

氏名	なか ひら よう いち 中 平 洋 一
学位(専攻分野)	博士 (人間・環境学)
学位記番号	人 博 第 48 号
学位授与の日付	平成 10 年 9 月 24 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	Circadian Clock-Regulated Transcription of the psbD Light-Responsive Promoter (psbD LRP) in Wheat Chloroplasts (生物時計によるコムギ葉緑体 (psbD LRP) の転写制御) (主査)
論文調査委員	教授 豊島喜則 教授 丸山圭蔵 教授 竹安邦夫 教授 藤堂 剛

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文では、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生物時計による制御を受けることを見出し、その転写制御の分子機構についての検討結果が報告されている。

高等植物において、生物時計によって制御される現象は多岐にわたるが、光合成初期過程(明反応)はその代表的なものである。この過程には、幾つかのタンパク質複合体が関与しているが、各々の複合体は核および葉緑体、両ゲノム由来のサブユニットタンパク質から構成されている。これらのタンパク質の内、核ゲノムにコードされたタンパク質の幾つかはその遺伝子発現が生物時計により制御を受けることが確認されており、光合成活性の概日性リズム発生に寄与している。しかしながら、葉緑体にコードされた遺伝子の生物時計による発現制御はこれまで全く報告されていなかった。

本研究では、葉緑体ゲノムコードの光合成関連遺伝子 (psbD遺伝子) の上流に存在する光応答性プロモータ (psbDLRP) からの転写産物量の変化が顕著な概日性リズムを示すこと、およびその周期的な変動が転写レベルで制御されていることを見出し(第2章)、さらに葉緑体抽出物による *in vitro* 転写系を用いて、生物時計および光による psbDLRP の転写制御に関わる分子機構の一端を明らかにした(第3章)。

12時間毎の明暗周期で5日間生育させたコムギ芽生えを連続明条件下に移した後、経時的に全RNAを抽出して転写産物量の経時変化を測定し、psbDLRPからのmRNA量が少なくとも3日間にわたって周期的な振動を示すことを見出した。その周期は約24時間で、発現量は人為的に与えた早朝の位相で最大、早晚の位相で最小となる。また、明暗サイクル後、連続暗条件下に移したコムギでも、同様のリズムを持つ変動が少なくとも1サイクルは起こることを観測している。これらの結果は、psbDLRPからのmRNA量の変化が外的な環境変化により生じたのではなく、内在性の生物時計による制御を受けた概日性リズムであることを示している。さらに、明暗周期後、連続明条件下に移したコムギ芽生えを経時的に採取し、そこから調製した葉緑体抽出物中でpsbDLRPのプロモータ領域を挿入した鋳型DNAを用いて *in vitro* で転写を行った。その結果、psbDLRPの転写活性はmRNA量の振動に沿う形で周期的に変動することを見出し、psbDLRPからのmRNA量の概日性リズムが主として転写レベルで制御されていることを明らかにした。

コムギおよび他の高等植物の葉緑体psbDLRPは、その転写開始点上流の配列が高い相同性を示す。その配列の2つの特徴、i) 原核生物型のコアプロモータ(-35, -10領域)に似た配列を持ち、葉緑体ゲノムにコードされた原核型RNAポリメラーゼによって転写されること、ii) -35領域の上流に2つの特徴的な繰り返し配列が存在することに着目し、これらの領域に種々の変異を導入して、それが概日性リズムおよび光応答性に与える影響を調べた。まず、上流の2つの繰り返し配列についての置換変異の導入やその配列の欠失は、全体的な転写活性を減少させるが、転写活性の周期的な変動あるいは光応答性には影響を与えないことを見出した。また、これらの配列を特異的に認識する転写制御因子の存在をゲルシフト法によって確認したが、その結合活性は生物時計および光による制御を受けず、ほぼ一定であった。この結果から、上流の2つ

の繰り返し配列は転写活性を高めるシス因子ではあるが、転写活性の周期的な変動および光応答性に直接関与する要因ではないと結論した。次に、コアプロモータ領域に対して変異を導入することにより、このプロモータでは-10領域はRNAポリメラーゼの認識配列として働くが、-35領域の配列は認識配列として働かないことを明らかにした。また、この領域の配列を通常の前核型RNAポリメラーゼが認識する典型的な-35領域配列に変えると概日性リズムおよび光応答性が消失すること等から、psbDLRPのコアプロモータに機能する形の-35領域が存在しないことが、生物時計および光による転写制御を受ける重要な要因であると結論した。

原核生物型葉緑体RNAポリメラーゼのプロモータ認識は核にコードされた複数の $\sigma$ サブユニットにより行われる。このうち、特定の $\sigma$ サブユニットの発現が顕著な概日リズムを示すことを見出し、葉緑体遺伝子の生物時計による制御において、 $\sigma$ サブユニットを介する核と葉緑体遺伝子系間のクロストークが存在する可能性を指摘した。

## 論文審査の結果の要旨

本学位申請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生物時計による転写制御の発見と、その制御機構についての研究成果を報告したものである。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章では、コムギ葉緑体ゲノムコードのpsbD遺伝子の上流に存在する光応答性プロモータ (psbDLRP) からの転写産物量の変化が顕著な概日リズムを示すこと、およびその周期的な変動が主として転写レベルで制御されていることを、コムギ葉緑体 *in vitro* 転写系を用いて明らかにした実験結果が述べられている。

第3章では、psbDLRPのプロモータ領域に種々の変異を導入した鋳型DNAを作成し、*in vitro* 転写への影響を解析した結果が述べられている。一連の実験から、転写活性を高める2つのシス配列の存在を確認し、さらにpsbDLRPのコアプロモータにおいて機能する形の-35領域配列が欠損していることが生物時計および光による転写制御を受ける主要因であるとの結論を得た。さらに、psbDLRPの転写制御の具体的なメカニズムとして、生物時計および光による核コードのサブユニットの発現制御の可能性を指摘している。

第4章で全体の総括と結論を述べ、最後に、今後の研究の進むべき方向に言及している。

高等植物では、比較的多くの遺伝子の発現が概日リズムを示すことが知られているが、それらはすべて核ゲノムにコードされた遺伝子に限られていた。本研究の以前にも、葉緑体ゲノムコードの遺伝子発現の概日リズムの有無が論じられたことはあるが、その存在を示す実験事実は全く得られていない。第2章で述べられている研究の成果は、高等植物において生物時計による葉緑体コードの遺伝子の発現制御を証明した最初の事例として高く評価できる。

生物時計による転写制御の分子機構についての知見は、核コードの遺伝子についてもきわめて少ない。第3章では、*in vivo*での葉緑体の転写活性を忠実に再現することが可能なコムギ葉緑体 *in vitro* 転写系を用いた実験から、生物時計による転写制御に関わるpsbDLRPのプロモータ構造を明らかにしている。また光に応答した転写制御においても同様のプロモータ構造が関与することが示されており、生物時計と光からの2つの情報が最終的にはプロモータ上で1つに収束することが結論されている。この研究成果は、環境変化に適応した葉緑体遺伝子の転写制御において、複数の情報がどのように統御されているかを例示した先駆的な仕事として高く評価できる。

原核生物型葉緑体RNAポリメラーゼのプロモータ認識は複数種存在する $\sigma$ サブユニットにより行われるが、これらは核ゲノムにコードされている。これらの内、特定の $\sigma$ サブユニットのmRNA蓄積量の変化が概日リズムを示すことを見出し、psbDLRP転写活性の概日リズムとの関連性を指摘した。これは葉緑体遺伝子の発現制御における核と葉緑体のクロストークの新しい機構の発見であり、高く評価できる。

植物における生物時計の分子機構は殆ど未知であるが、幾つかの現象観察から植物には複数の振動体 (時計本体) が存在し、その1つは葉緑体に存在することが指摘されている。しかし、そのような葉緑体内の時計の存在を実証するためのアプローチは殆ど行われていない。葉緑体psbDLRPの転写リズムの解析結果はこの問題解明への有力な手がかりを与えるものとしても期待できる。なお、本研究成果は本年度の国際光合成会議において、今後の研究に大きな影響を与えるものとして取り上げられた。また、本研究は生体機能と環境の関わりを究明を目指す人間・環境学専攻・分子生命環境論講座の目的に

沿ったものである。

よって、本論文は博士（人間・環境学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。平成10年7月27日、論文内容について公聴会を開催した。また、公聴会終了後論文内容とそれに関連した試問を行い、合格と認めた。