

学 位 審 査 報 告 書

(ふりがな) 氏 名	こばやし ゆうすけ 小林 優介
学位（専攻分野）	博 士 （ 理 学 ）
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学 位 授 与 の 日 付	平成 年 月 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 生物科学専攻
(学位論文題目) Molecular structure and evolution of chloroplast nucleoids (葉緑体核様体の分子構造と進化)	
論 文 調 査 委 員	(主査) 鹿内 利治 教授 長谷あきら 教授 小山 時隆 准教授

理 学 研 究 科

(続紙 1)

京都大学	博 士 (理 学)	氏名	小林 優介
論文題目	Molecular structure and evolution of chloroplast nucleoids (葉緑体核様体の分子構造と進化)		
(論文内容の要旨)			
オルガネラDNAは生体内において裸で存在せず、細胞核における染色体同様に塩基性タンパク質と相互作用することで、「核様体」を形成する。核様体は、オルガネラDNAの複製、遺伝、修復、遺伝子発現などの重要な足場として機能すると提唱されてきた。しかし、その詳細な分子構造や進化についての知見は限られたものであった。			
第1章：葉緑体核様体因子としての亜硫酸還元酵素の進化的矛盾の解消			
亜硫酸還元酵素 (SiR) は、陸上植物の葉緑体核様体タンパク質のコア因子として初めて報告された。しかし、その後の解析でSiRには、葉緑体核様体局在型と非局在型が混在することが明らかとなった。そこで様々なSiRのアミノ酸配列を比較解析した結果、核様体局在型SiRのみに保存されたペプチド (C-terminally Encoded Peptide : CEP)を発見した。このCEPを非葉緑体核様体型であるシロイヌナズナのSiR に融合させたところ、核様体局在型に変化したことから、SiRの葉緑体核様体局在／非局在の変化は、進化においてCEPが複数回独立して欠損したためであることが示唆された。			
第2章：葉緑体核様体構造の進化モデルの提唱			
植物の進化における葉緑体核様体のタンパク質構成の変遷を明らかにするため、まず緑藻クラミドモナスに注目し、その葉緑体核様体を精製し、LC-MS/MSによる網羅的質量分析を行った。さらに植物の陸上化に伴う葉緑体核様体の進化を明らかにするため、車軸藻植物門クレブソルミディウムと基部陸上植物ゼニゴケのゲノム解析を行い、同定された遺伝子産物の局在やDNA結合能を間接蛍光抗体法やDNAゲルシフトアッセイを用いて評価した。以上より、葉緑体核様体の進化について、バクテリア由来の因子が、宿主由来の因子へと徐々に置換されてきたとするモデルを提唱した。			
第3章：RECAは葉緑体核様体の形態を制御する			
クラミドモナスのRECAは、葉緑体DNAの相同組換えの開始、制御において重要であるが、RECAの蓄積量を増加させると葉緑体核様体は葉緑体全体を縦断する巨大なファイバーに、抑制すると1個の塊へと、葉緑体核様体の形態が劇的に変化し、葉緑体ゲノムのコピー数や異常な相同組換えが引き起こされることを明らかにした。葉緑体RECAは葉緑体ゲノムの複製や安定性に関わるだけではなく、DNAのトポロジーを変化させることで葉緑体核様体の形態や構造も制御している可能性が示唆された。			
第4章：MOC1変異体解析による葉緑体初のホリデイジャンクション切断機構の発見			
クラミドモナスのMOC変異体は、葉緑体DNAコピー数や葉緑体核様体の数が減少する表現型を示す。マッピングやTAIL-PCR、外来遺伝子による相補実験を繰り返し、原因遺伝子を同定した。遺伝子機能の生化学的解析により、MOC 1は相同組換えの最終ステップであるホリデイジャンクション(HJ)の切断を行うことが示唆された。葉緑体のHJ切断酵素が発見されたのはこれが世界初であり、それが藻類から陸上植物に至る			

(続紙 2)

まで細胞分裂時や色素体分化における葉緑体核様体の分離において重要な役割を果たしていることが示された。

(論文審査の結果の要旨)

小林氏が研究した葉緑体核様体は、蛍光顕微鏡やDNA染色法の開発により1980年代に発見され、その詳細な挙動が主に細胞学的に研究されてきた。これら観察結果に基づき、葉緑体核様体は藻類から陸上植物に至るまで普遍的に観察される構造体であり、葉緑体ゲノムの複製、修復、遺伝子発現、遺伝の基本的ユニットであると提唱されてきた。その一方、葉緑体核様体の分子構成についてはなかなか研究が進んでこなかった。近年の質量分析法の劇的進歩に促され、ようやく陸上植物において網羅的解析が行われるようになってきたものの、植物全体を俯瞰してみればそれは「点」の理解に過ぎない。そこで小林氏は、緑藻クラミドモナス、車軸藻クレブソルミディウム、基部陸上植物ゼニゴケ、陸上植物シロイヌナズナなど、植物の進化過程の各段階を反映するモデル生物群に着目して葉緑体核様体の分子構成の変遷を解析した。その結果、顕微鏡下では似通った輝点にしか見えない葉緑体核様体の構成が、分子レベルで見れば緑藻と陸上植物で全く異なっており、進化の中でバクテリア型から真核型へと大きく変遷してきた事を明らかにした(第2章)。さらに陸上植物において、これまで代表的な葉緑体核様体タンパク質として知られてきた亜硫酸還元酵素の葉緑体核様体への局在について、そのC末ペプチドが重要な役割を果たしていることを明らかにした(第1章)。これらの成果は葉緑体核様体の分子構成の進化について、今後の研究の重要な足がかりとなると思われる。

葉緑体核様体は静的な構造ではなく、細胞核染色体と同様、ダイナミックな挙動を示す。しかし、その基盤となる分子機構はほとんど分かっていなかった。本研究では、*RECA*というたった1つの遺伝子の発現を増減させることにより、葉緑体核様体が1個の塊から葉緑体全体を縦断するファイバーまで多様にその形態を変化させることが明らかになり、葉緑体核様体ダイナミズムを支える分子機構解明の布石が打たれた(第3章)。さらに、18年前に単離された変異体*moc1*について、最新のゲノムデータやTAIL-PCR技術をもとに原因遺伝子の同定に挑戦し、機能未知遺伝子に到達した。この遺伝子の機能について、生化学的解析を行った結果、それが葉緑体HJ切断酵素であることを発見した。葉緑体HJ切断酵素は、相同組換えの最終ステップとして重要な酵素であり、これまでファージ、細菌、ミトコンドリア、細胞核で同定されてきたが、葉緑体での発見はこれが初めてである。*MOC1*遺伝子は緑藻から陸上植物まで緑色植物に広く保存されており、葉緑体分裂や分化に伴う葉緑体核様体のすみやかな分離を実現する上で、この切断酵素の存在がなくてはならないものであることが示された(第4章)。

本研究の内容の一部は、植物科学の有力国際学術誌である*Genome Biology and Evolution*誌(第1章、第2章:各1報)及び*Plant Physiology*誌(第3章)に掲載され、もう1報発表予定(第4章)である。小林氏が実施した研究の質は高く、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。また、平成29年1月26日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った。その結果合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降