

## 学位論文題名

シロイヌナズナの種子形成におけるクロロフィル $b$ 還元酵素の機能解析

## 学位論文内容の要旨

高等植物のクロロフィル代謝は主に葉で行われることが知られているが、登熟種子においても行われている。葉におけるクロロフィル合成と分解の研究は盛んに行われているが、登熟種子のクロロフィル代謝のうち、特にクロロフィル分解の生理的役割についてはほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、モデル植物であるシロイヌナズナを使用して、登熟種子におけるクロロフィル分解の生理的機能の解明を目的とした。

クロロフィル代謝経路は、クロロフィル合成経路、クロロフィルサイクル、クロロフィル分解経路の三つに分けることが出来る。その中のクロロフィルサイクルは、クロロフィル $a$ とクロロフィル $b$ の相互転換経路である。クロロフィルサイクルの中の、クロロフィル $b$ から7-ヒドロキシメチルクロロフィル $a$ への還元反応を触媒するのがクロロフィル $b$ 還元酵素である。シロイヌナズナにおいてクロロフィル $b$ 還元酵素は二種類存在することがわかっており、Non-Yellow-Coloring1 (NYC1)、NYC1-like (NOL) と呼ばれている。

このクロロフィル $b$ 還元酵素の変異体を使用して、まず種子のクロロフィル量を High performance liquid chromatography (HPLC) で測定した。その結果、*nyc1* 変異体と *nyc1/nol* 二重変異体において多量のクロロフィルが存在した。またこのクロロフィルが種子のどの部分に存在するのかを調べるためクロロフィル蛍光を観察した。クロロフィル蛍光は種皮では観察されず、胚で観察された。さらに共焦点顕微鏡で調べた結果も同様に、種皮ではなく、胚でクロロフィルのピークが検出され、よって変異体の種子に存在したクロロフィルは種皮ではなく胚にあることがわかった。またこのクロロフィルがどのような状態で存在するのかを、光化学系 I 反応中心複合体を構成するタンパク質である PsaA/B、光化学系 II 反応中心複合体を構成するタンパク質である D1、光化学系 II 反応中心複合体のアンテナタンパク質である Light-harvesting chlorophyll-protein complex II (LHCII) のそれぞれの抗体で western blotting 解析を行った。その結果、PsaA/B と D1 は検出されなかったが、LHCII はクロロフィルの存在した *nyc1* 変異体と *nyc1/nol* 二重変異体において検出された。よってこのことから、種子中のクロロフィルはアンテナタンパク質に結合しているものも存在することがわかった。

以上の結果より、クロロフィル $b$ 還元酵素欠損株である *nyc1/nol* 二重変異体の種子にクロロフィルが存在することがわかったので、この種子を使ってクロロフィルと発芽の関係を調べた。まず採種直後の新しい *nyc1/nol* 二重変異体の種子のクロロフィル蛍光の有無で分け、発芽の様子を調べた。野生株と比較したところ、*nyc1/nol* 二重変異体は蛍光の有無

に関わらず、発芽が遅いことが分かった。さらにクロロフィル蛍光の有無で *nyc1/nol* 二重変異体を観察したところ、クロロフィル蛍光がない種子の発芽はクロロフィル蛍光がある種子の発芽より遅く、発芽率も悪いことが明らかとなった。さらに詳細に調べるため、保存期間の異なる種子の発芽率を調べたところ、野生株の種子は長期保存後も 8 割程度発芽したのに対し、*nyc1/nol* 二重変異体の種子は長期保存するとほぼ発芽しなくなることが明らかとなった。また長期保存前後で種子のクロロフィル量を測定した結果、野生株の種子は長期保存前後であまり変化はなく、ほとんどクロロフィルがなかった。しかし *nyc1/nol* 二重変異体は保存前に多量に存在したクロロフィルが、長期保存後ほとんど分解していることがわかった。発芽率にクロロフィル以外の因子が影響を与えていないかを調べるため、電子顕微鏡による種子の内部構造、タンパク質の量と組成、脂質の量と組成を調べた。野生株と *nyc1/nol* 二重変異体の種子の内部構造を比較したところ、*nyc1/nol* 二重変異体にのみ細かい小さな油体が確認された。脂質の量と組成、タンパク質の量と組成には、野生株と *nyc1/nol* 二重変異体で大きな差は見られなかった。よって以上の結果より、発芽率の保持には正常なクロロフィル分解が必要であることが明らかとなった。

ここでクロロフィル b 還元酵素である NYC1 のプロモーター配列に植物ホルモンであるアブシジン酸に反応すると推定される配列 (G-box 配列) が存在したことから、そしてアブシジン酸非感受性変異体 *abi3* の種子が緑色であることから、NYC1 とアブシジン酸の関係を調べた。まずアブシジン酸応答転写因子 ABF4 を使って gel shift 法を用いて NYC1 の G-box がアブシジン酸応答であるかを調べた。その結果、ABF4 と NYC1 の G-box が存在する時にだけ、両者が結合することが確認された。次に、*abi3* 変異体において NYC1 が抑制されているかどうかを Semiquantitative RT-PCR 法を用いて調べた。その結果、NYC1 は *abi3* において抑制されていることが確認された。以上より、NYC1 はアブシジン酸により発現制御されていることが示唆された。

これらの結果より、登熟過程の種子においてクロロフィル b 還元酵素はアブシジン酸により発現し、それによりクロロフィル分解が起こることが考えられた。そしてこのクロロフィル分解は発芽率の保持に重要であることが示唆された。

# 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 山 口 淳 二

学位論文題名

## シロイヌナズナの種子形成におけるクロロフィル *b* 還元酵素の機能解析

博士學位論文審査等の結果について（報告）

クロロフィル代謝経路や酵素の同定、制御機構に関しては大きな進歩を示しているが、代謝そのものの生理的な役割に関してはいまだ解明されていない。本研究は、モデル植物であるシロイヌナズナを用い、登熟種子におけるクロロフィル分解の生理的機能の解明を目的とした。

クロロフィル *b* から 7-ヒドロキシメチルクロロフィル *a* への還元反応を触媒するのがクロロフィル *b* 還元酵素である。シロイヌナズナにおいてクロロフィル *b* 還元酵素は二種類存在することがわかっており、Non-Yellow-Coloring1 (NYC1)、NYC1-like (NOL) と呼ばれている。これらのクロロフィル *b* 還元酵素の変異体を使用して、まず種子のクロロフィル量を測定した。その結果、*nyc1* 変異体と *nyc1/nol* 二重変異体において多量のクロロフィルが存在した。またこのクロロフィルが種子のどの部分に存在するのかを調べるためクロロフィル蛍光を観察した。その結果、クロロフィルは種皮ではなく胚にあることがわかった。またこのクロロフィルがどのような状態で存在するのかを明らかにするため、PsaA/B、D1、光 Light-harvesting chlorophyll-protein complex II (LHCII) のそれぞれの抗体で western blotting 解析を行った。その結果、PsaA/B と D1 は検出されなかったが、クロロフィルの存在した変異体において LHCII が検出された。このことから、種子中のクロロフィルは LHCII に結合していることがわかった。

以上の結果より、クロロフィル *b* 還元酵素欠損株である *nyc1/nol* 二重変異体の種子にクロロフィルが存在することがわかったので、この種子を使ってクロロフィルと発芽の関係を調べた。まず採種直後の新しい *nyc1/nol* 二重変異体の種子をクロロフィル蛍光の有無で分け、発芽の様子を調べた。野生株と比較したところ、*nyc1/nol* 二重変異体は発芽が遅いことが分かった。さらにクロロフィル蛍光の有無で *nyc1/nol* 二重変異体を分け、それぞれ

の発芽を観察したところ、クロロフィル蛍光がない種子の発芽はクロロフィル蛍光がある種子の発芽より遅く、発芽率も悪いことが明らかとなった。さらに詳細に調べるため、保存期間の異なる種子の発芽率を調べたところ、野生株の種子は長期保存後も 8 割程度発芽したのに対し、*nyc1/nol* 二重変異体の種子は長期保存するとほぼ発芽しなくなることが明らかとなった。また長期保存前後における種子のクロロフィル量を測定した結果、野生株の種子ではあまり変化はなく、いずれもほとんどクロロフィルがなかった。しかし *nyc1/nol* 二重変異体では、保存前に多量に存在したクロロフィルが、長期保存後にほとんど分解していることがわかった。発芽率にクロロフィル以外の因子が影響を与えていないかを調べるため、電子顕微鏡による種子の内部構造、タンパク質の量と組成、脂質の量と組成を調べた。野生株と *nyc1/nol* 二重変異体の種子の内部構造を比較したところ、*nyc1/nol* 二重変異体にのみ細かい小さな油体が確認された。脂質の量と組成、タンパク質の量と組成には、野生株と *nyc1/nol* 二重変異体で大きな差は見られなかった。以上の結果より、発芽率の保持には正常なクロロフィル分解が必要であることが明らかとなった。

ここでクロロフィル *b* 還元酵素である *NYC1* のプロモーター配列に植物ホルモンであるアブシジン酸に応答すると推定される配列 (G-box 配列) が存在したことから、アブシジン酸非感受性変異体 *abi3* の種子が緑色であることから、*NYC1* とアブシジン酸の関係を調べた。まずアブシジン酸応答転写因子 ABF4 を使い、gel shift 法を用いて *NYC1* の G-box がアブシジン酸応答であるかを調べた。その結果、ABF4 と *NYC1* の G-box が存在する時にだけ、両者が結合することが確認された。次に、*abi3* 変異体において *NYC1* の発現が抑制されているかどうかを RT-PCR 法を用いて調べた。その結果、*NYC1* は *abi3* において抑制されていることが確認された。以上より、*NYC1* はアブシジン酸により発現制御されていることが示唆された。

これらの結果より、登熟過程の種子においてクロロフィル *b* 還元酵素はアブシジン酸により発現し、それによりクロロフィル分解が起こることが考えられた。そしてこのクロロフィル分解は発芽率の保持に重要であることが示唆された。

これを要するに、著者は、クロロフィル分解についてその生理的な役割について新知見を得たものであり、クロロフィル代謝研究に対して貢献するところ大なるものがある。

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あるものと認める。