

氏 名	チン 陳 レイ 麗 メイ 梅
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1256 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 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 物 科 学 専 攻
学位論文題目	Molecular Characterization of Recombinant Phosphoenolpyruvate Carboxylase from a Thermophilic Cyanobacterium, <i>Synechococcus vulcanus</i> , and Effects of Its Expression on Nitrogen and Carbon Metabolism in <i>Arabidopsis thaliana</i> (好熱性シアノバクテリア由来の組換え体ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの分子特性解析と本酵素のシロイヌナズナにおける発現が窒素および炭素代謝におよぼす影響) (主 査)
論文調査委員	教 授 泉 井 桂 教 授 奥 野 哲 郎 教 授 西 岡 孝 明

論 文 内 容 の 要 旨

C4 光合成は光呼吸を抑制することによって炭酸同化の効率を高める働きがあることから、農業的にも魅力的な形質である。多くの作物植物は C3 光合成を行うので、これらに C4 光合成に類似した形質を付与することができれば、生産性を大きく向上させることができると期待される。その手始めとして、C4 光合成の初期炭酸固定酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) をはじめいくつかの C4 光合成酵素遺伝子を C3 植物に導入する試みが行われつつある。これまでに C4 植物や細菌の PEPC 遺伝子が導入されてきたが、発現されても植物体において高い活性を発現させるには至っていない。本研究は、安定性が高く、かつフィードバック阻害を受けにくい PEPC を探索し、その酵素学的特性を明らかにするとともに、これをシロイヌナズナに導入して実際に代謝的に顕著な影響をひきおこすことに成功したことを報告している。

第 1 章においては、好熱性シアノバクテリアの PEPC (遺伝子 (*SvPEPC*)) を大腸菌において発現させ、均一標品を調製して、酵素学的な諸性質を調べた。*SvPEPC* はトウモロコシの C4 光合成 PEPC (*ZmPEPC*) にくらべて 30°C における最大比活性および基質や Mg^{2+} に対する半飽和濃度はさほど違わなかったが、熱および変性剤に対する耐性は格段に高かった。種々のアロステリックな調節因子の探索をおこなった結果、以下の点が明らかになった。1) *SvPEPC* は多くの細菌の PEPC とは異なり、アセチル-CoA による活性化を受けず、この点では植物酵素と同様であるが、植物酵素とは異なりフルクトース 1,6-ビスリン酸 (FBP) によって強く活性化されること。2) フィードバック阻害因子に対する感受性はかなり弱く、pH 7.5 においてはアスパラギン酸 (Asp) によって有意に阻害されたが、リンゴ酸 (MA) によっては全く阻害されず、植物酵素と著しく異なっていた。3) さらに、FBP は Asp や MA に対する感受性を逆に高めること、および至適 pH である 9.0 では、植物酵素とは逆に Asp や MA に対する感受性が高まること。

第 2 章においては、*SvPEPC* に部位特異的変異を導入し、フィードバック阻害因子 Asp に対して脱感作した酵素を作成した。Asp と結合した大腸菌 PEPC の立体構造から Asp との結合に関与する塩基性アミノ酸残基を特定し、これに対応する *SvPEPC* の残基について非塩基性アミノ酸残基への置換をおこなった。その結果、Lys889 を Ser に置換した酵素では、pH 9.0 および pH 7.5 においてはほぼ完全に Asp 感受性を失い、しかも触媒活性はまったく影響を受けていないことを見出した。

第 3 章においては、シロイヌナズナの形質転換を行い、野生型 *SvPEPC* および *ZmPEPC* 遺伝子をカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターのもとに発現させてその効果を調べた。*SvPEPC* では顕著な表現型の変化がみとめられたが、*ZmPEPC* ではみとめられなかった。*SvPEPC* による形質転換体の表現型は 4 つにわけることができた。タイプ I では、スクロースを含む寒天培地で生育させたとき、芽生えの本葉の出現が抑制されるか、または出現しても辺縁部が壊死した異

常な葉がみられた。タイプⅡでは、同様の生育条件下で白化した葉を生じ、側根の発達が抑制されていた。タイプⅢでは、同様の生育条件下で、野生型のような正常な生育を示した。タイプⅣでは、鉢植えの T1 世代において、若い葉の基部および花序の白化がみとめられ、不稔となった。

第4章においては、タイプⅠの形質転換体について、発生、生長および代謝の観点からより詳細な解析をおこなった。SvPEPC の発現はノザンプロット、ウェスタンプロットおよび活性測定により確かめた。スクロースを含む寒天培地で生育させたときの生育異常は、培地に芳香族アミノ酸を添加することにより解除されたことから、SvPEPC の発現により PEP のプールが低下し、シキミ酸経路による芳香族アミノ酸の供給が十分にできなくなったためと推測された。実際、PEPC の作用によって生じる Gln, Asn および Arg の含量は、非形質転換株より 5-10 倍増加していた。培地へのスクロースの添加は窒素同化を高めることが知られているが、SvPEPC の発現はこの傾向を強めるようであった。さらに、形質転換株の生長や形態的な表現型がいわゆる *sugar-sensing* によってもたらされる表現型とよく似ており、実際、形質転換体におけるヘキソースの含量が増加していたことから、SvPEPC の発現による異常な表現型は *sugar-sensing* の作動の亢進による間接的効果ではないかと推測された。

これらの知見によって、植物体において発現された SvPEPC がその酵素機能を十分に発揮していることが強く示唆された。

論文審査の結果の要旨

C3 植物に C4 光合成の代謝経路の一部を付与することによって作物の光合成能を高めることは、食糧増産のための一つの方途ではないかと考えられている。現在も世界各地で C4 代謝の酵素を C3 植物に導入する試みが行われているが、C4 光合成を成立させている遺伝子群の全貌も未解明であり、その実現性を危ぶむ声もある。これまでに導入された C4 光合成酵素のなかで、とくに初期炭酸固定を行うホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) は C3 植物において大量に発現させても必ずしも高い活性を発揮しないことも一つの問題となっている。本研究は、代謝中間体によるフィードバック阻害がかかりにくく、かつ安定な PEPC を見出し、これを実際に C3 植物に導入してその活性発現を確認したものであり、評価すべき点は以下の通りである。

- (1) 好熱性シアノバクテリアの PEPC (SvPEPC) の組換え体酵素を調製し、その酵素学的諸性質を、トウモロコシ C4 光合成の PEPC (ZmPEPC) と比較しつつ調べた。SvPEPC が熱安定性にすぐれ、アセチル-CoA に依存しない植物型の酵素であり、かつフィードバック阻害因子であるリンゴ酸に対する感受性がきわめて低いことなどから、C3 植物に導入するための酵素として適していることを明らかにした。
- (2) SvPEPC のアロステリックな挙動は、活性化因子の一つによって阻害因子の酵素に対する親和性が逆に高められるという点で従来のアロステリック酵素のモデルでは解釈できず、酵素学的に新規な知見である。
- (3) SvPEPC に部位特異的変異を導入することによって、フィードバック阻害剤に対する感受性を著しく低下させ、かつ酵素活性は野生型と同様であるような酵素の作出に成功した。これは、今後利用価値があると期待される。
- (4) SvPEPC を C3 植物のシロイヌナズナに導入し、顕著な表現型を生じさせることに成功し、SvPEPC が実際に高い活性を発現していることをはじめて示した。とくに、形態的な異常や葉の白化という表現型が、芳香族アミノ酸の添加によって正常化された知見は注目に値する。
- (5) 形質転換植物の表現型が、スクロースを培地に与えたときに顕著となることから、*sugar-sensing* の作動が亢進されたからではないかという仮説を提出しているが、今後の検討に値すると思われる。

以上のように、本論文はいくつかの新規で有用な知見をもたらしており、植物生理学、生化学、分子育種学に貢献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2月21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。