

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	高用順
審査委員	主査 石川 孝博 ㊞
	副査 澤 嘉弘 ㊞
	副査 渡邊 文雄 ㊞
	副査 松下 一信 ㊞
	副査 柴田 均 ㊞
題目	Functional Analysis of Genes Involved in Ascorbate Biosynthesis and Regulation in <i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナにおけるアスコルビン酸の生合成と調節に関する遺伝子の機能解析)
審査結果の要旨 (2,000字以内)	
<p>高用順氏から提出された表題の学位論文について、平成23年7月25日に実施した口頭発表も踏まえで5名の審査委員で審査を行った。</p> <p>植物はアスコルビン酸(ビタミンC)をmMオーダーの高濃度で含んでおり、近年その生合成の主要経路がD-マンノース/L-ガラクトース経路であることが代謝酵素の遺伝子レベルでの解析で明らかにされたが、生合成調節の分子機構については明らかになっていない。また細胞周期制御や細胞伸張、病原応答などアスコルビン酸が関与するさまざまな現象についても、その関連を遺伝子レベルで明確に解明した研究はこれまでに報告がない。こうした状況の下、高氏は、モデル植物のシロイヌナズナを用いてこれらの課題解決のため、主に3つの研究を実施し以下のような優れた成果を挙げている。</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1) D-マンノース/L-ガラクトース経路の構成酵素 GDP-L-ガラクトースホスホリラーゼをコードする <i>VTC2</i> と <i>VTC5</i> 遺伝子の発現解析：この研究ではアスコルビン酸生合成の光調節機構に関して、2つの相同遺伝子 <i>VTC2</i> と <i>VTC5</i> に着目し、両遺伝子プロモーターの光応答性についてルシフェラーゼをレポーターとした実験系を構築し、同遺伝子が日周変動性を示すこと、光強度にも応じて転写レベルを調節していることを示し、アスコルビン酸生合成の光制御に同遺伝子が鍵であることを明確に証明した。また <i>VTC2</i> 遺伝子の光応答に関わるプロモーター領域のシスエレメントについても解析を進め、-40~-70の領域に関連シス因子が存在することを突き止めた。また生理機能未知の <i>VTC5</i> 遺伝子について、発芽直後の子葉において <i>VTC2</i> 遺伝子と相補性を示すことでアスコルビン酸レベルの維持に貢献し得ることを変異体の解析から初めて明らかにしている。</li><li>2) アスコルビン酸応答遺伝子の包括的解析：アスコルビン酸に応答し機能している遺伝子の探索と解析を目的に、本項ではシロイヌナズナアスコルビン酸欠乏変異体 <i>vtc2-1</i> に対して、アスコルビン酸生合成前駆体 L-ガラクトノラクトンを与えることで、葉中アスコルビン酸レベルを野生株レベルまで増加させ、マイクロアレーにより発現遺伝子を調べている。顕著に発現上昇した14遺伝子を対象に、定量的PCR法等でさらに絞込みを進め、最終的にアスパラギン酸プロテアーゼと C3HC4 型 RING-Zn フィンガータンパク質をコードする2つの遺伝子がアスコルビン酸応答性を有していることを見出した。C3HC4 型 RING-Zn フィンガータン</li></ol>	

パク質遺伝子については、ゲノムから単離したプロモーターとルシフェラーゼの融合遺伝子を用いた解析からも、アスコルビン酸応答性を明確に証明している。今回同定した2つの遺伝子はいずれも細胞周期調節や生育に関連する可能性が指摘されており、これら遺伝子発現を介してアスコルビン酸が細胞周期調節や生育に関与することを初めて提唱している。

- 3) L-ガラクトノラクトンに応答する新奇遺伝子の機能解析：本項では、上記の2)項とも関連して、L-ガラクトノラクトン投与によりスクリーニングした14遺伝子のうち、機能未知でありながらガラクトース結合ドメインを有する2つの相同遺伝子が存在したことから、これら2遺伝子に着目しアスコルビン酸に対する応答性や生理機能について解析・検討を進めている。DGR1とDGR2と名付けられた遺伝子は、アスコルビン酸に対して応答せず、L-ガラクトノラクトンに対してのみ特異的に発現応答することが示された。また、シロイヌナズナのDGR1とDGR2に対するT-DNA挿入変異体は、野生株と比較して葉中アスコルビン酸レベルに有意な違いが観察されなかったことから、DGR1とDGR2はアスコルビン酸生合成調節とは無関係であると結論されている。しかし、DGR2のT-DNA挿入変異体では、発芽直後から矮小の表現型を示すこと、 $\beta$ -グルクロニダーゼを指標にしたDGR1およびDGR2タンパク質の組織局在性の検討から、DGR1は根端の分裂組織でDGR2は根端以外の全体に渡って発現が認められたことから、DGR1とDGR2は細胞壁においてラムノガラクトツロナンの構成等に関与している可能性を示唆している。

上記の成果は、学術論文として国際専門誌 *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (1項) および *Journal of Experimental Botany* (2項) にそれぞれ受理および掲載されていることから、客観的にも得られた成果が学術的に評価されたと判断できる。また3項もすでに学術論文として国際誌に投稿済みである点も評価できる。Gao氏は、口頭発表においても得られた成果をその背景から明晰に述べるとともに、審査委員の質問に対してもすべて明確に回答していた。

以上の結果から、審査委員全員一致して高氏の提出した論文は学術的価値が高く、博士の学位を授与するのに相応しいと評価した。