

別紙 4

報告番号	※ 乙 第 号
------	---------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 シロイヌナズナ *crumpled leaf* 変異体サプレッサー遺伝子の同定と解析

氏 名 吉村 亮

論 文 内 容 の 要 旨

光合成を行う細胞小器官である葉緑体は核ゲノム遺伝子の発現制御や、植物の形態形成にも関与しているが、葉緑体のどのような機能がどのように核ゲノム遺伝子の発現制御や、植物の形態形成に関与しているかについては不明な点が多い。モデル植物 *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ) の *CRUMPLED LEAF (CRL)* 遺伝子は陸上植物に保存された遺伝子であり、葉緑体を包む外包膜に局在するタンパク質をコードしている。CRL タンパク質が葉緑体に局在するにも関わらず、*crl* 変異体では、植物体の形態異常、ストレス関連遺伝子の発現誘導、葉緑体分裂阻害、植物の成長抑制、自発的細胞死の誘導等様々な形質が顕れる。*crl* が示すこのような形質は葉緑体が核ゲノム遺伝子の発現制御、植物の形態形成や成長、自発的細胞死等に関与していることを示しているが、CRL がどのようにしてこれらの現象に関与しているのかは不明である。本研究は CRL タンパク質の機能を明らかにすることを目的として、*crl* 変異体が示す多面的な形質を抑圧するサプレッサー遺伝子の解析を行った。その結果、CRL タンパク質が葉緑体外包膜に存在する OUTER ENVELOPE PROTEIN OF 80 KDA (OEP80) タンパク質の複合体形成を補助する働きを持つことが明らかとした。OEP80 は葉緑体外包膜に存在する β バレルタンパク質の膜挿入に関わるタンパク質であり、外包膜にはイオン、アミノ酸、脂質、核コードタンパク質等の輸送に関わる複数の β バレルタンパク質が存在する。そのため、*crl* 変異体が示す多面的な形質が葉緑体外包膜に存在する β バレルタンパク質の機能不全、もしくは低下に起因することが示唆される。本研究の成果は、葉緑体外包膜に存在する β バレルタンパク質が、核ゲノム遺伝子の発現制御、植物の形態形成や

成長、自発的細胞死、葉緑体分裂に重要な働きをしている可能性を新たに示し、これらの現象に關与する葉緑体機能を理解する手がかりを提供するものである。

cr1 の 1 アミノ酸置換変異体 *cr1-2* 種子をエチルメタンスルホン酸変異原処理して複数のサプレッサー系統が単離されている。本研究は S2-6 について遺伝学的解析、表現型解析、およびトランスクリプトーム解析を行い、S2-6 がもつサプレッサーが形質によっては半顕性遺伝もしくは顕性遺伝する 1 遺伝子であること、地上部の成長と形態、葉緑体分裂、子葉における細胞死のすべての形質がほぼ完全に野生型に回復すること、および、遺伝子発現がほぼ野生型と同程度に戻っていることを明らかにした。次世代シーケンサーを用いた全ゲノム塩基配列解析、および、遺伝的相補実験によって、S2-6 のサプレッサー遺伝子が 516 番目のグリシンがグルタミン酸に置換する 1 アミノ酸置換 (G516E) をもつ、葉緑体外包膜タンパク質遺伝子 *OEP80* であることを明らかにした。また、S2-6 の原因遺伝子変異が *CRL* の機能喪失変異体 *cr1-1* の形質を回復させることを示した。半顕性サプレッサー遺伝子をもつ S1-9 系統は *OEP80* 遺伝子が 424 番目のアラニンがバリンに置換した 1 アミノ酸置換変異 (A424V) を持つこと、および、S1-9 系統においても *cr1-2* が示す地上部の成長阻害と形態異常、葉緑体分裂阻害、子葉における細胞死誘導がほぼ完全に野生型に回復することが明らかにされている。そこで、AlphaFold2 を用いた *OEP80*^{G516E}、*OEP80*^{A424V} の立体構造解析を行い、516 番目のグリシン、424 番目のアラニンがそれぞれ、16 個の β ストランドから構成される *OEP80* の β バレルドメイン内の 7 番目と 2 番目の β ストランドに位置すること、および、グリシンからグルタミン酸、アラニンからバリンへのアミノ酸置換によって、 β バレルドメイン構造が変形する可能性があることを示した。次に、単離葉緑体から膜タンパク質画分を抽出し、抗 GFP 抗体を用いた共免疫沈降実験によって、*CRL*-GFP 融合タンパク質が *OEP80* と相互作用することを示した。さらに、単離葉緑体膜タンパク質画分を用いた Blue-Native/SDS-PAGE 二次元電気泳動解析によって、分子量約 200,000 の *OEP80* タンパク質複合体が *cr1-2* では不安定化し、S2-6 では安定化していることを明らかにした。また、大部分の *CRL* タンパク質が分子量約 66,000 に検出され、ごく一部の *CRL* タンパク質のみが分子量約 200,000 に存在することを明らかにした。以上の結果から、*CRL* は *OEP80* と安定な複合体を形成しておらず、一過的に *OEP80* と相互作用し、*OEP80* 複合体の形成を促進する因子であることが示唆された。*OEP80* の機能喪失変異体 *oep80-2* が胚性致死であるのに対して、*CRL* の機能喪失変異体である *cr1-1* は致死ではないことから、*CRL* は *OEP80* 複合体の形成に必須の因子ではなく補助的な働きをしている因子であると考えられる。また、サプレッサーとして同定された *OEP80*^{G516E}、*OEP80*^{A424V} は *CRL* の介在なしに安定な複合体を形成すると考えられる。