

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	森井 (小松) 愛乃
論文題目	苔類ゼニゴケの青色光応答反応と青色光受容体フォトトロピン機能の解析		
(論文内容の要旨)			
<p>植物は光環境の変化に応じて適切な応答を行うことで、成長を最適化する。様々な光応答反応のうち、光屈性、葉緑体光定位運動、気孔開口などは主に青色光で誘導される。植物は、遺伝子発現制御を介する応答だけでなく、刻々と変化する光環境に応じた迅速な反応を示すことで、光合成効率の促進を図っている。葉緑体光定位運動は光環境に応じて葉緑体の細胞内における局在を変化させ、葉緑体の光吸収効率を調整することにより光合成効率を最適化する反応である。葉緑体光定位運動には、弱光条件において効率的に光を吸収するために葉緑体が光を求めて移動する反応 (集合反応)と、強光条件において光損傷を避けるために逃げる反応 (逃避反応)がある。多くの陸上植物で、葉緑体光定位運動は青色光によって誘導されており、青色光受容体フォトトロピンがその光受容体であること、その下流で複数のシグナル伝達因子が関与していることが明らかとなってきた。</p> <p>本論文では、新たなモデル植物として陸上植物の進化上最も基部に位置する苔類の1種、ゼニゴケ <i>Marchantia polymorpha</i> に着目した。ゼニゴケにおける葉緑体光定位運動を詳細に解析し、集合反応と逃避反応が青色光にのみ誘導されることを明らかにした。暗黒下における葉緑体局在 (暗黒定位) についても観察し、ゼニゴケ幼葉状態における暗黒定位のパターンを明らかにした。ゼニゴケの光受容体フォトトロピン遺伝子として、典型的なドメイン構造を保持したタンパク質をコードする <i>MpPHOT</i> 遺伝子を単離した。ゲノムデータベース検索およびゲノムサザンプロット解析から、ゼニゴケにはフォトトロピンが1分子種のみ存在することを示した。相同組換えによるジーンターゲットングの手法によって、<i>MpPHOT</i> のノックアウト株を作出して葉緑体光定位運動の観察を行った。ゼニゴケでは1分子種のフォトトロピンが集合反応、逃避反応、暗黒定位のすべての葉緑体光定位運動を制御することが明らかとなった。<i>phot</i> 変異体の機能欠損を相補する蛍光タンパク質シトリン融合 <i>phot</i> タンパク質を用いて細胞内局在を観察したところ、細胞膜への局在が観察された。</p> <p>また、発芽した胞子の光応答を利用して、青色光応答変異体を分離した。発芽胞子の光屈性と葉状体の葉緑体定位運動が異常になった変異体 <i>cap1</i> (<i>chloroplast abnormal positioning1</i>) が <i>MpPHOT</i> のキナーゼドメインの保存領域に変異をもつことを明らかにし、キナーゼ活性の重要性を示唆する結果を得た。</p> <p>以上のように、ゼニゴケの葉緑体光定位運動は1分子種のフォトトロピンで制御されることを示した。複数のフォトトロピンによって複雑に制御されている従来のモデル植物の制御機構に比べて、ゼニゴケの制御機構は共通性をもちながらも単純なもので解析に有利であることが期待される。そこで、シダ植物であるホウライシダおよび被子植物であるシロイヌナズナのフォトトロピン変異体において <i>MpPHOT</i> を発現させたところ、それぞれの植物のフォトトロピン変異体における葉緑体光定位運動の欠損が相補された。このことから、ゼニゴケフォトトロピンの葉緑体光定位運動における制御に関する機能は進化的に保存されていることが明らかとなった。</p> <p>このようにゼニゴケでは陸上植物に典型的な葉緑体光定位運動が観察され、それが単一分子種のフォトトロピンに制御されることがわかった。ゼニゴケは陸上植物に共通なフォトトロピンによる葉緑体光定位運動制御の基本的分子機構を解析するうえで優れたモデル植物となると期待される。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、進化的な側面から陸上植物の青色光応答の分子機構を解明することを目的として、陸上植物進化の基部に位置する苔類のゼニゴケを材料に青色光受容体フォトトロピンを介する葉緑体光定位運動に関する研究を進めた。まず、ゼニゴケの各組織の葉緑体光定位運動性を調べ、観察に適した実験系を確立した。そして、ゼニゴケが強光に対する逃避反応と弱光に対する集合反応といった葉緑体光定位運動能をもつこと、この反応には青色光が有効であることを示した。ヒメツリガネゴケとは異なり、赤色光は葉緑体光定位運動には効果がないことも示した。また、暗黒条件では葉状体辺縁部で葉緑体を欠く特徴的な暗黒定位を取ることも示した。次に、ゼニゴケから青色光受容体フォトトロピンをコードする遺伝子 (*MpPHOT*) を単離した。これまでに解析された陸上植物とは異なりゼニゴケには*MpPHOT*が1分子種のみ存在すること、分子系統解析により*Mpphot*が維管束植物で機能分化した*phot1*および*phot2*に対して基部に位置することを示した点は成果として評価できる。

次に相同組換えによる遺伝子ターゲティングによって、*MpPHOT*遺伝子破壊株 *Mpphot*<sup>KO</sup> を作出した。変異体と相補株を利用して、葉緑体の集合反応、逃避反応、暗黒定位に*Mpphot*が必要であることを示した。他の植物の研究では、複数の分子種の関与が解析を複雑にするといった問題があったが、ゼニゴケで1分子種の*phot*で全ての葉緑体定位運動を制御できることを示した意義は大きい。また、*MpPHOT*プロモーター制御下で蛍光タンパク質融合*Mpphot*を突然変異体背景で発現させ、機能相補を示しつつ発現特異性と細胞内局在を解析した。更に、順遺伝学的に*cap-1*変異体を分離し、原因遺伝子が*MpPHOT*であることを示している。この変異がキナーゼ活性に必要と考えられる部位の変異であることは*Mpphot*の分子機能の点からも興味深い。このように分子遺伝学的な機能解析が適切に進められ、正確な結果を導いている点は評価できる。

最後に、本論文では*Mpphot*の機能が進化的に保存されていることを実験的に示している。葉緑体逃避反応を示さないホウライシダ*phot2*変異体において*Mpphot*を一過的に発現させ、機能相補することを示した。逃避運動と集合反応を示さないシロイヌナズナ*phot1 phot2*二重変異体で*Mpphot*を安定的に発現させ、両反応ともにおいて機能することを示した。進化的な機能の保存性と1分子種で両反応を機能相補できることを示した意義は大きい。

以上、申請者は、陸上植物進化の基部に位置する苔類のゼニゴケを材料に1分子種のフォトトロピンによって葉緑体の集合反応および逃避反応が引き起こされることとフォトトロピンによる制御機構が陸上植物で進化的に保存されていることを実験的に明らかにするとともに、ゼニゴケを用いて葉緑体定位運動の機構を効率よく研究できることを示した。このような知見は植物生理学や植物環境応答の研究分野に貢献するところが大きい。

尚、本論文は、申請者の植物の生命科学に関する高度で幅広い学識と優れた能力により独創的かつ総合的に精緻な研究が展開されており、生命科学の理解と発展に寄与する発見が論理的かつ一貫性を持って記述されている。博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。また、平成26年11月12日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日