

## 論文の内容の要旨

論文題目 「シロイヌナズナのシアン耐性呼吸末端酸化酵素遺伝子の構造及び発現に関する研究」

氏 名 最相 大輔

広く真核生物に存在するミトコンドリアは、生物にとって必要不可欠なエネルギーの源である ATP を合成することから、エネルギーを作る重要な細胞内小器官として知られている。しかしながら植物は、光合成によって ATP のもととなる糖を合成し、エネルギーが必要なときに、その糖を分解しミトコンドリアにおける呼吸で ATP を合成することから、植物のミトコンドリアはエネルギーを消費するときに働く細胞内小器官ともいえる。さらに植物は、光合成に伴い生物にとって有害な酸素を生成し、また一定の場所に根ざして生きる生活様式から、様々な外的環境ストレスに耐えなければならない。植物特有の生活様式への適応進化の結果生まれたと考えられる植物ミトコンドリア特異的な特徴について理解を深める目的で、植物ミトコンドリアに特異的に存在する ATP 合成と脱共役した呼吸経路シアン耐性呼吸に注目し、高等植物のモデルであるシロイヌナズナを材料に、シアン耐性呼吸の末端酸化酵素遺伝子である *AOX* の構造及び発現制御に関して様々な調査を行い、シアン耐性呼吸の持つ機能の解明の糸口を得ることを目的に研究を行った。さらに、核ゲノムにコードされた *AOX* の発現を指標に、植物における核とミトコンドリアの協調的遺伝子発現制御に関わる知見を得ることを目指した。

## I. シロイヌナズナ alternative oxidase (AOX)遺伝子の構造と発現

種々のストレスに対する発現応答を調査するためには、シロイヌナズナ AOX 遺伝子がマルチジェンファミリーを形成している場合には個々の遺伝子の発現を区別して検出する必要がある。そこで、シロイヌナズナ AOX 遺伝子のゲノム中における遺伝子数を明らかにする目的で、全ての遺伝子のゲノミッククローン及び cDNA クローンを単離し、これらの塩基配列の決定を行い構造を明らかにした。その結果、既に Kumar and Söll (1992)によって単一遺伝子であると報告されていたシロイヌナズナ AOX 遺伝子は、ゲノム中に 4 つ(AOX1a, AOX1b, AOX1c, AOX2)存在していることが明らかとなった。中でも、AOX1a は同一染色体上の AOX1b の約 1.5kb 下流にタンデムに座していること、AOX2 は、他の 3 つの遺伝子や、他の植物種で報告されている AOX 遺伝子が3つのイントロンによって分割されているのとは異なり、5 つのエキソン、4 つのイントロンによって構成されていることが明らかとなった。また、塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、相互に比較した場合およそ 60-80%の類似性を持つことが明らかとなり、既に報告されている他植物及び他生物の AOX タンパク質の推定アミノ酸配列とも高い相同性を示した。さらに、塩基配列をもとに個々の遺伝子の特異的に検出するプローブを作製し、器官特異的な発現を調べた結果、AOX1a 遺伝子の解析したすべての組織での発現及び、AOX1b の花芽特異的な発現が示唆された。AOX1c, AOX2 についても発現を検出した。これらのことから、シロイヌナズナ AOX 遺伝子においても既に報告されているような器官特異的な発現様式が示唆された。

## II. ストレス条件下での AOX 遺伝子の発現誘導とそのシグナル伝達

いくつかの植物種において、シアン耐性呼吸が低温・傷害・病原生物の感染などの様々な外的ストレスにより活性化されることが報告されていたので、これらのストレスに対するシロイヌナズナ AOX 遺伝子の発現応答についての知見を得るために、ノーザンブロット法を用いて網羅的に解析した。その結果、本研究で行った低温(4°C)および傷害による発現応答は検出さ

れなかった。一方、病原生物の感染時の SAR 獲得の際重要な機能を担っていることが知られているサリチル酸や、植物に多様な害を及ぼすことが知られている UV 照射(UV-C)に対して、4つのシロイヌナズナ *AOX* 遺伝子のうち *AOX1a* が特異的に発現応答を示すことが明らかとなった。さらに、80Sリボソームを標的としたタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドによっても *AOX1a* の転写誘導を検出した。本研究で得られた結果を既報の知見と比較すると、シロイヌナズナ *AOX1a* の発現応答は、サリチル酸に対する発現誘導は光強度依存的であること、また、シクロヘキシミドによる転写誘導は、シクロヘキシミドによる *AOX* の発現抑制が検出された voodoo lily とは異なる発現応答であることが明らかになった。

さらに、ミトコンドリアにおける ATP 合成を担うシトクロム呼吸の複数の特異的阻害剤に対するシロイヌナズナ *AOX* 遺伝子の発現応答について理解を深め、*AOX* の発現誘導に関わるミトコンドリアから核へのシグナル伝達因子に関する知見を得ることを目的に解析を行った。解析の結果、作用部位の異なる呼吸阻害剤(アンチマイシン A,  $\text{NaN}_3$ , ミキソチアゾール)および作用機構の異なる ATP 合成阻害剤(オリゴマイシン, 2,4-DNP)に対して、*AOX1a* が特異的に発現誘導することが明らかとなった。

### III. *AOX2* 遺伝子の構造と発芽時におけるシアン耐性呼吸の発現

植物の発芽の過程では、吸水の開始と共に呼吸活性が劇的に高まることが知られている。そして、ATP 合成を担うシトクロム呼吸と共に、シアン耐性呼吸も活性化されることが知られているが、その生理的な意義については明らかにされていない。そこで、2つの呼吸経路の末端酸化酵素遺伝子の発現及び呼吸量を比較して、2つの呼吸経路が担う働きについて新たな知見を得ることを目的に解析を行った。シロイヌナズナの乾燥種子及び吸水後 96 時間までの発芽種子における4つの *AOX* 遺伝子および核コード *COX* 遺伝子(*COX5b*, *COX6b*)の発現様式をノーザンブロット法により解析したところ、*AOX* では、乾燥種子及び吸水後 48 時間までの発芽初期に *AOX2* が特異的に発現しており、*AOX2* mRNA が検出できなくなる 72 時間以降では

*AOX1a* の発現が増大することが明らかとなった。一方、2つの *COX* 遺伝子は乾燥種子では転写産物はほとんど検出できず、吸水後 6-96 時間にかけて徐々に発現が増加することが明らかとなった。さらに、この時期の酸素吸収速度を測定した結果、いずれも吸水時間に応じて呼吸量は増加しており、検出した mRNA が実際の呼吸に寄与していることが明らかとなった。発芽時の *AOX* 遺伝子の発現におけるアンチマイシン A の及ぼす影響について解析したところ、*AOX1a* では発現誘導が検出されたのに対し、*AOX2* はアンチマイシン A の影響を受けないことが明らかとなった。発芽初期の mRNA を用いた 5'RACE 解析から、*AOX* 遺伝子で初めて 5 つのエクソンに別れてコードされていることが明らかとなった *AOX2* 遺伝子の細胞内局在について、GFP を用いたタバコ培養細胞の一過的発現系を用いて解析した結果、本研究で新たに見出された第 1 エクソンはミトコンドリアへ移送されるためのプレシーケンスをコードしていることが示された。