

(論文内容の要旨)

光合成における電子供与体の水と比べて、基質となる CO_2 が不足しがちな水圏環境で生育する微細藻類は、細胞内に無機炭素 (CO_2 や HCO_3^-) を能動的に輸送・濃縮する無機炭素濃縮機構 (Carbon-concentrating mechanism: CCM) を持つ。シアノバクテリアではこれまでに 5 種類の無機炭素輸送系が同定され、その局在と機能が調べられているが、真核藻類では無機炭素輸送系の遺伝子候補の推定にとどまっており、その機能や局在の解析も進んでいない。代表的な真核藻類のクラミドモナスでは、葉緑体包膜やチラコイド膜に局在する無機炭素輸送系と葉緑体ストロマやチラコイド膜ルーメンに局在する炭酸脱水酵素により、細胞外から細胞内微細構造ピレノイド内の Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase へと無機炭素が輸送される経路のモデルが報告されている。このモデルに寄与する炭酸脱水酵素が同定されているが、無機炭素輸送系の実体は明らかでない。そこで本研究では、クラミドモナスの CCM に関わる遺伝子群を網羅的に特定するとともに、その中でも無機炭素輸送系に関わることが期待された LCIB に着目しその機能と局在を解析した。

第 1 章においては、クラミドモナスにおける CCM の誘導が環境中の CO_2 濃度の低下のみならず光強度の上昇にも影響を受けることを見出し、クラミドモナスの CCM が誘導される条件下で特異的に発現が誘導される 40 個の遺伝子群を cDNA アレイ法により特定した。これらの遺伝子群の中には、葉緑体包膜に局在する無機炭素輸送体の候補遺伝子 *LciA* や *Ccp1* に加えて、*LciB* や *LciC* などの機能未知遺伝子や、CCM の発現制御に関わる可能性がある GTPase をコードする *Lci14* が含まれていた。

第 2 章においては、第 1 章で特定した遺伝子群の中でも特に機能未知の親水性タンパク質をコードする遺伝子 *LciB* に着目し、その機能と細胞内局在を解析した。本研究では RNA 干渉法 (RNAi) を利用し、LCIB の蓄積が減少した株を複数単離し、その光合成特性を解析した。RNAi 株では、0.04 % の CO_2 を通気した低 CO_2 条件において無機炭素の取り込み活性が野生株の約 40% にまで減少し、光合成活性が低下することで正常な生育が阻害された。また RNAi 株は 0.01 % の CO_2 を通気した極低 CO_2 条件では、野生株と同程度に無機炭素を取り込むことで正常に生育した。これは LCIB が低 CO_2 条件における無機炭素輸送に寄与することを示唆する。また RNAi による LCIB のタンパク質レベルの減少により、一次構造が類似した機能未知タンパク質 LCIC の蓄積レベルも減少することを見出した。LCIB 及び LCIC と GFP との融合タンパク質を発現する株の蛍光観察像から、LCIB と LCIC はピレノイド周囲に局在することが考えられた。また間接免疫蛍光染色法と免疫金コロイド電子顕微鏡法による観察結果より、LCIB と LCIC はピレノイド周囲ならびにピレノイドを貫通するチラコイド膜に沿って局在すると考えられた。また酵母 two-hybrid 法による相互作用の検出とゲル濾過カラムクロマトグラフィによる *in vivo* の分子質量の推定より、LCIB と LCIC は低 CO_2 条件において約 350 kD の高分子複合体を形成することが示された。LCIB と LCIC は膜貫通ドメインを持たないことから、LCIB/LCIC 複合体はチラコイド膜に局在する未同定の無機炭素輸送体と相互作用することで、チラコイド膜を介する無機炭素輸送系に寄与する可能性が強く示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

光合成において、基質となる二酸化炭素 (CO_2) の供給は重要な要因の一つであるため、多くの藻類は無機炭素を細胞内に能動的に輸送・濃縮する無機炭素濃縮機構 (CCM) を持つ。真核藻類の無機炭素輸送に関わる分子はその候補の推定にとどまっており、機能や局在の解析は進んでいなかった。本研究は真核緑藻クラミドモナスの CCM に関わる遺伝子群を網羅的に特定するとともに、その中でも *LciB* に着目し、その機能と局在を解析したものであり、以下の点が特に評価される。

第 1 章では、細胞の無機炭素への親和性と CO_2 のガス交換活性を測定することで、クラミドモナスの CCM が誘導される条件を検討し、その条件下で誘導される遺伝子群を特定している。まずクラミドモナスの CCM が 0.04% の CO_2 を通気した低 CO_2 条件のみならず、1.2% の CO_2 を通気した条件で光強度の上昇によっても誘導されることを見出している。さらにこの複数の CCM 誘導条件で、発現が誘導される 40 個の遺伝子群を、cDNA アレイを用いて特定している。これらの遺伝子群の中には、無機炭素輸送体の候補遺伝子を含む 15 個の既知の低 CO_2 誘導性遺伝子が含まれていると共に、残りの 25 個の遺伝子のうち 23 個について、実際に低 CO_2 条件で誘導されることを半定量的 RT-PCR により確かめ、*Lci7* から *Lci29* までを新たに見いだしている。

第 2 章では、第 1 章で特定した遺伝子の中から機能未知タンパク質をコードする遺伝子 *LciB* に着目し、その機能と局在を解析している。まず RNA 干渉法を利用し、LCIB の蓄積が減少した株を単離し、その光合成特性と無機炭素の取り込み活性を測定することで、LCIB が低 CO_2 条件において無機炭素の輸送に寄与することを見出している。また RNA 干渉による LCIB の蓄積レベルの減少により、一次構造が類似した機能未知タンパク質 LCIC の蓄積レベルも減少することを見出している。さらに酵母 two-hybrid 法による相互作用の検出とゲル濾過カラムクロマトグラフィによる分子質量の推定より、LCIB と LCIC が相互作用し、低 CO_2 条件において約 350 kD の高分子複合体を形成することを示している。また GFP 蛍光、間接免疫蛍光染色、免疫金コロイド電子顕微鏡観察による局在解析から、LCIB と LCIC は低 CO_2 条件において、真核藻類に広く見られる細胞内微細構造ピレノイドの周囲とピレノイドを貫通するチラコイド膜に沿って共局在することを見出している。LCIB と LCIC は膜貫通ドメインを持たないことから、LCIB/LCIC 複合体はピレノイドを貫通するチラコイド膜に局在する未同定の無機炭素輸送体と共に、チラコイド膜を介する無機炭素輸送系に寄与する可能性を示している。

これらの研究成果は、CCM に寄与する遺伝子群の推定とその逆遺伝学的解析が、クラミドモナスの CCM を分子レベルで理解する上で有効なアプローチであることを示したことに加え、LCIB/LCIC 複合体の解析はピレノイドを介する無機炭素輸送機構の解明に大きく貢献すると考えられ、真核生物の無機炭素輸送系を理解する上で先駆的な研究成果として評価できる。よって、本論文は博士 (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 20 年 8 月 1 日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、博士 (生命科学) の学位を授与される学力があるものと認めた。