

氏名	田中 小百合
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5167号
学位授与の日付	平成27年 3月25日
学位授与の要件	環境生命科学研究科 農生命科学専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	オオムギ由来 Nudix hydrolase 遺伝子の発現と機能に関する研究
論文審査委員	准教授 杉本 学 教授 坂本 亘 教授 平山 隆志

## 学位論文内容の要旨

14 種類のオオムギ由来 Nudix hydrolase (HvNUDX) 遺伝子の探索、分類、ストレス応答、UV-C で発現量が増加する HvNUDX の構造と機能解析を行った。

### 1. オオムギ由来 Nudix hydrolase 遺伝子の同定と分類

シロイヌナズナに存在する 28 種類の NUDX アミノ酸配列と相同性を示すオオムギ由来遺伝子を BLAST 検索したところ、約 40-67%の相同性を示し、Nudix motif をコードする 14 種類の遺伝子を同定した。HvNUDX は 7 つの既知サブファミリーと 3 つの基質特異性未知のサブファミリーに分類された。また、ミナトカモジグサ、イネには AtNUDX と相同性を示したり Nudix motif をもつタンパク質をコードする遺伝子がそれぞれ 19、23 種類存在した。以上の結果、植物では NUDX の種類や機能が異なることを示唆した。

### 2. オオムギ由来 Nudix hydrolase 遺伝子のストレス応答解析

非生物的ストレス (UV-C、塩、乾燥) 下におけるオオムギ幼芽の HvNUDX の発現量の変化を解析した結果、7 種類の HvNUDX (HvNUDX1、2、6、7、11、12、13) と 4 種類の HvNUDX (HvNUDX6、7、12、14) がそれぞれ乾燥と UV-C で有意に発現が増加した。波長の異なる紫外線 (UV-A、-B、-C) をオオムギ幼芽に照射したところ、UV-A では HvNUDX4、UV-B では HvNUDX4、6、UV-C では、HvNUDX6、7、12、14 が発現増加し、このうち HvNUDX7、12、14 が UV-C 特異的に応答した。以上の結果、HvNUDX は紫外線の種類によって応答性が異なることを明らかにした。

### 3. UV-C で誘導されるオオムギ由来 Nudix hydrolase 遺伝子のクローニングと機能解析

HvNUDX6、7、12、14 の基質特異性を検討した。このうち HvNUDX12 の加水分解活性が最も高く酸化ヌクレオチド、ADP-ribose、dNTP、アデノシン四リン酸あるいはポリリン酸 (AP<sub>4</sub>A、AP<sub>n</sub>A) に対して活性を示し、幅広い基質特異性を有することが明らかとなった。HvNUDX12 の 8-oxo-deoxyguanosine 5'-triphosphate (8-oxo-dGTP) 加水分解活性の V<sub>max</sub> 値は ADP-ribose に比べ約 10 倍高いことから HvNUDX12 は主として、8-oxo-dGTP を加水分解することが推定された。また、HvNUDX12 遺伝子を導入した大腸菌では転写エラーが抑制された。

### 4. HvNUDX12 の基質特異性発現に関与するドメイン

HvNUDX12 の ADP-ribose pyrophosphatase で保存される 81 番目プロリン残基がアラニン残基となる変異酵素と、HvNUDX12 と AtNUDX26 の N 末端と C 末端を置換したキメラ酵素を構築し、基質特異性を検討した。HvNUDX12 の 81 番目プロリン残基は ADP-ribose 加水分解活性に重要ではないが、guanosine-3', 5'-tetrphosphate (ppGpp) 加水分解活性に関与していること、さらに HvNUDX12 の C 末側領域構造は 8-oxo-dGTP、AP<sub>4</sub>A、AP<sub>5</sub>A、ppGpp 加水分解活性に重要であることを明らかにした。

本研究により、植物には多様な NUDX が存在し環境ストレスに対する発現応答が異なること、同じサブファミリーに分類される NUDX であっても植物種の違いにより基質特異性や構造が異なること、植物が有する NUDX は環境ストレス耐性に関与する可能性について示唆することができた。

## 論文審査結果の要旨

ヌクレオシド-2-リン酸類縁体を加水分解するNudix hydrolase (NUDX) は、細胞内における毒性分子、シグナル分子、補酵素の濃度調節する役割を担う。NUDXは細菌からヒトまで広く分布し、多種多様な機能について報告されているが、植物における多様性、ストレス応答、機能についてはシロイヌナズナやキクに限られる。本研究は、オオムギ由来NUDXの多様性を明らかにし、その構造と機能について解析したものである。28種類のシロイヌナズナ由来NUDXのアミノ酸配列をもとに、Nudix motifをコードする14個のオオムギ由来NUDX (HvNUDX) 遺伝子を推定した。HvNUDXは7つの既知サブファミリーに分類されるもののほかに3つの基質特異性未知サブファミリーを形成すること、酸化ヌクレオチド8-oxo-dGTPを唯一分解するシロイヌナズナ由来AtNUDX1と相同性を示すものが無いことを明らかにした。非生物学的ストレスに曝露したオオムギ幼芽では、UV-A、UV-B、UV-C、乾燥によりそれぞれ1、2、4、7種類のHvNUDX遺伝子の発現量が有意に増加し、同じサブファミリーに属するものであってもストレス応答性が異なることを明らかにした。UV-Cで発現量が増加する4種類のHvNUDX遺伝子を大腸菌で発現させて精製酵素の酵素科学的諸性質を解析し、ジアデノシン4リン酸pyrophosphohydrolaseサブファミリーのHvNUDX12は、8-oxo-dGTPとADP-riboseを加水分解し、それぞれの至適pHが8.5と9.5であること、8-oxo-dGTP に対する  $V_{max}$  はADP-riboseの約10倍であること、*in vivo*転写エラー修復能を有する事を明らかにした。ADP-ribose pyrophosphohydrolaseサブファミリーで保存され活性残基とされている81番目プロリン残基をアラニン残基にした変異酵素を構築した結果、プロリン残基はADP-ribose 加水分解活性に重要では無く guanosine-3', 5' - tetraphosphate (ppGpp) 加水分解に関与していることを明らかにした。HvNUDX12と66%相同性を示すがADP-ribose加水分解能と *in vivo*転写エラー修復能を有しないシロイヌナズナ由来AtNUDX26とHvNUDX12のN末領域とC末領域をそれぞれ置換したキメラ酵素を構築した結果、HvNUDX12のC末領域が8-oxo-dGTPとppGpp加水分解活性に重要であることを明らかにした。

以上の研究成果は、オオムギには多様な NUDX 遺伝子が存在し環境ストレスに対する発現応答が異なること、同じサブファミリーに分類される NUDX であっても植物種の違いにより基質特異性や構造が異なること、オオムギが有する NUDX は環境ストレス耐性に関与する可能性について明らかにするとともに、植物における NUDX の多様性や機能を解明する上で重要な知見であり、博士（農学）学位に値すると判定した。