

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 バシル クーラム

全陸地の約25%を占める石灰質アルカリ土壌では、土壌中の鉄が水酸化第二鉄として沈殿し不溶態であるために、植物はこれを吸収できない。イネ科植物はムギネ酸類と総称されるキレーターを根から分泌して、三価の鉄を可溶化し、「鉄-ムギネ酸類」錯体として固有のトランスポーターにより吸収することによって必須元素である鉄を獲得する。鉄欠乏をシグナルとして、ムギネ酸の合成と分泌は飛躍的に上昇する。ムギネ酸類は、メチオニンを出発として、S-アデノシルメチオニン、ニコチアナミン、ケト体、デオキシムギネ酸、ムギネ酸、その他のムギネ酸類の順に生合成される。近年の研究により、ムギネ酸類生合成経路の酵素遺伝子はひとつの酵素を除いてすべて単離された。本論文は、唯一残されていた、ケト体からデオキシムギネ酸を生成する反応を触媒する酵素の遺伝子を単離することを目的とし、さらにイネ科植物の鉄-ホメオスタシスを分子レベルで解析するために、cDNAマイクロアレイ法を用いてイネの鉄欠乏誘導性遺伝子群を網羅的に解析し、鉄欠乏誘導性の新規グルタチオントランスポーター遺伝子を単離した。さらにオオムギから細胞質型と葉緑体型の2つのグルタチオン還元酵素遺伝子を単離した。全体は4章から構成されている。

第1章では、序論として研究の背景、目的と意義について述べられている。

第2章では、ムギネ酸類生合成経路上の酵素遺伝子のうち、唯一単離されていなかったデオキシムギネ酸合成酵素遺伝子のイネ、オオムギ、コムギ、トウモロコシからの単離について述べられている。2つのアプローチにより単離を目指した。デオキシムギネ酸生合成の最終ステップは、ニコチアナミンの末端アミノ基がニコチアナミンアミノ基転移酵素により転移され、生成したケト体を、NADPHを電子供与体に用いて還元する反応である。この反応から、目的とする酵素はアルド・ケト還元酵素スーパーファミリーに属するものと仮定した。また、これまで単離した生合成経路の酵素遺伝子はすべて鉄欠乏によって強く発現が誘導されることから、この酵素遺伝子も鉄欠乏によって発現誘導されると推定した。まず、このファミリー内に存在するいくつかの保存されたアミノ酸配列のなかから2つの領域を選び、ディジェネレートプライマーを設計してPCRを行った。得られたPCR断片のうち、鉄欠乏で誘導されるものをノーザン解析により選抜し、そのPCR断片を用いて鉄欠乏オオムギ根cDNAライブラリーから候補遺伝子のスクリーニングを行った。得られたcDNAクローンを酵母に導入して、そのタンパク質産物がデオキシムギネ酸合成酵素活性を持つかどうかを検定したところ、酵素活性は検出できなかった。その後の研究により、このタンパク質産物はグルタチオン還元酵素活性を持つことが明らかになり、オオムギのグルタチオン還元酵素遺伝子の単離となった(第3章に記述)。そこで次に、イネのマイクロアレイ解析により得られた鉄欠

乏誘導性遺伝子群のなかから、アルド・ケト還元酵素スーパーファミリーに属すると推定される還元酵素遺伝子を選びだし、デオキシムギネ酸合成酵素活性を持つかどうかを調べた。その結果、イネのデオキシムギネ酸合成酵素遺伝子、*DMASI* を同定することに成功した。イネの配列をもとに、オオムギ、コムギ、トウモロコシからもそれぞれデオキシムギネ酸合成酵素遺伝子を単離した。いずれの遺伝子も、そのコードするタンパク質が酵素活性を持つことを *in vitro* アッセイ系で確認した。いずれの遺伝子も鉄欠乏の根で発現が誘導された。本研究により、イネ、オオムギ、コムギ、トウモロコシからデオキシムギネ酸合成酵素遺伝子が初めて単離され、ムギネ酸類合成経路上のすべての酵素の遺伝子が明らかになった。

前述のように、第3章ではオオムギからグルタチオン還元酵素遺伝子を単離し、解析した結果について述べている。葉緑体型 (HvGR1) と、細胞質型 (HVGR2) との2種類の遺伝子を単離した。

第4章では、鉄欠乏によって誘導されるグルタチオントランスポーター遺伝子のイネからの単離が述べられている。イネマイクロアレイ解析によって得られた鉄欠乏誘導性遺伝子群のなかに、オリゴペプチドトランスポーター遺伝子ファミリーに属する遺伝子が含まれていた。この遺伝子をイネから単離し、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた系により、そのタンパク質産物の基質輸送活性を電気生理学的に調べたところ、グルタチオンを輸送することが明らかになった。本研究により、鉄欠乏によって発現が誘導されるイネグルタチオントランスポーター遺伝子が始めて単離された。第3章の結果とあわせると、グルタチオン還元酵素遺伝子や、グルタチオントランスポーター遺伝子の発現が鉄欠乏によって上昇する事実は、鉄濃度を感知する鉄センサーから遺伝子発現制御までの鉄栄養シグナル伝達経路と、グルタチオンを介したレドックス制御機構の間にクロストークが存在する可能性を示唆している。本研究結果は、細胞内レドックス制御と細胞内鉄ホメオスタシスの維持との間の関係を示唆しており、細胞内の鉄の過不足を感知するセンサー、あるいはそのシグナルを伝達して遺伝子発現を制御する情報伝達のメカニズムの解明に迫ることを可能とするものであると考えられる。

以上のように、本論文は、これまでムギネ酸合成経路上で唯一未同定だったデオキシムギネ酸合成酵素の遺伝子の単離に成功し、また鉄欠乏によって誘導されるグルタチオン還元酵素遺伝子や、グルタチオントランスポーター遺伝子を単離することによって、イネ科植物の鉄ホメオスタシスの維持に関する新たな知見を提供し、新規性と独創性に富む内容であり、今後の研究の発展に大いに貢献することが期待される。よって、審査委員一同は、本論文を博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。