

論文内容の要旨

申請者氏名 児玉 豊

植物は、長い時間をかけた進化によって様々な環境ストレスに適応してきた。これには、植物が持つ多様な機能や現象の発達が必要であり、それを促す原動力の一つは、蛋白質の分子進化である。その現象は広範にわたるが、一例として、細胞内局在性の変化がある。特に、核から葉緑体への細胞内局在性の変化に関しては、共通の特徴を持った幾つかの蛋白質が報告されている。これらの蛋白質は、葉緑体に局在するにも関わらず、核の転写因子モチーフを持っており、進化の過程で、核から葉緑体に局在性を変えたと推察されている。しかし、どのような機構を介して細胞内局在性を変化したかは、全く明らかとなっていなかった。

本研究では、核から葉緑体へ細胞内局在性を変化した新規の蛋白質 NtWIN4 について詳細な解析を行った。タバコから単離された NtWIN4 は、核の転写因子のモチーフである basic helix-loop-helix (bHLH) を持っていた。実際に、*in vitro* で転写抑制活性を持っていたが、タバコの葉では、葉緑体に局在していた。この葉緑体局在性は、選択的転写によって 2 番目のインフレーム AUG から翻訳されることが原因であった。また、タバコの倍数性は NtWIN4 の自然淘汰を引き起こし、それが核・細胞質型 NtWIN4 を消失させた。NtWIN4 の N 末端側には、bHLH モチーフを利用した葉緑体移行配列が存在した。NtWIN4 は、病傷害に応答して発現したため、形質転換タバコを用いて解析したところ、葉緑体の機能崩壊を介して過敏感細胞死を促進することがわかった。

以上の結果から、NtWIN4 は、核の転写抑制因子から葉緑体局在型の過敏感細胞死関連因子に分子進化した、と結論付けた。本研究より、植物が限られたゲノム情報を最大限に利用することによって多様な環境に適応してきた可能性を示す、新規の蛋白質分子進化モデルを提唱した。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 児玉 豊

本研究では、タバコ (*Nicotiana tabacum*) の病害および傷害に対する未知の応答機構を探索する過程で単離した遺伝子である *NtWIN4* (*N. tabacum* wound-induced clone 4) を解析した。これがコードする蛋白質は、核の転写因子モチーフを持つ、新規の葉緑体局在型因子であった。そこで、蛋白質の分子進化の一端を知るため、*NtWIN4* の葉緑体局在化の分子機構と生理機能について詳細な解析を行った。

GFP 融合蛋白質は核・細胞質に局在した。しかし、免疫ブロットでは葉緑体に局在していた。その原因は、異なる長さをもつ *NtWIN4* mRNA が複数存在することに起因していた。最も高い翻訳効率を持っていた最短 mRNA は、一番目の AUG コドンを欠失しており、*in vitro* で二番目のインフレーム AUG コドンから蛋白質が翻訳された。これに GFP を融合して細胞に発現させたところ、葉緑体に局在した。したがって、葉緑体型 *NtWIN4* は、この最短 mRNA から翻訳されていることがわかった。祖先植物 *N. sylvestris* では、核・細胞質型と葉緑体型の両方の *NsWIN4* が発現していた。しかし *N. tabacum* では、葉緑体型 *NtWIN4* のみ発現する。これは、約 600 万年前の倍数化後に *NtWIN4* の自然淘汰が起こった可能性を示している。

形質転換タバコを用いて生理機能を解析した。過剰発現タバコはで、葉が黄化して葉緑体の機能が崩壊した。RNAi 発現抑制タバコに病原体を感染したところ、過敏感細胞死が抑制された。*NtWIN4* が葉緑体の機能崩壊を介して過敏感細胞死に関与することを示唆した。以上の結果から、タバコへ進化する過程で、植物のストレス応答機構には、核・細胞質型より葉緑体型の *NtWIN4* が必要だったと推察される。これに助力した局在性変化の分子機構は、選択的転写制御、自然淘汰および蛋白質モチーフの転用であった。本研究より、植物が限られたゲノム情報を最大限に利用することによって多様な環境に適応してきた可能性を示す、新規の蛋白質分子進化モデルを提唱した。

以上のように、本論文は植物蛋白質の分子進化の一端を明らかにしたもので、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。