

氏名	藤谷 典志
授与した学位	博士
専攻分野の名称	農学
学位授与番号	博甲第3420号
学位授与の日付	平成19年 3月23日
学位授与の要件	自然科学研究科資源管理科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	植物のセリンラセマーゼの構造と機能に関する研究
論文審査委員	助教授 杉本 学 助教授 今野 晴義 教授 武田 和義

学位論文内容の要旨

D-アミノ酸は細菌、動物、植物に広く存在していることが報告されているが、植物におけるその機能と代謝については不明である。本研究では、オオムギ、イネ、シロイヌナズナ由来セリンラセマーゼ (HvSR、OsSR、AtSR) 遺伝子を探索し、クローニングした。また、HvSR、OsSR、AtSR 遺伝子を大腸菌で発現させ、酵素化学的諸性質や植物における発現を検討した。

HvSR のアミノ酸配列は OsSR、AtSR、ヒト由来セリンラセマーゼ (hSR)、マウス由来セリンラセマーゼ (mSR) とそれぞれ 87、67、42、42% の相同性を示した。アライメント解析から、PLP 依存型酵素である hSR と mSR の活性中心と PLP 結合に関与するアミノ酸残基が、HvSR、OsSR、AtSR にも保存されていた。系統樹分析や免疫学的分析により、真核生物由来セリンラセマーゼは、これまで明らかになっているアミノ酸ラセマーゼとは異なるグループを形成し、植物由来セリンラセマーゼは哺乳類由来セリンラセマーゼとは異なる一次構造をとり、単子葉植物と双子葉植物のセリンラセマーゼに分類できることを明らかにした。

精製 HvSR、OsSR、AtSR はヒドロキシルアミンで失活し水素化ホウ素ナトリウム処理により 415 nm 付近の吸収極大が消失することから、PLP 依存型酵素であることを明らかにした。HvSR、OsSR、AtSR は二価金属イオンである Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} の存在下でラセマーゼ活性が上昇したが、哺乳類由来セリンラセマーゼが要求する ATP による活性の上昇は認められなかった。また、哺乳類由来セリンラセマーゼと同様に HvSR、OsSR、AtSR もデヒドラターゼ活性を示し、ラセマーゼ活性よりも約 20 倍高いことを明らかにした。

AtSR 遺伝子は根、葉、花芽で発現し、細胞質に局在していることを明らかにした。また、根の分裂組織や幼葉で強い発現を確認したが成熟葉では発現が弱いことから、セリンラセマーゼは細胞分裂の活発な部位で発現することを明らかにした。

本研究により、植物由来セリンラセマーゼはデヒドラターゼ活性がラセマーゼ活性に比べ非常に高いことや、細胞分裂の活発な部位で特異的に発現していることが明らかとなり、植物由来セリンラセマーゼは、セリンを加水分解しピルビン酸にすることでエネルギー供給を行なうことが主な生理機能であり、哺乳類由来セリンラセマーゼの生理機能とは異なることが示唆された。

論文審査結果の要旨

D-アミノ酸は細菌、動物、植物に広く存在していることが報告されているが、植物における機能と代謝については全く不明である。本研究は、哺乳類で発見された D-アミノ酸を合成する酵素セリンラセマーゼ (SR) が植物に存在することを明らかにし、その構造と植物における機能について解析したものである。哺乳類由来セリンラセマーゼ遺伝子配列をもとにオオムギ、イネ、シロイヌナズナ由来セリンラセマーゼ (HvSR、OsSR、AtSR) 遺伝子を探索し、クローニングに成功した。cDNA の塩基配列を決定しアミノ酸配列を解析したところ、植物由来 SR は PLP 依存性酵素であるヒトとマウス由来 SR の活性中心に存在し PLP 結合に関与するアミノ酸残基が保存されているが PLP のリン酸基に隣接するグリシンリッチループが異なること、系統樹分析、HvSR と AtSR の抗体を作製して免疫学的分析により、植物由来セリンラセマーゼは哺乳類由来アミノ酸ラセマーゼとは異なるグループを形成し、また単子葉植物と双子葉植物で分類できることを明らかにした。HvSR、OsSR、AtSR 遺伝子を大腸菌で発現させ、精製酵素の酵素化学的性質を解析し、植物由来 SR は哺乳類由来 SR と同様に PLP の存在下二価金属でラセマーゼ活性が上昇するが哺乳類由来 SR がもつ ATP 要求性はないことを明らかにした。植物由来 SR はラセマーゼ活性より約 20 倍高いデヒドラターゼ活性を示すことや、植物には哺乳類とは異なりアミノ酸オキシダーゼが存在しないことから、植物由来 SR はセリンを加水分解してエネルギー供給をすることが主要な生理機能であり、D-セリンを供給する哺乳類由来セリンラセマーゼの生理機能とは異なるという結論に達した。このことは、SR プロモーターを GUS 遺伝子と融合したプラスミドを構築し形質転換したシロイヌナズナの解析により、SR が細胞分裂の活発な部位で発現することからも支持するものであった。

以上、本研究成果はこれまで全く不明であった植物の D-アミノ酸を代謝する酵素であるセリンラセマーゼが植物に存在することを初めて明らかにするとともに、セリンラセマーゼの酵素科学や生理機能を解明する上で新しい知見であり、博士 (農学) 学位に値すると判定した。