

氏 名	み うら けん じ 三 浦 謙 治
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1275 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	農学研究科応用生命科学専攻
学位論文題目	Identification and characterization of a <i>Ccm1</i> gene, which regulates a carbon-concentrating mechanism in a green alga, <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (緑藻クラミドモナス無機炭素濃縮機構の制御遺伝子 <i>Ccm1</i> の同定)
論文調査委員	(主 査) 教授 大山 莞爾 教授 佐藤 文彦 教授 關谷 次郎

### 論 文 内 容 の 要 旨

藻類は十分な光が与えられると CO<sub>2</sub> の供給が光合成の律速となり、細胞は CO<sub>2</sub> 欠乏ストレスを受ける。このストレスに応答して無機炭素濃縮機構を誘導し、細胞内に CO<sub>2</sub> を能動的に蓄積する。この誘導は、細胞が CO<sub>2</sub> 濃度を検知し、そのシグナルを伝達し、炭酸脱水酵素の遺伝子などの無機炭素濃縮機構に関わる遺伝子を調節する働きによると考えられている。しかし、CO<sub>2</sub> 欠乏シグナル伝達に関する分子機構はこれまで明らかにされていない。

本論文では、緑藻クラミドモナスを用いて、CO<sub>2</sub> 欠乏シグナルの伝達に関わる遺伝子を単離し、その分子機構を明らかにすることを試みている。その主な内容は以下の通りである。

第 1 章では、シグナル伝達に関わる遺伝子 *Ccm1* の単離について述べている。変異株 C16 では、3 つの炭酸脱水酵素の遺伝子 (*Cah1*, *Mca*, *Cah3*) の発現や無機炭素の取り込みに異常が見られ、シグナル伝達に関わる部位に変異があると考えられてきた。この変異株における変異部位を特定し、その変異部位に対応する野生株ゲノム DNA 断片によって、C16 株の変異が相補されることを示している。この断片上の遺伝子を *Ccm1* と名付け、その一次構造を明らかにしている。さらに、*Ccm1* 遺伝子、CCM1 タンパク質の発現は、CO<sub>2</sub> の濃度変化には応答せず構成的であることから、翻訳後修飾によって CO<sub>2</sub> 欠乏シグナルを伝達している可能性を示している。また CCM1 タンパク質のアミノ酸配列から転写因子や調節因子にみられる亜鉛フィンガードメインと相同な配列 (Cx<sub>4</sub>Cx<sub>12</sub>Hx<sub>5</sub>D) を持つことを示している。これらの結果に基づき、*Ccm1* 遺伝子が無機炭素濃縮機構の調節遺伝子として重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

第 2 章では、CCM1 タンパク質のもつ CCHD 型の亜鉛フィンガー様ドメインの重要性について述べている。CCM1 タンパク質は従来知られている CCHH 型の亜鉛フィンガードメインの最後の H が D に置換していた。そこで、このドメインが CCHH 型と同様に機能すること、CCM1 が機能する上で重要であることを調べるため、CCHD の D に部位特異的変異を導入している。CCHH に置換しても CCM1 タンパク質は正常に機能したが、CCHV に置換した場合は機能しないことを示している。更にこのドメインが重要であることを調べるため、*Ccm1* 遺伝子によって変異が相補される変異株 *cia5* の解析を行い、変異株 *cia5* では CCYD と置換していたため CCM1 タンパク質が機能しないことを明らかにしている。これらの結果に基づき、亜鉛フィンガー様ドメイン CCHD の H, D が CCM1 タンパク質の働きに必須であり、CCHD 型の亜鉛フィンガーモチーフの存在および、CCM1 タンパク質が調節因子として働く可能性を示唆している。

第 3 章では、*Ccm1* 遺伝子によって調節される遺伝子を明らかにするため、10,368EST クローンスポットした cDNA マクロアレイを用いて網羅的に解析している。*Ccm1* 遺伝子は 66 種の遺伝子を調節していた。この中には 55 種の低 CO<sub>2</sub> 誘導性遺伝子や、低 CO<sub>2</sub> 誘導性ではないが無機炭素濃縮機構に重要な遺伝子 *Cah3* を含む 11 種の遺伝子が含まれていた。また *Ccm1* 遺伝子によって調節を受ける遺伝子の中には、炭酸脱水酵素の遺伝子の他に無機炭素の取り込みに関わると考えられる遺伝子 (*LciA*, *LciB*) や光呼吸系の遺伝子も含まれており、*Ccm1* 遺伝子がシグナル伝達の上位に位置し、多岐にわたって下流の遺伝子の発現を調節していると述べている。

## 論文審査の結果の要旨

C3型の光合成を行う生物では、CO<sub>2</sub>のリブローズビスリン酸カルボキシラーゼへの供給が光合成の律速となっている。水生光合成生物は、環境中のCO<sub>2</sub>の欠乏を検知し、そのシグナルを伝達し、無機炭素濃縮機構に関わる遺伝子の発現を活性化させ、CO<sub>2</sub>を細胞内へ能動的に取り込むことができる。このようなCO<sub>2</sub>欠乏シグナルの伝達に関する分子機構は全く明らかにされておらず、その解明が待たれてきた。本論文は、光合成のモデル生物として広く用いられている緑藻クラミドモナスにおいて、CO<sub>2</sub>欠乏シグナルの伝達機構に関わる遺伝子を単離し、その分子機構の解明を試みたものである。本論文の評価すべき点は以下の通りである。

1. CO<sub>2</sub>欠乏シグナル伝達に変異をもつ変異株 C16 の変異を相補する遺伝子 *Ccm1* を単離した。CCM1 タンパク質は既知タンパク質と相同性を示さなかったことから、新奇な遺伝子であると確定した。この *Ccm1* 遺伝子が炭酸脱水酵素の遺伝子 (*Cah1*, *Mca*, *Cah3*) の発現や無機炭素の取り込みを調節する調節因子であることを明らかにしている。
2. CCM1 タンパク質にこれまでに報告のある転写因子や調節因子にみられる亜鉛フィンガードメインと相同な配列 (Cx<sub>4</sub>Cx<sub>12</sub>Hx<sub>5</sub>D) を見出している。CCHV に置換した場合や、他の低CO<sub>2</sub>応答性変異株 *cia5* に見られるように CCYD の変異が生じた場合は、CCM1 タンパク質が機能しないことを明らかにしている。これらの結果から、この亜鉛フィンガー様ドメインにおいて H, D が遺伝子発現の調節に必須であることを明らかにし、CCM1 タンパク質がもつ CCHD 型の亜鉛フィンガー様ドメインの重要性を指摘している。
3. 10,368EST クローンよりなる cDNA マクロアレイを用いて、*Ccm1* 遺伝子によって調節を受ける遺伝子を網羅的に解析している。この解析により、*Ccm1* 遺伝子が無機炭素濃縮機構に重要な炭酸脱水酵素の遺伝子や無機炭素の取り込みに関わる遺伝子など、多数の遺伝子の発現を調節していることを見出している。これらの結果から、*Ccm1* 遺伝子が無機炭素濃縮機構の調節において中心的な役割を果たすと結論している。
4. 低CO<sub>2</sub>に応答した遺伝子発現調節に関する新たなモデルを提唱している。

以上のように本論文は、CO<sub>2</sub>濃度変化に応じて発現される無機炭素濃縮機構の調節に関する理解を大幅に前進させたものであり、植物分子生物学、植物生理学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値のあるものと認める。

なお、平成14年2月21日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。