

博士（地球環境科学） 中 邦 真 之

学 位 論 文 題 名

Studies on the light-responsive transcription of
nuclear-encoded photosystem I genes in tobacco

（タバコにおける光化学系 I 核遺伝子の光応答性転写調節機構の研究）

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

高等植物の光化学系 I は少なくとも 13 のサブユニットで構成されており、うち 5 個は葉緑体ゲノムに、残りの 8 つは核ゲノムにコードされている。また、核ゲノムにコードされている遺伝子は一般に 2~3 の重複遺伝子族を構成している。このような数多くの遺伝子群がどのような機構で光に応答しているのかはよくわかつていなない。そこで本論文では、まずこれらの遺伝子が光刺激にたいしてどのように応答するのかを解明し、ついでその転写制御機構についての解析を行った。

タバコ光化学系 I 核遺伝子 *psaD*、*psaE*、*psaH* はそれぞれ 2、2、3 個の重複遺伝子族を構成している。これら個々の遺伝子コピーが光に対してどのような応答様式を示すのかを解析するため、RNase プロテクション法を用いて mRNA の蓄積の変化を調べた。5 日間暗所で成育させた *Nicotiana sylvestris* の黄化芽生えに白色光を照射し、個々の遺伝子コピーの mRNA 量の経時変化を調べた結果、光を照射していない黄化芽生えでも若干の mRNA の蓄積が見られたのに対し、個々のタンパク質産物の蓄積は検出できなかった。この結果は、黄化芽生え中ではこれらの遺伝子群が何らかの転写後制御を受けていることを示唆している。光照射後 1 時間目までは *psaDb* を除く全ての遺伝子コピーの mRNA 量に大きな変化が見られなかったが、*psaDb* の mRNA だけは黄化芽生えに比べ 2 倍ほどに増加しており、光に対してすばやい反応を示した。その後 6 時間目までは、どの遺伝子コピーの mRNA も直線的に同調して増加した。このような光応答は黄化芽生えだけでなく、暗順化させた成熟葉での光応答にも見いだされ、光化学系 I 核遺伝子群の光応答が何らかの共通した機構によって調節されていることを示唆している。

このような共通の光調節機構を解明する端緒として光化学系 I 核遺伝子群のプロモーター領域に共通して存在するオクタマー配列 (R5) に着目し、R5 モチーフに結合する核タンパク質因子の検索をゲルシフト法を用いて行った。その結果、R5 モチーフには少なくとも 3 種の核タンパク質 (R5F1~3) が結合し、それらはリン酸化タンパク質であることがわかった。また、光化学系 I 核遺伝子のプロモーター領域を用いた競合実験の結果、R5F1 は光化学系 I 核遺伝子に特異的に結合することが明らかとなった。しかしながら、R5F1 と R5F2 の結合が光による調節を受けていることを示す結果を得ることはできなかった。これらの結果を考慮に入れると、R5F1 は光化学系 I 核遺伝子の光誘導そのものに関与しているのではなく、光誘導を受けた後の調節機構に関わっているものと推定される。

次に、光化学系 I 核遺伝子の光応答に必須な制御領域を同定するため、*psaDb* をモデル遺伝子としてパーキンソンによるトランジェント発現系を用いて、そのプロモーター領域の解析を行った。*psaDb* のプロモーター領域 (-1722~+24) をレポーターであるホタルのルシフェラーゼ遺伝子と連結したキメラ遺伝子

*psaDb::LUC*を作成し、5日間暗所で成育させた *N. tabacum* の黄化芽生えにパーティクルガンを用いて導入した。明所あるいは暗所で24時間成育させた後、ルシフェラーゼ活性を測定し結果、-1722から+24をカバーするプロモータ領域は十分な光応答能を持つことが示された。同様の実験を5'側からのデリーションコンストラクトについても行い、それらの光応答能を検討したところ、*psaDb*の光応答領域は-233から+24の間にすることがわかった。そこで-249から+24の領域についてリンカースキャン法によるさらに詳細な解析を行った。*psaDb*の-40から-12の領域にはリンカー変異を導入しても *psaDb*の転写活性に大きな変化は見られなかった。一般にTATAボックスは転写開始点上流30塩基前後に存在しているので、この結果は *psaDb*はTATAボックスに依存しないメカニズムで転写されていることを示している。さらに、転写開始点付近(-11～+12)に変異を導入したところ *psaDb*の転写活性は著しく減少した。また、*psaDb*は2つの転写開始点を持っているが、これらの転写開始点の両方に変異を導入すると *psaDb*の転写活性が大きく減少すること、どちらか一方の転写開始点のみに変異を導入した場合は転写活性が部分的に回復したことを考え合わせると、*psaDb*の転写はTATAボックスではなく転写イニシエーターに依存して行われると考えられる。植物遺伝子の約80%がTATAボックスを持っているにもかかわらず、これまでに同定されている光化学系I核遺伝子は全てTATA様配列を持っていない。光化学系I核遺伝子群がTATAボックスを欠くことの生物学的意義はまだ明らかではないが、今後光化学系I核遺伝子群の転写制御機構や進化を解明していく上で興味深い問題である。

また、リンカースキャン解析の結果から *psaDb*の光応答を減少させる制御領域が5ヶ所あることがわかり、それらをRegulatory Box (RB)1～5と名付けた。これらのRBと既知の転写制御配列との相同意を検索したところ、それぞれのRBに興味深い配列がいくつか見いだされた。RB5(-11～+12)には転写イニシエーター結合タンパク質であるTFI-Iの認識配列があり、前述の通り *psaDb*はイニシエーター依存的に転写されることが明らかとなった。CCAAT/エンハンサー結合タンパク質であるNF-IL6の結合配列がRB1(-233～-202)とRB4(-115～-41)に見られ、これらの配列は *psaDb*のエンハンサーとして作用していると推定される。RB2(-195～-170)にはトウモロコシのカルコン合成遺伝子を活性化させるMybホモログタンパク質の認識配列があり、RB3(-137～-122)にはSV40で初めて見いだされたAP-1の結合配列があった。MybおよびAP-1はcGMPシグナルの応答領域として作用することが最近の研究で示唆されている。RB4にはNF-IL6のほかに、*rbcS*や*cab*で共通して存在する配列であるGATA配列とノナマー配列が隣接して存在している。GATA配列は光応答性シス配列であり、近年カルシウム/カルモジュリン情報の受容配列のひとつであることが推定されている。これらの知見を考慮に入れると、*psaDb*はcGMPとカルシウム/カルモジュリンの両方のシグナル受容配列を異なる位置に持っている可能性がある。

最近の光情報伝達系路の研究によると光化学系I遺伝子の光誘導にはcGMPとカルシウム/カルモジュリンの両方のシグナルが必要であることが明かとなっていたが、それぞれのシグナルが共通するひとつのシス配列に伝達されるのか、あるいはそれぞれのシグナルに対応する異なる調節領域があるのか、については未解明だった。本論文では、これらのシグナルに応答する配列が光化学系I遺伝子のプロモーター領域上に分かれて存在している可能性を初めて示唆した。今後、*psaDb*のそれぞれの領域を解析していくことで、光化学系I核遺伝子の光情報伝達系路の全容が明らかになっていくものと期待される。

学位論文審査の要旨

主査 教授 山本 興太朗
副査 教授 高木 信夫
副査 教授 田中 歩
副査 助教授 小保方 潤一 (名古屋大学遺伝子実験施設)
副査 助教授 山崎 健一

学位論文題名

Studies on the light-responsive transcription of
nuclear-encoded photosystem I genes in tobacco

(タバコにおける光化学系 I 核遺伝子の光応答性転写調節機構の研究)

光化学系 I は葉緑体のチラコイド膜上にある色素・タンパク質複合体であり、光合成の初期反応である光化学反応を担っている。高等植物では、光化学系 I 複合体の形成は環境からの光シグナルによって誘導されることが知られているが、その誘導の仕組を遺伝子発現制御機構のレベルから解析した例はまだ極めて少ない。光化学系 I は核ゲノムにコードされている8種のタンパク質サブユニットと葉緑体ゲノム上に遺伝子をもつ5種のサブユニットから構築されているが、申請者はこのうち核にコードされているサブユニット群の遺伝子に着目し、それらの発現が光によってどのように誘導されるのかを分子生物学的手法によって解明しようと試みた。

申請者は、先ずタバコの系 I 核遺伝子7種について、それらの発現が植物体に対する光照射にどのように応答しているのかを詳細に比較検討した。その結果、これらの遺伝子群はきわめて同調した光誘導を示すことが明らかとなり、申請者は一群の系 I 核遺伝子の発現は共通した分子機構によって制御されているものと推論した。次に、その分子機構を解析する端緒として、申請者はこれらの遺伝子群に共通して保存されている塩基配列に着目した。そして、系 I 核遺伝子群には核タンパク質によって特異的に認識される共通オクタマー配列のあることを見いだしたが、この配列が実際に発現の光誘導に関与していることを示す証拠は得られなかった。

ここで申請者は研究の方向を修正し、単離した系 I 核遺伝子に様々な人為的変異を導入した後それを再び植物体にもどし、このキメラ遺伝子の示す発現様式の解析から系 I 核遺伝子本来の発現調節機構を探るという研究手法を試みることにした。従来このような目的

には形質転換植物を用いるのが一般的であったが、形質転換植物の育成にはかなりの時間と手間を要するのが普通である。例えば実験系に形質転換タバコの実生を用いると、キメラ遺伝子を作成してから実際にその発現を調べるまでの1回の実験に半年以上の時間が必要となり、きめこまかい遺伝子解析を進めるのは事実上かなり困難である。最近、パティクルガンを用いればどのような動植物の組織にも比較的簡単に外来遺伝子を導入できることが明らかになり、またこのような方法で導入した遺伝子の一過性の発現を解析すれば、発現解析に要する時間をわずか2-3日に短縮できることが報告された。申請者は系I核遺伝子の解析にこの新しい実験方法を応用することを試みた。実際の実験にあたっては多くの問題点があったが、申請者は実験植物の栽培条件やキメラDNAの調製方法、等々、実験結果に影響を与える様々な因子をひとつひとつ辛抱強く検討し、遺伝子発現の光応答を非常に鋭敏に、かつ簡便に検出できる優れた実験系を作り上げた。そして、この実験系を用いて綿密な解析を進めたことで、光化学系I核遺伝子の光応答機構に関して以下に述べる二つの重要な知見を明らかにした。

申請者はタバコの*psaDb*をモデル遺伝子として解析を進め、まずこの遺伝子の光応答にはプロモーターを介した転写誘導が関っていることを示したうえで、このプロモーター領域（-249から+24までの範囲）に10～20塩基の幅でリンカースキャニング変異を導入し、プロモーターの光応答に必要な塩基配列領域を解析した。その結果、(1) *psaDb*プロモーターの光による転写活性化には五つの領域が関与しており、なかでも重要と推定される二つの領域にはそれぞれ細胞内でのcGMPシグナルとCaシグナルに応答する既知の転写因子の結合配列が見いだされた。また、(2)*psaDb*プロモーターはTATAボックスをもたず、かわりにイニシエーター (Inr) 配列に依存して機能する、所謂 TATA- Inr⁺型の珍しいプロモーターであることが明らかになった。

阻害剤などを用いた最近の研究から、光化学系I複合体の光誘導にはcGMPを介した細胞内シグナル伝達系とCa/カルモデュリン経由のシグナル系がともに関与しているものと推定されていたが、上記で明らかになったプロモーター因子の構成はこの推定を遺伝子レベルで裏付けるものであり、今後の研究の進展が大いに期待される。また、この研究によって植物で初めてTATA- Inr⁺型プロモーターの存在が明らかになったが、興味深いことに既知の系I関連核遺伝子の構造を比較したところその殆どがTATA-型遺伝子であると推定された。これは予想もされていなかった知見であり、このプロモーターの特徴が植物の遺伝子発現調節とどのように関っているのかは今後に残された興味深い研究課題である。

審査員一同は申請者の誠実で緻密な研究姿勢と、その結果生み出された新しい知見とを高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位などもあわせ申請者が博士（地球環境科学）の学位をうけるのに十分な資格を有するものと判定した。