

別紙 1

【研究題目】 クラミドモナス葉緑体遺伝子の転写促進配列の解析

【氏名】 葛西 精太郎

【要旨】

葉緑体は、独自の遺伝情報を持っており、代謝経路の多くが局在する植物の独立栄養性を支える重要な細胞小器官である。葉緑体の遺伝子発現は、プロモーター、RNA ポリメラーゼ、リボソームの構造などから原核生物と類似の機構を有していると考えられているが、その発現機構にはまだ不明の点も多くある。そこで、本研究では、葉緑体 DNA の相同組換えや形質転換体の取得が比較的容易な緑藻クラミドモナスを研究材料として用い、特に転写機構に注目して解析を進めた。

クラミドモナス葉緑体の遺伝子発現については、転写後制御が重要な役割を担っていると考えられており、これまでに mRNA の安定性やプロセッシングに関わる因子について多くの研究がなされている。一方、転写開始や転写速度に影響を与える因子に関する解析はほとんどなされていない。唯一 RuBisCO 大サブユニットをコードする *rbcL* に関して、転写活性が減少している核ゲノム変異体(76-5EN)が取得され、また *rbcL* の構造遺伝子領域が転写活性の維持に必須であるという報告がある。本研究では、葉緑体遺伝子の構造遺伝子領域と転写の関係を調べ、特に *rbcL* の転写に着目して構造遺伝子領域内に存在することが示唆された転写活性化領域の性格付けを行った。さらに、構造遺伝子領域に変異を導入した株を用い、転写時の核様体構造を調べることで、*rbcL* の構造遺伝子領域がどのような機構で転写を活性化しているのかの基本的なモデルを提唱することを試みた。また本研究では、葉緑体で高転写されている *rbcL* の発現機構をより詳細に調べるために、*rbcL* プロモーター領域への変異導入により転写活性が減少した変異株の取得、及び大腸菌由来の *lac* 系を用いた葉緑体遺伝子的人為的発現制御系の開発を行った。

まず、*rbcL* と同様に他の葉緑体遺伝子においても構造遺伝子領域の一部が十分な転写に必要なものであるかを調べた。*rbcL*、*psbA*、*psbD*、*atpA* の各葉緑体遺伝子の 5' 領域及び構造遺伝子領域の一部と、レポーター遺伝子として β -glucuronidase 遺伝子 (*uidA*) を連結したキメラ遺伝子を用いて、ノザン解析、ウェスタン解析、転写活性及び GUS 活性の測定を行った。その結果、*psbA* においても *rbcL* と同様に構造遺伝子領域の一部が十分な転写に必要なことが示唆された。一方、*psbD* 及び *atpA* においては、構造遺伝子領域の有無による転写への影響は認められなかった。

次に、*rbcL* の転写に影響を与える構造遺伝子領域(80 bp)に注目し、この領域の性格付けとさらなる領域限定を行った。解析には *uidA* または green fluorescent protein 遺伝子(*gfp*)をレポーター遺伝子としたキメラ遺伝子を用いた。まず、80 bp の方向

を逆にすることによる転写への影響を調べたところ、80 bp の方向には依存せず転写が十分行われた。また、転写阻害剤である Actinomycin D を用いて、80 bp を含まない RG(GFP)および 80 bp を含む RGF27(GFP)の mRNA 半減期を調べた結果、RG(GFP)と RGF27(GFP)の mRNA 安定性はほぼ同じであった。これらのことより、80 bp 領域は転写活性の上昇に寄与していると結論づけた。次に、80 bp を *rbcL* 以外の葉緑体遺伝子(16S *rRNA*, *atpB*)プロモーターの下流に挿入し転写へ与える影響を調べた。その結果 16S *rRNA* の転写活性を減少させたのに対し、*atpB* の転写活性を上昇させた。この両者はプロモータータイプが異なることから、*rbcL* の構造遺伝子内に存在する転写に影響を与える領域は、プロモータータイプによって作用が違ふことが示唆された。この領域をさらに限定するために、変異導入実験を行ったところ、約 40 bp の領域が転写活性の上昇に必須の領域であった。大腸菌内においてはこの 40 bp 領域の有無、あるいは 40 bp 領域への変異導入の有無に関わらず転写には影響がなかったことから、この 40 bp による転写への影響は、クラミドモナス葉緑体内部での特異的な現象で、葉緑体内の何らかの因子が 40 bp に関与して転写に影響を及ぼしていると推測された。ゲルシフトアッセイ及び核様体に対するヌクレアーゼ感受性試験を行うことで構造遺伝子領域により転写が促進される機構について検討した。

クラミドモナス葉緑体遺伝子において、*rbcL* は 16S *rRNA* に次ぐ高い転写活性を持つことが知られている。高転写の機構を考える上で、葉緑体遺伝子発現における転写の意味付けをすることは意義深いと考え、以下の実験を行った。まず、*rbcL* のプロモーター領域に変異を導入することで、転写活性を減少させたときに *rbcL* の発現にどのような影響があるか調べた。プロモーターコア配列を 2 塩基置換した変異株において転写活性の劇的な減少が認められた。一方、蓄積 mRNA 量およびタンパク質量は、転写活性ほど減少していなかった。転写活性が減少した数種の変異株の結果より、転写調節が *rbcL* の発現にどのような影響を及ぼすのか考察した。次に、大腸菌由来の *lac* 系を用いた葉緑体での人為的遺伝子発現制御系の構築を行い、*rbcL* の発現を人為的に調節することで、葉緑体機能や他の遺伝子発現にどのような影響が及ぼされるかを経時的に観察することを目指した。クラミドモナス葉緑体の 16S *rRNA* プロモーターに 2 つの人工オペレーター配列、*rbcL* 5'UTR、*uidA*、*lacI* を導入したキメラ遺伝子において、Lac リプレッサーによる転写抑制と、IPTG の添加による転写誘導が認められた。また、タンパク質レベルでの抑制、誘導も認められた。この系において、至適 IPTG 濃度及び至適 IPTG 誘導時間を調べたところ、それぞれ 5 mM、12 時間であった。さらに、内性 *rbcL* の発現を人為的に制御するための前段階として、*rbcL* プロモーターと *uidA* を用いたキメラ遺伝子にオペレーターを挿入して、*rbcL* プロモーターによる遺伝子発現を人為的に制御することを試みた。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 葛西精太郎

植物の葉緑体遺伝子である *rbcL* のコード領域には転写を促進する配列の存在が報告されているが、その構造と機能は不明である。本論文ではその詳細を緑藻、クラミドモナスの葉緑体を用いて検討し、特徴的な構造を明らかにし、この転写促進配列の応用の可能性について論議している。

1) 葉緑体ゲノムにコードされている代表的な遺伝子として、*rbcL*、*psbA*、*psbD*、*atpA* を選び、それぞれのプロモーター、5'UTR、5'末端側 90bp 以下の種々の長さのコード領域を、翻訳は *GUS* の ATG から始まるように、*GUS* レポーター遺伝子に連結し、クラミドモナス葉緑体に導入し、相同組換えにより葉緑体ゲノムに組み込んだ。*rbcL* および *psbA* ではコード領域を付加することにより、mRNA 蓄積量が大幅に増大した。mRNA の安定性には変化はなく、mRNA のパルスラベル実験より、転写速度が増大した結果である。また、*psbD* と *atpA* ではその効果は見られず、遺伝子に特異的な現象であると結論している。

2) *rbcL* のコード領域 81bp を 3'側から 33bp まで欠失させると、転写促進効果は大きく減少した。レポーター遺伝子を *LUC* に換えても同様の結果が得られた。また 81bp を逆向きに挿入しても転写促進効果があり、転写開始点から 90bp 程度下流にずらしても効果は維持されたが、250bp ずらすと効果は消滅した。プロモータータイプの異なる *rrn16* プロモーターに、この 81bp を連結したもの、および大腸菌に導入した場合は、転写促進効果はなかった。以上の結果から、コード領域 81bp の転写促進効果は、それに対応した特異的なタンパク質因子がクラミドモナスの -10 タイププロモーター上の転写開始ユニットと相互作用し、転写活性を上昇させると結論している。

3) この 81bpDNA 断片に特異的に結合するタンパク質が存在することがゲルシフトアッセイで示唆された。81bpDNA の中央部を 10bp-20bp 置換すると転写活性増大効果が消失すること、この領域に 2ヶ所存在する AAAGCA/CGGTG 配列が要因ではないかと推定している。

4) 葉緑体の -10 タイププロモーターはコア配列、TATAAT に続き、AT が保存されている。*rbcL* プロモーターの AT を種々の塩基に置換したが、コア配列の塩基置換に比べ転写活性への影響は少なかった。

5) 大腸菌の遺伝子発現誘導系の *lacI* リプレッサー遺伝子と *lac* オペレーターを *GUS* をレポーター遺伝子としてクラミドモナス葉緑体に導入した。*lacI* の発現により *GUS* の発現は抑制され、IPTG 添加により発現が誘導された。これは、葉緑体で遺伝子発現を人為的に制御する系として今後大いに有用である。

以上のように、本論文は植物の葉緑体における遺伝子発現機構の興味深い一面を明らかにするとともに、外来遺伝子の高発現をもたらす実用面での価値も高く、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。