

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

Regulation of amino acid metabolism that is affected by photorespiration in plants:

Identification and functional analysis of the peroxisomal *glutamate:glyoxylate aminotransferase (GGAT)* gene

(植物の光呼吸によるアミノ酸代謝制御に関する研究: ペルオキシソーム局在グルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子の同定と機能解析)

氏名 五十嵐 大亮

### [序論]

アミノ酸はタンパク質, 核酸, 2 次代謝産物など種々の窒素化合物の生合成における初発物質となることから生物にとって必須な化合物であり, 食品 (調味料)・医薬品等, 様々な用途で利用されている. 本研究は植物による効率的なアミノ酸生産技術の開発を目的とし, アミノ酸代謝制御に関わる因子の同定を目指した. 種々のアミノ酸生合成におけるアミノ基供与体となるグルタミン酸やグルタミンは主に光呼吸系で生合成代謝されることから (図 1), 光呼吸系のアミノ酸生合成および蓄積制御機構を明らかにすることが効率的なアミノ酸生産技術につながると考えられた.

グルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ (GGAT) はペルオキシソームで働く光呼吸系酵素 (図 1) であり, アミノ酸代謝制御において重要な役割を担っていると予想された. そこで, GGAT に着目しその遺伝子同定と, 過剰発現株を用いたアミノ酸代謝制御における役割を検討した.

## 〔結果と考察〕

### GGAT 遺伝子の同定

GGAT 遺伝子を同定するにあたり以下の既知情報を基に候補を絞り込んだ。①アラニンアミノトランスフェラーゼ (AOAT)活性と GGAT 活性はタンパク質分画すると挙動を供にする。②多くのペルオキシソーム局在タンパク質にはペルオキシソーム移行シグナル (PTS1, PTS2) が存在する。シロイヌナズナのゲノムと EST のデータベースを探索し、2 種の GGAT 候補遺伝子を見出した。これらは AOAT とアノテートされており、C 末端に PTS1 様配列が存在した。GFP を用いた局在解析から GGAT1 は PTS1 様配列に依存してペルオキシソームに局在した (図 2)。レポーター遺伝子 (*GUS*) を用いた解析から *GGAT1*, *GGAT2* 共に葉組織で発現することが示された (図 3)。発現量の多い *GGAT1* 遺伝子の破壊株をタグ挿入系統からスクリーニングし、単離に成功した。この遺伝子破壊株 (*ggat1-1*) は以下の特徴を示した。①葉内の GGAT 活性が 1 割程度に低下する (図 4)。②通常の栽培条件では生育が抑制されるが、光呼吸抑制条件である高 CO<sub>2</sub> 条件では生育が回復する (図 5)。③GGAT 反応の前駆体である基質である Glu とその前駆体である Gln 含量の増加、生成物である Ser, Gly 含量の減少が認められ、その傾向は光強度に依存する (図 6)。これらの結果から *GGAT1* は光呼吸系の GGAT 反応を担う酵素をコードしていることが明らかとなった。

### GGAT1 過剰発現株の解析

GGAT1 の機能と発現強化の効果を明確にすることを目的として、*GGAT1* ゲノム領域を導入した形質転換体を独立 42 系統作出した。得られた 42 系統の形質転換体は全て過剰発現株であり、さらに Ser, Gly 含量が顕著に増加した (図 7)。次に *GGAT1* の発現量の異なる 9 系統を選抜し、地上部における酵素活性と Ser, Gly 含量を測定、比較した。その結果、これらのアミノ酸含量と GGAT 活性は高い相関を示した (図 8) ことから Ser, Gly 含量の増加は *GGAT1* 過剰発現の直接の結果であることが示された。また Ser 含量が直接の生成物である Gly 含量よりも高い相関性を示した (図 8) のは Gly→Ser 反応が細胞内で積極的に行なわれており、Ser が蓄積形態となった為と考えられた。これらのアミノ酸蓄積が光呼吸依存的であるかを検証する目的で高 CO<sub>2</sub> 条件下における葉内のアミノ酸含量の変化を調べた。その結果、通常の栽培条件と比較し高 CO<sub>2</sub> 条件では蓄積量が減少することが示された (図 9)。これらの結果から *GGAT1* が光呼吸に依存したアミノ酸合成代謝において主要な役割を果たすことが示された。

## 〔結論〕

光呼吸系の GGAT 反応を担う酵素遺伝子を同定し、その遺伝子破壊、過剰発現株は光呼吸に依存してアミノ酸蓄積量が変化することを示した。この結果からペルオキシソームにおける光呼吸依存的アミノ酸代謝制御機構が個体レベルでのアミノ酸蓄積に大きく寄与していることが示唆された。

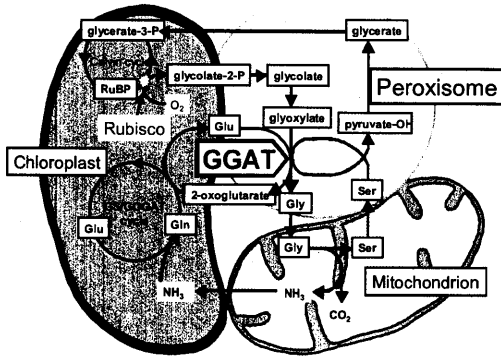


図1 光呼吸経路とGGAT

光呼吸はRubiscoのoxygenase活性で生じたGlycolate 2-phosphateを代謝する経路である。GGATはペルオキシソームにおけるアミノ基転移反応を担う酵素であり、光合成組織におけるアミノ酸代謝制御において主要な役割を果たすと考えられる。従ってGGATは有用な酵素であるが、コードする遺伝子は未同定であった。

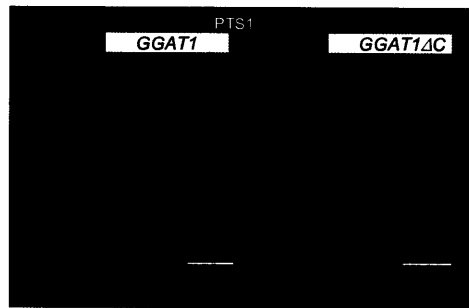


図2 GGAT1のペルオキシソーム局在

GGAT候補遺伝子とGFPを融合させ、タバコBY-2細胞内で発現させた。またC末端のペルオキシソーム移行シグナル(PTS1)を欠くGGAT1ΔCも同様に発現させた。GFP蛍光の解析からGGAT1はPTS1に依存してペルオキシソームに局在することが示された。

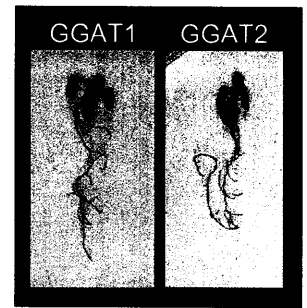


図3 GGAT1の葉組織での発現

GGAT1, GGAT2のプロモーターとレポーター遺伝子GUSを融合させ、植物体に導入した。GUSシグナルの解析からGGAT1, GGAT2は共に葉組織で強く発現することが示された。

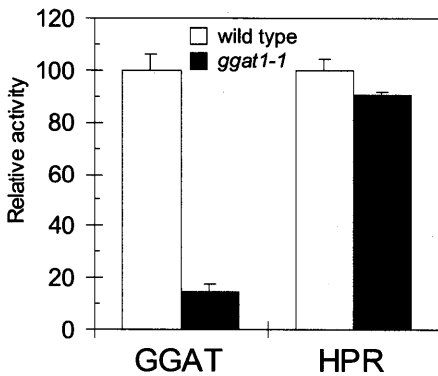
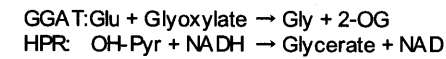


図4 GGAT1遺伝子破壊株における酵素活性の低下

GGAT1遺伝子破壊株を単離し、地上部の酵素活性を調べた結果、GGAT活性が顕著に減少していた。残りの活性はGGAT2に依存した活性であると考えられる。HPR(hydroxypyruvate reductase)をコントロールとした

CO<sub>2</sub> Normal (0.03%) High (0.3%)

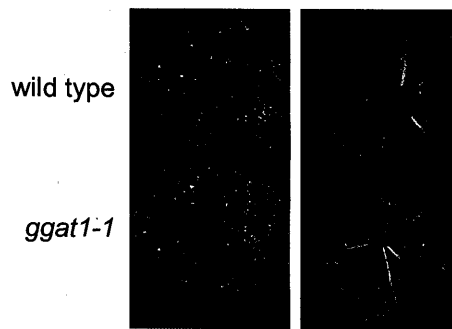


図5 GGAT1遺伝子破壊株の生育抑制と回復

GGAT1遺伝子破壊株は通常の栽培条件下で顕著な生育抑制を示した。光呼吸抑制条件である高CO<sub>2</sub>条件下で生育は回復した。このことからGGAT1遺伝子破壊株が光呼吸系欠損株であることが示された。

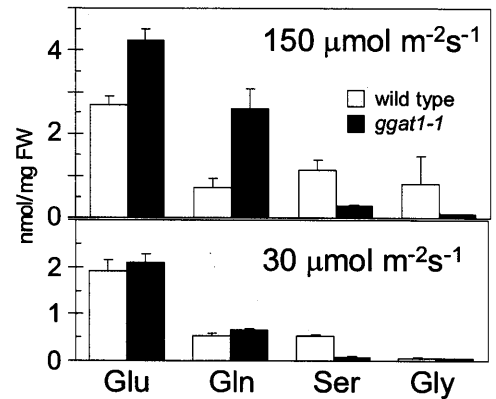


図6 GGAT1遺伝子破壊株のアミノ酸含量変化

GGAT1遺伝子破壊株ではGGAT反応の前駆体であるGlu, Gln含量が増加し、生成物であるGly, Ser含量が低下した。また、Glu, Glnの蓄積量は弱光下で低下した。この結果から、光呼吸に依存してアミノ酸含量が変化すること、GGAT1が光呼吸系で働くGGATをコードしていることが示された。

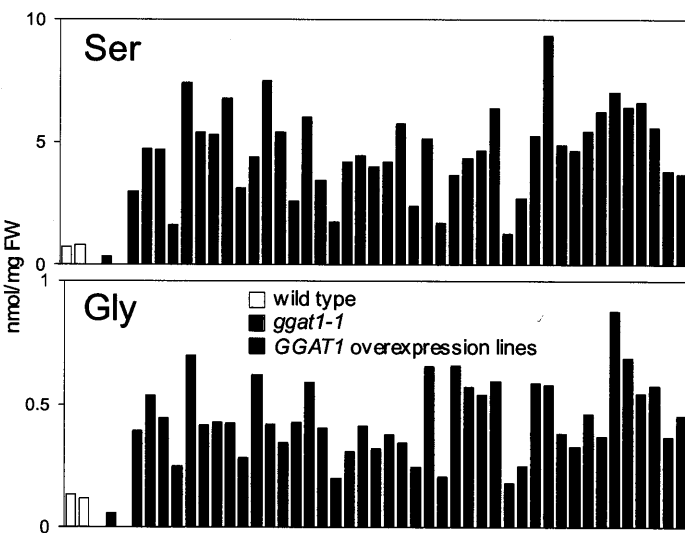


図7 GGAT1遺伝子過剰発現株におけるSer, Glyの蓄積

GGAT1遺伝子過剰発現株を作成し、アミノ酸含量を測定した。得られた42系統全ての形質転換体はGGAT1遺伝子が過剰発現しており、Ser, Gly含量が増加した。野生株と比較してSer含量は最大20倍、Gly含量は最大10倍に増加した。

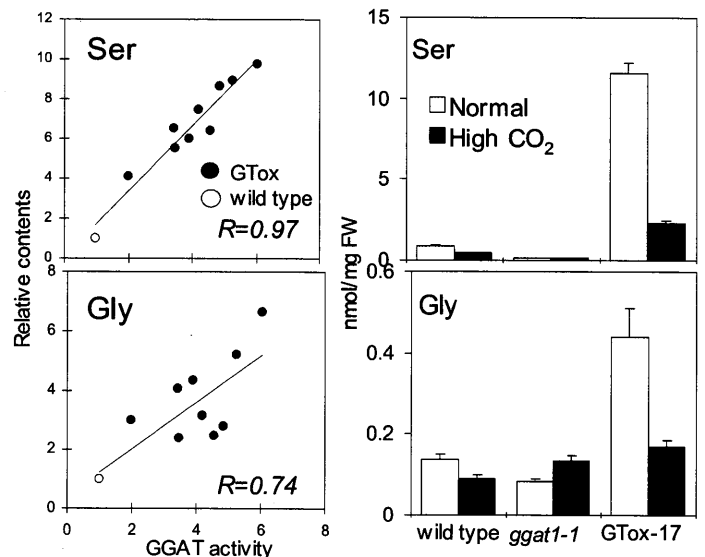


図8 GGAT1遺伝子過剰発現株における酵素活性とアミノ酸蓄積の相関

GGAT1遺伝子過剰発現株のうち発現量の異なる9系統(GTox)についてGGAT活性とSer, Gly含量を比較した結果、高い相関が認められた。この結果からアミノ酸含量の変化はGGAT1過剰発現の直接の結果であることが示された。

図9 GGAT1遺伝子過剰発現株のアミノ酸蓄積

光呼吸抑制条件である高CO<sub>2</sub>条件下でGGAT1遺伝子過剰発現株(GTox-17)はSer, Glyの蓄積量が減少することが示された。このことから、過剰発現株のアミノ酸含量の蓄積は光呼吸系の強化によるものと考えられた。