

氏 名	いとう ひさし 伊 藤 寿
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 1836 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 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	理 学 研 究 科 植 物 学 専 攻
学位論文題目	クロロフィル a とクロロフィル b の代謝系の解析

論文調査委員 (主 査) 教 授 岡 田 清 孝 教 授 藤 澤 久 雄 講 師 田 中 歩

論 文 内 容 の 要 旨

申請者はクロロフィル合成の最終段階であるクロロフィル a からクロロフィル b を合成する遺伝子のクローニングを試みるとともに、その逆反応であるクロロフィル b からクロロフィル a への代謝系の存在を明らかにした。

クロロフィル b のフィチル基をクロロフィラーゼで加水分解して調製したクロロフィライド b を、オオムギの単離エチオプラストと暗所でインキュベートすると、クロロフィル b とともに 7-ヒドロキシメチルクロロフィル、クロロフィル a が蓄積していた。クロロフィル b を水素化ホウ素ナトリウムで還元して 7-ヒドロキシメチルクロロフィルを合成し、7-ヒドロキシメチルクロロフィライドを調製した。これをエチオプラストとインキュベートしたところ、7-ヒドロキシメチルクロロフィルとクロロフィル a が蓄積していた。クロロフィル a のメチル基がフォルミル基に酸化されてクロロフィル b は合成されるが、これらの結果より、その逆反応のクロロフィル b からクロロフィル a への代謝系が存在し、その中間体は 7-ヒドロキシメチルクロロフィルであることが明らかになった。C¹⁴-クロロルイライド b をキュウリのエチオプラストとインキュベートすると ¹⁴C-クロロフィル a が蓄積することより、エチオプラスト内在のプロトクロロフィライドがクロロフィル a に代謝されたのではなく、外から与えたクロロフィライド b がクロロフィル a の基質になっていることが確認された。オオムギのクロロフィル b 欠損突然変異体のエチオプラストでもクロロフィライド b からクロロフィル a が合成されたので、クロロフィル a からクロロフィル b の合成と、クロロフィル b からクロロフィル a の合成は別々の酵素によると思われる。

クロロフィル b からクロロフィル a への変換の 2 段階の反応は、どちらも ATP が必要であり、また変換反応にはプラスチドの膜画分とともに、ストロマ画分も必要である。

クロロフィル b の C-13² のカルボメトキシ基を水素に置換したピロクロロフィル b もピロクロロフィル a に変換された。ピロクロロフィル a が高速液体クロマトグラフィーで他のクロロフィルより分離できることを利用して、黄化子葉の緑化による変換系の活性の変化を調べた。その結果、緑化が進んでもク

クロロフィル *b* からクロロフィル *a* への変換系の活性はあまり変化せず、クロロフィルを蓄積していない黄化葉の段階で十分に準備されていることが明らかになった。

クロロフィル *b* 合成酵素をコードする遺伝子の単離を目的として、クラミドモナスのクロロフィル *b* 欠損突然変異体を作製し、その解析を行った。細胞壁と硝酸還元酵素を欠くクラミドモナスを材料として用いた。クラミドモナスの硝酸還元酵素をコードするゲノム DNA 断片とともに、ガラスビーズと攪拌することによって DNA 断片がゲノムにランダムに挿入される。このようにして作製した形質転換体から、クロロフィル *b* の蛍光によってスクリーニングし、クロロフィル *b* 欠損突然変異体を 4 系統単離した。ゲノム DNA を解析したところ、それらのうち 3 系統は同じ部位の DNA を欠失していた。この結果よりこの領域にクロロフィル *b* 合成酵素がコードされていると推測される。

論文審査の結果の要旨

高等植物や緑藻は光合成色素としてクロロフィル *a* とクロロフィル *b* を持つ。申請者はこれらの色素の代謝系について、クロロフィル *a* からクロロフィル *b* を合成する酵素をコードする遺伝子のクローニングを試みるとともに、単離プラスチドによる生理的実験によりクロロフィル *b* からクロロフィル *a* への変換系の存在を明らかにした。

クロロフィル合成過程においてクロロフィル *b* の合成は、その重要性に比べて反応の解析が大きく遅れている。この反応機構を明らかにすることはクロロフィル合成だけでなく、クロロフィルタンパク質複合体の構築を調べる上でも重要な意義がある。単離プラスチドなどによるクロロフィル *b* の合成系が確立していないため反応機構の解析が遅れていたが、申請者はクロロフィル *b* 合成酵素の遺伝子を単離することによって、クロロフィル *b* 合成反応を明らかにしようとした。実験材料としてクラミドモナスを用いた。クラミドモナスは形質転換体からの遺伝子の単離法がまだ完全には確立されていないが、半数体であることや、形質転換が極めて容易であることなど、今後遺伝子を単離する目的で広く使われるようになると期待される材料である。申請者は 4 つのクロロフィル *b* 欠損突然変異体を単離し、そのうち 3 つがゲノム上で同じ部位を欠失していることを明らかにした。このことよりこの領域にクロロフィル *b* 合成酵素がコードされていると思われ、この結果を利用することにより遺伝子を容易にクローニングできると期待される。

クロロフィル *b* からクロロフィル *a* の代謝系の解析については、本論文においてその存在が初めて明らかになった。クロロフィルはフィチル基を持つため疎水性であり、そのため酵素反応の基質とすることが困難であり、それがクロロフィルの代謝を調べる上で大きな問題点であった。そこで本論文において基質としてクロロフィルの前駆体のクロロフィランドを使用し、単離プラスチド内でクロロフィルに代謝させることによってクロロフィルの変換を調べている。このような実験系を用いたことが本論文において極めて独創的な点である。またこの変換系の中間体が 7-ヒドロキシメチルクロロフィルであることを明らかにし、さらに緑化過程におけるこの変換系の活性をクロロフィルの類似体であるピクロクロロフィルを用いて調べ、黄化葉の段階で十分に高い活性を持つことを明らかにした。このような実験系において本論文ではクロロフィルを化学修飾したものを有効に利用している。この点も本論文の大きな特徴となっている。

この変換系は植物の光適応において重要な役割を果たしていると思われる。またクロロフィルの分解過程でこの変換系が働いているという仮説が、既にいくつかのグループによって発表されている。このようにこの変換系の存在が明らかになったことにより、クロロフィルの合成以外の分野でも新しいモデルをつくることが可能となった。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本論文及び参考論文に報告されている研究業績とこれに関連した研究分野について、生物科学専攻植物学系の予備審査において諮問した結果、合格と認められた。また、申請論文は共著の形式をとっているが、申請者の寄与が大きいと認められ、共著者の承諾も得ている。