

学 位 論 文 題 名

Regulation of Gene Expression in Response to Changes in Methionine Accumulation in *Arabidopsis thaliana*

(シロイヌナズナにおけるメチオニン蓄積の変化に
応答した遺伝子発現制御)

学位論文内容の要旨

含硫アミノ酸であるメチオニンはタンパク質の構成成分であるのみならず、S-アデノシルメチオニン (SAM) に代謝されて細胞内の主要なメチル基転移反応やポリアミン合成、さらに植物では植物ホルモンであるエチレンの合成にも関わる重要なアミノ酸である。本論文は (1) 遊離メチオニンを過剰に蓄積するシロイヌナズナ変異の研究, (2) ダイズ種子貯蔵タンパク質遺伝子のメチオニン応答に関する研究, (3) メチオニンに応答する新規遺伝子の研究の3つの内容からなる。

(1) 遊離メチオニンを過剰に蓄積するシロイヌナズナ変異の研究

植物におけるメチオニン生合成の制御機構を明らかにするため、メチオニンを過剰に蓄積するシロイヌナズナ変異株の解析を行った。高等植物においてO-ホスフォホモセリン (OPH) はメチオニンとスレオニンの生合成経路の分岐点に位置し、メチオニン生合成の鍵段階を触媒する酵素であるシスタチオニナーゼ (CGS) とスレオニン生合成の鍵段階を触媒する酵素であるスレオニンシンターゼは、共通の基質である OPH を奪い合う関係にある。CGS 遺伝子の発現は mRNA の安定性の段階でフィードバック制御されていることが明らかになっているが、この制御だけではメチオニンの生合成制御は説明できない。

若いロゼット葉における遊離メチオニンの蓄積が増加したシロイヌナズナ変異株について遺伝学的解析を行い、スレオニンシンターゼの構造遺伝子に変異を持つ *mto2-1* 変異と SAM シンターゼをコードする3つの遺伝子の内の一つに変異を持つ *mto3-2* 変異を同定した。*mto2-1* 変異株の若いロゼット葉ではスレオニンの蓄積が大幅に減少しており、植物の生長に伴ってメチオニンとスレオニンの蓄積が逆相関を示し、細胞内におけるメチオニンの蓄積制御にはスレオニンシンターゼの活性が重要な役割を演じていることを明らかにした。また、これら変異株は、いずれもロゼット葉における遊離メチオニンの蓄積が野生型株の約 20 倍

に増加しているが、*mtol-1* 変異株では CGS 遺伝子の発現が抑えられるのに対して *mtol-2* 変異株では抑えられないことを示した。これにより、CGS 遺伝子発現のフィードバック制御には SAM シンセターゼの機能が重要な役割を持っていることを明らかにした。

(2) ダイズ種子貯蔵タンパク質遺伝子のメチオニン応答に関する研究

ダイズの主要な種子貯蔵タンパク質の一つである β -コングリシニンの β サブユニット遺伝子の発現はイオウ欠乏で増加し、メチオニンの投与で抑えられる。この遺伝子のメチオニン応答機構を明らかにするため、 β サブユニット遺伝子プロモータとレポータ遺伝子の融合遺伝子を持つ一連のトランスジェニック・シロイヌナズナを用いた解析を行った。 β サブユニット遺伝子プロモータ内の 235 塩基対の領域をカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモータに組み込むと、種子における発現はメチオニン応答を示すが、ロゼット葉ではイオウ欠乏には応答するがメチオニンには応答しないこと、また、全長の β サブユニット遺伝子プロモータに 35S プロモータのエンハンサ領域をつないだものではロゼット葉においてもメチオニン応答を示すことが明らかになった。このことから、メチオニン応答とイオウ欠乏応答が独立の反応であること、また、メチオニン応答機構には少なくとも 2 種類が存在することを明らかにした。

(3) メチオニンに応答する新規遺伝子の研究

メチオニンに応答する遺伝子を明らかにするため、シロイヌナズナの野生型株と *mtol-1* 変異株の間でマイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイ実験によって得られた候補遺伝子について、さらにリアルタイム PCR 解析を行い、*mtol-1* 変異株で発現が変化している遺伝子を 8 個同定した。このうち、*AtMRD1* および *AtMRU1* 遺伝子と名付けた 2 つの遺伝子については、すでに公表されているゲノム解析の結果からも機能を推定することのできない新規遺伝子であった。*AtMRD1* 遺伝子は植物の生育段階に拘わらず *mtol-1* 変異株での発現が強く抑えられており、一方 *AtMRU1* 遺伝子は若いロゼット葉での発現が *mtol-1* 変異株で増加していた。いずれの遺伝子も、長いオープンリーディングフレームを持たず、非コード RNA である可能性を提示した。

本論文は、メチオニンの生合成制御、ならびにメチオニンによる遺伝子の発現制御を遺伝学的研究手法と分子生物学的手法を用いて研究したものであり、この分野の研究に多くの新知見をもたらした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 藤 哲
副 査 教 授 富 田 房 男
副 査 教 授 大 崎 満
副 査 助 教 授 石 川 雅 之

学 位 論 文 題 名

Regulation of Gene Expression in Response to Changes in Methionine Accumulation in *Arabidopsis thaliana*

(シロイヌナズナにおけるメチオニン蓄積の変化に
応答した遺伝子発現制御)

含硫アミノ酸であるメチオニンはタンパク質の構成成分であるのみならず、S-アデノシルメチオニン (SAM) に代謝されて細胞内の主要なメチル基転移反応においてメチル基供与体となる重要なアミノ酸である。本論文は (1) 遊離メチオニンを過剰に蓄積するシロイヌナズナ変異の研究, (2) ダイズ種子貯蔵タンパク質遺伝子のメチオニン応答に関する研究, (3) メチオニンに応答する新規遺伝子の研究の3つの内容からなる。

(1) 遊離メチオニンを過剰に蓄積するシロイヌナズナ変異の研究

植物におけるメチオニン生合成の制御機構を明らかにするため、メチオニンを過剰に蓄積するシロイヌナズナ変異株の解析を行った。高等植物においてO-ホスフォホモセリン (OPH) はメチオニンとスレオニンの生合成経路の分岐点に位置し、メチオニン生合成に関わるシスタチオニャ-シンターゼ (CGS) とスレオニン生合成に関わるスレオニンシンターゼは共通の基質である OPH を奪い合う関係にある。若いロゼット葉における遊離メチオニンの蓄積が野生型株の20倍に増加したシロイヌナズナ変異株について遺伝学的解析を行い、スレオニンシンターゼの構造遺伝子に変異を持つ *mto2-1* 変異と SAM シンターゼをコードする3つの遺伝子の内の一つに変異を持つ *mto3-2* 変異を同定した。これら変異株を用いた解析により、細胞内におけるメチオニンの蓄積制御にはスレオニンシンターゼの活性が重要な役割を演じていること、また、CGS 遺伝子発現のフィードバック制御に SAM シンターゼの機能が重要な役割を持っていることを明らかにした。

(2) ダイズ種子貯蔵タンパク質遺伝子のメチオニン応答に関する研究

ダイズの主要な種子貯蔵タンパク質の一つである β -コングリシニンの β サブユニット遺伝子の発現はイオウ欠乏で増加し、メチオニンの投与で抑えられる。この遺伝子のメチオニン応答機構を明らかにするため、 β サブユニット遺伝子プロモータとレポータ遺伝子の融合遺伝子を持つ一連のトランスジェニック・シロイヌナズナを用いた解析を行った。 β サブユニット遺伝子プロモータ内の 235 塩基対の領域をカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモータに組み込むと、種子における発現はメチオニン応答を示すが、ロゼット葉ではイオウ欠乏には応答するがメチオニンには応答しないこと、また、35S プロモータと全長の β サブユニット遺伝子プロモータをつないだものではロゼット葉においてもメチオニン応答を示すことが明らかになった。このことから、メチオニン応答とイオウ欠乏応答が独立の反応であること、また、メチオニン応答機構には少なくとも2種類が存在することが明らかになった。

(3) メチオニンに応答する新規遺伝子の研究

メチオニンに応答する遺伝子を明らかにするため、シロイヌナズナの野生型株と *mtol-1* 変異株の間でマイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイ実験によって得られた候補遺伝子について、さらにリアルタイム PCR 解析を行い、*mtol-1* 変異株で発現が変化している遺伝子を 8 個同定した。このうち、*AtMRD1* および *AtMRU1* 遺伝子と名付けた 2 つの遺伝子についてはすでに公表されているゲノム解析の結果からも機能を推定することのできない新規遺伝子であった。*AtMRD1* 遺伝子は植物の生育段階に拘わらず *mtol-1* 変異株での発現が強く抑えられており、一方 *AtMRU1* 遺伝子は若いロゼット葉での発現が *mtol-1* 変異株で増加していた。いずれの遺伝子も、長いオープンリーディングフレームを持たず、非コード RNA である可能性を提示した。

本論文は、メチオニンの生合成制御、ならびにメチオニンによる遺伝子の発現制御に新たな知見をもたらしたものであり、遺伝子発現制御の研究として学会で高く評価されている。メチオニンはヒトをはじめとしてほとんどのほ乳類にとって必須アミノ酸であるにも拘わらず、植物におけるメチオニン生合成制御の遺伝子レベルでの研究は進んでいない。本研究は作物のメチオニン含量を高めるための基礎研究としても重要である。

よって、審査員一同は Derek Bartlem Goto 氏が博士（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。