

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 12 年度博士課程進学

氏名 永島 明知

指導教官 高橋 秀夫

論文題目

葉緑体の分化とストレス応答に関わる RNA ポリメラーゼシグマ因子群の研究

光合成を行う細胞内小器官（オルガネラ）として知られ、植物細胞に最もその特性を与える葉緑体は、独自のゲノムと遺伝子発現系を持っている。オルガネラである葉緑体はその一生においてダイナミックに変化する。すなわち、プロプラスチドからの発達・分化に始まり、成熟、老化と続いていく間、形態的、機能的変化が連続的に起こり、核様体の構造や遺伝子発現の面でも大きな変化が観察される。以上のような過程は植物体の発生・分化・発達と共に起こり、内的プログラムに従う一方、光や水分、温度と言った外的環境変化にも応答しており、両プロセスが適切かつ巧妙に働くことにより葉緑体は正常に機能しうる。このようなことから、分化と環境応答といった2つの側面における葉緑体の転写レベルでの遺伝子発現制御の研究は重要である。

葉緑体の転写装置としては、少なくとも2種の存在が知られている。一つは核コードの T3/T7 ファージ型 RNA ポリメラーゼ（NEP, Nuclear-Encoded RNA Polymerase）であり、転写装置やリボソームといった遺伝情報の発現に関わる遺伝子等の転写に関与している。もう一方は、葉緑体ゲノム上にコードされる真正細菌型 RNA ポリメラーゼ（PEP, Plastid-Encoded RNA Polymerase）であり、主として光合成遺伝子の発現に関わる。PEP のコア酵素サブユニットの遺伝子群が葉緑体ゲノム上に存在するのに対し、コア酵素にプロモーター認識特異性を与えるシグマ因子の遺伝子は核染色体に存在する。シロイヌナズナにおいては、当研究室により6種のシグマ因子遺伝子（SIG1～6）の存在が明らかにされている。これは、それぞれのシグマ因子が葉緑体の分化や環境ストレスに応じて、葉緑体の遺伝子発現を適切にコントロールしていることを示唆している。葉緑体ゲ

ノムには光合成や脂肪酸合成、タンパク質分解、あるいは葉緑体自体の遺伝子発現に関与する、多くの重要な遺伝子がコードされている。このことから、シグマ因子群を介した葉緑体遺伝子の転写制御を理解することは、光合成機能の構築・維持を含む葉緑体機能構造の制御機構の解明といった基礎的研究、およびそれに基づいた葉緑体機能の人為的操作といった応用的研究において、重要な課題であると考えられる。本研究では、分化・発達の過程および環境ストレス下での葉緑体機能発現制御における、シグマ因子の解析を目的とした。

1. 葉緑体分化に関わるシグマ因子 SIG2 の機能解析

シロイヌナズナにおいて、SIG2 遺伝子の T-DNA 挿入変異 (*sig2-1*) 株 (以降、*sig2-1* と表記) が取得されている。この株では、暗所で育てた黄化植物体のプラスチド、すなわちエチオプラスチドの発達は野生型と同様であるが、葉などの緑色組織のプラスチド、すなわち葉緑体の発達は貧弱となることが示されている。これは、SIG2 の標的である葉緑体ゲノム上の特定の遺伝子の発現が、葉緑体の分化・発達に重要であることを示唆している。そこで、SIG2 依存的に転写される遺伝子を探索する目的で、葉緑体ゲノム上に存在するすべてのタンパク質遺伝子を網羅するマイクロアレイ (核コードの葉緑体遺伝子 *CAB*, *RBCS* および、量的対照としてのアクチン遺伝子 *ACT2*, λ ファージ *Q* 遺伝子を含む) を作成した。マイクロアレイのターゲット DNA は遺伝子の全長または一部領域を PCR 法で増幅することにより取得し、これらをスライドガラスに 4 連でスポットした。このマイクロアレイを評価する目的で、生育 7 日目のシロイヌナズナ野生株 (Col) より得た同一の total RNA を蛍光色素 Cy3 および Cy5 を用いて標識し、ハイブリダイゼーション実験を行った。その結果、Cy3 シグナル強度および Cy5 シグナル強度は同程度であり、当アレイによる解析の有効性が示された。

このマイクロアレイを用い、生育 7 日目における、野生株と *sig2-1* 間の遺伝子発現を比べた。その結果、*sig2-1* では 79 の全葉緑体コード遺伝子中、47 遺伝子の発現が、シグナル強度で 1.5 倍以上上昇していた。この結果は、ノーザン法による解析結果とも一致していた。転写産物量が上昇していた遺伝子の多くは転写や翻訳などに関わる遺伝子群であり、NEP によって転写されると考えられているものと一致した。ただし、光合成に関わる遺伝子の発現も一部上昇しているのが観察され、NEP ばかりではなくシグマ因子を含む PEP の活性上昇が予想された。そこで、生育 4 日目と 7 日目における、野生株と *sig2-1* 間の、シグマ因子 (*SIG1*, *SIG3*~*SIG6*) および NEP (*RPOT3*) の発現についてノーザン解析を行った。その結果、*SIG4* 以外のシグマ因子は発現が上昇していた。しかしながら、NEP についてはその発現の上昇はわずかであった。このことより、*sig2-1* における一部の光合成系遺伝子の発現の上昇は、SIG2 の欠損に対する相補的制御によるシグマ因子群の発現の増加によるものと考えられる。また、転写や翻訳等に関与する遺伝子群の発現の上昇は、NEP 分子自体の活性の上昇によることが示唆される。通常、発達した葉緑体における NEP の転写活性は低く、SIG2 が NEP 分子の活性を抑制していることが考えられる。

一方、マイクロアレイによる解析で転写産物量が減少していたのは、PSI-J サブユニットをコードする *psaJ* のみであった。この結果を踏まえて、*psaJ* ORF の全長 (135 nt) に対応するプローブ

を用いてノーザン解析を行ったところ、ポリシストロニックな転写産物（約 1.5 kb）およびモノシストロニックな転写産物（約 0.3 kb）の 2 種を検出し、約 0.3 kb の転写産物のみ発現量が減少していた。このために、SIG2 依存のプロモーターは *psaJ* ORF の直上流にあるものと推定された。そこで、S1 マッピングを行ったところ、*psaJ* ORF の上流 37 nt の位置に転写開始点を、さらにその近傍に原核生物型のプロモーターに特徴的なコンセンサス配列、-35 領域 (TTGACA) — (N_{17~19}) — -10 領域 (TATAAT)、に類似の配列を見出した。*psaJ* プロモーターの -35 領域および -10 領域に相当する配列は、TGTACA および TACTAT であった。当研究室による、SIG2 の標的プロモーターの解析結果とあわせて、SIG2 プロモーターのコンセンサス配列は、-35 領域 (TTNACA) — (N_{16~17}) — -10 領域 (TANNNT) であることが推定される。以上のことより、*psaJ* 遺伝子の発現に SIG2 を含む PEP が関与することが示唆された。なお *psaJ* の他にも、本研究に先立って行われた当研究室における解析により、グルタミン酸 tRNA を含む複数種の葉緑体 tRNA の転写が SIG2 に依存することが示されている。グルタミン酸 tRNA がクロロフィル合成系の補因子として働くことや、*psaJ* 遺伝子産物はクロロフィル結合タンパク質であることが、シアノバクテリアで示されていることから、SIG2 は葉緑体の分化・発達において、クロロフィルの合成とその結合タンパク質の発現を共調させている可能性が示唆される。

2. SIG5 遺伝子のストレス応答性の発見と機能解析

移動することの出来ない植物は、環境の変化に対応するための機構を発達させている。葉緑体においても、光や酸化ストレスなどに対する応答機構が知られており、遺伝子発現を介した応答機構も知られている。ストレス環境下における、転写制御に関わるシグマ因子を同定する目的で、様々なストレス下でのシグマ因子の発現をノーザン法により解析した。ストレス処理は連続光下 ($50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)、23°C、生育 10 日目のシロイヌナズナ野生株 (Col) に対して行った。250 mM NaCl の塩ストレスを与えたところ、6 つのシグマ因子のうち、SIG5 の発現のみが、処理後 2 時間目から誘導された。これと同様の解析を暗適応させた植物体で行ったところ、光照射下と同様に SIG5 の発現の誘導が見られた。従って、光の存在は SIG5 のストレス応答性に必須ではない。ただし、暗所下での誘導は光照射下での誘導よりも遅く、4 時間目から観察された。強光処理 ($50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \rightarrow 500 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) での発現では、同様に SIG5 のみで 30 分以内に強い誘導が見られた。低温処理 (23°C \rightarrow 4°C) では、1 時間目から SIG5 の誘導が見られた。また、浸透圧ストレス (250 mM マンニトール) でも SIG5 の発現が、1 時間目から誘導されていた。次に、SIG5 プロモーター::*uidA* 融合遺伝子を導入したトランスジェニック植物 (遺伝背景、Col) を用いて、その発現を GUS 染色法で観察した。その結果、比較的古い葉で SIG5 プロモーターの強い発現が観察されたが、塩ストレス処理により、それまでほとんど発現していなかった若い葉でも、SIG5 プロモーターの発現が誘導されることを見出した。以上のことは、SIG5 がマルチストレス誘導型のシグマ因子であることを示している。

続いて、ストレス応答時に SIG5 依存的に転写される葉緑体遺伝子を探索する目的で、光合成遺伝子 (*psaA*, *psbA*, *psbD*, *petA*, *atpA*,) 、転写装置遺伝子 (*rpoA*, *rpoB*) 、NAD(P)H デヒドロゲナーゼ遺

伝子 (*ndhB*, *ndhH*) についてノーザン解析を行った。すると、PSII 活性中心 D2 タンパク質遺伝子 *psbD* の発現が、強光照射後 3 時間目から誘導されていた。同様に、*psbD* は塩ストレスで 4 時間後、低温では 30 分で誘導が観察された。また、*psbD* には複数の転写開始点の存在が知られるが、ストレスで誘導される *psbD* 転写産物は、そのサイズから、青色光で誘導されることが知られる BLRP (Blue Light Responsive Promoter) からの転写によるものと考えられた。

本研究ではさらに、*SIG5* 遺伝子の T-DNA 挿入変異 (*sig5-1*) 株の同定に成功した (以降、*sig5-1* と表記; 遺伝背景, Col)。野生株 (Col) および *sig5-1* より得た total RNA に対し *SIG5* プロブを用いてノーザン解析をしたところ、野生株の正常型 *SIG5* mRNA のサイズは約 2.0 kb であるのに対し、*sig5-1* では検出される mRNA のサイズ小さく約 1.5 kb であった。*sig5-1* において、T-DNA は *SIG5* 遺伝子上の中央部に導入されており、たとえ発現しているとしても、プロモーターの認識やコア酵素との結合に関与する保存領域を欠いている。これらのことから、*sig5-1* において *SIG5* は機能していないと考えられる。塩ストレス付与後 6 時間での *psbD* の発現をノーザン法によって、野生株と *sig5-1* 株間で比べたところ、野生株では BLRP から転写されたと予想される転写産物の誘導が見られたのに対し、*sig5-1* では対応する転写産物が見られなかった。このことは、BLRP の認識に *SIG5* が必要であることを示している。*psbD* の遺伝子産物は PSII 活性中心の D2 タンパク質であり、様々なストレスによって光合成電子伝達系に不備が生じた場合に、もっとも大きな損害を受けるものであると考えられる。*SIG5* による遺伝子発現制御は、ストレス下で損傷した光合成活性中心の修復に関わっていることが示唆される。

まとめ

SIG2 について

葉緑体の分化・発達に関わる RNA ポリメラーゼシグマ因子 *SIG2* の標的遺伝子をマイクロアレイにより探索し、既報の複数の tRNA に加え、*psaJ* 遺伝子はその制御下にあることを見出した。また、同マイクロアレイ解析により、葉緑体転写制御系に対する *SIG2* 欠損の影響は大きく、シグマ因子群の発現の上昇や、NEP 分子の活性の上昇を引き起こしている可能性が示唆された。葉緑体の分化には、*SIG2* によるクロロフィル合成と、その結合タンパク質の共調的発現の制御、および NEP の活性抑制が重要であると考えられる。

SIG5 について

強光、低温、塩、浸透圧といった、環境ストレスに応答するシグマ因子として *SIG5* を同定し、*SIG5* のストレス応答性に光は必須でないことを示した。葉緑体ゲノムに存在する *psbD* 遺伝子の BLRP (Blue Light Responsive Promoter) からの転写も、同様のストレスに応答することを見出した。さらに、*SIG5* 遺伝子の T-DNA 挿入欠損株の解析から、*SIG5* の標的遺伝子のひとつが *psbD* 遺伝子であり、BLRP からの転写に関与することを示した。以上より、ストレスにより損傷した葉緑体機能の修復に、*SIG5* が関わっていることが示唆された。