

氏 名	とよ た けん た ろう 豊 田 健 太 郎
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1293 号
学位授与の日付	平 成 14 年 7 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 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Molecular analysis of C3 phosphoenolpyruvate carboxylase gene expression (C3 型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子の発現調節機構の解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 佐 藤 文 彦 教 授 關 谷 次 郎 教 授 泉 井 桂

論 文 内 容 の 要 旨

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) はホスホエノールピルビン酸と HCO_3^- を基質として、オキザロ酢酸と P_i を生成する反応を触媒する炭酸固定酵素である。PEPC は C4 や CAM 植物の光合成経路における初期炭酸固定に関与するばかりでなく、C3 植物においてもクエン酸回路回転やアミノ酸の生合成に対して C4 ジカルボン酸を供給する補充反応、pH や浸透圧バランスの維持、NADPH の生成、葉における気孔の開閉の調節等の多様な役割をもつとされている。しかし、C3 植物の PEPC はその発現が構成的であり、かつ比較的発現量が低いことから解析が遅れている。本論文は C3 植物であり、タバコの祖先種である *Nicotiana sylvestris* 由来のゲノム遺伝子を用いて、C3 型の PEPC 遺伝子の発現調節、特にリン酸欠乏時における有機酸の合成、あるいは解糖系のバイパス経路としての発現調節機構を解明しようとしたものである。その内容は以下の通りである。

第 1 章では、リン酸欠乏による C3 型 PEPC の発現誘導をタバコの芽生えを用いて検討した結果をまとめている。まず、播種後 8 日目の芽生えがもっとも顕著な応答を示すことを明らかにするとともに、その活性誘導はタンパク質の増加によること、根および地上部の両方において認められること、さらには、リン酸欠乏に対してショ糖の添加が相乗的に作用することを明らかにした。

第 2 章では、リン酸欠乏に対する PEPC の発現誘導の機構を解明するために、*N. sylvestris* から単離されていた 3 種の PEPC 遺伝子 (*Nsppc1-3*) を用いて解析した結果をまとめている。すでに、これら 3 種の *Nsppc* 遺伝子のうち、*Nsppc1* が根、茎、葉、培養細胞のいずれの組織においても、他の 2 つよりも強く発現していることを明らかにしていたが、リン酸欠乏条件下においても、この *Nsppc1* が主に応答していることを明らかにした。

次いで、この *Nsppc1* 遺伝子のプロモーター領域約 2kb を単離し、その塩基配列を決定するとともに、このプロモーター配列にレポーター遺伝子である β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子を連結させたキメラ遺伝子を構築し、その形質転換植物を作製して、リン酸欠乏応答に必要な遺伝子配列の解析を行った。まず、*Nsppc1* のプロモーター領域約 2kb を含むキメラ遺伝子を導入したタバコ (*Nicotiana tabacum*) を用い、その GUS 活性がリン酸欠乏によって増加し、さらにその活性は培地へのショ糖の添加によって相乗的に増加することを明らかにした。このことは、C3 型 PEPC 遺伝子のリン酸欠乏による活性の増大が転写レベルで制御されており、本研究で用いた 2kb のプロモーター領域中にリン酸欠乏応答性シス配列が存在することを示していた。

続いて、2kb のプロモーター配列を 5' 側から欠失させたキメラ遺伝子を数種類作製し、リン酸欠乏応答性シス配列を解析した。まず、PEPC の構成的発現におけるプロモーターの転写調節活性を測定し、翻訳開始点より上流 -400~-265bp の領域にサイレンサー様の配列が存在することを明らかにした。一方、リン酸欠乏応答性を解析した結果、-539~-442bp の領域を欠失させるとリン酸欠乏応答性が失われることを明らかにした。さらに、gain-of-function 実験により、この領域だけでリン酸欠乏応答性の決定に必要かつ十分であることを明らかにした。

第3章では、上記の-539~-442bpのリン酸欠乏応答性シス配列と相互作用するトランス因子の単離を試みた結果をまとめている。上記の領域を4つタンデムに並べたone-hybridスクリーニングベクターを用いて、リン酸欠乏および通常の培地で生育させたタバコ芽生えのcDNAライブラリーをスクリーニングし、この領域と明らかに相互作用する遺伝子を得た。この遺伝子の塩基配列を決定し、AT-hook DNA結合タンパク質と高い相同性を有することを明らかにするとともに、その発現を解析し、リン酸欠乏に対する応答性は示さないことを明らかにした。以上の結果を元に、*N. sylvestris* PEPC遺伝子のリン酸欠乏応答の調節機構について考察している。

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やCAM植物の光合成経路における初期炭酸固定に関与するばかりでなく、C3植物においても多様な役割をもつとされているが、C3植物のPEPCの研究はその発現が構成的であり、かつ比較的発現量が低いことから遅れていた。本論文はC3植物であり、タバコの祖先種である *Nicotiana sylvestris* 由来のゲノム遺伝子を用いて、C3型のPEPC遺伝子の発現調節、特にリン酸欠乏による発現調節機構を解明しようとしたものであり、その評価できる内容は以下の通りである。

1. タバコの芽生えを用いて、C3型PEPCがリン酸欠乏によって発現誘導されることを明らかにするとともに、その活性誘導がPEPCタンパク質の増加によること、さらには、リン酸欠乏に対してショ糖の添加が相乗的に作用することを明らかにしている。
2. *N. sylvestris* から単離されていた3種のPEPC遺伝子 (*Nsppc1-3*) を用いて、これら3種の *Nsppc* 遺伝子のうち、*Nsppc1* がリン酸欠乏条件下においても、主に応答していることを明らかにしている。
3. *Nsppc1* 遺伝子のプロモーター領域約2kbを単離し、その塩基配列を決定するとともに、このプロモーター配列にGUSレポーター遺伝子を連結させたキメラ遺伝子を構築し、C3型PEPC遺伝子のリン酸欠乏による発現の増大が転写レベルで制御されており、単離した2kbのプロモーター領域中にリン酸欠乏応答性シス配列が存在することを示している。
4. 2kbのプロモーター配列を5'側から欠失させたloss-of-function解析により、翻訳開始点より上流-400~-265bpの領域にPEPCの構成的発現に対するサイレンサー様の配列が存在することを明らかにしている。さらに、リン酸欠乏応答性の解析により、-539~-442bpの領域が必要であることを示し、さらにgain-of-function実験により、この領域だけで、リン酸欠乏応答性の決定に必要かつ十分であることを明らかにしている。
5. -539~-442bpのリン酸欠乏応答性配列と相互作用する遺伝子を単離し、この遺伝子がAT-hook DNA結合タンパク質と高い相同性を有することを明らかにしている。

以上のように本論文は、C3型PEPCの発現調節、特に、リン酸欠乏応答が転写レベルで制御されていることを明らかにするとともに、その制御に必要なシス配列を初めて同定したものであり、C3植物の一次代謝の分子生理学ならびに細胞生物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14年6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。