

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	新川 はるか
論文題目	炭素と窒素の栄養バランス応答における緑藻のタンパク質リン酸化酵素 TAR1の機能		
(論文内容の要旨)			
<p>微細藻類は窒素欠乏により炭素 (C) / 窒素 (N) 比が崩れると、中性脂質のトリアシルグリセロール (TAG) やデンプンを蓄積する一方、クロロフィルや光合成関連タンパク質を分解することが知られている。これまでに、緑藻クラミドモナス <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> から低 TAG 蓄積変異体 <i>tar1-1</i> が単離され、その変異原因遺伝子 TAG accumulation regulator1 (TAR1) が Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated protein kinase (DYRK) をコードすることが示されている。TAR1 は、培地中に有機炭素源として酢酸を含む混合栄養かつ N 欠乏条件下において、脂肪酸合成の炭素源となる酢酸利用を促進し、TAG 生合成を正に制御する因子と推定されていた。しかし、光独立栄養かつ N 欠乏条件下で光合成により固定された炭素に由来する TAG の蓄積制御において、TAR1 の役割は不明であった。また、タンパク質リン酸化酵素である TAR1 が標的とするタンパク質についても知見がなかった。そこで本研究では、光独立と光混合栄養条件それぞれにおける C/N ストレス条件での変異株 <i>tar1-1</i> の生理応答を明らかにし、TAR 依存的に発現レベルが変動する遺伝子群ならびに TAR1 のリン酸化標的候補因子を推定することにより、TAR1 を介した C/N ストレス応答の分子機構を推定した。</p> <p>光独立栄養で通気する CO₂ 濃度が 5% かつ N 欠乏条件下においては、炭素源が酢酸である光混合栄養条件とは異なり、<i>tar1-1</i> は野生株よりも TAG とデンプンを蓄積した。この <i>tar1-1</i> における TAG とデンプンの高蓄積は、光合成関連タンパク質の分解が抑制され、光合成能と生存性が維持されることによると推定した。一方、<i>tar1-1</i> では DNA やタンパク質を損傷する過酸化水素産生量が野生株よりも低下しており、なおかつ活性酸素除去系の酵素遺伝子群の発現量が野生株よりも増加していた。また <i>tar1-1</i> では、N 欠乏による配偶子誘導が進まず、その鍵因子 <i>MID</i> の転写産物量も野生株よりも低下していた。組換え TAR1 部分タンパク質とクラミドモナス野生株由来の全タンパク質との <i>in vitro</i> 反応物、ならびに <i>tar1-1</i>、野生株および相補株から抽出した全タンパク質についてそれぞれリン酸化プロテオーム比較解析を行い、TAR1 のリン酸化標的候補因子を 18 個推定した。その中には細胞分裂促進因子活性化タンパク質リン酸化酵素の上流リン酸化酵素 (MLTK) やカルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質リン酸化酵素 (CDPK11) が含まれていた。</p> <p>以上の知見から、TAR1 は C/N ストレスに応答して細胞内タンパク質のリン酸化状態に影響を与えることで、配偶子誘導と活性酸素種の発生を正に制御し、それに伴い光合成関連タンパク質の分解を促進することで光合成活性を負に制御する因子であることが示唆された。リン酸化プロテオミクス解析により MLTK1 や CDPK11 を含む 18 種の TAR1 のリン酸化標的候補因子を推定し、TAR1 を介した C/N ストレス応答の分子機構の一端を明らかにした。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

栄養源の窒素欠乏により炭素 (C) / 窒素 (N) 比が崩れると細胞は、中性脂質のトリアシルグリセロール (TAG) やデンプンを蓄積する一方、クロロフィルや光合成関連タンパク質を分解する。これまでに緑藻クラミドモナス *Chlamydomonas reinhardtii* から単離された低 TAG 蓄積変異体 *tar1-1* の解析により、Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated protein kinase (DYRK) をコードする遺伝子 *TAG accumulation regulator1* (*TAR1*) が TAG 蓄積の制御に必要であることが示されている。*TAR1* は、酢酸存在下の N 欠乏条件下で、脂肪酸合成の炭素源となる酢酸利用を促進し、TAG 生合成を正に制御すると推定されていた。しかし、酢酸が存在しない光独立栄養かつ N 欠乏条件下での機能は不明であった。また、*TAR1* のリン酸化標的タンパク質についても不明であった。

本研究では、光独立と光混合それぞれの C/N ストレス条件で変異株 *tar1-1* の生理応答を比較解析し、*TAR* 依存的に発現レベルが変動する遺伝子群ならびに *TAR1* のリン酸化標的候補因子を推定することにより、*TAR1* を介した C/N ストレス応答の新しい分子機構を推定した。

光独立栄養条件での N 欠乏ストレス環境において通気する CO₂ 濃度が 5% の場合には、光混合栄養条件とは逆転して、変異株 *tar1-1* が野生株よりも TAG とデンプンを蓄積することを見出した。この *tar1-1* における TAG とデンプンの異常蓄積は、光合成関連タンパク質の分解の抑制と、光合成能ならびに生存性の維持に依存することを示唆した。

また N 欠乏環境における *MID* を介した配偶子誘導が *TAR1* に依存することを示唆した。さらに、組換え *TAR1* 部分タンパク質とクラミドモナス野生株由来の全タンパク質との *in vitro* 反応産物、ならびに *tar1-1*、野生株および相補株から抽出した全タンパク質それぞれについてリン酸化プロテオーム比較解析を行い、*TAR1* のリン酸化標的候補因子を 18 個推定している。

上記の知見から、*TAR1* は C/N ストレスに応答し細胞内タンパク質のリン酸化状態を変えて配偶子誘導を正に制御すること、また、それに伴い光合成関連タンパク質の分解を促進することで光合成活性を負に制御する因子であることを示唆した。さらに、リン酸化プロテオミクス解析により *MLTK1* を含む 18 種の *TAR1* のリン酸化標的候補因子を推定し、*TAR1* を介した C/N ストレス応答の分子機構の一端を明らかにした。

以上のように、本論文は生命科学に関する高度で幅広い学識、植物分子細胞生物学分野における優れた研究能力、そして生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見が示されており、論理的かつ一貫性を持って記述されている。よって博士 (生命科学) の学位論文として価値があると認めた。さらに、平成 31 年 3 月 1 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： 令和 年 月 日