

論文の内容の要旨

論文題目： Studies on the function of cardiolipin in *Arabidopsis thaliana*
(シロイヌナズナを用いたカルジオリピンの機能に関する研究)

氏名： 片山 健太

生体膜は、生体内の空間を区画化する。細胞膜は細胞の内と外とを区分し、それが生命の物理的存在要件となる。また、チラコイド膜やミトコンドリア内膜といった、細胞膜以外の生体膜も、区画化により呼吸や光合成など種々の酵素反応が進行する根本的な基盤となる。このように、生体膜による空間の区画化は、生命を形作る上で最も重要なプロセスの一つである。そのため、生体膜の構造は時空間的に厳密に制御され、直接的に何らかの機能を実現していると推測される。しかし、生体膜は多くの生命現象を支えるため、その機能の喪失が広範囲にわたる副次的影響をもたらすことや、多数の分子が会合した複雑な超分子構造体であることなどから、その構造と機能には不明瞭な点が多い。とりわけ、生体膜構造の中心をなす生体膜脂質は、単一の脂質でも膜は構成可能であるのに、膜ごとに異なる脂質組成が維持されており、このような生体膜脂質の多様性が果たす主要な役割を解明することは極めて重要である。

本研究では、真正細菌及び動植物のミトコンドリアの膜に約10%含まれ、それらの生体膜脂質組成を特徴づけるリン脂質であるカルジオリピン (CL) に注目した。これまでに、CLは多くの生物から生化学的に精製された様々なミトコンドリアのタンパク質、例えば、呼吸鎖複合体I、IIIやATP/ADP輸送体などの *in vitro*での活性に不可欠であることが示されて

きた。だが、大腸菌および出芽酵母のCL欠損株は野生型と比べて生育が劣るものの、生存可能であった。さらに、出芽酵母のCL欠損株は、通常の培地だけでなく、生育に呼吸が不可欠な非発酵培地でも十分生育することが示された。これらの結果は、*in vivo*では、CLなしでも呼吸鎖複合体の活性がほとんど損なわれない環境が存在することを意味している。すなわち、脂質の*in vivo*における機能は、*in vitro*での実験結果からは推測不能であったといえる。しかし一方で、欠損変異体の表現型のみを基にした生体膜脂質の機能推定にも問題がある。例えば、CL欠損変異株では、呼吸鎖複合体の超分子複合体の構造や、哺乳動物培養細胞におけるアポトーシス過程、ミトコンドリアDNAの維持、浸透圧調節機構などに様々な異常が発見されている。しかし、このような異常の発見は、そもそも非常に限定された研究者の着目の範囲内に留まることが多い。そのため、欠損変異体が全体として致死的ではないとはいえ、多数存在しているに違いない、副次的異常を見ているにすぎず、普遍的な脂質の機能の理解にはつながらないとの批判がある。なるべく研究者の主観が入り込むのを避け、時代を経ても定見となるようなCLの主要な機能を、より早く発見するために、本研究では多細胞生物であるシロイヌナズナを用いて、CL合成変異体を作成し、その異常を発見するとともに、野生株における組織やオルガネラの特化した機能を個体内で比較することで、より広範囲な視野から、実際にはどのような場面でCLが機能し、どのような役割を果たしているかを推定することを目的に研究を行った。

1. CL合成変異体の確立

多細胞生物であるシロイヌナズナにおいてCL合成変異体を作成するため、私は修士課程において、ゲノム探索と隠れマルコフモデルで記述されたモチーフ部分を用いた系統樹の作成から、既知CL合成酵素遺伝子と相同性がある唯一のシロイヌナズナの遺伝子 *At4g04870* に注目した。そして、大腸菌内でこの遺伝子を発現させることで、多細胞生物で初めて、真核生物型のCL合成酵素をコードする遺伝子 *CLS* を発見した。そこで、博士課程ではさらにこの遺伝子の欠損変異体 *cls* の作出を目指した。シロイヌナズナ種子のストックセンターであるABRCから、T-DNA挿入による遺伝子破壊株の *cls-1* および *cls-2* を取り寄せ、T-DNAの挿入を確認した（以下、*cls-1* と *cls-2* に共通する事項は *cls* と略記）。

当初、シロイヌナズナに特化した栽培用具であるArasystemを用いて通常条件で生育した場合、ヘテロ変異体 *CLS/cls* を自家受粉させて得られた種子からホモ変異体 *cls/cls* は得られず、*CLS/CLS* : *CLS/cls* の分離比は約1:2であった。また、*CLS/cls* を自家受粉させた果実中には約1/4の割合で萎縮した種子が見られた。さらに、植物には存在しない外来の誘導物質（エストロゲン）に応じて *CLS* を発現することが可能なベクターである pER8:*CLS* を導入した

株では、ゲノム上の元々の*CLS*について、*CLS/CLS* : *CLS/cls* : *cls/cls* の分離比が約1 : 2 : 1となることから、*CLS*遺伝子欠損変異体*cls*は胚性致死であると考えた。

そこで次に、*CLS/cls*を自家受粉させた果実中で*cls/cls*が胚発生過程のどの段階で死に至るのかを、顕微鏡を用いてより詳細に観察した。その結果、*cls/cls*と推定される成長の遅い胚が胚発生を停止する時期は、心臓型胚から成熟胚まで様々で、果実や個体の状況によって大きく異なるように見えた。だが、顕微鏡観察時には生育遅延のみが*cls/cls*を判断する基準であったため、明確な答えを出すことができなかった。しかし同時期、YFPによってミトコンドリアを可視化し、胚発生過程の観察時にミトコンドリアの大きさを共に確認することで*cls/cls*と推定される胚をより明確に特定する技術を開発した。そこで、*in vitro*胚培養系 (Sauer and Friml, 2004) を活用し、*cls/cls*を培養したところ、*cls/cls*は特定の段階で発生を停止せずに培養できることを発見した。それらの結果を踏まえ、親株である*CLS/cls*の栽培条件に様々な変更を加えた結果、(1)栽培する土の量を増やす、(2)連続光で栽培する、(3)頂芽優勢を長期に維持するため、頂芽に支柱をつける、(4)種子回収時に果実中の種子の萎縮を確認する、(5)なるべく頂芽から早期に得られた果実の種子を回収する、などに注意すると、*cls/cls*の種子を得ることができた。以上の結果から、*cls/cls*では胚発生が非常に遅く進行するために、二次的な効果（多段階の不良種子除去機構）によって通常は種子が得られないものの、*cls/cls*の胚自体に発生能がない訳ではなく、親株の環境次第では発生可能であることがわかった。また、植物でよく研究されている呼吸鎖の変異体は雄性不稔となるが、*cls/cls*はそれらと異なることがわかった。こうして得られた*cls/cls*は、その後も生育が著しく遅いものの、次世代の種子まで得られた。次に、それらの変異株のCL量を、 $[^{33}\text{P}]$ Piを用いて長時間ラベルした試料から脂質を抽出することで測定した。その結果、変異体では確かにCL量が減少していることが確認できた。

2. 多細胞生物としての*CLS*の機能解析

序論で述べた通り、多細胞生物の組織における*CLS*の機能を踏まえることで、CLが主としてどのような機能を果たすかを推定したい。そこで、まず、*CLS*の発現をプロモーターGUS法を用いて解析した。通常、CLは細胞機能の維持に重要な因子と考えられるため、構成的発現、あるいは細胞分裂に応じた発現が予測できる。あるいは、ミトコンドリアでの呼吸が活発な花粉でも強く発現すると予測された。解析の結果、*CLS*は*cls/cls*において発生の著しく遅かった胚発生段階や維管束、気孔孔辺細胞、主根のコルメラ細胞などで強く発現していることがわかった。これらの結果は、マイクロアレイによる網羅的解析の結果でも支持されている。この中で、特に主根に注目すると、根における細胞分裂活性や呼吸活

性は静止中心より基部側で高いものの、コルメラ細胞は根の伸長に重要であることが知られている。*cls* 変異体においても根の伸びは顕著に低下しており、コルメラ細胞が何らかの特殊で重要な機能を果たしていると推定した。そこで、CL量が外来のエストロゲン量で制御できる *cls-2/cls-2* pER8:*CLS* の根端を観察すると、CLの誘導前後でコルメラ細胞の形態が特に変化していた。興味深いことに、主根のコルメラ細胞では、呼吸活性の低いミトコンドリアが非常に数多く観察された。他の *CLS* の発現の高い組織でも、ミトコンドリアの形態が特殊であった。一方、*cls* 変異体におけるミトコンドリアをYFPあるいは電子顕微鏡で観察すると、ミトコンドリアの動きは維持されているものの、巨大なミトコンドリアが見られた。CLはミトコンドリア内膜でその含量が多いことが知られるが、電子顕微鏡による観察ではミトコンドリア内膜の量が減少しているようには見えない。これらのことから、CLはミトコンドリア内膜、あるいは外膜の形態形成に重要な役割を果たすが、単に生体膜の面積を広げるために必要とされているのではなく、分裂や融合などといった局所的に必要な機能に重要な役割を果たしていると推測できる。

まとめ

本研究では、多細胞生物であるシロイヌナズナを用いて、CL合成変異体を作成することに成功した。CL合成変異体では生育異常の他に、ミトコンドリア形態の異常があることを発見した。野生型における多細胞生物の組織間の比較からも、*CLS*の発現部位とミトコンドリアの形態が変化している箇所は似ており、単なる変異体における機能欠損より広範囲な視野から推定したCLの機能として、ミトコンドリア形態の制御があげられることを発見した。