

## 論文内容の要旨

申請者氏名 市川雄彦

光合成の鍵酵素、RuBisCO は、核遺伝子 *rbcS* にコードされる小サブユニット (S) と葉緑体遺伝子 *rbcL* にコードされる大サブユニット (L) が、ストロマ内で L 8 S 8 の 16 量体として存在する。異なるゲノムにコードされるサブユニットが葉緑体内で会合して機能するには、お互いが過不足なく存在する制御機構があると考えられる。これまでに、タバコにアンチセンス *rbcS* を導入し、内在性 *rbcS* の発現を構成的に抑制すると、*rbcL* mRNA の蓄積量は変化しないが、S、L 共に同じ割合で蓄積量が減少し、L の翻訳量が低下することが示され、L の翻訳には S が必要だと考えられた。しかし、構成的に *rbcS* の発現を抑制すると、光合成能も低下するので、L の翻訳量の低下は S 直接か、光合成能の低下によるものか判断できない。そこで、本研究では任意の時期に S の合成を抑えるために、アンチセンス *rbcS* mRNA を dexamethasone (DEX) で誘導発現させる形質転換タバコを作成した。

形質転換 T<sub>2</sub> 世代のタバコを播種から 35 日間、水耕栽培で生育させた後、DEX を水耕液に添加すると 48 時間後に *rbcS* mRNA はノザン解析で検出限界以下に低下した。対照の DEX 溶解溶媒の DMSO を水耕液に添加した形質転換タバコ、および DEX 処理を行った野生株では *rbcS* mRNA 量に変化はなかった。

さらに 14 日間生育させるとタバコの葉には 2 種類の表現型が見られた。DEX 処理時にすでに展開していた葉では *rbcS* mRNA の蓄積量が著しく減少していること以外は対照の葉と違いがなかった。DEX 処理後に新しく展開した葉ではサイズとクロロフィル含量の減少、黄化、光合成速度の低下が見られ、葉緑体も未発達であった。

DEX 処理時にすでに展開していた葉では *rbcL* mRNA、RuBisCO の蓄積量は変化しなかった。<sup>35</sup>S メチオニンの取り込み実験にて、L の新規合成は検出されたが S は検出されなかった。*rbcL* mRNA に結合するリボソームのポリソーム解析においても L の翻訳量に変化はなかった。したがって、新規に合成される S の量に関係なく、L は翻訳されると結論できる。

DEX 処理後に新しく展開した葉では過去の報告と同様に、*rbcL* mRNA 量は変化しないが、RuBisCO の蓄積量および S、L の翻訳量は減少した。従来、L の発現調節機構としては、S が L の翻訳促進に働いている説と、RuBisCO に会合できない余剰 L が自身の翻訳を抑制している説が挙げられていたが、本研究の結果から、少なくとも光合成を正常に行っている展開葉では S は L の発現調節に関与しないことが明らかとなった。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 市川雄彦

光合成の鍵酵素、Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) は、核遺伝子コードの小サブユニット (S) と葉緑体遺伝子コードの大サブユニット (L) が等量の 16 量体として存在する。異なるゲノムにコードされる S と L が葉緑体内で会合して機能するには、互いが過不足なく存在する制御機構があるだろう。これまでに、タバコにアンチセンス *rbcS* を導入し、内在性 *rbcS* の発現を抑制すると、S、L 共に同じ割合で蓄積量が減少する、*rbcL* mRNA の蓄積量は変化しないが L の翻訳量が低下する、ことが示され、L の翻訳に S が必要と考えられている。しかし、この解析系では *rbcS* の発現が常時抑制されており、光合成能も低下しているため、L の翻訳低下が S に由来するか、光合成能そのものの低下によるものかが判断できなかった。

本論文では、dexamethasone (DEX) でアンチセンス *rbcS* mRNA の発現を誘導することにより、任意の時期に S の合成を抑える形質転換タバコを作成し、解析した結果を述べている。形質転換 T<sub>2</sub> 世代のタバコを播種から 35 日間、水耕栽培で生育させた後に DEX を水耕液に添加すると 48 時間後に見事に *rbcS* mRNA がノザン解析で検出限界以下にまで低下した。DEX 溶解溶媒の DMSO を水耕液に添加した形質転換タバコおよび DEX 処理を行った野生株では *rbcS* mRNA 量に変化はなかったことから、これは S の効果を検証できる貴重な解析系である。

DEX 添加後、さらに 14 日間生育させると 2 種類の表現型が表れた。DEX 添加時にすでに展開していた葉では *rbcS* mRNA の蓄積量が著しく減少していること以外は対照の葉と違いがないが、DEX 添加後に新しく展開した葉では *rbcS* 抑制の効果が顕著に現れ、葉は小さく、クロロフィル含量が減少し、黄化、光合成速度の低下が見られ、電子顕微鏡で観察した葉緑体も未発達であることを示している。

DEX 添加時にすでに展開していた葉では *rbcL* mRNA、RuBisCO 量は変化せず、<sup>35</sup>S メチオニンの取り込み実験にて、L の新規合成は起こるが、S は起こらないことを示している。*rbcL* mRNA のポリソームパターンも変化しないことから、新規に合成される S の量に関係なく、L は翻訳されると結論しているが、これは新規な発見である。

DEX 添加後に展開した葉では過去の恒常的抑制植物と同様に、*rbcL* mRNA 量は変化しないが、RuBisCO の蓄積量および S、L の翻訳量は減少したことを示している。

以上のように、本論文は少なくとも光合成を正常に行っている展開葉では S は L の発現調節に関与しないことを示したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。