

氏 名	く 九 町 けん いち
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1181 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	農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	Regulatory mechanisms of the carbonic anhydrase gene, <i>CAH1</i> , in response to carbon supply in a green alga, <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (緑藻クラミドモナス炭酸脱水酵素遺伝子 <i>CAH1</i> の炭素源供給に応答した発現調節機構)
論文調査委員	(主 査) 教 授 大 山 莞 爾 教 授 關 谷 次 郎 教 授 佐 藤 文 彦

論 文 内 容 の 要 旨

現在の大气には二酸化炭素 (CO₂) が 0.04% 含まれるが、十分な光エネルギーが与えられる場合、CO₂ の供給が光合成の律速となる。不足した CO₂ を補うために、クラミドモナスをはじめとする微細藻類は、無機炭素濃縮に関与する一連の遺伝子群を誘導して CO₂ を Rubisco 周辺に能動的に輸送する。このような CO₂ 濃度の変化に応答した遺伝子の転写調節が微細藻類で知られているが、その分子機構についての知見は極めて限られている。

本論文では、緑藻クラミドモナスの炭酸脱水酵素遺伝子 *CAH1* をモデルとし、環境中の炭素源の供給に応答した転写調節機構を明らかにすることを試みている。その主な内容は以下の通りである。

第 1 章では、*CAH1* 遺伝子上流の転写調節に関与する領域の同定について述べられている。クラミドモナスのアリルスルファターゼ (ARS) 遺伝子をレポーターとして用いることにより、転写開始点上流 -651 から -109 の 543 塩基が CO₂ 濃度の変化および光に応答した転写調節に十分であることを明らかにしている。さらに、この領域の 5' 側の 358 塩基は CO₂ が十分量供給された条件下で *CAH1* の転写を抑制すること、3' 側の 185 塩基は CO₂ が欠乏した条件下で転写を活性化することを示している。これらの結果に基づき、CO₂ 濃度変化に応答した *CAH1* の転写調節は、抑制に関わる因子と活性化に関わる因子が拮抗的に働くことにより行われるという可能性を示唆している。

第 2 章では、転写の活性化に関与するエンハンサーとそれに特異的に結合する核タンパク質について述べている。塩基配列を連続的に置換するリンカースキャン法を用いて転写活性化に必要な塩基を調べることにより、2 つのエンハンサー、EE-1 (25 塩基) と EE-2 (11 塩基) を同定している。また、シス配列のデータベースに対する相同性検索により、EE-1 の 5' 側の 9 塩基はエンドウ、アデノウイルス、ヒトの遺伝子のエンハンサーと高い相同性を示すことを見出し、動物から高等植物で普遍的に機能しているエンハンサーがクラミドモナスの CO₂ に応答した転写調節にも関与している可能性を指摘している。さらに、ゲルシフト法により 2 つのエンハンサーに結合する核タンパク質が存在することを示し、これらのタンパク質が転写の活性化に関与することを示唆している。EE-1 結合タンパク質は、他の生物のエンハンサーと相同性を示した 9 塩基の配列を特異的に認識することも明らかにしている。また、EE-1 と EE-2 に結合するタンパク質は、いずれも *CAH1* の活性化が起らない高い CO₂ 濃度下や暗所でも常に核抽出液中に含まれることを見出している。この結果に基づき、CO₂ 濃度変化や光に依存した EE-1、EE-2 結合タンパク質の転写リプレッサーとの相互作用や、リン酸化などの翻訳後修飾の働きにより *CAH1* の転写が制御されるというモデルを提唱している。

第 3 章では、酢酸と *CAH1* の発現との関連について述べている。クラミドモナスは酢酸を代謝して従属栄養的に生育することができ、この培養条件下では *CAH1* の転写は抑制される。この転写抑制は呼吸の変異株では起らないことを示し、呼吸が酢酸による *CAH1* の転写抑制に必須であることを明らかにしている。この結果から、酢酸が呼吸により代謝されることにより細胞内の CO₂ 濃度が上昇し、光合成の基質となる CO₂ の欠乏が解消されるため、*CAH1* の発現量が低下する

と結論づけている。また、この結果より、細胞内の CO_2 濃度を感知して遺伝子発現を制御する機構が存在する可能性を指摘している。

論文審査の結果の要旨

C_3 型の光合成を行う生物では、 CO_2 の Rubisco への供給が光合成の律速となっている。多くの微細藻類は、環境中の CO_2 の欠乏を感知して無機炭素濃縮機構に関与する遺伝子群の転写を活性化することにより、 CO_2 を葉緑体内に能動的に取り込むことができる。これらの遺伝子の発現誘導は、従属炭素源である酢酸の添加によって抑えられる。この合目的な転写調節の分子機構については全く知られておらず、その解明が待たれている。本論文は、分子遺伝学的手法を取りうる唯一の真核緑藻であるクラミドモナスの炭酸脱水酵素遺伝子 *CAH1* を用いて、 CO_2 と酢酸に応答した転写調節機構の解明を試みたものである。本論文の評価すべき点は以下の通りである。

1. *CAH1* 遺伝子転写開始点上流 -651 から -109 の543塩基が、環境中の CO_2 濃度変化に応答した転写調節に必要であることを明らかにした。
2. *CAH1* の発現調節は、 CO_2 が十分供給された条件下での転写抑制と、 CO_2 が欠乏した条件下での転写活性化の2つの機構により行われていることを証明した。抑制には -651 から -294 の358塩基が、活性化には -293 から -109 の185塩基が必要であることを明らかにした。
3. CO_2 欠乏に応答した転写活性化に必要な2つのエンハンサー、EE-1 と EE-2 を初めて同定した。配列のデータベースとの相同性検索から、動物や高等植物など幅広い生物で普遍的に機能するエンハンサーが、クラミドモナスの CO_2 に応答した転写調節に関与している可能性を指摘した。
4. 2つのエンハンサーには、核抽出液中に含まれるタンパク質が配列特異的に結合することを示し、これらの DNA 結合タンパク質が転写を調節している可能性を示唆した。
5. 2つのエンハンサーに結合するタンパク質は、*CAH1* の転写活性化の起こらない条件下でも核抽出液中に含まれることを見出し、転写リプレッサーとの相互作用やリン酸化等の翻訳後修飾により転写活性化が制御されるというモデルを提唱した。
6. 酢酸による *CAH1* の抑制には、呼吸による酢酸の代謝が必須であることを明らかにした。これより、酢酸が呼吸により代謝された結果引き起こされる細胞内 CO_2 濃度の上昇を感知して、転写を抑制する機構が存在する可能性を示唆した。

以上のように本論文は、環境中の CO_2 濃度に応答した転写調節機構ならびに従属炭素源である酢酸との関連についての理解を大幅に前進させたものであり、植物分子生物学、植物分子生理学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のあるものと認める。

なお、平成13年2月14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。