

論文内容の要旨

博士論文題目

シロイヌナズナフィトクロム発色団生合成系 *HY1* 遺伝子のクローニングと機能解析
氏 名 村本 拓也

要 旨

植物にとって光は自らの生育にとって重要な要因のひとつであり、発芽から伸長成長、花芽形成、老化に至る様々な成長・分化の過程において重要な役割を果たしている。積極的に周囲の光環境をモニターし、その変化に適切に対応するために、植物は光の波長により異なる受容体を進化させてきた。中でもフィトクロムは最も重要かつ普遍的で、研究が進んでいる光受容体である。フィトクロムは、複数の遺伝子によってコードされるアポタンパク質とテトラピロール化合物のフィトクロモビルリンを発色団にもつタンパク質である。光形態形成におけるフィトクロムの生理学的な解析の進展には目覚ましいものがあるがフィトクロム発色団の生合成に関しては、経路の予測や酵素の存在は確認されているものの、酵素や遺伝子の精製や単離は存在量の問題などのため解析が困難であった。

このような場合有効な手段となるのが変異体を利用した解析である。シロイヌナズナでは、数々の変異体が単離され解析されている。そのなかでも *long hypocotyl 1(hy1)* 変異体はフィトクロムの発色団の生合成に異常を来した変異体である。私は、*HY1* 遺伝子のフィトクロム発色団生合成における役割と光形態形成に及ぼす影響を調べるためにまず染色体上の *HY1* 遺伝子座の情報を基に *HY1* 遺伝子を単離した。*HY1* 遺伝子は、動物のヘムオキシゲナーゼと弱い相同性を示した。その発現は全ての組織において確認され、また光非依存的であった。このことは、フィトクロムが全ての組織において存在していることと光の有無に関わらず存在していることと矛盾しない結果であった。

HY1 遺伝子は、その N 末端に葉緑体移行に必要なトランジットペプチドと考えられる配列をコードしていた。GFP をレポーターに用いた解析によりそのトランジットペプチドは葉緑体への移行に必要な十分な機能を有しており、また実際 *HY1* タンパク質は葉緑体に局在していることを組換え *HY1* タンパク質に対する抗体を用いたウェスタン解析により確認した。

組換え *HY1* タンパク質の発現を誘導した大腸菌の粗抽出液の活性測定を行ったところ、ヘムオキシゲナーゼ活性が検出された。つまり、*HY1* 遺伝子は、プラスチドに局在するヘムオキシゲナーゼをコードするということが明らかになった。これは、植物において初めて単離されたヘムオキシゲナーゼ遺伝子である。

植物のヘムオキシゲナーゼは精製されておらず、酵素の性質の解析がなされていない。組換えタンパク質を用いた解析により *HY1* タンパク質は紅藻、ラン藻のヘムオキシゲナーゼと同様に反応に還元型のフェレドキシンを必要とし、アスコルビン酸、鉄の強力なキレート剤によって反応が促進される。その他の性質は、一次配列の相同性が低いにもかかわらず動物のヘムオキシゲナーゼと類似していた。

この研究は植物におけるテトラピロール生合成を光形態形成の制御の理解に寄与すると思われる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 村 本 拓 也

植物が成育環境を認識するために光は最も重要な刺激であり、その刺激の受容と信号伝達を介した応答に関する研究は生物学的な意義に加え、農学的应用にもつながるものである。植物の光受容体のうち最も重要であるフィトクロムは、複数の遺伝子にコードされるアポタンパク質と光受容に重要なフィトクロモビルンから構成される。フィトクロモビルンの生合成経路自体は提唱されていたが、酵素の精製やその遺伝子の単離は進んでいなかった。本申請者の論文では、このような研究領域にイロイヌナズナの突然変異体を利用した分子遺伝学的なアプローチを取り入れて、独創的な研究を進展させており優れたものである。

初めに、申請者はシロイヌナズナの光形態形成の突然変異体 (*hy1*)を利用して、変異遺伝子の詳細な染色体へのマッピング、変異の同定、変異体の野生型遺伝子による相補性検定を行い、その原因遺伝子を分子遺伝学的に単離同定した。遺伝子から推定される遺伝子産物の一次配列は動物でヘムの代謝に用いられるヘムオキシゲナーゼと弱い相同性を示し、植物ではフィトクロモビルン生合成のヘムからビルベルジンへの酵素反応を触媒するものと推定された。つまり、光形態形成の突然変異体としての原因を特定するに至った。

続いて、遺伝子の発現をHY1 mRNAおよびHY1タンパク質を検出することにより解析し、光非依存的に調べた組織全てで発現することが示された。また、その前駆体タンパク質が機能的な色素体への移行ペプチドをもち、タンパク質が色素体に局在することを、クラゲ緑色蛍光タンパク質をレポーターとする解析手法および免疫化学的手法を用いて明瞭に示した。これは、従来推論の域にあったフィトクロム発色団生合成の細胞内局在を明らかにした点で重要な観察結果である。

また、単離した遺伝子をもとに組換えタンパク質を大腸菌を用いて発現し、精製HY1タンパク質を得た。これが、ヘムオキシゲナーゼ活性を有することを示し、HY1タンパク質は、シロイヌナズナヘムオキシゲナーゼであることを示した。引き続き、組換えHY1タンパク質のヘムオキシゲナーゼとしての酵素化学的な諸性質を検討し、反応の補助因子を同定した。これは、反応を触媒する酵素の実態が明らかにしたものであり、今後、生合成の調節機構を研究する上で、重要な知見となるものである。

以上のように、本論文は、突然変異体に注目して従来研究が困難であった研究領域に著しい進展をもたらしたことなどの独創的な部分と、植物に重要な光受容体フィトクロムの発色団生合成の細胞内局在や酵素化学的性質を細部に至るまで明らかにしたことなど、生物学的に重要な知見を得たことが特に評価ができる。すなわち、本論文は遺伝子の同定と酵素化学的解析により高等植物の光受容体フィトクロムの生合成に関わる反応を分子レベルで解明したもので、学術上、応用上貢献するものである。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。