

学 位 論 文 題 名

Study of structure and expression of phosphate transporter gene in plant

(植物リン酸トランスポーター遺伝子の構造と発現に関する研究)

学位論文内容の要旨

大部分の土壌において、土壌溶液中のリン酸濃度は非常に低い(一般的には $2\ \mu\text{M}$ 以下)ため、リン酸は根圏で最も欠乏しやすい栄養素である。そのため、植物はリン酸欠乏状態に適応するために様々な戦略を発達させている。植物によるリン酸の土壌からの吸収や体内での移動においては、細胞膜に存在するリン酸トランスポーターが重要な因子の一つである。リン酸トランスポーターに関しては、生理学的な研究が多くなされているものの、分子レベルでの性質や遺伝子の発現制御機構については不明のままであることから、本研究では、リン酸トランスポーター遺伝子の構造を明らかにし、リン酸に対する遺伝子発現の応答性を解析し、遺伝子の発現制御機構について考察した。

1. *Catharanthus roseus* からのリン酸トランスポーター遺伝子のクローニングと解析

Catharanthus roseus のリン酸トランスポーターをコードしている cDNA を獲得し PIT1 と名付けた。PIT1 は 542 個のアミノ酸から成るオープンリーディングフレームを持ち、12 回の膜貫通領域を持つと推定される疎水性の強いタンパクをコードしていた。この様な構造は真核生物のプロトン／リン酸トランスポーターで保存されている。PIT1 の塩基配列から推定したアミノ酸配列は、酵母や糸状菌で既に明らかとなっている細胞膜の高親和型プロトン／リン酸トランスポーターと約 30% の相同性を示した。一方、植物の葉緑体に存在するリン酸トランスロケーターの既知のアミノ酸配列とは、13~15% の相同性であった。

Saccharomyces cerevisiae の高親和型リン酸トランスポーターをコードしている PHO84 遺伝子が破壊された DpU 株は、低リン酸の培地 (LP 培地、 $55\ \mu\text{M}$ リン酸) では生育できない。この DpU 株で PIT1 を発現させたところ、低リン酸の培地で生育可能となった。以上の結果から、PIT1 は *C. roseus* のプロトン／リン酸トランスポーターをコードしていると推定された。

ノーザンハイブリダイゼーションの結果から、PIT1 遺伝子は *C. roseus* の根、茎、および幼植物体全体で発現していることが明らかとなった。このことから、PIT1 タンパクが土壌からのリン酸吸収と植物体内でのリン酸転流の両方において機能していることが示された。これらの結果は、植物のリン酸トランスポーター遺伝子を世界で初めて獲得し、解析したものであ

る。

2. *Nicotiana tabacum* のリン酸トランスポーター遺伝子のクローニング

PIT1 を初めとし、既に獲得されている植物のリン酸トランスポーター遺伝子の間で保存されている塩基配列を利用して *Nicotiana tabacum* から 4 種類の cDNA (NtPT1、NtPT2、NtPT3、および NtPT4) を獲得した。NtPT1、2、3、4 の塩基配列から推定したアミノ酸配列は、既に明らかになっている植物のリン酸トランスポーターの配列と高い相同性を示した。また、NtPT1、2、3、4 は他の真核生物のプロトン／リン酸トランスポーターと同様に、12 回の膜貫通領域を持つと推定される疎水性の強いタンパクをコードしていた。さらに、これら 4 つの遺伝子は、植物や酵母や糸状菌のプロトン／リン酸トランスポーターで保存されているアミノ酸配列を含んでいた。これらの結果は、NtPT1、NtPT2、NtPT3、および NtPT4 が *Nicotiana tabacum* のプロトン／リン酸トランスポーターをコードしている遺伝子であることを示した。

3. *Nicotiana tabacum* のリン酸トランスポーター遺伝子の発現解析

NtPT1、NtPT2、NtPT3、および NtPT4 の発現パターンをノーザンハイブリダイゼーションにより解析した。その結果、NtPT1 と 2 の転写産物は植物体全体で検出され、またリン酸欠乏状態で植物体のいずれの器官においても遺伝子の転写が強く促進された。一方、NtPT3、4 の遺伝子の転写はリン酸欠乏状態においてのみ老化葉と根で検出され、他の器官では検出されなかった。これらの結果は、NtPT1、2 と NtPT3、4 は生理的な機能が異なっていることを示した。さらに、リン酸飢餓状態の植物では、リン酸の吸収に加え、リン酸の転流と再転流の過程もリン酸トランスポーター遺伝子の転写によって制御されていることを示した。

4. *Nicotiana tabacum* のリン酸トランスポーター遺伝子の発現におよぼすリン酸の影響

リン酸が十分にある状態から欠乏した状態に植物が移された場合、植物体内のリン酸濃度は全ての器官においてすみやかに同じような割合で減少したが、NtPT1、NtPT2、NtPT3、および NtPT4 の遺伝子の転写はいずれも、体内のリン酸濃度が低下し始めてから数日後に植物体全体で促進された。このことは、植物がリン酸飢餓状態になっていく過程では、リン酸トランスポーター遺伝子の発現は、体外のリン酸濃度よりも体内のリン酸濃度に対し植物体全体で反応していることを示している。一方、リン酸飢餓状態の植物にリン酸を再び与えた場合は、4 つの遺伝子の転写はいずれも体内のリン酸濃度が上昇する前に植物体全体で抑制された。この場合、リン酸トランスポーター遺伝子の転写は外部のリン酸の状態に反応していると考えられる。以上の結果から、リン酸トランスポーター遺伝子は、体内のリン酸状態に反応する要素と体外のリン酸状態に反応する要素の二つによって転写レベルで制御を受けていると考えられる。従って、リン酸トランスポーター遺伝子は、体内のセンサーと体外のセンサーの両方が活性化されている場合、すなわち外部からのリン酸の供給が不十分でかつ、体内のリン酸濃度も低下している状態にのみ発現するものと推定された。

以上の結果より、リン酸トランスポーター遺伝子は植物体全体で発現し、リン酸の吸収や転流において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、その遺伝子の発現制御は体内と体外、両方のリン酸状態によって制御されていることが明らかとなった。現時点では、その詳細な機構については明らかではないが、今後、リン酸欠乏に対する植物の適応機構を解明していくうえで、興味深い課題であると考えられた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	小林	喜六
副査	教授	富田	房男
副査	教授	松井	博和
副査	助教授	大崎	満

学位論文題名

Study of structure and expression of phosphate transporter gene in plant

(植物リン酸トランスポーター遺伝子の構造と発現に関する研究)

本論文は、図 24、表 3、引用文献 89 を含む総頁数 81 の英文論文であり、別に参考文献 2 編が添えられている。

植物によるリン酸の土壌からの吸収や体内での移動において重要な因子の一つである、細胞膜に存在するリン酸トランスポーターに関しては、生理学的な研究が多くなされているものの、分子レベルでの性質や遺伝子の発現制御機構については不明のままである。本研究では、リン酸トランスポーター遺伝子の構造を明らかにし、リン酸に対する同遺伝子の発現能を解析し、遺伝子の発現制御機構について考察したもので、得られた結果の概要は以下の通りである。

1. *Catharanthus roseus* からのリン酸トランスポーター遺伝子のクローニングと解析
Catharanthus roseus からクローニングされた cDNA (PIT1) は 542 個のアミノ酸から成るオープンリーディングフレームを持ち、推定されるアミノ酸配列や高次構造は、既知の真核生物細胞膜の高親和型プロトン／リン酸トランスポーターと類似性が認められた。また、高親和型リン酸トランスポーター遺伝子 PH084 を破壊し、低リン酸の培地で生育ができない *Saccharomyces cerevisiae* の変異株 DpU 株を作出し、同株に PIT1 を導入し発現させたところ、低リン酸の培地で生育が可能となった。以上の結果から、PIT1 は *C. roseus* のプロトン／リン酸トランスポーターをコードしていると推定された。

PIT1 のノーザンハイブリダイゼーションの結果から、PIT1 タンパクは土壌からのリン酸吸収と体内でのリン酸転流の両方で機能していることが示された。

2. *Nicotiana tabacum* のリン酸トランスポーター遺伝子のクローニング

既知の植物リン酸トランスポーター遺伝子の塩基配列を利用して *Nicotiana tabacum* から 4 種類の cDNA (NtPT1、NtPT2、NtPT3、および NtPT4) を獲得した。NtPT1、2、3、4 の推定されるアミノ酸配列と高次構造を既知の植物プロトン／リン酸トランスポーターと比較した結果は、NtPT1、2、3、4 が *Nicotiana tabacum* のプロトン／リン酸トランスポーターをコードしている遺伝子であることを示した。

3. *Nicotiana tabacum* のリン酸トランスポーター遺伝子の発現解析

NtPT1、2、3、4 のノーザンハイブリダイゼーションの結果、NtPT1 と 2 の転写産物は植物体全体で検出され、またリン酸欠乏状態では植物体全体で転写が強く促進された。一方、NtPT3、4 の遺伝子の転写はリン酸欠乏状態においてのみ老化葉と根で検出され、他の器官では検出されなかった。これらの結果は、NtPT1、2 と NtPT3、4 は生理的な機能が異なっていること、そしてリン酸飢餓状態の植物では、リン酸の吸収、そして体内での転流や再転流もリン酸トランスポーター遺伝子の転写によって制御されていることを示した。

4. *Nicotiana tabacum* のリン酸トランスポーター遺伝子の発現におよぼすリン酸の影響

リン酸が十分に供給された状態から欠乏した状態に植物を移した場合、体内のリン酸濃度は全ての器官ですみやかに減少し始めたが、NtPT1、2、3、4 の遺伝子の転写はそれより遅れて植物体全体で促進された。このことは、植物がリン酸飢餓状態になる過程では、リン酸トランスポーター遺伝子の転写が体内のリン酸濃度の低下に対し植物体全体で反応することを示している。一方、リン酸飢餓状態の植物にリン酸を与えた場合は、4 つの遺伝子の転写はいずれも体内のリン酸濃度が上昇する前に植物体全体で抑制された。この場合、リン酸トランスポーター遺伝子の転写は外部のリン酸の状態に反応していると考えられる。以上の結果から、リン酸トランスポーター遺伝子は、体内と体外の各々のリン酸状態に反応する二つの要素によって転写レベルで制御を受けていると考えられた。つまり、リン酸トランスポーター遺伝子は、体内のセンサーと体外のセンサーの両方が活性化されている場合にのみ発現するものと推定される。

以上のように、本研究は、植物のリン酸トランスポーター遺伝子の構造と、様々なリン酸栄養状態に対する同遺伝子の発現の機構を明らかにした。これらの知見は学術的に高く評価されると同時に、植物の低リン耐性機構の解明および獲得に貢献するものである。よって審査員一同は、甲斐元士が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。