

報告番号	※ 甲第 号
------	--------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 ヒメツリガネゴケにおける
色素体シグマ因子遺伝子の機能解析

氏 名 市川 和洋

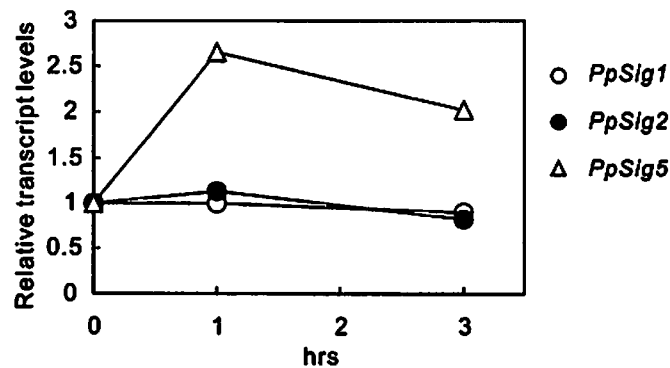
論 文 内 容 の 要 旨

色素体シグマ因子は、色素体遺伝子の発現を制御する重要なタンパク質の一つである。長らくシグマ因子はバクテリアのみに存在すると考えられてきたが、近年、シロイヌナズナをはじめとする各種植物の核ゲノム上にパラログ遺伝子が存在し、植物においても多重遺伝子族を形成していることが明らかになった（シロイヌナズナでは、AtSIG1 から AtSIG6 の 6 種類が存在する）。これらの遺伝子は、系統学的な解析から Sig1 グループ、Sig2 グループ、Sig3 グループ、Sig5 グループおよび Sig6 グループの 5 つのグループに分けることができる。色素体シグマ因子をコードする cDNA あるいは遺伝子が最初に同定されてから約 10 年が経つが、色素体シグマ因子の詳細な生理的機能は不明な点が多かった。最近になって、シロイヌナズナの遺伝子破壊株とアンチセンス株の解析などから、一部の色素体シグマ因子について生理的機能が徐々に解明されつつある。しかし、被子植物以外の陸上植物では、同定された色素体シグマ因子の数は少なく、解析もほとんど進んでいない。特に色素体シグマ因子の生理的機能の進化的な観点からの比較解析の報告は皆無である。

コケ植物は 4 億数千万年前に植物の祖先から分岐し、原始的な特徴を残す植物である。コケ植物を用いた研究により、植物の進化の観点から重要な知見が得られると期待できる。ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) は、陸上植物では唯一、高率な遺伝子ターゲティングが可能であることや、国際共同チームによって進行していたゲノムプロジェクトが完了し、網羅的な DNA 配列情報が入手可能であることなどにより、*in vivo*での遺伝子の機能解析に最適なモデル植物の一種である。ヒメツリガネゴケからは、既に Hara らによって *PpSig1* と *PpSig2* の 2 つの色素体シグマ因子遺伝子がクローニングされている。*PpSig1* がコードするタンパク質 PpSIG1 は被子植物の Sig1 グループに、*PpSig2* がコードするタンパク質 PpSIG2 は Sig2 グループに属し、両遺伝子ともに光による転写誘導を受けることなどが彼らによって報告された。筆者はまず、ヒメツリガネゴケの新たなシグマ因子をコードする cDNA のクローニングを行った。この cDNA の予想コードタンパク質は、多様な植物の色素体シグマ因子

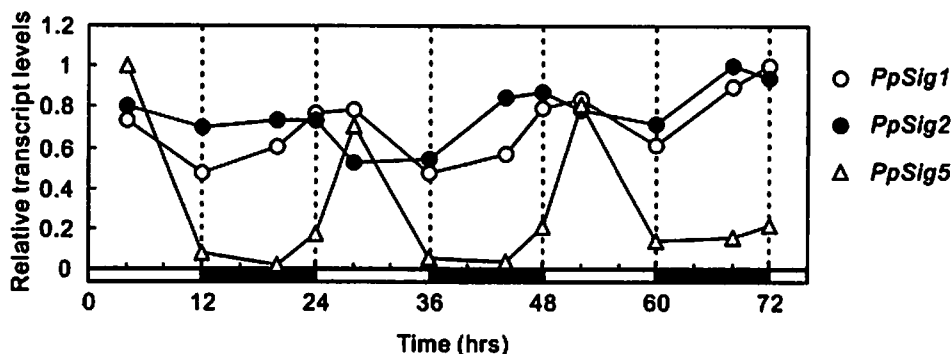
のアミノ酸配列を用いて作製した系統樹において、シロイヌナズナの AtSIG5 とクラスターを形成した。また、PpSIG5 と AtSIG5 のアミノ酸配列のアラインメント上でのイントロンの挿入位置は互いにほぼ一致した。これらの結果から、新たに分離した cDNA が被子植物の Sig5 グループに近縁な色素体シグマ因子をコードすることが分かったので、対応する遺伝子を *PpSig5* と名づけた。

次に、筆者は自然環境で見られる光照度の 2 種類の変化について着目して、ヒメツリガネゴケの 3 つの色素体シグマ因子 *PpSig1*、*PpSig2* および *PpSig5* の発現を追跡した。日陰から日向への推移や天候の急変のような急激な変動を模した「強光ステップ条件」と、緩やかで周期的な昼夜の変動を模した「明暗サイクル条件」である。強光ステップ条件では、 $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光照射条件で生育させたコケの野生型株を、 $520 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光照射条件に移し、3 つの *PpSig* の 1 時間および 3 時間後の mRNA レベルを観察した。その結果、*PpSig1* と *PpSig2* の発現にはまったく変化がなかったのに対して、*PpSig5* の発現は強光に特異的に誘導されることが分かった (図①参照)。



図① 強光ステップ条件における 3 つの *PpSig* の発現様式

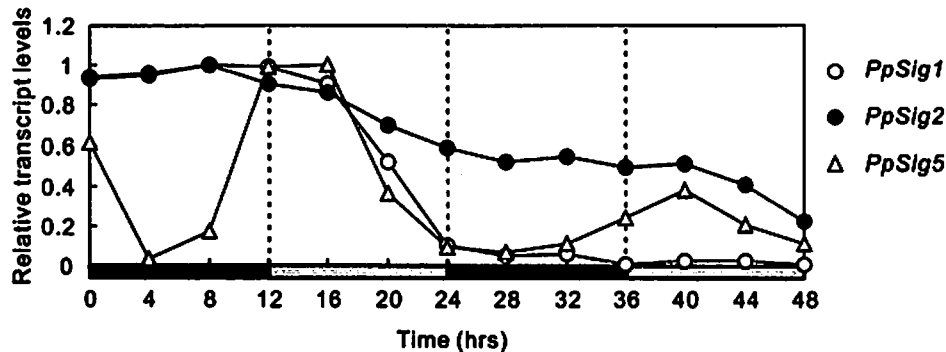
次に明暗サイクル条件 (12 時間明 : 12 時間暗) では、3 つの *PpSig* の発現パターンには互いに違いがあることが分かった (図②参照)。特に *PpSig5* の発現は、明期に高く暗期に低い非常に大きな振幅の日周リズムを示した。



図② 明暗サイクル条件における 3 つの *PpSig* の異なる発現様式

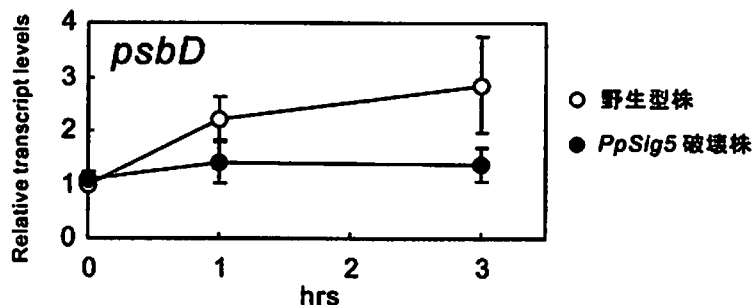
概日時計の制御によるリズム発現は、恒明あるいは恒暗などの恒常条件において 24 時間周期で継続する。3 つの *PpSig* の発現制御に概日時計が関与するか否かを検証するため、恒明あるいは恒暗条件において、それらの発現を経時的に追跡した。恒明条件では、3 つ

の *PpSig* のどれについても日周リズム発現を確認することはできなかった。一方、恒暗条件では、*PpSig5* の発現が減衰型の日周リズムを示した (図③参照)。この結果から、*PpSig5* のリズム発現は、概日時計による内因性の制御を強く受けていることが確認された。



図③ 恒暗条件における3つの *PpSig* の発現様式

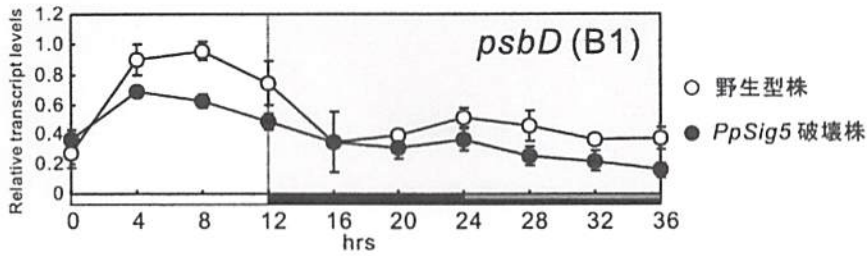
強光ステップ条件と明暗サイクル条件という2種類の光照度の動的変動に対して特徴的発現を示した *PpSIG5* の機能を、さらに直接的に解析することにした。この目的で、遺伝子ターゲティングにより *PpSig5* 破壊株を作製して、幾つかの色素体遺伝子の発現を解析した。色素体遺伝子の一つである *psbD* 遺伝子は、光化学系 II の反応中心 D2 タンパク質をコードし、光合成の電子伝達系において重要な役割を果たしている。強光ステップ条件では野生型株の *psbD* の発現は徐々に上昇した (図④参照)。一方、*PpSig5* 破壊株における *psbD* の発現はほとんど変動がなく、野生型株で観察された発現上昇は消失していた (図④参照)。これらの結果は、*PpSIG5* は強光に应答して発現し、*psbD* の発現誘導を制御していることを示している。この制御機構は、シロイヌナズナの *Sig5* グループのシグマ因子 *AtSIG5* による *psbD* の転写制御機構とよく似ている。*AtSig5* は、強光以外に低温、高浸透圧および高塩濃度の様々なストレスによっても発現が誘導される。*PpSig5* もまた *AtSig5* と同様に、様々なストレスに应答して発現し、ストレスによって損傷した反応中心タンパク質を補修するために働くことが示唆される。



図④ 強光ステップ条件における *psbD* 遺伝子の発現様式

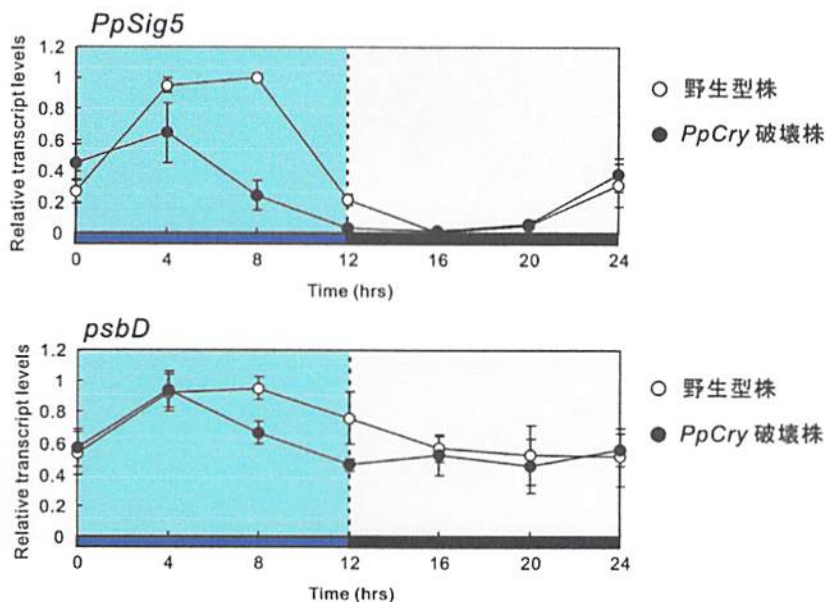
psbD の発現は、明期で高く暗期で低い日周リズムを示し、*PpSig1*、*PpSig2* よりも *PpSig5* に比較的似ている。興味深いことに、*PpSig5* 破壊株においては、明期における *psbD* の mRNA レベルが野生型株に比べて低下していた (図⑤参照)。この結果は、*PpSIG5* が *psbD* の日周的なリズム発現、特にその振幅を維持する制御に関与していることを示している。これは、色素体遺伝子の日周的な発現に対して色素体シグマ因子が関与することを示した初めての知見である。適切な時間帯に必要な色素体遺伝子の mRNA レベルを上

昇させることは、効率的な光合成を行う上で生存上有利に働くと考えられる。



図⑤ 明暗条件における *psbD* 遺伝子の発現様式

クリプトクロム (CRY) は、光シグナル (特に青色光シグナル) を感知する光受容体タンパク質の一つである。クリプトクロムは、概日時計の制御機構においては中心振動体の同調に関与する入力系のタンパク質として重要な働きをしている。コケの2つのクリプトクロム遺伝子を破壊した *PpCry* 破壊株を用いた解析では、青色光明暗条件 (12 時間青色光 : 12 時間暗、青色 LED による照射、 $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、 25°C) において、*PpCry* 破壊株の *PpSig5* と *psbD* の発現の位相が、野生型株に比べて少し前進していることが分かった (図⑥参照)。この結果は、*PpSig5* と *psbD* の日内発現がクリプトクロムによって制御されていることを示唆している。*PpCry* 破壊株と *PpSig5* 破壊株を用いた *psbD* の明暗サイクル条件での発現解析の結果を考え合わせると、次のような説明が可能である。まず、リズムの入力系の入口の一つであるクリプトクロムによって受容された光情報によって、概日時計の中心振動体の“針”が明暗サイクルに正確に同調する。次に、同調した時計に由来する時間情報が *PpSIG5* に伝えられる。その結果、周期的に合成されるようになった *PpSIG5* は色素体へ移行し、*psbD* のリズム発現を制御する。このように、光 → CRY → *PpSIG5* → *psbD*、という順番での時間情報の流れが考えられる。



図⑥ 青色光明暗条件 (12 時間青色光 : 12 時間暗) における *PpSig5* と *psbD* 遺伝子の発現様式

本研究において、*PpSIG5* は強光ステップ条件および明暗サイクル条件という2種類の

基となることは、効率的な光合成を行う上で葉面上に樹こも蓄えられる。

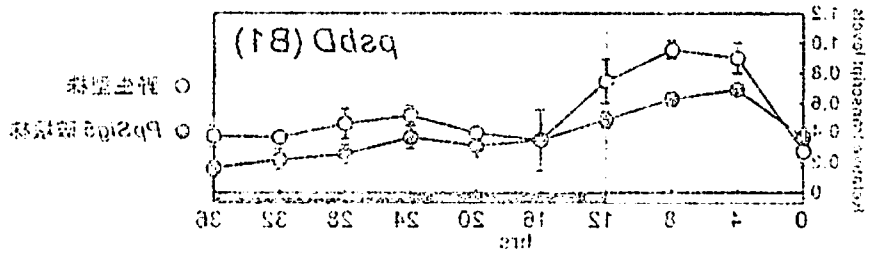


図8 明暗条件におけるPpsig5とPpsig6の相対蛍光

シリマロム (CRY) は、光マシマ (特に青色光マシマ) を感知する光受容体として知られており、擬日明暗の制御機構において中心調節因子として重要な役割を担っている。コウライアムロム遺伝子系を破壊したPpCRY破壊株を用いた実験では、青色光明暗条件 (12時間青色光: 12時間暗) による照射 (40 μmol m⁻² s⁻¹, 25°C) において、PpCRY破壊株のPpsig5とPpsig6の相対蛍光は、野生型株に比べて顕著に減少した。この結果は、Ppsig5とPpsig6の日内変動がシリマロムによって制御されていることを示唆している。PpCRY破壊株を用いたPpsig5とPpsig6の相対蛍光マシマ条件での相対蛍光の結果を組み合わせると、次のような説明が可能である。まず、シリマロム入口の入口であるシリマロムに受容体は液相膜に存在し、中心調節因子の中心調節因子の相対蛍光は、次に正確に同期する。次に、同期した相対蛍光は、Ppsig5とPpsig6の相対蛍光の減少に寄与する。このように、CRY→Ppsig5→Ppsig6とPpsig5の相対蛍光の減少に寄与する。

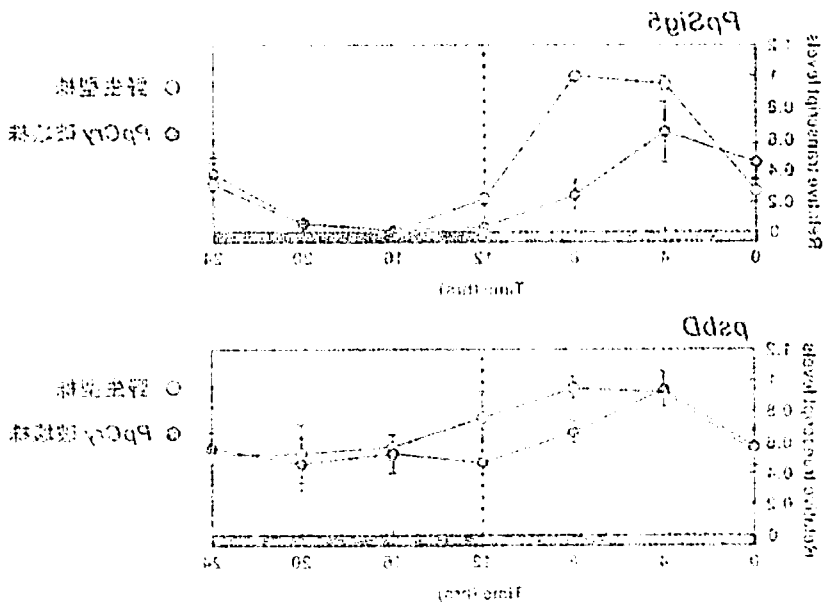
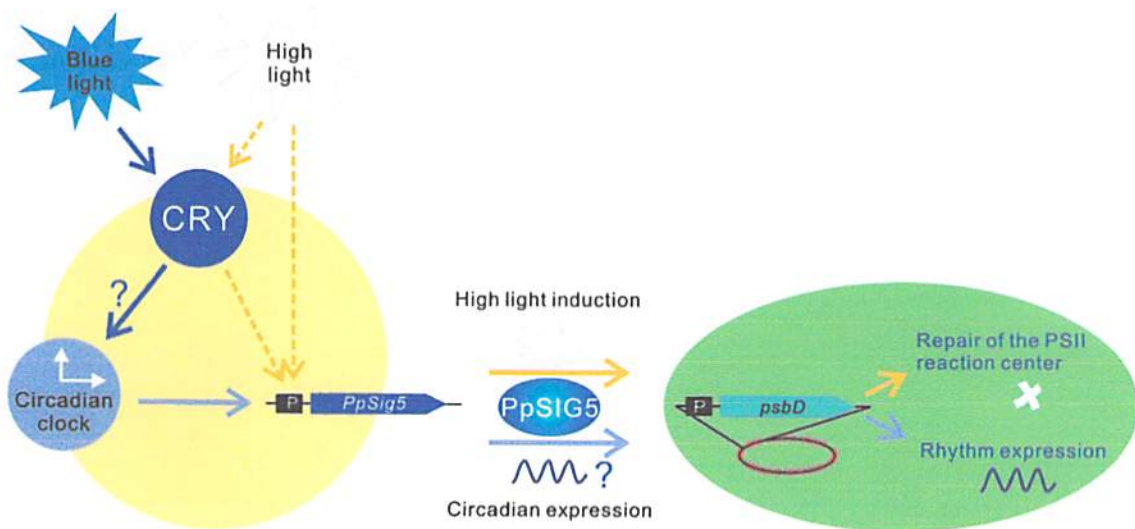


図9 青色光明暗条件 (12時間青色光: 12時間暗) におけるPpsig5とPpsig6の相対蛍光

本研究において、Ppsig5は液相膜に存在するシリマロムに結合し、中心調節因子の相対蛍光は、次に正確に同期する。次に、同期した相対蛍光は、Ppsig5とPpsig6の相対蛍光の減少に寄与する。

光照度の動的変化に適応する上で、シグナル伝達の仲介役を担い、*psbD* の発現を制御していることが明らかになった (図⑦参照)。強光ステップ条件のような急激な照度変化においては、強光シグナルに反応して *PpSig5* が特異的に発現し、*psbD* の発現を誘導することによって、強光ストレスで損傷した光化学系の反応中心タンパク質を補修すると考えられる。一方、明暗サイクル条件では、クリプトクロムにより調節された概日時計の制御を受けて *PpSIG5* がリズム発現し、色素体へ移行した後、*psbD* の日周リズムを制御すると考えられる。つまり *PpSIG5* は、自然環境下における多重で動的な光の変化に対して適応する上で、重要な制御因子であると位置づけることができる。



図⑦ *PpSIG5* を介した *psbD* 遺伝子の発現制御機構のモデル図

