博士（農 学） 尾 本 大 輔

学 位 論 文 題 名

シロイヌナズナ ADP-glucose pyrophosphorylase サブユニット遺伝子およびタンパク質の発現特性

学位論文内容の要旨

ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase, EC 2.7.7.27) は，グルコース 1-リン酸と ATP から ADP グルコースおよびピロリン酸を生成する反応を触媒する酵素である．この ADP グルコースはデンプン生合成における唯一の基質となり，様々なデンプン生合成関連酵素の働きでデンプンが合成される．AGPase は大小のサブユニットが 2 つずつ会合したヘテロ 4 量体であり，両サブユニットの担う役割は異なると考えられている．小サブユニットは主に触媒作用を担い，大サブユニットは主にアロステリック調節を担うことが明らかにされてきた．高等植物の場合，アロステリック調節を受ける際の活性化因子は 3-phosphoglycerate であり，阻害因子は無機リン酸である．各サブユニットはそれぞれ別の遺伝子にコードされている．一般に，植物では各サブユニットをコードする遺伝子は複数個存在するため，ヘテロ 4 量体である AGPase には多くのアイソザイムが存在すると考えられている．デンプンは光合成器官において合成される同化デンプンと貯蔵器官で合成される貯蔵デンプンの 2 種に大別されるが，両者の役割は異なると考えられるため，関与する AGPase アイソザイムも異なることが予想される．しかしながら，ある植物種にいくつの AGPase 遺伝子が存在するのか，あるいはそれぞれの遺伝子ないしはタンパク質の発現特性が，網羅的に解析された例はない．AGPase の活性はデンプン量に大きな影響を及ぼし，炭素源の振り分けに関与する重要な酵素であり，本酵素の植物体全体での機能を解析することは重要である．

シロイヌナズナにおいては全ゲノム配列がすでに解析されている．データベースから，シロイヌナズナには AGPase 大サブユニットをコードする遺伝子が 4 個 (*Apl1*, *Apl2*, *Apl3* および *Apl4*)，小サブユニットをコードする遺伝子が 2 個 (*Aps1* および *Aps2*) 存在することが明らかとなった．本研究では，シロイヌナズナの AGPase 全てのサブユニットの発現特性を，遺伝子レベルおよびタンパク質レベルで詳細に解析し，それぞれの AGPase アイソザイムの機能を明らかにすることを目的とした．遺伝子発現レベルの解析には，リアルタイム PCR を利用し，タンパク質レベルでの解析では，個々のサブユニットに対する特異的ポリクローナル抗体を作製し，それら抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った．植物体には，シロイヌナズナ野性株の他に，ApL1 タンパク質欠損株である TL46 株あるいは ApS1 タンパク質欠損株である TL25 株を使用し，欠損による影響も検討した．また，*Apl1*，*Apl3* および *Aps1* 遺伝子に関しては，各プロモーター領域の下流にレポーター遺伝子 (*GUS* 遺伝子)

を連結したプラスミドを植物体に導入した変異体を作製し，さらに詳細な発現特性を解析した．

Apl1 および *Aps1* 遺伝子は，全ての器官 (ロゼット葉，茎生葉，花茎および長角果) において強く発現しており，タンパク質レベルにおいても各器官で協調的に発現していた．また，GUS 染色の結果から両遺伝子は，植物体全体，特に光合成器官における強い発現が認められ，同部位にデンプンの蓄積が認められることから，ApL1/ApS1 AGPase アイソザイムは光合成器官における同化デンプン合成に強く関与していることが示唆された．貯蔵器官である種子における発現は光合成器官に比べると低いものの認められることから，ApL1/ApS1 AGPase アイソザイムは貯蔵組織における貯蔵デンプン合成にも関与していると考えられた．*Apl2* 遺伝子は，*Apl1* 遺伝子と同様な発現パターンを示し，タンパク質レベルにおいても ApL1 タンパク質と類似した発現特性であった (長角果においては発現が認められない)．しかしながら，遺伝子発現レベルの低さから，ApL2 タンパク質を構成因子とする AGPase アイソザイムのデンプン生合成に関する寄与は少ないと考えられた．ApL4 タンパク質は生育初期のロゼット葉にのみ存在が確認された．*Apl2* 遺伝子と同様に発現量が非常に小さいことから，ApL4 タンパク質を有する AGPase アイソザイムの量は少なく，デンプン生合成への関与も少ないと考えられた．*Apl3* 遺伝子はロゼット葉，茎生葉，花茎，長角果の順に発現量が大きく増加し，この増加はタンパク質レベルにおいても確認された．さらに，ApL3 タンパク質は種子において強く発現していることが示され，貯蔵器官におけるデンプン生合成への強い関与が示唆された．

ApL1 タンパク質欠損株 (TL46 株) および ApS1 タンパク質欠損株 (TL25 株) においては，*Apl1* 遺伝子は野性株と同様のレベルで転写産物を蓄積するが，他の遺伝子発現レベルは野性株に比べて TL46 株，TL25 株の順に増加した．この遺伝子発現量増加は，AGPase 活性およびデンプン蓄積量と負の相関を示し，ApL1 あるいは ApS1 タンパク質欠損に伴う何らかのシグナル応答の存在が示唆された．TL25 株においては，小サブユニットタンパク質が存在しないため，多くの大サブユニットは速やかに分解されたが，ApL3 タンパク質は単独で安定して存在し，AGPase としての機能以外にも何らかの役割があることが考えられた．

ApS2 タンパク質のアミノ酸配列には，触媒活性に重要とされるアミノ酸残基が欠如しており，活性を有する 4 量体を構成できないと考えられた．他にも，系統樹から ApS2 タンパク質の推定成熟タンパク質の一次構造は，他の植物種由来の AGPase 小サブユニット一次構造と相同性が低いこと，遺伝子発現レベルは他のサブユニット遺伝子と比較して著しく低いこと，特異的抗体を用いても ApS2 タンパク質を検出できないことから，*Aps2* 遺伝子は擬遺伝子であると考えられた．

以上のように，シロイヌナズナの AGPase サブユニットはそれぞれ特異的な発現特性を有することが明らかとなった．これらサブユニットからなる様々な AGPase アイソザイムが存在することが考えられたが，シロイヌナズナにおいては ApL1 および ApS1 タンパク質が主たる AGPase アイソザイムを構成し，同化デンプン合成・貯蔵デンプン合成の両方に寄与していると考えられた．ApL3 タンパク質に関しては，貯蔵デンプン合成に関する寄与の他に何らかに機能を有している可能性が示唆された．他のサブユニットからなる AGPase アイソ

ザイムも存在するが，デンプン生合成に関する寄与は少ないと考えられた．しかしながら，個々の AGPase アイソザイムは異なる酵素学的性質を有すると考えられ，生体内の環境の変化に対応し，複数の AGPase アイソザイムがデンプン生合成に関与していると考えられた．

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　松　井　博　和
副　査　教　授　浅　野　行　蔵
副　査　教　授　内　藤　　哲
副　査　助教授　伊　藤　浩　之

学位論文題名

シロイヌナズナ ADP-glucose pyrophosphorylase サブユニット遺伝子およびタンパク質の発現特性

本論文は，図 41，表 4，引用文献 272 を含み，5 章からなる総ページ 144 の和文論文である．別に参考論文 2 編が添えられている。

植物が合成するデンプンは人類に欠くことのできない物質であるが，その生合成経路の詳細は明らかになっておらず，不明な点も多い．本研究ではシロイヌナズナ植物を対象とし，デンプン生合成における鍵酵素 ADP-glucose pyrophosphorylase の全サブユニットの網羅的な発現特性を遺伝子レベルならびにタンパク質レベルで詳細に検討し，デンプン生合成経路のより深い理解を目指して行われた．

ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase, EC 2.7.7.27) は，デンプン生合成における唯一の基質 ADP-グルコースを生成する反応を触媒する酵素である．高等植物の AGPase は大小のサブユニットが 2 つずつ会合したヘテロ 4 量体であり，両サブユニットの担う役割は異なると考えられている．各サブユニットはそれぞれ別の遺伝子にコードされている．一般に，植物では各サブユニットをコードする遺伝子は複数個存在するため，ヘテロ 4 量体である AGPase には多くのアイソザイムが存在すると考えられている．しかしながら，ある植物種にいくつの AGPase 遺伝子が存在するのか，あるいはそれぞれの遺伝子ないしはタンパク質の発現特性が網羅的に解析された例はない．AGPase の活性はデンプン量に大きな影響を及ぼし，また，炭素源の振り分けに関与する重要な酵素であることから，本酵素の植物体全体での機能を解析することは重要である．

シロイヌナズナにおいては全ゲノム配列がすでに解析されている．データベースから，シロイヌナズナには AGPase 大サブユニットをコードする遺伝子が 4 個 (*Apl1*, *Apl2*, *Apl3* および *Apl4*)，小サブユニットをコードする遺伝子が 2 個 (*Aps1* および *Aps2*) 存在することが明らかとなった．

Apl1 および *Aps1* 遺伝子は，全ての器官 (ロゼット葉，茎生葉，花茎および長角果) において強く発現しており，タンパク質レベルにおいても各器官で協調的に発現していた．また，

GUS 染色の結果から両遺伝子は，植物体全体，特に光合成器官における強い発現が認められ，同部位にデンプンの蓄積が認められることから，ApL1/ApS1 AGPase アイソザイムは光合成器官における同化デンプン合成に強く関与していることが示唆された．同様に，ApL1/ApS1 AGPase アイソザイムは貯蔵組織における貯蔵デンプン合成にも関与していると考えられた．

Apl2 遺伝子は，*Apl1* 遺伝子と同様な発現パターンを示し，タンパク質レベルにおいても ApL1 タンパク質と類似した発現特性であった (長角果においては発現が認められない)．しかしながら，遺伝子発現レベルの低さから，ApL2 タンパク質を構成因子とする AGPase アイソザイムのデンプン生合成に関する寄与は少ないと考えられた．ApL4 タンパク質は生育初期のロゼット葉にのみ存在が確認された．*Apl2* 遺伝子と同様に発現量が非常に小さいことから，ApL4 タンパク質を有する AGPase アイソザイムの量は少なく，デンプン生合成への関与も低いと考えられた．*Apl3* 遺伝子は各器官で発現量が異なり，特に長角果における強い発現が確認された．タンパク質レベルでの発現特性は，遺伝子レベルにおける発現特性と相関を示した．ApL3 タンパク質は種子において強く発現していることが示され，貯蔵器官におけるデンプン生合成への関与が示唆された．

ApL1 タンパク質欠損株 (TL46 株) および ApS1 タンパク質欠損株 (TL25 株) においては，*Apl1* 遺伝子は野性型株と同様のレベルで転写産物を蓄積するが，他の遺伝子発現レベルは野性株に比べて TL46 株，TL25 株の順に増加した．この遺伝子発現量増加は，AGPase 活性およびデンプン蓄積量と負の相関を示し，ApL1 あるいは ApS1 タンパク質欠損に伴う何らかのシグナル応答の存在が示唆された．TL25 株においては，小サブユニットタンパク質欠損のため，多くの大サブユニットは速やかに分解されたが，ApL3 タンパク質は単独で安定して存在し，AGPase としての機能以外にも何らかの役割があることが考えられた．

ApS2 タンパク質のアミノ酸配列には，触媒活性に重要とされるアミノ酸残基が欠如しており，活性を有する 4 量体を構成できないと考えられた．加えて，ApS2 タンパク質の一次構造は，他の植物種由来の AGPase 小サブユニット一次構造と相同性が低いこと，遺伝子発現レベルが著しく低いこと，特異的抗体を用いても ApS2 タンパク質を検出できないことから，*Aps2* 遺伝子は擬遺伝子であると考えられた．

以上のように，シロイヌナズナの AGPase サブユニットはそれぞれ特異的な発現特性を有することが明らかとなった．これらサブユニットからなる様々な AGPase アイソザイムが存在することが考えられたが，シロイヌナズナにおいては ApL1 および ApS1 タンパク質が主たる AGPase アイソザイムを構成し，同化デンプン合成・貯蔵デンプン合成の両方に寄与していると考えられた．ApL3 タンパク質は，貯蔵デンプン合成への寄与に加え，何らかの機能を有している可能性が示唆された．他のサブユニットからなる AGPase アイソザイムも存在するが，デンプン生合成に関する寄与は低いと推定された．しかしながら，個々の AGPase アイソザイムは異なる酵素化学的性質をもち，生体内の環境の変化に対応し，複数の AGPase アイソザイムがデンプン生合成に関与すると考えられた．

本研究では，シロイヌナズナを用い植物体全体における AGPase サブユニットの発現特性を明らかにした．また，同時に変異株を解析することにより，AGPase サブユニットタンパク質の欠損に伴うシグナル伝達経路の存在を示唆し，さらに，AGPase サブユニットの 1 種が，AGPase としての機能以外に何らかの機能をもつ可能性を示した．これらの知見は学術

的のみならず，植物体内における炭素源を有効に利用し，デンプン量を増加させるなどの応用面においても大いに貢献するものと判断される.

よって，審査員一同は，尾本大輔氏が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有すると認めた.