

論文審査の結果の要旨

氏名 山 崎 誠 和

本論文は3章からなり、第1章はナノクロリスにおける核コード葉緑体由来遺伝子 *rbcS* の重複、第2章はナノクロリスにおける細胞質分裂タンパク質セプチンの局在、第3章はナノクロリスを用いた形質転換系の開発について述べられている。

細胞内共生後、葉緑体にコードされていた遺伝子の多くは、細胞核ゲノムに遺伝子移行したと考えられている。核に移行した遺伝子には真核生物型のプロモーターや葉緑体移行シグナルが加わるだけでなく、イントロンの挿入や遺伝子重複も起こったと予測される。*ftsZ* は、細菌の細胞質分裂に関与するだけでなく、近年葉緑体の分裂にも関与していることが明らかになった。*rbcS* は、光合成の暗反応で炭酸固定に関わる RuBisCO の小サブユニットをコードする遺伝子で、紅色藻類や灰色藻類では葉緑体、緑色藻類と陸上植物では核にコードされている。*ftsZ* は葉緑体獲得直後、*rbcS* は緑色藻類が紅色藻類から分岐後、遺伝子移行したと考えられる。植物は葉緑体獲得後に細胞質分裂の機構を劇的に変化させた。

トレボウクシア藻綱と緑藻綱の細胞質分裂では陸上植物とは異なり細胞膜が環状収縮する。分裂溝にはファイコプラストと呼ばれる微小管からなる構造体が出現するが、細胞膜の環状収縮にファイコプラストが関与しているかどうかはわかっていない。菌類や動物の環状収縮にはアクトミオシン収縮環が関与している。出芽酵母では、セプチンは細胞質分裂位置で二重のリングを形成し、分裂位置の細胞膜を周辺領域から区画化する障壁と考えられている。セプチンにより区画化された領域でアクトミオシン収縮環が収縮する。セプチンは、菌類や動物に広く分布しているが、陸上植物では失われてしまっている。

本論文では、緑色藻類における葉緑体から核への遺伝子移行と細胞質分裂機構の進化の理解を目指し、単細胞の緑色藻類であるトレボウクシア藻綱ナノクロリス (*Nannochloris bacillaris*) の葉緑体由来の核遺伝子 *rbcS* と細胞質分裂に関与するセプチンの解析を行な

っている。今後、トレボウクシア藻での遺伝子機能を解析するためには、ゲノムへの遺伝子導入や遺伝子破壊、GFPなどの蛍光タンパク質を用いた *in vivo* での観察が必須になる。そこで、緑色タバコ培養細胞を用いた一過的な形質転換による解析に加え、ナノクロリスを用いたプロモーターアッセイや細胞内局在を観察するための一過的な発現系と GFP を用いたタンパク質の動態を解析するための形質転換系の開発を試みている。

第1章では、3種類の *rbcS* (*NbrbcS1-1*、*NbrbcS1-2*、*NbrbcS2*) を同定している。分子系統解析から *NbrbcS1-1* と *NbrbcS1-2* は *NbrbcS2* から分岐した後に遺伝子重複したと考えられる。*rbcS* のイントロンの挿入と欠失は系統間と種内で独立に起こっていた。*NbrbcS1-1* は暗条件下で完全に発現が抑制されていたが、*NbrbcS1-2* と *NbrbcS2* はどちらの条件でも恒常的に発現していた。陸上植物と緑藻類では *rbcS* の発現は光に応答するので、光応答性のプロモーターは初期段階で獲得されていたと考えられる。本章では、遺伝子重複が起こると容易に光応答性のプロモーターが活性を失うことを明らかにしている。

第2章の内容は以下の通りである。ナノクロリスのゲノム上にあるセプチンと相同性のある NbSep は、NbSep と出芽酵母の CDC10、ショウジョウバエの Punt、ヒトの Sept2 のセプチンコアドメインを比較したところ、各々と 40% 以上の類似性があった。分子系統解析から NbSep は分裂酵母の Spn5 に最も近縁で菌類型のセプチンに分類された。NbSep のセプチンコアドメインを含む C 末側 400 アミノ酸残基に HS タグを付加したリコンビナントタンパク質 HS-NbSep は、GTP の添加により約 1 μ m から 4 μ m の巨大な繊維状の構造体を形成する。NbSep は、分裂期で細胞核分裂後に細胞の中央でリング状に局在することが明らかとなった。セプチンは、菌類や動物ではアクトミオシン収縮環と協調的に細胞質分裂に機能する。ナノクロリスにおける F-アクチンの動態をファロイジン染色法により観察したところ、F-アクチンは収縮環様の構造ではなく、分裂面を挟み細胞の中央で陥入する平行な 2 本のバンドを形成した。本章では、NbSep とアクチンの動態を細胞生物学的手法で明らかにしたと考えられる。

第3章では、*NbrbcS2* の上流約 600bp をプロモーターとし、GFP と GFP 融合タンパク質のナノクロリスでの発現を試みた。プロトプラスト化した細胞にエレクトロポレーション法 (EP 法) での遺伝子導入を試みたところ、GFP の蛍光が観察できた。これによりナ

ノクロリスで遺伝子導入法が開発できたことになろう。

なお、本論文第1章は、山本 真紀、坂本 亘、河野 重行との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。