

# 論文の内容の要旨

生産・環境生物学 専攻

平成 17 年度博士課程 進学

氏 名 上田 実

指導教員名 堤 伸浩

論文題目 Molecular genetic analysis of gene transfer from organelles  
to the nucleus in higher plant

(高等植物におけるオルガネラから核への遺伝子転移に  
関する分子遺伝学的解析)

ミトコンドリアと葉緑体は核ゲノムと独立して各々が独自のゲノム、転写、翻訳系を備えるオルガネラである。この2つのオルガネラは細胞内共生によって誕生したと考えられている。共生が成立して以降、自身のゲノムがコードしていた遺伝子は核ゲノムへ転移（遺伝子転移）したか、もしくは消失したものと考えられている。そして、現在ではミトコンドリアや葉緑体を構成するタンパク質の大部分が核ゲノム上の遺伝子にコードされている。オルガネラから核ゲノムへの遺伝子転移は生物が進化の過程で経た現象の中で興味深い現象の一つであるが、この遺伝子転移機構の詳細については未だ謎が多い。

高等植物ミトコンドリアゲノムにおいては未だに多くの遺伝子が残存し、特に脊椎動物のミトコンドリアゲノムにはコードされていないリボソームタンパク質遺伝子が数多くコードされている。また、高等植物においては種間においてミトコンドリアゲノムにコードされる遺伝子に多様性が見られることから、高等植物のミトコンドリアゲノムから核ゲノムへの遺伝子転移は現在も活発に行われていることが示唆されている。一方で、葉緑体ゲノムにコードされている遺伝子数は種間で高度に保存されていることが知られていた。しかし、近年 40 種以上の植物の葉緑体

ゲノムが明らかになり、例外的に核ゲノムへ転移している例が知られてきた。このように高等植物ではオルガネラゲノムから核への遺伝子転移が現在も進行中であり、核ゲノムへ転移した遺伝子には遺伝子転移の形跡が数多く残されている。

多数のオルガネラゲノムの配列が核ゲノム内に存在していることから、ゲノムの移動は頻繁に起こっていることが知られている。実際に筆者は、イネ 12 番染色体上に約 190 kb の巨大ミトコンドリアゲノム断片を同定した。しかし、遺伝子転移が成立するためには、単に核ゲノムにミトコンドリアゲノムが組み込まれるだけではなく、核ゲノムへ組み込まれる際、もしくはその後プロモーター配列やもとのオルガネラへ輸送されるための移行シグナルを獲得する必要がある。本研究はこれらの獲得機構について明らかにすることを目標に行った。

#### 1. イネミトコンドリア *rpl27* のプロモーター配列獲得機構

ミトコンドリアの祖先と考えられている  $\alpha$ -proteobacteria の一種、*Rickettsia prowazekii* ゲノムにコードされるリボソームタンパク質遺伝子 54 個についてイネ核ゲノム中に存在する相同遺伝子をイネゲノムや完全長 cDNA データベース(<http://cdna01.dna.affrc.go.jp/cDNA/>)より抽出した。

このうち、ミトコンドリアリボソーム大サブユニットを構成するタンパク質の遺伝子である *rpl27* について解析した。イネゲノムデータベース (<http://riceblast.dna.affrc.go.jp/>) より *rpl27* はイネ 8 番染色体にマップされることが判明した。この遺伝子がミトコンドリア RPL27 タンパク質をコードしていることを確認するため、抽出した遺伝子から予想されるアミノ酸配列のうち、移行シグナルと考えられる N 末端の 40 アミノ酸残基に該当する塩基配列と GFP 遺伝子を融合した。一過的にこの遺伝子産物を発現させた結果、GFP 融合タンパク質がミトコンドリアに局在することを確認した。次に、*rpl27* の周辺配列について解析したところ、*rpl27* のプロモーター領域は 4 番染色体と 8 番染色体の染色体間での重複、更に 8 番染色体内での縦列重複という二度の重複を経て獲得されていたことが明らかとなった。そして、この新たに獲得されたプロモーター配列は、かつて自身の遺伝子の下流に存在していた遺伝子である *Osspt16* (*Oryza sativa* yeast *spt16* homolog) のプロモーター配列に由来することが判明した。*rpl27* は染色体間と染色体内で起こった重複によって、完全長 cDNA がマップされた配列の他に 4 番染色体に 1 コピー、8 番染色体上の完全長 cDNA

がマップされた領域の上流に 1 コピー、計 2 コピーの *rpl27* 相同配列が存在するので、それぞれの *rpl27* 相同配列における転写の有無について解析を試みた。まず、*rpl27* と *rpl27* 相同配列それぞれのプロモーター配列を  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) をコードするレポーター遺伝子に連結して転写活性を比較した。この結果、染色体間と染色体内で起こった重複により、*rpl27* の転写活性が 7 倍に上昇していたことが判明した。次に、4 番染色体上の *rpl27* 相同配列は ORF 内に完全長 cDNA と 3 塩基の置換が見られる事を利用して、ORF をターゲットにした RT-PCR を行い、PCR 産物をクローニングして 30 クローンについて DNA シーケンスを明らかにした。その結果 4 番染色体由来の配列は得られなかった。また、完全長 cDNA の上流に存在する *rpl27* 相同遺伝子については完全長 cDNA と ORF 内の配列が一致するため、完全長 cDNA と塩基配列の構造が異なる 5' 領域について任意のプライマーを設計し、RT-PCR を行ったが転写産物は検出できなかった。このことから、少なくとも大部分の *rpl27* の転写産物は 8 番染色体に由来することが判明した。*Osspt16* は基本転写因子であることが知られており、*rpl27* と同様に植物体内で恒常的に発現する遺伝子と考えられる。上記に示したプロモーター獲得機構はミトコンドリアから核へ転移した遺伝子が核ゲノム内で適切に発現するための有効な手段であったと考えられる。

## 2. ポプラ葉緑体 *rpl32* におけるエキソンシャッフリングによる移行シグナルの獲得

高等植物において、*rpl32* は葉緑体ゲノムにコードされていることが知られているが、例外的にポプラ (*Populus alba*) では *rpl32* が葉緑体ゲノムから消失していることが報告されている。まず *Populus alba* から Total DNA を抽出し、PCR により *rpl32* が葉緑体ゲノムから抜け落ちていることを確認した。次に、NCBI EST データベースにより、タバコ葉緑体ゲノムにコードされている *rpl32* の予想アミノ酸配列をもとに核へ転移した *rpl32* を探索したところ、183 アミノ酸残基をコードする完全長 cDNA が得られた。この 183 アミノ酸残基に対応する塩基配列と GFP 遺伝子を融合し、この遺伝子産物を一過的に発現させた。その結果この GFP 融合タンパク質が葉緑体へ局在することを確認した。更に、EST データベースより、葉緑体 *rpl32* の葉緑体移行シグナルに該当する配列と高い相同性を示す EST を探索したところ、葉緑体に局在する活性酸素消去酵素の一種 Cu-Zn superoxide dismutase (*sod-1*) をコードする EST が得られた。この結果から、ポプラ葉緑体 *rpl32* は

遺伝子転移成立の際、葉緑体 *sod-1* の葉緑体移行シグナルを exon-shuffling により獲得することで葉緑体へのタンパク輸送を可能にしたことが判明した。この exon-shuffling による移行シグナルの獲得はミトコンドリアから核へ転移した遺伝子について多数報告例があり、葉緑体から核へ転移した遺伝子でも既存の移行シグナルを利用することにより、遺伝子転移した例が明らかとなった。

### 3. フレームシフトによる葉緑体移行シグナルの成立

ミトコンドリアの祖先と考えられている  $\alpha$ -proteobacteria の一種、*Rickettsia prowazekii* ゲノムにコードされる *rpl13* から予想されるアミノ酸配列を用いてイネゲノム内の相同配列の探索を行った。その結果、*rpl13* の相同配列が 2 コピー存在し、それぞれに対応する完全長 cDNA を抽出した。これらの完全長 cDNA から予想される ORF の下流に GFP 遺伝子を融合したコンストラクトを作製し、この遺伝子産物の一過的な局在を観察した。その結果、一方がミトコンドリアへ、他方が葉緑体へ局在することが判明した。このことからそれぞれが ミトコンドリア *rpl13*、葉緑体 *rpl13* であると示唆された。ミトコンドリア *rpl13* について更に解析を行ったところ、ミトコンドリア *rpl13* の下流には、ミトコンドリア *rpl13* 遺伝子自身の N 末端 60 アミノ酸残基部分の相同配列を C 末端に含む 160 アミノ酸残基をコードする遺伝子(*orf160*)が存在した。この *orf160* の完全長 cDNA が単離されていることから、この遺伝子も転写されていることを確認した。興味深いことに、この *orf160* についても翻訳産物の局在を解析したところ、葉緑体に局在することが判明した。また、イネゲノム情報から、この *orf160* の葉緑体移行シグナル部分は *orf160* が存在する 5 番染色体とは別の 1 番染色体に存在する *ppr564* の一部の配列が重複し、変異が蓄積しフレームシフトが起こったことにより誕生したことが判明した。今回の結果は、オルガネラから核への遺伝子転移成立のために必要な移行シグナルは、ゲノム内で移行シグナルとして機能しない配列が重複や変異を経て移行シグナルとして機能し得ることを示す興味深い現象である。

本研究において、染色体間と染色体内で起こった重複によるプロモーター配列の獲得、フレームシフトによる葉緑体移行シグナルの成立というこれまで報告されていない遺伝子転移機構に関する新規知見を得ることができた。