論文内容の要旨

申請者氏名 中原 剣

カルビンサイクル構成酵素の一つであるアルドラーゼ (FBA) は、サイクル中の可逆反応段階を触媒し、光合成速度に与える影響力が低い酵素と考えられてきた。しかし、葉緑体 FBA 発現量を制御した植物体の解析から、葉緑体 FBA 活性が光合成速度に対して、SBPase, FBPase などの光合成に対して強い影響力を及ぼす不可逆反応触媒酵素と同程度以上の影響を与えているとの報告がなされてきた。しかし、なぜ可逆酵素である FBA がこれほど強い影響力を持つかという代謝学上重要な問題点については、まったく不明であった。このため本研究は FBA の光合成制御に対するより詳細な機構の解明を目的として行った。

ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 の全ゲノムが解読された結果、この光合成原核生物にはクラス I(CI), クラス II(CII)という異なる分子進化を遂げてきた二種類の FBA がコードされていることが明らかとなった。これら二種類の FBA を単離・精製したもの、および大腸菌を使って作成したりコンビナント酵素を用い、植物葉緑体 FBA と酵素的諸性質を比較したところ、フルクトース 1,6 ビスリン酸(FBP)を基質とする V_{max}, K_m 値にはほとんど差異はなかった。これに対して、セドヘプツロース 1,7 ビスリン酸(SBP)をに対する K_m 値は、CII-FBA と C-I 型である植物葉緑体 FBA の間ではほとんど差が見られなかったが、CI-FBA は、CII-FBA、植物葉緑体 FBA と比較してそれぞれ約 6 倍、8 倍親和性が低いことが明らかになった。また飽和量の SBP、FBP に対するそれぞれの活性の比(SBP/FBP)を求めた結果、カルビンサイクルで機能する FBA の SBP/FBP 値は細胞質で解糖系で働く FBA よりかなり高いものであった。

この結果を基に、カルビンサイクルで働く FBA の SBP/FBP 値に着目し、植物葉緑体内での SBP/FBP 値の代謝的な意義を明らかにするために、以降の研究を行った。植物カルビンサイクル FBA と異なる SBP/FBP 値をもつ *Synechocystis* 由来の CI-FBA 遺伝子を葉緑体形質転換によってタバコ葉緑体で過剰発現させた形質転換体を作成し、コントロールとの比較解析を行った。コントロールの約 2.2 倍の活性を持ち、SBP/FBP 値が 0.7 倍低下した形質転換体では、ヘキソース、スクロース、クロロフィル a,b 含量、光飽和条件下における光合成速度がコントロールと比較してそれぞれ低下していることが明らかとなった。これに対して、光合成同化産物の一種であるデンプンの含量はコントロールとの間に差は見られず、FBA の基質となるトリオースリン酸含量ではコントロールと比較して約 1.4 倍の増加が見られた。

これらの結果から、カルビンサイクルで働く FBA は、SBP/FBP 値によるトリオースリン酸量の調節を介して、光合成炭素代謝の制御を行っていることが明らかとなった。とくに、スクロースとデンプンという 2 つの光合成最終産物への分配が大きく変化したことは、FBA が単に光合成速度に影響を及ぼすだけでなく、代謝制御上でも重要な機能を担っていると考えられる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 中原 剣

カルビンサイクル構成酵素の一つであるアルドラーゼ (FBA)は、カルビンサイクル内で光合成同化産物の分配基点となる二つの反応を触媒する酵素である。FBA は可逆酵素であり、活性調節も受けないことから炭素代謝に与える影響力が低い酵素と考えられてきた。しかし、1998年、葉緑体 FBA の発現量を落とした植物体の解析から、葉緑体 FBA 活性が光合成速度に対して、光活性調節を受ける GAPDH,SBPase,FBPase という代謝に対して影響力の強い不可逆酵素と同程度以上の影響を与えている事がわかった。しかし、なぜ葉緑体 FBA がこれほど影響力を持つ酵素であるかについては明らかとなっていない。このため、本研究ではその原因を明らかとすることを目的として行った。

ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 は全ゲノムが解読されており、クラス I(CI), クラス II(CII)という二種類の FBA がコードされていることが明らかとなった。これら二種類の FBA を単離・精製し、植物葉緑体 FBA と酵素的諸性質を比較したところ、フルクトース 1,6 ビスリン酸(FBP)を基質とする V_{max}, K_m 値にはほとんど違いが見られなかった。これに対して、セドヘプツロース 1,7 ビスリン酸(SBP)を基質とした K_m 値は、CII-FBA と植物葉緑体 FBA の間ではほとんど差が見られなかったが、CI-FBA は、CII-FBA、植物葉緑体 FBA と比較してそれぞれ約 6 倍、8 倍親和性が低いことがわかった。また 飽和量の SBP、FBP に対するそれぞれの活性の比(SBP/FBP)を求めた結果、カルビンサイクルで機能する FBA は SBP/FBP 値がそれ以外で働く FBA より高いことがわかった。

このためカルビンサイクルで働く FBA の SBP/FBP 値に着目し、植物葉緑体 FBA の SBP/FBP 値を変化させた形質転換体を作成、解析を行うことにした。形質転換体作成には、タバコの葉緑体形質転換の系を用い、葉緑体内で *Synechocystis* 由来のホスト FBA と異なる SBP/FBP 値を持つ CI-FBA 遺伝子の過剰発現させた。この結果、野生型の約 2.2 倍の活性を持ち、SBP/FBP 値が 0.7 倍低下した形質転換体が作成された。この形質転換体を解析したところ、光合成同化産物の分配量の変化、トリオースリン酸含量の上昇が起こり、これらの代謝物質含量の変化により起こったと予想される光合成速度の低下、生育阻害が観察された。またリブロー 1,5 ビスリン酸再生量の低下、ルビスコ活性化の抑制が見られた。これらの現象は SBP/FBP の変化によって濃度が上昇したトリオースリン酸が細胞質へ過剰量排出され、細胞質でのスクロース合成を阻害し、葉緑体内に流入する無機リン酸量が低下した結果引き起こされたと予測した。

以上の結果より、カルビンサイクルで働く FBA は、SBP/FBP 比によるトリオースリン酸量の調節を介して、光合成炭素代謝の制御を行っていることが明らかとなった。

以上のように、本論文は光合成における炭素代謝調節に新しい概念を導入したもので、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。