

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 13 年度博士課程入学

氏 名 蓑田 歩

指導教官名 田中 寛

論文題目

単細胞紅藻シアニディオシゾンにおける光合成遺伝子群の転写制御系の解明

1. はじめに

太陽光の光エネルギーにより水と二酸化炭素を炭水化物に変換する光合成は、生態系の基盤である植物の独立栄養性を支えることで、太陽光と水に富む地球に数え切れない生命の存在を可能にしている。光合成は、教科書にあるように、様々な構成要素によって成り立つ複雑な系である。その一方で、その本質は模式図には描かれない動態にあり、刻一刻と変わる細胞内外の変化に応じた制御によって初めて成立する。しかし、その形成と維持の制御機構に関する知見は全体像の理解にはほど遠い。本研究では、複雑かつ動的な光合成反応の統合的理解を目指して、光合成遺伝子群の転写制御系の解明に焦点を絞った。

真核光合成生物には、独自のゲノムを持つ光合成機能に特化したオルガネラ、葉緑体が存在する。その機能を反映して、葉緑体ゲノムには多くの光合成遺伝子が保持され、環境変化に応答した迅速な制御を受けている。私は研究材料を単細胞紅藻 *Cyanidoschyzon merolae* の葉緑体遺伝子の転写制御系とした。*C. merolae* は原始紅藻類に属し、植物の祖先的な要素を多く持っている。とりわけ、葉緑体ゲノムの構造は特徴的であり、光合成遺伝子群の発現は主に転写調節によりなされていると考えられる。葉緑体は非光合成生物に細胞内共生をした祖先型の藍藻を起源とすると考えられている。高等植物の葉緑体は進化の過程で核による支配をうけ、調節因子群がそのゲノムから失われたのに対して、*C. merolae* の葉緑体ゲノムには、4種の転写因子

(Ycf27-30)が保持されている。これらは、主要な光合成遺伝子群の転写制御を行っていることが予想される。この4種の転写因子の機能の解明を中心として、光合成遺伝子群の転写制御系の解明を進めることにした。

C. merolae は核、葉緑体、ミトコンドリアのゲノム配列が明らかになっており、その核ゲノムは約14Mbpと小さく、ハプロイドの非常に単純な構造をしている。核ゲノム配列の検索から、葉緑体ゲノムにコードされた4種の転写因子(Ycf27-30)とともに葉緑体遺伝子群の転写制御を行っていると考えられる4種の葉緑体シグマ因子遺伝子(*SIG1-4*)と1種のヒスチジンキナーゼ遺伝子(*HIK*)が見つかった。このことにより、*C. merolae*の葉緑体遺伝子の転写制御系は最も単純な葉緑体転写制御系あり、光合成遺伝子群の転写制御系の全体像をとらえるのに適していると考えられた。しかし、*C. merolae*は培養系や形質転換系が完成されていなく、その基盤整備が必要であった。そこで本研究では、植物細胞における光合成遺伝子群の転写制御系のより詳細な解明を目指して、培養系の確立や核ゲノムの形質転換系の確立に向けた研究を併せて行った。

2. *C. merolae*の葉緑体遺伝子群の転写制御機構

Ycf27、Ycf29はそれぞれOmpR、NarL型のレスポンスレギュレーターを、Ycf28、Ycf30はそれぞれCRP型、LysR型の転写因子をコードしている。HIKはYcf27、Ycf29と2成分制御系を構成する可能性が高い。各転写因子の機能の解明には、その標的遺伝子を同定する必要がある。最初に、N末にHisタグを融合させたタンパク質を大腸菌で大量発現させ、不溶画分から回収、可溶化を行うことで、各々の精製タンパク質を得た。次に、それらの標的遺伝子を絞りこむことを目的として、様々な環境変化に応答した葉緑体遺伝子群とその調節因子群の転写の挙動を調べた。

2.1 強光処理に対する応答

強光処理後の葉緑体遺伝子群の発現の挙動を葉緑体マイクロアレイ解析とノーザン解析により調べた結果、集光装置に対応する遺伝子群などの発現量の低下と、光化学系IIの反応中心タンパク質に対応する*psbD*、*psbA*遺伝子を含む遺伝子群の発現量の上昇がみられた。これらの遺伝子発現の挙動は、強光に対する光化学系の防御機構が働いていることを示唆した。この際、葉緑転写調節因子のうち、*SIG2*、*HIK*、*ycf27*の転写量が誘導されていた。この結果から*SIG2*が強光への応答に関わるシグマ因子であること、強光下での*HIK*によるシグナル伝達を介したYcf27転写制御機構が存在する可能性が示唆された。過剰発現系による大量発現の結果、Hisタグ融合Ycf27タンパク質は一部大腸菌内で可溶化していた。ゲノム上で遺伝子が隣接していることから、Ycf27が*psbD*遺伝子領域の発現調節をする転写因子であるという仮説をもとに、この

融合タンパク質を大量発現後の大腸菌のライセートを用いて、*psbD* 上流領域への結合実験を行った。その結果、特異的な結合を観察することができた。同様の結果は、*psbA* の上流領域でも得られた。Ycf27 タンパク質は、強光条件下で *psbD*, *psbA* 遺伝子の転写量を上げることで、強光により最も損傷を受けやすい光化学系 II の反応中心タンパク質の修復に関与していることが示唆された。

2. 2 CO₂濃度の低下に対する応答

10% CO₂ 濃度条件から通常大気条件へと移し、葉緑体遺伝子群の転写産物量の変化を調べた結果、全ての葉緑体遺伝子のうち、炭酸固定の鍵酵素であるルビスコをコードする遺伝子オペロンのみの転写活性化が観察された。タンパク質合成阻害剤を用いた実験から、転写活性化は葉緑体コードの転写因子によるものであることが強く示唆された。さらに、この遺伝子オペロンの上流領域に精製した Ycf30 タンパク質が結合することが示された。転写開始点決定の結果、CO₂ 濃度の低下により、ルビスコ遺伝子オペロンは一箇所の転写開始点からの転写が活性化されていることが強く示唆された。CO₂ 濃度の低下を感知した Ycf30 は、ルビスコ遺伝子オペロンの上流域に結合し、核のシグナル伝達系とは独自に、転写の活性化を行い、CO₂ 同化能を高めることで環境変化に応答した炭酸固定能の調節を行っていると考えられる。

3. *C. merolae* の培養系の確立

C. merolae の単純な細胞構造やゲノム情報を最大限に利用して研究を進めるためには、優れた培養系の確立と形質転換系の確立が不可欠である。そこで、液体培養条件の検討を行った結果、90 μE/m²・s の光照射下で、培地成分を既存の Allen 培地の 2 倍とし、5%CO₂ を通気培養することにより、倍加時間は 72 時間から 9 時間に短縮され、ストレスなどにも強い健全な培養が可能となった。また、同様の培地成分に 0.4% のゲランガムを加えることでプレート培養系を確立した。

4. *C. merolae* の形質転換系の確立

プレート培養系の確立によって、形質転換系の確立が現実的なものとなった。そこで、12 種類の薬剤について異なる濃度を添加したプレートを作製し、形質転換のマーカーとして有効な薬剤を検索した。その結果、5-フルオロオロト酸 (5-FOA) が有望であると考えられた。5-FOA はオロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ、Ura3 遺伝子産物により代謝されることで毒性を発揮するため、この酵素を欠損した酵母は 5-FOA 耐性、かつウラシル要求性となることが知られている。

C. merolae において、5-FOA 耐性かつウラシル要求性の自然変異株の単離を目的として、0.8 mg/ml

5-FOAとウラシルを含む培地を用い、0.4%ゲランガムプレートあたり 10^7 細胞を塗布することで選択を行った。その結果、約 9×10^7 の細胞から8個の自然突然変異株の取得に成功した。これらのうち、ウラシル要求性の増殖を示した3クローンについて*Ura3*領域の塩基配列を決定した結果、2クローンで*Ura3*遺伝子にフレームシフト変異が入っていることが確認された。これらの株では、触媒部位の手前の261番目のアミノ酸が終止コドンに変わった結果、Ura3タンパク質のC末端側が欠損していた。次に、このウラシル要求性株をレシピエントとして、エレクトロポレーション法により形質転換を試みた。ベクターのみを導入した時は、選択培地上でコロニーの形成がみられなかったのに対して、幾つかの条件で野生型の*Ura3*遺伝子の導入を試みた結果、コロニーの形成が非常に高い確率でみられた。得られたコロニーから無作為に複数のコロニーを選び、ゲノムを単離した。単離したゲノムを制限酵素で処理し、サザンハイブリダイゼーションを行った結果、形質転換後に得られたコロニーのうち調べたものに関しては全て、野生株とウラシル要求性株と同様のパターンを示した。このことは、ウラシル要求性株への野生型の*Ura3*遺伝子の導入は、相同組み替えにより起こっ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、Ycf27が損傷をうけた光化学系反応中心の修復に、Ycf30が炭酸固定能の調節に関与していることが強く示唆された。Ycf27-30は、核のシグナル伝達系とは独立した転写調節ネットワークを形成しており、このことは、葉緑体や光合成系の進化を考える上で非常に興味深い。光合成の制御系は生物の進化に伴って変化を遂げるが、反応系の制御には共通した概念が存在するはずである。各転写因子が認識しているシグナルと標的遺伝子群の同定により、複雑かつ動的な光合成反応の形成と維持を可能にする制御機構とその概念が鮮明に示されるだろう。また、本研究において、培養系が確立されたことで、*C. merolae* 研究材料としての有用性がさらに引き出されることが期待される。とりわけ、核ゲノムの形質転換が相同組み替えにより起こる可能性が強く示唆されたことは意義深い。本研究をもとにした核ゲノム形質転換系の確立と優れた培養系により、*C. merolae* は理想的な植物細胞のモデル生物になると考えている。