

氏 名	もり かわ かず や 森 川 一 也
学位(専攻分野)	博士 (人間・環境学)
学 位 記 番 号	人 博 第 121 号
学位授与の日付	平成 13 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	Regulation of Plastid Gene Transcription by Sigma Factors and Sigma Factor Binding Proteins (シグマ因子及びシグマ因子結合タンパク質による葉緑体転写制御)
論文調査委員	(主 査) 教 授 豊 島 喜 則 教 授 藤 堂 剛 助教授 瀬 戸 口 浩 彰

論 文 内 容 の 要 旨

本論文では、核にコードされる葉緑体転写因子群の同定と機能解析を行い、葉緑体遺伝子の核遺伝子系による転写制御機構について検討した結果を報告している。

葉緑体は植物特有の細胞内小器官で、独自のゲノムと遺伝子発現系を持つ。葉緑体ゲノムにコードされる約100種類の蛋白質のほとんどは光合成に必要な蛋白質や、遺伝子発現系の蛋白質であり、これらの発現調節は主として転写レベルで行われる。葉緑体で働く RNA ポリメラーゼには少なくとも 2 種類あるが、光合成関連遺伝子の転写は主に PEP と呼ばれる大腸菌タイプの RNA ポリメラーゼによって行われ、遺伝子ごとに異なる組織特異性、光応答性を示す。特に、光化学系Ⅱのコアタンパク質をコードする *psbD*, *psbA* 遺伝子の転写は成熟葉緑体で光応答性を示し、*psbD* はさらに概日時計の制御を受ける。これら葉緑体遺伝子の組織特異的な転写や光応答転写には、PEP のプロモータ認識性の変化が中心的な役割を果たすことが明らかとなっている。本論文は PEP のプロモータ認識性とその変化の分子機構を解明することを目的とし、核にコードされる幾つかの因子の同定と機能解析を行ったものであり、第 2 章と第 3 章に分けてその内容が報告されている。

第 2 章では、PEP を構成するサブユニットのうち、プロモータ認識因子 (シグマ因子) を介する制御機構についての研究結果が述べられている。PEP のコア酵素部分を構成するサブユニット群は葉緑体ゲノムにコードされているが、コア酵素だけでは部位特異的な転写を開始することはできない。大腸菌などの細菌では、部位特異的な転写開始にはコア酵素に結合するシグマ因子が必要である。しかし、植物では、シグマ因子の遺伝子は葉緑体ゲノムには存在しないことが核にコードされると想像されていたが、同定されてはおらず、シグマ因子による転写制御の知見はまったくなかった。そこで、当時藍藻や紅藻で同定されていたシグマ因子遺伝子の配列情報をもとにした逆転写 PCR, cDNA ライブラリーの作成・スクリーニングにより、高等植物であるコムギを対象として、核コード葉緑体シグマ因子 (*Ta sigA*) のクローニングを試み、世界に先駆けてこれに成功した。さらに *Ta sigA* の発現が細胞の発達段階、光、及び概日時計により制御されていることをノーザン解析によって見出した。これらの結果は、葉緑体内での光応答転写や、概日時計に依存した転写、あるいは細胞の発達段階に依存した転写が、核コードのシグマ因子を介することを示すものである。

第 3 章では、シグマ因子に結合し、その活性を調節するタンパク質因子の発見とその機能解析の結果が報告されている。細菌では複数存在するシグマ因子の使い分けによる制御のほかに、シグマ因子に結合し、その活性を調節する蛋白質が知られているが、PEP に関してはシグマ因子に結合する蛋白質は全く見つかっていなかった。そこで、シロイヌナズナのシグマ因子 SigA に結合する蛋白質を yeast two-hybrid screening によって検索し、SigA の領域 4 に結合する蛋白質をコードする遺伝子のクローニングに成功した。SibI と名付けたこの蛋白質はまったく新規な蛋白質であり、N 末端側には Ser, Thr に富んだ葉緑体移行シグナルの特徴がみられた。また、SibI が SigA の領域 4 に直接かつ特異的に結合することを、two-hybrid assay 及び GST-pull down assay によって確かめている。ついで、SibI と GFP の fusion 蛋白質を発現させるために作成したプラスミドをシロイヌナズナのプロトプラストに導入して、発現した GFP の細胞内局在を観察した。そ

の結果、GFP シグナルが葉緑体中で検出されたことから、SibI が葉緑体へ輸送されることを確認している。さらに、葉緑体に入った SibI が葉緑体内の転写にどのような影響をあたえるかを調べるために、形質転換プロトプラストを用いた run-on assay 系を確立した。恒常的に機能する CaMV35S プロモータの制御下で *sibI* を発現させるために作成したプラスミドをプロトプラストに導入し、培養後のプロトプラストに対し run-on assay を行い、個々の葉緑体遺伝子の転写活性を調べたところ、SibI の発現が *psbD* と *psbA* の転写活性を顕著に増加させることを見出した。特に *psbD* の転写活性化は顕著であり、最高で数千倍に達する場合もあった。さらに、*sibI* の mRNA は成長したロゼット葉、茎上葉、根に特異的に蓄積しており、また光によって誘導されることをノザン解析によって明らかにした。これらの結果は、SibI による葉緑体遺伝子の転写制御機構の存在をはじめて示したものである。

なお、第1章では、本研究の背景が、また、第4章では今後の展開が述べられている。

論文審査の結果の要旨

植物細胞中で光合成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おり、葉緑体遺伝子の発現は細胞の発達段階や環境の変化に応答するように制御されている。この応答性に関して、核と葉緑体遺伝子系間のクロストークが重要な働きをしていることが示唆されており、その分子論的な実体の解明に向けた研究が現在植物生理学の分野の重要な研究課題の1つとなっている。

本学位申請論文では、核コードの葉緑体転写制御因子群の同定及び機能解析により、核遺伝子系による葉緑体遺伝子転写制御の2つの機構が明らかにされている。そのうちの1つはまったく新しく提唱された機構である。本論文は4章から成り、第1章ではこの研究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章及び第3章で申請者の研究成果が報告されており、第4章で全体の結論と将来への展望が記述されている。

葉緑体での転写には複数の RNA ポリメラーゼが関与するが、光合成関連遺伝子群の転写は主に大腸菌型の RNA ポリメラーゼによって行われる。このポリメラーゼは、そのコア部分が葉緑体ゲノムにコードされていることから PEP (plastid-encoded plastid RNA polymerase) と呼ばれている。PEP による光合成関連遺伝子群の転写では、それぞれの遺伝子ごとに異なる組織特異性、光応答性、概日時計依存性が見出されている。これらの制御のなかでも、光化学系Ⅱのコアタンパク質をコードする *psbD*、*psbA* 遺伝子の転写制御に関しては詳しい解析が行われており、両遺伝子の転写活性は成熟葉緑体で光応答性を示し、*psbD* はさらに概日時計の制御を受けることが分かっている。これらの応答性には各遺伝子の upstream に存在するプロモータ配列が重要であることが本研究以前に示されていたが、プロモータ配列を認識するためのシグマ因子の遺伝子は葉緑体ゲノムには見出されず、その実体は分かっていなかった。

第2章では、コムギを対象としその核ゲノムから葉緑体シグマ因子の遺伝子 (*Ta sigA*) をクローニングし、*Ta sigA* の発現が光シグナル及び概日時計による制御を受けることを明らかにした結果が報告されている。現在では、多くの高等植物において、それぞれ複数のシグマ因子が核ゲノムからクローニングされているが、本研究の成果はそのひとつとして重要な位置を占めている。また、*Ta sigA* の発現挙動の解析結果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クロストークがシグマ因子を介して行われている可能性を最初に示したものであり、きわめて重要な知見である。また、この結果は第3章での研究の発展基盤となっている。

第3章では、葉緑体シグマ因子に結合する蛋白質をはじめて発見し、さらにシグマ因子結合蛋白質が葉緑体内で働く転写因子であることを証明している。申請者はシグマ因子の発現調節のほかに、それらが葉緑体に輸送された後、何らかの活性制御が行われているとの作業仮説を立て、細菌の転写装置の知見を基に葉緑体シグマ因子に結合する蛋白質の検索を行い、未知の因子 (SibI) の同定に成功している。SibI は SigA に特異的に結合するものであり、また SibI が葉緑体に移行することを確認している。さらに SibI の葉緑体転写制御における機能を解析するためにその assay 系を開発し、SibI の一過性発現がある条件下で *psbD* 及び *psbA* 遺伝子の転写を特異的に活性化することを見出している。また、*sibI* の発現が成熟葉特異的であり光によって制御されていることを示し、葉緑体遺伝子転写制御における SibI の役割の一端を明らかにしている。この成果は高く評価できる。一方、本研究で新しく開発した assay 系は、他の目的にもすでに利用され大きな成果が得られていることから、核コードの葉緑体転写因子群の機能を解析する上で一般性を持つ非常に優れた手法であると評価でき

る。

以上、本研究の成果は、植物の葉緑体遺伝子の転写制御に関して、核と葉緑体ゲノム間のクロストークを担う中心的な分子論的実体を明らかにしたものであり、特に葉緑体シグマ因子結合蛋白質による遺伝子特異的な転写の活性化ははじめて見出された制御機構で、国際的にも高い評価を受けている。今後の植物の葉緑体機能統御に関する分子レベルでの研究に新たな展開を与えるものであると言える。

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、この目的に添ったものと言える。

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13年1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。