

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 大津和弘

植物においては、発芽時や開花期などに特異的に ATP の需要が高まることが知られており、これらの時期に ATP の供給量が不足すると植物の生育は大きく阻害されることがある。したがって、植物における ATP 生産機能を詳細に理解することは、有用な作物を作出する上で重要である。本論文ではミトコンドリアで機能する呼吸系遺伝子の構造と発現調節機構について、シトクローム経路の末端酸化酵素 cytochrome c oxidase (COX) 遺伝子とオルタナティブ経路の末端酸化酵素 alternative oxidase (AOX) 遺伝子に焦点を当てて解析している。

第 1 章では、イネにおける核ゲノムコード COX 遺伝子のひとつである、*COX6b* 遺伝子について解析をおこなっている。イネにおける *COX6b* 遺伝子は、ヒトや酵母の *COX6b* と比べて、N 末端側に伸張配列を持ったアミノ酸配列をコードしている *OsCOX6b1* 遺伝子と、ヒトや酵母の *COX6b* とほぼ同じサイズのアミノ酸配列をコードしている *OsCOX6b2* 遺伝子の二種類が存在することを見出した。この二種類の遺伝子が存在しているという特徴が、他の植物でも保存されているかどうかを調べるため、シロイヌナズナにおける *COX6b* 遺伝子の同定も行った。その結果、シロイヌナズナにおいても伸張配列を持ったアミノ酸配列をコードしている *AtCOX6b1* 遺伝子と、伸張配列を持たないアミノ酸配列をコードしている *AtCOX6b2* 遺伝子及び *AtCOX6b3* 遺伝子の存在が明らかになった。アミノ酸配列を比べると、*OsCOX6b1* は *OsCOX6b2* よりも *AtCOX6b1* との相同性のほうが高かった。また、ゲノム配列における遺伝子の構造を比較すると、*OsCOX6b1* 遺伝子と *AtCOX6b1* 遺伝子のイントロンの挿入位置は完全に一致していたが、*OsCOX6b1* 遺伝子の二番目のイントロンと *OsCOX6b2* 遺伝子の一番目のイントロンに関しては、挿入位置が一致していなかった。これらのことから、*COX6b1* 遺伝子と *COX6b2* 遺伝子が分岐したのは、単子葉植物と双子葉植物が分岐する以前であったことが推定された。イネとシロイヌナズナの *COX6b* 遺伝子の様々な器官における発現をノーザンハイブリダイゼーションによって調べたところ、*OsCOX6b1* 遺伝子と *AtCOX6b1* 遺伝子、それに *AtCOX6b3* 遺伝子は調べた器官において恒常的に転写物が蓄積していた。また、*OsCOX6b2* 遺伝子と *AtCOX6b2* 遺伝子に関しては、主に根において転写物の蓄積が見られたが、*AtCOX6b2* 遺伝子の転写物はほとんどが分解されていた。単子葉植物であるイネと、双子葉植物であるシロイヌナズナにおいて、共通した性質を持った *COX6b* 遺伝子が存在していたことや、*AtCOX6b2* 遺伝子を除いて、それらの遺伝子の転写物が様々な器官で蓄積していたことから、本研究において同定した遺伝子は、それぞれの植物体において何らかの機能を担っている可能性が高いと考えられた。

第 2 章では、イネにおける新規 AOX 遺伝子である *AOX1c* 遺伝子について解析している。イネにおいては、すでに *AOX1a* 遺伝子および *AOX1b* 遺伝子という二つの AOX 遺伝子が同定されていた。しかし、ゲノミックサザンハイブリダイゼーションの結果をみると、それら二つの遺伝子以外にもイネ AOX 遺伝子が存在していることが推定された。そこでイネにおける新規 AOX 遺伝子の

単離を試みた結果、イネ新規 *AOX* 遺伝子である *AOX1c* 遺伝子が単離された。RT-PCR によって得られた断片から、*AOX1c* 遺伝子の cDNA の配列を決定しゲノム配列と比べたところ、イネ *AOX1c* 遺伝子は他の多くの *AOX* 遺伝子と同じく、そのコード領域が三つのイントロンによって分断されていた。また、推定アミノ酸配列を他の *AOX* の配列と比べたところ、イネ *AOX1c* には *AOX* の活性に必要なと思われる構造が保存されていた。したがってイネ *AOX1c* 遺伝子は機能的な *AOX* をコードする遺伝子であることが推定された。イネ *AOX1c* 遺伝子の様々な器官における転写物の蓄積パターンは、*AOX1a* 遺伝子および *AOX1b* 遺伝子のパターンと異なっていた。また、*AOX1a* 遺伝子および *AOX1b* 遺伝子の転写物の蓄積は低温処理によって増加するのに対して、*AOX1c* 遺伝子の転写物の蓄積は低温処理によって増加しなかった。この結果から、イネ *AOX1c* 遺伝子は *AOX1a* 遺伝子および *AOX1b* 遺伝子とは異なる機能を担っている可能性が考えられた。

第3章では、イネ *AOX1c* 遺伝子の配列を一部含んだ *Mutator* 様トランスポゾンとその類似配列についてその特徴を明らかにした。イネにおいて、*AOX* 遺伝子の保存領域をプローブに用いてゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行うと、10 本以上のバンドが得られる。これは、イネのゲノム中に *AOX1a* 遺伝子、*AOX1b* 遺伝子および *AOX1c* 遺伝子以外にも、*AOX* 遺伝子と同一性のある配列が存在することを示していた。実際、第2章におけるゲノミックライブラリーを用いたスクリーニングの結果、*AOX1c* 遺伝子の他に、*AOX* 遺伝子配列の一部を含むクローンが二つ得られてきた。これらの配列は、イントロンや 3' UTR を含めて、*AOX1c* 遺伝子との同一性が高かった。そこで、*AOX1c* 遺伝子の配列と、これらの配列を詳細に比較してみたところ、得られた二つのクローンの配列は *AOX1c* 遺伝子配列を一部含んだ *Mutator* 様トランスポゾン (*OsMuA(AOX)*) であることが明らかとなった。さらに、データベースを検索すると同様の構造を持った配列が他に二つ見つかった。イネゲノム中に、*OsMuA(AOX)* が 4 コピー存在することは、ゲノミックサザンハイブリダイゼーションの結果からも支持された。さらに、データベース検索により、*OsMuA(AOX)* の TIR と同一性の高い TIR を持った *Mu* 様因子が多数見つかったので、それらのうち 22 個の配列に関して解析した。これらの配列は全て非自立性因子であり、イネにおける *Mu* 様因子の中で新規のグループを形成していた。これらの因子における TIR の内側には、*AOX1c* 遺伝子以外にも、既知の遺伝子配列の一部と同一性の高い配列が多く見られた。また、レトロトランスポゾンをはじめイネゲノム中の反復配列、またはその一部を含んでいるものもいくつか見られた。これらの結果は、*Mu* 様因子の多様性には、遺伝子配列の獲得や、反復配列の挿入など様々なイベントが関与していたことを示している。

以上、本論文は核ゲノムコード *COX* 遺伝子である *OsCOX6b* 遺伝子が、ヒトや酵母にはない特異的な構造を持つことを明らかにした。また、イネ *AOX* 遺伝子ファミリーの構成を明らかにし、重複した遺伝子間に機能分化があること、さらに一部の配列は *Mu* 様因子に取り込まれてゲノム再構成にかかわったことを明らかにした。これらの知見はイネの呼吸調節機構の解明に新たな視点を与え、将来の農業生産の効率化に寄与するものである。よって審査員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。