大別さ

れることを見い出した。しかし *Cyanophora* FNR は何れの型にも属さないことが判明した。

4. 硝酸塩によるイネ根 FNR 遺伝子発現の誘導

無窒素で培養したイネ根には FNR mRNA は殆ど検出されないが、 NO_3^- 添加後 1 時間以内に顕著に誘導され最大値に達し、その後減少することから、FNR が NO_3^- 同化に関与することを示した。

5. イネ根 FNR 遺伝子のクローニングと構造解析

根 FNR の全長 3.9 kbp のゲノムクローンを単離し、その構造を決定した。プライマー伸長法により転写開始部位を決定し、5' 上流域 (1122 bp) には基本転写因子の結合配列の他に、アカパンカビの硝酸塩レダクターゼ遺伝子のシスエレメントと似た GATA 配列、TCCN₅GGA 配列、T-rich 配列を見い出した。一方、転写領域は 5 個のイントロンを含む 6 個のエキソンから構成されることを明らかにした。

6. イネ根 FNR 遺伝子の転写因子の検索

根 FNR 遺伝子のプロモーター領域には NO_3^- 誘導に関与すると思われる特異的配列が存在するので、ゲル移動度シフトアッセイによりこれらの塩基配列に結合する核蛋白質を検索した。その結果、イネの根と葉の核に GATA, TCCN₅GGA, および T-rich 配列に結合する蛋白質の存在が明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

植物の一次生産は窒素肥料の投与量に支配されるが、特に硝酸塩の還元同化は収量を支配する大きな要因である。光合成組織では光化学系で生成する還元型フェレドキシン (Fd) によって亜硝酸塩が還元同化されるが、非光合成組織では炭水化物代謝で生成する NADPH からフェレドキシン-NADP⁺ オキシドレダクターゼ (FNR) の逆反応によって還元型 Fd が供給され、亜硝酸塩を還元すると考えられている。しかし非光合成組織の硝酸塩同化系に関与する FNR の分子レベルでの実体は不明であった。本論文はイネ根、胚 FNR 遺伝子は葉のそれとは異なる遺伝子であり、硝酸塩によって発現誘導されることを明らかにしたもので、成果のうちとくに評価できる点は以下の通りである。

1. イネ葉、根、胚に発現する FNR cDNA をそれぞれクローニングし、同一植物種で初めて 3 種の FNR cDNA の存在を示した。葉と根の cDNA の塩基配列から推定されるアミノ酸配列の相同性は低いが、根と胚のそれは高いことを明らかにした。このことから高等植物には光合成型と従属栄養型の FNR 遺伝子が存在することを初めて示した。
2. 葉緑体 FNR の発現は光によって誘導されるのに対し、根 FNR 遺伝子の発現は硝酸塩によって誘導されることを明らかにし、根 FNR は硝酸塩同化に機能していることを示唆した。
3. イネ根 FNR 遺伝子を単離し、その全塩基配列を決定し、プロモーター領域に硝酸塩誘導に関与することが推定される 3 種類のシスエレメントを見い出した。
4. イネ根 FNR 遺伝子のプロモーター領域に見出された 3 種のシスエレメントに結合する核蛋白質が存在することを証明した。

以上のように本論文はイネ根に発現する FNR の生理的機能、一次構造、遺伝子構造、硝酸塩による遺伝子発現の誘導などに関して新しい知見を提示している。従来、硝酸塩同化系については主に硝酸塩レダクターゼ、亜硝酸塩レダクターゼの遺伝子が研究されてきたが、その還元力供給系に関与する遺伝子につい

ては着目されていなかった。本研究によって高等植物の非光合成組織の硝酸塩同化でのFNRの役割が明らかになり、硝酸塩同化能力の向上による一次生産機能の増進を計る研究に資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9年2月20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。