

氏名	小林 啓子		
博士の専攻分野の名称	博士（理学）		
学位記号番号	博理工甲第 677 号		
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 24 日		
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
学位論文題目	植物のイソプレノイド合成の制御機構に関する研究		
論文審査委員	委員長	客員教授	松本 正吾
	委員	客員教授	辻本 雅文
	委員	准教授	金子 康子
	委員	教授	菅原 康剛

論文の内容の要旨

高等植物が生合成する多種多様なイソプレノイド化合物は、動物とは異なり細胞質のメバロン酸（MVA）経路と、色素体の非メバロン酸（MEP）経路の 2 つの経路によって合成される。これまでに両経路がそれぞれ異なる物質を生合成すること、および 2 経路間には少なくとも物質レベルのクロストークがあることが分かってきた。このような植物イソプレノイド生合成の複雑さなどから、植物は独自のイソプレノイド生合成制御機構を持つと考えられているが、その詳細は不明である。HMG-CoA レダクターゼ（HMGR）は MVA 経路における鍵酵素である。この HMGR の特異的阻害剤であるロバスタチンに低感受性を示すシロイヌナズナの変異体として *loi1*, *loi2* の 2 ラインを得た。本研究ではこれらの変異体解析により、植物に特徴的な MVA 経路の新規調節因子を同定した。

loi1 はロバスタチン存在下においても MVA 経路の主要な代謝産物であるステロール量が減少しにくい変異体であった。*loi1* と野生型を比較してロバスタチンの処理・非処理に関わらず HMGR の遺伝子発現、タンパク質量の上昇は見られなかったが、ロバスタチン存在下で育成した *loi1* では HMGR 活性の上昇が見られた。*loi1* はこの HMGR の活性化によりロバスタチン低感受性を示していると考えている。また *loi1* は MEP 経路の阻害剤に対しても低感受性を示したが、この形質とロバスタチン低感受性形質はお互いに独立しており、MEP 経路の代謝フロー増加によってロバスタチン低感受性を獲得している可能性は否定された。

LOI1 は pentatricopeptide repeat (PPR) タンパク質をコードする遺伝子であった。PPR はプラスチドかミトコンドリアに局在して、オルガネラ RNA のスプライシングや編集などに関わると予測されているタンパク質ファミリーである。*LOI1* は RNA 結合能を持ち、*LOI1*-GFP 融合タンパク質を用いた解析によりミトコンドリア局在が予測された。ではミトコンドリア局在の RNA 結合タンパク質がどのようにして HMGR 活性を調節しているのか？まず *LOI1* の PPR としての機能を調べるために野生型と *loi1* のミトコンドリア RNA のスプライシングと RNA 編集を調べて比較した。イントロンを持つミトコンドリア遺伝子の発現を調べたところスプライシングの異常は見られなかったが、RNA 編集が報告されている 33 個の遺伝子のうち、*nad4*, *ccb203*, *cox3* の三つの遺伝子に、*loi1* のみで RNA 編集が起らない RNA 編集サイトが存在した。これら三つの遺伝子はそれぞれミトコンドリアで呼吸鎖の構成に直接的・間接的に関わっており、*loi1* では呼吸能が損なわれていると予想した。そこで呼吸活性を調べたところ、*loi1* は野生型と比較して全

体の呼吸能が上昇しているにも関わらず *ccb203* と *cox3* が関与するシトクロム経路の活性が若干下がっており、ATP 合成に貢献しない AOX 経路の活性が上昇していることが示唆された。そこで野生型にシトクロム経路の阻害剤を投与したところ *loi1* 同様にロバスタチンに低感受性となり、HMGR 活性の上昇が見られた。以上の結果から、*loi1* のロバスタチン存在下での HMGR 活性上昇は、*ccb203* や *cox3* 遺伝子の RNA 編集が異常になり、シトクロム経路が損傷を受けることにより引き起こされるのではないかと考えている。

一方 *loi2* は胚軸の長い変異体でもあり、2004 年に MVA と MEP 経路の阻害剤に耐性を示す変異体として報告された *rim1* (*phyB*) 変異体に酷似していた。そこで *phyB* を含む胚軸の長い既知の光感受性変異体と *loi2* の相補性検定を行ったところ、*loi2* はどの変異体とも原因遺伝子が異なる変異体であった。また、*rim1* の MVA 経路阻害剤低感受性は HMGR 遺伝子発現の上昇により説明されているが、*loi2* の HMGR 遺伝子発現は特に上昇が見られなかった。*loi2* 形質は T-DNA と連鎖しているものの T-DNA 挿入領域に遺伝子は存在せず、現在マッピングにより *LOI2* 遺伝子の同定を進めている。

本研究ではイソプレノイド生合成の調節に関わる新規変異体 *loi1* と *loi2* を単離・解析した。*loi1* の解析によりミトコンドリアにおける呼吸が MVA 経路の調節に関わっているという、新しい調節機構を発見した。イソプレノイド生合成の制御機構の研究は、専ら代謝酵素の生化学的解析や生物有機化学的解析、逆遺伝学の手法により行われてきた。これらの手法で解析出来るのは直接的な因子に限られており、実際にはそれらの因子は様々な環境変化や成長段階に応じた制御を受けて機能している。*loi* シリーズのさらなる解析により、環境応答や生長・生理による制御を含む、異なるオルガネラ間にまたがったイソプレノイド生合成の調節機構の理解に繋がると考えている。

論文の審査結果の要旨

本学位論文審査委員会は当該論文の発表会を平成 20 年度 1 月 31 日に公開で開催し、詳細な質疑のもとで論文内容を審査した。以下に学位論文の審査結果を要約する。

本論文は高等植物のイソプレノイド生合成の新規制御機構を双子葉植物のモデル植物であるシロイヌナズナを用いて遺伝学的に明らかにした研究の成果についてまとめたものである。

高等植物が生合成する多種多様なイソプレノイド化合物は、植物の生育に必須であるのみならず、人の生活に有用な物質が数多く含まれることから、その生合成経路の解析は重要な研究領域として注目を集めてきた。動物のイソプレノイド生合成は細胞質のメバロン酸経路 (MVA 経路) で行われているが、高等植物ではこの経路に加えて色素体に非メバロン酸経路 (MEP 経路) を持っている。両経路間は原則的には区分されているが、少なくとも物質の流れがあることが分かってきた。MVA 経路の鍵酵素である HMG-CoA reductase (HMGR) の調節領域の構造は動物と植物で異なっており、動物の HMGR の調節因子が植物では保存されていないことから、植物は動物とは異なる MVA 経路の調節機構を持っていることが予測されている。最近の研究の進捗に伴い、イソプレノイド生合成の酵素遺伝子がクローニングされ、代謝経路の概要が明らかにされつつあるが、MVA 経路の調節因子については未だ同定されていない。本学位申請者は以上の現状を踏まえた上で MVA 経路の調節に関わる 2 つの新しい因子 LOI1 と LOI2 に関する研究成果を 4 章に分けて記述している。

第一章では、HMGR の特異的阻害剤であるロバスタチンに低感受性を示す変異体 (*lovastatin insensitive; loi1, loi2*) の単離・解析について述べている。イソプレノイド生合成阻害剤と変異体を用いた解析により、*loi1* 変異体は MVA 経路と MEP 経路が独立して増強された変異体であることを示している。さらに野生型と変異体におけるイソプレノイド生合成酵素の遺伝子発現やタンパク量、酵素活性を比較することにより、MVA 経路の増強は HMGR 活性の上昇によるものであることを明らかにしている。また、*loi1* 変異体における T-DNA 挿入位置を特定し、LOI1 遺伝子の同定を行っている。

第二章では LOI1 蛋白質の機能解析を行っている。LOI1 遺伝子は 35 アミノ酸から成る PPR (pentatricopeptide repeat) モチーフを含む蛋白質をコードしていた。PPR 蛋白質ファミリーは、オルガネラ RNA の転写後調節に関わることが予測されている。そこで、LOI1 蛋白質が RNA 結合能を持つこと、LOI1N 末端-GFP 融合蛋白質がミトコンドリアに局在することを明らかにした。ミトコンドリア遺伝子は転写後において RNA スプライシングやエディティング、安定化などの機構により発現が調節されることが知られている。そこで、野生型と *loi1* 変異体におけるミトコンドリア遺伝子のスプライシングとエディティングを比較した。その結果、*loi1* 変異体において *nad4*, *ccb203*, *cox3* の 3 つの遺伝子で RNA エディティングの異常を見いだし、LOI1 がこれら 3 つの呼吸鎖の直接的・間接的な構成要素をコードする遺伝子の RNA エディティングに機能する因子であることを明らかにした。

第三章ではミトコンドリアにおいて呼吸鎖が損なわれることによってイソプレノイド生合成にどのような影響が及ぼされているのか、検討を行っている。*loi1* 変異体では呼吸鎖に機能する遺伝子の RNA エディティングが異常になることにより、呼吸能が低下していることが予測された。そこで、酸素電極を用いて野生型と *loi1* 変異体における呼吸活性を比較した。その結果 *loi1* 変異体では ATP 合成に貢献するシトクロム経路の活性が若干低下し、ATP 合成に貢献しない AOX 経路の活性が上昇しており、野生型よりも呼吸の効率が低下していることが示唆された。さらに、呼吸鎖の阻害剤を野生型植物に与えることによって *loi1* と同様のイソプレノイド生合成阻害剤低感受性形質と HMGR 活性の上昇を再現することに成功した。以上の結果により申請者はミトコンドリアの呼吸異常が細胞質と色素体のイソプレノイド生合成に影響を与えること

を明らかにし、複数のオルガネラにまたがった複雑なイソプレノイド生合成制御機構の存在を見いだした。

第四章ではもう一つのロバスタチン低感受性変異体である *loi2* 変異体の解析を行っている。この *loi2* 変異体は HMGR 阻害剤に低感受性が報告されている既存の光感受性変異体に似た形質を持っていたが、相補性検定により *loi2* 変異体はこれらの変異体とは異なる新規な変異体であることを明らかにした。また、光感受性変異体の HMGR 阻害剤低感受性は HMGR 遺伝子発現の上昇によるものであったが、*loi2* 変異体では HMGR 遺伝子の高発現は見られず、異なるメカニズムによりロバスタチン低感受性形質を示していることが予想された。*loi2* 変異体の解析によりさらに新しいイソプレノイド生合成の調節機構が明らかになることが期待出来る。

以上のように、本研究は今まで知られていなかったイソプレノイド生合成調節機構の存在を示した。さらに高等植物におけるオルガネラ間コミュニケーションの因子として注目を集めている PPR 蛋白質の機能について、多くの新規な知見を提示している。また、第一章と第二章の一部の成果については既に *Plant and Cell Physiology* 誌に発表されており、後半の章についても現在投稿論文をまとめている。よって、当審査委員会は、本論文が博士（理学）の学位にふさわしいものと、全員一致で判断した。