HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	葉緑体のイソプレノイド代謝に関わるLight-harvesting-like protein (LIL3)の機能解析［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	高橋, 香織
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第12271号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61789
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Kaori_Takahashi_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（生命科学）　氏 名　高 橋　香 織

学 位 論 文 題 名

葉緑体のイソプレノイド代謝に関わる Light-harvesting-like protein (LIL3)の機能解析

光合成生物は光エネルギーを用いて光合成を行う。高等植物の場合、光合成の第一段階は、Light-harvesting chlorophyll a/b binding protein complex (LHC)による光エネルギーの集光である。LHC の機能において重要な役割を担うのが、LHC motif と呼ばれる保存されたアミノ酸配列である。光合成生物のゲノム解析が進んだ結果、LHC 近縁なタンパク質がいくつか発見された。これらのタンパク質は、LIL タンパク質と呼ばれ、LHC と同様に LHC motif を持つ。

北海道大学・生命科学院・生物適応機構学研究室では、2002 年より継続的にシロイヌナズナを用いてクロロフィル代謝に異常をきたす変異体のスクリーニングを行っている。このスクリーニングにおいて、側鎖の還元が不完全なクロロフィルを蓄積する 2 つの変異体が単離された。これらの変異体では、それぞれ *LIL3:1* (At4g17600)遺伝子と *LIL3:2* (At5G47110)遺伝子の最初のエキソンにトランスポゾンが挿入されていた。LIL3 は、まだ機能の同定されていない LIL タンパク質の一種であった。当研究室の研究により、*lil3:1/lil3:2* 二重変異体では、α-tocopherol および phytylated chlorophyll (Chl-phytol) の蓄積が見られないことが明らかとなった。この表現型は、geranylgeranyl reductase (GGR)と呼ばれる酵素を欠損した変異体の表現型と非常によく似ている。GGR は geranylgeranyl diphosphate (GGPP)を phytyl diphosphate (PPP)へと還元する酵素であり、生じた PPP は、クロロフィル合成、および α-tocopherol 合成に利用される。実際、*lil3:1/lil3:2* 二重変異体では GGR の蓄積がみられなかった。

では、なぜ、LIL3 遺伝子を欠損させると GGR が蓄積しなくなるのか。LIL3 は GGR の蓄積にどのような影響を与えているのか。さらには、LIL3 が GGR の酵素活性に関与している可能性はあるのか。本研究では、これらの疑問を解決し、LIL3 の機能を明らかにすること、また、LIL タンパク質で保存されている LHC motif の機能を明らかにすることを目的に実験を行った。

まず、LIL3 に FLAG タグを融合した形質転換植物を作成し、免疫沈降によって LIL3 複合

体の単離・精製を行った。その結果、LIL3 は GGR と約 200kDa と約 160kDa の複合体を形成していることが明らかとなった。さらに、GGR に膜貫通ドメインを融合したコンストラクトを作成し、*lil3:1/lil3:2* 二重変異体に形質転換したところ、部分的にではあるが、表現型の回復が見られた。また、LHC がもつ LHC motif はクロロフィルが結合していることが明らかになっており、この結合したクロロフィルが LHC の機能に重要であると考えられている。そこで、LIL3 がもつ LHC motif のうち、クロロフィルが結合すると推測されるアミノ酸をアラニンに置換した形質転換植物を用いて、LHC motif の機能解析を試みた。その結果、LIL3 アミノ酸置換変異体では、野生型植物と同レベルの GGR が蓄積しているにも関わらず、Chl-phytol の割合は 4 割程度までしか回復せず、また、野生型植物で見られる LIL3-GGR 複合体の高分子のバンドが検出されなかった。これらの結果を総合的に考えると、LIL3 の主な機能は、GGR のチラコイド膜へのアンカーであり、GGR の酵素活性には直接的には影響を与えないこと、さらに、LIL3 は LHC motif を介してチラコイド膜上で複合体を形成しており、複合体を形成することで、GGR が効率的に酵素反応を触媒することができることが明らかとなった。