

論文の内容の要旨

論文題目 **Studies on the DNA polymerases localized to plastids and mitochondria in plants and algae**
(植物と藻類に固有の色素体・ミトコンドリア局在型 DNA ポリメラーゼの研究)

氏名 森山 崇

序論

植物や藻類には、独自のゲノムを持つ色素体とミトコンドリアが存在し、それらのゲノムはそれぞれのオルガネラに存在する複製酵素によって複製されている。動物のミトコンドリアゲノムの複製酵素は DNA ポリメラーゼ γ であるが、ゲノム塩基配列が決定されたシロイヌナズナ、イネ、および紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* には、DNA ポリメラーゼ γ をコードすると思われる遺伝子は存在しない。現在、植物や藻類のオルガネラゲノムの複製は、大腸菌の DNA ポリメラーゼ I (Pol I) とある程度の相同性を持つ核コードの酵素 (POP : Plants organellar DNA polymerase と呼ぶ) が行っていると考えられており、シロイヌナズナ、イネ、タバコにおいて、色素体とミトコンドリアの両方に局在することや発現タンパク質の活性が調べられているが、複製酵素であることはまだ証明されていない。単細胞紅藻である *C. merolae* の核ゲノムには、Pol I とある程度の相同性を持つ酵素、PolA と PolB をコードする遺伝子が存在する。PolB は POP のホモログであり、Pfam による解析から、植物の POP と同様に 3'-5'エキソヌクレアーゼドメインと DNA ポリメラーゼドメインを持つことが推定された。PolA は POP ではなく、大腸菌の Pol I に対してさらに高い相同性を持つ酵素で、5'-3'エキソヌクレアーゼドメインと DNA ポリメラーゼドメインを持つことが推定された。3'-5'エキソヌクレアーゼドメインは Pfam によるスコアが低く、保存されたモチーフも存在しないため、PolA はこの活性は持たないことが推定された。*C. merolae* は、真核生物としては高温 (至適温度 46°C) で生育するため、タンパク質が比較的熱に強いと考えられる。また、単細胞であり液体培養で培養できるため、活発に増殖している細胞を大量に得ることができることから、DNA ポリメラーゼのように細胞の増殖に関わる酵素を植物よりも精製しやすいと考えられる。また、形質転換法はまだ確立されていないが、明暗の周期により同調培養ができ、細胞内に 1 個ずつ存在する色素体とミトコンドリアの分裂が細胞分裂と同調的に起こるため、細胞周期に

おける発現を調べることに適している。以上の理由から *C. merolae* を実験材料として用い、POP (PolB) の酵素的性質およびオルガネラゲノムの複製への関与についての知見を得ることを目的とした。

結果

①PolA と PolB の細胞内局在

免疫ブロット分析により PolA と PolB の細胞内局在を調べた結果、PolA は色素体、PolB は色素体とミトコンドリアの両方に局在することがわかった。また、5'-RACE 法により PolA と PolB の mRNA の 5'末端を調べ、その結果より推定された開始メチオニンから 57 アミノ酸を GFP との融合タンパク質としてタマネギで発現させ GFP の蛍光を観察した。その結果、免疫ブロット分析の結果と一致し、PolA は色素体、PolB は色素体とミトコンドリアの両方に局在が観察された。

②*C. merolae* から精製した PolB、および PolA と PolB の組換えタンパク質の DNA 合成活性の測定

ゲノム塩基配列が解読されている植物や藻類において、植物体からの POP の精製は行われていないため、*C. merolae* の細胞から PolB を精製した。PolB の精製は、Q Sepharose を用いたバッチ法、ヘパリンカラム、DNA セルロースカラム、Resource Q カラム、Resource S カラムを用いて行った (ネイティブ PolB と呼ぶ)。PolB の存在は、あらかじめ作製していた抗 PolB 抗体を用いた免疫ブロット分析によって検出した。また、比較のため PolA と PolB の組換えタンパク質を大腸菌において発現し精製した (組換え PolA、PolB と呼ぶ)。DNA 合成活性を調べた結果、ネイティブ PolB の比活性は組換え PolA、PolB の 20 倍以上高かった。DNA 合成阻害剤の効果を調べた結果、ネイティブ PolB および組換え PolB は、ddTTP によっては同様にあまり阻害されなかったが、ホスホノ酢酸には感受性があった。一方、組換え PolA は PolB とは異なり、ホスホノ酢酸に対しては感受性はなかったが、ddTTP によって強く阻害された。耐熱性を調べた結果、ネイティブ PolB と組換え PolA は 60°C、組換え PolB は 50°C で失活した。コントロールとして調べた大腸菌 Pol I の Klenow フラグメントも 60°C で失活し、また、タバコの POP も 60°C で失活することが報告されていることから、PolA、PolB 共に耐熱性は特に高くないことがわかった。組換え PolA、PolB を用いて 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を調べた結果、PolB では 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が検出されたが、PolA では検出されなかった。

③*C. merolae* の新規同調培養系の開発

C. merolae の同調培養は従来、明期 12 時間暗期 12 時間の周期 (CO₂ 添加無し) で行われてきたが、この条件では細胞が毎周期分裂し、さらに細胞分裂が明期の間で起きるため、光による発現誘導と細胞分裂に関わる発現誘導は区別ができない。そこで、PolA と PolB の細胞分裂との関係を調べるために、新規同調培養系を開発することにした。CO₂ の添加をしない条件において明期の長さを検討した結果、明期 7 時間後から細胞分裂が起こりはじめ、分裂率のピークは明期 9 時間後で 7% だった。また、明期 6 時間後消灯しそこから 10 mM グルコースを加え培養した結果、グルコースなしの時は分裂率のピークが 1% だったが、グルコースを加えることで分裂率が 3% に増加した。これらの結果は、明期 6 時間では M 期に入るための光合成産物が不足しているため細胞分裂が起こらないが、グルコースを加えることにより、取り込まれたグルコースが光合成産物の代わりにエネルギー源として働き、細胞分裂が起きたと考えられる。これらの結果から、明期 6 時間暗期 18 時間の周期で CO₂ の添加を調節する同調培養系を開発した (図 1C)。この系では、

明期の長さが同じでも、細胞分裂が起こらない周期 (CO₂ 添加無し) と起こる周期 (CO₂ 添加有り) が生じるため、これらの周期を比較することで、光による発現誘導と細胞分裂による発現誘導とを区別することができる。この同調培養系では 70% と高度な同調率が得られた。また、この同調培養系の DNA 合成期 (S 期) を調べた結果、核、色素体、およびミトコンドリアのゲノムは、明期開始から 3 時間以内に複製が完了することがわかった。

④同調培養における PolA と PolB、および細胞周期に関わる遺伝子の発現量の変化

同調培養において PolA と PolB の転写産物とタンパク質の蓄積量を測定した (図 1A、B)。PolA の転写産物量は光または細胞分裂にあわせ若干増加したが、タンパク質量は周期を通じてほとんど変化しなかった。PolB の転写産物量は、光によっても増加したが、細胞分裂が起きる前で急激な増加が見られた。PolB のタンパク質量は細胞分裂が起きる周期の明期から増加し始め、細胞分裂前後でピークになり、暗期になってもそれほど減少しなかった。

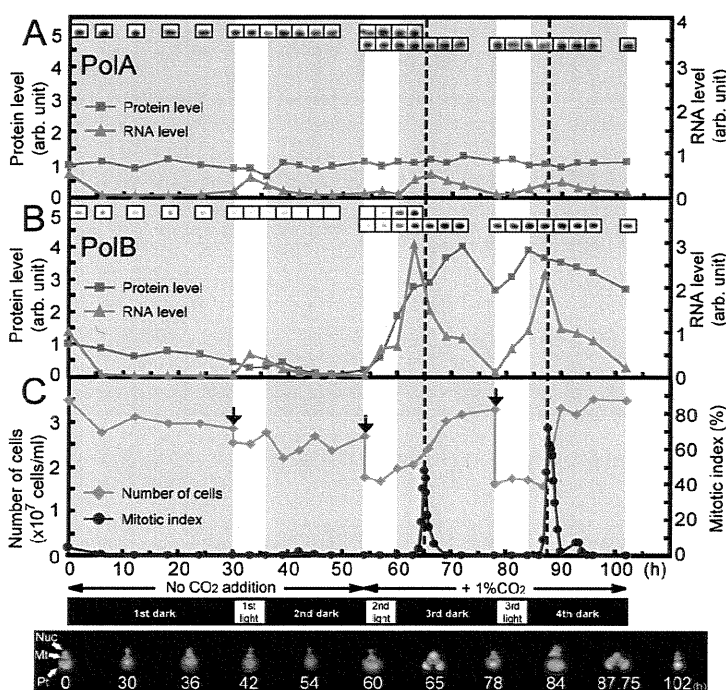


図 1 *C. merolae* の同調培養における PolA および PolB の発現量の変化。(A、B) PolA または PolB のタンパク質量と mRNA 量の測定。タンパク質量は免疫プロット分析を行い、バンドを定量化した。mRNA はリアルタイム RT-PCR を行い、18S rRNA によりノーマライズした。(C) 新規同調培養系における同調率 (Mitotic index) および細胞数 (Number of cells) のグラフ。矢印は培養液の希釈およびサンプリングにより減少した培養液を補充するために培地を加えたところを示している。点線は同調率のピークを示している。下の写真は、各時間における代表的な *C. merolae* 細胞で、DAPI で染色し蛍光顕微鏡で観察した。

細胞周期に関わる遺伝子など 49 個についてもリアルタイム RT-PCR によって転写産物量を測定した。発現量の変化を自己組織化マップおよび階層的クラスタリング (図 2) により解析した結果、遺伝子を 2 つのグループに分けることができた (Cluster 1 と 2)。Cluster 1 は主に光によって誘導され、細胞分裂後に不足したタンパク質または転写産物を補うように再び発現量が増加するグループで、この中には G1/S の制御に関わるサイクリンやサイクリン依存性キナーゼ (CDK)、オルガネラ DNA の複製、修復、組換えに関わる遺伝子 (SSB、ジャイレース A と B、プライマーゼ、DnaB および twinkle ヘリカーゼ)、核ゲノムの修復に関わる遺伝子 (DNA ポリメラーゼ ι 、 λ) などが含まれた。Cluster 2 は主に細胞分裂によって誘導されるグループで、PolB、G2/M の制御に関わるサイクリンや CDK、核ゲノムの複製酵素 (DNA ポリメラーゼ α 、 ϵ)、ヒストンがこのグループに含まれた。PolA は Cluster 1 と 2 の発現量の変化を混合したようなパターンを示し、どちらのグループにも属さなかった。

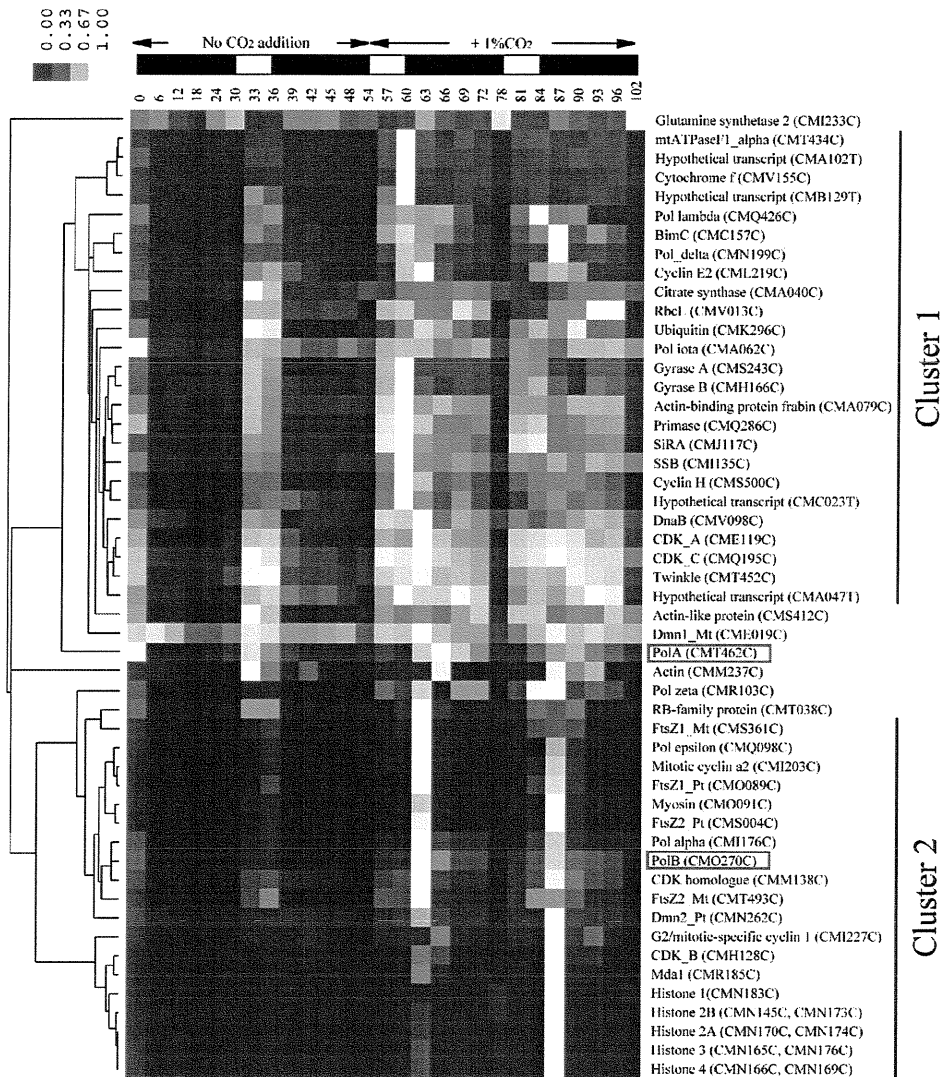


図2 同調培養におけるさまざまな遺伝子の発現量の変化。PolA、PolB、および49個の遺伝子についてリアルタイム RT-PCRを行い、それぞれの遺伝子の発現量のピーク値を1とし、クラスタリングソフトウェア Cluster 3.0 を用いて階層的クラスタリングを行った。自己組織化マップの結果とあわせて検証し、2個のクラスターに分けた。

まとめ

本研究において、PolBは、色素体とミトコンドリアに局在すること、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を持つこと、細胞周期にあわせ発現量に変化すること、また核ゲノムの複製酵素であるDNAポリメラーゼ α と ϵ もPolBと類似した発現を示したことを明らかにし、POPであるPolBが*C. merolae*のオルガネラゲノムの複製に関わることを示した。また、これらのDNAポリメラーゼやヒストンの発現はS期の後にピークがくることから、*C. merolae*は他の生物とは異なり、DNA複製に関わる遺伝子は前もって発現しており、次の細胞周期のS期において働くことが示唆された。PolAはこれまでのところ、真核生物では*C. merolae*にしか見つかっていないDNAポリメラーゼであるが、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を持っていなかったことから、DNAの複製に関わるとしてもメインに働くとは考え難く、大腸菌のPolIと同様に5'-3'エキソヌクレアーゼドメインを持つことから、色素体においてゲノムの修復やニックトランスレーションによる岡崎フラグメントのプライマーの除去に関わっていることなどが考えられる。