

別紙 4

| | | | | |
|------|---|---|---|---|
| 報告番号 | ※ | 甲 | 第 | 号 |
|------|---|---|---|---|

主 論 文 の 要 旨

論文題目 気孔開度変異体の単離と新奇気孔開度制御遺伝子の同定

氏 名 富山 将和

論 文 内 容 の 要 旨

植物の表皮に存在する気孔は一对の孔辺細胞により構成されており、植物は変化する環境に応じて気孔の開度を調節することで、光合成に必要な二酸化炭素の取り込みや酸素の放出などのガス交換や蒸散を制御している。これまでの研究により、気孔は青色光に応答して開口すること、植物ホルモン・アブシジン酸 (ABA) に応答して閉鎖することなどが明らかとなっているが、気孔開・閉のシグナル伝達経路には未だ不明な点が多く残されており、その分子メカニズムの詳細は明らかではない。本研究では、気孔開・閉に関わる新奇因子を同定するために、赤外線サーモグラフィを用いた葉の表面温度測定により、EMS (エチルメタンサルホン酸) 処理したシロイヌナズナのスクリーニングを行った。その結果、通常の生育条件下において気孔が顕著に開口した *lost* (*low temperature with open-stomata*) 変異体を 6 株 (*lost1*-*lost6*)、気孔が閉鎖した *hist* (*high temperature with closed-stomata*) 変異体を 2 株 (*hist1*, *hist2*) 単離した。このうち *lost2*、*lost3*、*lost5* 変異体の原因遺伝子は、既知の気孔が顕著に開口した変異体と同じ原因遺伝子であることが示唆され、本スクリーニングが気孔開度変異体の単離に有用であることを確認することができた。そこで、さらに他の気孔開度変異体について解析を進めた。

まず、気孔が恒常的に開口しており、ペールグリーンの表現型を示す新奇気孔開度変異体 *lost1* について解析を進めた。ゲノムマッピングとシーケンスによる解析の結果、*lost1* の原因遺伝子はクロロフィル合成酵素 Mg-キラターゼの I サブユニット 1 (*CHL11*) である可能性が示唆された。さらに、*lost1* 変異体に野生型の *CHL11* 遺

伝子を導入する相補実験により、これが原因遺伝子であることを同定することができ、気孔開度変異体として順遺伝学的に *chli1* 変異体を単離した初の例となった。さらに、気孔の ABA 応答を調べた結果、*lost1* は、過去に報告されている Mg-キラターゼの H サブユニット (CHLH) の変異体 *rtl1* と同様に、ABA 低感受性の表現型を示した。これらの結果から、Mg-キラターゼの H サブユニットだけでなく I サブユニットも気孔の ABA シグナル伝達に影響することが明らかとなった。さらに本研究では、同じくクロロフィル合成酵素である Mg-プロトポルフィリン IX メチルトランスフェラーゼ (CHLM) の変異体 *chlm* と、クロロフィル合成と前駆体を共有しているフィトクロモビルン合成に関わる酵素 GUN2 と GUN3 の変異体 *gun2* と *gun3* の解析を行った。その結果、これらの変異体の気孔も ABA 低感受性を示すことが明らかとなり、葉緑体におけるクロロフィルやフィトクロモビルンのテトラピロール色素の生合成が、気孔の ABA 応答に影響する可能性が示唆された。

次に、特に顕著な気孔開口を示した *lost4* の解析を行った。*lost4* は、*lost1* と同じくペールグリーンの表現型を示した。ゲノムマッピングと次世代シーケンサーを用いた解析により原因遺伝子を探索した結果、原因遺伝子は葉緑体タンパク質 ClpC1 と推定された。また、*ClpC1* 遺伝子のノックアウト変異体 *clpc1* は *lost4* と同様に顕著な気孔開口を示した。さらに、*lost4* 変異体に野生型の *ClpC1* 遺伝子を導入する相補実験により、これが原因遺伝子であることが同定された。ClpC1 は、葉緑体ストロマに存在する Clp プロテアーゼ複合体の C1 サブユニット (ClpC1) として機能することが知られている。そこで、Clp プロテアーゼ関連タンパク質の変異体 *clpb3* の気孔の表現型解析を行った結果、*clpb3* はペールグリーンの表現型とともに非常に顕著な気孔開口を示したことから、ClpC1 や ClpB3 が関わる Clp プロテアーゼの機能が気孔開度制御に重要であることが示唆された。今後は、Clp プロテアーゼが気孔の開・閉にどのように影響しているのか、その分子メカニズムと生理学的意義を明らかにしたい。さらに、本研究にて単離した、原因遺伝子が未同定の *lost6*、*hist1*、*hist2* についても今後解析を進め、より多くの新奇気孔開度制御因子の同定と機能解析を行い、気孔開度制御メカニズムを解明したい。