

氏 名	くろ たに けん いち 黒 谷 賢 一
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1257 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 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 応 用 生 物 科 学 専 攻
学位論文題目	光誘導性の遺伝子発現における転写調節と転写後の mRNA 安定性調節 の機構に関する研究

論文調査委員 (主 査)
教 授 泉 井 桂 教 授 奥 野 哲 郎 教 授 西 岡 孝 明

論 文 内 容 の 要 旨

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) はホスホエノールピルビン酸に HCO_3^- を固定し、オキサロ酢酸とリン酸を生成する反応を触媒する酵素である。本酵素の主要な生理的役割は炭素数 4 つのジカルボン酸 (C4) を供給して生合成およびエネルギー代謝を支えることにあるが、植物においてはさらに多様な生理的役割をもち、それらはいくつかのアイソザイムによって分担されている。とくにトウモロコシやソルガムなどの C4 植物においては、特定の PEPC のアイソザイム (C4 型 PEPC) が C4 光合成の初期炭酸固定反応を行う酵素として重要な役割を担っている。C4 型 PEPC は葉肉細胞の細胞質において特異的に発現し、その量は細胞質の全可溶性タンパク質の 10% 以上を占めている。C4 型 PEPC 遺伝子はゲノムあたり 1 コピーであるので本遺伝子の高レベルの発現は本遺伝子の転写段階およびそれ以降での調節によるものと考えられる。本研究の材料であるトウモロコシの C4 型 PEPC は暗所で生育した黄化葉ではその発現が見られず、光による強い誘導を受ける。mRNA レベルは日周期的に顕著な発現量の変化を示すが、これは光のみならず概日リズムによる調節も受けている。さらに、ストレスや栄養によっても変化する。C4 型 PEPC 遺伝子 (*Ppc1A*) の発現は多彩な調節をうけるが、その分子的機構に関しては未解明な点が多い。本研究はこの問題の一端を明らかにしようとするものである。

(1) *Ppc1A* の光による発現調節では、フィトクロームによって受容された光シグナルを受けて、mRNA の転写段階の調節がまず行われるとされているが、受容体以降の光シグナルの伝達についての知見は少ない。この伝達過程における転写因子その他の構成要素のリン酸化、脱リン酸化が介在するかどうかについて手がかりを得るために、暗所で生育した黄化トウモロコシ葉に各種阻害剤を投与したのち、光誘導をかけ、発現におよぼす影響を調べた。切り取った黄化葉にプロテインホスファターゼの阻害剤である、オカダ酸 ($1\mu\text{M}$) を用いたとき、著しく mRNA の蓄積が阻害されることを見いだした。細胞核を分離して run-on アッセイによって *Ppc1A* の転写活性を調べたところ、オカダ酸の投与の有無にかかわらず *Ppc1A* の転写活性は光照射によって同程度に増加していた。これらのことから光によって誘導される *Ppc1A* の mRNA の蓄積は、転写活性の増加と mRNA の安定性によって規定され、オカダ酸は mRNA の分解速度を高めることによって mRNA レベルの低下をもたらしていると推測された。同様の結果はクロロフィル a/b 結合タンパク質の遺伝子 (*Cab*) についても得られたが、PEPC の C3 型アイソザイムの遺伝子 (*Ppc1B*) ではみられなかった。さらに、緑化した芽生えについて、RNA ポリメラーゼ II の阻害剤であるコルジセピンの投与下で *Ppc1A* および *Cab* 遺伝子の mRNA の半減期を測定したところ、それらの半減期はともに光によって著しく長くなり、さらにオカダ酸の投与下では明条件においても著しく短くなることを見出した。これらの知見から *Ppc1A* 遺伝子の発現において mRNA の分解速度の調節の重要性が示唆された。

(2) *Ppc1A* の転写活性に、転写開始点の上流 1kb 以上の領域が寄与しているかどうかについて手がかりを得るために、*Ppc1A* のプロモーター領域とレポーター遺伝子との融合遺伝子をパーティクルガンによりトウモロコシ緑葉に導入し、一過的な発現によってプロモーター活性を調べた。まず、未決定であった *Ppc1A* の転写開始点の 4.2kb 上流までの塩基配列を決定したのち、上流域 4.2kb および 1.7kb までをもつコンストラクトについてプロモーター活性を調べた。その結果、

前者が後者より有意に高い活性を示すことを見出した。これは転写開始点から非常に離れた上流部分の塩基配列が転写活性に寄与することを示唆するものである。

(3)ゲノム DNA のメチル化と遺伝子発現調節の関連性がいくつかの遺伝子について知られているが、*Ppc1A* のプロモーターの上流領域の DNA にも黄化葉と緑葉でメチル化状態の異なる部位の存在することが以前に報告されていたので、この領域のシトシン(C)のメチル化状態を bisulfite による化学修飾法によってより詳しく調べた。その結果、黄化葉と24時間光を照射して緑化させたトウモロコシ葉のゲノム DNA では、*Ppc1A* のプロモーター上流-3.5kb 付近に見られる CG 含量の高いゲノム領域 (CG island) において、黄化葉では多くの CpG, CpNpG のシトシン残基がメチル化を受けており、緑葉では脱メチル化されていることを見出した。

(4)mRNA 安定性の調節に関与するリボヌクレアーゼ (RNase) の探索を RNase activity gel アッセイ法を用いて試みた。多くの分子種の RNase を検出するとともに明暗条件で活性の変動するいくつかの分子種を見出した。

論文審査の結果の要旨

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) は C4 光合成の代謝経路において大気中の二酸化炭素を捕集する役割を担っている。C4 型 PEPC の遺伝子 (*Ppc1A*) は、光によりその発現が誘導され、明条件下での mRNA の定常レベルが非常に高く、かつ日周的な変動や概日リズムによる変動を示すことが知られている。また、葉肉細胞に特異的に発現し、維管束鞘細胞には発現しないという組織特異的発現パターンを示すなど、*Ppc1A* は光応答性遺伝子および C4 光合成遺伝子のモデル系としてその発現調節機構に興味をもたれている。これまでの多くの研究にもかかわらず、未だ不明な点が多い。本論文において著者はトウモロコシを用いて遺伝子発現調節を転写レベルでの調節と転写後の mRNA の安定性の調節という2つの側面に着目して解析を行った。評価すべき点は以下のとおりである。

(1)阻害剤投与実験の結果、プロテインホスファターゼの阻害剤であるオカダ酸の投与により著しく mRNA の蓄積が阻害されることを見いだした。Run-on アッセイにより光照射時の *Ppc1A* の mRNA の蓄積には転写促進が関与していることを示したが、同時にオカダ酸による蓄積阻害は転写阻害によるのではないことを示した。さらに、転写阻害剤の投与実験により、*Ppc1A* の mRNA の安定性が明条件下で高く、暗条件下で低くなることおよびオカダ酸は明条件下における安定性を低下させることを見出した。これらの知見は、C4 光合成遺伝子の高い発現には転写活性のみならず mRNA の安定化も寄与していることを初めて示したものであり、さらに mRNA の安定化の過程にタンパク質の脱リン酸化が関与することを初めて示唆したものである。

(2)*Ppc1A* の転写調節に関して、*Ppc1A* のプロモーター領域の塩基配列を転写開始点の-4.2kb 上流まで決定し、光応答性プロモーターのコンセンサス配列と非常に CG に富んだ領域を見いだした。パーティクルガンによる遺伝子の一過的発現系を構築し、*Ppc1A* プロモーターの転写活性を比較した結果、4.2kb 全長の方が1.7kb のものに比べて高いことを示し、転写開始点から非常に離れた上流部分の塩基配列が転写調節に寄与する可能性を示した。

(3)*Ppc1A* の-4.2kb 上流領域のメチル化状態を黄化葉と緑葉とで比較し、光照射前後でゲノム DNA の-3.5kb 付近のメチル化状態の変化は CG island において起っていることを初めて見出し、遺伝子発現調節と関連する可能性を示した。これは(2)の知見と関係があるかもしれない。

(4)mRNA 安定性の調節に関与する RNase の探索を試み、いくつかの新知見を得た。

以上のように、本論文は *Ppc1A* 遺伝子の発現調節機構についていくつかの新知見をもたらすと同時に、予備的ではあるが今後の研究の端緒となる新規な知見を報告している。従って本論文は植物生理学、分子生物学の進展に貢献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14年2月21日、論文並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。