

## 論文の内容の要旨

論文題目：ニコチアナミン合成酵素に関する研究

氏名：鈴木一矢

鉄をはじめとする遷移金属はその酸化状態が変化するという特性を生かして生体内でタンパク質と結合し、さまざまな電子伝達反応に関与している。中でもその存在量が豊富な鉄はミトコンドリアにおける呼吸鎖の電子伝達系などに大きく関与している。植物特有の器官である葉緑体においても光化学系における電子伝達成分として必要なことはもちろん、集光色素のひとつであるクロロフィルの合成にも必須である。植物はこの微量元素としての鉄を根から吸収するが、その方法は植物種によって異なっている。双子葉植物、イネ科以外の単子葉植物は Strategy I と呼ばれる方法で鉄の吸収をおこなっている。この方法は土壌中の三価鉄を根に存在する還元酵素が二価鉄に還元し、これをトランスポーターで吸収するという方法である。一方、オオムギをはじめとするイネ科植物は根からファイトシデロフォアであるムギネ酸類を放出し、これらムギネ酸が土壌中の鉄を三価の状態でキレートし、植物体内に運び込む。この方法は Strategy II と呼ばれている方法である。Strategy I 植物における三価鉄還元酵素や Strategy II におけるムギネ酸の放出は鉄欠乏によって顕著に誘導される。ムギネ酸類の生合成経路はすでに決定されており、メチオニンを出発物質として、ニコチアナミンが前駆体となっている。このニコチアナミンは Strategy II 植物だけでなく全ての植物に存在していることが知られており、ムギネ酸類の前駆体としてだけでなく、鉄や銅といった微量元素を植物体内で運搬する役割

を担っていると考えられている。本研究では、このニコチアナミンに焦点を当て、まず、ニコチアナミンを合成する酵素、NAS、の精製を行い、その発現について解析を行った。

まず、鉄欠乏条件で生育したオオムギの根とコントロール条件で生育したオオムギの根からそれぞれタンパク質を抽出し、二次元電気泳動によりその組成の比較を行った。NAS 活性はオオムギでは鉄欠乏で顕著に誘導されるので、鉄欠乏によって誘導されるタンパク質の中に NAS が含まれることが期待された。鉄欠乏によって誘導されたタンパク質のいくつかを回収し、ペプチドを断片化してそのアミノ酸配列を求めた。その結果、NAS と予想されるタンパク質は同定できなかった。しかし、鉄欠乏特異的に誘導される遺伝子の一つであり、ムギネ酸合成酵素であることが明らかにされた *Ids3* 遺伝子の遺伝子産物が検出されたほか、鉄欠乏応答には直接関与しないと考えられるギ酸デヒドロゲナーゼ (FDH) や、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (APRT) のタンパク質のスポットの増加が確認された。これらのタンパク質の一つ、FDH について鉄欠乏のオオムギの根から構築した cDNA ライブラリーを用いて FDH をコードする遺伝子のクローニングをおこなった。さらにこの遺伝子を用いて詳細な解析を行ったところ、この酵素は本来の活動の場である嫌気条件下だけでなく、鉄欠乏オオムギの根でもタンパク質の活性の上昇および mRNA の発現が認められた。FDH 遺伝子の鉄欠乏による誘導は鉄欠乏処理後 1 日目に確認されたのに対し、嫌気条件による誘導は嫌気処理後 6 時間後に確認された。鉄欠乏によってクロロフィル、ヘムの共通の前駆体であるプロトポルフィリンの生合成が抑えられ、酸素の運搬をおこなうヘムの量が減少するために嫌気条件が引き起こされるものと考えられた。また、FDH はムギネ酸合成に必要なとされるメチオニンを再生する経路 (Yang Cycle) で生じるギ酸の無毒化処理を行うために発現が促進されている可能性も考えられる。

二次元電気泳動による検出では NAS を特定することができなかったため、鉄欠乏オオムギの根から生化学的方法を用いることによって NAS の精製を試みた。イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィーなどをおこなうことにより、SDS-PAGE 上で NAS 活性を持つバンドを含む画分を得ることができた。NAS 活性を含むバンドを回収し、このバンドを酵素的、化学的に切断して断片化し、アミノ酸配列を求めた。このアミノ酸配列とデータベースの検索によって得られたイネの EST の配列をもとに、鉄欠乏オオムギの根から作成した cDNA ライブラリーからスクリーニングをおこない、オオムギで NAS をコードする遺伝子、*HvNAS1*、をクローニングすることに成功した。この遺伝子を発現ベクターに挿入し、大腸菌内で発現させたところ、NAS としての活性を示した。さらにこの遺伝子の解析を行ったところ、鉄欠乏の根で特異的かつ非常

に強く誘導され、さらにオオムギゲノム中に複数コピー存在することが明らかになった。他の NAS 遺伝子についてもクローニングをおこなった。

オオムギから得られた NAS の遺伝子の配列と *Arabidopsis* のゲノムの配列をもとに Strategy I 植物である *Arabidopsis* から NAS をコードする遺伝子のクローニングをおこなったところ、3 種類の NAS をコードする遺伝子、*AtNAS1* ~*3* をクローニングすることができた。これらの遺伝子を発現ベクターによって大腸菌内で発現させたところ、3 種の *AtNAS* 遺伝子全てが NAS としての活性を示した。すでに得られている複数のオオムギの NAS 遺伝子との配列の比較をおこなったところ、Strategy I 植物の NAS と Strategy II 植物の NAS で保存性の高い領域が見つかった。これらの遺伝子について RT-PCR による発現解析を行ったところ、それぞれが異なる発現のパターンを示すことが明らかになった。*AtNAS1* 遺伝子は植物体の地上部、地下部とともに発現しており、*AtNAS3* 遺伝子は地上部でのみ発現が確認された。また、*AtNAS2* 遺伝子は地上部、地下部ともに発現が確認されなかった。

これら 3 種の *AtNAS* 遺伝子の発現について詳細に調べるために、これらの遺伝子の上流配列をクローニングし、5' 側からのデリベーションを行い、 $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) をレポーター遺伝子とするデリベーションシリーズを作成した。これらのデリベーションシリーズをパーティクルガン法によりタバコ培養細胞 BY-2 に導入した。細胞にさまざまな環境変化 (鉄、銅、亜鉛、マンガンの過剰、欠乏、塩ストレス、浸透圧ストレス、各種植物ホルモンの添加) を与えて培養し、GUS の一過性発現によって各 NAS 遺伝子の環境応答性シスエレメントについて検索をおこなった。その結果、*AtNAS1* 遺伝子の ORF から -323 の位置まで上流域をデリベーションすることによって鉄、銅、亜鉛の欠乏状態で GUS の活性が上昇したが、マンガンの欠乏では GUS 活性の上昇は認められず、また、各金属の過剰状態ではこれらの変化は見られなかった。さらに解析を進めたところ、*AtNAS1* 遺伝子の上流域では *AtNAS1* 遺伝子の ORF から -403 から -363 塩基上流の位置に金属欠乏によって発現を促進するエレメントが存在する可能性が示唆された。この結果は、*AtNAS1* 遺伝子の上流を 3' 側からデリベーションをおこなった場合とも一致した。*AtNAS2* 遺伝子は植物体内で発現が認められなかったものの、その上流域約 1.5 kb のみの配列では BY-2 細胞内で発現が認められた。この結果により、*AtNAS2* 遺伝子は発現する可能性があることが示唆された。また、この遺伝子の上流域は今回おこなった各種条件下では GUS 活性に変化は認められなかった。*AtNAS3* 遺伝子の上流配列は培養液中の金属の含量に応答はしなかったが、各種ホルモンの添加をおこなったところ、エチレンによる GUS 活性の誘導が認められた。*AtNAS3* 遺伝子の上流には代表的なエチレン応答エレメントである GCC ボックスは認められなかったが、カーネー

ションの GST-1 遺伝子やマメのキチナーゼ遺伝子の上流に存在する、別種のエチレン応答エレメントが存在することがわかった。この配列を破壊すると、エチレンによる誘導は失われ、この配列を複数繰り返したプロモーターで、エチレンによる誘導はさらに促進した。オリジナルの *AtNAS3* 遺伝子上流においても、このエレメントのみをとりだして CaMV35S プロモーターの上流に組み込んだ場合でも同様の結果が得られた。また、この配列に方向性はなかった。これらのエレメントについてさらに詳しく解析を進めるために、トランスジェニック植物の作成を行っている。

以上の研究により、鉄欠乏ストレスにさらされた植物が鉄欠乏応答をおこなうだけでなく、さらに擬似的に嫌気条件を引き起こすことが示された。また、イネ科植物、双子葉植物の両方から NAS をクローニングし、これまで鉄欠乏には NAS は応答しないと考えられてきた双子葉植物も、金属の欠乏に対して応答する NAS が存在する可能性があること、さらに、植物ホルモンであるエチレンも NAS の発現に関係していることが明らかになった。これらの遺伝子レベルの研究から、NAS およびその反応産物であるニコチアミンがこれまでの生理学的な研究から予想されていた以上に植物の代謝系に大きな役割を担っていることが示唆された。