

2

全論文

学位申請論文

*Nicotiana sylvestris*における光化学系IサブユニットPSI-Dの

生合成調節機構に関する研究

1994年

山本義治

## 目次

略語	2
序章	3
第1章 高等植物におけるPSI-Dサブユニットの多型	6
第2章 <i>N.sylvestris</i> におけるPSI-Dサブユニットをコードする $psaD$ 多重遺伝子族の構成	12
第3章 $psaD$ 多重遺伝子族の組織特異的発現	25
第4章 光化学系 I 遺伝子群の光応答	31
第5章 $psaDb$ 遺伝子の転写、転写後、翻訳に与える光の影響	43
結論	59
謝辞	60
引用文献	61

## 略語

BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate)

DTSSP (3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidylpropionate))

EDC (N-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide)

FNR (ferredoxin:NADP<sup>+</sup> oxydoreductase)

IAA (3-indoleacetic acid)

MU (4-methylumbelliferon)

NAA (1-naphtylacetic acid)

NBT (nitro-blue tetrazolium)

PSI (photosystem I)

## 序章

高等植物の光化学系I (PSI) は葉緑体チロイド膜に存在し、光エネルギーを利用してplastocyaninからferredoxinへ電子を伝達する色素タンパク質複合体である (Golbeck, 1992). 高等植物においてはPSIは少なくとも13種のサブユニットタンパク質から出来ており、それらは葉緑体ゲノムにコードされているもの (PSI-A, PSI-B, PSI-C, PSI-I, PSI-J) と核コードのもの (PSI-D, PSI-E, PSI-F, PSI-G, PSI-H, PSI-K, PSI-L, PSI-N) とがある (Bryant, 1992; Knoetzel et al., 1993). 光化学反応を行うP700反応中心と一連の電子受容体のA<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, F<sub>x</sub>, F<sub>v</sub>/F<sub>b</sub>はPSI-A, PSI-B, PSI-Cが保持している. これら光化学反応中心を構築するのに必要な遺伝子群は葉緑体ゲノム上に1コピーずつ存在しているのに対し、PSI複合体の周辺部分を構成するサブユニットのPSI-D, PSI-E, PSI-F, PSI-G, PSI-H はそれぞれ2-3コピーの小さな重複遺伝子として核ゲノム上にコードされ、4型タンパク質を持っている (Herrmann et al., 1991; Yamamoto et al., 1993; Obokata et al., 1994; Nakamura and Obokata, 1994). これらの周辺部分のサブユニットの多型は結果として植物個体中に分子種構成の異なる不均一なPSI複合体群を生じさせることになるが、このPSIの多型現象がどのような生理的意義を持っているのかは明らかではない. 原核生物の*Synechocystis* sp. PCC 6803や*Synechococcus* sp.ではPSI-D, PSI-E, PSI-Fの遺伝子 $psaD$ ,  $psaE$ ,  $psaF$ はすべてゲノム中に1コピーずつしか見出されておらず (Reilly et al., 1988; Chitnis et al., 1989; Chitnis et al., 1991; Mülenhoff et al., 1993)、先に述べたようなサブユニットの多型は高等植物に独自の現象であると思われる (高等植物の持つPSI-G, PSI-Hの遺伝子は上記の*Synechococcus*のゲノムには存在しないと考えられている (Bryant, 1992; Mülenhoff et al., 1993)).

PSIの周辺サブユニットのうちその機能が明らかになっているものは少ないが、PSI-D, PSI-E, PSI-Fについてはいくつかの報告がある. PSI-Dサブユニット(subunit II, PsaD)はstroma側に表出しており (Oh-oka et al., 1989; Andersen et al., 1992; Lagoutte and Vallon, 1992; Zilber and Malkin, 1992)、架橋剤(EDC)でPSI-Dがferredoxinと架橋されること ('20-kDa polypeptide', Zanetti and Merati, 1987; '22 kD subunit', Zilber and Malkin, 1988; Iwasaki et al., 1991; Andersen et al., 1992) から、このサブユニットはferredoxinとの結合部位であると考えられている. PSI-E(subunit IV,

PsaE)もstroma側に表出している('14-kDa polypeptide', Oh-oka et al., 1989; Zilber and Malkin, 1992; Andersen et al., 1992). ランソウの*psaE*(PSI-E遺伝子)欠失変異体では、ferredoxinの還元速度が野性型より遅く(Rousseau et al., 1993)、循環的電子伝達が起こらなくなる(Yu et al., 1993)ことが報告されており、PSI-EはPSIからの電子伝達に関与していることが示されている。PSI-Eは架橋剤(DTSSP)でferredoxin:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase (FNR) と架橋される(Andersen et al., 1992)ので、PSI-EサブユニットがFNRとの結合に関わっている可能性も考えられる。PSI-F(PsaF)はEDCでplastocyaninと架橋され('19-kDa subunit', Wynn and Malkin, 1988; Hippler et al., 1989)、PSI-Fのトランジットペプチドはチロコイド内腔へ輸送されるタンパク質と共通する特徴を持つ(Steppuhn et al., 1988; Franzén et al., 1989)ことから、このサブユニットはplastocyaninとの結合部位であると考えられている。その他の周辺サブユニットの機能については現在のところほとんど知られていない。

ランソウ*Synechocystis* sp. PCC6803の*psaD* (PSI-D遺伝子) 欠失変異体のPSI標品にはPSI-Eサブユニットが欠失しており、またいくつかの低分子量サブユニットが減少している(Chitnis et al., 1989)。またPSI複合体中でPSI-Cが安定して存在するためにはPSI-Dを必要とする(Zhao et al., 1990; Li et al., 1991)。以上のことからPSI-DサブユニットがPSIの分子構築に必須の役割を果たしていることがわかるが、これはPSI-EやPSI-F、PSI-Lがなくても他のサブユニットのアセンブリには影響しない(Chitnis et al., 1989; Chitnis et al., 1991; Chitnis et al., 1993) ことと対照的である。

本研究では、機能が知られており、かつPSIのアセンブリに重要な役割を果たすPSI-Dサブユニットに焦点をあて、まず前半の章(1,2,3章)ではPSI-Dサブユニットの分子種構成をタンパク質レベルで明らかにし、次いで個々のPSI-Dタンパク質をコードする*psaD*遺伝子群を分子レベルで解析した。さらに個々の*psaD*遺伝子の発現の組織特異性についても検討した。

被子植物の黄化芽生えには光合成を行う能力は無く、光を受けると次第に光合成を行う装置が構築されていく。このとき葉緑体タンパク質をコードする19種類の核遺伝子群が光誘導を受けることが報告されている(Thompson and White, 1991)。この光による核遺伝子の活性化には、多くの場合転写誘導が関与している(Thompson and White, 1991)。ただしエンドウの

ferredoxin遺伝子*fedA*の場合は光照射によりmRNAが安定化されることが示唆されており (Gallo-Meagher et al., 1992)、amaranthの*rbcS*の場合は光による翻訳誘導を受ける (Berry et al., 1990)。これらの転写後の光制御は上記の植物種や遺伝子に限られた現象なのか、あるいは光制御を受ける遺伝子一般に広く行われているのかは現在のところ明らかではない。

光による転写の活性化のメカニズムはエンドウの*rbcS-3A*で最も精力的に研究されている。活性型フィトクロムはこの遺伝子発現を誘導する (Fluhr and Chua, 1986)。またトランスジェニックタバコを用いた解析から*rbcS-3A*のプロモーターに存在するGT-1結合配列(box II)が暗所での転写を抑制していて、光照射後その抑制を解除することが示された (Kuhlemeier et al., 1987; Lam and Chua, 1990)。タンパク質性のDNA結合因子であるGT-1のcDNAはタバコから単離されているが (Perisic and Lam, 1992; Gilmartin et al., 1992)、GT-1がどのようにして光に依存した転写調節を行うのかは明らかでは無い。最近Neuhausらは*cab*のphytochromeに依存した発現には、三量体Gタンパク質とcalmodulinが関わっていることを示唆する結果を報告している (Neuhaus et al., 1993)。彼らはさらに、phytochromeに依存した発現を行う核遺伝子にはcalmodulinが関わっているもの (RbcS, LHCII, OEE1, ATP synthase  $\gamma$  subunitの遺伝子) と関わっていないもの (PsaD, PsaF, Rieske FeS, ferredoxin, plastocyaninの遺伝子) の2つのグループがあることを示唆している。しかし後者については光応答を担うシ配列が同定されていないばかりか、ごく最近まで遺伝子の単離さえなされていなかった。本研究の後半(4,5章)では、後者のグループに属するPSI核遺伝子群の光応答機構について*psaD*を中心にして解析を行った。*N.sylvestris*のPSI核遺伝子群の中で最も素早い光応答を示した*psaDb*遺伝子を、PSI-Dサブユニットの遺伝子としては真核生物から初めてクローニングし、その構造を明らかにした。環境変化に対する遺伝子発現の素早い応答は転写後のレベルで行われている場合があるので (Thompson and White, 1991; Green, 1993)、*psaDb*の光応答が転写レベルで行われているのかあるいは転写後のレベルで行われているのかをトランスジェニックタバコを用いて検討した。その結果*psaDb*の光応答は転写レベルで行われていることが明らかになり、また*psaDb*の5'非翻訳領域には翻訳を促進するシ配列があることを示唆する結果が得られた。

## 第1章 高等植物におけるPSI-Dサブユニットの多型

### 要旨

タバコ(*Nicotiana tabacum*)の母系祖先種である*N.sylvestris*から光化学系I複合体を精製し、LDS-PAGEにより構成タンパク質を分離し、それぞれのタンパク質をアミノ酸シーケンサーにかけN-末端アミノ酸配列を決定した。その結果、*N.sylvestris*には分子量の異なる2種類のPSI-Dサブユニットが存在することがわかったので、高分子側のPSI-DをPSI-D1、低分子側のものをPSI-D2と名付けた。両者のアミノ酸配列は異なり、それぞれ別の遺伝子にコードされている。いずれのアミノ酸配列もタバコの葉緑体ゲノムにはコードされておらず、PSI-Dサブユニットは核支配であることが示された。免疫ブロット法による解析の結果から、トマト、ソイマスナ、トウモロコシには電気泳動の移動度の異なる2種類のPSI-Dがあることがわかった。このことは、一般に高等植物においては、PSI-Dサブユニットは2種類の型から成り立っていることを示唆している。

### 序

PSI複合体にはPSI-A, PSI-B, PSI-Cの3つのポリペプチドが含まれ、これらは葉緑体ゲノムにコードされている(Golbeck, 1987)。PSIに含まれるタンパク質はこれ以外に十数種類あるが、1988年から1993年にかけて、それらのタンパク質のN-末端アミノ酸配列が決定され、またそれぞれに対する抗体が作成された。そしてそれらを基にして、PSIサブユニットをコードする葉緑体遺伝子や核遺伝子に由来するcDNAが単離され、PSIサブユニットの分子レベルでの同定が行われてきた(Lagoutte, 1988; Hoffman et al., 1988; Münch et al., 1988; Okkels et al., 1988; Steppuhn et al., 1988; Okkels et al., 1989; Scheller et al., 1989; Steppuhn et al., 1989; Iwasaki et al., 1990; Okkels et al., 1991; Yamamoto et al., 1991; Hayashida et al., 1992; Okkels et al., 1992; Flieger et al., 1993; Kjarulff and Okkels., 1993; Kjarulff et al., 1993; Knoetzel et al., 1993; Obokata et al., 1993)。その過程で*Nicotiana tabacum*から精製したPSI標品にはN-末端アミノ酸配列のよく似たタンパク質が含まれていることが明らかになった(Obokata et al., 1990)。*N.tabacum*は*N.sylvestris*と

*N. tomentosiformis*のゲノムを合わせ持つ複二倍体であり (Kung et al., 1982)、その結果 *N. tabacum*においては異質倍数性に由来するPSIサブユニットの多型が生じている (Obokata et al., 1990)。高等植物の半数体ゲノム当たりいくつのPSIタンパク質があるのかを調べるには、半数体か純系の2倍体を用いると解析が容易である。そこで本研究ではその点を考慮して *N. tabacum*の母系祖先種である *N. sylvestris*を材料として用いて、PSI複合体に含まれるタンパク質の種類を詳細に調べた。その結果、PSI-Dサブユニットにはアミノ酸配列の異なる2種類の型が存在することが明らかになった。従ってここでみられた多型は多重遺伝子族に由来すると考えられる。また免疫ブロット解析を行いこのPSI-Dサブユニットの多型の一般性についても検討した。

## 材料及び方法

### 植物の育成

*Nicotiana sylvestris*、トマト (*Lycopersicon esculentum*, VFNT LA line 1221)、アズキ (*Vigna angularis*, cv. Chagarawase)、トウモロコシ (*Zea mays*, Ho9) は温室 (25°C) で育成した。シロイヌナナ (*Arabidopsis thaliana*, ecotype Columbia) は植物培養器中で、22°C、蛍光灯の連続照明下で育てた。

### 光化学系 I 複合体サブユニットのN-末端アミノ酸配列の決定

Obokataらの方法 (Obokata et al., 1993) に従って、*N. sylvestris*の葉より葉緑体を単離し、蔗糖密度勾配超遠心法によりPSIを精製した。LDS-PAGEによりPSIタンパク質を分離し (Obokata et al., 1993)、PVDF膜にブロットングし、それぞれのバンドをプロテインシーケンサー (Applied Biosystems, 477A/120A) にかけた (Obokata et al., 1990)。

### 葉緑体膜画分の調製

全ての操作は4°Cで行った。*N. sylvestris*、トマト、シロイヌナナ、アズキ、トウモロコシの葉を単離

メディアム (0.35M sorbitol, 2mM EDTA, 25mM HEPES-NaOH (pH 7.6)、2mM sodium isoascorbate) 中でポリロンにより破碎し、8層のガーゼで濾過した。濾液を4,000rpm、5分間遠心し、生じた沈殿を再び単離メディアムに懸濁し、50% ショ糖溶液に重層したのち、10,000rpmで30分間遠心した。緑色のバンドをすべて回収し、5mM Tris (pH7.5)に懸濁し葉緑体を破碎した。サンプルを14,000rpm, 10分間遠心し、生じた沈殿を5mM (Tris pH7.5)で数回洗ったのち、5mM Tris (pH7.5)に懸濁し、これを葉緑体膜画分として-80°Cに保存した。膜画分に含まれるタンパク質濃度はBCA法(Smith et al., 1985)により定量した。

### 免疫ブロットイング

ホレンソウのPSIに対するウサギ抗血清(Oh-oka et al., 1989)から、Kellyらの方法(Kelly et al., 1986)により抗PSI-D抗体をアフィニティー精製した。

様々な植物より得た葉緑体膜画分を、LDS-PAGEにかけPVDF膜にブロットイングし(Obokata et al., 1990)、ウサギ抗PSI-D抗体、ビオチン標識されたハバの抗ウサギ免疫グロブリン抗体(Amersham)、alkaline phosphatase結合streptavidin(Amersham)と順次反応させ、NBT/BCIPの発色反応によりPSI-Dを検出した。

## 結果

ハバの母系祖先種である *N. sylvestris* から得たPSI標品をLDS-PAGEにより解析すると、20kDa以下の低分子側の領域に約20本のバンドが検出された(図1-1)。このうち19kDaと17.5kDaのバンドをPVDF膜にブロットイングし、ブロテン-ゲンザを用いてN-末端アミノ酸配列を決定した。得られた配列はいずれもハバの葉緑体ゲノムにはコードされておらず、トマトの核遺伝子 *psaD* の産物であるPSI-Dと相同性があった(図1-1)。従って、19kDaと17.5kDaのタンパク質はいずれもPSI-Dサブユニットであることがわかった。その他のバンドのタンパク質はPSI-Dと相同性は無かった。

次に、PSI-Dサブユニットの多型が、ハバ属に限られた現象なのか、あるいは高等植物一般に

広く見いだされることなのかを調べるために、純系のトマト、シイタケ、アズキ、そして近交系のトモロコシから、葉緑体膜タンパク質を調製し、抗PSI-D抗体を用いて免疫ブロットングを行い、PSI-Dを検出した。図1-2はその結果を示しており、トマトでは18 kDaと17.3 kDa、シイタケでは18.2 kDaと17.5 kDa、アズキでは18.2 kDa、トモロコシで16.9 kDaと16.6 kDaのバンドが検出された。アズキを除く全ての植物で2本のバンドが検出されたので、これらの植物では2種類のPSI-D型タンパク質を持つことが明らかとなった。

### 考察

*N. tabacum*においては異質倍数性に由来するPSI-Dサブユニットの多型が知られているが (Obokata et al., 1990)、*N. tabacum*の純系祖先種である*N. sylvestris*においても、PSI-Dサブユニットにはアミノ酸配列の異なる2つの種類があることがわかった。後者の多型は、多重遺伝子族に由来するものと考えられる。また免疫ブロット解析の結果(図1-2)から、このPSI-Dサブユニットの多型は高等植物に一般的に存在するものと思われる。

2種類のPSI-Dが二者択一的にPSI複合体に取り込まれると、結果的に2種類のPSI複合体が生じることになる。PSI複合体にはアンテナの大きさが異なる2種類の型がありそれぞれラ-チロイドとstroma-チロイドとに局在している (Andreasson et al., 1988) ということは報告されているが、PSI複合体自体の多型についてはこれまで知られていなかった。PSI-Dサブユニット (Subunit II) はferredoxinとの結合部位であると考えられているので (Zanetti and Merati, 1987; Zilber and Malkin, 1988)、PSI-Dサブユニットの型によってferredoxinとの親和性に違いが生じるのかも知れない。興味深いことにferredoxinにも型があり、光合成器官に複数種のフェドキシンが存在する (Takahashi et al., 1983; Hase et al., 1991) ので、PSI-Dサブユニットの多型との関係に興味を持たれる。原核生物の藍藻においてはPSI-D遺伝子はゲノム中に1コピーしか存在しないと考えられる (Mühlenhoff et al., 1993; Reilly et al., 1988) ので、この現象は高等植物に特有な光合成反応の制御機構を研究していく上で1つの手掛かりとなることが期待される。



図1-1. *N.sylvestris*に含まれるPSI-Dサブユニットの同定

精製したPSI複合体のLDS-PAGEの銀染色像(左)と図に示したバンドに対応するタンパク質のN-末端アミノ酸配列を示す。19kDaのPSI-D1と17.5kDaのPSI-D2のN-末端アミノ酸配列は、いずれもトマトのPSI-D(Hoffman et al., 1988)と高い相同性を示している。

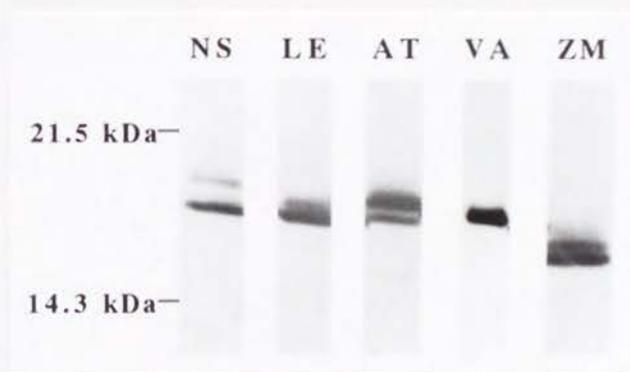


図1-2. 高等植物におけるPSI-Dサブユニットの多型

*N.sylvestris* (NS)、トマト (LE)、ソイマズナ (AT)、アズキ (VA)、トウモロコシ (ZM) の葉緑体膜画分をそれぞれ20 $\mu$ gタンパク質ずつ(アズキは2 $\mu$ g)電気泳動し、抗PSI-D抗体を用いて免疫ブロットングを行った。

## 第2章 *N.sylvestris*におけるPSI-Dサブユニットをコードする

### *psaD*多重遺伝子族の構成

#### 要旨

*N.sylvestris*のPSI-D2のN-末端アミノ酸配列をもとに、オリゴDNAを合成し、PCRを用いてcDNAライブラリから、PSI-D2をコードする*psaDa* cDNAを単離した。そして*psaDa* cDNAをプローブとしてゲノムライブラリからPSI-D1をコードする*psaDb*遺伝子を単離した。*psaD*のゲノムサブクローニングの結果と、得られたゲノムクローンの制限酵素地図とから、*N.sylvestris*においてはPSI-D遺伝子は*psaDa*と*psaDb*の2つよりなることが明らかとなった。PSI-D1とPSI-D2のホロジーンをコード領域の塩基配列、そこから演繹される前駆体タンパク質のアミノ酸配列、について調べたところ、DNAレベルで83%、アミノ酸レベルで94%のホロジーンがあった。

#### 序

光合成に関わる葉緑体タンパク質は葉緑体ゲノムか核ゲノムのいずれかにコードされている。光化学系II複合体のサブユニット群や光化学系IのPSI-A/B, PSI-Cなどは葉緑体ゲノムにコードされており、一つのサブユニットに対して1種類の遺伝子が存在する。核ゲノムにコードされている遺伝子としてはアンテナ成分であるLHCI/II (*cab*, *Lha/b*) が遺伝子構成に関してよく調べられている。*cab*はトマトでは19の遺伝子が同定されており (Green et al., 1991)、またソイヌズナでは少なくとも12の遺伝子があると見積もられている (McGrath et al., 1992)。しかし、光化学系IIを構築しているタンパク質の核遺伝子の構成についてはほとんど知られていない。

第1章において、*N.sylvestris*には2種類のPSI-Dが検出されたが、それぞれのPSI-Dの性質や遺伝子の発現機構を解明するには、まずそれぞれをコードする遺伝子を単離し、次いでゲノム中でのPSI-D遺伝子の構成を知ることが不可欠である。そこで、この章では、PSI-DをコードするcDNAや遺伝子を単離し、*N.sylvestris*のゲノムにおけるPSI-Dの遺伝子構成を明らかに

した。

## 材料及び方法

### psaDa cDNAのクローニング

*N. tabacum* PSI-DのN-末端アミノ酸配列(Obokata et al., 1990)をもとにしてpsaD特異的プライマー(5'-GAA/GGCICCGTIGGITTACICCCICCAIT/CTIGAT/CCCIAAT/CAC-3'、ただしIはインデール)を合成し、λgt10プライマー(5'-AGCAAGTTCAGCCTGGTTAAG-3')と組み合わせて、PCR法により*N. sylvestris*のλgt10 cDNAライブラリからpsaD cDNAを増幅した(Erich, 1989)。PCRの温度条件としては(94°C/1min., 55°C/2min., 72°C/4min.)を30サイクル行った。PCR産物をアガロースゲル電気泳動し、0.6kbpのDNA断片をゲルから精製した。そして一部をアルカリ変性させた後、psaD特異的プライマーを用いてdideoxy法により部分塩基配列を決定した(Sambrook et al., 1989)。次いで残りの精製済のPCR産物をランダムプライマー法により<sup>32</sup>Pで標識し、cDNAライブラリから、ブレイクハイブリダイゼーション法によりポジティブシグナルをあたえるクローンを単離した(Sambrook et al., 1989)。

### psaDb遺伝子のクローニング

psaDa cDNA (yaDC17) をランダムプライマー法により<sup>32</sup>Pで標識しプローブとして用いた。*N. sylvestris*のλdash<sup>+</sup>ミックスライブラリ(Li et al., 1991)からブレイクハイブリダイゼーション法によりポジティブシグナルをあたえるクローンを単離した(Sambrook et al., 1989)。

### 制限酵素地図の作成と塩基配列の決定

得られたλクローンはM13ベクターかpBluescript IIベクターにサブクローニングし制限酵素地図を作成した(Sambrook et al.)。塩基配列の決定は、cDNAクローンについてはインサート全長を、yaDG20についてはyaDC17とハイブリダイズする領域及びその周辺部分について、dideoxy法を用いて行った(Sambrook et al., 1989)。

塩基配列及びアミノ酸配列の解析は、パーソナルコンピュータ(NEC PC9801RA)上で遺伝子解析

パッケージ GENETYX (SDCソフトウェア) を用いて行った。

### プライマー伸長法

*N. sylvestris*の葉からPiechullaらの方法(Piechulla et al., 1986)に従って全RNAを抽出した。<sup>32</sup>Pで末端標識したプライマーを20 $\mu$ gの全RNAとハイブリゲイズさせ、MMLV逆転写酵素(BRL, Superscript)を用いて45°Cで90分間プライマー伸長反応を行った(Sambrook et al., 1989)。遺伝子特異的プライマー (5'-GGGCGACGACACGGGGATCGGCTGTTTTTCGAGGTG) は*psaDb* mRNAと相補的であるが、*psaDa*とはハイブリゲイズしない。

### ゲノムDNAのロットニング

*N. sylvestris*からJofukuとGoldbergの方法(Jofuku and Goldberg, 1988)により核DNAを精製した。核DNA 9 $\mu$ gを制限酵素で切断し、0.8%アガロースゲル上で電気泳動した。泳動後、ゲルを0.25N HCl中で振とうしゲル中の色素の色が変わってからさらに10分間振とうを続けDNAの脱プリン化(断片化)を行った。ゲル中のDNAをナイロン膜(Amersham Hybond N+)にキャピラリーブロットし、<sup>32</sup>Pで標識した*psaDa* cDNA (YaDC17)をプローブとしてハイブリゲーション溶液(6xSSC, 5% Irish cream liqueur ('Oreginal Irish Cream', R & A Baileys Co.Ltd., Naas Road Dublin 12), 0.5% SDS, 20 $\mu$ g/ml heat-denatured salmon sperm DNA, 2 $\mu$ Ci/ml <sup>32</sup>P標識プローブ)中で、65°Cで一晩ハイブリゲーションを行った(Sambrook et al., 1989)。膜を1xSSC、0.5% SDS溶液中で65°Cで15分間振とうして洗浄し、オートラジオグラフィにかけた。

## 結果

### *psaDa* cDNAのクローニング

*psaDa* cDNAのクローニングには、まずPCR法を用いて*psaDa* cDNAをcDNAライブラリから増幅し、次にそれをプローブとして全長のcDNAクローンを得ることにした。

PSI-D2のN-末端アミノ酸配列をもとにして $psaD$ 特異的プライマーを合成し、 $\lambda$  gt10プライマーと組み合わせて、PCR法により $N.sylvestris$ の $\lambda$  gt10 cDNAライブラリを鋳型としてPCRを行った。その結果0.6kbpの増幅産物が生じた。この0.6kbpのDNAを回収し、 $psaD$ 特異的プライマーを用いて直接塩基配列を決定したところ、トマトの $psaD$ と高い相同性があることがわかったので(データは省略)、これをハイブリダイゼーションプローブとして $N.sylvestris$ のcDNAライブラリをスクリーニングした。1次スクリーニングの結果100,000クロンのcDNAライブラリに対して75個のポジティブシグナルが得られた。このうち50個のシグナルを選び、プレートのシグナルを与えた所からファージを掻き取り(この中には数十クロンのファージを含む)、一部を先に述べたのと同じ条件で再びPCRにかけると、50個のうち12個が0.6kbpの増幅産物を生じた。増幅されたDNA断片をAluIで消化後、PAGEを行い、異なる切断パターンを生じた8個についてさらに解析を進めた(データは省略)。2次スクリーニングを行いそれぞれのクロンを単離し、M13mp18ベクターにサブクローニングし、その塩基配列を決定した(データは省略)。その結果8クロンのうち1クロンについてはEMBLデータベースを検索してもホモロジーのあるものは得られなかったが、残りの7クロンは共通の配列を持ち、トマトの $psaD$ (Hoffman et al., 1988)と相同性があった。そこで7つのクロンのうち最も長い挿入断片を持つクロンともう1クロンを選んで全塩基配列を決定した(図2-1)。これらのcDNAは互いにオーバーラップしており、同じ遺伝子に由来すると思われるのでこの遺伝子を $psaDa$ と名付けた。 $psaDa$  cDNAは2047アミノ酸からなるポリペプチドをコードしており、PSI-D2のN-末端配列AEEAATKEAEAPVGFTを含んでいた(図2-1)。従って、 $psaDa$ はPSI-D2タンパク質をコードしていることがわかった。 $psaDa$  cDNAの塩基配列から演繹されるPSI-D2成熟タンパク質の分子量は17.4kDaであり、LDS-PAGEによって算出された分子量17.5kDaとよく一致している。この $N.sylvestris$ の $psaDa$ はトマトの $psaD$ (Hoffman et al., 1988)と、DNAレベルで82%、アミノ酸レベルで90%のホモロジーがあった(データは省略)。

#### $psaDb$ 遺伝子のクローニング

次に、得られた $psaDa$  cDNAをプローブとして、 $N.sylvestris$ のゲノムライブラリ、約 $3 \times 10^6$ クロンをスクリーニングし、1つのポジティブシグナルを与えるクロン、yaDG20を得た。このクロンの制限酵素地図

を図2-2に示す。 *psaDa* cDNAとハイブリダイズした領域をpBSベクターにサブクローニングし、その塩基配列を決定した(図2-3)。 yaDG20には2147アミノ酸をコードするORFがイントロンによる分断を受けずに存在しており、このアミノ酸配列にはPSI-D1のN-末端アミノ酸配列(AVEKAQSATKEAEP)を含み、PSI-D2と全長に渡って高い同源性があった(図2-3, 2-4)。 結局このクローンはPSI-D1をコードしていることがわかったので、この遺伝子を *psaDb* と名付けた。

#### *psaDb*転写産物のマッピング

*psaDb*の転写開始点を決定するために、*psaDb*特異的プライマーを用いてプライマー伸長法を行った(図2-5)。 その結果、*psaDb* mRNAの5'末端は、翻訳開始のATGコードンの23bp上流のAであることがわかった。 ただし、ATGから15bp上流のCについても5'末端としての弱いシグナルが検出された。 *N.sylvestris*の別の組織より得たRNA標品を用いても同様の結果が得られた(データは省略)。 *psaDb* mRNAの5'上流域のアンチセンス鎖をプローブとしてRNaseプロテクション法を行ったが、プライマー伸長法で得られた結果と矛盾しなかった(データは省略)。 また、*psaDb*のコード領域全長のアンチセンス鎖をプローブとしてRNaseプロテクション法を行ったところ、コード領域のほぼ全長が保護されたので、*psaDb*にはイントロンが無いことが確認された(データは省略)。

#### *N.sylvestris*における *psaD*のコピー数

*N.sylvestris*における *psaD*のコピー数を決定するために、*psaDa* cDNAをプローブとしてゲノムDNA Southern blottingを行った(図2-6)。 どの制限酵素で消化したものでも強いバンドと弱いバンドが見られる。 yaDG20の制限酵素地図(図2-2)を参照すると、*psaDa*と弱くハイブリダイズするEcoRIの15kbpのDNA断片とHindIIIの7.8kbpの断片は、*psaDb*遺伝子に由来することがわかる。 1.9kbpのEcoRI断片は強いハイブリダイゼーションシグナルを示しているが、これは *psaDa* 遺伝子のシグナルであると思われる。 この断片は2つ以上の *psaD* 遺伝子を含むには小さすぎるので、結局、*N.sylvestris*のゲノムは2コピーの *psaD* をコードしていると結論された。

## 考察

本章では、*N.sylvestris*においては $psaD$ 遺伝子はゲノム当たり2コピー-あること、また2つの $psaD$ の遺伝子産物の1次構造は非常によく似ていることが明らかになった。*N.sylvestris*のゲノム中には $psaE$ はおそらく2コピー-、 $psaH$ はおそらく3コピー-あると報告されているので (Obokata et al., 1994; Nakamura and Obokata, 1994)、これらのPSIの周辺サブユニットはおおむね2-3コピー-の小さな多重遺伝子族を形成していると思われる。これらの遺伝子族にコードされているアミノ酸配列はそれぞれよく似ている(成熟タンパク質での相同性は、 $psaDa$ と $psaDb$ とでは94%、 $psaEa$ と $psaEb$ では89.1%、 $psaHa$ ,  $psaHb$ ,  $psaHc$ では100% (Obokata et al., 1993; Nakamura and Obokata, 1993))なので、これらのイ型サブユニットがそれぞれ機能的に異なっているとは考えにくい。しかしながら、予備的な実験の結果から、 $psaDb$ 特異的なアンチセンスRNAを高発現させた*N.sylvestris*は致死性であることが示唆されている(山本ら、未発表データ)ので、*N.sylvestris*にとっては $psaDa$ 、 $psaDb$ の両方の遺伝子産物が必須であるのかも知れない。今後詳しい解析が必要であると思われる。

```

(YaDC12)
|
      20              40              60
TTTTTTTTTTTTTTTTTTCATCCAGAAGAATAAGTCAACATAGAATGTAAACAAGCGCGCA
      80              100             120
ATCAAATTTATTTGGTATCCTTAACACCAAAAATTTGGTTAAGTGCATCTCCTTTTATA
      140             160             180
TTAGCTTGAAAGTAATATTTCTCAGAACTGTAATCAACACCTCTCAAAAATTGTCTT
      200             220             240
TGCTTGTGGTTTTCCAATTAATTGCCACTCAAGCTTGAATTCTAGCAGACACACCTACTG
      260             280             300
CACTTTCCATTTCGAGAGTACCAATCACCGATATGTGTGTTCTCCACCATGTCTCTACCAG
      320             340             360
ATTTTCAGGTAGCGGATGGGTCTCAAAACGCCATATACAGCAAGATCAGCCAAGTTTGGTT
      380             400             420
TAGAGCCACCAAGAAAATCTCGACCCTTCAGAGCATCAACCCATGTTTCTGCAGCTTCAT
      440             460             480
ACAGGGCTGCACGCTCATCGGTAATATTATACTTCTTCTTCAATCTCTTTGAAACAAAAT
      500             520             540
ACATGGATGCAGCACCACCATACTTGACGGTAAATCTTCCGTAAGCCAATAATTCTAC
(YaDC17)
      560              580              600
AATGGCCATGGCAACTCAAGCTTCTCTCTTCACTCCAGCTCTCTCTGCCCAAAATCTTC
M A M A T Q A S L F T P A L S A P K S S
      620              640              660

AGCCCCATGGAAACAATCCCTTGCTTCCTTCTCTCCTAAGCAACTCAAATCCACTGTTTC
A P W K Q S L A S F S P K Q L K S T V S

      680              700              720
CGCTCCCCGTCCCATTAGAGCCATGGCCGAAGAAGCCGCCACAAAAGAAGCAGAGGCTCC
A P R P I R A M A E E A A T K E A E A P

      740              760              780
AGTGGGCTTTACCCACCAAAATTTGGACCCAAACACACCTTCCCAATCTTCGGTGGCAG
V G F T P P Q L D P N T P S P I F G G S

      800              820              840
CACCGGTGGGCTTCTCCGCAAGGCCAAGTTGAGGAGTTTTACGTAATTACTTGGGAATC
T G G L L R K A Q V E E F Y V I T W E S

      860              880              900
ACCTAAAGAACAGATCTTTGAGATGCCAACTGGTGGTGCAGCTATTATGAGGGAAGGTGC
P K E Q I F E M P T G G A A I M R E G A

      920              940              960
TAATTTGCTGAAATTTGGCGAGGAAAGAGCAGTGTTCAGCACTTGGTACTAGGCTTAGGTC
N L L K L A R K E Q C L A L G T R L R S

      980              1000             1020
AAAGTACAAGATTAACACAGGTTTTACAGGGTGTTCCTAATGGTGAGGTTCAACTACTT
K Y K I N Y R F Y R V F P N G E V Q Y L

      1040             1060             1080
GCACCCTAAGGATGGTGTACCCAGAAAAGGTGAACGCTGGCCGTCAGGAGTTGGACA
H P K D G V Y P E K V N A G R Q G V G Q

      1100             1120             1140
GAACTTCAGATCCATTGGTAAGAACAAGAGCCCAATTGAGGTCAAGTTCACTGGCAACA
N F R S I G K N K S P I E V K F T G K Q

      1160             1180             1200
AGTGTATGATTTGTAAGCTGATTATGGTTTTTTGTGCCTTTTCATGCAATGTAATGAATT
V Y D L *

      1220             1240
TGTGATTATTTAGTGATCGTTTCTGTAATTTTATTTGCCACTACAAATACCGCAT
      poly(A)(YaDC60) poly(A)(YaDC12) poly(A)(YaDC17)

```

図2-1. PSI-D2をコードするpsaDa cDNAクローン、yaDC12, yaDC17, yaDC60の塩基配列

これらのクローンはオバ-ラップしており、各クローンの末端を図に示した。yaDC60については3'末端から約200 bpsの領域についてのみ塩基配列を決定し、3'末端のみを図に示した。塩基配列から演繹されるアミノ酸配列を下に示した。矢印は7'セシク部位を表す。

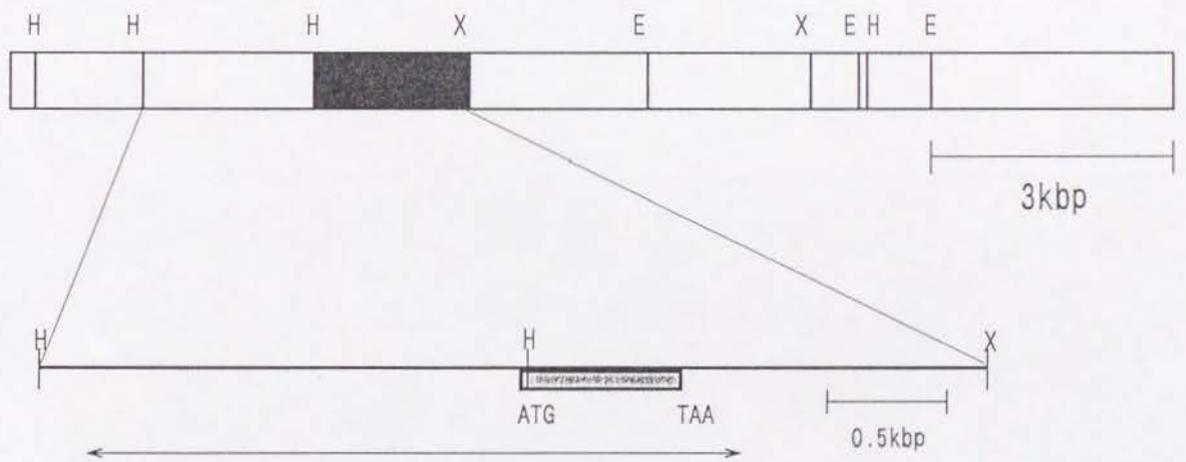


図2-2. *psaDb*を含む $\lambda$ ミックロン-DG20の制限酵素地図

H,X,EはそれぞれHindIII, XbaI, EcoRIの制限酵素部位を表す。黒く塗りつぶした領域が *psaDa* cDNAとハイブリダイズした。矢印で示した領域の塩基配列を決定した。灰色で囲われた所にPSI-D1の前駆体タンパク質がコードされている。

-1697

AAGTGAATTGATTAGCGTATTTAGTGGCTTAGGTTTAGGAGATAACTAAAATAAATATTTTGTATAAACCTTAAAAGATATTTATAG  
-1607  
AATATAATTTTTAAACAGTATTTATTTAAATAAAATAAAGTAACTGTTAACCTTTGCTATGGAGATAAAAATTGGAATAATATTTGTGGGGTG  
-1517  
ATCTGTGAAGAGTAAAAAGTGATATGGTGCAGAAGTGGACCCCTCAAATCTACATGTATCCACCTAATGTGCAGGCTCATTAGCTTTT  
-1427  
GTGGATATTTAAAGTCCATGACATCATCAGCTTTGGTGGCAGAAGTGGGCTTCAAGTCCGTAACAAGAGTAGTAGTTTTCCATGGA  
-1337  
TTTAGTCTTCCACGTGTATCCATAGCATCATCAGCTTCTGTGGCCCTGGAGTAGCACAATTTATTCATTAATCTAACAAAGCAG  
-1247  
ACTTCTCAATATTTAGCTTATAGAACGATTTCCCGTGTGCACAGATAACAATTTATACACTAAATTAATTAAGTAACTAATGTCTGT  
-1157  
TTAATTAATTTTTCAACAATTTATCTTTTCTAAAATTTATGATCATAGCTTCTTCTTTTGTCTTTCCCTGTCTAGCTTTTAAATAGCAG  
-1067  
CAAGTGGGTAAATGATTTATCATGAAAACAACCTCAGTGAATTTTATGTTAGTTCATGTAATACTTCACCTATATATATTTGTTTACTT  
-977  
GTCAGTTTTTATAATAAGACAGCGGCTTTTTGAGTTATCTTAGCTAACTACAATAATTTAGAAATAGTTACTGAGACGCTTCTTACC  
-887  
CTAAGAAAAATATGTGTTACATTAGAAGTGGACCTGAAAATATAGAAAATAATTTCTAAAGGAGATGCCAATCTCTACTCTTTCTT  
-797  
TTTATATTTTCTTATTAATTAAGTAAAGATAGTTGTTGAGCAATTCAGCCTGAAATGTTTACTTAATTTCAAATAATAAGA  
-707  
TTCAAGTAGTAAAGTTATTATAGTTTGAACAATAATTTGTGACTTCTAATTTGAGTCTGTGTCATTTCCATAATCATATTACTCTTTCT  
-617  
TGTTATATACGCAAAAAGATATAAATGTATTATTAATATTTAAATTAAGTCTGAGCAAGTTTTTCTAAATGAGAATAGCTGAATTA  
-527  
AATAATTTGTATTATGTTTGTCTATAGTATTTAATATATATTTGTTTTATTTTTATATCAAGCATGAGCCCAACATGTAATTTAAAA  
-437  
ATACTTTTGTAAAGTGAATATTGCAATTTTATAAGAGCATTATATTTAAAGTTGGTTAACGGAGATATCTAACCTTTATATTTT  
-347  
ACTTTAGATTCATTAACCTCACTTTTACATTTTGTAACTACAATATGTTACCTTTTTTTGTTTCAAATTAGATTCATTAACCTCACTTTAA  
-257  
TATTTTTGTAGTTAAACTATTACGTAAGCTAATTAACATATAGTATATTTATCTTTTTTCTCTTATTTATTATAATCTCTACAATTT  
-167  
GACGTAGTTGTAGTATATTACAGTATTACTAGTTTGTTCGAATTGATTGGAAAATTGTGGTCACACCTCAAATAAATCAACCAGTTTG  
-77  
CATTTTTTCTCTCAATGTTAATTTGCTGACTGGCTAGGGTGCGAATCAAATCACACGTTCTAATGGGCAAAATCCGTATATACC  
14  
TTATCCTATATCCTTTTTCTCCACCACCATCATCTCTCTATGCAACAAAAATAGCTTCTTCTTTTCATTTTTCACCTCTCTCAATCC  
104  
AACTTTTCTATGGCCATGGCATCCCAAGCTTCCCTTTTCAACCCATCTATCTCCACCTCGAAAACAGCCGATCCCGTGTCTGCGCCCA  
M A M A S Q A S L F T P S I S T S K T A D P R V V A P  
194  
TGGAAGCAATCGGCTTCTTCTTCCGCCCTAAACTGTCCAAGTCCGTCGTGGCATACCGTCTATCAAGGCTATGGCAGTTGAGAAG  
W K Q S A S S F S A P K L S K S V V A Y R P I K A M A V E K  
284  
GCCCAATCAGCCACTAAAGAGCCGAGCCGGCGGCTCCAGTGGGCTTCAACCACCACAATTGGACCCAAGCACCCCATCTCCAATATTT  
A Q S A T K E A E P A A P V G F T P P Q L D P S T P S P I F  
374  
GGTGAAGCACTGGTGGCTTCTACGCAAGGCCAAGTTGACGAGTTTTATGTGATCACTTGGGAATCACCTAAAGAACAGATCTTTGAA  
G G S T G G L L R K A Q V D E F Y V I T W E S P K E Q I F E  
464  
ATGCCAAGTGGTGGTGTCTATCATGAGAGAAGGCCAAATTTGCTCAAATTTGGCCGTAAAGAACAATGCTTGGCACTTGGTACTAGG  
M P T G G A A I M R E G P N L L K L A R K E Q C L A L G T R  
554  
CTTAGGTCCAAATACAAGATTAACACAGATTTTATAGAGTTTTTCTAATGGTGAAGTCCAATATTTGCACCCAAAAGATGGTGTGTAC  
L R S K Y K I N Y R F Y R V F P N G E V Q Y L H P K D G V Y  
644  
CCAGAAAAAGTGAATCCGGGCCGTCAAGGAGTTGGGCAGAATTTAGATCCATTGGTAAAATAAGAGCCCAATGAAGTCAAGTTTACA  
P E K V N P G R Q G V G Q N F R S I G K N K S P I E V K F T  
734  
GGCAACAAGTGTATGATATTTAAGGCGATCTGATGATTATGGTGGCTTGTAAATGTCTTTAACACGAAATGTATGATTTTGTCTTA  
G K Q V Y D I \*  
824  
TTAATGCTTGTATCAAATTTATCGTCATTACACATAGCATGGATATAATTGGCTTCTGTCACTTGATTAATTTCTATTTTTTGTGT

861  
TGTGTTGTTGTTGTGCGTAATTTACTGTCTCGAG

図2-3. PSI-D1をコードする *psaDb* 遺伝子の塩基配列

塩基配列から演繹されるアミノ酸配列を下に示した。PSI-D1成熟タンパク質のN-末端アミノ酸配列を波線で示した。黒い三角で示された転写開始点を+1とした。白紙の三角はプライム伸長法(図2-4)で表れた弱いバンドに対応している。GT-1ボックス(Green et al., 1988)、TGA-1a結合配列(Katagiri and Chua, 1992)、GATAボックス(Castresana et al., 1987)、GrobとStüberによるLRE(1987)をそれぞれa, b, c, dで示した。R1, R2, R3は繰返し配列を示す。

processing site ✂

```

PSI-D1  1'  MAMA[S]QASLFTP[S]I[S]T[S]K[T]ADPRVVA[P]WKQS[A]S[S]F[S]A[P]K[L]S[K]S[V]V[A]Y[R]P[I]K[A]M[A]
PSI-D2  1'  MAMA[T]QASLFTP[A]L[S]A[P]K[-SSA----]PWKQSLA[S]F[S]P[K]Q[L]K[S]T[V]S[A]P[R]P[I]R[A]M[A]

55'  [V]EKAQ[S]A[T]KEA[E][P]A[AP]VGFTPPQLD[P]S[TP]SPIFGGSTGGLLRKAQ[V][D]EFYVITW
50'  [---]EEA[A]TKEA[E][--]APVGFTPPQLD[P][N]TPSPIFGGSTGGLLRKAQ[V][E]EFYVITW

109'  ESPKEQIFEMPTGGAAIMREG[P]NLLKLARKEQCLALGTRLRSKYKINYRFYRVF
99'   ESPKEQIFEMPTGGAAIMREG[A]NLLKLARKEQCLALGTRLRSKYKINYRFYRVF

163'  PNGEVQYLHPKDGVYPEKVN[P]GRQGVGQNFRSIGKNKSPIEVKFTGKQVYD[I]
153'  PNGEVQYLHPKDGVYPEKVN[A]GRQGVGQNFRSIGKNKSPIEVKFTGKQVYD[L]

```

図2-4. PSI-D1とPSI-D2のアミノ酸配列の比較

両者の間で異なるアミノ酸残基を枠で囲った。ハサミは7' スPLICING 部位を示す。

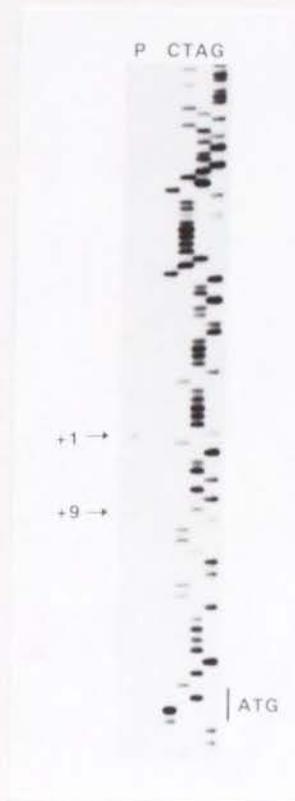


図2-5. プライマー伸長法を用いた $psaDb$ の転写開始点の決定

プライマー伸長反応を行ったサンプル(P)と $psaDb$ のシーケンスタグ-(CTAG)を、5.3%ホリアクリルアミド/8M尿素ゲルの電気泳動にかけ、オートラジオグラフィを行った。

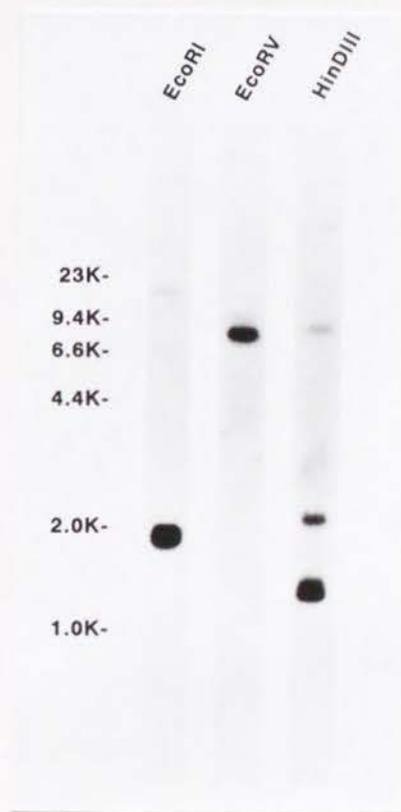


図2-6. *psaD*のゲノムDNAのSouthern blotting

核DNAの消化に用いた制限酵素を各レーンの上に示した。消化後、電気泳動を行い、ナイロン膜にブロットングし、*psaDa*のプロブとハイブリダイズさせ、オートラジオグラフィを行った。

### 第3章 *psaD*多重遺伝子族の組織特異的発現

#### 要旨

*psaDa*と*psaDb*のmRNAの量比を、えき芽、若葉、成葉、茎、花芽、根についてRNase7'プロテアソーム法を用いて調べたところ、*psaDa*、*psaDb*ともに根には存在せず、他の器官においては*psaDb*より*psaDa*の方がmRNA量が多かった。しかし、*psaDa* mRNAに対する*psaDb* mRNAの量比は一定ではなく、えき芽、若葉、成葉と葉の成熟に伴ってその比は、1/8、1/7、1/3と増加していた。*psaDb*、*psaDa*遺伝子の産物である、PsaDa(PSI-D2)、PsaDb(PSI-D1)タンパク質の量比を免疫ブロット法により調べたところ、いずれのタンパク質も根には存在しないこと、そして若葉から成葉への成熟に伴ってPsaDb/PsaDa比(PSI-D1/PSI-D2比)はむしろ減少していることがわかった。これらのことから、*psaDa*、*psaDb*遺伝子の発現にはRNAレベル(転写速度、RNAの安定性)とタンパク質レベル(翻訳速度、タンパク質の安定性)の双方で異なる制御を受けていることが明らかになった。

#### 序

第2章において明らかになったように、PSI-Dは*N. sylvestris*の半数体ゲノム当たり2コピーの遺伝子によってコードされており、2種類の1型タンパク質を生じる。このPSI-Dタンパク質の多型は単細胞性の藻類では見いだされておらず(Reilly et al., 1988; Mühenhoff et al., 1993)、多細胞生物である高等植物独自の現象であると考えられる。2種類のPSI-Dが二者択一的にPSI複合体に取り込まれると、結果的に2種類のPSI複合体が生じることになるが、PSIの多型の出現は植物の多細胞体制と関連があるのだろうか？第3章では、この2種類の1型PSI複合体の植物個体内における分布を見るために、いろいろな組織での*psaD*産物の蓄積量を遺伝子ごとに調べた。その結果*psaDa*と*psaDb*の発現は異なる機構によって制御されていることがわかった。

## 材料及び方法

### RNAとプラスチド膜タンパク質の精製

温室(25°C)で育てた*N. sylvestris*のえき芽(0-3cm)、若葉(5-10cm)、成葉(20-30cm)、茎、花芽、根、を晴れた日の昼過ぎに収穫し、Piechullaらの方法(Piechulla et al., 1986)により全RNAを抽出した。また、プラスチド膜画分については第1章と同様の方法で精製した。

### RNase7'ロケション法

*psaDa*についてはATG開始コドンから下流の18-279bpの領域を、*psaDb*については18-263bpの領域をpBluescriptベクターにサブクローニングし、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ の存在下でT7 RNA polymeraseによる*in vitro*の転写反応を行い(Ausubel et al., 1987)、それぞれのmRNAに相補的なRNA7'ローブを作成した。

RNase7'ロケションアッセイはRPAIIキット(Ambion Inc., Texas, USA)を用いて説明書に従って行った。RNase A/T<sub>1</sub>で消化したサンプルを6%ボリアクリルアミド/8M尿素ゲルの電気泳動にかけ、オートラジオグラフィを行った。それぞれのバンドの放射活性は、AMBIS Radioanalytic Imaging System (K&M, Torrance, CA, USA)あるいは、Fujix BAS2000 (Fuji Photo Film, Tokyo)により解析した。*psaDa*と*psaDb*に対するRNA7'ローブは、1分子当たりそれぞれ61と55個の $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ を含んでいる。従って*psaDa* mRNAに対する*psaDb* mRNAの比は次の式に従って算出した。

$$\text{Db/Da} = (61/55) \times (\text{cpm of Db} - \text{background}) / (\text{cpm of Da} - \text{background})$$

### 免疫7'ロケション

プラスチド膜標品のタンパク質濃度をBCA法(Smith et al., 1985)により定量した。各組織より得たプラスチド膜標品を、タンパク質量を合わせてLDS-PAGEにかけ、第1章と同様の方法で免疫7'ロケションを行い、PSI-Dタンパク質を検出した。

## 結果

*psaDa*と*psaDb*の発現に組織特異性があるのかどうかを調べるために、*N. sylvestris*のえき芽(0-3cm)、若葉(5-10cm)、成葉(20-30cm)、茎、花芽、根から全RNAを抽出し、*psaDa*、*psaDb*に特異的なRNAプロブを用いてRNaseプロテクションアッセイを行い、各々の組織中での転写産物の蓄積をみた(図3-1)。*psaDa*、*psaDb*ともに根では発現しておらず、両者の転写産物は緑色組織でのみ検出された。mRNAが検出された全ての組織では、*psaDa* mRNAの方が*psaDb* mRNAより量が多く、どの光合成組織においてもPSI-D2を含む光化学系Iが主なタイプであることが示唆された。各々のバンドを定量的に解析した結果、*psaDa* mRNAに対する*psaDb* mRNAの量比は、茎と花芽とではほぼ同じ値(それぞれ0.18と0.17)を示したが、葉では成長に伴って0.12から0.36へと増加していた。

図3-1で見られたmRNA量の変化がタンパク質量にどのような影響を与えているのかを調べるために、ホレンソウの抗PSI抗体を用いて免疫ブロッティングを行った(図3-2)。*psaDa*、*psaDb*の翻訳産物であるPsaDa (PSI-D2)、PsaDb (PSI-D1)はいずれも根からは検出されず、その他の組織では両方のタンパク質が蓄積していた。若葉から成葉への成熟に伴ってPSI-D1は減少し、同時にPSI-D2は増加していた。従ってこのときPsaDaタンパク質(PSI-D2)に対するPsaDbタンパク質(PSI-D1)の量比は減少しており、RNAレベルとは逆の傾向が見られた。

## 考察

*N. sylvestris*のゲノム中に2コピーの*psaD*が存在することが明らかになり、コピー間での機能、発現様式に差異があるのかどうか、という疑問が生じる。本章ではそれぞれの遺伝子コピーでの発現様式について調べたところ、葉、茎、花芽のどの光合成組織においてもどちらか一方のコピーのみが排他的に発現しているということはないことがわかった。しかし、葉の成熟に伴って*psaDa* mRNAに対する*psaDb* mRNAの量比は増加し、また同時にPsaDaタンパク質(PSI-D2)に対するPsaDbタンパク質(PSI-D1)の量比は減少している。以上のことから2つの

psaD<sup>+</sup>の発現制御機構はRNAレベルとタンパク質レベルの両方で異なっていると考えられる(以下参照).

葉の成熟の過程で、*psaDa*のmRNA量は若葉で最も多く、その翻訳産物は成熟葉で最も多量になる. この蓄積様式は、*psaDa*のタンパク質産物はいったんPSI複合体に組み込まれると葉の成長の過程を通じて安定に保持されると考えれば簡単に説明することが出来る. しかし、*psaDb*のmRNAとタンパク質の蓄積様式はもう少し複雑である. *psaDb* mRNAの量は若葉でも成葉でも高いレベルに保たれているのに対して、タンパク質産物 (PSI-D1) の相体量は若葉から成葉へと大きく減少している. この原因として考えられるのは、葉の成長に伴って、*psaDb* mRNAの翻訳活性が抑えられるか、あるいはPsaDbタンパク質(PSI-D1)の安定性が低下するということである. 翻訳制御や翻訳後の制御は環境の刺激に対してより素早い応答を行えるが(Thompson and White, 1991)、*psaDb*は何らかの環境からの刺激に対して迅速に誘導されるのかも知れない. *psaD*多重遺伝子族の発現解析を進めることで、光合成装置の多様性の果たす役割について新たな知見が得られることが期待される.

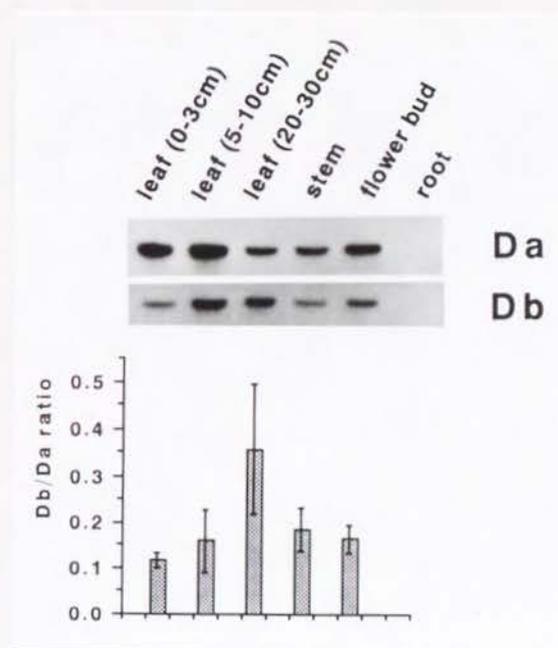


図3-1.様々な器官での $psaDa$ と $psaDb$ のメッセンジャー-RNAの蓄積

図に示された組織から抽出した全RNA 22 $\mu$ gに対してRNase7'ロテクションアッセイを行った。7'ロブには $psaDa$ または $psaDb$ 特異的な相補鎖RNAを用いた。3回の実験を行い、 $psaDa$  mRNAに対する $psaDb$ の比の平均値と標準偏差を算出した(下のパネル)。

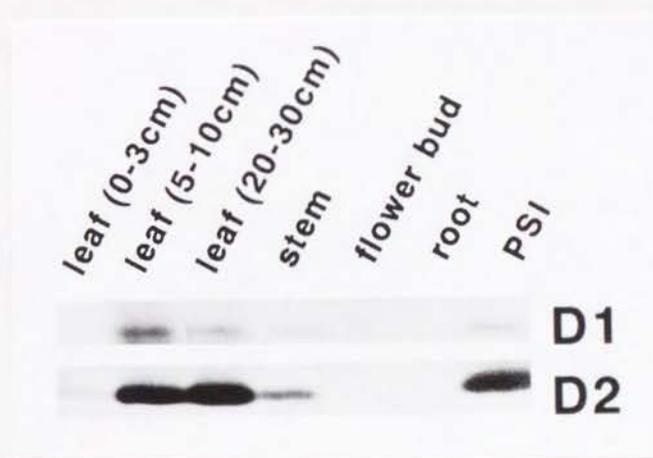


図3-2.様々な器官でのPSI-D1(*psaDb*産物)とPSI-D2(*psaDa*産物)の蓄積

図に示された組織から得た「ラフト」膜タンパク質(PSI-D1の検出には225ng、PSI-D2には45ngを用いた)を、抗オレウグ PSI抗体に対して免疫ブロットングを行った。精製したPSI標品を同時に免疫ブロットングし、各型を同定した(PSIのレーン)。

## 第4章 光化学系 I 遺伝子群の光応答

### 要旨

*N. sylvestris*のグリーンング時でのPSI-A/PSI-B, PSI-C, PSI-D, PSI-E, PSI-H, PSI-Lのタンパク質量の変化を抗PSI抗体を用いて調べた。その結果、*N. sylvestris*の黄化芽生えからはこれらのPSIサブユニット群は検出されなかったが、白色光を連続照射すると照射開始後6時間から72時間まで各サブユニットは協調的に増加していった。このときのmRNA量の変動を核遺伝子である *psaDa*, *psaDb*, *psaEa*, *psaEb*, *psaHa*, *psaHb*, *psaHc*に特異的なプローブを用いてRNase7'プロテクション法により解析した。黄化芽生えにおいては調べた全てのmRNAはある程度蓄積しているにもかかわらずそれらのタンパク質産物は検出されなかったため、これらの遺伝子発現には、翻訳あるいは翻訳後の段階で光を要求することがわかった。光照射後、*psaDb*を除いて光照射開始後1時間まではmRNA量に変化は見られなかったが、*psaDb*のみ照射開始後1時間ですでにmRNA量が増加しており、素早い光応答性を示した。調べたすべての遺伝子において照射開始後1時間から6時間まではほぼ直線的にmRNA量が増加し、その後mRNA量は複雑に増減していった。

播種後1-2カ月の幼植物を暗所に5日間置き暗順化させた後、白色光を連続照射し、mRNA量の変動をRNase7'プロテクション法を用いて調べた。*psaEb*は光応答を示さなかったが、*psaDa*, *psaDb*, *psaEa*, *psaHa*, *psaHb*, *psaHc*についてはグリーンング時と同じ特徴を持つ変動曲線が得られたため、これらの遺伝子群は黄化芽生えと暗順化させた緑植物とで同様の光制御を受けていることが示唆された。

### 序

被子植物の黄化芽生えには光合成を行う能力はないが、光の下に曝されるとPSI活性、そしてPSII活性が現れ、その後明反応の電子伝達鎖が完成し (Wellburn and Hampp, 1979; Ohashi et al., 1989)、次第に光合成能を発達させる。このグリーンングの過程でプラスチドに含まれ

るタンパク質の組成は大きく変化するが、光合成に関わるタンパク質としては黄化芽生えにすでに存在するものと、光照射後に出現してくるものがある(Herrmann et al., 1991).

葉緑体ゲノムにコードされたP70070タンパク質であるPSI-A/Bは、オオムギの黄化芽生えには存在せず、光照射によりその翻訳が活性化されPSI-A/Bが蓄積していく(Vierling and Alberte, 1983; Kreuz et al., 1986; Klein and Mullet, 1986). しかし、双子葉植物においてはインゲンマメとホウレンソウの黄化芽生えにはすでに相等量のPSI-A/Bが存在するというNechushtaiとNelsonの報告(Nechushtai and Nelson, 1985)がある一方で、黄化芽生えからはPSI-A/Bは検出されないという報告がエンドウ(Takabe et al., 1986)、ホウレンソウ(Herrmann et al., 1991)を材料に用いてなされている。これらの報告は一見矛盾しておりグリーニング時における光化学系 I の挙動を理解する上で混乱を生じている。こうした混乱が解決出来ない原因の一つとして挙げられるのは、それぞれの実験系でのタンパク質の検出感度が示されていないために、これらの報告が矛盾しているかどうかを実際には明らかではないということである。従ってグリーニング時におけるPSI-A/Bのタンパク質量の変動を定量的に解析することが必要であると思われる。

核にコードされたPSIサブユニットの量がグリーニングの過程を通じてどう変動するかはPSI-Dを代表としてよく調べられている。このサブユニットは黄化芽生えには存在せず、光照射後初めて現れる(Nechushtai and Nelson, 1985; Takabe et al., 1986; Iwasaki et al., 1991; Herrmann et al., 1991; Pauncz et al., 1992)。このとき核遺伝子である *psaD*, *psaE*, *psaF*, *psaG*, *psaH* の転写産物が光照射後大きく増加することがラジオ法による解析の結果明らかにされている(Brunner et al., 1991; Flieger et al., 1993)。これらの遺伝子は高等植物においては一般に小さな多重遺伝子族を作っている(Herrmann et al., 1991; Obokata et al., 1992; Obokata et al., 1993)が、BrunnerらとFliegerらの研究ではその点は考慮されていない。しかしそれぞれの多重遺伝子族を構成する各遺伝子コピーのうちどのコピーがグリーニング時に光誘導を受けるのかを調べることは、PSI生合成の分子レベルでの調節機構を解明するためには不可欠である。そこでこの章ではグリーニング時におけるPSI遺伝子群の発現をそれぞれの遺伝子コピーごとに定量的に解析した。

## 材料及び方法

### 植物材料

植物の育成、光/暗処理は25°Cで行った。*N.sylvestris*の種子を表面滅菌し、1/2xMS培地(0.8%寒天)を含むプラスチックシャーレに播種し、発芽促進のために蛍光灯の白色光( $70 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ )を48時間照射して、その後完全暗黒下に5日間置いた。生じた黄化芽生えに蛍光灯の白色光( $50 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ )を連続照射し、光照射後の様々な時間に収穫し、直ちにプラスチック膜画分を精製した(以下参照)。RNA抽出のためには、シャーレに直接液体窒素を注ぎ込み凍結した芽生えを収穫し、-80°Cに保存後RNAを抽出した。*N.sylvestris*は発芽のために光の前照射が必要であり、24時間の前照射では50%以下の発芽率しか得られない。緑葉での光応答を見るためには、1/2xMS培地上でL16/D8の明暗周期で1-2カ月程育成し、暗所で5日間暗順化させた後、黄化芽生えに与えたのと同様にして光処理を行った。

### 免疫ブロットング

プラスチック膜画分の精製は第1章と同様の方法で行った。プラスチック濃度を血球計算板を用いて算出し、同数のプラスチックより得た膜標品に対してLDS-PAGEを行い、ニトロセルロース膜(Amersham, Hybond ECL)にブロットし、オムギのPSIに対するウサギ抗体、horseradish peroxidase標識protein Aと順次結合させた。そして化学発光により(Amersham, ECL Western blotting kit) X線フィルムを感光させPSIサブユニットを検出した。X線フィルムへの露光は15秒から一夜の間行った。各バンドの強度を積分デンシトメータ(Molecular Dynamics, Model 300SXE)を用いて測定した。希釈系から検量線を作成し、光照射を72時間行った芽生えでのそれぞれのタンパク質量を100%として相対量を算出した。

### RNAの抽出

凍結組織2-3gをMikro-Dismembrator II (B.Braun Japan Inc., Tokyo)を用いて破碎し、AGPC法(Chomczynski and Sacchi, 1987)により全RNAを抽出した後、フェノール/クロホルム抽出を3回繰返

し、さらにリウム沈澱を行い全RNAを精製した。通常、2-3gの組織から100-500 $\mu$ gのRNAが得られた。

#### RNAase $\beta$ プロテクションアッセイ

RNA $\beta$  プロブ作成のための鋳型DNAは以下の様に作成した。 *psaDa*, *psaDb*については第3章にすでに記載した。 *psaEa*, *psaEb* cDNA (Obokata et al., 1994)のATG開始コドンの+20 から+265 bp, +18 から+335の領域をそれぞれpBluescriptII $\beta$  クラ-に挿入した。 また *psaHa*, *psaHb*, *psaHc* については+1052から+1261, +2117から+2321, +1251から+1376の領域 (Nakamura and Obokata, 1994)をそれぞれpBluescriptII $\beta$  クラ-に挿入した。 これらの鋳型DNA $\beta$  ラスト $\beta$  を適当な制限酵素を用いて切断した後、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ の存在下でT7またはT3 RNA polymeraseを用いて *in vitro*の転写反応を行い、それぞれの遺伝子に特異的なアンセンスRNA $\beta$  プロブを作成した (Ausubel et al., 1987)。 芽生えより得た全RNA10 $\mu$ gと $1 \times 10^5$ cpmの $\beta$  プロブをハイブリダイズさせ RNase A/T $\beta$ で消化後、8M尿素/6%ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した (Ausubel et al., 1987)。 泳動後ゲルをオトラジオグラフィ-にかけ、各バンドの放射活性をFujix BAS2000 (Fuji Photo Film, Tokyo)を用いて解析した。

## 結果

### PSI $\beta$ プロブ群のゲリニグ時における光誘導

黄化芽生えに白色光を連続照射し、PSI $\beta$  プロブの蓄積量の変化を免疫プロット法を用いて調べた(図4-1)。 用いた抗体はPSI-A/B, PSI-C, PSI-D, PSI-E, PSI-H, PSI-Lと反応するものである。 PSI-D, PSI-E, PSI-Hの $\beta$ 型は電気泳動の移動度の差から区別した。 PSI-L $\beta$  プロブにはPSI-L1とPSI-L2の2種類の $\beta$ 型があるが (Obokata et al., 1993)、この時の電気泳動の条件では区別出来ない。 またPSI-H1タンパク質はPSI-H2タンパク質の前駆体であると考えられているが (Nakamura and Obokata, 1994)、微量にしか存在しないために検出されなかった。

図4-1(A)では抗体の力価によって6-24時間光照射の標品からPSIサブユニットが検出され始めているが、X線フィルムへの露光時間を長くとることによって、6-12時間光照射の標品からも全てのサブユニットが検出された。その結果を図4-1(B)に定量的に表した。黄化芽生えからはどのPSIサブユニットも検出されなかった。このときPSI-A/Bについては72時間光照射した標品の3.6%のタンパク質があれば十分検出されており、1.2%のレベルで検出不能になった。従ってこのときの検出限界は2%程度であると考えられる。同様に他のサブユニットについても検出限界は72時間光照射した標品の2-7%の間であったので、黄化芽生えにおいては多くてもそれ以下の量であることが明らかになった。

調べたすべてのPSIタンパク質は光照射後大きく増加していき、PSI-DやPSI-Eサブユニットのなかで光の影響を受けにくいイ型タンパク質はなかった。しかし、光照射後6時間ではPSI-D2を含めてほとんどのタンパク質はまだ72時間光照射した標品の8%以下であったのに対して、PSI-D1だけは14%にまで増加しており早い光応答を示した(図4-1(B))。

このときの転写産物量の変化を核遺伝子の *psaDa*, *psaDb*, *psaEa*, *psaEb*, *psaHa*, *psaHb*, *psaHc* について調べた(図4-2)。なお *psaDa*, *psaDb* のタンパク質産物はそれぞれPSI-D2, PSI-D1である(2章参照)。また *psaEa* にコードされた前駆体タンパク質には2カ所のプロセシング部位があるために、この遺伝子 *psaEa* からN-末端部分が17ミノ酸ずれた2種類のタンパク質PSI-E1とPSI-E2が生じると考えられている(Obokata et al., 1994)。同様に不均一なプロセシングの結果 *psaEb* からPSI-E3とPSI-E4とが生じると考えられている(Obokata et al., 1994)。 *psaHa*, *psaHb*, *psaHc* の成熟タンパク質のアミノ酸配列は同一であり、これらの遺伝子のタンパク質産物はPSI-H2であることが強く示唆されている(Nakamura and Obokata, 1994)。

調べた7つの遺伝子全てについて黄化芽生えにはすでにある程度のmRNAが蓄積していた(図4-2(A))。またすべての転写産物は光照射後増加しており、 *psaD*, *psaE*, *psaH* の多重遺伝子族の中で光応答を示さない遺伝子はなかった。増加の傾向は *psaDb* を除いてよく似ていた。すなわち、照射後1時間まではmRNA量に変動は無いが、1時間後から6時間後にかけてほぼ直線的に増加していった。その後12時間後にやや減少した後再び増加し、72時間後にはまた減少した。 *psaDb* については1時間後にすでに転写産物が2.3倍に増加してお

り、素早い光応答を示した。

ゲリニグ時のタンパク質量とmRNA量の変化を各サブユニットごとにまとめた結果を図4-3に示した。*psaD*, *psaE*, *psaH*の転写産物は光照射後1時間から増加し始め、増加は6時間後まで続き、その後mRNAレベルは複雑に増減する(図4-3B)。タンパク質レベルではPSI-D, PSI-E, PSI-Hを含む6つのPSIサブユニットはすべて6時間後から顕著に増加し始め、サブユニット間で協調して72時間後までほぼ直線的に増加している(図4-3A)。mRNAレベル、タンパク質レベルともにサブユニット間でよく調和のとれた光誘導を受けており、反応がとりわけ素早いサブユニットや遅いものは見出されなかった。

#### 暗適応させた緑葉でのPSIサブユニット群の光応答

次に緑葉でのPSIサブユニットの核遺伝子群の光に対する反応を見た。播種後1-2カ月の幼植物を暗所に5日間置いて暗順化させた後、再び白色光を連続照射し、*psaDa*, *psaDb*, *psaEa*, *psaEb*, *psaHa*, *psaHb*, *psaHc*のmRNA量の変化をRNaseプロテクション法を用いて調べた(図4-4)。黄化芽生えの時の反応とは異なり、*psaEb*の転写産物はほとんど光の影響を受けなかったが、*psaEa*は他の遺伝子と同様に光応答を示した。また*psaEb*を除く6つの遺伝子は黄化芽生えでの場合と同じ特徴を持つ蓄積様式を示したので、これら6つの遺伝子の光応答には黄化芽生えの子葉と暗順化させた葉で共通の制御機構が働いていることが示唆される。

#### 考察

*N. sylvestris*の黄化芽生えにはPSI-Dサブユニットは検出されず、光照射後増加していった。これはオレソウ、オトメギ、インゲンマメ(Nechushtai and Nelson, 1985)、エンドウ、小麦(Takabe et al., 1986)、キウリ(Iwasaki et al., 1990)を材料に行った結果と一致する。このときPSI-A/PSI-BサブユニットもPSI-Dと同じ蓄積様式を示した。この結果はTakabeら(1986)やHerrmannら(1991)の報告とは一致するが、NechushtaiとNelsonの報告(1985)とは矛盾している。この不一致の原因については明らかではないが、双子葉植物の黄化芽生えにPSI-A/PSI-Bが存在するとい

う報告は今のところ1つの研究室からのみ提出されていることになる。本章での結果と考  
え合わせてみても、NechushtaiとNelsonの結果は再検討を要するのではないかと思われ  
る。本章においてはさらにサブユニットPSI-C, PSI-E, PSI-H, PSI-LもPSI-Dと同じ蓄積様式を示  
すことが明らかになった。このことから、グリーニング時における光化学系Iサブユニット群の蓄  
積は非常に協調的に行われていることがわかる。

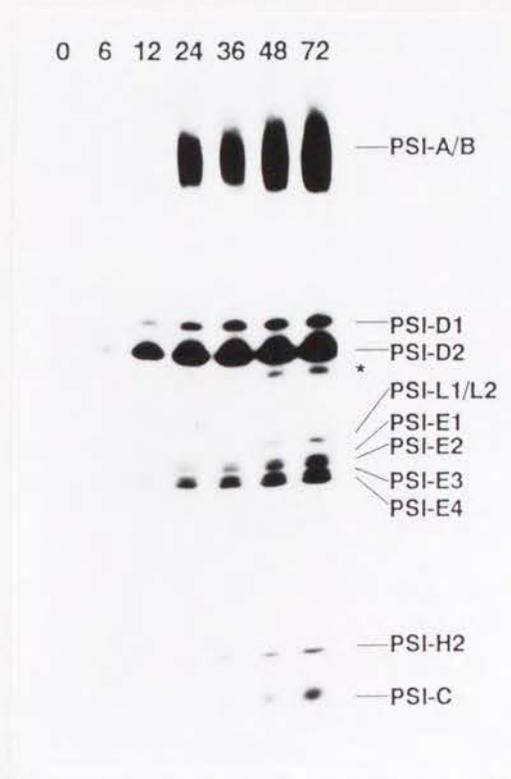
黄化芽生えにはPSI-D, PSI-E, PSI-HのmRNAはある程度存在している(図4-2)のでこれら  
のサブユニットの蓄積には翻訳そして/あるいは翻訳後の段階で光が必要であることがわか  
る。この現象の1つの説明としては、黄化芽生えではPSI-A/PSI-Bは存在しないが、このと  
き他のPSIサブユニットが合成されプラスチドへ運ばれたとしてもPSI複合体に組み込まれないの  
で蓄積されずに分解されてしまうということが考えられる。クロロフィルタンパク質であるPSI-  
A/PSI-Bの蓄積には翻訳あるいは翻訳後の段階で光が必要であり、従って黄化芽生えでは  
PSI-A/PSI-Bは存在出来ない(Gruissem and Tonkyn, 1993)、またPSI-A/PSI-Bが存在しない時  
には他のPSIサブユニットは蓄積されずに分解されてしまう(Girard-Bascou et al., 1987; Smart et  
al., 1991; Gruissem and Tonkyn, 1993)という知見は前述の説明と矛盾しない。ただしPSI-D,  
PSI-E, PSI-Hの翻訳あるいはプラスチドへの輸送に光が必要かどうかは現在のところ明らか  
ではない。

*psaD*, *psaE*, *psaH*はそれぞれ小さな多重遺伝子族を形成しているが、光に対する応答は遺  
伝子レベルごとに異なっていた。*psaD*遺伝子族のなかでは*psaDb*が光応答が素早く(図4-1, 4-  
2, 4-4)、また*psaE*遺伝子族の中では*psaEb*のみが緑葉での光応答がみられない(図4-3)。  
PSI-D, PSI-Eサブユニットの1型の変動がPSI活性に対してどのような影響を与えるのか  
は現時点では明らかでは無い。しかしながら*psaD*, *psaE*多重遺伝子族のそれぞれの遺伝子  
レベルは異なる挙動をしていることから、遺伝子レベルごとに異なる役割を担っていると思わ  
れる。

*psaH*遺伝子発現の光応答性が、ホレソウのグリーニング時とmRNAの日周変動とで他のPSI遺  
伝子と比較して遅く、むしろLHCI遺伝子の応答と似ていることから、PSI-H (Subunit VI)  
はPSIコア複合体とアンテナとの結合に関わるサブユニットではないかとSteppuhnらは議論している

(Steppuhn et al., 1989; Golbeck, 1992; Bryant, 1992). しかし一方でBrunnerらがホレンソウのグリーンイング時のmRNA量の増加をノザン法を用いて調べた実験では、*psaH*は*psaD*, *psaF*, *psaG*と比べて特に光に対して遅い反応を示してはいない(Brunner et al., 1991). *psaH*は高等植物では単独コピ-の遺伝子ではなく、ホレンソウでは2-3コピ-(Herrmann et al., 1991)、*N. sylvestris*ではおそらく3コピ-(Nakamura and Obokata, 1993)あるので、プロトに用いた遺伝子、用いた遺伝子の領域によって同じ材料を用いてもノザンプロテイングの結果が異なることは十分考えられる. 上記の論文ではこの点について考慮されていない. *N. sylvestris*の黄化芽生えにおいてRNaseプロテクション法を用いて各コピ-ごとに*psaH*の発現を調べた結果(図4-2)では*psaH*の光応答が*psaD*, *psaE*と比べて遅いということにはなかった. PSI-Hタンパク質の増加パターンについても同様である(図4-1). 従ってPSI-Hの機能についてのSteppuhnらの考察は再検討を必要とすると思われる.

A



B

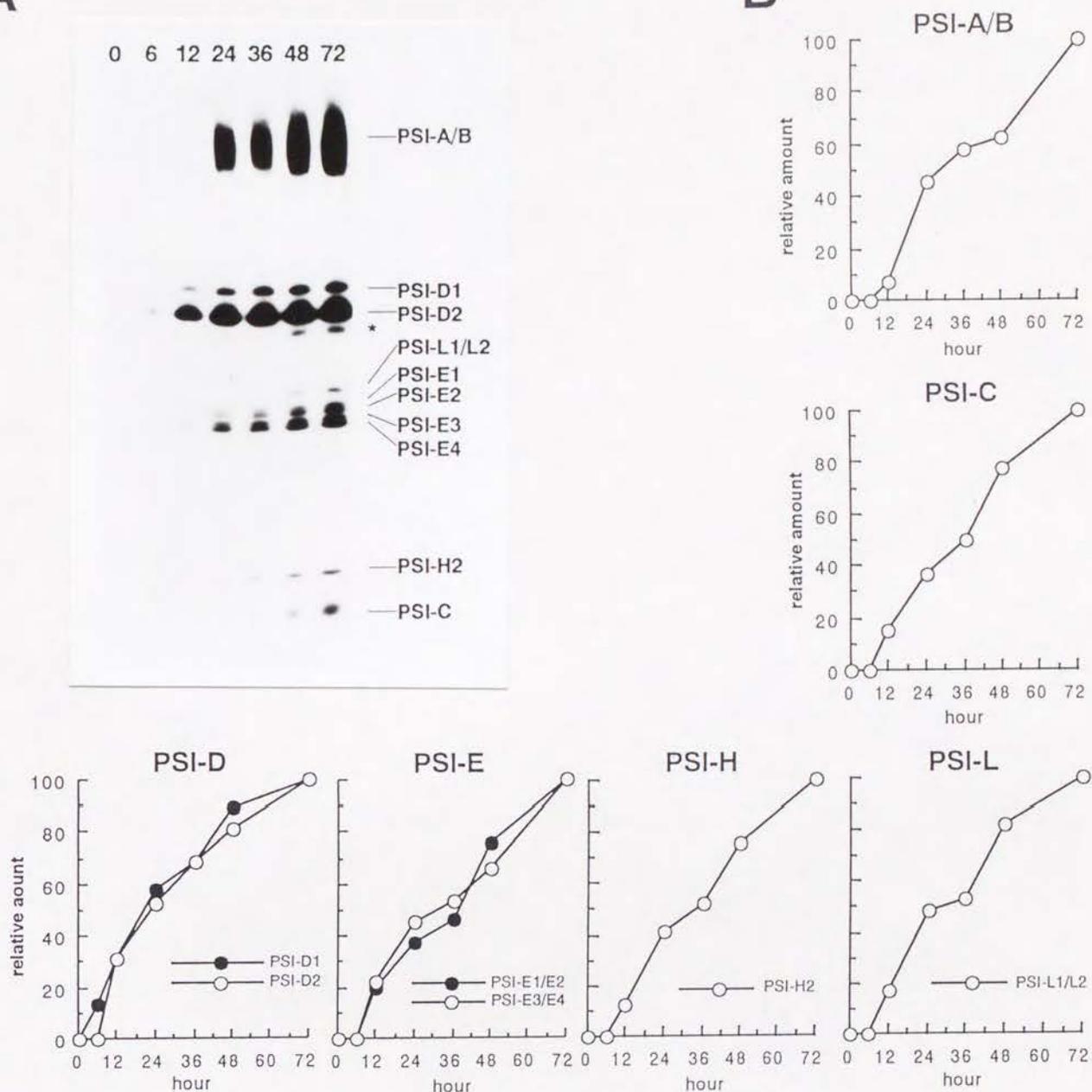


図4-1. グリーニング時におけるPSIタンパク質の蓄積

(A) 黄化芽生えに0, 6, 12, 24, 36, 48, 72時間照射し、免疫ブロット法によりPSIサブユニットを検出した。検出にはperoxidaseの化学発光法を行い、X線フィルムへ1分間露光した。各レーンにはガラス片 $5 \times 10^8$ 個分の膜タンパク質を試料とした。精製したPSI標品を同時に電気泳動し、移動度の比較から各サブユニットを同定した(Obokata et al., 1993)。星印は未同定のバンドを示す。(B) 2回の実験を行い、それぞれのタンパク質量の平均値を算出し、72時間照射した標品のタンパク質量を100%として相対値を算出した。それぞれのタンパク質量が8%以上の場合のみ定量的な解析が行えた。

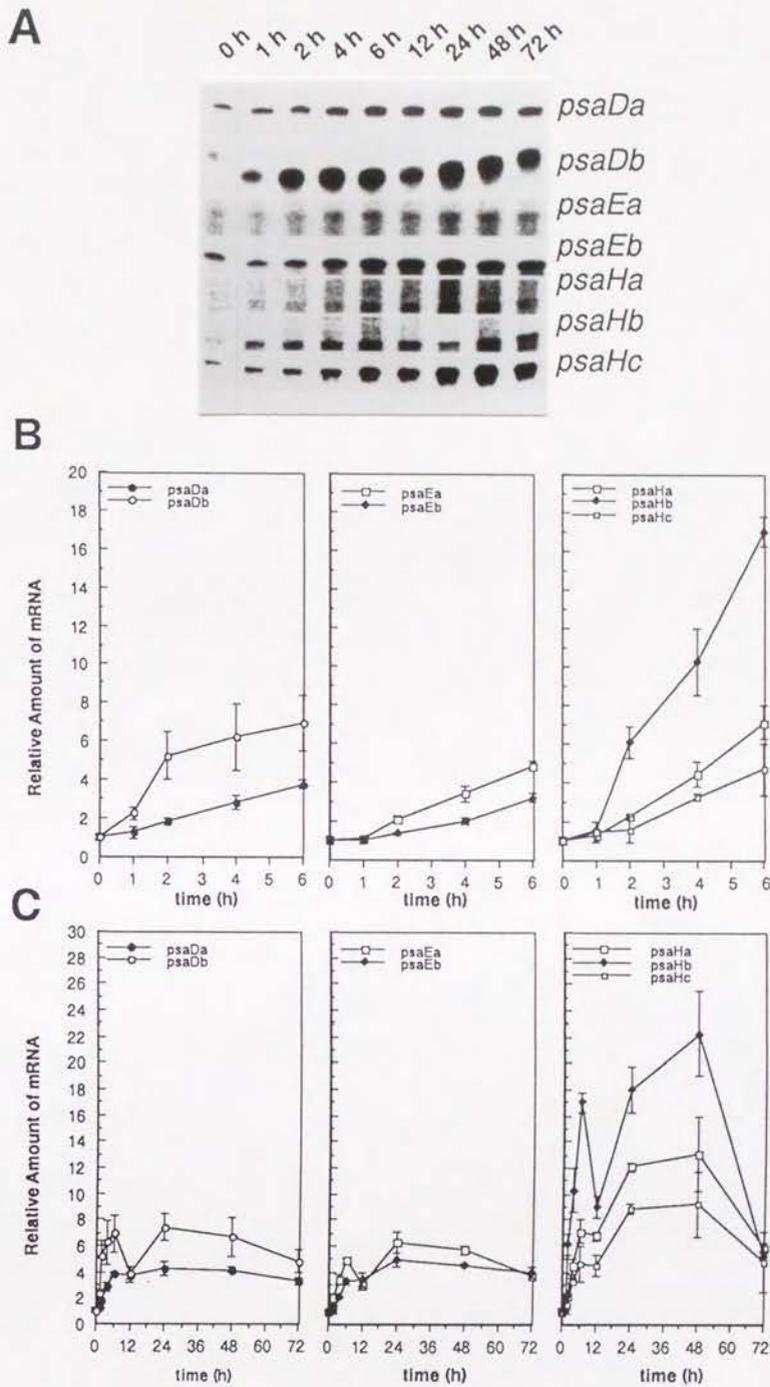


図4-2. グリーニング時における *psaD*, *psaE*, *psaH* 遺伝子群の光誘導

(A) *N. sylvestris*の黄化芽生えに白色連続光を図に示された時間照射して全RNAを抽出し、*psaDa*, *psaDb*, *psaEa*, *psaEb*, *psaHa*, *psaHb*, *psaHc*に対する特異的プローブを用いてRNaseプロテクション assayを行った。変性ゲル中で電気泳動を行った後のオートラジオグラムを示す。

(B)と(C)それぞれの遺伝子について0hでのmRNAレベルを1.0として相対値を算出した。3回の実験を行い、平均値と標準偏差を示した。0-6hの反応を(B)に、0-72hの反応を(C)に示した。

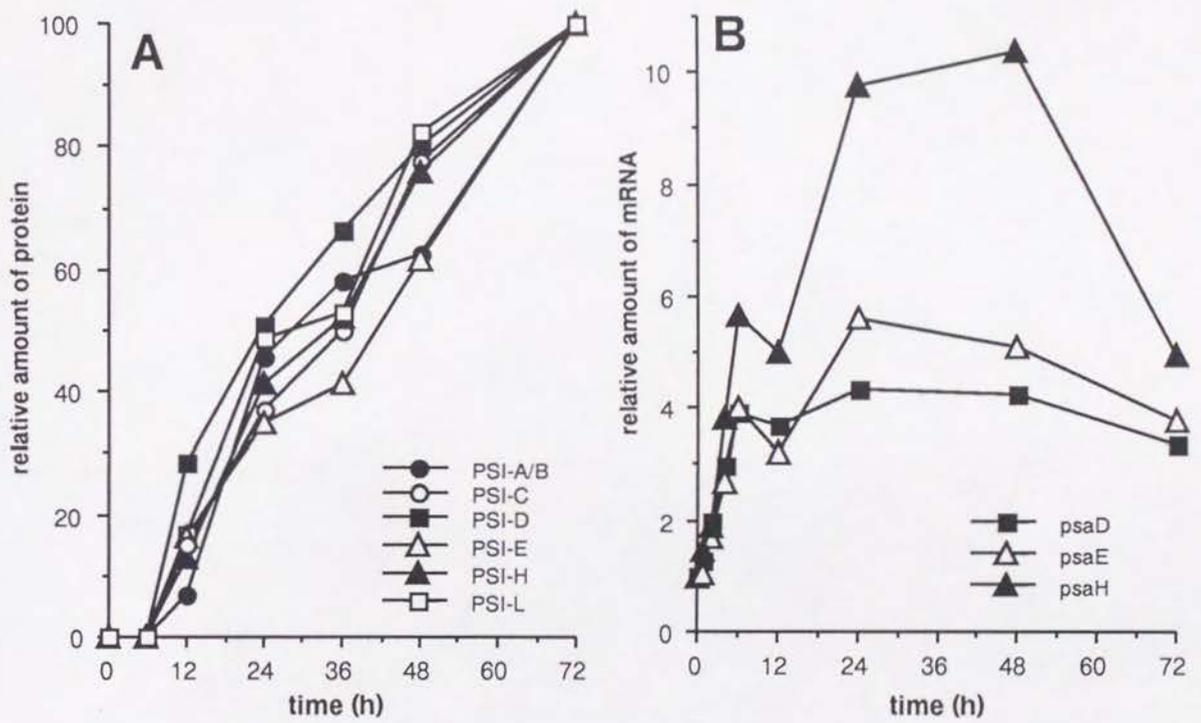


図4-3. グリーニング時におけるPSIサブユニット群の蓄積プロフィール。

(A) 図4-1の結果をもとにして、それぞれのサブユニットごとにタンパク質量を積算した。(B) 図4-2の結果をもとにして、それぞれのサブユニットごとにmRNA量を積算した。

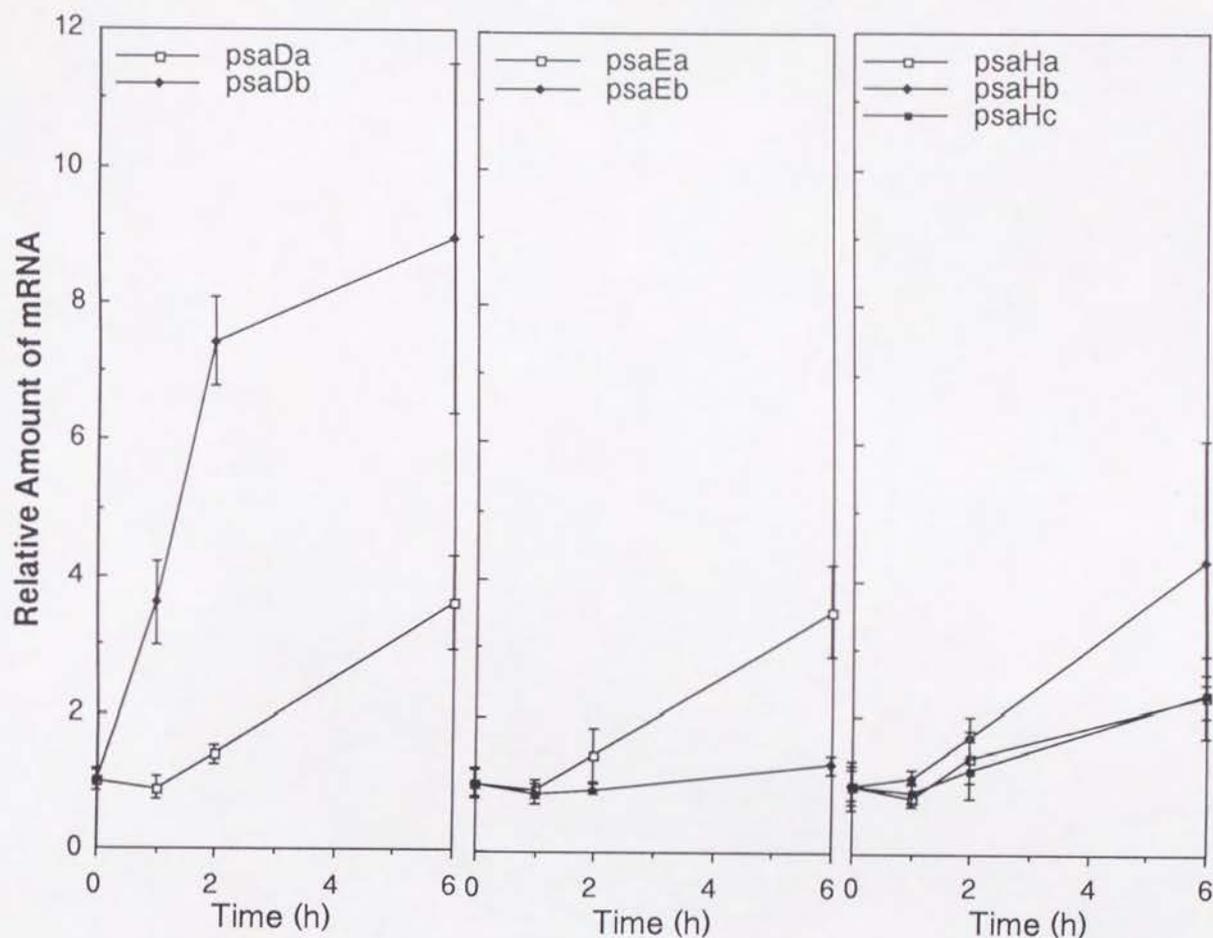


図4-4. 暗順化させた幼植物における *psaD*, *psaE*, *psaH* 遺伝子群の光応答

シャーレ中で1-2カ月育成した *N. sylvestris* の幼植物を暗所に5日間置いて暗順化させ、その後白色連続光を0-6h照射し、図4-2と同様にRNase7'プロテクションアッセイを行いそれぞれの遺伝子の転写産物を定量した。3回の実験を行い平均値と標準偏差を算出した。0hのmRNAレベルを1として相対値をグラフに現した。

## 第5章 *psaDb*遺伝子の転写、転写後、翻訳レベルでの光制御について

### 要旨

*Nicotiana sylvestris* の光化学系 I 核遺伝子群の中で *psaDb* は最も迅速な光応答をタンパク質レベル並びにRNAレベルで示す。*psaDb* の遺伝子発現に関して光の作用点は転写、mRNAの安定性、翻訳のどの段階にあるのかをトランスジェニックタバコを用いて解析した。*psaDb* 遺伝子断片を含む3種の融合遺伝子（「*psaDb* プロモーター+GUSレポーター」「CaMV 35Sプロモーター+*psaDb* の転写領域」「CaMV 35Sプロモーター+*psaDb* mRNAの5'部分+GUSレポーター」）を構築し、アガベケリウム系のよりタバコ (*Nicotiana tabacum* SR1 cv Petite Havana) に導入した。そしてこれらの導入遺伝子が光応答を示すかどうかを調べた。その結果「*psaDb* プロモーター+GUSレポーター」のみが光応答を示したので、*psaDb* の光に依存した発現は転写レベルで調節されており、mRNAの安定性や翻訳開始頻度は光照射によって変化しないことがわかった。また *psaDb* 転写産物の5'部分には翻訳効率を十数倍高める機能があることが示された。同様の結果が示唆されているシイナス *nfedA* との構造比較から、*psaDb* の5'非翻訳領域に存在する *ef-7*、LM1(TCTCAA)、LM2(CAACTTT)が翻訳活性を高めるシ配列であることが示唆される。

### 序

グリーンング時には光合成を行うための数多くのタンパク質が光に依存して合成される。葉緑体遺伝子の多くは、転写レベルではなく転写後のレベルで光制御を受けているが、このことは、*in vitro* での転写活性は光による影響を受けないが *in vivo* での mRNA 量は増加していることから明らかになった (Deng and Gruissem, 1987; Krupinska and Apel, 1989)。一方いくつかの核遺伝子では、転写レベルで光誘導を受けていることが単離核での転写活性の変化から示されている (Thompson and White, 1991)。核遺伝子の転写後の光制御を調べるために、これまで単離核での転写活性の増加率と *in vivo* での mRNA 量の増加率を比較することで検討されてきた。しかし、run-onアッセイ法で測定した単離核での転写活性は、*in vivo* での転写

活性のすべてを反映しているわけでは無いので、定量的な解析を行うことは疑問視されている(Thompson and White, 1991)。上記の検討法には別の問題もある。例えばmRNAの分解速度が変化しない場合、転写活性が2倍に変化したときmRNAの増加速度がどのくらいになるかはもともとの転写活性によって異なる。またこのときmRNA量が何倍になるかは転写活性の上昇の持続時間によって異なる。従ってたとえmRNA量の安定性に変化はなくても、転写活性が2倍に変化したときmRNA量が2倍になることも20倍になることも原理的には有り得る。

転写後の光制御を調べるためのもう1つのアプローチとして形質転換植物を用いた研究が行われている。Thompsonとその共同研究者らの報告によると、光の影響を受けないCaMVプロモーターの支配下にエンドウのferredoxin遺伝子*fedA*の転写領域をつないだ融合遺伝子をタバコに導入すると、この融合遺伝子は光照射により発現誘導される(Elliott et al., 1989; Gallo-Meagher et al., 1992; Dickey et al., 1993)。このことは*fedA*の光に依存した遺伝子発現には、mRNAの光安定化が含まれることを示唆している。

第4章で明らかになったように、ferredoxin結合性サブユニットをコードする*psaD*は*N. sylvestris*のPSI核遺伝子群の中で最も素早い光応答をRNAレベル並びにタンパク質レベルで示す。遺伝子発現の環境変化に対する素早い反応には転写後の制御が行われている場合がある(Thompson and White, 1991; Green, 1993)。そこでこの章では*psaD*の転写、mRNAの安定性、翻訳のどの段階で光誘導が行われるのかをトランスジェニックタバコを用いて調べることにした。

## 材料及び方法

### プラスミドの構築

概略は図5-1に示した。

### *psaD*::GUS

yaDG20(2章参照)の2kbpのFokI断片(-2080から+24までを含む)をKlenow酵素で平滑末端に

し、pBI221(Jefferson et al., 1987)のBamHI部位(Klenow酵素で平滑末端にした)へ導入した。CaMV 35S7'プロモーター領域を含む領域をExonuclease IIIを用いて除去し再び連結した。得られたクローンの部分塩基配列を決定し導入した断片の両端を確認した後、得られたキメラGUS遺伝子全体を含むEcoRI-HindIII断片をpBI101のEcoRI-HindIIIへ導入し、同時にpBI101に含まれていたプロモーターGUS遺伝子を除いた。

#### CaMV::*psaDb*

pBI121からGUSをコードするSmaI-SacI断片を除きpBI121Gを作成した。*psaDb*の+1から+861の領域をPCRにより増幅しpBluescriptのXbaI部位にサブクローニングし、挿入断片の全塩基配列を確認した。得られたクローンをXbaIで切断し、*psaDb*を含む断片をpBI121GのXbaI部位へ挿入した。

#### CaMV::GUS

pBI121に含まれているものをそのまま用いた。

#### CaMV::*psaDb*-GUS'

2つのオリゴDNA (5'-CTAGACTTCTCTCAATCCAACCTTTTCTATGGCCATGGCAC-3'), (5'-GATCGTGCCATGGCCATAGAAAGTTGGATTGAGAGAAGT-3')をアニリングしpBI221のXbaI-BamHI部位へ挿入した。挿入した領域の塩基配列を確認した後、得られた融合遺伝子を含むEcoRI-HindIII断片をpBI101のEcoRI-HindIII部位へ導入し、同時にpBI101に含まれていたGUS遺伝子を除いた。

#### CaMV::GUS'

2つのオリゴDNA (5'-CTAGATGGCTATGGCTC-3'), (5'-GATCGAGCCATAGCCAT-3')を用いてCaMV::*psaDb*-GUS'の構築と同様にして作成した。

#### Tiプラスミドを用いたタバコへの遺伝子導入

タバコの培養はすべて25°C、蛍光灯の連続照明(20 μE/m<sup>2</sup>s)下で行った。無菌的に育成したタバコ(*Nicotiana tabacum* SR1 cv Petite Havana)の葉を1-2cm角の切片にし、終夜培養したアグロバクテリウム(*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404)とMS104培地(Horsch et al., 1988)(ただし寒天は

INA Agar (Funakoshi, BA-30)を用いた)、NAAの代わりに3-indolacetic acid(Wako, Osaka)を用いた)上で2-3日間共存培養した。葉片をMS液体培地で懸濁し余分なバクテリアを除いてから、MS104培地(500 $\mu$ g/ml Claforan (Hoechst Japan Inc., Tokyo)を含む)へ植え継いだ。4-5日後、葉片をMS液体培地(100 $\mu$ g/ml kanamycinを含む)で懸濁した後、MS104培地(400 $\mu$ g/ml Claforan、100 $\mu$ g/ml kanamycinを含む)へ植え継いだ。1-2週間に一度MS104(300-100 $\mu$ g/ml Claforan、100 $\mu$ g/ml kanamycinを含む)へ植え継ぎ、シュートを再生させた。独立に得られたシュートをMS0培地(100 $\mu$ g/ml Claforan、100 $\mu$ g/ml kanamycinを含む)に移した。シュート形成後、正常な外観を示す個体のなかからMS0培地(100 $\mu$ g/ml Claforan、100 $\mu$ g/ml kanamycinを含む)で植え継いでから2週間以内に発根したのを6-8個体ずつ選びさらに解析を進めた。発根した個体は温室(25°C)に移して開花させた。

T1世代のハコを2つに分けて、それぞれをMS寒天培地(3% ショ糖、100  $\mu$ g/ml kanamycin、100  $\mu$ g/ml Claforan)を含む培養容器(Sigma, Magenta GA7)へ植え接ぎ、25°C、蛍光灯の連続照明(20  $\mu$ E/m<sup>2</sup>s)下で2-3週間育てた。その後4日間暗処理を行い、2つに分けた内の片方から葉(3-6 cm)を緑色安全光のもとで収穫し即座に液体窒素中に投入し-80°Cで保存した。もう一方は暗処理後白色光(70  $\mu$ E/m<sup>2</sup>s)を8時間照射し葉(3-6cm)を収穫した。T2世代を用いた場合は、独立に得た形質転換個体のT1世代の種子を無菌的に採集し、寒天培地(1/2xMS 無機塩類、カナマイシン100 $\mu$ g/mlを含む)に播種した。発芽促進のために一夜白色光(70  $\mu$ E/m<sup>2</sup>s)を照射し、その後暗所または白色光(70  $\mu$ E/m<sup>2</sup>s)のもとに6日間置き、生じた芽生え(50-500個体)の上半分(寒天から露出している部分)を収穫し凍結保存した。

凍結した葉組織をMikro-Dismembrator II (B.Braun Japan Inc., Tokyo) を用いて破碎し再び-80°Cで保存した。得られた凍結破碎標品から、可溶性タンパク質及び/あるいは全RNAを抽出した(以下参照)。GUS活性の見られなかった個体、あるいはグライマ-伸長法の結果形質転換体特異的なシグナルが検出出来なかった個体を除いて統計解析を行った。

## GUSアッセイ

凍結破碎標品からJeffersonらの方法により可溶性タンパク質を抽出しGUSアッセイを行った (Jefferson et al., 1987). 抽出した標品に含まれるタンパク質濃度をBradford法(Bradford, 1976)により測定し、GUS活性をタンパク質濃度当たりの値で表した。

## RNAの抽出とRNAの解析

全RNAは第4章と同様の方法で抽出した。プライマー伸長法は2章と同様に行った。タバコ葉より得た全RNA 10 µgを、*psaDb*特異的プライマー (5'-GGGCGACGACACGGGGATCGGCTGTTTCGAGGTG-3') または *uidA* (GUS遺伝子) 特異的プライマー (5'-GTCGAGTTTTTTGATTTTCACGGGTTGGGGT TTCTA-3') を  $^{32}\text{P}$  で末端標識したものの  $1 \times 10^5$  cpm (約10 fmol) とを S1 ハイブリダイゼーションバッファー中で 30 °C で一夜ハイブリダイズさせた後、第2章と同様にプライマー伸長反応、電気泳動を行った。泳動後オートラジオグラフィを行い、各バンドの放射活性をFUJIX BAS2000 (Fuji Photo Film, Tokyo) を用いて解析した。

## 結果

### *psaDb* キメラ遺伝子の構築

*psaDb* の転写、転写後の光制御を調べるために図5-1にあるようなキメラ遺伝子を構築した。まず *psaDb* の転写産物の安定性が光によって変化するかどうかをみるために、光の影響を受けない CaMV 35S 7' プロモーターの支配下に *psaDb* の転写領域を置いた (CaMV::*psaDb*)。そして光による転写の活性化が起こるかどうかを調べるために *psaDb* の 7' プロモーターを含む -1728 から +24 までの領域の下流に GUS 5' -ター遺伝子を接続した (*psaDb*::GUS)。また翻訳開始の頻度を調節するとすれば、5' リーダー領域か開始コドンの周辺であると考えられるので、*psaDb* の開始コドンを含む +1 から +35 までの領域を GUS 5' -ター遺伝子に in frame で接続した (CaMV::*psaDb*-GUS)。この結果 GUS タンパク質の N-末端に 127 ミノ酸が付加される (この長くなった

GUSタンパク質をGUS'で表した)。この付加に由来してGUSの比活性やタンパク質の代謝速度が変化する可能性があるので、GUS'を持つコントロールも用意した(図5-1B, CaMV::GUS')。これらのキメラ遺伝子をタバコに導入し形質転換体を作成した。

#### psaDb転写産物の安定性への光の影響

まず *psaDb* の転写産物の安定性が光によって変化するかどうかを調べた。導入遺伝子の転写産物の同定をプライマー伸長法により行った(図5-2)。 *psaDb* プライマーを用いると、 *N. tabacum* の非転換体(SR1)で *N. sylvestris* の *psaDb* mRNAと同じ長さの伸長産物を生じる。タバコ *N. tabacum* は *N. sylvestris* 由来のゲノムを持つので、この伸長産物は *N. sylvestris* の *psaDb* に相当する *N. tabacum* の遺伝子産物のシグナルであると思われる。この遺伝子は *N. sylvestris* の場合と同様に光誘導を受けていた(図5-2, SR1 D, SR1 L)。CaMV::*psaDb* の形質転換体では転換体特異的なシグナルが強く現れているが、このシグナルは光照射による変動は見られなかった(図5-2, CaMV::*psaDb* D, CaMV::*psaDb* L)。また *psaDb* に対応する遺伝子の発現は、 *psaDb* を高発現する転換体(CaMV::*psaDb*)でも非転換体(SR1)と変わりなく起こっていたので *psaDb* の遺伝子発現に関してmRNAレベルでのフィードバック制御は起こっていないことがわかる。コントロールのCaMV::GUSの形質転換体では転換体特異的なシグナルは光照射によって減少している(図5-2右のバネ)。プライマー伸長法による解析を5個体ずつ行い、導入遺伝子のmRNA量を定量した所、 *psaDb* 転写産物の安定性は光による変化を受けないことが明らかになった(図5-3)。コントロールとして用いたCaMV::GUSでは明所でmRNA量が減少しているため、GUS mRNAは暗所に比べると明所では不安定なようである。同様の結果はElliottらら(1989)、BichlerとHerrmann(1990)によっても得られている。

#### psaDbプロモーターの光応答

次に *psaDb*::GUS の光応答能を調べた。GUSタンパク質は *in vivo* で非常に安定であるため、形質転換世代でのGUS活性はmRNA量の変動にはなかなか一致しない(データは省略)。そこでGUS活性を指標に遺伝子発現を解析する実験はT2世代の芽生えを用いることにした。

図5-4に示されているように、コントロールのCaMV::GUSでは光照射によってややGUS活性が減少したが、これに対して*psaDb*::GUSでは光処理によってGUS活性は増加した。このことから*psaDb*の-1728から+24までの領域に光応答領域があることがわかる。この領域には転写される配列も含まれているが、図5-3に示されているように*psaDb* mRNAは転写後の光誘導は受けないので、これは転写及び／あるいは翻訳レベルで誘導されていることがわかる。

### *psaDb*の翻訳制御

翻訳レベルでの光調節があるかどうかをCaMV::*psaDb*-GUS' 遺伝子を用いて調べた。図5-5に示されているように、*psaDb*との融合遺伝子を持つ転換体は光によってGUS活性に変化はなかったため、*psaDb*の翻訳開始頻度は光制御を受けていないことがわかった。従って*psaDb*::GUS遺伝子で見られた光応答(図5-4)は転写レベルで行われていることが明らかになった。

コントロールのCaMV::GUS' 遺伝子はCaMV::*psaDb*-GUS遺伝子と同じく光応答能は無いが(図5-5)、GUS活性の絶対量は後者に比べると相当低い値であった(データは省略)。この理由として*psaDb*由来の配列に翻訳効率を高める働きがあるか、あるいは転写活性を高める働きがあると考えられる。そこで、定常状態における転換体でのGUS活性とmRNA量を比較し、翻訳効率を調べることにした。T1世代のトランスジェニックタバコを培地に植え継ぎ、連続照明下で培養し、培養容器の中で成熟した葉(3-6cm)から可溶性タンパク質と全RNAを抽出し、GUS活性とGUS mRNA量を測定した(図5-6)。その結果、*psaDb* mRNAの5'部分の配列を持つものはpBI121ベクターに含まれているGUS遺伝子(CaMV::GUS)と比べるとmRNAあたり73倍のGUS活性があった。そしてGUS'のアミノ酸配列をコードするコントロールのGUS遺伝子(CaMV::GUS')と比べると、*psaDb* mRNAの5'部分を持つことで(CaMV::*psaDb*-GUS')翻訳効率は14倍高まることが明らかになった。

## 考察

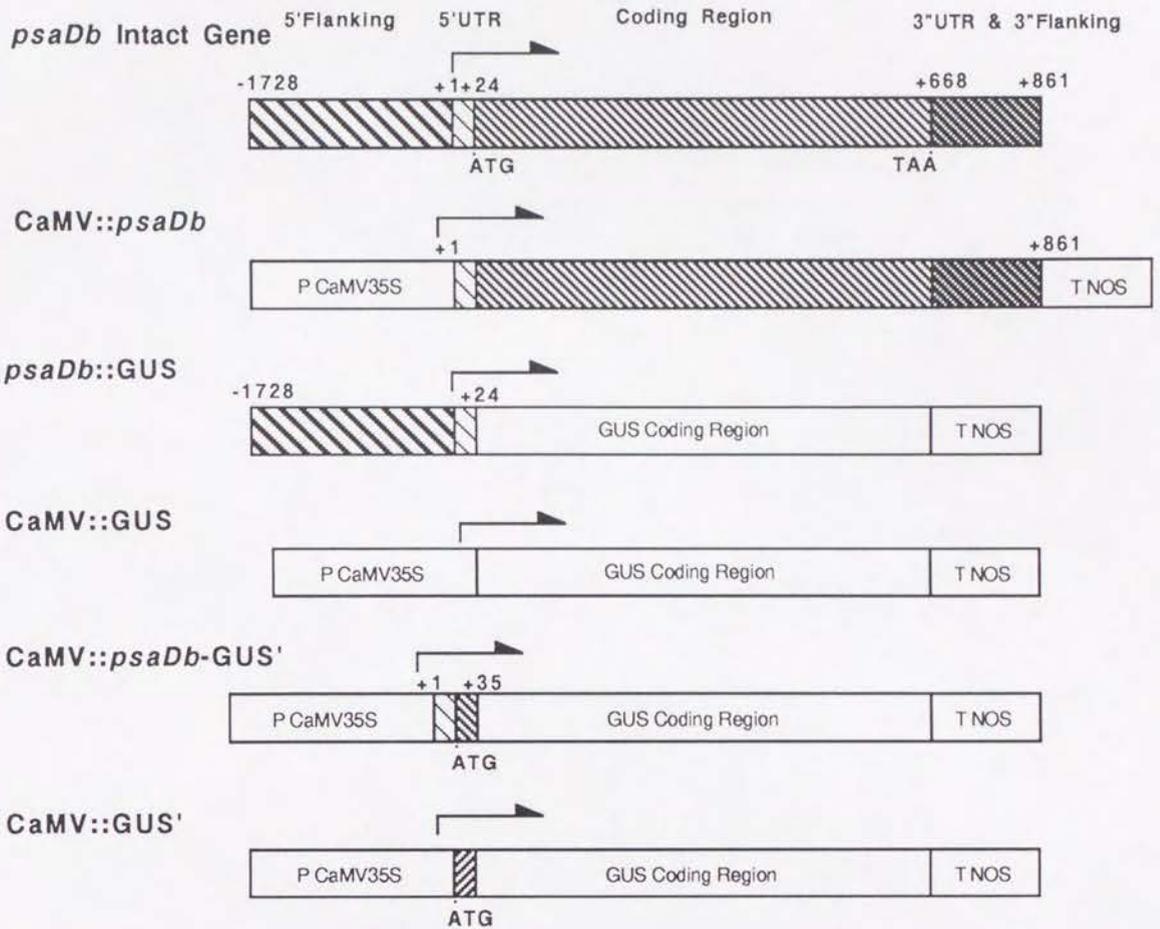
エンドウ *ferredoxin* 遺伝子 *fedA* の転写領域内には光応答領域があり、転写後のレベルで光制御を受けていると示唆されている (Dickey et al., 1992). 高等植物の *fedA* は一般に転写領域内に光応答領域を持つのか、あるいはそれはエンドウの *fedA* に限られたことなのかを見るために、ソイヌズナ の *fedA* で転写後の光制御が行われているかどうか調べられているが (Caspar and Quail, 1993; Vorst et al., 1993)、明確な結論は得られていない。光化学系 I の PSI-D サブユニットは *ferredoxin* と機能的に非常に近い関係にはあるものの、*psaDb* の遺伝子発現の光応答は転写レベルで行われており、mRNA の安定性や翻訳開始頻度は光の影響を受けないことが本章の結果から明らかになった。他の PSI サブユニットをコードする核遺伝子群については、光応答が *psaDb* より遅いのでやはり転写レベルでのみ光制御を受けているものと推察される。

翻訳レベルでの遺伝子発現調節は真核生物では数少ない例外を除いてほとんどわかっていない (Kozak, 1992) が、それに比べるとウイルスの RNA に関しては比較的よく調べられている。ある種の RNA の 5' 非翻訳領域には翻訳活性を高める働きがあることが、タバコモザイクウイルスゲノムや、アルファモザイクウイルス RNA 4、ブロムモザイクウイルス RNA 3、ポテト Xウイルス、タバコモザイクウイルスゲノムで示されている (Gallie, 1993)。宿主である高等植物がこれらウイルス RNA の 5' 非翻訳領域を認識し翻訳活性を高めていることは明らかであるが、どのような分子機構で行われているのかはわかっていない (Gallie, 1993)。本章の結果から、*N. sylvestris* の *psaDb* に翻訳活性を調節する配列がコードされていることが明らかになった (図 5-6)。このことはウイルス RNA だけでなく、高等植物のゲノムにコードされた遺伝子においても翻訳レベルでの発現調節が行われていることを示している。翻訳レベルでの発現調節は *amaranth* の *rbcS* においても知られている (Berry et al., 1990) が、高等植物での翻訳調節機構を解明するにはより多くの知見が必要であると思われる。

Caspar と Quail の報告 (1993) によると、ソイヌズナ *fedA* のプロモーターと 5' 非翻訳領域を含む領域と luciferase レポート遺伝子との融合遺伝子は光応答能を持つ。このとき 5' 非翻訳領域を欠失させた融合遺伝子は、光応答能は保たれていたが、発現量は大きく減少した。このことからソイヌズナ *fedA* の 5' 非翻訳領域には、光に依存しないで翻訳活性を高めるシ配列があると考

えられる。そこで、*N.sylvestris* *psaDb*の5'非翻訳領域を*Soybean* *fedA*のものを比較してみた(図5-7)。その結果両者に共通するモチーフ(5'Leader Motif, LM1及びLM2)が見いだされた。驚くべきことに、短い*psaDb*の5'非翻訳領域の半分以上の配列が*fedA*のものと共通に存在していた。*psaDb*は、ferredoxin結合部位であるPSI-Dサブユニットをコードしており(Bryant, 1992; Golbeck, 1993)、PSI-Dとferredoxinは機能的に非常に緊密な関係にある。従って両者はこれらのモチーフを通じて、協調的な遺伝子発現制御を翻訳レベルで受けるのかも知れない。

**A**



**B**

**CaMV::GUS**

TCTAGAGGATCCCCGGGTGGTCAGTCCCTTATGTTA-  
*r g s p g g q s / M L*

**CaMV::psaDb-GUS'**

TCTAGACTTCTCTCAATCCAACTTTTTCTATGGCCATGGCACGATCCCCGGGTGGTCAGTCCCTTATGTTA-  
 M A M A R S P G G Q S L M L

**CaMV::GUS'**

TCTAGAATGGCTATGGCTCGATCCCCGGGTGGTCAGTCCCTTATGTTA-  
 M A M A R S P G G Q S L M L

図5-1. タバコの形質転換に用いたキメラ遺伝子の模式図

(A) 詳細は「材料及び方法」に記載した。(B) 翻訳開始点付近の塩基配列とそこから翻訳されるポリペプチドのアミノ酸配列を示した。大文字のアミノ酸配列は実際に翻訳されるが、小文字の斜字で示した配列は翻訳されない。下線で示した塩基配列は*psaDb*に由来する。

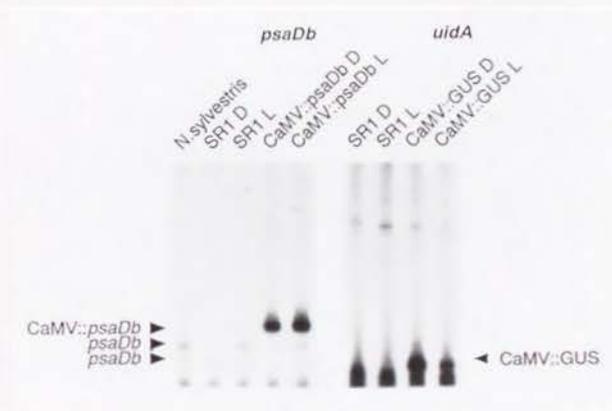


図5-2. 形質転換タバコでのmRNAの同定

図の上には示された材料の葉から得た全RNAと、*psaDb*特異的プライマー(*psaDb*)またはGUS遺伝子特異的プライマー(*uidA*)を用いてプライマー伸長法を行った。変性ゲルでの電気泳動後のオートラジオグラムを示す。1つの個体を2つに分け、「材料及び方法」に従い光(L)または暗(D)処理した。

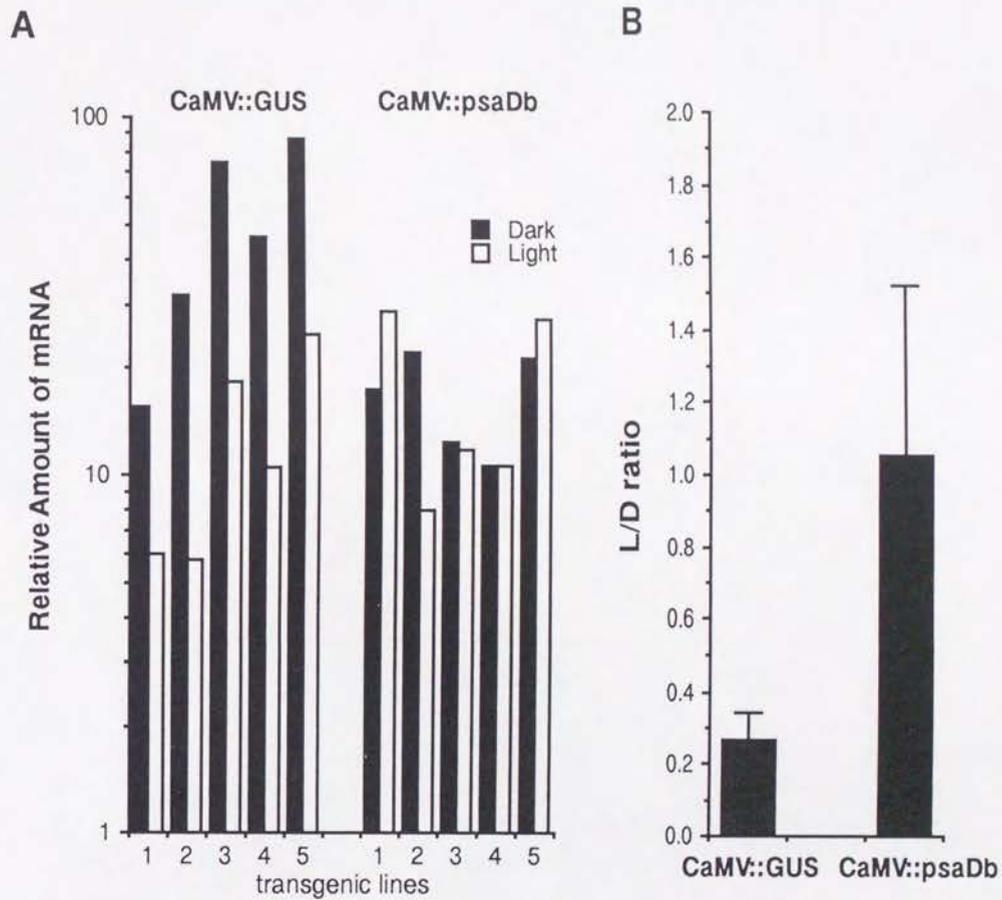


図5-3. *psaDb* mRNAの安定性は光による影響を受けない

(A) 図に示されたキメラ遺伝子を導入した形質転換タバコT1世代を、4日間暗処し(D)、その後8時間光照射した(L)。葉より全RNAを抽出し、プライマ-伸長法によりキメラ遺伝子の転写産物を定量した。(B) (A)の結果から各キメラ遺伝子の転写産物量のL/D比、標準偏差を算出した。

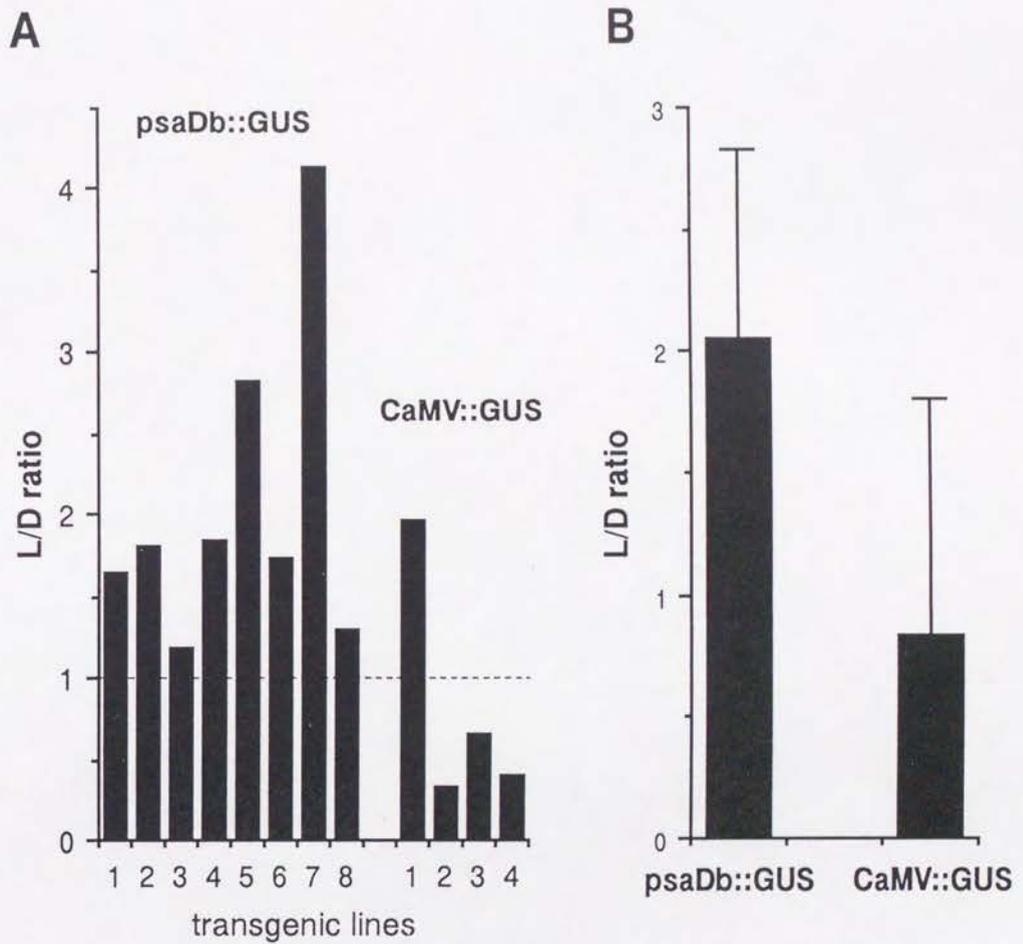


図5-4. *psaDb7* プロモータの光応答

(A) 図に示された導入遺伝子を持つ形質転換トウモロコシの種子(T2世代)を明所(L)または暗所(D)で6日間育て、GUS活性を測定した。(B) (A)の結果をもとにGUS活性のL/D比、標準偏差を算出した。

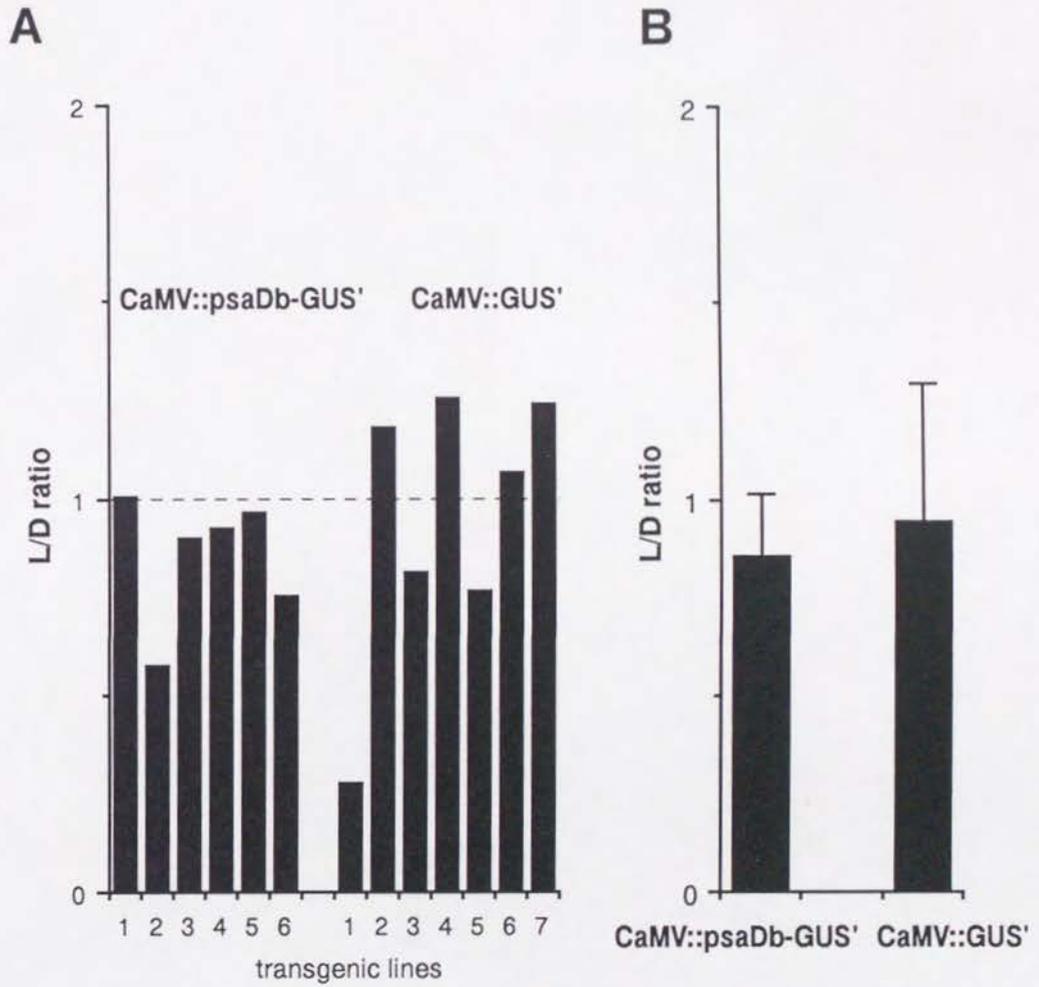


図5-5. *psaDb* mRNAの翻訳活性は光による影響を受けない

(A) 図に示された導入遺伝子を持つ形質転換カブチの種子(T2世代)を明所(L)または暗所(D)で6日間育て、GUS活性を測定した。(B) (A)の結果をもとにGUS活性のL/D比、標準偏差を算出した。

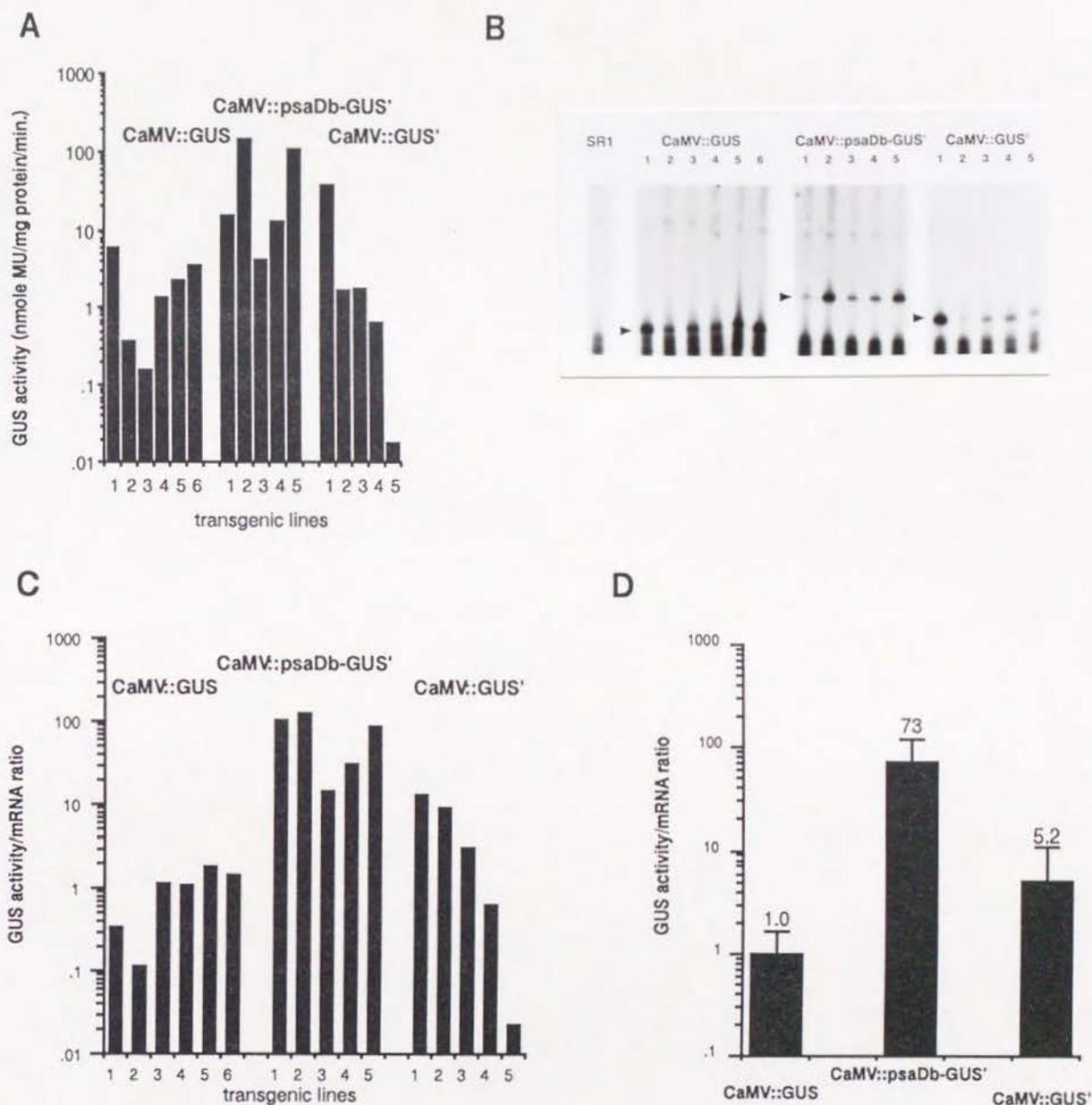


図5-6. *psaDb*転写産物の5'部分は翻訳効率を高める

(A) それぞれの形質転換体(T1世代)を蛍光灯の連続照明( $20 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ )下で培養し、定常状態での葉(3-6cm)でのGUS活性(MUは4-methylumbelliferonを表す)を測定した。(B) プライマ伸長法によりGUS mRNA量を定量した。(C) 各個体より得たGUS活性をGUS mRNA量で割り、CaMV::GUSの6個体の平均を1.0として相対値を算出した。(D) (C)の結果をもとにmRNA量に対するGUS活性の平均値と標準偏差を算出した。棒グラフ上の数値は平均値を示す。



## 結論

1. タバコ属 *Nicotiana sylvestris* の光化学系I複合体のPSI-Dサブユニットをコードする核遺伝子としては *psaDa*, *psaDb* の2コピーが半数体ゲノム中に存在し、その結果2種類のイ型タンパク質を生じる。これらの遺伝子は葉の成熟に伴って異なる様式で発現制御を受ける。また、いずれも光によって発現が活性化されるが、その反応の素早さは遺伝子コピーによって異なり、*psaDa* は他のPSIサブユニット遺伝子と協調して誘導されるが、*psaDb* はそれに比べるとより迅速な光応答を示す。また *psaE* 遺伝子群のなかでは、*psaEa* は緑葉中で光に依存した発現の活性化を行うが、*psaEb* の発現は光の影響を受けない。これらのことは、*psaD*, *psaE* 遺伝子群に含まれるそれぞれの遺伝子コピーは異なる発現様式をしており、光化学系I複合体の形成においてコピーごとに異なる役割を担っていることを示している。しかしながら、それぞれのイ型サブユニットを含む光化学系Iが異なる機能を持つのかどうかは今のところ明らかでは無い。

2. グリーニング時に *N. sylvestris* の光化学系Iサブユニット群 (PSI-A/B, PSI-C, PSI-D, PSI-E, PSI-H, PSI-L) は協調的に蓄積していく。このとき *psaD*, *psaE*, *psaH* の核遺伝子群もRNAレベルで調和のとれた光誘導を受けおり、共通の分子機構によって発現調節が行われていることが示唆される。その中で最も早い光応答をタンパク質レベル並びにRNAレベルで示す *psaDb* について、光によって影響を受けるのは転写、mRNAの安定性、翻訳のどの段階なのかを形質転換法を用いて調べた。その結果光制御を受けているのは転写活性だけであり、mRNAの安定性や翻訳活性は光の影響を受けないことが明らかになった。また、*psaDb* 転写産物の5'部分には翻訳活性を高める機能があり、LM1(TCTCAA)、LM2(CAACTTT)が翻訳活性を高めるシ配列であることが示唆された。

## 謝辞

本研究の遂行と取りまとめに終始懇切なる御指導を賜った京都大学理学部教授 辻英夫博士に心より感謝の意を表します。また北海道大学大学院地球環境科学研究科助教授 小保方潤一博士には本研究を行う機会を与えていただき、また本論文の完成に至るまで暖かい御指導と多大な御援助を頂きました、衷心より謝意を表します。有益な討論、御指導を賜った京都大学理学部 田中歩博士に深く感謝の意を表します。研究を行うに当たって貴重な材料の分譲をして頂いた大岡宏三博士(大阪大学)、杉浦昌弘教授(名古屋大学)、杉田護助教授(名古屋大学)、Henrik Vibe Scheller 教授(デンマーク王立獣医農業大学)、三上哲夫教授(北海道大学)、土岐精一博士(北海道大学)の各博士に謹んで感謝の意を表します。本研究には三上浩輝氏(北海道大学)、近藤由希子女史(北海道大学)、中邨真之氏(北海道大学)、林田信明博士(理化学研究所)、木村淳夫博士(北海道大学農学部)、井上和仁博士(神奈川大学)らの御協力、御助言を頂きました、深く感謝の意を表します。また $\alpha$ 形質転換の実験は一部北海道農業試験場で行われました。快く場所の提供をして頂き、また御指導して頂いた加藤明博士(北海道農業試験場)に謹んで謝意を表します。本研究は主に北海道大学遺伝子実験施設で行われました。同施設の利用に際し快く受け入れて頂いた北海道大学遺伝子実験施設長 高木信夫教授並びに前施設長 杉本和則教授に衷心より謝辞を表します。本研究をまとめるに当たって、御助言、活発な御討論を頂いた京都大学理学部 植物学教室 環境応答機構解析学講座の方々、並びに北海道大学 大学院地球環境科学研究科 生態環境科学専攻 生態遺伝学講座 小保方研究室、北海道大学遺伝子実験施設、北海道大学理学部 生物学科植物学専攻 細胞生物学講座の方々に深く感謝の意を表します。

## 引用文献

- Andersen B, Koch B and Scheller HV** (1992). Structural and functional analysis of the reducing side of photosystem I. *Physiol Plant* 84: 154-161.
- Andersen B, Scheller HV and Møller BL** (1992). The PSI-E subunit of photosystem I binds ferredoxin:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase. *FEBS Lett* 311: 169-173.
- Andreasson E, Svensson P, Weibull C and Albertsson P-Å** (1988). Separation and characterization of stroma and grana membranes-evidence for heterogeneity in antenna size of both photosystem I and photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 936: 339-350.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K** (1987). *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
- Berry JO, Breiding DE and Klessig DF** (1990). Light-mediated control of translational initiation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in amaranth cotyledons. *Plant Cell* 2: 795-803.
- Bichler J and Herrmann RG** (1990). Analysis of the promoters of the single-copy genes for plastocyanin and subunit  $\delta$  of the chloroplast ATP synthase from spinach. *Eur J Biochem* 190: 415-426.
- Bradford MM** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brunner H, Thümmler F, Song G and Rüdiger W** (1991). Phytochrome-dependent mRNA accumulation for nuclear coded photosystem I subunits in spinach seedlings. *J Photochem Photobiol B: Biol* 11: 129-138.
- Bryant DA** (1992). Molecular biology of photosystem I. In: Barber J (ed) *The photosystems: structure, function and molecular biology*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, pp. 501-549.
- Caspar T and Quail PH** (1993). Promoter and leader regions involved in the expression of the *Arabidopsis* ferredoxin A gene. *Plant J* 3: 161-174.

**Castresana C, Staneloni R, Malik SV and Cashmore AR** (1987). Molecular characterization of two clusters of genes encoding the Type I CAB polypeptides of PSII in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Mol Biol* 10: 117-126.

**Chitnis PR, Purvis D and Nelson N** (1991). Molecular cloning and targeted mutagenesis of the gene *psaF* encoding subunit III of photosystem I from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem* 266: 20146-20151.

**Chitnis PR, Reilly PA, Miedel MC and Nelson N** (1989). Structure and targeted mutagenesis of the gene encoding 8-kDa subunit of photosystem I from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem* 264: 18374-18380.

**Chitnis PR, Reilly PA and Nelson N** (1989). Insertional inactivation of the gene encoding subunit II of photosystem I from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem* 264: 18381-18385.

**Chitnis VP, Xu Q, Yu L, Golbeck JH, Nakamoto H, Xie D-L and Chitnis PR** (1993). Targeted inactivation of the gene *psaL* encoding a subunit of photosystem I of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem* 268: 11678-11684.

**Chomczynski P and Sacchi N** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.

**Deng X-W and Gruissem W** (1987). Control of plastid gene expression during development: the limited role of transcriptional regulation. *Cell* 49: 379-387.

**Dickey LF, Gallo-Meagher M and Thompson WF** (1993). Ferredoxin gene expression and its regulation by light. In: Verma DPS (ed) *Control of plant gene expression*. CRC Press, Inc., Florida, pp. 211-222.

**Elliott RC, Dickey LF, White MJ and Thompson WF** (1989). *cis*-acting elements for light regulation of pea ferredoxin I gene expression are located within transcribed sequences. *Plant Cell* 1: 691-698.

**Erlich HA** (1989). *PCR technology*. Stockton Press, New York.

**Flieger K, Oelmüller R and Herrmann RG** (1993). Isolation and characterization of cDNA clones encoding a 18.8 kDa polypeptide, the product of the gene *psaL*, associated with photosystem I reaction center from spinach. *Plant Mol Biol* 22: 703-709.

**Flieger K, Tyagi A, Sopory S, Cseplö A, Herrmann RG and Oelmüller R** (1993). A 42 bp promoter fragment of the gene for subunit III of photosystem I (*psaF*) is crucial for its activity. *Plant J* 4: 9-17.

**Fluhr R and Chua N-H** (1986). Developmental regulation of two genes encoding ribulose-bisphosphate carboxylase small subunit in pea and transgenic petunia plants: Phytochrome response and blue-light induction. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2358-2362.

**Franzén L-G, Frank G, Zuber H and Rochaix J-D** (1989). Isolation and characterization of cDNA clones encoding the 17.9 and 8.1 kDa subunits of photosystem I from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol* 12: 463-474.

**Gallie DR** (1993). Posttranscriptional regulation of gene expression in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 44: 77-105.

**Gallo-Meagher M, Sowinski DA, Elliott RC and Thompson WF** (1992). Both internal and external regulatory elements control expression of the pea *Fed-1* gene in transgenic tobacco. *Plant Cell* 4: 389-395.

**Gilmartin PM, Memelink J, Hiratsuka K, Kay SA and Chua N-H** (1992). Characterization of a gene encoding a DNA binding protein with specificity for a light-responsive element. *Plant Cell* 4: 839-849.

**Girard-Bascou J, Choquet Y, Schneider M, Delosme M and Dron M** (1987). Characterization of a chloroplast mutation in the *psaA2* gene of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet* 12: 489-495.

**Golbeck JH** (1987). Structure, function and organization of the photosystem I reaction center complex. *Biochim Biophys Acta* 895: 167-204.

**Golbeck JH** (1992). Structure and function of photosystem I. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 293-324.

**Green BR, Pichersky E and Kloppstech K** (1991). Chlorophyll *a/b*-binding proteins: an extended family. *Trends Biochem Sci* 16: 181-186.

**Green PJ** (1993). Control of mRNA stability in higher plants. *Plant Physiol* 102: 1065-1070.

**Green PJ, Yong M-H, Cuozzo M, Kano-Murakami Y, Silverstein P and Chua N-H** (1988). Binding site requirements for pea nuclear protein factor GT-1 correlate with sequences

required for light-dependent transcriptional activation of the *rbcS-3A* gene. *EMBO J* 7: 4035-4044.

**Grob U and Stüber K** (1987). Discrimination of phytochrome dependent light inducible from non-light inducible plant genes. Prediction of a common light-responsive element (LRE) in phytochrome dependent light inducible plant genes. *Nucleic Acids Res* 15: 9957-9973.

**Gruissem W and Tonkyn JC** (1993). Control mechanisms of plastid gene expression. *Crit Rev Plant Sci* 12: 19-55.

**Hase T, Kimata Y, Yonekura K, Matsumura T and Sakakibara H** (1991). Molecular cloning and differential expression of the maize ferredoxin gene family. *Plant Physiol* 96: 77-83.

**Hayashida N, Izuchi S, Sugiura M and Obokata J** (1992). Nucleotide sequence of cDNA clones encoding the PSI-H subunit of photosystem I in tobacco. *Plant Cell Physiol* 33: 1031-1034.

**Herrmann RG, Oelmüller R, Bichler J, Schneiderbauer A, Steppuhn J, Wedel N, Tyagi AK and Westhoff P** (1991). The thylakoid membrane of higher plants: genes, their expression and interaction. In: Herrmann RG and Larkins B (ed) *Plant Molecular Biology 2*. Plenum Press, New York, pp. 411-427.

**Hippler M, Ratajczak R and Haehnel W** (1989). Identification of the plastocyanin binding subunit of photosystem I. *FEBS Lett* 250: 280-284.

**Hoffman NE, Pichersky E, Malik VS, Ko K and Cashmore AR** (1988). Isolation and sequence of a tomato cDNA clone encoding subunit II of the photosystem I reaction center. *Plant Mol Biol* 10: 435-445.

**Horsch RB, Fry J, Hoffmann N, Neidermeyer J, Rogers SG and Fraley RT** (1988). Leaf disc transformation. In: Gelvin SB, Schilperoort RA and Verma DPS (ed) *Plant molecular biology manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, A5: pp. 1-9.

**Iwasaki Y, Sasaki T and Takabe T** (1990). Sequencing and expression of the gene that encodes a 20-kDa polypeptide of the PS I complex from cucumber cotyledon. *Plant Cell Physiol* 31: 871-879.

**Jefferson RA, Kavanagh TA and Bevan MW** (1987). GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*. 6: 3901-3907.

**Jofuku KD and Goldberg RB** (1988). Analysis of plant gene structure. In: Chaw CH (ed) *Plant Molecular Biology*. IRL Press, Oxford, pp. 37-66.

**Katagiri F and Chua N-H** (1992). Plant transcription factors: present knowledge and future challenges. *Trends Genet* 8: 22-27.

**Kelly JL, Greenleaf AL and Lehman IR** (1986). Isolation of the nuclear gene encoding a subunit of the yeast mitochondrial RNA polymerase. *J Biol Chem* 261: 10348-10351.

**Kjærulff S, Andersen B, Nielsen VS, Møller BL and Okkels JS** (1993). The PSI-K subunit of photosystem I from barley (*Hordeum Vulgare* L.): Evidence for a gene duplication of an ancestral PSI-G/K gene. *J Biol Chem* 268: 18912-18916.

**Kjærulff S and Okkels JS** (1993). Cloning and sequencing of a full-length cDNA clone encoding the PSI-D subunit of photosystem I from barley. *Plant Physiol* 101: 335-336.

**Klein RR and Mullet JE** (1986). Regulation of chloroplast-encoded chlorophyll-binding protein translation during higher plant chloroplast biogenesis. *J Biol Chem* 261: 11138-11145.

**Knoetzel J and Simpson DJ** (1993). The primary structure of a cDNA for *PsaN*, encoding an extrinsic luminal polypeptide of barley photosystem I. *Plant Mol Biol* 22: 337-345.

**Kozak M** (1992). Regulation of translation in eukaryotic systems. *Annu Rev Cell Biol* 8: 197-225.

**Kreuz K, Dehesh K and Apel K** (1986). The light-dependent accumulation of the P700 chlorophyll *a* protein of the photosystem I reaction center in barley. *Eur J Biochem* 159: 459-467.

**Krupinska K and Apel K** (1989). Light-induced transformation of etioplasts to chloroplasts of barley without transcriptional control of plastid gene expression. *Mol Gen Genet* 219: 467-473.

**Kuhlemeier C, Fluhr R, Green PJ and Chua N-H** (1987). Sequences in the pea *rbcS-3A* gene have homology to constitutive mammalian enhancers but function as negative regulatory elements. *Genes Dev* 1: 247-255.

**Kung SD, Zhu YS and Shen GF** (1982). *Nicotiana* chloroplast genome III. Chloroplast DNA evolution. *Theor Appl Genet* 61: 73-79.

**Lagoutte B** (1988). Cloning and sequencing of spinach cDNA clones encoding the 20 kDa PS I polypeptide. *FEBS Lett* 232: 275-280.

**Lagoutte B and Vallon O** (1992). Purification and membrane topology of PSI-D and PSI-E, two subunits of the photosystem I reaction center. *Eur J Biochem* 205: 1175-1185.

**Lam E and Chua N-H** (1990). GT-1 binding site confers light responsive expression in transgenic tobacco. *Science* 248: 471-474.

**Li N, Zhao J, Warren PV, Warden JT, Bryant DA and Golbeck JH** (1991). PsaD is required for the stable binding of PsaC to the photosystem I core protein of *Synechococcus* sp. PCC 6301. *Biochemistry* 30: 7863-7872.

**McGrath JM, Terzaghi WB, Sridhar P, Cashmore AR and Pichersky E** (1992). Sequence of the fourth and fifth photosystem II type I chlorophyll *a/b*-binding protein genes of *Arabidopsis thaliana* and evidence for the presence of a full complement of the extended CAB gene family. *Plant Mol Biol* 19: 725-733.

**Mühlenhoff U, Haehnel W, Witt H and Herrmann RG** (1993). Genes encoding eleven subunits of photosystem I from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp. *Gene* 127: 71-78.

**Münch S, Ljungberg U, Steppuhn J, Schneiderbauer A, Nechushtai R, Beyreuther K and Herrmann RG** (1988). Nucleotide sequences of cDNAs encoding the entire precursor polypeptides for subunits II and III of the photosystem I reaction center from spinach. *Curr Genet* 14: 511-518.

**Nakamura M and Obokata J** (1994). Organization of a *psaH* gene family of photosystem I in *Nicotiana sylvestris*. *Plant Cell Physiol* (in press)

**Nechushtai R and Nelson N** (1985). Biogenesis of photosystem I reaction center during greening of oat, bean and spinach leaves. *Plant Mol Biol* 4: 377-384.

**Neuhaus G, Bowler C, Kern R and Chua N-H** (1993). Calcium/calmodulin-dependent and -independent phytochrome signal transduction pathways. *Cell* 73: 937-952.

**Obokata J, Mikami K, Hayashida N, Nakamura M and Sugiura M** (1993). Molecular heterogeneity of photosystem I: *psaD*, *psaE*, *psaF*, *psaH* and *psaL* are all present in isoforms in *Nicotiana* spp. *Plant Physiol* 102: 1259-1267.

**Obokata J, Mikami K, Hayashida N and Sugiura M** (1990). Polymorphism of a photosystem I subunit caused by allopolyploidy in *Nicotiana*. *Plant Physiol* 92: 273-275.

**Obokata J, Mikami K, Yamamoto Y and Hayashida N** (1994). Microheterogeneity of PSI-E subunit of photosystem I in *Nicotiana sylvestris*. *Plant Cell Physiol* (in press)

**Obokata J, Yamamoto Y, Kubota T and Nakamura M** (1992). Structure of the nuclear genes coding for photosystem I subunits in *Nicotiana glauca*. In: Murata N (ed) Research in Photosynthesis. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, III: pp. 367-370.

**Oh-oka H, Takahashi Y and Matsubara H** (1989). Topological considerations of the 9-kDa polypeptide which contains centers A and B, associated with the 14- and 19-kDa polypeptides in the photosystem I complex of spinach. *Plant Cell Physiol* 30: 869-875.

**Ohashi K, Tanaka A and Tsuji H** (1989). Formation of the photosynthetic electron transport system during the early phase of greening in barley leaves. *Plant Physiol* 91: 409-414.

**Okkels JS, Jepsen LB, Hønberg LS, Lehmbeck J, Scheller HV, Brandt P, Høyer-Hansen G, Stummann B, Henningsen KW, von Wettstein D and Møller BL** (1988). A cDNA clone encoding a 10.8 kDa photosystem I polypeptide of barley. *FEBS Lett* 237: 108-112.

**Okkels JS, Nielsen VS, Scheller HV and Møller BL** (1992). A cDNA clone from barley encoding the precursor from the photosystem I polypeptide PSI-G: Sequence similarity to PSI-K. *Plant Mol Biol* 18: 989-994.

**Okkels JS, Scheller HV, Jepsen LB and Møller BL** (1989). A cDNA clone encoding the precursor for a 10.2 kDa photosystem I polypeptide of barley. *FEBS Lett* 250: 575-579.

**Okkels JS, Scheller HV, Svendsen I and Møller BL** (1991). Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an 18-kDa hydrophobic photosystem I subunit (PSI-L) from barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Biol Chem* 266: 6767-6773.

**Pauncz Y, Gepstein S and Horwitz BA** (1992). Photocontrol of the accumulation of plastid polypeptides during greening of tomato cotyledons. *Plant Physiol* 100: 1934-1939.

**Perisic O and Lam E** (1992). A tobacco DNA binding protein that interacts with a light-responsive box II element. *Plant Cell* 4: 831-838.

**Piechulla B, Pichersky E, Cashmore AR and Gruissem W** (1986). Expression of nuclear and plastid genes for photosynthesis-specific proteins during tomato fruit development and ripening. *Plant Mol Biol* 7: 367-376.

**Reilly P, Hulmes JD, Pan Y-CE and Nelson N** (1988). Molecular cloning and sequencing of the *psaD* gene encoding subunit II of photosystem I from the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem* 263: 17658-17662.

**Rousseau F, Sétif P and Lagoutte B** (1993). Evidence for the involvement of PSI-E subunit in the reduction of ferredoxin by photosystem I. *EMBO J* 12: 1755-1765.

**Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T** (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

**Scheller HV, Okkels JS, Høj PB, Svendsen I, Roepstorff P and Møller BL** (1989). The primary structure of a 4.0-kDa photosystem I polypeptide encoded by the chloroplast *psaI* gene. *J Biol Chem* 264: 18402-18406.

**Smart LB, Anderson SL and McIntosh L** (1991). Targeted genetic inactivation of the photosystem I reaction center in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *EMBO J* 10: 3289-3296.

**Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ and Klenk DC** (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85.

**Steppuhn J, Hermans J, Nechushtai R, Herrmann GS and Herrmann RG** (1989). Nucleotide sequences of cDNA clones encoding the entire precursor polypeptide for subunit VI and of the plastome-encoded gene for subunit VII of the photosystem I reaction center from spinach. *Curr Genet* 16: 99-108.

**Steppuhn J, Hermans J, Nechushtai R, Ljungberg U, Thümmel F, Lottspeich F and Herrmann RG** (1988). Nucleotide sequence of cDNA clones encoding the entire precursor polypeptides for subunits IV and V of the photosystem I reaction center from spinach. *FEBS Lett* 237: 218-224.

**Takabe T, Takabe T and Akazawa T** (1986). Biosynthesis of P700-chlorophyll *a* protein complex, plastocyanin, and cytochrome *b<sub>6</sub>/f* complex. *Plant Physiol* 81: 60-66.

**Takahashi Y, Goldschmidt-Clermont M, Soen S-Y, Franzén LG and Rochaix J-D** (1991). Directed chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii*: insertional inactivation of the *psaC* gene encoding the iron sulfur protein destabilizes photosystem I. *EMBO J* 10: 2033-2040.

**Takahashi Y, Hase T, Wada K and Matsubara H** (1983). Ferredoxins in developing spinach cotyledons: the presence of two molecular species. *Plant Cell Physiol* 24: 189-198.

**Thompson WF and White MJ** (1991). Physiological and molecular studies of light-regulated

nuclear genes in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42: 423-466.

**Vierling E and Alberte RS** (1983). Regulation of synthesis of the photosystem I reaction center. *J Cell Biol* 97: 1806-1814.

**Vorst O, Dam Fv, Weisbeek P and Smeekens S** (1993). Light-regulated expression of the *Arabidopsis thaliana ferredoxin A* gene involves both transcriptional and post-transcriptional processes. *Plant J* 3: 793-803.

**Wellburn AR and Hampp R** (1979). Appearance of photochemical function in prothylakoids during plastid development. *Biochem Biophys Acta* 547: 380-397.

**Wynn RM and Malkin R** (1988). Interaction of plastocyanin with photosystem I: A chemical cross-linking study of the polypeptide that binds plastocyanin. *Biochemistry* 27: 5863-5869.

**Yamamoto Y, Tsuji H, Hayashida N, Inoue K and Obokata J** (1991). Nucleotide sequence of cDNA clones encoding PSI-D2 protein of photosystem I in *Nicotiana sylvestris*. *Plant Mol Biol* 17: 1251-1254.

**Yamamoto Y, Tsuji H and Obokata J** (1993). Structure and expression of a nuclear gene for the PSI-D subunit of photosystem I in *Nicotiana sylvestris*. *Plant Mol Biol* 22: 985-994.

**Yu L, Zhao J, Mühlhoff U, Bryant DA and Golbeck JH** (1993). PsaE is required for in vivo cyclic electron flow around photosystem I in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Plant Physiol* 103: 171-180.

**Zanetti G and Merati G** (1987). Interaction between photosystem I and ferredoxin. *Eur J Biochem* 169: 143-146.

**Zhao J, Warren PV, Li N, Bryant DA and Golbeck JH** (1990). Reconstitution of electron transport in photosystem I with PsaC and PsaD proteins expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 276: 175-180.

**Zilber AL and Malkin R** (1988). Ferredoxin cross-links to a 22 kD subunit of photosystem I. *Plant Physiol* 88: 810-814.

**Zilber AL and Malkin R** (1992). Organization and topology of photosystem I subunits. *Plant Physiol* 99: 901-911.