

氏 名	こ ひ なた つとむ 小 白 向 務
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 135 号
学位授与の日付	平 成 20 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	生 命 科 学 研 究 科 統 合 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	緑藻の無機炭素濃縮機構を制御する因子CCM1の亜鉛結合性と制御を受ける遺伝子に関する研究

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

論 文 内 容 の 要 旨

植物は光合成を維持するために、種々の環境要因を検知して光合成機能を「順化」させることが知られている。光合成の基質である二酸化炭素 (CO_2) の濃度が不足しがちな水中では、細胞内に CO_2 および HCO_3^- といった無機炭素を能動的に輸送・濃縮することによって、炭酸固定能を維持する無機炭素濃縮機構 (CCM) が多くの水生光合成生物で知られている。代表的な単細胞緑藻クラミドモナスでは、 CO_2 欠乏条件下でのCCMの誘導に必須な制御遺伝子 *CcmI* が報告されているが、その遺伝子産物の細胞内蓄積量が極端に少ないために生化学的研究は進んでいなかった。CCM1のN末端部位には、亜鉛フィンガーと推定される領域が2カ所存在するが、これらの領域への亜鉛の結合性、又その領域の機能的な重要性は不明であった。第一章では、CCM1のN末端領域をGlutathione S-transferase融合タンパク質として大腸菌で発現するとともに、原子吸光法を用いて亜鉛の結合量を測定し、CCM1分子当たりの亜鉛結合数を算出した。その結果、CCM1のアミノ末端1-71および72-101アミノ酸領域に、それぞれ亜鉛1原子が結合していることが明らかとなった。さらに、この領域のH54, C77, C80アミノ酸残基のいずれかに置換変異を導入すると、亜鉛の結合性が失われることが判明した。一方、C36, C41, H54, C77, C80, H90, C93アミノ酸残基のいずれかに置換変異を導入した場合、低 CO_2 条件に応答したCCMの誘導ならびに、CCMに関与する複数の遺伝子発現誘導が失われることをクラミドモナス *ccmI* 変異株を用いた相補実験により明らかにした。以上の結果より、CCM1には、亜鉛結合に必須なアミノ酸残基ならびに、 CO_2 濃度変化に対する光合成の順化のシグナル伝達に必須な部位があることが示された。また、ウェスタン解析により、 CO_2 濃度に関わりなく、CCM1は構成的に発現しており、かつ、290~580 kDaの高分子複合体を形成していることが示された。

これまでにCCM1は3種類の低 CO_2 誘導性遺伝子の発現を制御していることは報告されていた。しかし、 CO_2 濃度変化によって制御を受ける遺伝子の種類、ならびにCCM1が制御する遺伝子の種類は網羅的に調べられていなかった。そこで、第二章では、10,368種類のcDNAからなるDNAアレイを利用して、低 CO_2 誘導性遺伝子ならびにCCM1により制御を受ける遺伝子を明らかにした。高 CO_2 条件と低 CO_2 条件における野生株の遺伝子発現プロファイルと比較することで、51種の低 CO_2 誘導性遺伝子と、32種の低 CO_2 抑制性遺伝子を見出した。さらに、低 CO_2 条件において、*CcmI* 遺伝子の欠損株の発現プロファイルを、野生株のそれと比較したところ、*ccmI* 株では51種の低 CO_2 誘導性遺伝子のうち、47種の誘導が認められなかった。この結果から、CCM1は CO_2 応答に伴う遺伝子発現制御において、中心的な役割を果たす因子であることが示された。CCM1に制御を受ける低 CO_2 誘導性タンパク質には、炭酸脱水酵素や葉緑体胞膜に移行すると予測される膜タンパク質、さらにABCトランスポーターが含まれていた。これらの知見から緑藻クラミドモナスが、 CO_2 の欠乏を検知し、CCM1を介してCCM関連遺伝子の発現誘導を行い、低 CO_2 環境に順化する機構の概要を明らかにした。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

二酸化炭素 (CO_2) の供給は、光合成生物の生存において重要な要因の一つである。無機炭素濃縮機構 (CCM) と生存

環境におけるCO₂濃度の検知機構の存在が微細藻類で提唱されていたが、検知機構の実体は不明であった。本研究は緑藻クラミドモナスから単離されていた低CO₂順化に必須な因子CCM1の生化学的性状、特に、CCM1のN末端部位に予測された2ヶ所の亜鉛結合性とCCM発現における機能、さらには、CCM1によって制御される遺伝子発現ネットワークを解析したものであり、その評価できる点は以下のとおりである。

第1章では、CCM1の亜鉛結合性を証明し、さらに亜鉛を結合する領域内のアミノ酸残基9ヶ所について、亜鉛結合における必要性和細胞のCO₂応答における必要性を生化学的手法で解析している。まず、3つのアミノ酸残基が亜鉛結合に必要であることを、変異導入組換えタンパク質の原子吸光分析法によって示している。また、2ヶ所の亜鉛結合領域はCCM1を介したCO₂応答に必須であることを示している。さらに、CO₂応答に必要なアミノ酸残基を、変異導入遺伝子をもつ細胞の生理学的解析から、複数同定するとともに、細胞内においてCCM1が翻訳後修飾を受け高分子複合体を形成する可能性を示している。2ヶ所存在する亜鉛結合領域のうち第1番目の領域にアミノ酸置換を導入した変異株では、細胞内におけるCCM1の安定性が低下したことから、CCM1の構造的安定性維持にはこの領域が必要であることを示している。

第2章では低CO₂環境で発現が誘導される遺伝子、ならびにCCM1により制御を受ける遺伝子を、cDNAアレイを用いて包括的に解析し、51種の低CO₂誘導性遺伝子、32種の低CO₂抑制性遺伝子を見出している。さらにCCM1により発現誘導される遺伝子58種類と、CCM1により発現抑制される遺伝子38種類を見出している。低CO₂誘導性遺伝子のほぼ全てがCCM1により発現制御を受けることから、CCM1は一般的な転写調節因子であるよりも、CO₂応答におけるマスター制御因子である可能性を示している。

これらの研究成果は、微細藻類における無機炭素濃縮機構の制御機構の解明のみならず、生物のCO₂応答機構を理解する上で、先駆的研究成果として高く評価できる。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。なお、平成20年1月23日、論文内容とそれに関連した分野にわたり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十分にあるものと認めた。