

学位論文要旨

Molecular analysis of *DELAYED YELLOWING1* that encodes Lhca4, a subunit of LHCI, in rice

(イネ LHCI サブユニット Lhca4 をコードする *DELAYED YELLOWING1* の分子遺伝学的解析)

氏名 山谷 浩史

野外環境下で生育する植物は絶えず光強度や光質の変化にさらされている。光合成の明反応は二つの複合体、光化学系I (PSI)と光化学系II (PSII)が中心的な役割を担うが、それぞれ効率的に働く光条件は異なる。そのため、生育する光環境によっては光化学系間のバランスが大きく崩れることがある。植物は様々な光条件においても光合成の効率を保つため、PSIとPSIIの活性調節システムを備えている。その代表的なものにステート遷移と長期的光順化がある。ステート遷移は両光化学系のアンテナタンパク質として働くことができるLHCIIを2つの光化学系の間で移動させ、アンテナサイズを調節することでバランスを補正する短期的な応答機構であり、PSI活性が低くなる光条件下ではLHCIIをリン酸化し、PSIのアンテナタンパク質として利用する。一方、長期的光順化は相対的にPSI活性が低くなる光条件下で光化学系Iのコアタンパク質の転写量を増加させ、光化学系間のバランスを補正する長期的な応答機構である。これらの光環境応答の研究は活発に行われているものの、いまだに不明な点も多く、またモデル植物種以外での知見は必ずしも多くない。

本研究ではイネの新奇stay-green突然変異体*delayed yellowing1* (*dye1*)の原因遺伝子の単離と機能解析を試みた。stay-green突然変異体とは老化時も葉の緑色が保たれる突然変異体のことであり、*dye1*では自然老化時に野生型に比べ高いクロロフィル含量が保持されていた。止葉クロロフィル含量の変化を経時的に調べたところ、*dye1*では老化前から野生型に比べ高く、老化過程においては野生型と同様にクロロフィル含量は低下していくものの、野生型に比べると高い値を維持することが分かった。したがって、*dye1*がstay-green表現型を示すのは老化前からクロロフィル含量が高いことが原因と考えられた。出穂後4週間における老化マーカー遺伝子の発現と炭酸固定速度は*dye1*と野生型との間で有意な差はなかったことから、*dye1*は老化前からクロロフィル含量が高く、緑色は保っているものの老化自体は進行するType E と呼ばれるstay-green突然変異体と考えられた。

次に*DYE1* 遺伝子を単離するためにマップベースクローニングを試みた。*dye1*と野生型の交雑後代を用いた解析により、候補領域を第8染色体の43.1kbに絞り込むことに成功した。次世代シーケンサーを用いた解析の結果、この領域に存在するPSIアンテナタンパク質LHCIのサブユニットの一つLhca4に、146番目のグルタミン酸をリジンに置

換する塩基置換が生じていることが分かった。このグルタミン酸残基は緑色植物の間で高度に保存されるとともに、クロロフィル結合にも重要であると考えられている。*dye1* に野生型の *Lhca4* を導入した形質転換体は野生型と同程度のクロロフィル含量を示したことから、*DYE1* は *Lhca4* をコードすることが確かめられた。

以上の解析により *dye1* の stay-green 表現型の原因が老化前からクロロフィル含量が高いことと考えられたことから、*dye1* の老化前の表現型についてさらに解析を行った。まずウェスタンブロット解析により出穂時の止葉における *Lhca4* の蓄積量を検討したところ、顕著な低下が観察されたことから、*Lhca4* に生じたアミノ酸置換がタンパク質の不安定化を引き起こしている可能性が考えられた。また、*Lhca4* とヘテロダイマーを形成する *Lhca1* の蓄積も減少した。光化学系複合体の構成を Blue Native PAGE 法により解析したところ、*dye1* では PSI-LHCI が含まれるバンドが薄くなり、野生型には見られない 2 本のバンドが現れた。二次元電気泳動法による解析の結果、高分子側のバンドは *Lhca4* が欠損した PSI-LHCI 複合体、低分子側のバンドは PSI コア複合体であることを明らかになった。したがって *dye1* ではアンテナ機能の低下により PSI 活性が大きく減少することが考えられる。実際に P700 光酸化解析により *dye1* では LHCI のアンテナ機能が顕著に低下していることが推測された。

dye1 における *Lhca4* 機能欠損によるアンテナサイズの減少は PSI 機能低下を引き起こすと考えられるが、意外なことに *dye1* におけるバイオマスの減少や炭酸固定速度の低下は観察されなかった。このことは *dye1* において PSI 活性の低下を補償する作用が働いていることを示唆する。そこで PSI の活性調節に働くシステムとして知られているステート遷移と長期的光順化について検討した。PAM 蛍光法によりステート遷移活性を測定したところ *dye1* ではステート遷移活性が極めて低かったことから、PSII から PSI への LHCII の移動は補償作用として働いていないと考えられた。また、シロイヌナズナの長期的光順化では PSI 活性に対し PSII 活性が過剰な条件下で PSI コアタンパク質 mRNA の転写が増大するが、*dye1* では PSI コアタンパク質量がやや増加したものの、転写量の増加は見られなかった。*dye1* では PSI コアタンパク質量の増加に加え、LHCII 量が顕著に増加していた。LHCII はステート遷移の関与がなくても PSI のアンテナタンパク質として機能できることが知られていることから、LHCII 量の増大も PSI 活性の補償に働いている可能性がある。また、*dye1* においてクロロフィル含量が高まっているのはこれらクロロフィル結合タンパク質量が増加しているためと考えられた。

以上、本研究ではイネにおける Type E stay-green 突然変異体 *dye1* の原因遺伝子が PSI アンテナタンパク質サブユニットのひとつ *Lhca4* をコードすることを明らかにした。*dye1* では LHCI の PSI アンテナとして機能が大きく低下しているものの、圃場条件下での生育抑制はみられないことから、*dye1* では低い PSI 活性を補償するメカニズムが働いていると考えられる。その補償は既知の PSI の活性調節システムとは異なるメカニズムにより行われている可能性が考えられた。