| 博士論文の要旨及び審査結果の要旨 | |
|---|---|
| 氏　　名 | 猪俣　拓也 |
| 学　　位 | 博士（農学） |
| 学 位 記 番 号 | 新大院博（農）第 189 号 |
| 学位授与の日付 | 平成 31 年 3 月 25 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 |
| 博 士 論 文 名 | Studies on physiological function of *Oryza sativa* nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1<br>（イネ nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 の生理機能に関する研究） |
| 論 文 審 査 委 員 | 主査　教授・三ツ井　敏明<br>副査　教授・末吉　邦<br>副査　教授・伊藤　紀美子<br>副査　教授・原田　直樹<br>副査　准教授・佐藤　努<br>副査　助教・金古　堅太郎 |

博士論文の要旨

Nucleotide pyrophosphatase /phosphodiesterase (NPP) は動植物に普遍的に存在する酵素であり、ヌクレオチドや糖ヌクレオチドのピロリン酸とホスフォジエステル結合を加水分解する。哺乳類の NPP はヌクレオチドシグナリング、細胞分化、ヌクレオチドのリサイクルや濃度調整に関与していることが知られている。しかし、植物における NPP の生理機能詳細はまだ不明な点が多い。本研究では、NPP の酵素としての特性を明らかにするとともに、NPP ファミリーの中で特に NPP1 に注目し、変異体を作成、解析することで植物における NPP1 の生理機能解明を目的として行われた。

NPP の機能の解明のため NPP1、NPP2、NPP6 の強発現イネ細胞から酵素タンパク質を精製し、それぞれの酵素特性の解析を行われた。NPP1 および NPP6 はヌクレオチド糖を認識した。一方、NPP2 は基質としてヌクレオチド糖を認識しなかったが、優先的に UDP、ADP、およびアデノシン 5'ーホスホサルフェート（APS）を加水分解した。 NPP1 は ADP-グルコース、ADP-リボース、および ATP を最もよく加水分解したが、NPP 6 の最適な基質は ADP および ADP-グルコースであった。NPP1 の生理機能を解明するため *Tos17* 挿入 *npp1* 変異体を作成し、解析が行われた。*npp1* 変異体の幼芽では ADP-グルコース加水分解活性が WT の 8%まで低下していたことより、*NPP1* はイネの幼芽において主要な ADP-グルコース加水分解酵素として機能していると考えられた。ADP-グルコース量の変化はデンプン合成に影響を及ぼすことが知られている。そこで、*npp1* 変異体と過剰発現体のデンプン含量を測定したところ、*NPP1* 遺伝子の mRNA 発現レベルによりデンプン含量が変動していることが分かった。これより、NPP1 の 1 つの重要な機能はデンプン生合成の調節であることが示された。

*NPP1* の変異がイネの成長生理に及ぼす影響を調べるために、サーモグラフィと光合成測定装置を用いた解析が行われた。*npp1* 変異体では植物体温は WT より低く、葉の気孔コンダクタンスおよび光合成速度が増加していた。同じ細胞内 $CO_2$ 濃度（$C_i$）でも有意に光合成速度が高まっていたことから、*NPP1* の変異は気孔コンダクタンスによらないで光合成を促進する機構もあることが示唆された。次に、この *npp1* 変異体を 28℃ / 23℃、160 Pa の高 $CO_2$ 条件下で栽培した場合、WT と比較して植物の成長とデンプン蓄積が促進され

た。高温条件下（33℃ / 28℃、160 Pa）でも同様の現象が見られた。これらの結果から、*NPP1* 遺伝子の機能不全は気孔を開くことによって植物体温を低下させ、光合成を促進し、デンプンおよびスクロースの蓄積を引き起こすことが分かった。

高温・高 $CO_2$（HT + $ECO_2$）下での *npp1* 葉のプロテオームの変化を調べるために、定量的プロテオーム解析が行われた。一般的な傾向は、HT + $ECO_2$ 処理に対する *npp1* 変異体の応答は、少なくとも、光合成、炭水化物代謝、タンパク質合成、およびシグナル伝達系のタンパク質発現の変化によるものであることを示した。さらに、キナーゼおよびホスファターゼなどの様々なシグナル伝達タンパク質と相互作用する 14-3-3 タンパク質の発現も *npp1* 変異体において増加した。葉緑体に存在する 14-3-3 タンパク質は、ストロマおよびチラコイド膜のストロマ側に局在しており、このことはデンプン調節における潜在的役割を示唆した。多くのタンパク質が葉緑体でリン酸化されることが報告されており、それらは光合成の明暗反応に関連している。単離された葉緑体におけるホスホプロテオームを解析した結果、クロロフィル a/b 結合タンパク質は HT + $ECO_2$ 下の *npp1* 変異体において有意にリン酸化されていた。したがって、HT + $ECO_2$ 下の *npp1* における高いリン酸化状態は、イネの成長および炭水化物蓄積の活性化に関連している可能性があると考えられた。

審査結果の要旨

本学位論文では、イネ nucleotide pyrophosphatase /phosphodiesterase (NPP)の酵素としての特性の解明と、*NPP1* 遺伝子の生理機能解明が行われた。NPP1 は ADP-グルコース、ADP-リボース、および ATP を最もよく加水分解した。*NPP1* 遺伝子はイネ植物体における澱粉・ショ糖蓄積、気孔開閉、光合成並びに成長の制御に関わることが示された。*NPP1* 遺伝子機能欠損により上記のような制御が失われると、光合成やタンパク質の合成・リン酸化が促進され、デンプンやスクロースといった炭水化物蓄積や成長が亢進されることが示唆された。

これまでイネにおける NPP1 の生理機能の詳細は不明であったが、本研究によって、イネ植物体の健全な成長のために NPP1 が光合成、澱粉・ショ糖蓄積並びに成長の微調整を担っていることが明らかにされた。

本論文の主な内容は、申請者を筆頭著者として以下の論文に掲載済みである。

1 金古 堅太郎、猪俣 拓也、増井 貴広、甲州 努、梅沢 幸歩、伊藤 紀美子、Javier Pozueta-Romero、三ツ井 敏明: Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 exerts a negative effect on starch accumulation and growth in rice seedlings under high temperature and $CO_2$ concentration conditions.
平成 26 年(2014 年) 2 月発行 *Plant Cell and Physiology* Vol.55(2), pp320-332

2 猪俣 拓也、Marouane Baslam、増井 貴広、甲州 努、高松 壮、金古 堅太郎、Javier Pozueta-Romero, 三ツ井 敏明: Proteomics analysis reveals non-controlled activation of photosynthesis and protein synthesis in a rice *npp1* mutant under high temperature and elevated $CO_2$ conditions
平成 30 年(2018 年) 9 月発行 *International Journal of Molecular Sciences* Vol.19(9) DOI:10.3390/ijms19092655

よって、本論文は博士（農学）の博士論文として十分であると認定した。