

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 蓑田 歩

---

太陽光の光エネルギーにより、水と二酸化炭素から炭化水素を合成する光合成は、生態系の基盤である植物の独立栄養性を支えることで、地球上の生命の存在を可能にしている。そして光合成システムは、様々な構成要素により成り立つ複雑な系であり、その構成要素については詳細な解析がなされてきた。しかし、刻一刻と変わる細胞内外の変化に応じて制御されることが、そのシステムの形成や維持には必須であるものの、その動的な全体像は未だよく理解されているとはいえない。本論文は、複雑かつ動的な光合成システムの理解を目指し、光合成遺伝子群の転写制御系の解明を行ったものであり、4章からなっている。

第一章の序論では、本論文で扱う材料である *Cyanidioschyzon merolae* について紹介すると共に、葉緑体の起源や進化について、本論文の研究背景について述べている。*C. merolae* は高温酸性温泉 (pH 1.5, 45 度) の極限環境に生育する単細胞の紅藻であり、葉緑体ゲノム配列の決定とその形態的特徴により、共生説によって葉緑体の起源とされるシアノバクテリアに最も類似した葉緑体を持つ光合成真核生物であると考えられている。*C. merolae* の葉緑体ゲノムには、高等植物の葉緑体ゲノムと異なり4種の転写因子遺伝子 (*ycf27*~*30*) が保持されている。これら4種の転写因子は、核による制御とは別に、独自に環境の変化を察知し、葉緑体ゲノム上にコードされた数多くの光合成遺伝子群の転写制御を行っていると考えられる。本章では本論文が、これら転写因子の機能解析を通じ、光合成システムの動的制御を明らかにしようとするものであることが述べられている。

第二章では、それぞれの転写因子についての解析結果が述べられている。*Ycf27* は2成分制御系のレスポンスレギュレーターと考えられる転写因子であり、祖先のシアノバクテリアや、緑藻と高等植物を除く葉緑体に保存されている。*C. merolae* の核ゲノムには唯一種のヒスチジンキナーゼ (HIK) がコードされることから、*Ycf27* は HIK と2成分制御系を構成する可能性が考えられた。本論文では、細胞を強光ストレス下に置くことで、*HIK* と *ycf27* の転写産物が一過的に増加することを見いだしている。また、葉緑体マイクロアレイ解析により、強光条件で転写産物量の変動する遺伝子群を網羅的に同定した。さらに、ヒスチジンタグ融合 *Ycf27* 蛋白質を発現させた大腸菌の溶菌液を用いて、*Ycf27* が強光誘導される遺伝子群のうち、光化学系 II の反応中心蛋白質をコードする *psbA*、*psbD* 遺伝子上流域に特異的に結合することを示している。また、これら遺伝子については、プライマー伸長法により転写開始点を決定した。*Ycf30* は、バクテリアに広く保存されている LysR 型の転写因子であり、光合成細菌において炭酸固定の鍵酵素をコードするルビスコオペロンの調節因子として知られる *CbbR* のホモログである。従って、*C. merolae* でもルビスコオペロンの転写因子であることが示唆された。本論文では、10% CO<sub>2</sub> 条件から通常の大気条件へ

と培養条件を移し、その際の葉緑体遺伝子発現についてマイクロアレイ解析をおこなった結果、ルビスコオペロンのみの転写活性化を観察した。蛋白質合成阻害剤を用いた実験より、この転写活性化は葉緑体コードの転写因子によるものであることが強く示唆された。さらに、大腸菌を用いた大量発現により Ycf30 蛋白質を調製し、Ycf30 がルビスコオペロンのプロモーター上流領域に結合することを示すとともに、このプロモーターからの転写開始点についてプライマー伸長法により決定した。

第三章では、*C. merolae* の培養条件の検討を行い、培地成分、光条件を最適化することで大幅な倍加時間の短縮に成功している。また、プレートによる培養系の確立にも成功している。ここで確立したプレート培養系を用いて、本論文では、これまで検討されてこなかった形質転換系の構築を試みた。形質転換には薬剤による選択が簡便であることから、12種の薬剤に対する感受性を検討し、5-フルオロオロト酸 (5-FOA) を有望な薬剤として選択した。酵母において 5-FOA は *URA3* 遺伝子により代謝されることで細胞毒性を示す薬剤であり、*URA3* 遺伝子が破壊された細胞は 5-FOA 耐性となると共にウラシル栄養要求性を示す。本論文ではプレート上で 5-FOA 耐性、ウラシル要求性となる変異株をスクリーニングし、これら株で実際に *URA3* 遺伝子が破壊されていることを示した。この株に対し、野生型の *URA3* 遺伝子を含む DNA 断片をエレクトロポレーション法で導入した結果、高頻度でウラシル要求性を失った形質転換体を得ることができた。従って、外来 DNA による *C. merolae* の形質転換が起きている可能性が強く示唆された。

第四章の総合討論では、4種の葉緑体転写因子の役割分担や、葉緑体進化における意義について考察し、光合成系のダイナミックな環境応答との関連が議論されている。また、基本的な実験系が構築されたことにより、本生物をモデル生物として研究材料とする有効性を強く提唱している。

以上、本論文はこれまで殆ど研究のされてこなかった紅藻葉緑体の4種の転写因子について実験的にアプローチし、光合成系の動的制御について多くの知見を得たものである。また、*C. merolae* の実験生物としての基盤整備に多大な貢献をしており、学術上・応用上貢献することが少なくない。よって審査委員一同は、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。