

氏 名	か とう ゆう すけ 加 藤 裕 介
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 52 号
学位授与の日付	平 成 17 年 11 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	生 命 科 学 研 究 科 統 合 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	形質転換植物体を用いた葉緑体核様体タンパク質 CND41 の機能解析

論文調査委員 (主 査)
教 授 佐 藤 文 彦 教 授 河 内 孝 之 教 授 山 本 憲 二

論 文 内 容 の 要 旨

植物細胞に固有のオルガネラである葉緑体はその存在する細胞の状態により、様々に機能分化している。タバコ培養細胞の葉緑体核様体から DNA 結合性蛋白質 CND41 (Chloroplast Nucleoid DNA-binding protein 41 kD) が単離され、葉緑体光合成関連遺伝子の発現調節に関与していることが示されていた。一方、CND41 には DNA 結合性領域とともにアスパラギン酸プロテアーゼの活性中心が存在し、窒素欠乏条件下の老化ならびに下位葉における蛋白質の分解に関与していることが明らかになってきていた。しかし、CND41 がどのように葉緑体蛋白質の分解に関与しているかについては不明であった。本研究では CND41 の発現を抑制した形質転換体とともに過剰発現体を作製し、これらの植物体を用いて CND41 の生理的機能の解明ならびに機能調節機構の解明を目指した。

第 1 章では、CND41 の発現抑制体を用いて、窒素欠乏処理によって誘導されるタバコ植物体の老化過程における葉緑体蛋白質の変動を解析した。その結果、CND41 低発現植物体では、野生株では老化が誘導されるはずの下位葉で、Rubisco の分解が顕著に抑制されていることを明らかにした。さらに CND41 を過剰発現する高発現植物体を作製し、生理的老化に対する影響を観察した。その結果、上位葉においては CND41 が発現するにもかかわらず老化は誘導されないこと、一方、下位葉では明らかに過剰発現により老化が促進されることを認めた。これらの結果から、CND41 が緑葉の老化において葉緑体蛋白質、特に Rubisco の分解に関与しており、その活性は転写後制御を受けていることを示唆した。

第 2 章では、CND41 のプロテアーゼ活性の転写後調節機構を解析するために、新たに CND41 特異的ペプチド抗体を作製し、タバコ植物体内での CND41 の発現・蓄積について詳細に検討した。その結果、野生株では老化葉でのみ成熟型 (41kD) の CND41 の蓄積が認められたが、CND41 高発現植物体では上位葉においても 41kD の CND41 が蓄積していることを認めた。一方、41kD よりも SDS-PAGE にてさらに移動度の早い CND41 シグナルが、野生株ならびに CND41 高発現植物体の老化葉において検出された。このプロセッシングを受けたと考えられる CND41 と老化葉での Rubisco の減少は、よい相関を示していた。すなわち、CND41 がプロセッシングを受けることにより活性調節を受け、Rubisco のプロテアーゼとして機能している可能性が示唆された。このことを確認するべく、芽生えに窒素欠乏/糖処理し、老化を誘導する条件を確立し、解析した結果、明条件下、窒素欠乏/糖添加によって黄化(老化)が促進されるとともに、Rubisco の分解が生じること、また同時に CND41 の蓄積ならびにそのプロセッシングが顕著に生じていることを明らかとした。すなわち、自然老化のみならず、人工的に老化誘導した系においても、CND41 のプロセッシングと Rubisco の分解が生じていることを明らかにした。これらの結果から、CND41 が翻訳後修飾を受け、Rubisco の分解に関与するとともに、葉の老化を制御しているというモデルを示唆した。

第 3 章では、CND41 の機能の一般化を図るべく、タバコ CND41 と相同性の高い 2 種類のシロイヌナズナ CND41 ホモログの解析を行なった。解析の結果、シロイヌナズナにおいても、タバコ同様に窒素欠乏/糖添加の複合的処理によって CND41 ホモログの発現が増大すること、新たに作製した CND41 ホモログ高発現植物体では窒素欠乏処理により緑葉の黄

化が野生株より早まり、可溶性蛋白質の分解が促進されることを認め、シロイヌナズナ CND41 ホモログが緑葉の老化、ならびにその蛋白質分解に関与していることを示唆した。

以上の研究により、CND41 が植物体の老化を制御する機構の一部であることを示唆した。

論文審査の結果の要旨

植物細胞に固有のオルガネラである葉緑体は、光合成をはじめとする様々な機能を有し、その存在する細胞の状態により、機能分化制御されている。しかし、その機能制御の機構については、まだ、ほとんど解明されていない。本研究はタバコ培養細胞の葉緑体核様体から単離された DNA 結合性蛋白質 CND41 (Chloroplast Nucleoid DNA-binding protein 41 kD) がもつアスパラギン酸プロテアーゼ活性に着目し、これまでその本体が不明であった葉緑体の老化、特に、その主要タンパク質である Rubisco の分解に関わる分子の実体と、その分解制御の機構の解明を行なったものであり、その評価できる内容は以下の通りである

1) CND41 の発現を抑制した形質転換タバコ植物体を用いて、窒素欠乏処理によって誘導される老化条件下における葉緑体蛋白質の分解を解析し、野生株では Rubisco の分解が優先的に起こる条件で、Rubisco の分解が顕著に抑制されていることを明らかにしている。すなわち、生体内においても CND41 が老化時に Rubisco を特異的に分解しているプロテアーゼであることを初めて明らかにしている。

2) CND41 を過剰発現する高発現タバコ植物体を作製し、上位葉においては CND41 が発現するにもかかわらず老化は誘導されないこと、一方、下位葉では明らかに老化が促進されることを明らかにし、CND41 が転写後制御を受けていることを示唆している。

3) 新たに作製した CND41 特異的ペプチド抗体を用いたタバコ植物体の解析により、生育に伴う生理的な老化の進行において、41kD (成熟型) よりも SDS-PAGE においてさらに移動度の早い CND41 のバンドが、野生株ならびに CND41 高発現植物体の老化葉のいずれにおいても存在することを明らかにしている。さらに、このプロセッシングを受けたと考えられる CND41 と老化葉での Rubisco の分解は、よい相関を示すことを明らかにし、CND41 がプロセッシングを受けることにより活性調節を受け、Rubisco を分解している可能性を示唆している。

4) タバコ芽生えに明条件下、窒素欠乏/糖処理し、人工的に老化を誘導する条件を確立するとともに、同条件下における蛋白質分解の解析より、CND41 のプロセッシングと Rubisco の分解の相関があることを明確にしている。さらに、以上の結果をもとに、CND41 が翻訳後修飾を受け、Rubisco の分解に関与するとともに、葉の老化を制御しているというモデルを示している。

5) シロイヌナズナにおいて、タバコ CND41 と相同性の高い 2 種類の CND41 ホモログを見出し、それらの発現解析、ならびに過剰発現体の解析の結果、シロイヌナズナにおいても、タバコ同様に CND41 ホモログが緑葉の老化時における蛋白質分解に関与していることを示唆している。

以上の結果は、CND41 が植物の生活環において重要な老化過程を制御する機構の一部であることを示す重要な知見であり、植物分子生理学に寄与するところが多い。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。

なお、平成17年10月3日、論文内容とそれに関連した分野にわたり口頭試問した結果、博士(生命科学)の学位を授与される学力が十分にあるものと認めた。