

学位論文題名

Organ-specific and hormone-dependent expression  
of the genes for serine carboxypeptidases during  
germination of rice seeds.

(イネ・種子発芽時におけるセリンカルボキシペプチダーゼ遺伝子族の  
組織特異的、ホルモン依存的発現)

学位論文内容の要旨

イネ、コムギ、トウモロコシなどのデンプン性穀物植物の種子はその栄養価の高さから、我々人類の主要食物として広く栽培が行われている。このデンプン性穀物種子の持つ高い栄養価は、種子内の内胚乳組織に含まれる多糖類やタンパク質などからなる豊富な貯蔵物質に由来しており、本来これらの栄養分は植物体が発芽、成長する際のエネルギー源や細胞構成物質として使われるものである。多糖類や高分子性のタンパク質として胚乳組織に貯えられてる貯蔵物質は、吸水後、植物体からの積極的な分解・利用作用を受けるが、急速な成長を行う実生に対してこれらの生成物が効果的に利用されるためには貯蔵物質の分解・利用が時間的、空間的に厳密に制御されて行われる必要がある。本研究では貯蔵タンパク質の分解・利用系に着目してこれらを担うタンパク質分解酵素についての研究を行った。単純タンパク質の分解は、ポリペプチド分子内部のペプチド結合を切断するエンドプロテアーゼと、末端のペプチド結合に作用するエクソペプチダーゼの共作用的な作用によって効果的に進行してゆくことが知られているが、この内タンパク質のカルボキシ末端のペプチド結合に作用して順次アミノ酸を遊離してゆくものはカルボキシペプチダーゼ(CBP)と呼ばれ、デンプン性穀物の発芽種子においては酵素学的性質の異なる5種類のCBPが存在することが知られている。これらの酵素群は基質特異性などにおいて類似した性質を持っており酵素学的解析だけでは各CBPクラスの発芽時期における特異的な役割を推定することは困難であった。そこでこれらのCBPクラスの発芽種子における発現特性を調べるため、イネ種子を材料に用いて、CBPをコードするcDNAクローンの単離を試みた。同定されたいくつかのmRNA種は最終的に3つのクラスに分類された。ひと

つは2量体型のCBPとして知られているI型CBPであり、もうひとつは単量体のCBPとして報告されていたIII型CBPをコードしていた。残りのものについては、その1次構造がIII型CBPに似たものであったので、新規なIII型様CBPとして扱うことにした。いずれのCBPも推定されるアミノ酸配列内には、酵母CBPで同定されたいくつかの活性部位に相当する配列が同様に見いだされ、イネ植物体内で機能しているCBPであることが推定された。これら同定されたCBPクラスのmRNAの種子発芽時における動向を調べるためノーザン法や種子切片を用いた *in situ* hybridization法による解析を行った。いずれのクラスのmRNAも時間経過においては種子成熟、発芽過程において同様の発現状況を示したが、発芽後期における種子内各組織でのmRNAの蓄積の度合いを詳細に調べたところ、各CBPクラス間に組織特異的なmRNAの蓄積状況が見受けられた。III型様CBPは発芽胚全体でそのmRNAが確認され胚盤において若干の高いレベルが見られた。I型CBPのmRNAは同様に発芽胚に存在していたが、その発現は胚盤上皮細胞と茎葉組織に限定されていた。III型CBPについては他の2者とは異なり、胚乳組織、特に糊粉層細胞における発現が顕著であった。これらのCBPのmRNAの蓄積が主に確認された胚盤上皮細胞と糊粉層細胞は、種子発芽時における貯蔵物質の分解・利用に関与する多くの細胞外分泌性加水分解酵素の供給源であることが知られているため、同定された3種のCBPクラスはともに種子発芽における貯蔵タンパク質利用系に深く関与していることが推定されたが、各クラスの類似した酵素活性を考慮すると、空間的に異なる発現が各々のクラスに特異的な機能を与えていると推察される。そこで次に、これらのCBPの遺伝子の構造解析と発現制御に関する研究を行った。遺伝子解析を行うに当たっては酵素タンパク質としての特性がはっきりとしており、なおかつ発現様式に顕著に違いがあるものとしてI型とIII型CBPに焦点を絞って研究を進めた。サザン法においてイネ・ゲノム内において両CBP遺伝子ともにユニークに存在していることが推定されたのでこれらの遺伝子領域を含むDNA断片をクローニングした。I型CBP遺伝子はそのタンパク質読みとり領域が13個のイントロンで分断されており、I型CBPの持つ特徴的なドメイン構造(A鎖、リンカーペプチド、B鎖)は各々、異なるエクソンに分かれて存在していた。この遺伝子に由来するmRNAは、S1マッピング法を用いた分析において胚盤と茎葉に特異的なバンドを与えたので確かに発芽種子

で発現してくる I 型 C B P をコードする遺伝子であることが確認された。III 型 C B P 遺伝子は 9 個のエクソンよりなっており、I 型 C B P 遺伝子と同様の実験により発芽時期において糊粉層で発現量を上昇させてくる遺伝子であることが確認された。この両者の遺伝子構造の比較において、C B P の活性部位をコードする領域以外に顕著な共通性は見いだされず、イントロンの挿入部位においても一致性を見いだすことはできなかった。この両者の C B P は、酵素の作用形式においても 2 量体 (I 型 C B P) と単量体 (III 型 C B P) という異なる形態で作用することが知られているので異なる遺伝子進化の過程を経て来たものと推定された。C B P はセリン残基を含むペプタペプチド (G E S Y A) を活性部位の中心に配していることが知られており、同様の配列を活性部位に持ちながら異なる酵素活性を示すものがエステラーゼやリパーゼに知られている。これらを総称して  $\alpha / \beta$  ハイドrolラーゼと呼んでいるが、I 型と III 型 C B P はこの加水分解酵素群に属しながら偶然同じ触媒活性を持っているのだと解釈された。I 型と III 型 C B P の示した胚盤上皮細胞と糊粉層細胞に別れた異なった発現は各々の遺伝子の持つ発現特性が反映されているのだと思われたので、遺伝子の発現特性、特にその転写活性に影響を与えられるプロモーター領域についての比較を行った。III 型 C B P 遺伝子のプロモーター領域において植物ホルモンであるジベレリン酸 (G A) に応答してエンハンサー様の活性を示すモチーフがいくつか見いだされ III 型 C B P の糊粉層細胞における発現は G A によって制御されていることが示唆された。実際、III 型 C B P 遺伝子のプロモーター領域を G U S レポーター遺伝子に連結して G A 応答性のオート麦糊粉層プロトプラストに導入すると G A に応答した一過性の G U S 活性の上昇が検出されたので III 型 C B P は G A による遺伝子発現誘導を受けていると確認された。このデンプン性穀物種子・糊粉層細胞における G A による遺伝子発現誘導は貯蔵物質の分解・利用に関与するいくつかの加水分解酵素の遺伝子にも見られる現象なので、III 型 C B P 遺伝子の示した糊粉層特異的発現は発芽種子において機能している複雑なメカニズムの一端を担っていると推定された。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 石 川 鑛  
副 査 教 授 谷 藤 茂 行  
主 査 教 授 落 合 廣  
副 査 教 授 吉 田 静 夫

### 学位論文題名

Organ-specific and hormone-dependent expression  
of the genes for serine carboxypeptidases during  
germination of rice seeds.

(イネ・種子発芽時におけるセリンカルボキシペプチダーゼ遺伝子族の  
組織特異的、ホルモン依存的発現)

イネやコムギなどの穀物種子の発芽時における貯蔵タンパク質の分解は、ポリペプチド内部のペプチド結合を切断するエンドペプチダーゼと、末端のペプチド結合に作用するエクソペプチダーゼの共役的な作用により分解されるものと考えられている。カルボキシペプチダーゼは、タンパク質のカルボキシ末端から順次アミノ酸を遊離して行く酵素で、これまでに発芽穀物種子には酵素学的性質から5種類存在することが知られている。

本論文では、イネ種子からカルボキシペプチダーゼのcDNAをクローニングし、最終的に3種類に分類した。即ち、2量体型として知られているI型、単量体として報告されているIII型、1次構造がIII型と似ているIII型-likeである。いずれのカルボキシペプチダーゼも推定されるアミノ酸配列中には、酵母のカルボキシペプチダーゼで報告されている活性部位に相当する配列が見られた。種子の成熟期および発芽期における各種カルボキシペプチダーゼmRNAの蓄積はほぼ同様の変動を示した。発芽後

期の種子内各組織における mRNA の蓄積をノーザン法と *in situ hybridization* 法で調べると、組織特異性がみられ、Ⅰ型は胚盤上皮組織と茎葉組織に、Ⅲ型は糊粉層で顕著、Ⅲ型-likeは胚盤と葉・根で見られた。その上、Ⅲ型は植物ホルモンのジベレリンによりその発現が誘導され、同じく植物ホルモンのアブシジン酸により打ち消されることが明らかになった。

次いで、Ⅰ型とⅢ型のカルボキシペプチダーゼのゲノミッククローンを分離した。Ⅰ型は14個のエクソンから成り、その特徴的なドメイン構造(A鎖-リンカー-B鎖)は各々数の違ったエクソンから成っていた。この遺伝子に由来する mRNA は、S1マッピング法を用いた分析では胚盤と茎葉に特徴的なバンドを与えたので確かに発芽種子で発現している遺伝子であることが確認された。Ⅲ型は9個のエクソンより成り、Ⅰ型同様の分析により発芽種子の糊粉層で発現している遺伝子であることが確認された。また、Ⅰ型およびⅢ型共にイネ・ゲノムにおいてユニークに存在していることが推定された。更に、Ⅲ型カルボキシペプチダーゼ遺伝子のプロモーター領域にはジベレリンに反応してエンハンサー様の活性を示すモチーフがいくつか見いだされて居り、このプロモーター領域にGUSレポーター遺伝子を接続して、エンバク種子糊粉層のプロトプラストに導入してジベレリンに対する反応性を調べた。その結果、ジベレリンに反応して一過性のGUS活性の上昇がみられ、プロモーターを部分的に削除するとGUS活性の上昇が見られなくなることから、ジベレリンによる遺伝子発現誘導を受けていることが確認された。

以上のように、穀物種子の発芽にさいし、各種カルボキシペプチダーゼ遺伝子が組織特異的に発現し、そのうちの一種は植物ホルモンにより発現誘導されることを明らかにした。

本研究は、植物における遺伝子発現の制御のメカニズムを解明して行く上で極めて重要な知見であり、最終試験の結果も十分に満足すべきものであった。審査員は全員が、申請者が博士(理学)の学位を受ける資格があるものと認めた。