

論文内容の要旨

生産・環境生物学専攻
平成 11 年度博士課程進学
氏 名 有村 慎一
指導教官 堤 伸浩

論文題目 植物オルガネラの遺伝子進化と機能獲得に関する研究

植物細胞内において葉緑体(プラスチド)は二重膜で囲まれた独自の場の内部に遺伝情報を持ち、光合成をおこなうばかりでなく、アミノ酸、色素、植物ホルモンや脂肪酸の生合成、さらに代謝産物の貯蔵を担っている。ミトコンドリアも独自のゲノムを持っており、クエン酸回路と電子伝達系によるエネルギー生産の他に、有機酸、アミノ酸合成代謝経路の一部を担っている。さらに、ミトコンドリアの機能異常により斑入りや細胞質雄性不稔が引き起こされることが知られている。このように、葉緑体とミトコンドリアは、農業生産上きわめて重要な役割を担っており、その機能を人為的に改変することができれば、農業生産の効率化や高付加価値作物の作出などさまざまな形で応用できる。

葉緑体とミトコンドリアは、それぞれ a プロテオバクテリアの祖先種とシアノバクテリアの祖先種がおおよそ 15 億~7 億年前に原始真核細胞内に取り込まれ、共生関係を樹立して現在に至ったと考えられている。オルガネラは原始真核細胞に共生して以来、宿主細胞との間で機能の分業化と特殊化を進めて協調的なシステムを構築すると同時に、真核細胞内の環境により適応するために、原核生物にはなかった新しい機能を獲得してきたと考えられる。作物のオルガネラの機能を人為的に改変して利用するためには、細胞内における核とオルガネラの協調性を保ったまま、目的の形質を導入する必要がある。そのためには、進化の過程でオルガネラと核が構築してきた協調的なシステムと、オルガネラが新たに獲得した機能について理解する必要がある。本研究ではこれらに関する基礎的な知見を蓄積するために、以下の 4 つの実験をおこなった。

1. イネ核コード葉緑体リボソームタンパク質遺伝子 *rpl13*, *rpl24* 遺伝子の転写調節

葉緑体リボソームは 58 個のタンパク質因子をもち、そのうち 20 個が葉緑体ゲノムに、38 個が核ゲノムにコードされている。後者は進化の過程で葉緑体ゲノムから核ゲノムへ転移してきたものである。二つのゲノムにコードされた遺伝子群は、互いに協調的に発現し、最終的なタンパク質のモル比を揃えていると考えられている。本研究ではイネの核ゲノムにコードされた 2 種の葉緑体リボソームタンパク質遺伝子 *rpl13*, *rpl24* (ribosomal protein L13, L24) の発現パターンの解析と転写開始点の決定を行った。明条件下あるいは暗条件下で育成したイネ幼植物のさまざまな組織から抽出した RNA を用いて、*rpl13*, *rpl24* 遺伝子の転写産物蓄積量をノーザンハイブリダイゼーションで確認したところ、光の条件に関係無く幼植物の地上部で強いシグナルが確認された。また、オリゴキャップ法と S1 マッピングアッセイの 2 種の方法を用いて *rpl13*, *rpl24* 遺伝子の転写開始点を決定した。その結果、いずれの方法を用いた場合も 2 箇所ずつ転写開始点があることが確認された。通常の場合、核ゲノム上の遺伝子の転写開始点は 1 箇所である。双子葉植物の他の核コード葉緑体リボソームタンパク質遺伝子 (*rps1*, *rps17*, *rpl21*) でも複数の転写開始点を持つ例が報告されており、核コードの葉緑体リボソームタンパク質の転写調節における共通性の一つであると考えられる。

2. 葉緑体リボソームタンパク質遺伝子 *rps9* の同定とトランジットペプチドの獲得

オルガネラゲノムから核ゲノムへ移行した遺伝子は、その翻訳産物を目的のオルガネラへ輸送するために、細胞内局在シグナルをコードする配列を獲得しなければならない。しかし、進化の過程でどのようにしてこの細胞内局在シグナルが獲得され利用されるようになったのか不明な点が多い。一般に、葉緑体局在シグナル(トランジットペプチド)やミトコンドリア局在シグナル(プレシークエンس)はタンパク質ごとに異なっており、トランジットペプチド間あるいはプレシークエンス間で相同性は無い。そのため、局在シグナルの一次配列情報からそのタンパク質の輸送されるオルガネラを特定することは困難である。

本研究では、イネの EST クローンに見出された原核生物型リボソームタンパク質遺伝子 *rps9* (ribosomal protein S9) がコードするタンパク質について、この N 末端領域と GFP (緑色蛍光タンパク質) の融合タンパク質を発現するプラスミドを構築し、これをパーティクルガンによってイネ緑葉に遺伝子導入し一過的に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡による観察でその細胞内局在を観察した。その結果、融合タンパク質発現プラスミドを導入した細胞では、GFP の緑色蛍光とクロロフィルが示す赤色蛍光の位置が完全に一致し、それ以外のシグナルは見出されなかった。このことから、この遺伝子産物が葉緑体に輸送されることを確認し、高等植物で初めて葉緑体リボソームタンパク質 S9 をコードする遺伝子を突き止めた。また、同定したイネの *rps9* の相同遺伝子をシロイヌナズナからも単離し、その cDNA 塩基配列を決定した。本研究で同定したイネとシロイヌナズナの RPS9 およびイネの他の葉緑体に輸送されるタンパク質のトランジットペプチド領域のアミノ酸配列

を比較したところ、イネの RPS9 の配列は別の遺伝子の葉緑体トランジットペプチド領域と相同性が高いことが確認された。この結果は、既存のトランジットペプチド領域の配列がコピーされ、別の葉緑体タンパク質遺伝子の N 末端側に挿入されることによってトランジットペプチドが獲得されたことを示している。

3. 高等植物で見出された真核生物型ミトコンドリア分裂装置

最近、葉緑体の分裂に関して、細菌の細胞分裂装置と相同なタンパク質 FtsZ が利用されていることが明らかにされた。またミトコンドリアの分裂においても、紅藻、黄金藻類において原核生物型の分裂装置 FtsZ が関与していることが報告された。これらは、共生前の細菌型分裂システムをオルガネラがそのまま受け継いで自身の分裂に利用していることを示している。しかしながら、酵母や動物のミトコンドリアの分裂においては、細菌の因子とは全く異なるダイナミン様タンパク質を利用していることが明らかになった。ダイナミンは、エンドサイトーシスの際に細胞膜を小胞化するタンパク質として知られている。つまり、酵母や動物ではミトコンドリアの分裂に真核細胞のシステムを利用していると考えられる。高等植物におけるミトコンドリアの分裂装置に関してはこれまで報告例は無かった。

本研究では高等植物におけるミトコンドリア分裂にかかわる遺伝子の候補として、原核生物型 FtsZ 遺伝子とダイナミン様タンパク質遺伝子をシロイヌナズナゲノム情報から探し出し、実際にミトコンドリアの分裂に機能しているかを検討した。予想に反してシロイヌナズナゲノム中には a プロテオバクテリア型 FtsZ 遺伝子は存在せず、ダイナミン様タンパク質遺伝子 ADL2b が存在することを見出した。GFP と ADL2b の全長を融合させたタンパク質をタバコ培養細胞で発現させた場合、ミトコンドリアの狭窄部、端部に局在した。これは、ADL2b 遺伝子産物がミトコンドリアの分裂面に局在しているためであると考えられた。また ADL2b に存在する GTPase ドメインに点変異を入れたタンパク質をシロイヌナズナの表皮細胞およびタバコの培養細胞で高発現させると、いずれもミトコンドリアが著しく伸長することを見出した。このミトコンドリアの伸長は、変異型 ADL2b タンパク質によるミトコンドリア分裂機能障害の結果であると考えられる。以上の結果から、高等植物のミトコンドリア分裂には、細菌型の FtsZ ではなく真核生物型ダイナミン様タンパク質が用いられることが明らかとなった。さらに他の生物種で得られている知見を総合すると、進化系統上、動物、菌類、植物が分岐する以前にダイナミン様タンパク質がミトコンドリアの分裂に利用されるようになり、FtsZ 遺伝子の消失は系統樹上で複数回独立に起こったと推測された。

4. 葉緑体突出構造 (stromule)

顕微鏡で観察される葉緑体とミトコンドリアは、教科書によく図示されているレンズ状やピーナツ状の静かな構造物ではない。近年、ペチュニアとタバコにおいて、葉緑体から突出した筒状の構造物 (stromule) があることが報告された。本研究では GFP の N 末端側に葉緑体トランジットペ

プチドを融合したタンパク質を発現させるプラスミドを構築し、これをパーティクルガンによってイネ、シロイヌナズナ、タバコ、ツユクサの葉あるいは培養細胞に導入した。この方法ではストロマに GFP が局在するため、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を利用することで容易に葉緑体の構造を観察することができる。その結果、調べたすべての植物種の葉緑体において **stromule** が存在することがわかり、**stromule** が高等植物に一般的に存在する構造であることがわかった。また **stromule** は単に葉緑体から突出した構造をとるだけではなく、葉緑体間を網目状に連結する高次の構造体を構築すること明らかにした。このように網目状の構造をとることから、**stromule** は葉緑体間の物質輸送や情報伝達に利用されている可能性がある。このような構造体は、葉緑体の起源となったシアノバクテリアには見出されないものであり、オルガネラの共生後に獲得された新たな形質であると考えられる。

オルガネラは宿主細胞と細胞内共生をはじめた後、原核生物のシステムを残しながら、核ゲノムへの遺伝子転移を行い、徐々に核ゲノムの支配下に納まってきた。本研究では、葉緑体ゲノムから核ゲノムへ移行した遺伝子において、転写調節領域の共通性と細胞内局在シグナルの獲得機構の一部を明らかにした。また、ダイナミン様タンパク質のように、進化の過程においてオルガネラ機能の一部は真核生物型の因子で代用されるようになった部分があること、さらに **stromule** のように原核細胞には存在しないまったく新しい機能を獲得した可能性があることを示した。