

学 位 論 文 題 名

高等植物におけるクロロフィル *b* 蓄積調節の 役割と分子機構

学位論文内容の要旨

クロロフィル *b* は全ての高等植物が保持している、主要な光合成色素の 1 つです。クロロフィル *b* は光集光機能の他に、光合成の光集光アンテナのサイズの調節と密接に関わっている事が分かっています。そのため、クロロフィル *b* の蓄積量の調節は高等植物が様々な光環境に適応するのに重要です。葉緑体において、クロロフィル *b* はクロロフィリド *a* オキシゲナーゼ (CAO) によってクロロフィル *a* から合成されます。CAO の蓄積量は主に、クロロフィル *b* の量に依存したタンパク質レベルでの制御によって決定されています。そのため CAO タンパク質の蓄積制御機構を解明する事は、高等植物の光環境適応を考える上で重要です。高等植物の CAO のアミノ酸配列をアライメントした研究によって、CAO は 3 つのドメインからなることが明らかになっています (N 末端からそれぞれ A, B, C ドメインと呼ぶ)。そのうち C ドメインは触媒活性をもち、A ドメインは CAO の蓄積制御機構に関わっていることが明らかにされています。さらに、この CAO の蓄積制御機構には、葉緑体プロテアーゼの 1 つである Clp プロテアーゼが関わっている事が、遺伝学的研究から示されました。

この学位論文において私は、CAO タンパク質の蓄積制御機構の全容を解明するために、まず形質転換体の解析によって B ドメインの機能を明らかにする事を試みました。その結果、B ドメインは CAO タンパク質を安定化する機能をもっており、A ドメインと C ドメインが独立して構造を保つためのリンカーの役割を担っている事が予想されました。またこの結果により、CAO の 3 つのドメインのうち、CAO の蓄積制御機構に関わっているのは A ドメインだけである事がわかり、A ドメイン内に CAO の蓄積制御に関わる、つまり Clp プロテアーゼの degron 配列がある事が示唆されました (Sakuraba et al. 2007)。そこで次に A ドメイン内の degron 配列を形質転換体を用いた解析により同定しました。私はまず、A ドメインの N 末端から 10

アミノ酸残基ずつ削っていった CAO 遺伝子の C 末端に GFP を融合し、それらをシロイヌナズナに導入しました。完成した形質転換体について、共焦点顕微鏡やウエスタンブロットによる GFP 融合タンパク質の蓄積を解析したところ、A ドメインの N 末端から 50 アミノ酸残基削った形質転換体から、融合タンパク質の過剰な蓄積が見られ、さらにその過剰な蓄積によってクロロフィル *b* の合成量も劇的に増加していました。これらの結果から、A ドメインの 40～50 残基目の配列がシグナル配列である可能性が高いことが明らかになりました。このことを検証するために、次に、この 40～50 残基目の配列を A ドメインを除去した CAO 遺伝子に融合したところ、過剰に蓄積するはずのタンパク質の蓄積が抑制されていることが明らかになりました。これらのことからこの 10 アミノ酸残基の配列が単独で CAO の蓄積制御に関わり、Clp プロテアーゼ認識配列である可能性が高いことがわかりました。さらにこの 10 アミノ酸を GFP に融合したところ、GFP タンパク質の蓄積も抑制されていることが明らかになり、葉緑体内で一般的にタンパク質を制御する配列として働くことが明らかになりました。このようなタンパク質蓄積制御に関わる配列は葉緑体では見つかっておらず、本研究が初めての報告となります。

さらに私は、CAO の蓄積制御機構に異常をきたした EMS 変異体を 66 株単離し、それらの変異体の表現形解析を行い、7 つのグループに分類しました。それらの変異体の表現形が多岐にわたることから、CAO の蓄積制御機構には、さらに複数の因子が関わっている事が示唆されました。

私はまた、高等植物の成長過程におけるクロロフィル *b* の蓄積の影響を、シロイヌナズナのクロロフィル *b* 過剰蓄積株 (BC 株) を用いて解析しました。私はこの BC 株を様々な条件下で生育した結果、2 つの興味深い表現形を発見しました。まず 1 つ目は、BC 株は強光条件下で深刻な光障害を起こす事を発見しました。スペクトル解析の結果、光化学系 2 のエネルギー移動効率が野生株に比べ著しく低下している事がわかり、これによって BC 株では強光条件下において大量の活性酸素が発生している事がわかりました。またマイクロアレイによる遺伝子発現解析の結果、BC 株の強光条件下において、核の遺伝子発現に大きな変化が観察されました。活性酸素の一つである過酸化水素で誘導される遺伝子が、BC 株においても誘導されている事が分かりました。2 つ目として、BC 株は老化過程において顕著な老化遅延を起こす事を発見

しました。この老化遅延は、老化過程における核での遺伝子発現の変化によって引き起こされ、クロロフィルbの量の変化が老化過程における葉緑体と核の間のレトログレードシグナルに関係している事が示唆されました。このBC株における2つの現象は自然界で植物が繁栄して行くためには都合の悪い現象です。

以上の研究から、クロロフィルbの蓄積制御機構とその生理的役割を明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 歩

副 査 教 授 山 本 興太朗

副 査 教 授 内 藤 哲

学 位 論 文 題 名

高等植物におけるクロロフィル *b* 蓄積調節の 役割と分子機構

クロロフィル *b* は全ての高等植物が保持している主要な光合成色素の 1 つです。クロロフィル *b* は集光機能の他に、光合成の集光アンテナのサイズの調節と密接に関わっており、クロロフィル *b* の蓄積量の調節は高等植物が様々な光環境に適応するのに重要です。葉緑体において、クロロフィル *b* はクロロフィリド *a* オキシゲナーゼ (CAO) によってクロロフィル *a* から合成されます。CAO の蓄積量は主に、クロロフィル *b* の量に依存したタンパク質レベルでの制御によって決定されています。そのため CAO タンパク質の蓄積制御機構を解明する事は、高等植物の光環境適応を考える上で重要です。高等植物の CAO のアミノ酸配列をアライメントした研究によって、CAO は 3 つのドメインからなることが明らかになっています (N 末端からそれぞれ A, B, C ドメインと呼ぶ)。そのうち C ドメインは触媒活性をもち、A ドメインは CAO の蓄積制御機構に関わっていることが明らかにされています。さらに、この CAO の蓄積制御機構には、葉緑体プロテアーゼの 1 つである Clp プロテアーゼが関わっている事が、遺伝学的研究から示されました。

この学位論文において著者は、CAO タンパク質の蓄積制御機構の全容を解明するために、まず形質転換体の解析によって B ドメインの機能を明らかにする事を試みました。その結果、B ドメインは CAO タンパク質を安定化する機能をもっており、A ドメインと C ドメインが独立して構造を保つためのリンカーの役割を担っている事が予想されました。またこの結果により、CAO の 3 つのドメインのうち、CAO の蓄積制御機構に関わっているのは A ドメインだけである事がわかり、A ドメイン内に CAO の蓄積制御に関わる、つまり Clp プロテアーゼの degron 配

列がある事が示唆されました (Sakuraba et al. 2007)。そこで次に A ドメイン内の degron 配列を次のような形質転換体を用いた解析により同定しました。著者はまず、A ドメインの N 末端から 10 アミノ酸残基ずつ削っていった CAO 遺伝子の C 末端に GFP を融合し、それらをシロイヌナズナに導入しました。完成した形質転換体について、共焦点顕微鏡やウエスタンブロットによる GFP 融合タンパク質の蓄積を解析したところ、A ドメインの N 末端から 50 アミノ酸残基削った形質転換体で、融合タンパク質の過剰な蓄積が見られ、さらにその過剰な蓄積によってクロロフィル *b* の合成量も劇的に増加していました。これらの結果から、A ドメインの 40~50 残基目の配列がシグナル配列である可能性が高いことが明らかになりました。このことを検証するために、この 40~50 残基目の配列を A ドメインを除去した CAO 遺伝子に融合したところ、過剰に蓄積するはずのタンパク質の蓄積が抑制されていることが明らかになりました。これらのことからこの 10 アミノ酸残基の配列が単独で CAO の蓄積制御に関わり、Clp プロテアーゼ認識配列である可能性が高いことがわかりました。さらにこの 10 アミノ酸を GFP に融合したところ、GFP タンパク質の蓄積も抑制されていることが明らかになり、葉緑体内で一般的にタンパク質を制御する配列として働くことが明らかになりました。このようなタンパク質蓄積制御に関わる配列は葉緑体では見つかっておらず、本研究が初めての報告となります。

著者はまた、高等植物の成長過程におけるクロロフィル *b* の蓄積の影響を、シロイヌナズナのクロロフィル *b* 過剰蓄積株 (BC 株) を用いて解析しました。私はこの BC 株を様々な条件下で生育した結果、2 つの興味深い表現形を発見しました。まず 1 つ目は、BC 株は強光条件下で深刻な光障害を起こす事を見ました。スペクトル解析の結果、BC 株では光化学系 2 のエネルギー移動効率が野生株に比べ著しく低下しており、これによって強光条件下において大量の活性酸素が発生している事がわかりました。2 つ目として、BC 株は老化過程において顕著な老化遅延を起こす事を見ました。この BC 株における 2 つの現象は自然界で植物が繁栄して行くためには都合の悪い現象です。

以上の研究から、クロロフィル *b* の蓄積制御機構とその生理的役割を明らかにしました。よって著者は、北海道大学博士 (生命科学) の学位を授与される資格があるものと認めます。