

氏 名	村 濱 稔
生 年 月 日	
本 籍	石川県
学 位 の 種 類	博士(理学)
学 位 記 番 号	博甲第431号
学位授与の日付	平成13年3月31日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	ストレス植物におけるプロリン蓄積の意義に関する研究
論文審査委員(主査)	和田敬四郎(自然科学研究科・教授)
論文審査委員(副査)	櫻井 勝(理学部・教授) 星名 哲(理学部・助教授) 福森 義宏(理学部・教授) 山口 和男(遺伝子実験施設・教授)

学 位 論 文 要 旨

Studies on the meaning of proline accumulation of plants under the stressed conditions.

Plant rooted in the native place are exposed to serious changes of various environmental factors such as high and low temperatures, high intensity of light, drought, high osmotic pressure during their growth. Most plants have acquired mechanisms which make them tolerant to environmental stressed during their development. It has been known that free proline accumulated in bacteria, algae and higher plants in response to some water stresses as an osmolyte. In order to clarify the meaning of proline accumulation of plants under the stressed conditions, I carried out four experiments as follows:

- 1) Purification of 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, the second enzyme in the proline degradation pathway and a catalyst for oxidation of P5C to glutamate from spinach leaves.
- 2) Determination of partial amino acid sequence of P5C reductase purified from spinach leaves for identification of P5C reductase isoenzymes and comparison between partial sequence and amino acid sequence deduced from four other P5C reductase cDNA.
- 3) Metabolism of the accumulated proline in pollen grains and fern spores at a removal of drought stress.
- 4) Relationship between levels of accumulated proline and sodium ion in barley seedling in darkness.

It was confirmed that proline accumulated or degraded in response to the extent of water stresses. From spinach leaves, the fourth enzyme, P5C dehydrogenase, in proline metabolism was purified and characterized in some enzymatic properties. From a comparison of the partial amino acid sequence, one of P5C reductase isoenzymes, P5CR-1 was highly homologous to four other P5C reductase sequences deduced from cDNA. I would like to propose that pollen grains and fern spores become a important and useful system for studies on explaining the meaning of proline accumulation of plants under stress conditions.

現在地球上広範囲で進行している地球の砂漠化や、将来予想される食料不足は人類が抱える重大な問題の一つである。塩・乾燥耐性（高浸透圧耐性）を賦与した形質転換植物は、これらに対する有効な解決策として期待できる。塩・乾燥という環境要因に対する陸上植物の適応は、地上部の表層を透水性の極めて低いクチクラ層で覆うこと、必要なガス交換のための気孔という特殊な器官を発達させてきた。また光合成の効率をある程度確保しながら葉面積を小さくしたり、葉の形を変形させて、できるだけ表面積を減らすこと、また1年のうち水の確保できる短い期間に生育、開花、繁殖を行い、他の期間はほとんどすべての活動を休止すること適応してきたものもある。このように長期的で一般的な戦略の他に、短期的で局所的な塩・乾燥ストレス応答、すなわち一時的な気孔の閉鎖や日周変動といったミクロで代謝的な応答があり、グリシンベタイン、ポリオール、プロリンなどの浸透圧調節物質の蓄積などが行われる。私はこのような浸透圧調節物質の蓄積のなかでもプロリン蓄積に焦点をあてた。プロリンは植物が唯一分解系を有する浸透圧調節物質で、塩・乾燥ストレスの程度により蓄積量を任意に変化させることができる。そのため、蓄積されたプロリンはストレス解除時にはエネルギー源や炭素・窒素源としての再利用されることも示唆されている。プロリンと共によく研究されている浸透圧調節物質ベタインの場合、植物には分解系が存在せず、蓄積されるとそのまま植物体内に残存し、再利用されることはない。普通の植物におけるエネルギーのバランスシートを考えると、ベタイン蓄積はプロリン蓄積より非経済的であるといえる。マングローブやアッケシソウのように海岸や海中に生育する植物がプロリン蓄積でなくベタイン蓄積を選択したことは非常に興味深い。言い換えるとプロリン蓄積は条件(facultative)であり、絶対的(obligatory)ではない。しかし、プロリン蓄積と塩・乾燥ストレス耐性とを直接結びつける糸口はまだ得られていない。プロリンが細胞内に蓄積するとどうして細胞が塩・乾燥ストレスに耐えられるようになるのか、プロリンというアミノ酸の一種がどのように細胞内に局在し、作用しているのか、まだまだ想像の域を出ない。プロリンの細胞内での直接の作用を明らかにすることは重要である。また、プロリンの合成・分解の機構は近年の分子生物学的手法により遺伝子レベルでの解析は進展したが、タンパク質レベルの研究は遅れている。そこで私はプロリンの合成・分解に関与する酵素を精製し、それらの性質の解明に取り組んだ。

プロリンはグルタミン酸を前駆体としてピロリン5カルボン酸(P5C)合成酵素とP5C還元酵素により合成され、ミトコンドリアに局在するプロリン脱

水素酵素とP5C脱水素酵素によりグルタミン酸まで分解される。このうち、P5C脱水素酵素をホウレンソウ (*Spinacia oleracea* L.) の葉を用い、その粗抽出液を硫酸分画 (30-70%) し、その後Blue Cellulofine、DEAE-TOYOPEARL 650M、hydroxyapatite、sephacryl S-300HR、POROS QE/M のクロマトグラフィーを行った。その結果SDS-PAGEにおいて60kDaのバンドが検出された。一方、ゲル濾過クロマトグラフィーの結果よりP5C脱水素酵素の分子量は約240kDaと算出されたので、ホウレンソウP5C脱水素酵素は60kDa subunitの4量体である。また、ホウレンソウP5C還元酵素タンパク質の部分アミノ酸配列決定にはじめて成功した。すで報告されている大豆のcDNAの塩基配列から推定される推定アミノ酸配列274残基のうち105残基を決定した。報告されている大豆、エンドウ、*Arabidopsis thaliana* 及びキウイフルーツのcDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列とそれぞれに高い相同性が見られた。加えて極度の乾燥に晒された花粉や胞子が多量のプロリンを蓄積していた。花粉や胞子が乾燥ストレスから解放されると、プロリン脱水素酵素が発現した。蓄積プロリンがプロリン脱水素酵素により代謝され、減少することから、花粉や胞子に蓄積しているプロリンが浸透圧調節や水分保持に使われている可能性を示した。

学位論文審査結果の要旨

高等植物は、環境要因の変動 (温度、光、酸素、塩、水の状態、化学物質等) には非常に敏感で、最適な環境からのズレをすべてストレスと捉え、応答する。本研究では特に塩・乾燥ストレスに対しての植物の応答の一つであるプロリンの蓄積・分解を主たるテーマとしている。ストレス下にある植物細胞に蓄積されたプロリンが実際にどのような機能を果たしているのか、具体的な研究は緒に付いたばかりであり、生理的・生化学的な種々の問題が残されている。

本研究ではプロリン合成系の一つの酵素であるピロリン-5-カルボン酸還元酵素の精製とアミノ酸配列を全分子の約40%を解明し、既に配列の明かなものと比較した。これは林らまた市野によって明らかにされていたサイトゾル局在の酵素であり、これまでに解析された遺伝子産物の配列と67~79%の相同性があった。また、プロリン合成系に働くP50脱水素酵素の精製に取り組み、ほぼ精製に成功した。この酵素は関係する4つの酵素のうちでは最も研究の遅れている酵素で、今後イタリアのグループとの競合が問題となろう。

更に新しい試みとして、常に乾燥ストレスに曝されていることが予測される胞子や花粉のプロリンの消長を解析し、胞子や花粉を水に浸すだけで、蓄積されていた多量のプロリンの減少と相呼応したプロリン分解の制御酵素と考えられているプロリン脱水素酵素の発現を検出した。乾燥の解消によって生ずるプロリンの分解は呼吸活性とも関連していることが呼吸阻害剤を用いた実験から明らかにされた。

本研究は、ストレス下にある植物のプロリン蓄積の本当の意義を明らかにするところまでには至らなかったが、プロリン蓄積および分解の制御と塩・乾燥ストレスとの間を繋ぐ更なる知見の蓄積に大いに貢献した。花粉や胞子を用いた実験により、将来に向けての新たな研究の道を開拓したものといえる。したがって本論文は博士論文に値すると判断された。