

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 12 年度博士課程入学  
氏 名 華岡 光正  
指導教官名 高橋 秀夫

### 論文題目

シロイヌナズナの葉緑体分化における転写システムの変換と転写制御の研究

#### 1.はじめに

葉緑体は植物細胞に特有のオルガネラであるが、そこには光合成などの重要な代謝経路の多くが存在し、植物の独立栄養性を支えている。葉緑体の構造や機能は植物体の組織や器官の分化に対応してダイナミックに変化する。また、光をはじめとした環境の変化に速やかに応答し、各機能の活性を効果的に調節している。これらの過程において、それぞれの葉緑体の機能に関わる遺伝子を発現レベルで制御することは特に重要なステップの一つである。

葉緑体は、原始シアノバクテリアの細胞内共生に由来すると考えられ、独自の DNA とその遺伝子発現システムを有している。陸上植物の葉緑体 DNA は、120~216kbp の二本鎖環状 DNA であり、光合成などの葉緑体機能に関わる約 120 種の遺伝子がコードされている。これらの遺伝子は、分化の段階や光などの環境条件に応じて異なる発現制御を受けている。葉緑体遺伝子の発現は様々な段階で制御を受けるが、中でも転写レベルにおける制御に関する研究についてはこれまでに多くの報告があり、その重要性が最近特に注目されている。

高等植物の葉緑体には、少なくとも 2 種類の RNA ポリメラーゼが存在している。一方が核コードの T7 フェージ型 RNA ポリメラーゼ (NEP) で、もう一方が葉緑体コー

ドのバクテリア型 RNA ポリメラーゼ (PEP) である。PEP のサブユニットのうち、プロモーター構造を認識するのに必要なシグマ因子は核にコードされており、シロイヌナズナの場合 6 種存在している。したがって、葉緑体遺伝子の転写制御機構を理解するためには、2 種の RNA ポリメラーゼ、及び 6 種のシグマ因子間の役割分担を明確にすることが不可欠である。これらの転写装置を構成する遺伝子は近年相次いで単離されその発現や機能について解析が進められているが、それぞれの役割や相互作用に関する知見はほとんど得られていない。

そこで本研究では、モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を材料に用いて、葉緑体の分化に際した転写システムの変換メカニズムと、それに伴った遺伝子特異的な転写制御機構について、分子レベルで明らかにすることを目的とした。特に核コードシグマ因子の機能を詳細に解析することで、核から葉緑体への情報伝達という観点から、葉緑体分化に関わる転写制御の役割の解明を目指した。

## 2. 葉緑体 RNA ポリメラーゼシグマ因子 SIG2 に依存したプロモーターの解析

葉緑体における PEP のシグマ因子は複数存在しており、全てが核にコードされている。したがって、各シグマ因子は葉緑体の発達や様々な環境の変化に応答して異なるプロモーター配列を選択的に認識することで、遺伝子特異的な転写制御に寄与しているものと考えられる。しかしその詳細については未だ不明な点が多い。シロイヌナズナには 6 種のシグマ因子遺伝子が存在するが、最近それらの中で発芽初期から発現する SIG2 遺伝子への T-DNA の挿入による変異株 (*sig2-1*) を取得した。pale-green の表現型を示すこの株では葉緑体の発達が著しく抑制されており、ウエスタン解析の結果からいくつかの葉緑体タンパク質の蓄積量も大きく減少していることが示された。ノザン解析の結果、主要な光合成遺伝子の転写量は野生株との顕著な差が認められなかった。一方で、一部の葉緑体コードの tRNA の発現が変異株において顕著に抑制されていることが見出された。そこで、プライマー伸長法と S1 マッピング法を用いて各プロモーターレベルでの転写量を詳細に検討したところ、*psbD* プロモーターの 1 つ (*psbD*-256) 及び *psaJ*, *trnE*, *trnV* プロモーターからの転写量が SIG2 の変異に依存して特異的に減少することを見出した。また、変異株に SIG2 のゲノム領域を導入したシロイヌナズナにおいてこれらのプロモーターからの転写が野生株と同じレベルまで相補されることを確認した。さらに、これらの転写開始点を決定し SIG2 に認識されると考えられるプロモーター構造を解析した結果、細菌型の '-10'、'-35' に類似した領域や SIG2 に依存したプロモーター内にもみ特異的に存在する 'A(A/T)TTA' モチーフが含まれていることが分かった。この結果は、上記の領域が PEP-SIG2 による転写に関与している可能性を強く示唆して

いる。一方、*psbA* 及び *rbcL* プロモーターからの転写は *SIG2* 変異の影響をほとんど受けておらず、*SIG2* とは異なるシグマ因子の制御下にあることが示唆された。

### 3. 葉緑体の分化・発達に伴った tRNA を介した NEP 活性の抑制メカニズム

高等植物の葉緑体には、PEP とは別に NEP と呼ばれる核コードの RNA ポリメラーゼが存在している。葉緑体分化に際してまず NEP の活性化と PEP のコア酵素や翻訳装置をコードする葉緑体遺伝子の発現が起こり、続いて PEP の活性化と光合成遺伝子の発現が起こると同時に NEP 活性が抑制されるという一連の流れが存在することが予想されている。*sig2-1* 変異株における解析の結果、*rpoC1*、*rps15*、*accD* といった NEP に依存して転写される遺伝子の転写量が、野生株では初期に一過的に発現が誘導され、その後発達に伴って減少していくのに対して、*sig2-1* 変異株では発達に伴った mRNA 量の減少は見られず、高い発現量を保つことが示された。NEP 本体をコードしている核の *RpoT3* 遺伝子の転写量を調べたところ、野生株と *sig2-1* 変異株の間で変わらないことが分かった。したがって、葉緑体の分化・発達に伴って *SIG2* に依存した何らかの因子が NEP による転写を負に制御している可能性が高い。そこで、これまでシロイヌナズナでは困難とされてきた *in vitro* 転写系を確立し、候補として考えられる制御因子を加えることでその効果を直接的に検証することを試みた。その結果、*sig2-1* 変異株において著しく発現量が減少していた tRNA である tRNA<sup>Glu</sup> を添加した際に、NEP による *accD* プロモーターからの転写量が劇的に減少することを見出した。一方、tRNA<sup>Val</sup> や tRNA<sup>Met</sup> は *sig2-1* 変異株において tRNA<sup>Glu</sup> と同様に発現量が減少していたが、これらの tRNA を加えても転写活性には影響がなかった。また、野生株と変異株の間で発現量の差が認められなかった tRNA<sup>Gly</sup> や tRNA<sup>Trp</sup> を加えても転写量の変化は見られなかった。さらに、*SIG2* 自身を添加しても NEP による転写には全く影響しないことが分かった。以上の結果から、NEP による転写活性の阻害は、tRNA<sup>Glu</sup> を添加した際のみ特異的に起こることが示された。また、シロイヌナズナ葉緑体の tRNA<sup>Glu</sup> と構造的によく類似している大腸菌やシアノバクテリアの tRNA<sup>Glu</sup> を加えた結果、同様に転写量が減少することが分かり、tRNA<sup>Glu</sup> 分子内の特定の領域がこのメカニズムに関与していることが予想された。これらの結果から葉緑体における NEP による転写は tRNA<sup>Glu</sup> によって特異的に制御される可能性が強く示唆された。

### 4. リボソーム L32 様タンパク質による葉緑体遺伝子の転写制御

NEP による葉緑体遺伝子の転写に関する研究は、5 年前に NEP 本体をコードする遺伝子 (*RpoT3*) が単離されたもののその後大きな進展がない。その理由の一つとして、

転写調節因子がほとんど同定されていなかったことがあげられる。そこで、NEP による葉緑体遺伝子の転写制御機構をさらに明らかにするために、新規な RpoT3 結合タンパク質を同定しその機能解析を行った。

RpoT3 を N 末端領域と C 末端領域に分けて、それぞれと相互作用するタンパク質を酵母の Two-hybrid Screening 法を用いて検索を行った。その結果、いくつかの候補クローンが得られたが、その後の選抜を行うことで、最終的に RpoT3 の N 末端領域と非常に強く相互作用するクローン 1 つを最有力候補として取得した。その DNA 塩基配列を決定した結果、真核型リボソームタンパク質 L32 に非常によく似たタンパク質をコードしている遺伝子であることが分かった。このタンパク質は、RpoT3 の C 末端領域には結合せず、N 末端領域にのみ特異的に相互作用することが分かった。またゲルシフト解析の結果、NEP によって転写される *accD* 遺伝子のプロモーター領域に結合することを見出した。これらの結果から L32 様タンパク質は RpoT3 とプロモーターの両方に結合することで転写に関与している可能性が示唆された。さらに、大腸菌で発現させた組換えタンパク質を *in vitro* 転写系に加えたところ、*accD* プロモーターからの転写が添加量に依存して活性化されることを明らかにした。以上の結果は、このタンパク質が新規な核コードの転写制御因子としてプロモーター-DNA に結合して NEP による転写を正に調節している可能性を強く示唆している。

## 5.まとめ

本研究において、シロイヌナズナに 6 種存在するシグマ因子のうち *SIG2* に依存した転写産物を同定し、そのプロモーター構造を明らかにした。今後、他の 5 種類のシグマ因子に関してもその標的遺伝子とプロモーター配列の特異性を解析し、PEP による転写制御におけるシグマ因子間の役割分担を明確にできるものと期待している。また、これまで全く不明であった NEP と PEP 間の相互作用に関して、葉緑体の発達に伴って PEP-SIG2 によって発現する tRNA<sup>Glu</sup> によって NEP による転写活性が抑制されることを見出し、葉緑体の分化における転写システム変換の分子機構の一端を明らかにした。さらに、新規に同定した RpoT3 結合タンパク質であるリボソーム L32 様タンパク質が NEP プロモーターからの転写の活性化に関与していることを明らかにすることにより、全く新しい葉緑体遺伝子の転写制御因子として機能している可能性を示した。