

## 植物における緊縮応答シグナル伝達物質 ppGpp の機能解析

## 学位論文内容の要旨

バクテリアは環境の変化に速やかに適応するために、ストレス応答機構を獲得してきた。特に、アミノ酸不足などの栄養飢餓に対する応答は緊縮応答と呼ばれ、1960年代の発見以降、活発に研究されてきた。この緊縮応答を引き起こす分子が ppGpp (グアノシン 5'-二リン酸 3'-二リン酸) である。バクテリアにおいて、ppGpp は RNA ポリメラーゼに結合することにより様々な遺伝子の発現を調節し、また、病原性およびクオラムセンシングなどの重要な生理現象と深く関わっていることが示されている。最近、バクテリアにのみ存在すると考えられてきた ppGpp およびその合成酵素遺伝子である *RelA/SpoT* ホモログ (*RSH*) が植物にも存在することが証明された。植物葉緑体はシアノバクテリア起源と考えられているが、それに符号するように、ppGpp は葉緑体に局在することが明らかとなった。さらに、葉緑体 RNA ポリメラーゼ活性は ppGpp との結合により抑制されることも証明された。以上から、植物においても緊縮応答に類似したストレス応答が存在する可能性が示唆されている。植物の ppGpp を介したストレス応答の解明は、植物のストレス応答全体への理解を深め、さらにはストレスに強い植物体の作出へと繋がる可能性もある。また、バクテリアから植物への進化の過程で ppGpp および *RSH* 遺伝子が保持されてきたということの意味を知る上でも大変興味深い。このような観点から、植物における ppGpp の機能解明を目的に以下の研究を行った。

## 1. ppGpp の植物葉緑体 RNA ポリメラーゼ結合部位に関する研究

葉緑体には主に機能している RNA ポリメラーゼが 2 種類存在する。一つは葉緑体ゲノム上にコードされているバクテリア型 RNA ポリメラーゼ (plastid-encoded plastid RNA polymerase, PEP) であり、もう一つは核ゲノムにコードされているミトコンドリア RNA ポリメラーゼから派生した一本鎖ポリペプチド RNA ポリメラーゼ (nuclear-encoded plastid RNA polymerase, NEP) である。葉緑体の起源を考慮すると、ppGpp の標的タンパク質はバクテリア型の PEP である可能性が高い。そこで、ppGpp が PEP と NEP のどちらに作用するのかを明らかにし、さらにそれらとの結合部位を解明することを目的に研究を行った。その結果、ppGpp は主に PEP の RNA ポリメラーゼ反応を選択的に、且つ濃度依存的に阻害することが明らかとなった。さらに光親和性プローブ 6-thio ppGpp を用いて ppGpp の PEP 結合部位を解析した結果、6-thio ppGpp は PEP を構成する  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  および  $\beta''$  の 4 種のサブユニットのうち、 $\beta'$  サブユニットに結合することが明らかとなった。大腸菌 RNA ポリメラーゼにおいて ppGpp は  $\beta'$  サブユニットに結合するという報告があり、また PEP の  $\beta'$  サブユニットが大腸菌  $\beta'$  サブユニットと相同性を有することを考慮すると、ppGpp によるバク

テリアの転写抑制機構が、ほぼ同質的に植物の葉緑体に維持されていることが示唆された。

## 2. タバコ(*Nicotiana tabacum*)に於ける ppGpp 合成酵素(*AtCRSH*)の機能に関する研究

植物の ppGpp 内生量はストレス負荷により一過的に上昇する。この ppGpp 量上昇の植物への影響はまだ未解明ではあるが、バクテリアの環境ストレスに応答する ppGpp の機能が植物にも保存されている可能性を示唆する現象である。シロイヌナズナにおいて *RSH* 遺伝子の一種である *AtCRSH* 遺伝子を破壊した変異株の表現型は、長角果の矮小化や種子の生産低下を示した。植物の花芽形成をはじめとする植物の生殖活動に ppGpp が関与しているという研究報告は、バクテリアの緊縮応答以外に、植物が独自に発達させてきた新たな機能が存在するというを示唆するものである。また、これまで ppGpp は葉緑体に局在することが明らかになっているにも関わらず、葉緑体に着目して行われた研究は報告されていない。そこで *AtCRSH* 遺伝子を高発現するタバコ変異体の作成し、ppGpp の葉緑体の転写翻訳機能に対する作用を明らかにすることを目的に研究を行った。葉緑体に対する (p)ppGpp の機能を解析するために、変異株および野生株それぞれの葉緑体タンパク質発現を二次元電気泳動により解析した。その結果、代表的な葉緑体タンパク質であるリブローズ 1,5-二リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (*RubisCO*) 大サブユニットの発現が野生株に比べ *AtCRSH* 高発現株で大きく上昇していた。ルビスコ大サブユニットをコードする葉緑体遺伝子 *rbcL* の発現を比較した結果、*rbcL* の発現が *At-CRSH* 高発現株で上昇していた。また、生育を比較したところ、高発現株の生育が早いことが明らかとなった。*RubisCO* の発現が上昇する機構やその発現上昇が植物体の生育の差に及ぼす影響などは未解明であるが、ppGpp が植物の生長に関わっていることが示された。

## 3. ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) における (p)ppGpp 合成酵素の機能解析

植物は約 4 億年前に車軸藻類から多細胞のコケ類に進化し、陸上に進出したと考えられている。これまでの研究から、ppGpp 合成酵素遺伝子である *RSH* 遺伝子がシロイヌナズナをはじめとする維管束植物や緑藻類 *Chlamydomonas reinhardtii* に存在することが明らかとなっている。植物の進化の過程を考慮すれば、維管束植物と藻類の進化の中間に位置するコケ類にも *RSH* 遺伝子が存在すると予想される。そこで本研究では、蘚類ヒメツリガネゴケの *RSH* 遺伝子の機能を解析することを目的とした。遺伝子情報からヒメツリガネゴケのゲノム中には 9 種類の *RSH* 遺伝子が推定された。これは緑藻類や維管束植物と比べても多く、興味深い特徴である。ヒメツリガネゴケ *RSH* 遺伝子の一つ、*PpRSH1* をクローニングし、その機能を解析した結果、*PpRSH1* は ppGpp 合成活性を有し、さらにヒメツリガネゴケの葉緑体へ輸送されることが示された。また、ヒメツリガネゴケにアブンシジン酸や紫外線などを処理することにより、*RSH* 遺伝子群の発現上昇が確認できた。この結果からヒメツリガネゴケの *RSH* 遺伝子も他の植物の *RSH* 遺伝子と同様にストレスにより発現が誘導されることが明らかとなり、この誘導機構が陸上植物に普遍的に存在することが示唆された。さらに *PpRSH1* の過剰発現株の作成を行い、野生株と比較した結果、生育速度の上昇が見られ、また植物体の分化にも影響を与えていることが示唆された。バクテリアにおける緊縮応答は、基本的にさまざまな栄養欠乏によって引き起こされるストレス応答であるが、ヒメツリガネゴケにおいては、*RSH* 遺伝子は UV や乾燥などの環境ストレスや植物ホルモンにより上昇する。本研究の結果から、バクテリアから葉緑体への

進化の過程で、ヒメツリガネゴケはバクテリアとは異なるストレス受容機構を進化させることによって、その生育環境により適応したことが本研究から示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	鍋田憲助
副査	教授	橋床泰之
副査	准教授	荒川圭太
副査	准教授	松浦英幸
副査	助教	高橋公咲

学位論文題名

## 植物における緊縮応答シグナル伝達物質 ppGpp の機能解析

本論文は、図 40、表 2、引用文献 57 を含み、3 部からなる総ページ 90 の和文論文である。別に参考論文 2 編と投稿中論文 2 編が添えられている。

グアノシン 5'-二リン酸 3'-二リン酸 (ppGpp) はバクテリアがアミノ酸不足による栄養飢餓にある時、緊縮応答を引き起こす分子として生成する化合物である。その作用機構は、ppGpp が RNA ポリメラーゼに結合することにより種々の遺伝子発現を調節することにある。その後の研究で、ppGpp の維管束植物葉緑体での存在とその生合成遺伝子 *relA/spot* ホモログ (*RSH* 遺伝子) の存在が確認され、更に ppGpp が葉緑体 RNA ポリメラーゼと結合することによって、その活性を抑制することが証明されている。植物の ppGpp を介したストレス応答の解明は、植物のストレス応答全体への理解を深める上で重要である。また、バクテリアから植物への進化の過程で ppGpp および *RSH* 遺伝子が保持されてきたということの意味を知る上でも大変興味深い。このような観点から、植物における ppGpp の作用機構と機能解明を目的に以下の研究を行った。

### 1. ppGpp の植物葉緑体 RNA ポリメラーゼ結合部位に関する研究

維管束植物の葉緑体には主として 2 種類の RNA ポリメラーゼが機能している。即ち、葉緑体ゲノム上にコードされているバクテリア型 RNA ポリメラーゼ (PEP) と核ゲノムにコードされているミトコンドリアから派生する RNA ポリメラーゼ (NEP) である。本研究によって、ppGpp は PEP の RNA ポリメラーゼ反応を選択的に、且つ、濃度依存的に阻害することを明らかにした。さらに光親和性プローブ 6-thio-ppGpp を化学合成し、ppGpp の PEP 結合部位を解析した結果、6-thio-ppGpp は PEP を構成する  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\beta'$  および  $\beta''$  の 4 種のサブユニットのうち、 $\beta'$  サブユニットに結合することが明らかとなった。大腸菌 RNA ポリメラーゼにおいて ppGpp は  $\beta'$  サブユニットに結合すること、PEP の  $\beta'$  サブユニットが大腸菌  $\beta'$  サブユニットと相同性を有することを考慮すると、ppGpp によるバクテリアの転写抑制機構がほ

ば同質的に植物の葉緑体に維持されているということが示唆された。

## 2. タバコ(*Nicotiana tabacum*)に於ける ppGpp 合成酵素(*AtCRSH*)の機能に関する研究

これまで、ppGpp の葉緑体局在性にも関わらず、葉緑体における ppGpp 合成の機能に着目した研究は報告されていない。そこで *AtCRSH* 遺伝子を高発現するタバコ変異体を作成し、変異株および野生株それぞれの葉緑体タンパク質発現を二次元電気泳動により解析した。その結果、葉緑体タンパク質であるリブロース 1,5-二リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (*RubisCO*) 大サブユニットの発現が野生株に比べ *AtCRSH* 高発現株で大きく上昇していた。また、生育を比較したところ、高発現株の生育が早いことが明らかとなった。*RubisCO* の発現が上昇する機構やその発現上昇が植物体の生育の差に及ぼす影響などは未解明であるが、光合成への影響を通して、ppGpp が植物の生長に関わっている可能性が示された。

## 3. ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) における(p)ppGpp 合成酵素の機能解析

維管束植物と藻類の進化の中間に位置するコケ類に *RSH* 遺伝子が存在すると予想され、遺伝子情報からヒメツリガネゴケのゲノム中には 9 種の *RSH* 遺伝子の存在が推定された。ヒメツリガネゴケ *RSH* 遺伝子の一つ *PpRSH1* 及び *PpRSH2* をクローニングし、機能解析した結果、*PpRSH1* と *PpRSH2* は ppGpp 合成活性を有し、さらに葉緑体へ移送されることが示された。また、ヒメツリガネゴケにアブシジン酸や紫外線などを処理することにより、*RSH* 遺伝子群の発現上昇が確認できた。この結果からヒメツリガネゴケの *RSH* 遺伝子も維管束植物の *RSH* 遺伝子と同様にストレスにより発現が誘導されることが明らかとなり、この誘導機構が陸上植物に普遍的に存在することが示唆された。さらに *PpRSH1* の過剰発現株の作成を行い、野生株と比較した結果、生育速度が上昇した。また、植物体の分化にも影響を与えていることが明らかになった。本研究の結果から、バクテリアから葉緑体への進化の過程で、ヒメツリガネゴケはバクテリアとは異なるストレス受容機構を進化させることによって、その生育環境に適応したことが示唆された。

本研究によって、ppGpp の葉緑体 RNA ポリメラーゼ結合部位が明らかになった。特筆すべきことに、陸上植物における ppGpp 合成系の普遍的な存在と新たな機能に関する知見が得られた。

よって審査員一同は、佐藤道大が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有すると認めた。