

論文審査結果の要旨

福田漢生のクロマグロの群行動の発達過程とそのメカニズムに関する研究に関する論文は、クロマグロの仔稚魚期における群行動の発達過程を、群の特徴の行動学的解明、組織生理学的手法を用いた視覚の機能解析、システム工学的手法を応用した魚群の行動決定要因解析のそれぞれを統合したアプローチで明らかにしたものである。クロマグロは、初期生活史情報に乏しい魚種であり、ここで得られた本種の行動記録は、本種の初期行動生態に関する重要な知見である。

本研究結果から、本種の群形成は、流体力学的な環境が粘性力の支配的な環境から慣性力が支配的となる環境へと遷移する時期に、その遷移への適応として巡航遊泳を開始する際に発現することが示された。これは、魚類の群形成の発現に関して、視覚や脳神経系のみでなく、魚体サイズや遊泳力も関わることを示した重要な報告である。

また、孵化後25-55日齢の間の成長に伴う視覚の機能発達によって、本種が夜間や水深100m以深のような暗い環境であっても視覚に依存した群行動が可能になることが示唆された。

これらの研究成果と、既存の報告にある本種の行動に関する断片的な報告は、良く一致しており、本研究成果が本種の初期生態を明らかにしていることが裏付けられている。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。なお審査にあたっては、論文に関する専攻内の審査および博士論文発表会などの所定の手続きを経たうえ、平成22年2月9日、研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。

氏名	石川和也
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	農第139号
学位授与の日付	平成22年3月23日
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当
学位論文題目	Physiological roles of Arabidopsis ADP-ribose/NADH pyrophosphohydrolase (AtNUDX2, 6, and 7) in biotic and abiotic stress responses 生物的／非生物的ストレス防御応答におけるシロイヌナズナ ADP-ribose/NADH pyrophosphohydrolase (AtNUDX2, 6, 7) の生理的役割
論文審査委員（主査）	教授 重岡 成
（副主査）	教授 角田 幸雄
（副主査）	教授 深溝 慶

## 論文内容の要旨

### 緒論

Nudix hydrolase (NUDX) は、nudixモチーフと呼ばれる特徴的なアミノ酸配列 (GX<sub>2</sub>EX<sub>2</sub>REVXEEEXGU; イソロイシン、ロイシン、バリン) を有するヌクレオシド2リン酸類縁体 (nucleoside diphosphate linked to some other moiety X) に対して加水分解活性を持つタンパク質ファミリーである。NUDXはウイルスからヒトにいたる多種の生物に存在しており、ゲノムデータベースには360種以上の生物から2500を超えるopen reading frameが存在する。これまでに、*Escherichia coli*には13種類、*Bacillus cereus*には26種類、*Saccharomyces cerevisiae*には7種類、*Homo sapiens*には22種類、*Arabidopsis thaliana*には28種類存在することが報告されている。本酵素ファミリーは、突然変異の原因となる8-oxo-dGTPや2-OH-dATPなどの酸化ヌクレオチド、代謝中間体およびシグナル分子であるADP-riboseなどの糖ヌクレオチドや diadenosine polyphosphate (Ap<sub>2</sub>A)、補酵素として機能するNADHやcoenzyme A (CoA)などを基質とするサブファミリーに分類される。また、ジホスホインソントールポリリン酸やチアミンポリリン酸などの非ヌクレオチド分子を基質とするNUDXの存在も明らかになっている。これらの基質は潜在的な細胞毒性物質、もしくは細胞のシグナル分子や代謝中間体であることから、本酵素ファミリーは生体内においてそれらの加水分解を介して様々な代謝に密接に関与しているため、個々の生物が有するNUDXの総数は当該生物の代謝能力や適応力を反映していると考えられている。

これまでに、動物や微生物における種々のNUDXの生化学的および分子的特性が明らかにされている。種々のストレスによって生じた活性酸素種 (ROS) により生じるDNAやRNAの突然変異の防御には、酸化ヌクレオチドを基質とするNUDXサブファミリー、すなわち大腸菌 MutTやそのホモログであるヒト MTH1やNUDT5が機能している。それらは変異源となる酸化ヌクレオチド [8-oxo-(d)GTPや2-OH-(d)ATP] を加水分解することで、酸化ヌクレオチドのDNAやRNAへの蓄積を未然に回避している。また、好熱菌 (*Thermus thermophilus* HB8) のNdx8は、アラーム (警告物質) でありRNAポリメラーゼの活性制御に機能するグアノシン4リン酸の加水分解を介して、栄養制限時の細胞増殖制御に機能している。

さらに、大腸菌、酵母および哺乳動物から、ADP-ribose、NADH、Ap<sub>2</sub>A、およびCoAを基質とするNUDXの存在も多数報告されている。興味深いことに、ヒトのTransient receptor potential melastatin-related channel 2 (TRPM2) はNUDX相同配列を有するCa<sup>2+</sup>チャネルの一つである。TRPM2は、ADP-riboseに反応して細胞質へのCa<sup>2+</sup>流入を引き起こすことで、細胞死の制御に関与していると考えられている。しかし、ほとんどのNUDXサブファミリーの生理機能については不明な点が多く残されており、特に植物NUDXについてはほとんど研究が行われていないのが現状であった。

その様な状況下で当研究室では、高等植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) におけるNUDX (AtNUDX) の機能解析を進めてきた。シロイヌナズナには28種類のNUDX相同遺伝子 (AtNUDX1-27, AtDCP2) が存在し、推定アミノ酸配列から、細胞質 (AtNUDX1-11 および 25)、ミトコンドリア (AtNUDX12-18) および葉緑体 (AtNUDX19-24, 26 および 27) に局在すると推測されている (*J. Biol. Chem.*, 2005, 280: 25277-83)。それらの中で、これまでにAtNUDX1は8-oxo-(d)GTPを基質とし、細胞質ヌクレオチドプールを浄化することで、DNAやRNAの突然変異を防いでいることを明らかにした (*Plant Cell Physiol.*, 2007, 48: 1438-49)。また、AtDCP2はmRNA 5'-cap分解 (デキャッピング) 酵素であり、mRNAのターンオーバーの制御に関与していることが明らかになっている。しかしながら、その他のAtNUDXの分子特性および生理機能については不明なままであった。

注目すべき点は、これら多くのAtNUDX (AtNUDX2, 5, 6, 7, 8, 14, 19, 23 および 25) には、nudxモチーフに加え、ADP-riboseおよびNADHの加水分解に関わる保存配列 [nudxモチーフの15もしくは16アミノ酸残基下流のプリン、SQX<sub>2</sub>WPXPXS (e.g. SQPWPEPQS) および motif 4] が存在することであり、高等植物におけるADP-ribose/NADH加水分解活性を有するNUDX (ADP-ribose/NADH pyrophosphohydrolase) の重要性が示唆される。そこで本研究では、シロイヌナズナADP-ribose/NADH pyrophosphohydrolaseに焦点を当て、それらの分子特性および生理機能を明らかにすることを目的とした。

### 1) シロイヌナズナにおける細胞質およびオルガネラ局在型 ADP-ribose/NADH pyrophosphohydrolaseの分子特性

ADP-ribose/NADH pyrophosphohydrolase活性を有するAtNUDXを同定するために、大腸菌によるリコンビナントタンパク質を用いた基質特異性の解析を行った。その結果、AtNUDX2, 6 および 7 は、ADP-ribose および NADH に対して高い加水分解活性を示した。一方、AtNUDX10, 14 および 23 は ADP-ribose に対してのみ活性を示した。反応速度理論的解析の結果、AtNUDX2, 6, 7, 10, 14 および 23 の

ADP-ribose に対する  $K_m$  値はそれぞれ  $16.9 \pm 2.3$ ,  $23.0 \pm 0.9$ ,  $23.2 \pm 6.3$ ,  $27.4 \pm 2.1$ ,  $13.1 \pm 0.7$ ,  $387.0 \pm 75.9 \mu\text{M}$ 、AtNUDX2, 6 および 7 の NADH に対する  $K_m$  値は  $22.3 \pm 1.1$ ,  $13.7 \pm 0.4$ ,  $37.2 \pm 5.3 \mu\text{M}$  であった。

次に、GFP 融合タンパク質を用いてオルガネラ局在と推定されるAtNUDX14 および 23 の細胞内局在性について解析を行った。その結果、両タンパク質はどちらも葉緑体に局在することが明らかになった。

これまでに、遊離 ADP-ribose は DNA 修復、細胞死、細胞周期およびストレス応答など、多くの重要な生体反応の制御に関与する poly(ADP-ribosylation) (PAR) 反応とその分解経路によって生成されることが明らかになっている。PAR 反応は様々な内因性および外因性のストレスによる DNA 損傷に反応し、NAD<sup>+</sup>を基質として poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) によって引き起こされるタンパク質の転写後調節機構であり、多くの細胞内代謝の制御に機能していると考えられている。遊離 ADP-ribose は、poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) により PAR 化されたタンパク質から、もしくは cyclic ADP-ribose や NAD<sup>+</sup>からの分解により生成される。しかし、遊離の ADP-ribose は非常に反応性が高く、非特異的なタンパク質の mono ADP-ribosylation に起因した細胞傷害の原因となる。さらに、PARP の過剰な活性化は基質である NAD<sup>+</sup>および ATP を枯渇させ、細胞死を誘導することが知られている。一方、高エネルギー含有生体分子の一つである NADH は、還元力として様々な種類の酵素の補酵素として働くとともに、ROS 代謝機構においても主要な電子供与体として機能する。したがって、細胞内 NADH : NAD<sup>+</sup> のレドックス比は同化/異化のバランスおよびレドックス状態の制御に重要な役割を果たしている。

そこで、植物細胞内での ADP-ribose および NADH 代謝の生理的意義を明らかにするために、細胞質局在型 AtNUDX2, 6 および 7 の生理機能について解析を行った。

### 2) シロイヌナズナ ADP-ribose pyrophosphohydrolase, AtNUDX2, の過剰発現による酸化ストレス耐性への向上

AtNUDX2 および PAR およびその分解反応に関与する 3 種類の PARP (PARP1, 2, putative PARP) と 2 種類の PARG (TEJ, putative PARG) の種々の酸化ストレスに対する発現応答性をリアルタイム PCR により解析した。その結果、AtNUDX2, PARP および PARG は、光依存的な ROS 発生剤であるバラコート (PQ; 3  $\mu\text{M}$ )、塩 (250 mM NaCl)、乾燥ストレスに対して顕著に発現誘導された。これらのことから、AtNUDX2 および PAR が酸化ストレス応答/防御に深く関与していることが示唆された。

次に、AtNUDX2 過剰発現株 (*Pro335:AtNUDX2*) および発現抑制株 (*RNAi-AtNUDX2*) の作出を行った。その結果、転写レベルでの *AtNUDX2* の発現量がコントロール株と比較してそれぞれ 3-27 倍および 0.7-0.8 倍に変化した形質転換体が得られた。*Pro335:AtNUDX2* および *RNAi-AtNUDX2* では、NADH pyrophosphohydrolase 活性に変化は認められず、ADP-ribose pyrophosphohydrolase 活性のみそれぞれ増加および減少していた。これら形質転換体のストレス耐性を検討した結果、*RNAi-AtNUDX2* はコントロール株と比較して有意な差は見られなかったが、*Pro335:AtNUDX2* はコントロール株と比較して塩および PQ による酸化ストレスに対する耐性への向上が認められた。また、通常条件下での *Pro335:AtNUDX2* および *RNAi-AtNUDX2* における NADH 量は、コントロール株と比較して差が認められなかったが、*Pro335:AtNUDX2* における ADP-ribose 量は減少していた。さらに、コントロール株では PQ による酸化ストレス下での PAR 活性の上昇に伴う ADP-ribose の蓄積、NAD<sup>+</sup> および ATP の減少が認められたが、*Pro335:AtNUDX2* ではどちらも顕著に抑制されていた。一方、*RNAi-AtNUDX2* では酸化ストレス下での ADP-ribose の蓄積が認められた。

以上のことから、AtNUDX2 は ADP-ribose を生理的基質とし、酸化ストレスによる PAR 反応の活性化により生成する ADP-ribose 代謝によるヌクレオチドリサイクルに機能することで酸化ストレス耐性に寄与することが示された。

### 3) シロイヌナズナ ADP-ribose/NADH pyrophosphohydrolase, AtNUDX7, による poly(ADP-ribosylation) 反応制御の酸化ストレス耐性への寄与

次に、シロイヌナズナに複数存在する ADP-ribose/NADH pyrophosphohydrolase の生理的意義を明らかにするために、AtNUDX2 と同様の酵素的性質を有する AtNUDX7 の機能解析を行った。

まず、AtNUDX7 の種々のストレスに対する発現応答性をリアルタイム PCR により解析した。その結果、AtNUDX7 は PQ 処理、塩、乾燥、および強光ストレスに対して顕著な発現誘導が認められた。このことから、AtNUDX7 は AtNUDX2 同様に酸化ストレス応答/防御に深く関与していることが示唆された。

## 論文審査結果の要旨

次に、*AtNUDX7* の発現量が転写レベルで 1.7-5.6 倍に上昇した *AtNUDX7* 過剰発現株 (*Pro335:AtNUDX7*)、および T-DNA 挿入により *AtNUDX7* の発現が完全に抑制された遺伝子破壊株 (*KO-nudx7*) を作出した。*Pro335:AtNUDX7* および *KO-AtNUDX7* では、ADP-ribose/NADH pyrophosphohydrolase 活性がそれぞれ増加および減少していた。*Pro335:AtNUDX7* はコントロール株と比較して PQ による酸化ストレス耐性が向上し、*KO-nudx7* は酸化ストレス感受性を示した。また、通常および酸化ストレス下において *Pro335:AtNUDX7* では ADP-ribose および NADH の減少、および酸化ストレス下における NAD<sup>+</sup> および ATP の減少の抑制が認められた。一方、*KO-nudx7* では通常および酸化ストレス下において ADP-ribose、NADH、NAD<sup>+</sup> および ATP が蓄積していた。注目すべきことに、通常および酸化ストレス下において *Pro335:AtNUDX7* および *KO-nudx7* では、それぞれ PAR 活性の上昇および減少が認められた。

これまでに、PAR 反応は DNA の酸化的損傷にตอบสนองした修復機構の制御に機能することが報告されている。そこで、*AtNUDX7* が DNA 一本鎖損傷の修復因子 (*AtXRCC1*)、DNA 相同組換え修復因子 (*AtRAD51*、*AtDMC1*、*AtXRCC2*、*AtXRCC3* および *AtMND1*) の発現に及ぼす影響をリアルタイム PCR により解析した。その結果、通常および酸化ストレス下における *AtXRCC1* および *AtXRCC2* の発現量は、*AtNUDX7* の発現量および PAR 活性と正の相関関係を示した。一方、*AtRAD51*、*AtDMC1*、*AtXRCC3* および *AtMND1* の発現量は負の相関関係を示した。

次に、PARP 阻害剤 (3-aminobenzamide : 3-AB) を用いて PAR 反応と酸化ストレス耐性との関連性を検討した。シロイヌナズナ野生株を 3-AB 処理することにより、PAR 活性の減少および PQ による酸化ストレス耐性低下が認められた。また、NAD<sup>+</sup> および ATP 量は 3-AB 処理により蓄積したが、NADH 量には差は認められなかった。さらに、3-AB 処理により *AtXRCC1* および *AtXRCC2* の発現量の減少、および *AtRAD51*、*AtDMC1*、*AtXRCC3* および *AtMND1* の発現量の増加が認められた。これらのことから、酸化ストレス下における NAD<sup>+</sup> および ATP の代謝に PAR 反応が大きく寄与していること、および DNA の酸化損傷に対する修復機構は PAR 反応によって制御されていることが示された。

以上より、*AtNUDX7* は ADP-ribose および NADH の両方を生理的基質とし、PAR 反応により生成する ADP-ribose 代謝によるヌクレオチドリサイクルだけでなく、NADH 代謝による PAR 反応を介した DNA 酸化損傷修復機構の制御に関与していることが示された。

#### 4) シロイヌナズナ NADH pyrophosphohydrolase (*AtNUDX6*) による NPR1 依存的サリチル酸シグナリングの制御

*AtNUDX6* は、*AtNUDX2* および 7 と同様の酵素学的性質を有する。まず、*AtNUDX6* の発現応答性をリアルタイム PCR により解析を行った。その結果、*AtNUDX6* の発現は種々の酸化ストレス (強光、乾燥、PQ、塩) ではなく、病原菌感染に対する植物独自の獲得免疫機構 (全身獲得抵抗性) に重要な植物ホルモンであるサリチル酸 (SA; 0.5 mM) 処理により顕著に誘導された。そこで、転写レベルで *AtNUDX6* の発現量が 10-23 倍に上昇した過剰発現株 (*Pro335:AtNUDX6*) および T-DNA 挿入による遺伝子破壊株 (*KO-nudx6*) を作出した。*Pro335:AtNUDX6* および *KO-AtNUDX6* では、ADP-ribose pyrophosphohydrolase 活性に変化は認められず、NADH pyrophosphohydrolase 活性のみそれぞれ増加および減少していた。*Pro335:AtNUDX6* および *KO-nudx6* における ADP-ribose 量は、通常条件下において差が認められなかったが、NADH 量は通常および SA 処理下でそれぞれ蓄積および減少していた。また、*KO-nudx6* ではコントロール株と比較して SA 処理下における NADH pyrophosphohydrolase 活性の上昇が顕著に抑制されていた。興味深いことに、*Pro335:AtNUDX6* および *KO-nudx6* における病原菌感染応答のマスター制御因子、Nonexpressor of Pathogenesis-Related genes 1 (NPR1) 依存的な SA 誘導遺伝子 (*PR1*、*WRKY70*、*NIMIN1* および *NIMIN2*) の発現量は、通常および SA 処理下で顕著に上昇および抑制されていたが、NPR1 非依存的 SA 誘導遺伝子の発現量には有意な差は見られなかった。さらに、NPR1 の酸化還元制御による活性化に関与するチオレドキシ (*TRX-h5*) の発現量は、*Pro335:AtNUDX6* および *KO-nudx6* においてそれぞれ顕著に上昇および抑制されていた。また、NPR1 によるフィードバック制御を受ける SA 生合成酵素遺伝子、*isochlorisinate synthase 1 (ICS1)* の発現量は、*Pro335:AtNUDX6* および *KO-nudx6* においてそれぞれ減少および増加していた。さらに、*KO-nudx6* では種子発芽時における SA 感受性が増加していた。

以上より、*AtNUDX6* は *AtNUDX2* および 7 とは異なり NADH のみを生理的基質とし、NADH の代謝調節による TRX-h5 の発現制御を介した NPR1 依存的 SA シグナリング経路の制御により、病原菌感染に対する獲得免疫機構に関与することが示された。

Nudix hydrolase (NUDX) は、nudix モチーフと呼ばれる特徴的なアミノ酸配列 (GX<sub>2</sub>EX<sub>2</sub>REVX<sub>2</sub>EXGU, U; イソロイシン、ロイシン、バリン) を有するヌクレオシド-2 リン酸類縁体 (nucleoside diphosphate linked to some other moiety X) に対して加水分解活性を持つタンパク質ファミリーである。本酵素ファミリーは、突然変異の原因となる 8-oxo-dGTP などの酸化ヌクレオチド、代謝中間体およびシグナル分子である ADP-ribose などの糖ヌクレオチドや diadenosine polyphosphate、補酵素として機能する NADH や coenzyme A、また、ジホスホイノシトールポリリン酸などの非ヌクレオチド分子を基質とするが明らかになっている。これらの基質は潜在的な細胞毒性物質、もしくは細胞のシグナル分子や代謝中間体であることから、本酵素ファミリーは生体内においてそれらの加水分解を介して様々な代謝に密接に関与している。しかしながら、動物や微生物における種々の NUDX の生化学的および分子的特性は明らかにされていないが、ほとんどの NUDX サブファミリーの生理機能については明らかにされておらず、特に植物 NUDX についてはほとんど研究が行われていないのが現状であった。

高等植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) には 28 種類の NUDX 相同遺伝子 (*AtNUDX1-27*、*AtDCP2*) が存在し、推定アミノ酸配列から、細胞質 (*AtNUDX1-11* および 25)、ミトコンドリア (*AtNUDX12-18*) および葉緑体 (*AtNUDX19-24*、26 および 27) に局在すると推測されていた。それらの中で、*AtNUDX1* は 8-oxo-(d)GTP を基質とし、細胞質ヌクレオチドプールを浄化することで、DNA や RNA の突然変異を防いでいること、また、*AtDCP2* は mRNA 5'-cap 分解 (デキャッピング) 酵素であり、mRNA のターオーバーの制御に関与していることが明らかであった。しかしながら、その他の *AtNUDX* の分子特性および生理機能については不明なままであった。注目すべきことに、これら多くの *AtNUDX* (*AtNUDX2*、5、6、7、8、14、19、23 および 25) には、nudix モチーフに加え、ADP-ribose および NADH の加水分解に関わる保存配列が存在することから、高等植物における ADP-ribose/NADH 加水分解活性を有する NUDX (ADP-ribose/NADH pyrophosphohydrolase) の重要性が示唆された。

そこで本研究では、シロイヌナズナ ADP-ribose/NADH pyrophosphohydrolase に焦点を当て、それらの分子特性および生理機能について解析された。

#### 1) シロイヌナズナにおける細胞質およびオルガネラ局在型 ADP-ribose/NADH pyrophosphohydrolase の分子特性

ADP-ribose/NADH pyrophosphohydrolase 活性を有する *AtNUDX* を同定するために、大腸菌によるリコンビナントタンパク質を用いて基質特異性の解析を行った。その結果、*AtNUDX2*、6 および 7 は、ADP-ribose および NADH に対して、*AtNUDX10*、14 および 23 は ADP-ribose に対して高い活性を示した。また、オルガネラ局在と推定される *AtNUDX14* および 23 の細胞内局在性について解析した結果、両タンパク質はどちらも葉緑体に局在していた。そこで、植物細胞内での ADP-ribose および NADH 代謝の生理的意義を明らかにするために、細胞質局在型 *AtNUDX2*、6 および 7 の生理機能について解析された。

#### 2) シロイヌナズナ ADP-ribose pyrophosphohydrolase *AtNUDX2* の過剰発現による酸化ストレス耐性の向上

*AtNUDX2*、poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) および poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) は、光依存的な活性酸素発生剤であるパラコート (PQ; 3 μM)、塩 (250 mM)、乾燥ストレスに対して顕著に発現誘導されたことから、*AtNUDX2* および poly(ADP-ribosyl)ation (PAR) が酸化ストレス応答防御に深く関与することを見いだした。さらに、*AtNUDX2* 過剰発現株 (*Pro335:AtNUDX2*) のストレス耐性を検討した結果、コントロール株と比較して塩および PQ による酸化ストレスに対する耐性の向上が認められた。また、通常条件下での *Pro335:AtNUDX2* における NADH 量は、コントロール株と比較して差が認められなかったが、ADP-ribose 量は減少していた。さらに、コントロール株では PQ による酸化ストレス下での PAR 活性の上昇に伴う ADP-ribose の蓄積、NAD<sup>+</sup> および ATP の減少が認められたが、*Pro335:AtNUDX2* ではどちらも顕著に抑制されていた。よって、*AtNUDX2* は ADP-ribose を生理的基質とし、酸化ストレスによる PAR 反応の活性化により生成する ADP-ribose 代謝によるヌクレオチドリサイクルに機能することで酸化ストレス耐性に寄与することを明らかにした。

#### 3) シロイヌナズナ ADP-ribose/NADH pyrophosphohydrolase *AtNUDX7* による poly(ADP-ribosyl)ation 反応

**制御の酸化ストレス耐性への寄与**

AtNUDX7はPQ処理、塩、乾燥、および強光ストレスに対して顕著な発現誘導が認められた。このことから、AtNUDX7はAtNUDX2同様に酸化ストレス応答/防御に深く関与することを見いだした。AtNUDX7過剰発現株 (*Pro35S:AtNUDX7*)、およびT-DNA挿入による遺伝子破壊株 (*KO-nudx7*) は、コントロール株と比較してそれぞれPQによる酸化ストレス耐性能の向上、および、酸化ストレス感受性が認められた。通常および酸化ストレス下において *Pro35S:AtNUDX7* ではADP-riboseおよびNADHの減少が認められ、酸化ストレス下においてNAD<sup>+</sup>およびATPの減少が抑制していた。一方、*KO-nudx7* では通常および酸化ストレス下においてADP-ribose、NADH、NAD<sup>+</sup>およびATPが蓄積していた。さらに、通常および酸化ストレス下において *Pro35S:AtNUDX7* および *KO-nudx7* では、それぞれPAR活性が上昇および減少しており、また、*AtXRCC1* および *AtXRCC2* の発現量は、AtNUDX7の発現量およびPAR活性と正の相関関係を示したが、*AtRAD51*、*AtDMC1*、*AtXRCC3* および *AtMND1* の発現量は負の相関関係を示した。次に、PARP阻害剤 (3-aminobenzamide: 3-AB) を用いてPAR反応と酸化ストレス耐性との関連性を検討した結果、シロイヌナズナ野生株は3-AB処理によりPAR活性の減少およびPQによる酸化ストレス耐性能の低下を示した。また、NAD<sup>+</sup>およびATP量は3-AB処理により蓄積したが、NADH量に差は認められなかった。さらに、3-AB処理により *AtXRCC1* および *AtXRCC2* の発現量の減少、および *AtRAD51*、*AtDMC1*、*AtXRCC3* および *AtMND1* の発現量の増加が認められた。これらのことから、酸化ストレス下におけるNAD<sup>+</sup>およびATPの代謝にPAR反応が大きく寄与していること、およびDNAの酸化損傷に対する修復機構はPAR反応によって制御されていることを示した。

以上より、AtNUDX7はADP-riboseおよびNADHの両方を生理的基質とし、PAR反応により生成するADP-ribose代謝によるヌクレオチドリサイクルだけでなく、NADH代謝によるPAR反応を介したDNA酸化損傷修復機構の制御に関与していることを明らかにした。

**4) シロイヌナズナ NADH pyrophosphohydrolase (AtNUDX6) による NPR1 依存的サリチル酸シグナリングの制御**

*AtNUDX6* の発現は種々の酸化ストレスではなく、病原菌感染に対する植物独自の獲得免疫機構 (全身獲得抵抗性) に重要な植物ホルモンであるサリチル酸 (SA; 0.5 mM) 処理により顕著な発現誘導が認められた。*AtNUDX6* 過剰発現株 (*Pro35S:AtNUDX6*) および T-DNA 挿入による遺伝子破壊株 (*KO-nudx6*) におけるADP-ribose量は、通常条件下において差が認められなかったが、NADH量は通常およびSA処理下でそれぞれ減少および蓄積していた。また、*KO-nudx6* ではコントロール株と比較してSA処理下におけるNADH pyrophosphohydrolase活性の上昇が顕著に抑制されていた。さらに、*Pro35S:AtNUDX6* および *KO-nudx6* における病原菌感染応答のマスター制御因子、Nonexpressor of Pathogenesis-Related genes 1 (NPR1) 依存的なSA誘導遺伝子の発現量は、通常およびSA処理下で顕著に上昇および抑制されていたが、NPR1非依存的SA誘導遺伝子の発現量には有意な差は見られなかった。さらに、NPR1の酸化還元制御による活性化に関与するチオレドキシ (*TRX-h5*) の発現量は、*Pro35S:AtNUDX6* および *KO-nudx6* においてそれぞれ顕著に上昇および抑制されていた。また、NPR1によるフィードバック制御を受けるSA合成酵素遺伝子、*isochorismate synthase 1* の発現量は、*Pro35S:AtNUDX6* および *KO-nudx6* においてそれぞれ減少および増加していた。さらに、*KO-nudx6* では種子発芽時におけるSA感受性が増加していた。

以上より、AtNUDX6はAtNUDX2および7とは異なりNADHのみを生理的基質とし、NADHの代謝調節によるTRX-h5の発現制御を介したNPR1依存的SAシグナリング経路の制御により、病原菌感染に対する獲得免疫機構に関与することを明らかにした。

以上本論文は、植物におけるADP-ribose/NADH pyrophosphohydrolaseの分子特性について詳細に解析されている。さらに、細胞質局在型ADP-ribose/NADH pyrophosphohydrolase (AtNUDX2, 6, 7) の生理機能も明確にしている。これらの成果は、植物細胞内でのADP-riboseおよびNADH代謝の生理的意義の解明に大きく貢献した。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会などの所定の手続きを経たうえ、平成22年2月9日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。

氏名	もり した てる ゆき 森 下 輝 之
学位の種類	博士 (農学)
学位記番号	農 第 1 4 0 号
学位授与の日付	平成 22 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規程第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Mechanism of response to environment stress via ANAC078 transcription factor in Arabidopsis (シロイヌナズナの NAC 転写因子 ANAC078 を介した環境ストレス応答機構)
論文審査委員 (主査)	教授 重 岡 成
(副主査)	教授 内 海 龍 太 郎
(副主査)	教授 加 藤 容 子