

氏名(本籍)	ひら かわ よし ひさ 平 川 泰 久 (広 島 県)		
学位の種類	博 士 (理 学)		
学位記番号	博 甲 第 4984 号		
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 25 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	Protein Targeting into Chlorarachniophyte Plastids: Characterization of Plastid-Targeting Signals (クロララクニオン藻の葉緑体へのタンパク質輸送：葉緑体輸送シグナルの特徴を明らかにする)		
主 査	筑波大学准教授	博士(理学)	石 田 健一郎
副 査	筑波大学教授	理学博士	井 上 勲
副 査	筑波大学教授	理学博士	沼 田 治
副 査	筑波大学教授	理学博士	鎌 田 博

論 文 の 内 容 の 要 旨

葉緑体は、一つのシアノバクテリアが真核生物に取り込まれ維持される一次共生により誕生し、その後、一次共生により葉緑体を獲得した植物をさらに別の真核生物が取り込むという二次共生によって、複数の真核生物系列へと伝播したことが知られている。これら葉緑体の獲得と伝播に寄与した共生イベントは、生物進化に非常に大きな影響を与えたと考えられ、細胞内共生による葉緑体獲得の進化過程の理解は、光合成真核生物の進化の理解において大変重要である。細胞内共生の過程において、核に転移した葉緑体(共生者)遺伝子が機能し、細胞核による葉緑体の制御を可能にするためには、葉緑体へのタンパク質輸送機構の確立が一つの重要なステップであるといえる。従って、このタンパク質輸送機構を明らかにすることで、細胞内共生による葉緑体獲得の進化過程の理解に大きく貢献できると考えられる。

陸上植物など、一次共生に由来する生物の核コード葉緑体タンパク質は、N末端側に Transit peptide と呼ばれる輸送シグナル配列をもち、細胞質で翻訳された後、2枚の葉緑体膜を通過して輸送される。一方、二次共生に由来する生物の葉緑体へ輸送される前駆体タンパク質は、N末端側に2つの輸送シグナル(小胞体への輸送シグナル: Signal peptide (SP) とストロマへの輸送シグナル Transit peptide (TP))をもつ。これらの前駆体タンパク質は小胞体上のリボソームで翻訳され、その後、小胞体を介して葉緑体へ輸送されるとされている。しかし、二次共生由来の生物群が複数存在する中で、葉緑体へのタンパク質輸送が詳細に研究されたのは一部のグループだけであり、二次葉緑体をもつ生物群全体では不明な点が多い。筆者が研究対象としたクロララクニオン藻は、原生生物の一群であるケルコゾアの一つが緑藻を取り込んだ二次共生由来の生物群で、4枚の平滑な膜に包まれた緑色の葉緑体をもつ。これは、他の二次共生由来の生物群とは起源も細胞構造も異なることを意味しており、二次共生の過程で葉緑体へのタンパク質輸送も独自に確立したと考えられる。しかし、葉緑体へのタンパク質輸送に関する知見は著しく乏しく、詳細な研究が期待されていた。

筆者は、クロララクニオン藻での葉緑体タンパク質の輸送シグナルの機能を明らかにし、二次葉緑体全体での輸送シグナルの機能の多様性と進化過程を考察することを目的として、本研究を行った。筆者は博士前

期課程における研究で、クロララクニオン藻への遺伝子導入系を世界で初めて確立しており、本研究ではこのオリジナルの研究技術を用い、タンパク質輸送シグナルに関する *in vivo* での機能解析をおこなった。

クロララクニオン藻の葉緑体タンパク質前駆体はN末端に2つの輸送シグナル (SP, TP) をもつことが、遺伝子の配列からすでに予測されていた。筆者は、まずN末端の輸送シグナルが実際に機能するかどうかを GFP (green fluorescent protein) との融合タンパク質を用いて解析した。その結果、SPとGFPの融合タンパク質は小胞体へ、SP + TPとGFPの融合タンパク質は葉緑体へ輸送されることを確認し、クロララクニオン藻のSPは小胞体への輸送に、TPはその後の葉緑体への輸送に必要であることを初めて実験的に明らかにした。次に、葉緑体への輸送に重要だと思われるTP領域について deletion および substitution 技術を用いて実際の機能部位を詳しく解析し、TPのC末端領域が小胞体から葉緑体への輸送に重要であり、TP内の複数の正電荷のアミノ酸が4枚の葉緑体包膜の内、内側2枚を通過するのに必要であることを示した。これにより、クロララクニオン藻のTPの機能部位は他の二次共生由来の生物のものとは異なることを明らかにした。

筆者は次に、クロララクニオン藻の葉緑体を包む4枚の膜の内側の2枚と外側の2枚の間の区画 (ペリプラスチダルコンパートメント: PPC) へのタンパク質輸送シグナルについても解析を行った。クロララクニオン藻のPPCには、葉緑体の祖先となった共生緑藻の痕跡的な核 (ヌクレオモルフ) が存在する。最近、このPPCで機能すると考えられるペプチド伸長因子様タンパク質遺伝子: EFL) が核ゲノムに転移していることが明らかとなり、筆者はこの遺伝子がコードするEFL前駆体の輸送シグナルの機能を *in vivo* で解析した。その結果、PPC輸送シグナルと葉緑体輸送シグナルは、非常によく似ているが、PPC輸送シグナルのTPは複数の負電荷アミノ酸をもち、これがタンパク質輸送をPPCで停止するのに必要であることを明らかにした。これは、クロララクニオン藻が、TP内の電荷によってPPCタンパク質と葉緑体タンパク質をPPC内で識別していることを初めて示したものである。

筆者はさらに、クロララクニオン藻のRubisCO小サブユニットの葉緑体への輸送には、通常のSP, TPに加えて新規の第3のシグナルが必要であることを明らかにした。クロララクニオン藻のRubisCO小サブユニットタンパク質はN末端側にSP, TPの輸送シグナルをもつが、筆者の *in vivo* 解析により、それらのシグナルのみでは葉緑体へタンパク質を輸送することができないことが示された。そこで成熟タンパク質領域も含めた deletion & substitution 解析を行ない、このタンパク質が、成熟タンパク質内に新規の輸送シグナル領域 (internal targeting signal: ITS) をもつことを明らかにした。このような輸送シグナルをもつタンパク質の報告はこれまでなく、葉緑体へのタンパク質輸送に関する新たな知見となった。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、これまで不明であったクロララクニオン藻の葉緑体へのタンパク質輸送シグナルの具体的な機能を、独自に開発した世界初の遺伝子導入系を用いて解明し、クロララクニオン藻における葉緑体へのタンパク質輸送に関する理解だけでなく、二次葉緑体をもつ生物群全体でのタンパク質輸送シグナル機能の多様性の解明にも大きく貢献した点で高く評価できる。さらに、ペリプラスチダルコンパートメントへのタンパク質輸送シグナルと葉緑体タンパク質との識別機構の解明、ルビスコタンパク質の新規の輸送シグナルの発見など、インパクトの大きな新知見を次々に得ており、質の高い博士論文であると言える。本研究の成果は、二次共生による葉緑体獲得の進化過程の理解と光合成真核生物の進化と多様性の理解に非常に大きく貢献するものである。

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。