

氏名	やまもと よし はる 山 本 義 治
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 1542 号
学位授与の日付	平成 6 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	理学研究科植物学専攻
学位論文題目	<i>Nicotiana sylvestris</i> における光化学系 IPSI-D サブユニットの 生合成調節機構に関する研究
論文調査委員	(主 査) 教授 辻 英夫 教授 岩 淵 雅 樹 教授 藤 沢 久 雄

### 論 文 内 容 の 要 旨

光合成の光化学系 I (PSI) 複合体は、光エネルギーを用いてプラストシアニンからフェレドキシンへと電子を運搬する色素-タンパク質複合体であり、高等植物では少なくとも13種類のサブユニットから成っているが、これらのサブユニットのなかには機能の不明なものも少なくなく、また、ほとんどのものについて生合成の調節機構はまだわかっていない。高等植物の黄化芽生えでは PSI の活性は見られず、光を受けた後に初めてその活性が出現する。申請者の論文は、PSI 複合体を構成するサブユニットの一つである PSI-D と呼ばれるタンパク質 (核コード) に着目し、黄化組織のグリーニング過程におけるこのタンパク質の生合成調節機構を解明するために、このタンパク質の同定、遺伝子の単離、遺伝子発現様式の解析を行なったものである。

従来、タバコを材料とする実験では *Nicotiana tabacum* がよく用いられていたが、この種は2つの異なるゲノムから成る複二倍体であるため、申請者は解析をより明快にするために、この種の母系祖先種でありゲノム構成のより単純な *Nicotiana sylvestris* を実験材料に選んだ。

先ず PSI-D の同定とその遺伝子の単離を行なった。*N. sylvestris* の葉より得た PSI 画分に含まれるタンパク質を電気泳動により分離し、それぞれのタンパク質の N 末端アミノ酸配列を決定したところ、PSI-D にはアミノ酸配列の異なる2種類のタンパク質が存在することを見出した。この2種類のタンパク質の一つに対する cDNA クローン、他の一つに対する遺伝子クローンを単離し、それぞれの一次構造を決定した。PSI-D の遺伝子は *N. sylvestris* の半数体ゲノム当たり2コピー存在することをサザンプロットにより示した。両者の発現は組織間では大きな違いは見られなかったが、葉の成長に伴う発現の変化に関しては、それぞれの遺伝子が異なった制御を受けていることを明らかにした。また、このような個体内での PSI-D の多形は、*N. sylvestris* だけではなく、トマト、シロイヌナズナの純系、トウモロコシの近交系においても見られることを免疫プロット法により示した。

次に、PSI-D だけではなく PSI を構成する他のサブユニット PSI-A/B, -C, -D, -E, -H, -L をも

対象とし、これらの遺伝子の光に対する応答性について調べた結果、これらすべてのタンパク質は黄化芽生えには蓄積しておらず、光を受けた後にきわめて協調的に増加することを明らかにした。また、2種類のPSI-D遺伝子のうちの一つ *psaDp* がRNAレベルにおいてもタンパク質レベルにおいても最も迅速な光応答を示すことを明らかにした。

核ゲノムにコードされた光合成関連遺伝子には、光により発現が促進されるものがあり、このなかには転写活性が高められているものがあることが報告されている。しかし、このとき転写後の制御が行なわれているかどうかについてはほとんど調べられていなかった。従来、転写後の制御が行なわれている例は、環境変化に対して速い応答を示すものについて知られている。そこで申請者は、核コードのPSI遺伝子群のなかで光に対して最も迅速な応答を示した *psaDb* に焦点を当て、この遺伝子の光応答機構を形質転換タバコを用いて解析した。光によるこの遺伝子の発現促進は、転写、転写後、翻訳のどの段階で起こっているかを調べるため、レポーター *GUS* 遺伝子を用いて、3種類のキメラ遺伝子、[*psaDb* プロモーター+*GUS*]、[CaMV35S プロモーター+*psaDb* の転写領域]、[CaMV35S プロモーター+*psaDb* と *GUS* の融合遺伝子] を作製し、タバコに導入した。その結果、*psaDb* のプロモーター領域のみ光応答能が見られたことから、転写は光により活性化されるが、mRNAの安定性や翻訳開始頻度は光の影響を受けていないと結論した。また、*psaDb* mRNAの5'部分には光とは関係なく翻訳効率を高める働きがあることを見出し、そのシス配列の候補としてLM1、LM2 (5' leader motif) を挙げている。

#### 論文審査の結果の要旨

申請者の論文は、PSIを構成するサブユニットの一つであるPSI-D(核コード)に着目し、グリーンング時におけるこのタンパク質の生合成調節機構を明らかにしようとしたものであり、その内容は次の3つに大別される。すなわち、(1)PSI-Dの同定と遺伝子の単離、(2)PSI遺伝子群の光応答、(3)形質転換タバコを用いた *psaDb* の光応答機構の解析である。

従来、高等植物においてPSIに関連した多形が見られるという報告では、PSIがサイズの異なるアンテナと会合しているというものや、タバコでは異質倍数性に由来するPSIサブユニットの多形が存在するというものはあったが、PSIサブユニットに多重遺伝子族に由来する多形が存在することを明らかにしたのは、申請者によるPSI-Dについての研究が最初のものである。申請者は、*N. sylvestris* には2種類のPSI-Dが存在することを明らかにし、その一つに対するcDNA、他の一つに対する遺伝子を同定した。また、この多重遺伝子族に由来するPSI-Dの多形が他のいくつかの双子葉植物、単子葉植物にも見られることを示したが、このことはこの現象が植物界に普遍的なものであることを強く示唆している。同一個体内に複数種のPSI-Dが存在することはPSI複合体自身に多形が生じることを意味するが、その生理学的意義はまだ明らかではない。しかし、申請者は2種類のPSI-Dの発現パターンが異なることを明らかにした。このことは、それぞれをコードする遺伝子が、異なる発現制御を受けていることを示している。

グリーンング時におけるPSIサブユニットの蓄積のタイムコースは、従来、葉緑体コードのPSI-A/Bと核コードのPSI-Dを代表として、免疫プロット法を用いて調べられてきた。また、RNAレベルでは核コードのPSI-D、-E、-F、-G、-Hの遺伝子についていくつかの研究室で解析が行なわれている。し

かし、これらのサブユニットまたは mRNA 蓄積のタイムコースに関する結果はまちまちであった。その原因としては、タンパク質に関しては免疫ブロットに用いた抗体の力価が異なること、また mRNA に関しては核コードの PSI 遺伝子が小さな多重遺伝子族を形成していることがあり、それぞれの遺伝子の発現パターンが異なる可能性があることが挙げられる。申請者の論文では、この2点を考慮し慎重に実験が行なわれていることは評価される。その実験の結果、グリーニング時に PSI-D を含む7種類の PSI サブユニットがきわめて協調的に増加することを明らかにした。

申請者は形質転換タバコを用いて、PSI-D の遺伝子の一つである *psaDb* の転写から翻訳に至る各段階に対する光の影響について調べた結果、光はこの遺伝子の転写を促進するが、mRNA の安定性や翻訳開始頻度には影響しないことを明らかにした。光による遺伝子発現促進に関する研究は数多く行なわれているが、このように一つの遺伝子について転写後の制御も含めた体系的な解析は申請者によるものが初めてであり、この分野に重要な知見を提供している。

さらに、申請者は *psaDb* の転写領域の 5' 部分には翻訳効率を高める働きがあることを見出し、5' リーダー配列に存在するモチーフ LM1, LM2 が翻訳効率を高めるシスエレメントではないかと議論している。翻訳活性を高め、5' リーダーに関しては、タバコモザイクウイルスなどいくつかのウイルス RNA についての報告はあるが、真核生物の RNA に関しては知られていなかった。したがって、申請者の見出した現象は、翻訳制御の分子機構を解析するための優れた実験系として使えるのではないかと期待される。

以上のように、申請者の研究は PSI 複合体の分子構築の一側面を明らかにするとともに、PSI-D 遺伝子の発現制御機構に関する重要な知見を提供したものであり、この分野の研究発展に大きく寄与するものである。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、主論文および参考論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。