

論文内容の要旨

申請者氏名 小川 太郎

植物の光合成は、CO₂固定酵素 Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO)の大量蓄積により達成され、その蓄積量は葉可溶性タンパク質の40%を占める。一般に大腸菌や動物の細胞内タンパク質濃度は約250 mg/mlであるが、植物葉緑体では400 mg/mlにも達し、これらのタンパク質濃度差はRuBisCOの蓄積によるものである。このような葉緑体内におけるRuBisCO高蓄積を達成するために、植物は特有のメカニズムを有していると予想されるが、明らかにされていない。

そこで本研究ではまず、正の遺伝学的アプローチから RuBisCO 高蓄積の達成に必要な遺伝子 (*gene necessary for the achievement of RuBisCO accumulation, NARA*) を単離するため、RuBisCO 蓄積量が低下したシロイヌナズナ変異体のポジティブ選抜法を確立し、EMS 突然変異体プールから RuBisCO 蓄積量が低下した 4 系統の *nara* 劣性変異体を取得した。RuBisCO 蓄積量が 70、90%に低下した 2 系統は、機能未知タンパク質、RNase H domain containing protein (NARA4) と pfkB-type carbohydrate kinase (pfkB-CK) family protein (NARA5)の変異体であることを明らかにした。

次に、NARA4 および NARA5 と RuBisCO 高蓄積との関連を理解することを目的に、分子遺伝学的解析を行った。NARA4 局在解析から、NARA4 の一部が葉緑体に局在することが示唆された。*nara4* 変異体と欠損株は、本葉が黄化し、RuBisCO を含めた光合成タンパク質の蓄積量が低下しており、この原因は転写産物の蓄積低下であった。以上の結果から、植物葉緑体において RNase H ホモログである NARA4 が RuBisCO をはじめとする光合成遺伝子の発現に必要であることが明らかとなった。

一方、NARA5 は、シロイヌナズナの光独立栄養成長に必須であり、変異株では RuBisCO を含めた光合成タンパク質蓄積量が低下していた。NARA5-sGFP を発現させた *nara5* 変異体相補株を用いた GFP 蛍光観察から、NARA5 が葉緑体に局在することが示唆された。また発現解析より、変異体では、葉緑体遺伝子の転写装置の 1 つ plastid encoded RNA polymerase (PEP)により転写される光合成遺伝子の転写産物、中でも RuBisCO large subunit 遺伝子 (*rbcL*)の転写産物量が著しく低下していた。これらの結果から NARA5 は PEP と共に、葉緑体における *rRNA* の転写促進による翻訳装置の増大、かつ光合成遺伝子の特に *rbcL* の遺伝子発現強化に関わることで、RuBisCO を含めた光合成タンパク質の高蓄積に寄与していることを明らかにした。

本研究では、2つの NARA タンパク質が RuBisCO の高蓄積を通じて、植物の光合成能の最適化に貢献していることを明らかにした。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 小川 太郎

光合成 CO₂ 固定酵素 RuBisCO は光合成能力の発揮のために、植物葉緑体内において、大量に合成蓄積される。RuBisCO のように 1 タンパク質が大量に合成蓄積される例は、他に存在しない。しかしながら、RuBisCO の高蓄積を達成するための因子はほとんど明らかにされておらず、またその単離を目指したスクリーニングが試みられたこともなかった。本論文では、シロイヌナズナ変異種子プールから RuBisCO 量低下変異株スクリーニング法確立を目指した。RuBisCO が触媒するオキシゲナーゼ反応が細胞毒性を示すアンモニアを大量放出する光呼吸代謝の初発であることに着目し、この代謝反応を利用した RuBisCO 量低下変異株のスクリーニング法を実験的に確立した。このスクリーニング法は、植物代謝を利用した、新規性、独創性に富む手法であり、RuBisCO 合成蓄積に関わる因子の単離において、この実験手法の確立は生物学上、非常に意義のあるものである。

確立したスクリーニング法を用いて、特に 2 つの RuBisCO 高蓄積の達成に必要な遺伝子 (*gene necessary for the achievement of RuBisCO accumulation, NARA*) を単離した。*NARA4* に関して、葉緑体ゲノムコードの RuBisCO 遺伝子を含む光合成遺伝子の高発現に必要であることを明らかにした。また、この遺伝子が葉緑体ゲノムのコピー数を最適に制御するために必要であることを明らかにした。*NARA4* は、RNase H と相同性を示すことから、RNA-DNA ハイブリッド鎖に対する RNA 分解活性を用いて、葉緑体ゲノムコピー数と転写活性の最適化を通して、光合成遺伝子高発現に寄与しているという新しい RuBisCO 高蓄積メカニズムのモデルを提唱した。

また *NARA5* は葉緑体ゲノムコードの RNA polymerase (PEP) によって転写される光合成遺伝子、特に RuBisCO large subunit 遺伝子 *rbcL* の高蓄積に必須であることが明らかになった。これまで、*rbcL* の転写に特異的に関わる遺伝子はこれまでに報告例がなく、*NARA5* がはじめてであった。*NARA5* は葉緑体 PEP 相互作用因子の 2 つと同じ pfkB-type carbohydrate kinase (pfkB-CK) family protein に属していることから、*NARA5* が PEP と相互作用することにより PEP に *rbcL* 特異的に高転写活性を発揮させる新規モデルを提唱した。

以上のように、本論文は植物 RuBisCO 高蓄積に関与する遺伝子のスクリーニング法を確立し、2 つの新規因子を単離し、また、これらの因子の解析結果から RuBisCO 高蓄積の新規モデルを提唱したもので、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。