

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 洞庭 葉子

ミトコンドリアはほとんどすべての真核生物に存在し、生存に必要不可欠な細胞内小器官である。ミトコンドリアの機能が異常になった植物では、重篤な生育阻害や細胞質雄性不稔が引き起こされることが知られている。ミトコンドリアの機能は植物の生殖や生長に重要な役割を果たしており、これを人為的に制御、改変することは農業生産の上でも大きな影響を与えると思われる。植物のミトコンドリアの機能を人為的に制御するためには、宿主の核とミトコンドリアの相互作用をバランスよく保つことが必要である。本研究では、植物細胞の核によるミトコンドリア機能の制御の分子的な機構について基礎的な知見を得るために、シロイヌナズナを主な材料として以下の研究がおこなわれた。

1. ミトコンドリアの動きと細胞骨格の関係

生きた細胞内のミトコンドリアは細胞質中を活発に移動している。動物細胞において、ミトコンドリアを細胞内の必要な場所へと配置することは、エネルギーの供給やシグナリングに不可欠であると示唆されている。様々な生物種におけるオルガネラの配置の研究から、細胞骨格を構成するアクチン繊維あるいは微小管とそれぞれのモータータンパク質がオルガネラの輸送に関わっているという知見が得られてきた。生物種、細胞の種類などによって使われる細胞骨格系が異なることが知られている。しかしながら、高等植物では、ミトコンドリアの動態や配置についての報告はこれまであまりなされていなかった。そこで申請者は、高等植物のミトコンドリアがアクチン繊維、微小管のどちらをどのように利用して動くのかを明らかにすることを目的として実験をおこなった。

まず、ミトコンドリアを蛍光タンパク質で可視化したシロイヌナズナ形質転換体の葉を用いて、ミトコンドリアの細胞内での速度を測定した。細胞内ではブラウン運動しているものから $5.21\mu\text{m/s}$ の速さで移動するミトコンドリアまでが観察され、平均速度は $1.44\mu\text{m/s}$ (S.D. ± 0.89) であった。次にミトコンドリアを可視化した植物体に薬剤を処理し、動きや細胞内分布の変化を観察した。この結果、アクチン繊維の重合阻害剤である Latrunculin B (Lat-B) を処理した場合、ミトコンドリアの動きが阻害された。一方、微小管の重合阻害剤である Propyzamide を処理した場合、ミトコンドリアの動きは阻害されなかった。

生きた細胞内でのミトコンドリアの動態と細胞骨格の配置を詳細に観察するために、赤色蛍光タンパク質(RFP)でミトコンドリア、緑色蛍光タンパク質(GFP)で細胞骨格を同時に可視化したシロイヌナズナ形質転換体を作製した。その結果、ミトコンドリアはアクチン繊維に沿って動くように観察されることが多く、ミトコンドリアの軌跡と微小管の配向は一致しないことが多かった。また、タバコ培養細胞 BY-2 を材料として細胞骨格を GFP、ミトコンドリアを MitoTracker 染色により同時に可視化したところシロイヌナズナの緑葉の場合と同様の結果が得られた。以上より、シロイヌナズナやタバコ培養細胞において、ミトコンドリアの素早い動きはレールのようにアクチン繊維を利用する方法で行われていることが明らかとなった。

2. ミトコンドリアのパーシャル RNA エディティングに関わる pentatricopeptide repeat (PPR) タンパク質の解析

ミトコンドリアでのタンパク質発現は、ミトコンドリア、核の両方にコードされるタンパク質によって制御される。ミトコンドリアのリボソームタンパク質はシロイヌナズナでは7つがミトコンドリアゲノムにコードされており、それらは多くの転写後修飾が施されている。また、ミトコンドリアにコードされていないリボソームタンパク質遺伝子は核にコードされている。そこで申請者は、ミトコンドリアゲノムコードのリボソームタンパク質遺伝子の転写後修飾に関与するタンパク質が存在するとすれば、これらの遺伝子は核コードのミトコンドリアリボソームタンパク質遺伝子と共発現する可能性が高いであろうと予想し、そのような遺伝子を探索した。

共発現解析から、核コードのミトコンドリアリボソームタンパク質遺伝子の共発現遺伝子の中に、複数の PPR タンパク質をコードする遺伝子が含まれていることが分かった。その中の1つは、タンパク質の N 末端側に約 70 アミノ酸のミトコンドリア移行シグナルが存在することが予想された。この配列に緑色蛍光タンパク質を融合させたタンパク質がミトコンドリアに局在したことから、この PPR タンパク質はミトコンドリアに移行して機能することが示唆された。この遺伝子の T-DNA 挿入突然変異体を用いてミトコンドリアゲノムにあるリボソームタンパク質遺伝子の RNA エディティングの状態を調べたところ、*rps3* 遺伝子の 1344 番目のシトシン(*rps3-1344*)において、変異体では野生型に比べて顕著にエディティング効率が上昇していた。また、*rps3-603*、*rps3-1534*、*pseudo-rps14-99*、*pseudo-rps14-194* でも若干のエディティング効率の上昇が見られた。野生型遺伝子のゲノム断片を挿入した相補形質転換体では、当該サイトのエディティング効率は野生型と同程度に回復していた。これより、この遺伝子産物はサイト特異的なエディティングの維持、形成に阻害的に関わっていることが示唆された。そこでこの遺伝子を *mitochondrial partial editing related protein 1 (MPERP1)* と名付けた。なおスプライシングに関しては変異体で顕著な違いは見られなかったことから、*MPERP1* はスプライシングイベントには関与していないことが示唆された。シロイヌナズナゲノム中で *MPERP1* 遺伝子と相同性の高い遺伝子を *MPERP2* 遺伝子と名付け、その T-DNA 挿入変異体を用いて RNA エディティングの解析を行った。その結果、*mperp2* 変異体でも *mperp1* 変異体と同様に *rps3-603*、*rps3-1344* のエディティング効率が上昇していた。さらに、*mperp1/mperp2* 二重変異体では、*rps3-603*、*rps3-1344* のエディティング効率が単独変異体に比べてさらに上昇していたため、*MPERP1* と *MPERP2* はある程度の機能的冗長性を持ってこれらのサイトの RNA エディティングを抑制していることが示唆された。

以上本論文では、高等植物における細胞内でのミトコンドリアの移動と PPR タンパク質によるエディティングについての新たな知見が得られた。これらの知見は、核によるミトコンドリアの制御機構について新たな視点を与えるものであり、学術上きわめて価値あるものである。したがって、審査委員一同は本論文が博士（農学）に値するものと認めた。