

博士（農 学） 千 葉 由佳子

学 位 論 文 題 名

Cystathionine γ -synthase 遺伝子にみられる
メチオニン添加に応答した転写後制御機構の研究

学位論文内容の要旨

遊離メチオニンを過剰に蓄積するシロイヌナズナ突然変異株 (*mto1*) の解析から、メチオニン生合成の鍵酵素と考えられる cystathionine γ -synthase (CGS) 遺伝子が、メチオニン添加に応答した転写後制御機構を持つことを明らかにした。

*mto1*変異株ではCGS mRNAの蓄積が野生型株の3~5倍になっていた。また、野生型株に根からメチオニンを与えた場合、CGS mRNAの蓄積が低下するのに対し、*mto1-1*変異株では高いレベルの蓄積を保ったままであり、メチオニンの影響は見られなかった。これらの結果から、野生型株にはメチオニン添加に応答してCGS mRNAの蓄積量を抑える機構が存在し、*mto1-1*変異株ではこの機構が働かないために、遊離メチオニンを過剰に蓄積すると考えられる。

独立に分離した5つの*mto1*変異株を調べたところ、*mto1*変異はCGS遺伝子の第1エキソン中の8アミノ酸という極く限られた領域に位置することがわかった。また、すべての変異はアミノ酸置換を伴う1塩基置換であった。この結果はCGS mRNAの蓄積量の抑制機構にCGS遺伝子自身の第1エキソンが関わっていることを示唆している。

一方でCGS遺伝子発現制御のメカニズムを解明するために、カルスを用いた研究を行った。mRNAレベルの制御には転写調節および転写後調節が考えられる。カルスに転写阻害剤であるアクチノマイシンDを加えることでCGS mRNAの分解を調べた。その結果、野生型株にメチオニンを加えたときにCGS mRNAの分解が速くなること、および*mto1-1*変異株ではメチオニン添加による効果が見られないことがわかった。この結果はCGS mRNAの蓄積量の制御は転写後調節によるものであることを示している。

そこで、カルスを用いた一過的発現系においてCGS遺伝子第1エキソンの機能解析を行った。野生型株の第1エキソンまたは*mto1-1*~*mto1-4*変異株の第1エキソンのC末端側にレポーター遺伝子として β -glucuronidase (GUS) の構造遺伝子を読み枠をあわせてつなぎ、これをカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターの制御下においてプラスミドを構築した。これらのプラスミドを野生型株由来のプロトプラストに電気穿孔法によって導入し、メチオニン添加によるGUS活性の変化を調べた。そ

の結果、野生型の第1エキソンではメチオニン添加に応答してGUS活性が低下するのに対し、*mtol*変異型の第1エキソンでは野生型の第1エキソンより高いGUS活性を示し、かつ、メチオニン添加には応答しなかった。また、*mtol*変異の生じたコドンに対してアミノ酸置換を伴わない塩基置換を導入した第1エキソンでは、野生型の第1エキソンと同様の挙動を示した。つまりCGS 第1エキソンのアミノ酸配列がメチオニン添加に応答したCGS遺伝子の発現制御に重要な役割を持つことがわかった。

CGS遺伝子のアミノ酸配列がCGS mRNAの転写後制御に関わっているとすると、CGSは酵素としての機能に加え、その第1エキソンにはmRNAの安定性の制御に関する因子としての機能も備わっていると考えられる。そこで、CGS遺伝子の第1エキソンが自身のCGS mRNAにのみ働く(*cis*に働く)か、他のCGS mRNAにも働く(*trans*に働く)かを検討するために、野生型の第1エキソンと*mtol*変異型の第1エキソンをそれぞれ異なったレポーター遺伝子につないだプラスミドを構築した。2つのプラスミドを野生型株由来のプロトプラストに同時に導入し、両方のレポーター活性を調べたところ、野生型の第1エキソンと*mtol*変異型の第1エキソンはお互いに影響しあわないことが示された。すなわち、CGS第1エキソンのポリペプチドはCGS遺伝子に対して*cis*に働くことがわかった。また、カルスにおいてCGS mRNAの蓄積を調べたところ、メチオニン添加によってCGS mRNAレベルが低下するとともに、5'領域の欠けたCGS mRNA断片が生じることがわかった。この断片はメチオニン添加によっておこるCGS mRNAの分解の中間産物と考えられる。

CGS遺伝子に見られるメチオニン添加に応答した転写後制御機構には、CGS遺伝子の第1エキソンのアミノ酸が重要である。また、CGSの第1エキソンは自身のCGS mRNAに対してのみ機能する。ポリペプチドがシスに働くということから、この制御がCGS mRNAとCGS の第1エキソンが近接する時、即ち翻訳の段階で起きていると考えることができる。これらの事からひとつのモデルを提唱した。CGS遺伝子からCGS mRNAが転写され、そのCGS mRNAにリボゾームが結合し、翻訳が開始される。CGSの第1エキソンが翻訳されるとメチオニンあるいはメチオニンの代謝産物からの何らかのシグナルを受けて、自身のmRNAの分解がおこるというものである。

一方、メチオニンはヒトをはじめとするホ乳類にとって自分で合成することのできない必須アミノ酸のひとつである。このため作物のメチオニン含量は栄養学的にも重要である。しかしながら、豆類、穀類とともに種子のメチオニン含量は低く、メチオニンを多量に含む作物の開発が様々な方法によって試みられてきている。このような現状で、植物におけるメチオニン生合成制御の分子機構を解明することは、作物のメチオニン含量を増やす分子育種の基礎となるものである。

学位論文審査の要旨

主査 教授 内藤 哲
副査 教授 千葉 誠哉
副査 助教授 石川 雅之

学位論文題名

Cystathionine γ -synthase 遺伝子にみられる メチオニン添加に応答した転写後制御機構の研究

本論文は、図20、表3、引用文献62を含み、総頁数79の和文論文である。他に参考論文3編が添付されている。

高等植物におけるメチオニンの生合成は厳密に制御されており、栄養条件等によらず細胞内の遊離メチオニン濃度はほぼ一定に保たれる。本論文は、遊離メチオニンを過剰に蓄積するシロイスナズナの $mto1$ (methionine overaccumulation 1) 変異の解析により、メチオニン生合成の鍵酵素と考えられているcystathionine γ -synthase (CGS) をコードする遺伝子の発現が、mRNAの安定性の段階で負のフィードバック制御を受けていることを明らかにしたものである。得られた結果の概要は以下の通りである。

1. $mto1-1$ 変異株におけるメチオニン生合成関連酵素遺伝子の発現解析

$mto1-1$ 変異株ではCGS mRNAの蓄積が野生型株の3~5倍に増加していた。また、野生型株にメチオニンを与えて栽培するとCGS mRNAの蓄積量が低下するのに対し、 $mto1-1$ 変異株では高いレベルを保ったままであった。これらの結果から、野生型株にはメチオニン添加に応答してCGS mRNAの蓄積を抑える機構が存在すること、および $mto1-1$ 変異株ではこの制御機構が欠損していることが明らかになった。

2. $mto1$ 変異の同定

独立に分離した5つの $mto1$ 変異株を調べたところ、すべての $mto1$ 変異はCGS遺伝子のN末端から約80アミノ酸離れた領域に局在していた。この領域はCGS遺伝子の第1エキソンに対応しており、メチオニン添加に応答したCGS mRNAの抑制機構にCGS遺伝子の第1エキソンの領域が関わっていることを示唆した。また、いずれの変異もアミノ酸置換を伴った1塩基置換であった。

3. CGS mRNAの安定性の解析

mRNAレベルの制御には転写調節および転写後調節が考えられる。野生型および $mto1-1$ 変異株のカルス培養に転写阻害剤を与えてCGS mRNAの安定性を解析した。その結果、野生型株では $mto1-1$ 変異株に比べてCGS mRNAの分解が速く、メチオニンを与えることでき

らに分解が速まった。これに対して、*mtol-1*変異株での分解はメチオニンに非感受性であった。一方、転写速度は野生型株と*mtol-1*変異株で違いは見られなかった。これらの結果からCGS mRNAの蓄積量はmRNAの安定性の段階で制御されていることが明らかになった。

4. CGS遺伝子第1エキソンの機能解析

カルスを用いた一過的発現系においてCGS遺伝子第1エキソンの機能解析を行った。野生型株または*mtol*変異株の第1エキソンとレポーター遺伝子を読み枠を合わせてつなぎ、これをカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターの制御下においてプラスマドを構築した。これらのプラスマドを野生型株のプロトプラストに電気穿孔法によって導入し、メチオニン添加によるレポーター活性の変化を調べた。その結果、野生型の第1エキソンを持つ場合は*mtol*変異型の第1エキソンに比べてレポーター活性が低く、メチオニン添加によりさらに低くなった。一方、*mtol*変異型の第1エキソンはメチオニン添加に応答しなかった。これらの結果から、CGS遺伝子第1エキソンはメチオニン添加に応答して遺伝子発現を制御するに必要かつ十分な機能を持つことが明らかになった。

さらに、*mtol*変異の生じたコドンに対してアミノ酸置換を伴わない塩基置換を導入した第1エキソンでは、野生型の第1エキソンと同様の挙動を示した。従って、この制御にはCGS第1エキソンのアミノ酸配列が重要な役割を持つことが明らかになった。また、野生型と*mtol*変異型の第1エキソンをそれぞれ異なったレポーター遺伝子につないだプラスマドを構築し、2つのプラスマドを同時に野生型株のプロトプラストに導入した結果、それぞれの第1エキソンは他方のレポーター活性に影響しないことが示された。従って、CGS第1エキソンのポリペプチドは自身を合成したCGS遺伝子に対してのみ働く（シスに働く）ことが明らかになった。

5. CGS mRNA断片の検出

カルス培養にメチオニンを添加してCGS mRNAの蓄積量の経時変化を調べた結果、メチオニン添加によってCGS mRNAレベルが低下すると同時に、ポリAを持つが、5'領域を欠いたCGS mRNA断片が生じることがわかった。この断片はCGS mRNAの分解の中間産物と考えられた。

以上の結果より、CGS遺伝子はメチオニン添加に応答した転写後制御機構を持ち、この制御にはCGS遺伝子の第1エキソンのアミノ酸配列が重要であること、およびCGSの第1エキソンは自身のmRNAに対してのみ機能することが明らかになった。ポリペプチドがシスに働くということから、この制御がCGSのmRNAと第1エキソン ポリペプチドが互いに近接する時、即ち翻訳の段階で起きていると考察した。これらを総合して、CGS遺伝子の翻訳中に新生第1エキソン ポリペプチドは、メチオニンもしくはその代謝産物からのシグナルを受けて自身のmRNAを5'側から分解するのに関与するというモデルを提唱した。

メチオニンはヒトにとって必須アミノ酸のひとつである。しかしながら、豆類、穀類とともに種子のメチオニン含量は十分ではない。本論文で明らかにされたCGS遺伝子の発現制御機構は、新規性の高い発現制御機構の存在を明らかにしたのみならず、作物のメチオニン含量を増やす分子育種の基礎としても重要である。よって、審査員一同は千葉由佳子が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。