

|           |                                                                                   |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名       | おくむら さとる<br>奥村 暁                                                                  |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (農 学)                                                                         |
| 学 位 記 番 号 | 論 農 博 第 2295 号                                                                    |
| 学位授与の日付   | 平成 12 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    | Gene Manipulation of Phosphate Uptake in Higher Plants<br>(高等植物におけるリン酸吸収機構の遺伝子操作) |

|        |                    |           |           |
|--------|--------------------|-----------|-----------|
| 論文調査委員 | (主 査)<br>教 授 泉 井 桂 | 教 授 古 澤 巖 | 教 授 遠 藤 隆 |
|--------|--------------------|-----------|-----------|

### 論 文 内 容 の 要 旨

リンは植物の3大栄養素の一つであり植物にとって必須であるが、一方で肥料の原料として用いられるリン鉱石が世界的に枯渇する心配が出始めている。このため、土壌中のリン酸を効率よく利用する植物の作出は今後の農業のために非常に重要な課題である。植物のリン酸代謝については植物生理学的な研究がよくなされているのに対して、分子生物学レベルでの研究は報告が少なく、知見が乏しいのが現状である。植物はリン酸飢餓時に環境応答の一環としてリンを有効利用するための様々な反応を示す。本研究ではリン酸飢餓植物反応の中でクエン酸・リンゴ酸などの有機酸分泌と、根のリン酸吸収活性の増大に着目し、高等植物のリン酸吸収機構にかかわる遺伝子の操作によりリン酸吸収効率を高めた植物を作出する事を目的とした研究を行っている。主な研究成果は次の通りである。

1. クエン酸・リンゴ酸はともに TCA サイクルの代謝中間体でありこれらを分泌する際には補充反応が重要になる。そこで、補充反応を担うホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（以下、PEPC と略す）に着目し、畑作物の一つであるアブラナから4種類の PEPC 遺伝子ゲノムクローンを単離し、その塩基配列を解析した。その結果、3種の遺伝子の推定ゲノム構造が既知の植物 PEPC 遺伝子と違う構造を有することが分かった。既知の植物 PEPC 遺伝子は全て10個のエキソンからなっていた。しかし、今回単離したアブラナの PEPC 遺伝子のなかで、2種類はトウモロコシの3番目相当のイントロンが、1種類は7番目相当のイントロンがそれぞれ欠失していた。また、これら遺伝子は恒常的に発現しており、根の有機酸分泌に関与する PEPC 遺伝子の特定はできなかった。残る1種類については推定ゲノム構造は既知の植物 PEPC 遺伝子と同じであったが、塩基配列の欠失や終始コドンへの変異が見られ、遺伝子発現も確認できなかったことから偽遺伝子と考えられた。

2. 次に、ダイズの PEPC 遺伝子をモデル植物であるシロイヌナズナで過剰発現させた。有機酸分泌が増えればそのキレート効果によりアルミニウムイオン耐性が高くなると期待されたが、確認できなかった。有機酸を多量に根の外に分泌するためには有機酸チャンネルの活性化などが必要であると予想された。しかし、植物根の有機酸分泌に関わるチャンネルについては生理学的に傍証があるだけで、現在のところほとんど知見がない。

3. 植物の高親和性リン酸輸送体（以下、PHr と略す）については、研究開始時点で遺伝子単離の報告はなかった。しかし、シロイヌナズナ Expressed Sequence Tag database の中に酵母の高親和性リン酸輸送体遺伝子 *pho 84* と相同性を示す遺伝子のデータが見つかり、その情報をもとにこの植物から PHT 遺伝子群を単離した。ゲノムクローンを丹念にスクリーニングして、シロイヌナズナの PHT 全てと思われる7種類の遺伝子を単離した。

4. 各 PHT 遺伝子のマッピングを行ったところ、2種類の遺伝子がシロイヌナズナのリン酸蓄積突然変異体 *pho 2* の位置と近かった。そこで、*pho 2* 変異体の PHT 遺伝子の解析を行ったが、コード領域の塩基配列、遺伝子の発現様式ともに野生型株との差がなかった。このことから、*pho 2* は PHT 遺伝子の変異に起因するものではないと考えられた。

5. PHT 遺伝子のコードするタンパク質が高親和性リン酸輸送活性を有していることは、タバコ培養細胞に RHT 1 遺伝子を過剰発現させることによって確認した。また、このタバコ培養細胞を、リン酸を含む培地で短時間培養後リン酸を含ま

ない培地に植え継いで生育を観察したところ、対照培養細胞に比べて、PHT 1 過剰発現細胞は生育量が多かった。これは、成長初期の、リン酸吸収量を増やすことによって培養細胞の最終的な生育量に影響を与えうるとことを示している。

6. 以上の結果を総合すると、植物の高親和性リン酸トランスポーターの活性を増大させることによって植物の生育を良くできる可能性が示唆された。また、有機酸分泌による土壤中不溶性リン酸（リン酸アルミニウムなど）の可溶化については細胞内の有機酸合成の促進だけでなく、現在ほとんど知見のない有機酸分泌機構の強化が必要であることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

植物の3大栄養素の一つであるリン酸の代謝については、植物生理学的な研究が多くなされてきたのに対して、分子生物学レベルでの知見が乏しかった。本論文では、リン酸飢餓状態の植物の反応の中でも特にクエン酸やリンゴ酸などの有機酸分泌と、根のリン酸吸収活性の増大の2点に着目し、高等植物のリン酸吸収機構関連遺伝子の操作によりリン酸吸収効率を高めた植物の作出を目的として研究を行っている。評価すべき主な研究成果は次の通りである。

1. クエン酸やリンゴ酸などの有機酸を根外に分泌するに際しては重要な働きをするのがPEPCである。本研究ではPEPCに着目し、畑作物のアブラナから4種類のPEPC遺伝子ゲノムクローンを単離した。単離された遺伝子の構造を調べた結果、新規なエキソン-イントロン構成をもつものを見いだした。これは、植物のPEPC遺伝子の分子進化を考える上で有用なデータである。

2. 次に、ダイズのPEPC遺伝子を、モデル植物であるシロイヌナズナにおいて過剰発現させた。意図した形質は確認できなかったが、根の有機酸分泌に着目した解析はほとんど例がなく興味深い試みである。

3. 植物のPHTについて、シロイヌナズナからPHT遺伝子群を単離した。特定の遺伝子群を網羅的に単離した例は少なく、発現組織の確認なども行っており、各遺伝子の機能分担の解明などへの足がかりとなる成果である。

4. タバコ培養細胞にRHT 1遺伝子を過剰発現させることによって、この遺伝子が高親和性リン酸輸送タンパク質をコードしていることを確認した。さらに、この培養細胞は前処理後のリン酸欠乏条件下で野生型培養細胞に比べて生育量が増大することを観察した。この結果はPHT遺伝子群の発現強化により植物の生育量を増大させうる可能性を示し、農作物の生産性の増強のための一つの有力な指針を与えるものである。

5. なお、遺伝子の機能を証明するために、通常は大腸菌や酵母を用いるのに対して、本論文では植物の培養細胞で機能解析が行えることを示したのは方法論的に新しい。

以上のように、本論文は植物のリン酸代謝を分子生物学的に探求したもので、植物生理学、植物分子育種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12年1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。