

氏名(本籍)	ば ば まさと (栃木県)			
学位の種類	博 士 (理 学)			
学位記番号	博 甲 第 6112 号			
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 23 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
審査研究科	生命環境科学研究科			
学位論文題目	Molecular Mechanism of High-CO₂-inducible Responses in the Unicellular Green Alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (単細胞緑藻 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> の高 CO ₂ 誘導型応答の分子機構)			
主査	筑波大学教授	理学博士	白 岩 善 博	
副査	筑波大学教授	博士(農学)	鈴 木 石 根	
副査	筑波大学教授	理学博士	鎌 田 博	
副査	筑波大学教授	理学博士	佐 藤 忍	

論 文 の 内 容 の 要 旨

大気中の CO₂ 分圧は地球史上ある程度の増減を経ながらも減少傾向で推移し、現在は非常に低い水準（低 CO₂ 環境）にあり、植物は CO₂ 制限状態にさらされている。それを反映して、現大気条件に適応した植物は、低濃度の CO₂ を効率よく同化する仕組みを有する。一方、微細藻類は現大気の数十～数百倍の CO₂ 濃度上昇に対しても機能的に応答することが知られ、このような高 CO₂ 応答性は、多様な水中の CO₂ 環境と関連していると思われる。今世紀末、大気 CO₂ 分圧は、藻類の低 CO₂ 応答が喪失される水準（1,000 ppm）になると予測されており、藻類の高 CO₂ 応答機構の研究の重要性が増している。

申請者は微細藻類の高 CO₂ 応答を研究するにあたり、まず、単細胞緑藻クラミドモナスが細胞膜-細胞壁間領域に保持する細胞外タンパク質組成が CO₂ 濃度依存的に顕著に変化する現象に着目した。そこで、細胞の CO₂ 順化程度を示す分子マーカーとして、それぞれ高 CO₂ と低 CO₂ 濃度下で発現量が増加する細胞外タンパク質である H43/FEA1 と CAH1 に着目し研究を進めた。

本研究では、第一に、高 CO₂ 応答機構の解明の第一歩として、H43/FEA1 に高 CO₂ 誘導性を付与するシス転写因子を探索した。そのため、H43/FEA1 の上流配列を欠損させた変異株を作製して解析した。シス転写因子解析は、レポーター遺伝子と選抜マーカー遺伝子を一齐に導入することが可能な手法を構築し用いた。シス転写因子を含むと予想される H43/FEA1 上流配列を ARS 遺伝子に接続した人工遺伝子で形質転換した株を用いて、酢酸呼吸の増大によりもたらされる高 CO₂ 誘導的な ARS 酵素活性を観察した。配列に欠失変異を加えた系列も解析した。その結果、遺伝子の高 CO₂ 誘導性は、鉄欠乏誘導性シス転写因子を欠失変異させた場合にも残ることを示した。高 CO₂ 誘導性シス転写因子の厳密な位置決定は今後の課題として残されているが、H43/FEA1 は高 CO₂・鉄欠乏誘導性シス転写因子を別々に持ち、2つのシグナルは異なる経路で遺伝子発現を制御することが明らかとなり、微細藻類の高 CO₂ 誘導性転写因子が本研究により初めて確認された。この範囲内には既知の CO₂ 応答性シス配列は見出されず、新規な高 CO₂ 誘導性シス配列の存在が予測された。この結果は、高 CO₂ 誘導性が、鉄欠乏によりもたらされる二次的影響によるものではないことを明確に証明したものである。

第二は、クラミドモナスにおける CO₂ 濃度依存的な細胞外タンパク質組成変化の網羅的解析である。本研究では、細胞内タンパク質組成には顕著な変化が見られなかったことから、細胞外タンパク質に焦点を絞り解析したものであり、クラミドモナスのゲノムデータベースの整備とペプチド-質量分析フィンガープリント法の確立によりようやく可能となったものである。

低 CO₂ (0.04%) および高 CO₂ (3%) 通気条件でクラミドモナス細胞壁欠損株をそれぞれ培養し、細胞外タンパク質を回収した。解析の結果、高 CO₂ 誘導性タンパク質を 22 種 (11 種のヒドロキシプロリンに富む糖タンパク質 (HRGP) および 6 種の配偶子形成関連タンパク質を含む) 新たに同定した。HRGP は、クラミドモナス属の性認識に関わることが示唆されているが、高 CO₂ に順化した細胞では接合子の形成は誘導されないことを確認した。この結果は、それらの高 CO₂ 誘導性タンパク質が単独で接合子形成を完結させることはできないことを明らかにしたが、それをもって直ちに高 CO₂ が有性生殖に全く関与しないと結論づけることはできないため、今後は新規に発見された高 CO₂ 誘導性 (有性生殖関連) タンパク質のさらなる解析が課題である。

審 査 の 結 果 の 要 旨

微細藻類の高 CO₂ 応答機構の解明は、今後増加する大気 CO₂ 濃度への生物応答やバイオマス・バイオエネルギー物質の生産過程で使用される高 CO₂ 富化条件下での微細藻類の応答の予測のために特に重要である。本研究は、光合成のモデル生物として使用されている単細胞緑藻クラミドモナスを用いて、新規の高 CO₂ 誘導性シス転写因子の存在を明確に示し、さらに高 CO₂ 誘導性の細胞外タンパク質を明らかにしたことに加えて、高 CO₂ 条件が短期的な光合成の促進をもたらすだけでなく、有性生殖のような細胞増殖の根幹にかかわる現象にも影響する可能性を示した点でも意義深いものである。

平成 24 年 1 月 11 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士 (理学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。