

学 位 論 文 要 旨

氏 名	ヴッティ テン
題 目	3種類のCAM植物（セイロンベンケイソウ，コダカラベンケイソウ，パイナップル）におけるCAM型光合成の制御に関する分子生物学的研究 (Molecular Biological Study on the CAM Regulation in <i>Kalanchoë pinnata</i> , <i>K. daigremontiana</i> and <i>Ananas comosus</i>)

本研究の目的はセイロンベンケイソウ (*Kalanchoë pinnata*)，コダカラベンケイソウ (*K. daigremontiana*)，及びパイナップル (*Ananas comosus*) のCAM型光合成におけるPEPCのリン酸化の制御機構を明らかにすることである。

3種のCAM植物におけるPEPCの制御特性は，抽出したPEPC活性が日周変化を示すことを支持するものであった。活性の昼/夜変動はパイナップルより2種ベンケイソウで大きかった。この日周変動は代謝状態と密接に関連していた。つまりPEPC活性は，葉内のリンゴ酸レベルが高いときに低くなり，逆にリンゴ酸レベルが低いときに高かった。特に，PEPCタンパクがPEPC活性と平行した日周変動を示すことが明らかになった。また，2種類のベンケイソウにおいては，PEPCタンパクのリン酸化が消燈後2時間頃にピークに達し，その後漸減した。しかし，パイナップルにおいては，消燈から6時間を経た真夜中にPEPCのリン酸化がピークが認められ，そのリン酸化の程度はベンケイソウに較べ小さかった。このようなリン酸化の推移は，リンゴ酸感受性の推移と平行するものであった。

供試したCAM植物の葉身から4種類のPEPCアイソフォームを単離し，そのうち一つがCAM型光合成特有のCO₂交換の日周変化と並行した転写発現を示し，CAM型光合成に特異なアイソフォームであると推定された。これらのCAM特異的なPEPC遺伝子は他の植物にもみられるリン酸化モチーフ (Ser-11) をN末端に有していた。また，これらPEPC遺伝子の転写発現の日周変化は種によって異なっていた。すなわち，ベンケイソウ2種では転写量が暗期の始めにピークとなったが，パイナップルでは深夜にピークとなった。PEPCの転写量にみられた昼夜変動はPEPCタンパク合成と活性にみられた昼夜変動とよく一致した。これはPEPCのmRNAの転写量がPEPCタンパク質の量と活性にみられた日周変動の制御に関与していることを初めて示唆するものである。

2種のベンケイソウ種から単離したPEPCキナーゼの転写産物はタンパク質キナーゼ触媒部位のみを含み，272~276アミノ酸残基からなる分子量約30.6~31.0 kDaのタンパク質であることが推定された。これら2種類のPEPCキナーゼ (*KpPpck1* 及び *KdPpck1*) は暗期で発現量が増加した。特にPEPCキナーゼの転写産物の発現パターンはPEPCタンパクのリン酸化状態と一致したことから，ベンケイソウではPEPCのリン酸化がPEPCキナーゼ転写産物量で制御されていることが示唆された。

本研究ではPEPCキナーゼ転写産物をパイナップルからは単離できなかった。しかしパイナップルのPEPCキナーゼ転写産物がベンケイソウのPEPCキナーゼで作製したプローブとクロスハイブリダイゼーションすることが観察された。しかしその発現はPEPCタンパクのリン酸化状態にみられる日周変動と一致せず，数時間後れた暗期後半に発現量ピークが観察された。さらに，パイナップルにおけるPEPCキナーゼの転写発現レベルはベンケイソウより明らかに低かった。切除葉身にタンパク合成阻害剤を処理する実験からベンケイソウのPEPCのリン酸化状態はPEPCキナーゼの転写量に大きく影響されるが，パイナップルではPEPCキナーゼとCDPKによって制御されていることが示唆された。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	VUTHY THENG
題 目	Molecular Biological Study on the CAM Regulation in <i>Kalanchoë pinnata</i> , <i>K. daigremontiana</i> and <i>Ananas comosus</i> (3種類のCAM植物 (セイロンベンケイソウ, コダカラベンケイソウ, パインアップル) におけるCAM型光合成の制御に関する分子生物学的研究)

The aim of this study was to investigate the characteristics of regulatory phosphorylation of PEPC in two *Kalanchoë* species, *K. pinnata* and *K. daigremontiana* and pineapple (*Ananas comosus*). Regulatory properties of PEPC in three CAM species illustrated that PEPC activity in crude leaf extracts displays diurnal variations. The day/night variations in activity are higher in *Kalanchoë* species than that in pineapple. The diurnal oscillations are well correlation with diurnal variations in metabolite status. PEPC activity is low when malic acid level is high, and high activity when malic acid is low. Furthermore, the interesting finding in this study was that PEPC proteins also illustrate diurnal oscillations in a manner correlating with metabolite status as observed in the diurnal oscillations in PEPC activity. The present study showed clearly the existent of diurnal changes in phosphorylation state of PEPC protein in pineapple as well as in both *Kalanchoë* species. Comparing to *Kalanchoë* CAM species, the phosphorylation status of PEPC protein in pineapple is much lower and is activated exclusively in the dark periods, peaking at midnight period. In both *Kalanchoë* species, PEPC is phosphorylated before the light setting off, peaking during the first 2h of dark phase, and then dephosphorylated after the light setting on. The low phosphorylation state of PEPC in pineapple is attributed to high malate sensitivity of the enzyme, which is consistent with the previous study found that the night form of PEPC from this CAM species was highly sensitivity to malate inhibition (Shaheen et al. 2002). Among the four PEPC isoforms expressed in leaf tissues of the investigated CAM species, one of which is recruited as a CAM-specific isoform to fulfill the CAM photosynthetic pathway. These CAM-specific isogenes contain a plant invariant phosphorylation motif (Ser-11) near the N-terminus, and these isogenes exhibit diurnal oscillations in transcript abundance. The expression patterns of PEPC transcripts were different with respect to different CAM species; in *Kalanchoë* species the transcripts peak during the first dark period whereas in pineapple peaks during the midnight period. The day/night variations in PEPC transcript were in agreement with diurnal changes in protein synthesis and enzyme activity, providing for the first suggestion that the diurnal changes in PEPC mRNA abundance attribute into changes in PEPC protein amount and enzyme activity over day/night cycle.

PEPC kinase transcripts isolated from both *Kalanchoë* species contain only protein kinase catalytic domain, encoding 272 – 276 amino acid residues with predicted molecular mass of 30.6 – 31.0 kDa. These two PEPC kinase genes, *KpPpck1* and *KdPpck1*, show their transcript abundances during the dark period. The expression pattern of PEPC kinase transcripts tracked the phosphorylation state of PEPC *in vivo*, suggesting that PEPC kinase transcripts control the phosphorylation state of PEPC in both *Kalanchoë* species. PEPC kinase transcript could not be isolated from pineapple in the present study, but PEPC kinase transcript in pineapple showed crossed-hybridization with PEPC kinase probes from *Kalanchoë* species. Its transcript abundance did not match the diurnal phosphorylation state of PEPC, showing a short lag time peaking during the late dark phase. Moreover, PEPC kinase transcript in pineapple is much lower than that in both *Kalanchoë* species. Based on the treatment of detached leaves with various pharmacological drugs indicated that the phosphorylation state of PEPC in both *Kalanchoë* species is largely controlled by PEPC kinase transcripts whereas that in pineapple may possibly be controlled by both PEPC kinase and CDPK.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	Vuthy Theng
審査委員	主査 佐賀大学 教授 野瀬 昭博
	副査 佐賀大学 助教授 東江 栄
	副査 鹿児島大学 教授 富永 茂人
	副査 宮崎大学 教授 杉本 安寛
	副査 琉球大学 助教授 川満 芳信
審査協力者	
題 目	<p>Molecular Biological Study on the CAM Regulation in <i>Kalanchoë pinnata</i>, <i>K. daigremontiana</i> and <i>Ananas comosus</i> (3種類のCAM植物 (セイロンベンケイソウ, コダカラベンケイソウ, パインアップル) におけるCAM型光合成の制御に関する分子生物学的研究)</p>
<p>本研究は、CAM型光合成制御の分子生物学的特性を明らかにする目的で、セイロンベンケイソウ (<i>Kalanchoë pinnata</i>), コダカラベンケイソウ (<i>K. daigremontiana</i>), 及びパインアップル (<i>Ananas comosus</i>) を用いて、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) のリン酸化の制御機構を中心に調査したものである。</p> <p>まず、3種類のCAM植物から抽出したPEPC活性の日周変化について、関連する要因と合わせ解析を試みている。その結果、活性の昼/夜変動はパインアップルより2種のベンケイソウで大きいことを認め、その日周変動は代謝状態と密接に関連していることを明らかにしている。つまりPEPC活性は、葉内のリンゴ酸レベルが高いときに低くなり、逆にリンゴ酸レベルが低いときに高くなる。特に、PEPCタンパクがPEPC活性と平行した日周変動を示すことを明らかにしている。また、2種類のベンケイソウにおいては、PEPCタンパクのリン酸化が消灯後2時間目頃にピークに達するのに対し、パインアップルでは、消灯から6時間を経た真夜中にPEPCタンパクのリン酸化のピークが現れ、そのリン酸化の程度はベンケイソウに較べ小さいことを観察し、リン酸化の程度及び推移が、リンゴ酸感受性の推移と平行するものであることを明らかにしている。</p>	

さらに、供試した CAM 植物の葉身から 4 種類の PEPC 遺伝子アイソフォームを単離し、そのうち一つが CAM 型光合成特有の CO₂ 交換の日周変化と並行した発現を示し、CAM 型光合成に特異なアイソフォームであると推定している。これらの CAM 特異的な PEPC 遺伝子は他の植物にもみられるリン酸化モチーフ (Ser-11) を N 末端に有し、これら PEPC 遺伝子の転写発現の日周変化は種によって異なることを認めている。すなわち、2 種のベンケイソウでは転写量が暗期の始めにピークとなったが、パインアップルでは深夜にピークとなる。PEPC の転写量にみられた昼夜変動は PEPC タンパク合成と活性にみられた昼夜変動とよく一致し、これは PEPC の mRNA の転写量が PEPC タンパク質の量と活性にみられた日周変動の制御に関与していることを初めて示すものである。

2 種のベンケイソウ種から単離した PEPC キナーゼの転写産物はタンパク質キナーゼ触媒部位のみを含み、272~276 アミノ酸残基からなる分子量約 30.6~31.0 kDa のタンパク質であると推定している。これら 2 種類の PEPC キナーゼ (*KpPpck1* 及び *KdPpck1*) は暗期で発現量が増加し、特にその転写産物の発現パターンは PEPC タンパクのリン酸化状態と一致したことから、ベンケイソウでは PEPC のリン酸化が PEPC キナーゼ転写産物量で制御されていることを示唆している。

本研究では PEPC キナーゼ転写産物をパインアップルからは単離できていないが、パインアップルの PEPC キナーゼ転写産物がベンケイソウの PEPC キナーゼで作製したプローブとクロスハイブリダイズすることを観察している。しかしその発現は PEPC タンパクのリン酸化状態にみられる日周変動と一致せず、数時間後れた暗期後半に発現量ピークが生じることを認めている。さらに、パインアップルにおける PEPC キナーゼの発現レベルはベンケイソウより明らかに低いことも認めている。切除葉身にタンパク合成阻害剤を処理する実験からベンケイソウの PEPC のリン酸化状態は PEPC キナーゼの転写量に大きく影響されるが、パインアップルでは PEPC キナーゼと Ca²⁺依存性タンパク質キナーゼ (CDPK) によって制御されていることを示唆している。

以上の結果は、CAM 型光合成の制御が PEPC タンパクのリン酸化のみによらず、PEPC タンパク発現の日周変化も関与し、さらにパインアップルにおいては PEPC キナーゼに加えて CDPK によるリン酸化が関与する可能性を示すという、CAM 型光合成制御メカニズムにおける新たな知見を提供している。以上の成果について、本審査委員会は学位論文として十分な価値を持つものと判断した。

最終試験結果の要旨

学位申請者 氏 名	Vuthy Theng			
審査委員	主査	佐賀大学	教授	野瀬 昭博
	副査	佐賀大学	助教授	東江 栄
	副査	鹿児島大学	教授	富永 茂人
	副査	宮崎大学	教授	杉本 安寛
	副査	琉球大学	助教授	川満 芳信
審査協力者				
実施年月日	平成 19 年 1 月 10 日			
試験方法（該当のものを○で囲むこと。）				○口答・筆答
<p>主査および副査の5名は、平成19年1月10日（水）の公開審査会において、学位申請者に対して学位論文について説明を求め、その内容および関連事項について試問をおこなった。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>その結果、審査委員会は、申請者が大学院連合農学研究科博士課程修了者として十分な学力ならびに見識を有するものと認め、博士（農学）の学位を与えるに足る資格をもつものと判定した。</p>				

学位申請者 氏名	Vuthy Theng
<p>質疑・応答の経過</p> <p>質問 1: この論文は結果も興味深く、論旨もよくまとまっていると思います。ひとつだけ、CDPKのフルスペルは、何でしょうか？それと、CDPKとリン酸化の関係はどう考えますか？</p> <p>答: カルシウム依存性タンパク質キナーゼです。パイナップルにおいてCDPKによるリン酸化がどの程度生じているのかは、この研究では明らかにすることが出来ませんでした。機会があれば、今後明らかにしたいと思います。</p> <p>質問 2: パイナップルの土壌にカルシウムが多いと、クロロシスが生じますが、CDPKの働きと何か関係がありますか？</p> <p>答: わかりません。</p> <p>質問 3: 良い論文だと思います。いくつかの点について教えてください。パイナップルではPEPCキナーゼの発現がベンケイソウに較べて遅い時間にピークになりますが、それは液胞膜のリンゴ酸の透過性と関係がありますか？</p> <p>答: ご指摘の通り、パイナップルでは液胞膜の効率的なリンゴ酸取込みが関与していると考えています。</p> <p>質問 4: この研究では、3種類のCAM植物が用いられていますが、ここでの結果は他のCAM植物でも広く認められるものと考えられますか？それとも種によって夫々異なると考えられますか？</p> <p>答: 今後の検討課題だと考えています。できれば研究を続けたいです。</p> <p>質問 5: ここでの結果は、日長条件を変えるとどのように変化しますか？それともしませんか？</p> <p>答: 変わると思います。</p> <p>質問 6: ベンケイソウではカルシウムによるリン酸化の制御は考えられませんか？</p> <p>答: 今のところ考えられません。ベンケイソウではCDPKの発現を認めることができませんでした。</p> <p>質問 7: この論文では、リンゴ酸を葉全体として分析していますが、葉内での局在化についてどのように考えていますか？</p> <p>答: Hartwellらは細胞質のリンゴ酸レベルの定量を試みていますが、成功していません。Hafkeらは、コダカラベンケイソウでpHについて調査していますので、pHから推定できるかもしれません。今後、検討します。</p> <p>質問 8: それは、どんな方法を用いていますか？</p> <p>答: 蛍光分析法です。</p> <p>質問 9: CAM植物の液胞膜のカルシウムチャンネルの存在についてはどのように考えていますか？</p> <p>答: C4植物では単離されていますが、CAM植物ではまだ単離されていません。</p> <p>質問 10: カルシウムはカチオンですが、リンゴ酸とどのようにして、トノプラストを介した交換が可能ですか？</p> <p>答: リンゴ酸も解離して、カチオンになっています。</p> <p>質問 11: カルボニックアンヒドラーゼについては調査しなかったのですか？</p> <p>答: していません。</p>	