

氏 名 佐 藤 淳 子
 学位(専攻分野) 博士 (人間・環境学)
 学位記番号 人 博 第 73 号
 学位授与の日付 平成 11 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 人間・環境学研究科人間・環境学専攻
 学位論文題目 Studies of Selective Activation of Plastid Promoters in Higher Plants
 高等植物における葉緑体遺伝子プロモーターの選択的活性化についての研究

(主査)

論文調査委員 教授 豊島喜則 教授 池永満生 助教授 藤堂 剛

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、高等植物の葉緑体ゲノムにコードされた遺伝子の転写活性が光環境や細胞の成熟度に応答しながら遺伝子特異的に制御されていることを見出し、その分子機構について検討した結果を報告している。

葉緑体は地球上の生態系に大きな影響を与える光合成反応の場であり、光エネルギーの変換は光化学反応系をもつ2つのタンパク質複合体、光化学系I (PSI) と光化学系II (PSII) で行われる。これらの複合体、とりわけPSIIはその存在量が光をはじめとするさまざまな環境要因の変化に応答して変化し、光合成過程全体のエネルギーの供給と需要のバランスをとっている。光強度に応答して複合体の存在量が変化することは、それを構成するタンパク質の崩壊と合成が光により制御されていることを示している。

葉緑体は原核生物型の独自のゲノムとその発現系を持っているが、光の受容体は葉緑体にはなく、細胞膜あるいは細胞質中に存在することから、光による葉緑体ゲノム上の遺伝子の発現制御には、核遺伝子系を介するシグナル伝達機構が存在することが想像される。しかし、その実体は未だ明らかにされていない。

本論文では、コムギを対象に、転写段階での制御に焦点を合わせ、光による葉緑体psb遺伝子群 (PSII構成タンパク質をコードしている遺伝子群) の核遺伝子系を介しての発現制御機構の1つが明らかにされている。

本論文は5章からなるが、主題は第2章から第4章の3章で報告されている。第2章では、PSII複合体のコア部分の構成タンパク質のうち、D1、D2およびCP43の合成速度がコムギの芽生え中で光によって増加することをin organello翻訳実験によって明らかにしている。

第3章では、D2の合成速度の光依存性が転写レベルで制御されていることを明らかにし、さらに、転写の光応答挙動を詳細に調べた結果①～③を報告している。① D2の遺伝子であるpsbDのプロモータは光照射後30～60分の誘導期の後活性化される。②活性化に必要な光強度の閾値は $15 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であり、その後光強度に伴い活性が増加する。③光活性化には細胞質でのタンパク質合成が必要であり、核遺伝子系を介する葉緑体遺伝子の発現制御機構が存在することを示す。

第4章では、psb遺伝子群の転写活性が葉の生育状態や光環境によって遺伝子特異的に制御される分子機構についての研究結果が報告されている。葉緑体内で、psb遺伝子群を転写するRNAポリメラーゼ (RNAP) は原核生物型であり、それが認識するプロモータは転写開始点の上流35近傍と10近傍 (-35領域と-10領域と呼ぶ) に相同性の高い特徴的な配列を持っている。しかし、その塩基配列は各プロモータで少しずつ異なり、それが遺伝子ごとに転写活性を制御している主要因であると推測されていた。しかし、両者の関係についての具体的な因果関係は見出されていなかった。本研究では、4つのpsbプロモータを対象にその構造と活性の関係を調べると同時に、各プロモータに変異を導入し、それが活性に与える影響を調べることにより、葉緑体内で働くRNAPが光環境や葉の成熟度によって、プロモータ構造の認識性を変化させることを見出している。すなわち、葉の基部近くにある生育中の細胞で働くRNAPは、-35領域と-10領域に特徴的な配列を必要とし、

光条件に関係なく作動する。一方、葉の先端部の成熟した細胞で働くRNAPはpsbAとpsbDプロモータを特異的に認識するが、その活性は光によって誘導される。また、このRNAPは-35領域の配列を必要とせず、psbAでは-10領域のすぐ上流にあるTGNモチーフを、psbDでは50近傍にあるAATGとGACCの配列を認識し、それらが-35領域の代わりにすることを明らかにした。葉緑体中で働く原核生物型RNAPは葉緑体ゲノムにコードされている α 、 β 、 β' 、 β'' サブユニットから成るコア酵素と核ゲノムにコードされている σ サブユニット(σ 因子)から構成されている。 σ 因子の役割はプロモータを認識し、正しい位置からの転写を可能にすることであり、上記の結果は葉の生育度によって異なった σ 因子が使い分けられていることを示唆している。この発見は、葉緑体遺伝子の転写制御における核と葉緑体ゲノム間の情報伝達の実体の1つを明らかにしたものである。すなわち、RNAPを構成するサブユニットの中で、進化の過程で、唯一葉緑体から核に移行した σ 因子の遺伝子が細胞質で受けた情報を葉緑体遺伝子系に伝える仲立ちをしているという、全く新しい機構の存在を提唱したとも言える。

論文審査の結果の要旨

植物細胞中で光合成反応の場として働く葉緑体は原核生物型の独自のゲノムとその発現系を持っているが、葉緑体遺伝子の発現に関しては核遺伝子系との間の情報交換の重要性が指摘されており、その実体の解明に向けた研究が現在植物生理学の分野で活発に進められている。

本学位申請論文では、コムギ葉緑体psb遺伝子群(PS IIタンパク質をコードしている遺伝子)の転写に関して核遺伝子系を介する制御機構の1つが明らかにされている。本論文は5章から成り、第1章ではこの研究題目に関わるこれまでの諸研究の成果と問題点に触れ、当該研究の動機付けと目的が述べられている。第2章から第4章にかけて、申請者の研究成果が報告されており、第5章で全体の結論と将来への展望が記述されている。

葉緑体中での光エネルギー変換反応で中心的な役割を果たすものに光化学系II複合体(PS II)があり、その数は光の強度や概日リズムによって変化して、光合成反応全体のエネルギーの供給と需要のバランスをとっている。PS IIは20種以上のタンパク質から成るが、中心的な役割を果たすのはD1とD2タンパク質のヘテロダイマーであり、それにアンテナクロロフィルを結合しているCP43タンパク質等が結合してコアを形成している。

第2章では、D1とD2およびCP43の合成速度がコムギの芽生え中で光によって増加することをin organello翻訳実験によって明らかにした。この結果は、複合体の存在量の変化に対応して、実際に構成タンパク質の合成速度が光強度によって変化することを示したものであり、第3章以降の研究の基礎となっている。

第3章では、D2に焦点を合わせ、まず、その合成速度の光依存性が転写に起因することを見出している。ついで、転写の光応答挙動をin vitro転写系を用いて詳細に調べ、①D2の遺伝子psbDのプロモータは光照射後30-60分の誘導期の後活性化される、②活性化に必要な光強度の閾値は $15 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であり、その後光強度に伴い活性が増加する。③光活性化には細胞質でのタンパク質合成が必要であり、核遺伝子系を介する葉緑体遺伝子の発現制御機構が存在する、ことを明らかにした。この成果は、葉緑体遺伝子の光による転写制御の分子機構を明らかにする上での重要な手がかりを与え、第4章での展開につながるものである。

第4章では、psb遺伝子群の転写活性が葉の生育度や光環境によって遺伝子特異的に制御される機構の1つが明らかにされている。psb遺伝子群の転写に関わるプロモータは原核生物型であり、転写開始点の上流35近傍と10近傍(-35領域と-10領域と呼ぶ)にそれぞれ6塩基から成る相同性の高い配列を持っている。しかし、その配列は各プロモータで少しずつ異なり、それが遺伝子ごとの転写活性を調節している主要因であると推測されていた。しかし、本研究以前には両者についての具体的な因果関係は見出されていなかった。ここでは、まず、4つのpsbプロモータを対象にその塩基配列と転写活性の関係を詳細に調べ、次いで、それぞれのプロモータに変異を導入し、それが活性に与える影響を調べている。さらに、葉の成長に伴いプロモータ活性が遺伝子特異的に変化することを見出し、その解析から、葉緑体内で働くRNAPは光環境や葉の成熟度によって、認識できる塩基配列が変化することを明らかにした。すなわち、葉の基部近くにある生育中の細胞で働くRNAPは、-35領域と-10領域に特徴的な配列を必要とし、光条件に関係なく作動するが、一方、葉の先端部の成熟した細胞では上記のRNAPに代わり、psbAとpsbDを選択的に認識するRNAPが光により誘導されることを見出している。また、

このRNAPは、-35領域の配列を認識せず、それぞれ別の配列を認識することを明らかにした。RNAPは葉緑体ゲノムにコードされている4種のコアサブユニットと核ゲノムにコードされている σ サブユニット(σ 因子)から構成されているが、プロモータの認識は σ 因子が行う。これを考慮すると、上の結果は葉の成長に伴い異なった性質を持つ σ 因子が現れてくることを示している。この発見は、葉緑体遺伝子の転写制御における核から葉緑体遺伝子系への情報伝達を担う分子機構の1つをはじめて明らかにしたものと言える。

本研究の成果は、RNAPを構成するサブユニットの中で、進化の過程で、唯一葉緑体から核に移行した σ 因子の遺伝子が、細胞質で受けた情報を葉緑体遺伝子系に伝える仲立ちをしていると云う、新しい機構を実験事実に基づき提唱したものであり、国際的にも高い評価を受けている。

本申請者が所属する分子・生命環境論講座の目的の1つは、生命現象と環境の相関を分子レベルで追求していくことにあり、本研究は、この目的に沿ったものと言える。

よって本論文は博士(人間・環境学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成11年2月15日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果合格と認めた。