

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 植松君夫

ヤセウツボは、クロロフィルを全く持たず、栄養を寄主に全面的に依存する全寄生型の根寄生性植物である。その生態の特徴は、通常の植物と異なり、寄主の根から分泌される物質による発芽誘導、屈化性による幼根の伸長、寄主の維管束への侵入、栄養分の吸収及び代謝、寄主との相互作用などがあげられる。特に種子発芽は、通常の種子植物が一定の水分及び温度条件下で培養されることにより発芽するのに対し、ヤセウツボ種子は一定の水分及び温度条件下で前培養（コンディショニング）された後、寄主の根から分泌される物質を受容することにより発芽の誘導が起こる。このような点から、発芽刺激が入った時点が明らかである利点があり、現在まで不明な点の多い、植物の発芽機構を研究する上で有用な植物と考えられた。

本論文はこのような背景のもとに、発芽刺激受容可能となった種子より、プロテインキナーゼのスクリーニングを行い、その結果得られた A キナーゼについてその種子における機能の解析を行い、A キナーゼを構成する 2 つのサブユニット遺伝子の単離、それらタンパク質の機能解析結果、A キナーゼの活性化因子である cAMP の、種子における定量的な解析結果、および種子における A キナーゼの基質分子の解析結果について述べており、七章から成る。

第一章で背景を述べた後、第二章では発芽刺激から発芽に至るまでのシグナル伝達における、プロテインキナーゼの役割を解明するために、発芽刺激受容可能となった種子よりプロテインキナーゼのスクリーニングを行っている。その結果、数種類のプロテインキナーゼに相同性を示す断片の取得に成功し、その中に A キナーゼ触媒サブユニットに高い相同性を示すクローンを見出した。

第三章では A キナーゼの種子発芽における役割を明らかにするために更に詳細な解析を行った。その結果、ヤセウツボ種子 RNA と花芽 RNA より、2 種類の A キナーゼ触媒サブユニットに高い相同性を示す遺伝子を単離した。発現解析の結果、PKA1 は種子特異的に発現していることが明かとなり、PKA1 が種子においてなんらかの機能を果たしていることが示唆された。

第四章では A キナーゼの調節サブユニットのクローニングを行い、A キナーゼの調節サブユニットに高い相同性を示す遺伝子 REG の単離を述べている。REG の組み換え型タンパク質を作成し、これを用いて cAMP 結合活性を測定し、組み換え型 REG タンパク質は cAMP 結合活性を有していることが明かとなった。このことから REG がヤセウツボ A キナーゼの調節サブユニットであることが示唆され、ヤセウツボ種子において、cAMP を介した情報伝達系が存在し、A キナーゼがその一部としてなんらかの機能を果たしていることが強く示唆された。

第五章では *in vivo* での A キナーゼ活性調節の可能性を探る上で、A キナーゼの活性化因

子である cAMP の種子における定量的な解析を行った。その結果、コンディショニング開始後 24 時間から cAMP 量は上昇しはじめ、コンディショニング終了となる 72 時間まで上昇し続けることが明かとなった。このことから、ヤセウツボ種子において A キナーゼはコンディショニング期間中に活性化され機能を果たしていることが示唆された

第六章では得られた PKA1 遺伝子産物の活性を調べている。PKA1 の組み換え型タンパク質を作成し、これを用いて A キナーゼ活性を測定した。その結果、組み換え型 PKA1 タンパク質は A キナーゼ活性を有していることが明かとなった。このことから PKA1 がヤセウツボ A キナーゼの触媒サブユニットであることが強く示唆された。

第七章では A キナーゼの基質分子の探索を行った。他の生物における知見から、ピルビン酸キナーゼに着目し、ヤセウツボピルビン酸キナーゼがヤセウツボ A キナーゼによりリン酸化されるか検討した。ヤセウツボ種子よりピルビン酸キナーゼのスクリーニングを行い、ピルビン酸キナーゼに相同性を示す 2 種類の断片 PyK1、PyK2 の取得について述べている。これら組み換え型タンパク質を用いて、A キナーゼによるリン酸化を検討した。その結果、構造上予想された PyK1 のみがリン酸化されることが判明した。従って、ヤセウツボ種子において、A キナーゼがピルビン酸キナーゼをリン酸化し、その活性を調節することにより代謝調節を行っていることが示唆された。

第八章では、総合討論と今後の展望について述べている。

以上、本論文は寄生植物ヤセウツボより、現在まで植物より単離されていなかった A キナーゼを単離し、その種子における機能解析を行うことにより、有用な知見を供給したもので、学術上応用上貢献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。