

# 論文内容の要旨

申請者氏名 石 倉 清 秀

本論文はparticle bombardmentにより導入した外来遺伝子が相同組換えにより葉緑体ゲノムへ比較的容易に組み込まれる単細胞緑藻、*Chlamydomonas reinhardtii*を材料に、葉緑体における外来遺伝子の発現制御要因を明らかにしたものである。

第1章では葉緑体の機能の重要性と遺伝子構造、*C. reinhardtii*を葉緑体形質転換のモデル系として利用する利点、外来遺伝子の発現を転写、転写後プロセス、翻訳、翻訳後プロセスに分割しかつ総合的に解析することの重要性を述べ、本論文での研究の意義と方向性を説明している。

第2章では*C. reinhardtii*の葉緑体ゲノムにコードされている遺伝子の代表例として *rbcL* (RuBisCOの大サブユニット遺伝子)、*psbA* (光化学系II反応中心D1タンパク質遺伝子)、*atpA* (ATPase  $\alpha$  サブユニット遺伝子) を選び、それぞれのプロモーターおよび5'非翻訳領域をGUS ( $\beta$ -グルクロニダーゼ) レポーター遺伝子に連結し、*C. reinhardtii* 葉緑体ゲノムに導入し、遺伝子の発現をmRNAレベル、GUSタンパク質量、酵素活性について詳細に解析している。本来の葉緑体では *rbcL*, *psbA*, *atpA* の順に転写活性が低下するのに対し、キメラ遺伝子の場合には *atpA* プロモーターが最も活性が高く、*rbcL*, *psbA* プロモーターは *atpA* よりかなり低く、外来遺伝子の高発現を期待する場合、内在のプロモーター活性のみでは評価できないことを明らかにしている。

第3章ではGUSキメラ遺伝子の高発現には、*rbcL*, *psbA* プロモーターと5'非翻訳領域断片のみでは不十分であり、*rbcL*, *psbA* 遺伝子の翻訳領域が重要であると想定し、それぞれ異なる長さのN末端の翻訳領域をGUSの上流に付加したキメラ遺伝子を導入し、転写速度、mRNAの安定性も含めて解析した結果、*rbcL* ではN末端から27、*psbA* では29アミノ酸残基に対応するDNAを付加すれば内在の転写活性まで上昇し、翻訳領域が高い転写活性に重要であることを証明している。

第4章ではキメラ遺伝子の発現においてプロモーター活性が高かった *atpA* についても翻訳領域を付加したところ、上とは逆にmRNAの蓄積量は低下し、それにも拘らずGUS酵素活性は逆に増大することを見出している。翻訳領域が必ずしも転写を促進しない例であるが、なぜmRNAの蓄積量とGUS翻訳量が逆相関するかを、葉緑体での翻訳を特異的に阻害するクロラムフェニコールの添加、無添加の条件下で、パルスチェイス実験によりmRNAの安定性を定量的に解析した結果、翻訳活性が高くなるとmRNAの分解が速くなると結論し、その理由について考察している。

第5章は要約と結論である。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 石 倉 清 秀

葉緑体は高等植物の光合成をはじめ、窒素、硫黄代謝を司る重要な細胞内器官で、独自の環状DNAを持つ。したがって植物の遺伝的形質改変には核染色体ゲノムのみならず、葉緑体ゲノムを操作することも重要である。また葉緑体は原核生物型の遺伝子発現機構を有する点からも核ゲノムとは異った制御機構が示唆されている。本論文は単細胞緑藻、*Chlamydomonas reinhardtii*を材料に、DNA相同組換えを利用して葉緑体ゲノムに外来遺伝子を導入し、その発現制御要因を明らかにしようとしたもので、以下の成果を上げている。

1) *C. reinhardtii*の*rbcL*, *psbA*, *atpA* 遺伝子のプロモーターおよび5'非翻訳領域(UTR)をGUSレポーター遺伝子に連結したキメラ遺伝子を*C. reinhardtii*葉緑体ゲノムに導入し、遺伝子の発現を解析した結果、*atpA*プロモーターが高い転写活性を示し、外来遺伝子の高発現に有効であることを明らかにしている。

2) *rbcL*, *psbA*のプロモーター, 5'UTRは、本来の葉緑体での転写活性と比べ、キメラ遺伝子の発現では著しく低下したが、両遺伝子のN末端のコード領域をGUSの上流に付加することにより、転写活性がほぼ回復し、コード領域が転写に効果が大きいことを示している。

3) プロモーター活性が高かった*atpA*についても翻訳領域を付加したところ、mRNAの転写蓄積量は逆に低下し翻訳領域が必ずしも転写を促進しない場合もあり、遺伝子ごとに特異的であることを明らかにしている。

4) *atpA*プロモーター, 5'非翻訳領域に翻訳領域を付加すればGUSレポーターのmRNAの蓄積が低下するのに対し、GUS酵素活性は増大することを見出し、mRNAの翻訳活性が高くなるとmRNAの分解が速くなることを証明し、同様の例を数種類の葉緑体遺伝子について示している。

以上、本論文は次世代の有用形質転換植物作成に重要な葉緑体工学の一環として、葉緑体での外来遺伝子の高発現に必要なプロモーター、転写・翻訳に重要なコード領域、mRNAの翻訳活性と安定性の関係を明解に示したもので、植物細胞工学の学術上、応用上貢献するところが大きい。よって審査委員一同は、本論文が博士(バイオサイエンス)学位論文として価値あるものと認めた。