

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 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 ATP を合成する重要な細胞内小器官である。しかしながら、植物のミトコンドリアは、ゲノム構造や機能の面で様々な特徴を持つ。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機能について理解を深める目的で、その一つである ATP 合成と脱共役した呼吸経路シアン耐性呼吸に注目して研究が行われた。研究は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 *AOX* の構造及び転写レベルの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解明の糸口が得られたと考えられる。

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の調査では、*AOX* 遺伝子が多重遺伝子の場合、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・cDNA クローンの塩基配列を決定し構造を明らかにした。その結果、既に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*) 存在することが判明した。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のとは異なり 5 つのエキソンによって構成されていることが判明した。さらに、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* 遺伝子の植物体全体での発現、*AOX1b* の花芽特異的な発現等、シロイヌナズナ *AOX* 遺伝子ファミリーの個々の器官特異的な発現をしていることが認められた。

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

幾つかの植物種において、シアン耐性呼吸の低温・傷害・病原生物の感染等の様々な外的ストレスによる活性化が報告されている。種々のストレスに対するシロイヌナズナ *AOX* 遺伝子ファミリーの発現応答について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できず、一方、病原生物に対する抵抗性の誘導に深く関わっていることが知られるサリチル酸や、植物に多様な害を及ぼすことが知られる UV-C 照射に対し、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判明した。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る *AOX1a* の転写誘導を検出した。また、シロイヌナズナ *AOX1a* 特異的なサリチル酸に対する発現応答は光強度依存的事であること、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ていた voodoo lily とは異なる発現応答であること等が明らかになった。

さらに、ATP合成を担うシトクロム呼吸の複数の特異的阻害剤を用いて、*AOX* 遺伝子の発現応答について解析を行った。その結果、作用部位の異なる呼吸阻害剤(アンチマイシンA, 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、*AOX1a* が特異的に発現応答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り、ATP合成を担うシトクロム経路が迅速に構築される。同時にシアン耐性呼吸も活性化されることが報告されているが、その機能については明らかでない。そこで、2つの呼吸鎖の末端酸化酵素遺伝子の発現及び呼吸量を比較し、2つの呼吸鎖が担う働きについて調査した。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*)の転写様式を解析したところ、*AOX* では乾燥種子及び吸水後48時間まで*AOX2* が特異的に発現し、72時間以降では*AOX1a* の発現が特異的に増大することが見出された。一方、2つの*COX* 遺伝子は乾燥種子では転写産物は殆ど検出できず、吸水が進むにつれて徐々に発現が増加していた。発芽期の呼吸量を測定した結果、何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することが示された。発芽初期の特異的に発現している*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、*AOX2* 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。

以上要するに、本研究ではシアン耐性呼吸を司る末端酸化酵素の4遺伝子をアラビドプシスから単離し、その構造を決定した。さらにそれらの遺伝子の生育過程とストレス環境下での転写レベルでの発現を調べ、シアン耐性呼吸の役割に関する新しい知見を得た。これらの結果は独創的であり、学術上、応用上の価値も高い。よって審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位を授与するに値するものと認めた。