

ふりがな なんじょう ようへい
氏名 南 條 洋 平
学位 博士 (農学)
学位記番号 新大院博 (農) 第 56 号
学位授与の日付 平成 16 年 9 月 30 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 Germination and Growth Regulating Enzymes in Rice Plant
(イネにおける発芽・生長制御関連酵素に関する研究)

論文審査委員
主査 教授 三ツ井敏明
副査 教授 堀 秀隆
副査 教授 和田 清俊
副査 教授 大山 卓爾
副査 助教授 伊藤紀美子

博士論文の要旨

植物においてデンプンは、生長に必要なエネルギーの貯蔵形態として重要である。デンプンは色素体で合成され、貯蔵される緑葉においては、デンプンは葉緑体に一時保存される、一方、種子や塊根などの貯蔵組織においては、アミロプラストがもっぱらデンプン貯蔵オルガネラとしての役割を果たしている。単子葉穀類において、発芽及びその後の伸長・生長のために種子胚乳に貯蔵されたデンプンが用いられる。本論文は、イネ (*Oryza sativa* L.) の発芽・生長に本質的に関わるデンプン分解・合成関連酵素の詳細を解明することを目的として研究が行われ、得られたいくつかの新知見をとりまとめたものである。

1. 発芽イネ種子における *RAmy3B/3C* 遺伝子にコードされた α -アミラーゼアイソフォームのプロテオミクス解析による同定：発芽イネ種子から 10 個の α -アミラーゼアイソフォームが β -シクロデキストリンアフィニティーカラムクロマトグラフィー及び二次元電気泳動法によって単離、同定された。抗 α -アミラーゼ I-1、II-4 抗体を用いたイムノプロットの結果、8 個のアイソフォームが α -アミラーゼ I-1、II-4 とは異なるものであった。ペプチドマスフィンガープリント解析から *RAmy3B/3C* 遺伝子によってコードされた新しいアイソフォームの存在が確認された。それらの至適温度は α -アミラーゼ II-4 (*RAmy3D*) と類似していた。さらに一遺伝子から生ずる複雑な多型発現が *RAmy3D* だけでなく *RAmy3B* にも起こっていることが見出された。

2. 発芽イネ種子におけるジベレリン誘導 α -アミラーゼ II-4 発現の転写後調節：発芽イネ種子を用いて、その遺伝子のプロモーター領域にジベレリン応答シス領域 (GARE) のない α -アミラーゼ II-4 のホルモンによる発現制御が調べられた。アリュエロン層における時期、組織特異的な α -アミラーゼ II-4 の発現は、その遺伝子に GARE をもつ α -アミラーゼ I-1 と同様であったが、発芽の早い時期においては区別できるものであった。 α -アミラーゼ II-4 のジベレリン応答発現もまた、 α -アミラーゼ I-1 と類似していた。しかしながら、 α -アミラーゼ II-4 mRNA レベルは、ジベレリンによって増加せず、こ

これは、 α -アミラーゼ II-4 mRNA 発現の増加がアリュールン層では起こらないことを示していた。ジベレリンは、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の細胞内分泌系膜システムへの蓄積を引き起こした。加えて Ca^{2+} シグナリングのさまざまなエフェクター、EGTA、ネオマイシン、ルテニウムレッド、そして W-7 は、ジベレリン誘導 α -アミラーゼ II-4 発現に影響を及ぼした。一方、ヘテロ3量体 G タンパク質の α サブユニットの欠損した矮性変異体である *d1* においてジベレリン誘導 α -アミラーゼ II-4 発現は、正常であった。これらの結果から発芽イネ種子アリュールン層におけるジベレリン誘導 α -アミラーゼ II-4 の発現は、 Ca^{2+} を介するが、G タンパク質を介さない転写後の調節によって制御されていると結論された。

3. イネヌクレオチドピロホスファターゼの精製とクローニング及び発現によるその特性の解析：イネ発芽種子から ADP-グルコースをグルコース-1 リン酸と AMP に加水分解する活性を有する新規なヌクレオチドピロホスファターゼ (NPP) が同定、精製された。ゲル濾過クロマトグラフィー及び MALDI-TOF-MS を用いたペプチドマスフィンガープリント解析から、精製酵素は 70 kDa のポリペプチドで構成されたホモポリマーであったことが分かった。この酵素は、Con A に結合すること、SDS との親和性が低いこと、PAS 染色されること、さらにエンドグリコシダーゼ H により糖鎖が切断されることから糖鎖修飾されていることが分かった。酵素反応速度論的解析から NPP は、広い範囲の糖ヌクレオチド、ヌクレオシド二リン酸、三リン酸を分解する能力を持つことが分かった。N-末端及び内部のアミノ酸配列の解析によりこの酵素は単子葉、双子葉、両植物中に存在し、その役割が多岐にわたる植物ヌクレオチド分解酵素ファミリーに属することがわかった。加えて、NPP をコードする完全長 cDNA をイネ及びジャガイモで発現させ、その性質が精製酵素と一致することが確かめられた。予測されたアミノ酸配列には、多くの N-結合型糖鎖の結合部位があり、成熟タンパク質の N-末端配列の前に切断可能な疎水的なシグナル配列があった。最も重要なことに、免疫組織観察及び NPP、NPP と GFP の融合タンパク質の発現解析において、NPP は葉緑体に局在することが見いだされた。一つの可能性として NPP はヌクレオチドの細胞内レベルをコントロールすることにより関連の糖化反応を制御することが考えられた。

審査結果の要旨

平成 16 年 8 月 23 日 (月)、専攻として公開発表会を持った。その後、審査委員会を開催し、発表内容、質疑応答、論文を査読しての感想、意見交換を行い、特記すべき事項として以下 3 点が挙げられた。

1. α -アミラーゼアイソフォームのプロテオミクス解析により新規な α -アミラーゼアイソフォームが同定された。
2. 発芽イネ種子における α -アミラーゼ II-4 発現解析から、ジベレリンによる発現制御に転写後調節メカニズムが重要な役割を果たすことが明らかにされた。
3. デンプン生合成制御に関する新規な酵素因子が発見された。

また、本論文に記載されている内容の主要部分は国際誌、国内学会誌に掲載されていることから、植物生化学分野へ新知見を加えることにより大きく貢献したと評価した。よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として十分であると認定した。