

氏 名	もり 森	しま 島	あきら 明
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)		
学位記番号	農 博 第 1056 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	農学研究科農林生物学専攻		
学位論文題目	STUDIES ON REGULATORY MECHANISM OF TRANSCRIPTIONAL EXPRESSION OF THE C ₄ -FORM PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLA-SE GENE IN MAIZE (トウモロコシC ₄ 型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子 の転写発現調節機構に関する研究) (主査)		
論文調査委員	教授 泉井 桂	教授 古澤 巖	教授 遠藤 隆

論 文 内 容 の 要 旨

C₄型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼは、トウモロコシの葉肉細胞においてC₄光合成の炭酸固定反応を触媒する酵素であり、その遺伝子 (*Ppc 1*) は非常に強く発現していることが知られている。本研究は*Ppc 1*の転写発現調節機構、特に光による転写調節機構の解明を目的として行なわれた。

初めに、種々の光条件下における*Ppc 1*の転写産物量の変化、並びに、経時的な*Ppc 1*の転写速度の変化を測定し、新たな知見を得た。次に、*Ppc 1*の転写制御を担う分子メカニズムの解明を目的として、転写調節因子の候補である核内因子 MNF 1 の分子的性質を、その認識する配列を中心として詳細に調べた。MNF 1 はタンパク質複合体であることが種々の知見から示唆されたため、併せて、その構成要素の解析を行なった。主な結果は、次の3点に要約される。

1. ノーザンハイブリダイゼーションを行ない、12時間明期/12時間暗期条件下における*Ppc 1*転写産物量の変動を調べ、トウモロコシにおいて、昼夜で転写産物量が大きく変動することを明かにした。次に、明暗条件下から連続明期もしくは連続暗期に移した後の*Ppc 1*転写産物量の変化を調べ、この消長が概日リズム依存的であることを明かにした。また、同条件下の経時的な転写速度の変化をrun-on法によって調べ、*Ppc 1*の転写速度も概日リズム依存的に変動しており、転写産物量の消長に寄与していることを明かにした。

2. 暗所栽培のトウモロコシに白色光パルスを与えると、*Ppc 1*プロモーター配列内の特定の領域に対するMNF 1の結合活性が一過的に高まることを見だし、この因子が光刺激依存的な転写調節に関与する可能性を示した。種々の合成DNAを用いたゲルシフト解析により、*Ppc 1*プロモーター配列内でMNF 1が最も強く結合する領域中、GTGCCCTT 8塩基対が厳密に認識され結合に関与していることを示した。更に、ゲルシフト解析、並びに、ランダムサイトセレクション法を用いた解析により、MNF 1は異なる2つの配列、GTGCC(A/T)(A/T)とCC(G/A)CCCを特異的に認識し結合することを明らかにし、先の知見を確認した。両配列は、光応答能を有する*Ppc 1*プロモーター配列中に高い頻度で見いだされ、予想された領域にMNF 1が結合することを確認した。ゲル濾過クロマトグラフィを用いた実験により、MNF 1の見かけの分子量は約1MDaであり、タンパク質複合体であることを示した。また、MNF 1のCC(G/A)CCCへの結合は10mMオルトフェナントロリンの添加により阻害されるが、GTGCC(A/T)(A/T)への結合は阻害されないことから、MNF 1中に少なくとも2つの異なるDNA結合ドメインが存在することを示唆した。

3. 上記の配列を認識する2つの異なるDNA結合因子が、トウモロコシ核抽出液中に存在することをゲルシフト解析により示した。UVクロスリンク法を用いて合成オリゴヌクレオチドで標識した因子をSDS-PAGE法により解析し、結合を担うと考えられる特定のタンパク質の分子量を、それぞれ200~230kDa及び60kDaと推定した。いずれも高等植物において未

同定のDNA結合因子であると考えられ、REB1及びECF1と命名した。様々な合成オリゴDNAをプローブもしくはコンペティターとして用いたゲルシフト解析により両因子の配列認識特異性を調べたところ、MNF1中に存在する2つのDNA結合ドメインの配列認識特異性と一致した。また、両因子の認識配列への結合に対するオルトフェナントロリンの阻害効果は、MNF1において認められた効果と一致した。更に、UVクロスリンク法を用いて標識したMNF1をSDS-PAGE法により解析し、両因子がMNF1中に含まれていることを示唆する知見を得た。

論文審査の結果の要旨

トウモロコシのC型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子 (*Ppc1*) は、ゲノムあたり1コピー存在し、葉組織において高レベルに発現している。また、そのmRNAの蓄積レベルで見た遺伝子発現は、フィトクロームを介する光調節を受け、維管束鞘細胞では認められず葉肉細胞特異的であることが知られている。これらの調節の分子機構は、未だ明らかになっていないが、植物体を用いた有用物質生産という観点からその解明が待たれている。本論文は、*Ppc1*の光刺激依存的転写調節の作用機構の解明を目的として行なわれた。評価すべき主な点は以下の通りである。

1. トウモロコシにおいて昼夜で*Ppc1*の転写産物量が変化しており、昼に高く夜に低い日周期的な調節がなされていることを示した。また、*Ppc1*転写産物量の変動は光刺激の有無のみに起因するものではなく、概日リズム依存的な調節によるものであることを初めて明かにした。更に、*Ppc1*の転写速度も概日リズム依存的に変動しており、*Ppc1*転写産物量の変動に寄与していることを初めて明かにした。また、暗所における*Ppc1*転写産物の速やかな分解機構の存在を示唆した。

2. 核内因子MNF1は、8塩基対GTGCCCTTを厳密に認識し結合することを明かにした。更に、MNF1が認識し結合する配列は、GTGCC(A/T)(A/T)及びCC(G/A)CCCと記述できることを明かにした。これらの配列認識を担う実体はタンパク質複合体MNF1中に存在する2つの異なるDNA結合因子であることを示唆した。両配列は、光応答に関与する*Ppc1*プロモーター配列中に高い頻度で存在した。最初にMNF1の結合配列として記述された繰り返し配列であるRS1を含まない、より転写開始点に近いDNA領域に対するMNF1の結合と、両エレメントの出現には相関が認められることを示唆した。

3. トウモロコシ核抽出液中にGTGCC(A/T)(A/T)配列及びCC(G/A)CCC配列を特異的に認識し結合する特定のタンパク質因子がそれぞれ別個に存在することを明かにし、それらの分子量を推定した。いずれも植物において新たに見いだされたDNA結合因子であると考えられる。両因子がタンパク質複合体MNF1中に含まれていることを示唆する知見を得た。

以下のように、本論文は、*Ppc1*の転写発現調節が光刺激に加えて概日リズム依存的であることを初めて明かにし、また、核内因子複合体MNF1が*Ppc1*の光による転写調節を担う可能性を示唆し、MNF1中に存在すると考えられる2種類の未知のDNA結合因子を新たに見いだした点で、植物生理学、分子生物学分野の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成11年2月17日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。