

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	小出 絵里
論文題目	苔類ゼニゴケにおいて光合成依存的にリン酸化されるRaf様キナーゼの機能解析		
(論文内容の要旨)			
<p>植物の適切な生育にはエネルギーの生産と消費、貯蔵のバランスをとることが重要である。そのような例として、光合成の電子伝達系の酸化還元状態に依存した遺伝子発現制御や、光合成産物の糖がシグナルとして細胞周期を制御することなどが知られている。しかし、植物の成長を光合成と調和させるシグナリング機構については依然不明な点が多い。そこで、本研究では光合成の刺激に応答する新奇シグナル伝達因子を同定するために、モデル植物の苔類ゼニゴケ <i>Marchantia polymorpha</i>を用いてリン酸化プロテオーム解析を行った。暗処理した植物体に光照射することでリン酸化レベルが変動し、かつ光合成阻害剤存在下ではその変動が見られないリン酸化ペプチドを探索した。新奇な光合成シグナル伝達因子の候補として、PHOTOSYNTHESIS-RELATED RAF (MpPRAF) と名付けた Raf様プロテインキナーゼに注目した。MpPRAFはB4グループのRaf様キナーゼに分類され、このグループの光合成に関連した機能はこれまでどの植物種においても報告されていなかった。多くのB4グループRaf様キナーゼと同様に、MpPRAFはN末端側にタンパク質相互作用に機能することが予想されるPB1ドメインが、C末端側にプロテインキナーゼドメインが保存されている。</p> <p>まず、抗MpPRAF抗体を用いた生化学的解析により、光合成活性依存的なMpPRAFのリン酸化を確認し、また暗所においては脱リン酸化されることを明らかにした。MpPRAFのリン酸化状態は光合成活性に応答して制御されていることが示唆された。</p> <p>次に、Mppraf変異株を作出したところ、成長遅延がみられた。内生の炭水化物の測定により、Mppraf変異株ではデンプンが高蓄積し、スクロースが減少することが示された。デンプンの生合成を阻害しても成長遅延とスクロース減少は抑圧されなかったことから、デンプンの高蓄積はMppraf変異株の成長遅延の一次的な原因ではないことが示唆された。さらに、スクロース添加により野生型株では内生のスクロース量が増加したが、Mppraf変異株では増加がみられなかった。スクロース添加培地においてもMppraf変異株の成長は有意には回復せず、スクロース非含有培地における野生型株に比べて遅延していた。よって、Mppraf変異株ではスクロースの生合成と蓄積の両方が著しく損なわれていることが示唆された。また、Mppraf変異株では光合成電子伝達が低下しており、多面的な表現型がみられた。</p> <p>続いて、野生型MpPRAF、およびキナーゼ不活性型MpPRAF<sup>D1540N</sup>遺伝子を用いて相補実験を行ったところ、成長遅延や炭水化物代謝異常といったMppraf変異株の表現型は、野生型遺伝子では相補したのに対し、MpPRAF<sup>D1540N</sup>遺伝子では相補されなかった。そのため、MpPRAFは生体内でプロテインキナーゼとして機能することが必要であることが示唆された。また、光照射をしてもMpPRAF<sup>D1540N</sup>のリン酸化は誘導されなかった。MpPRAF自身のキナーゼ活性が、光合成依存的なリン酸化にも必要であることが示唆された。</p> <p>本研究により、光合成の刺激に応答してリン酸化される新奇プロテインキナーゼMpPRAFの同定に至った。MpPRAFは主にスクロース代謝を制御することで、炭水化物代謝のバランスを調節するプロテインキナーゼであることが明らかになった。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

植物の適切な生育にはエネルギーの生産と消費、貯蔵のバランスをとることが重要であるが、植物の成長を光合成と調和させるシグナリング機構については依然不明な点が多い。本研究は、そのようなシグナリングを行う新奇因子として、苔類ゼニゴケを用いたリン酸化プロテオーム解析によりRaf様プロテインキナーゼMpPRAFを同定し、その機能解析の結果をまとめたものである。以下の発見が報告されている。

- 1) 暗処理した植物体に光照射することでリン酸化レベルが変動し、かつ光合成阻害剤存在下ではその変動が見られないリン酸化ペプチドを、リン酸化プロテオーム解析により多数同定した。その中に、これまでに光合成に関する機能は報告されていない、B4グループのRaf様キナーゼを見出した。
- 2) 抗MpPRAF抗体を用いた生化学的解析により、MpPRAFのリン酸化状態は光合成活性に相関して変動することを明らかにした。
- 3) MpPRAFの機能欠損により成長が遅延することを明らかにした。炭水化物の定量実験より、Mppraf変異体ではデンプンが高蓄積し、スクロースが減少していることを示した。デンプンの生合成を阻害しても成長遅延とスクロース減少は抑圧されないことを見出し、Mppraf変異株の成長遅延の一次的な原因はデンプンの高蓄積ではないことが示唆された。また、Mppraf変異株にスクロースを外部添加しても内生のスクロース量は増加せず、成長を回復させることもなかった。よって、Mppraf変異株ではスクロースの生合成と蓄積の両方が著しく損なわれていることが示唆された。
- 4) Mppraf変異株では、スクロース代謝異常の影響として光合成電子伝達が低下していることを示した。
- 5) キナーゼ活性がMpPRAFの機能と自身のリン酸化に必須であることを明らかにした。

以上の知見から本研究では、B4グループのRaf様キナーゼMpPRAFが光合成の刺激に応答してリン酸化されること、また、MpPRAFは主にスクロース代謝を制御することで炭水化物代謝のバランスを調節するキナーゼであることが明示された。当初の狙い通り、光合成刺激に応じて成長を調和させる新たな分子機構の存在を明らかにしたことは評価できる。

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、植物生理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ならびに概念が示されており、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あるものと認めた。さらに、令和2年2月3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