

## 学位論文題名

Microbial metabolism of a specific  
and immediate precursor of plant hormone ethylene

(植物ホルモンエチレンの特異的前駆体の微生物による代謝)

## 学位論文内容の要旨

エチレンは果実の成熟を促進するホルモンとして植物によって合成されることが知られている。その作用は果実の成熟のみでなく、植物の生長発達の諸過程に影響していることも知られている。エチレンは植物体内では極めて特異的前駆体を経て合成される。その前駆体は1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸の構造を持ち、ACCと呼ばれる。エチレンはACCの酸化分解によってシクロプロパン環から遊離し、酵素ACCオキシダーゼが植物から分離されている。ACCを窒素源として利用する微生物が土壌から分離され、ACCを分解する酵素ACCデアミナーゼが数種類の細菌から精製され、遺伝子の分析によって6種の配列が決定されている。ACCデアミナーゼは細菌ばかりでなく、酵母 *Hansenula saturnus* および糸状菌 *Penicillium citrinum* にも発見され、酵母の酵素は精製されて、配列も決定されている。

本論分は、主として糸状菌のACCデアミナーゼに関するものであり、*P. citrinum* から酵素の分離とその性質の特定、コードするcDNAの分離と配列の決定、*P. citrinum* によるACCの合成と分解、およびACC合成酵素 ACCシンターゼとACCデアミナーゼを導入した大腸菌が植物の生長に与える影響について、実験結果を示し考察したものである。

1) *P. citrinum*のACCデアミナーゼ

ACCデアミナーゼはACCや2-アミノイソ酪酸によって誘導される。*P. citrinum*の培養で酵素が誘導される条件を調べ、最適な条件で培養した菌体から酵素を精製した。精製の過程では、特に、pH10のアルカリ性の溶液で酵素が安定であること、硫酸銅が酵素を安定に保つ作用を持つことを発見して、有効に利用した。精製された酵素は、電気泳動とゲル濾過の結果から水溶液では2量体であると考えられ、モノマーの分子量は細菌や酵母の酵素に比べて幾分大きいことが推定された。精製酵素はpH6.0から11.0まで安定であり、短期間の貯蔵では硫酸銅を加える必要はなかった。ACCに対するKmは4.8 mMで、細菌や酵母の酵素に比較して高く、d1-コロナミン酸やD-セリンに対する活性は他の二者の場合より低かった。しかし、補酵素、光吸収スペクトル、活性やスペクトルのpH依存性は同様であった。

## 2) ACCデアミナーゼのアミノ酸配列

硫酸銅を使用せずに迅速な操作によって酵素を精製し、不純物を含む酵素試料を水素化ホウ素ナトリウムで還元して補酵素ピリドキサルリン酸を酵素タンパク質に共有

結合で固定し、更に、SH基をピリジルエチル化し、HPLCによって修飾酵素を精製した。精製した修飾酵素はリジルエンドペプチダーゼで分解して、HPLCにより325 nmに吸収を持つペプチドを、補酵素結合部位を含むものとして分離した。このペプチドは細菌酵素の補酵素結合部位に類似した配列を示した。同時に分離されたペプチドの分析によって全配列の約70%が決定された。修飾酵素のN末端分析は特定のアミノ酸を指定せず、酵素N末端が修飾されていることを示した。得られた配列を用いてPCRプライマーを設計し、合成されたDNAを用いてプローブを調製した。2-アミノイソ酪酸の誘導によってACCデアミナーゼを盛んに合成している*P. citrinum*からRNAを抽出して、cDNAライブラリーを調製し、プローブを用いてACCデアミナーゼcDNAを分離した。このcDNAの塩基配列から39.2 kDaの分子量を持つ360残基のアミノ酸配列が明らかになった。この配列は細菌の酵素と52%、酵母の酵素と45%のアミノ酸を一致させて並べることができた。起源の異なる3酵素の配列の比較から、8から10残基連続して類似性の高い配列を6箇所発見し、活性や立体構造との関係を考察した。

### 3) *P. citrinum*によるACCの合成と分解

蜜柑に生育して腐敗させる*P. digitatum*はエチレンをよく発生することが知られている。この場合は2-オキソグルタル酸を前駆体とすることが証明されており、予備的実験で細胞内にACCをほとんど蓄積しないことが認められた。*P. citrinum*の場合はエチレンの発生は極めて低いにもかかわらず、細胞内にACCを蓄積した。ACCの蓄積は培地にL-メチオニンを加えると増加し、他方、ACCを加えてもエチレンの発生は影響されなかった。しかし培養の後期で細胞内ACCは低下するので、ACCデアミナーゼの作用が予想された。この酵素はACCまたは2-アミノイソ酪酸で誘導されるが、ACCはより低濃度で有効であり、1 $\mu$ M ACCを含む培養液でもACCデアミナーゼmRNAが検出された。この濃度は*P. citrinum*が生産するACC量に相当する濃度より低い。0.05% L-メチオニンを含む培地で*P. citrinum*を培養し、生育が最大に近づいたときACCデアミナーゼmRNAが検出された。低い酵素活性も検出され、細胞内ACC蓄積量が最大に達する頃、ACCデアミナーゼが誘導されACCが分解されることを示した。

### 4) 植物の根の生長に対する微生物酵素の影響

カナダで植物の根の生長を促進する細菌がACCデアミナーゼを持つこと、分離したACCデアミナーゼ遺伝子を導入した大腸菌が同じ作用を獲得することが示されている。この実験系を用いて、*Pseudomonas*属細菌のACCデアミナーゼおよび*P. citrinum*のACCシンターゼをそれぞれ発現する大腸菌を調製し、その懸濁液にカノーラまたはナタネの種子を浸して1.5時間室温に静置してから取り出し、発芽装置を使用して、水または水溶液を吸い上げている紙に沿って生育させた。この時ベクターのみを導入した大腸菌による場合を対照とした。大腸菌の懸濁および発芽装置に脱塩水または10 mM 硫酸マグネシウムを用いた実験で、ACCデアミナーゼを含む大腸菌では根の生長が促進され、ACCシンターゼの場合は生長が阻害された。根に付着して生育する大腸菌の酵素が、根のACC濃度を変化させ、結果としてエチレンの濃度を変化していると考えられる。エチレンは根の生長を抑えることが知られている。そのことは発芽装置に0.1 $\mu$ M ACCを使用すると根の生長が阻害されることから示された。

以上のように本論文は、植物によるエチレン生合成の特異的中間体ACCが、土壌微生物

物では分解されて窒素源として利用されエチレンには変換されないことを、酵素のアミノ酸配列の決定と mRNA の分析によって示し、ACC の分解酵素および合成酵素を持つ微生物と植物の根の生長との関係について示唆的結果を示したものである。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 本 間 守  
副 査 教 授 千 葉 誠 哉  
副 査 教 授 松 井 博 和

学 位 論 文 題 名

## Microbial metabolism of a specific and immediate precursor of plant hormone ethylene

(植物ホルモンエチレンの特異的前駆体の微生物による代謝)

本論文は序論と結論を含めて7章で構成され、図46、表7、引用文献90を含む103頁の英文論文である。別に参考論文2編が添えられている。

エチレンは果実の成熟を促進するホルモンとして植物によって合成されることが知られている。その作用は果実の成熟のみでなく、植物の生長発達の諸過程に影響していることも知られている。エチレンは植物体内では極めて特異的前駆体を経て合成される。その前駆体は1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸の構造を持ち、ACCと呼ばれる。エチレンはACCの酸化分解によってシクロプロパン環から遊離し、酵素ACCオキシダーゼが植物から分離されている。ACCは土壌微生物によって窒素源として利用され、ACCを分解する酵素ACCデアミナーゼが数種類の細菌や酵母から精製され、遺伝子の分析によって既に7種の配列が決定されている。

本論分では、主として糸状菌によるACCの分解と合成について、更に、大腸菌に導入した酵素の植物生長に与える影響について記述している。

### 1) 糸状菌 *Penicillium citrinum* のACCデアミナーゼ

ACCデアミナーゼはACCや2-アミノイソ酪酸によって誘導される。*P. citrinum*の培養で酵素が誘導される条件を調べ、最適な条件で培養した菌体から酵素を精製した。精製の過程では、特に、pH10のアルカリ性の溶液で酵素が安定であること、硫酸銅が酵素を安定に保つ作用を持つことを発見して、有効に利用した。精製された酵素は2量体で、モノマーの分子量は細菌や酵母の酵素に比べて幾分大きいことが推定された。精製酵素はpH6.0から11.0まで安定であり、短期間の貯蔵では硫酸銅を加える必要はなかった。ACCに対する $K_m$ は4.8 mMで、細菌や酵母の酵素に比較して高く、dl-コロナミン酸やD-セリンに対する活性は他の二者の場合より

低かった。

## 2) ACCデアミナーゼのアミノ酸配列

硫酸銅を使用せずに迅速な操作によって部分精製した酵素を水素化ホウ素ナトリウムで還元して補酵素ピリドキサルリン酸を酵素タンパク質に共有結合で固定し、更に、SH基をピリジルエチル化し、HPLCによって補酵素結合酵素を精製した。精製した酵素はリジルエンドペプチダーゼで分解して、HPLCによりペプチドを分離し、それらペプチドの分析によって全配列の約70%が決定された。酵素のN末端分析は特定のアミノ酸を指定せず修飾されていることを示した。得られた配列を用いてプローブを調製し、cDNAライブラリーからACCデアミナーゼcDNAを分離した。このcDNAの塩基配列から39.2 kDaの分子量を持つ360残基のアミノ酸配列が明らかになった。この配列は細菌の酵素と52%、酵母の酵素と45%のアミノ酸が一致した。

## 3) *P. citrinum*によるACCの合成と分解

蜜柑に生育して腐敗させる*P. digitatum*はエチレンをよく発生し、2-オキソグルタル酸を前駆体とすることが証明されている。*P. citrinum*の場合はエチレンの発生は極めて低いにもかかわらず、細胞内にACCを蓄積した。ACCの蓄積は培地にL-メチオニンを加えると増加し、生育に幾分遅れて最大となり、培養の後期で細胞内ACCは低下した。L-メチオニンを含む培地で生育した*P. citrinum*のmRNAを分析して、蓄積したACCによってACCデアミナーゼが誘導されることを示した。

## 4) 植物の根の生長に対する微生物酵素の影響

植物の根の生長を促進する細菌がACCデアミナーゼを持つこと、分離したACCデアミナーゼ遺伝子を導入した大腸菌が同じ作用を獲得することが、既に報告されている。この実験系を用いて、*Pseudomonas*属細菌のACCデアミナーゼおよび*P. citrinum*のACC合成酵素をそれぞれ発現する大腸菌を調製し、その懸濁液にカノーラまたはナタネの種子を浸して1.5時間室温に静置してから取り出し、発芽装置を使用して生育させた。ACCデアミナーゼを含む大腸菌では根の生長が促進され、ACC合成酵素の場合は生長が阻害された。根に付着して生育する大腸菌の酵素が、根のACC濃度を変化させ、結果としてエチレンの濃度を変化していると考えられる。エチレンは根の生長を抑えることが知られている。そのことは発芽装置に0.1  $\mu$ M ACCを使用すると根の生長が阻害されることから示された。

以上の成果は、植物によるエチレン生合成の中間体ACCの微生物による代謝を明らかにし、微生物の酵素と植物の根の生長との関係について示唆的結果を示したもので学術上高く評価される。よって審査員一同は 賈延軍が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。