

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 鈴木一矢

---

本研究は、多くの試行錯誤の末に、高等植物におけるニコチアナミンを合成する酵素 (NAS) の精製を行い、その遺伝子をクローニングし、その発現について解析を行ったものである。

第 1 章では、高等植物における必須元素である鉄の役割と、高等植物の 2 種類の鉄獲得機構 Strategy-I と Strategy-II について概説している。ニコチアナミンはすべての高等植物に存在している化合物で、ムギネ酸合成経路の中間産物であるばかりで無く、微量重金属元素 (Fe、Cu、Zn、Mn) のホメオスタシスに関係する。

第 2 章では、ギ酸脱水素酵素 (FDH) の遺伝子のクローニングについて述べている。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 が含まれることを期待して鉄欠乏によって誘導されたタンパク質を二次元電気泳動上で数種類を回収したところ、NAS と予想されるタンパク質のアミノ酸配列は得られなかった。しかし FDH が同定され、この遺伝子のクローニングをおこなった。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活性の上昇および mRNA の発現が認められた。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。

第 3 章は NAS 遺伝子のクローニングについて述べている。二次元電気泳動による検出では NAS タンパク質を特定することができなかつたため、鉄欠乏オオムギ根タンパク質を数種のカラム操作の後 SDS-PAGE 上で分離し NAS 活性を持つバンドを検出することができた。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機能未知の EST の配列を参考にプローブを作成し、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*) を初めてクローニングした。*HvNAS1* は鉄欠乏の根に特異的かつ強く誘導された。オオムギの他の NAS 遺伝子 7 種もクローニングした。

オオムギの NAS 遺伝子の配列をもとに *Arabidopsis* のゲノムの塩基配列から NAS をコードする遺伝子を 3 種類クローニングした。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。栄養生長期のアラビドプシスでは *AtNAS1* 遺伝子は地上部と地下部でともに発現しており、*AtNAS3* 遺伝子は地上部でのみ発現が確

認められた。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。

第4章では3種の *AtNAS* 遺伝子の発現に及ぼす環境因子について、タバコ BY-2 細胞にパーティクルガンで遺伝子導入して詳細に調べている。*AtNAS1* 遺伝子の ORF の始めから数えて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。*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 のみの配列では発現が認められた。この結果により、*AtNAS2* 遺伝子はインタクトのアラビドプシスでも発現する可能性があることが示唆された。*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、別種のエチレン応答エレメントに類似の TTTGAAAAT 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4回繰り返したプロモーターの場合、エチレンによる誘導はさらに促進された。また、この配列に方向性はなかった。

第5章では総合考察を行っている。

以上、本研究は永年懸案であった生物界で全く新規な酵素である、高等植物のニコチアミン合成酵素遺伝子のクローニングに成功したものであり、今後の高等植物における微量重金属代謝に関する研究や農業上の応用に寄与するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。