

氏名(本籍)	さかき はら よし きよ 榊原祥清(愛知県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第2284号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	Studies on the Structure and Physiological Functions of H ⁺ -translocating Inorganic Pyrophosphatase in Rice (イネ液胞膜H ⁺ -ピロホスファターゼの構造及び機能の解明)
主査	筑波大学教授 農学博士 日下部 功
副査	筑波大学教授 農学博士 白井健二
副査	筑波大学教授 理学博士 長谷川 宏司
副査	筑波大学教授 農学博士 生井兵治

論文の内容の要旨

植物は動物と比べ、その一生を同じ場所で過ごすことから、よりシビアな恒常性維持機構を持つものと考えられる。植物細胞の液胞膜には、H⁺-ATPaseの他に、ピロリン酸の加水分解エネルギーを利用して、プロトン細胞質から液胞内に能動輸送するプロトンポンプ(H⁺-ピロホスファターゼ、V-PPase)が存在している。本酵素は植物や光合成細菌にのみ存在しており、植物細胞に特異的な生理機能を有するものと考えられる。この酵素は細胞内pHの調節のみならず、生体膜の両側にプロトンの濃度勾配を作ることにより、他の無機イオンや有機酸、糖などの輸送に重要な働きをしているものと考えられている。したがって、V-PPase活性を増加させることによって、例えばナトリウムイオンの細胞質から液胞への集積が促進され、植物の耐塩性が向上する可能性がある。本研究では、このようなV-PPaseの農学的利用の可能性を検証するために、イネを用いてV-PPaseの構造および生理機能の解析を行った。

本研究において、まずイネよりV-PPaseの4種類のアイソフォームと考えられるcDNA(OVPI, OVP2, OVP3, OVP5)とOVPIに相当する1種類のゲノミッククローン(gOVPI)の単離とDNA塩基配列の解析を行った。塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、相互によく保存されており、85-94%の相同性を示した。また、他の高等植物由来のV-PPaseに対しても高い相同性を示し、この酵素の構造は種内・種間を問わず良く保存されていることを示していた。一方、gOVPIの解析より、イネのV-PPase遺伝子は8つのエクソンと7つのイントロンから成り、最も上流のイントロンが非常に長い(1,869bp)ものであることが明らかとなった。翻訳開始点より上流の配列を植物のcis-elementのデータベースを用いて検索した結果、光や低酸素ストレス、アブシジン酸などに応答するACGT-elementやMyb, Mycタンパク質の結合配列と相同な配列が存在していた。これらのelementを含む5'-上流域約1.1kbをGUS遺伝子と連結し、イネ培養細胞に導入した結果、形質転換体において高いGUS活性が見られた。その値は5'-上流域を含まないコントロールに比べて約45倍であったことから、この領域が細胞内においてプロモーターとして機能していることが確かめられた。

次にV-PPaseの生理機能を解明するために、各アイソフォームの遺伝子発現の解析および形質転換体の作出を行った。ノーザンハイブリダイゼーション解析より、OVP3においては他のアイソフォームとは異なり組織特異的な発現が見られた。すなわち、他のアイソフォームはイネ幼苗全体や花で発現していたのに対して、OVP3は根に

においてのみ発現が見られた。また、イネ培養細胞においては通常の細胞ではOVP3の発現は見られなかったが、NaClに対して適応させた細胞において発現の誘導が見られた。このことはアイソフォーム間で生理機能に違いがあることを示しており、OVP1,OVP2,OVP5は植物内で構成的に発現しているのに対し、OVP3は組織特異的に、もしくはストレスに応答して機能している可能性を示唆している。CaMV 35Sプロモーターの下流にOVP2遺伝子を連結させ、V-PPaseを大量発現させた細胞を作出し、細胞内pHを³¹P-NMRを用いて測定した。その結果、V-PPaseを高発現させた細胞において液胞内pHの酸性化が見られた。しかし、細胞質pHの変化は見られなかったことから、これらの細胞では細胞質と液胞の間のpH差は大きくなっていると考えられた。このことはV-PPaseの高発現が液胞膜を介したプロトン濃度勾配（プロトン駆動力）を強めることを示唆している。

以上の結果より、ストレス環境下におけるV-PPaseの発現誘導は細胞の恒常性維持に寄与していることが明らかとなり、V-PPase遺伝子を植物に導入することにより細胞質のpHに悪影響を与えずに液胞におけるプロトン駆動力を増加することが出来ることから、本酵素を利用した塩ストレス耐性等の強化が可能であると結論した。

審 査 の 結 果 の 要 旨

動物は生存に不適な環境を回避して好適な環境への移動が可能であるが、植物は生育に不適な条件下でも一生を同じ場所で過ごす。このようなことから、植物は幅広い環境に適応するために精密な恒常性維持機構を備えると考えられる。この機構にはV-PPaseの関与が考えられるが、その構造や機能などについては未知の部分が多い。著者はイネを研究材料として選定し、イネV-PPaseの構造と生理機能の解明を行った。その結果、本酵素の高発現が液胞膜を介したプロトンの濃度勾配を強め、NaClや種々のストレス環境下におけるV-PPaseの発現誘導が細胞の恒常性維持に寄与していることを突き止めた。これらの解明に向けて遺伝子操作の技術を駆使して解決した点において高く評価できる。

V-PPaseはその基質にピロリン酸を用いるため、細胞内の貴重なエネルギー通貨であるATPを消費することがない。また、ピロリン酸は細胞内におけるタンパク質や核酸等の生合成反応の副産物として生成してくるため、細胞内に大量に存在している。したがって、V-PPaseを植物をストレス耐性や有用物質の液胞への蓄積に用いることは、非常に有効な手段であると考えられる。本研究において、V-PPaseの高発現によって細胞質のpHを殆ど変化させずに、すなわち細胞にダメージを与えずに、液胞のプロトン濃度勾配を増加し得ることが明らかになったことは、今後のV-PPaseの応用に対して重要な知見を与えたと言える。また、V-PPaseは単一のサブユニットで機能することが、本研究によっても明らかとなり、塩ストレス耐性や貯蔵組織における有用物質の蓄積などへのV-PPaseの活用が期待できる。

世界の主要な穀物の大部分は単子葉植物であり、とりわけイネは我が国の農学上重要な作物であることから、それを実験材料に選定して研究した成果は農学分野との関連性が極めて高い。特に、V-PPaseの過剰発現が植物細胞に及ぼす影響を、イネを用いてin vivoで解析した点は評価に値する。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。