

論文審査の結果の要旨

氏名 稲継理恵

本論文は三章からなり、第一章ではシロイヌナズナの CDP-コリン合成酵素 (CCT) イソ遺伝子の単離と低温でのイソ遺伝子特異的な発現強化機構の発見、第二章では CCT イソ遺伝子破壊株の単離とその株を用いた低温でのイソ遺伝子特異的な活性調節機構の発見、第三章では CCT イソ遺伝子二重破壊株の作出とその株を用いた長期低温生長における CCT 遺伝子の重要性の発見および CCT 遺伝子欠損を相補する ECT 遺伝子産物の新奇機能の発見について述べている。審査では、35 分間の口頭発表ののち、40 分間の質疑応答および一般的知識に関する口頭試問を行った。論文の要旨は以下の通りである。

植物は周囲の環境の変化に応答して自らの生理状態を変化させる。低温におけるホスファチジルコリン (PC) の増加はその一例で、多種の低温耐性植物で報告されている。低温での不飽和度の高い PC の増加は、生体膜の流動性の調節に関与するほか、凍結・融解条件下での細胞の生存率上昇に寄与するという仮説もたてられている。しかし、これらの知見は生理学的な研究に基づくもので、分子生物学的・遺伝学的な視点からの研究はまだ行われていない。論文提出者は、低温での PC 増加の意義の解明には、まず低温に応答した PC 生合成の活性化の分子機構を明らかにし、さらにその機構の逆遺伝学的解析が必要であると考えた。そして植物の PC 生合成を担う CDP-コリン経路上の鍵酵素 CCT に着目し、シロイヌナズナを用いて低温での PC 合成活性化機構とその意義の解明に取り組んだ。

第一章では、まだ単離例のなかった *AtCCT2* 遺伝子を単離し、*in vitro* で組換タンパク質の CCT 活性を確認した。野生株 (Col) の各器官で *AtCCT1* および *AtCCT2* は構成的に発現するが、ロゼット葉において *AtCCT2* のみが低温に応答して発現増強されることを明らかにした。

第二章では、*AtCCT1* および *AtCCT2* の遺伝子破壊株 (WS 由来) を単離した。Col での低温による発現増強が第一章で明らかにされた *AtCCT2* は、WS 由来の *AtCCT1* 破壊株でも低温で発現上昇し CCT 活性を増加させることが示された。一方 *AtCCT2* 破壊株では、低温で *AtCCT1* タンパク質レベルが変化しないにも関わ

らず CCT 活性増加が見られたため、AtCCT1 タンパク質が低温で活性化される可能性が示唆された。遠心分画法によって低温処理前後の AtCCT1 タンパク質の細胞内分布と CCT 比活性を比較することにより、ミクロゾーム膜画分に結合した AtCCT1 タンパク質が低温特異的に活性化されることを明らかにした。以上の結果は、2つの CCT イソ遺伝子は異なる機構によっていずれも低温での PC 合成活性化に寄与することを示している。このような低温に応答した CCT 活性の制御機構は動物細胞には見られないため、植物が低温環境へ適応する過程で独自に獲得したものと考えられる。

第三章では、CCT 遺伝子二重破壊株を作出し、低温での PC 合成活性上昇の生理学的意義の解明を試みた。CCT 遺伝子の二重破壊は、常温での生育や短期間の低温下での生育にはほとんど影響しないが、長期にわたる低温環境下ではロゼット生長と花茎伸長が遅延することを示した。この結果は、CCT が PC 合成の律速酵素であるとする従来の考え方に一石を投じるものである。また低温での PC 合成活性化のしくみは、単に生合成のためのものではない可能性を示唆している。二重破壊株では野生株の 8% 程度の残存 CCT 活性が検出されたが、この活性がホスファチジルエタノールアミン合成の鍵酵素である ECT に由来する可能性が高いことを示した。

以上の内容は、植物の CCT 活性を遺伝子レベルで改変する初の試みであり、植物の低温でのリン脂質合成増加の分子機構とその意義の解明に新しい展開をもたらした。また、ECT が CCT 欠損を相補可能であることを示唆した点でも新奇性が認められた。

口頭発表後には、本論文中で述べられた実験技術の精度や AtCCT1 の活性化を詳細に調べる上で必要と考えられる解析方法、CDP-コリン経路以外の経路によって PC 合成が行われている可能性、今回の結果とは逆に CCT が ECT の欠損を相補する可能性などについて質疑応答が行われ、これらに対する的確に回答した。また、現在までに知られる CCT 活性化機構についての一般的な知識を問う試問も問題なく終了した。

本論文は博士論文として十分充実した内容を有する。本論文の第一章は、中村正展、西田生郎との共同研究であるが、論文提出者が主体となって解析を行ったものである。

以上の内容をふまえ、論文提出者への学位の授与について投票を行った結果、全員一致で合格と判定した。