

3 シグマ因子の多様性からみた葉緑体の機能発現

Multiple Factors Engaged in Building up the Functional Chloroplasts

加藤秀起, 小林裕和†

Kato Hideki, Kobayashi Hirokazu

静岡県立大学大学院 生活健康科学研究科 食糧(植物)細胞工学研究室

† E-mail: hirokazu@smail.u-shizuoka-ken.ac.jp

KEY WORDS シグマ因子, 多様性, 葉緑体, 機能発現, 転写制御

葉緑体は植物細胞におけるエネルギーの獲得(光合成)・供給機能を担い, その遺伝情報は細胞核と葉緑体の両ゲノムに分散してコードされている。葉緑体ゲノムにコードされる光合成遺伝子の発現は, その転写を制御するRNAポリメラーゼ(シグマ)因子を介して核遺伝子の制御下にある。本稿では因子の多様性からみた葉緑体機能発現について考察する。

はじめに

葉緑体(chloroplast)はプラスチド(plastid)の一種であり, プラスチドはギリシャ語の“plastikos”(意味“molded”)に由来し可塑性に富むオルガネラである。未分化なプロプラスチド(proplastid)は緑葉細胞においては葉緑体に発達するが, 被子植物の場合, 暗所ではクロロフィルを蓄積しないエチオプラスト(etioplast)になり葉は黄化する。一方, プラスチドは, 種子あるいは根など貯蔵組織ではデンプンを蓄積し, 白色体(leucoplast)の一種であるアミロプラスト(amyloplast)に分化する。また, 花や果実では赤色のリコピンなどを蓄積し, クロモプラスト(chromoplast)に発達する^{1), 2)}。

プラスチドの遺伝子発現は, 遺伝子量, 転写, 転写後, 翻訳, および翻訳後の各段階での制御を受ける^{1)~6)}。緑葉葉緑体における光合成遺伝子発現は, 非光合成プラスチドとの対比あるいは非光合成プラスチドとの変換過程

において評価されるが, 非光合成プラスチドの多様性が, それらとの対比において議論される葉緑体光合成遺伝子発現の制御機構の一律な理解を困難にしている。そこで筆者らは, シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)を用いて, 光合成器官である緑葉と非光合成器官である根におけるプラスチド光合成遺伝子発現を解析した。それによると, DNAコピー数および転写産物の安定性による制御の介在を確認したが, 転写活性において最も顕著な差を認めた⁷⁾。これはメチル化等のDNA修飾による制御ではなく, 転写装置活性の違いによる制御と考えられた⁷⁾。1997年に筆者らを含む国内の研究グループが(シグマ)因子^{*1, 8), 9)}を, また国外の研究グループがNEP(後述)¹⁰⁾をクローニングしたことにより, プラスチド遺伝子の基本的転写装置が明らかになり今日の研究の礎が築かれた。

◆◆ 1. RNAポリメラーゼ

植物のプラスチドにおける転写装置は2つに大別される。一つはNEP(nuclear-encoded plastid RNA polymerase)とよばれるバクテリオファージ型RNAポリメラーゼである。これは細胞核にコードされており, 細胞質基質を介してプラスチドに輸送される。もう一つは細菌型RNAポリメラーゼであり, PEP(plastid-encoded RNA polymerase)とよばれる。このコア酵素はプラスチドゲノムにコードされている。プラスチドにおける転写

*1 (シグマ)因子細菌RNAポリメラーゼ(2)およびplastid-encoded plastid RNA polymerase (PEP, 2)の構成サブユニットの一つ。コア酵素(2)あるいは(2)に因子が結合することにより(ホロ酵素), 転写が開始する。各生物種において因子は複数種存在し, 転写される遺伝子のプロモーター特異性を支配する。

は、これら2種類のRNAポリメラーゼが協力することで制御されていると考えられる。

1. NEP

細菌型RNAポリメラーゼとは異なるRNAポリメラーゼの存在は、寄生植物であるピーチドロップ(*Epifagus virginiana*)のプラスチドゲノムにおいて、*rpo* 遺伝子が欠失しているにもかかわらず、プラスチドゲノム上の遺伝子が発現することから示唆された¹¹⁾。また、タバコ(*Nicotiana tabacum*)などで決定されたプラスチドゲノムには、細菌型RNAポリメラーゼのプロモーターである-35および-10配列をもたない遺伝子が見いだされ、さらに核コードと考えられる110kDaの単サブユニットからなるRNAポリメラーゼがハウレンソウ(*Spinacia oleracea*)の葉緑体から精製された¹²⁾。1997年にシロイヌナズナより、葉緑体やミトコンドリアに輸送される核コードのバクテリオファージ型RNAポリメラーゼ(NEP)遺伝子がクローニングされた¹⁰⁾。NEPは、主として細菌型RNAポリメラーゼのコア酵素を構成するサブユニット遺伝子*rpoB*(後述)を含むハウスキーピング遺伝子*2の転写を司る¹²⁾(NEPによる制御については第2章-4参照)。

2. PEP

1980年代には、タバコをはじめとしてさまざまな植物についてプラスチドゲノムの全塩基配列が決定され、それら遺伝子の中から細菌型RNAポリメラーゼのコア酵素を構成するサブユニットの遺伝子群が見いだされた。しかしながら、実際にそれらが細胞内で発現し、さらに機能しているのか疑問視されていた^{13), 14)}。その後、トウモロコシ(*Zea mays*)単離葉緑体より細菌型RNAポリメラーゼが単離精製され、それらの部分アミノ酸配列が決定された¹⁵⁾。その結果、これが細菌型RNAポリメラーゼのコア酵素を構成するサブユニットである、'、'、'であることが明らかとなった¹⁵⁾。これらの研究において解析されたのは、コア酵素のサブユニットのみであり、この時点で、プロモーター認識能をもつ因子あるいはその遺伝子(*rpoD*, 現在では*sig*が用いられる)は見いだされなかった。

3. 因子

真核藻類から双子葉植物まで、多種の因子遺伝子あるいはcDNAがクローニングされている。これらはすべて核コードである。高等植物ではシロイヌナズナの遺伝情報が最も詳細に解析されている。シロイヌナズナの因子の一次構造は、大腸菌(*Escherichia coli*)の主要因子である⁷⁰⁾と相同性が高い(図1)。また、各植物種ごとに因子は複数種あるものと思われる。葉緑体と共通の先祖に由来すると考えられているシアノバクテリア(ラン藻, cyanobacteria)では、増殖に必要な主要因子(グループ1)のほかに、グループ1とアミノ酸配列は類似しているが、増殖に必須でないグループ2の因子が多数見いだされている^{17), 18)}。このため、高等植物もシアノバクテリアと同様、各因子が役割分担をもち、それぞれ認識するプロモーター配列が異なる可能性が高いと考えられる。

◆ 2. シグマ因子の多様性

1. 主要因子

細胞進化において、最近の知見は共生説を支持し、葉緑体の起源はシアノバクテリアの祖先にあると考えられている。したがって、まず初めに高等植物における因子の機能を理解する一助として、シアノバクテリアの因子も含めてその多様性を整理したい。

シアノバクテリアには複数個の因子がコードされており、各々の因子がストレスを含むさまざまな環境条件(温度、光など)に応答し、遺伝子発現を制御することで環境変動に適応していると考えられる。主要因子(グループ1因子)は、細胞の増殖・分裂に必要な遺伝子の発現を司る^{17), 19)}。しかし、シアノバクテリアではグループ1以外に、構造上グループ1因子と類似した(ただし領域1.1を除く)グループ2因子が知られている。グループ2因子遺伝子の破壊株は、通常の生育においては野生株と有意な差異が認められない。したがって、これらの因子は生育に必須ではないと考えられている。これらグループ2因子は、環境変化あるいはストレスに対する適応において重要な役割を演じて

*2 ハウスキーピング遺伝子

細胞の一般的な機能に必要なタンパク質である細胞構成タンパク質や解糖系酵素などをコードする遺伝子。このような遺伝子は、細菌などでは恒常的に、また真核生物では分化の異なるような細胞でも発現していると考えられる。

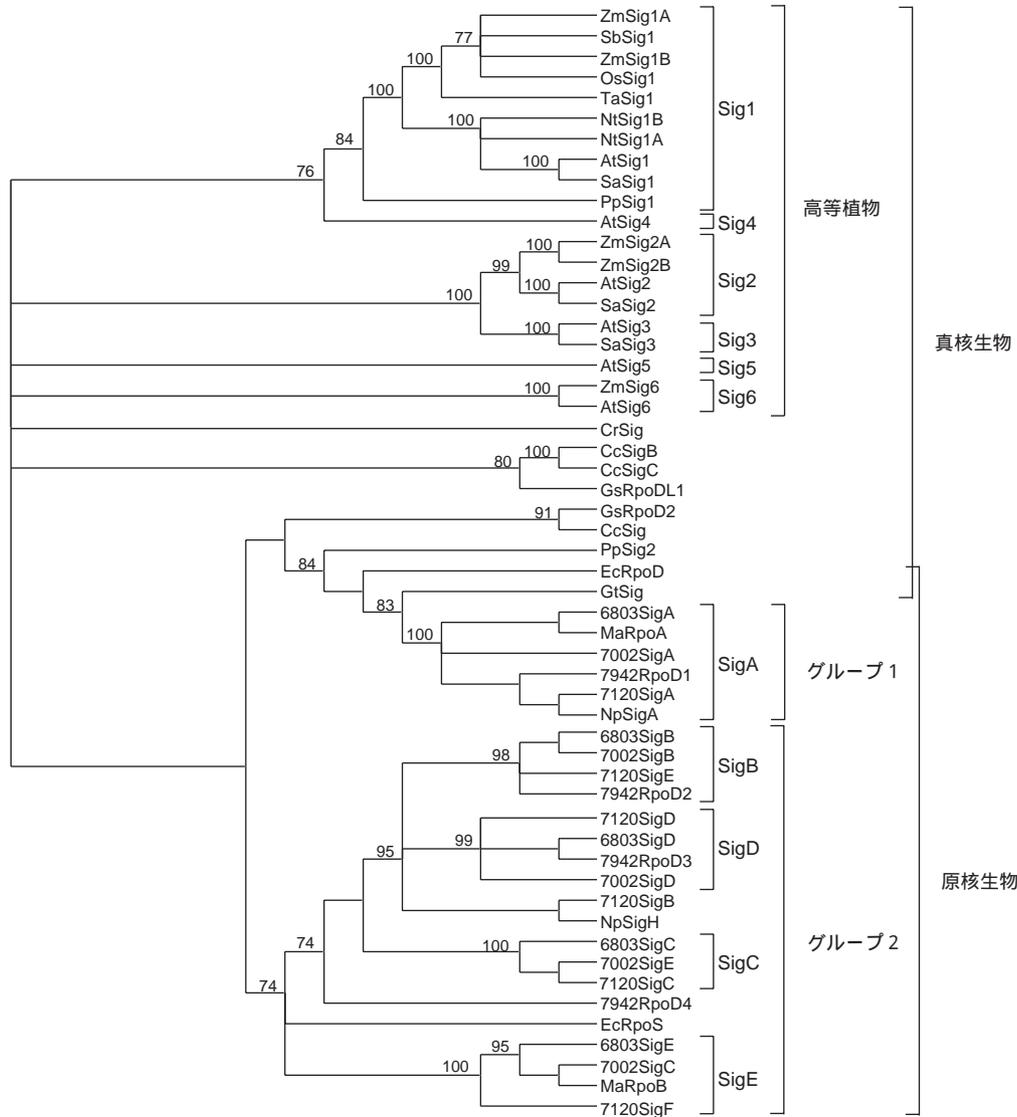


図1 植物 因子(70 ホモログ)の系統樹(口絵参照)

植物型光合成を営む生物の PEP を構成する 因子について, GenBank および CyanoBase に登録されているアミノ酸配列すべて網羅し(ただし, 同一生物種由来の同一分子種については重複を割愛), 系統樹を作成した. 因子の機能配列(2.1領域から4.2領域のうちの保存配列)に対して, 系統樹解析を行った[MacVector 7.1.1, Oxford Molecular Group, Inc.; ClustalW alignment; neighbor joining; bootstrap (collapse nodes: < 50%) midpoint rooting]. 樹中の数字は, ランダムに抽出した座位についての1000回の解析の再現性(%)を示す. 生物種, 因子遺伝子産物名, およびデータベースの accession number は, 表1のとおりである. 青字はシアノバクテリア, 緑字は真核藻類, 茶色字は原核生物を示す. なお, 細菌のグループ3 因子は, 70 ホモログに相当しないため, 本系統樹には含まれていない.

いると考えられている^{18), 20)}. *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Anabaena* sp. PCC 7120, および *Synechococcus elongatus* PCC 7942 から, これら 因子遺伝子群がみついている. これら 因子の機能配列(2.1領域から4.2領域のうちの保存配列)に対して系統樹解析*^{3, 21)}を行うと, 各シアノバクテリア種の 因子はグループ1を含む少なくとも5つのクラス

ターに分けられる. グループ1は大腸菌の 70 (RpoD)に最も近く, 1クラスターからなる. グループ2には少なくとも他の4つのクラスターが所属する. シアノバクテリアでは, グループ1ともグループ2とも相同性が低い 因子も複数見いだされている. これらはグループ3とよばれ, これらも生育には必須ではない. 現在までに, SigFが織毛運動*⁴に関与し

*3 系統樹解析

相同性の高い領域のアミノ酸配列や, リボソームRNA等の塩基配列を元に, 進化の過程を推定することができる. また, 目的の遺伝子などがどのような経緯で保存されてきたのかを類推することも可能である. このような解析法のことを指し, 得られる系統樹は分子系統樹ともよばれる.

*4 織毛運動

単細胞生物の運動系で, 織毛は重要な働きをもつ. ソウリムシの織毛運動は光などの環境に応答し, 運動様式(織毛の打つ頻度と向き)を変化させることによって個体全体を移動させる. 織毛運動の基本的なメカニズムは, タブレット微小管同士が滑りあうことで運動を行っていると考えられている.

表1 植物 因子の生物種、遺伝子産物名、およびデータベースの accession number

グループ	生物種(学名)	接頭文字	因子の遺伝子産物	accession number	
高等植物	シロイヌナズナ(<i>Arabidopsis thaliana</i>)	At	Sig1	AB004821	
			Sig2	AB004820	
			Sig3	AB004822	
			Sig4	AB021119	
			Sig5	AB021120	
			Sig6	AB029916	
	タバコ(<i>Nicotiana tabacum</i>)	Nt	Sig1A	AB023571	
			Sig1B	AB023572	
	イネ(<i>Oryza sativa</i>)	Os	Sig1	AB005290	
	シロガラシ(<i>Sinapsis alba</i>)	Sa	Sig1	Y15899	
			Sig2	AJ276656	
			Sig3	AJ276657	
	ソルガム(<i>Sorghum bicolor</i>)	Sb	Sig1	Y14276	
	コムギ(<i>Triticum aestivum</i>)	Ta	Sig1	AJ132658	
	トウモロコシ(<i>Zea mays</i>)	Zm	Sig1A	AF058708	
			Sig1B	AF058709	
			Sig2A	AF099110	
			Sig2B	AF099111	
			Sig6	AF099112	
			Sig1	AB059354	
コケ類	ヒメツリガネゴケ(<i>Physcomitrella patens</i>)	Pp	Sig2	AB046872	
真核藻類	クラミドモナス(<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)	Cr	Sig1	AB049220	
			Sig	AB056579	
	クリプト藻	<i>Guillardia theta</i>	Gt	Sig	D83179
	原始紅藻	シアニジウム(<i>Cyanidium caldarium</i> RK-1)	Cc	Sig	AB006798
				SigB	AB006799
		<i>Galdieria sulphuraria</i> (<i>Cyanidium caldarium</i> , Allen strain)	Gs	RpoDL1	L42639
RpoD2				AF050634	
原核生物	シアノバクテリア	6803	SigA	D90916	
			SigB	D63999	
	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	7002	SigC	D64002	
			SigD	D90908	
			SigE	D90908	
			SigA	U15574	
			SigB	U82435	
	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	7942	SigC	U82436	
			SigD	U82484	
			SigE	U82485	
			RpoD1	D10973	
			RpoD2	AB006910	
	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	7120	RpoD3	AB024709	
			RpoD4	AB024710	
			SigA	M60046	
			SigB	M95760	
			SigC	M95759	
			SigD	AF262216	
			SigE	AF262217	
	SigF	AF262218			
<i>Microcystis aeruginosa</i> K-81	Ma	RpoD1	D85684		
		RpoD2	D86575		
<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	Np	SigA	AF265349		
		SigH	AF022822		
大腸菌	<i>Escherichia coli</i>	Ec	RpoD	J01687	
			RpoS	X16400	

高等植物 因子遺伝子は、核ゲノムにコードされている。The Commission on Plant Gene Nomenclature (CPGN) により、核遺伝子は、1文字目を大文字で、プラスチド遺伝子は1文字目を含む通常3文字を小文字で表記することが推奨されている¹⁶⁾。しかしながら、The Steering Committees for the Arabidopsis Genome Project は、シロイヌナズナの核遺伝子の命名において、野生型を全文字大文字、突然変異型を全文字小文字で表記することを規定している¹⁶⁾、両命名法には矛盾が生じる。たとえば *Sig1* の場合、一般的には *Sig1* を用い、特にシロイヌナズナ野生型であることを明確にしたい場合には、*SIG1* を用いる。また、シロイヌナズナ 因子 cDNA は、当初、複数の研究グループによりそれぞれ独立に解析が進められたため、同一遺伝子に対して異なる呼称が与えられた。CPGN の要請に応え、この種の混乱を避けるために研究グループ間で協議し、高等植物については図1に示す命名が現在採用されている。この詳細は、以下を参照されたい。

ワーキンググループウェブサイト <http://sfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/pctech/sigma/proposal/>

CPGN ウェブサイト <http://mbclserver.rutgers.edu/CPGN/>

なお、DDBJ/EMBL/GenBank に登録された accession number のデータベースにおいては、登録時の命名が訂正されておらず、本遺伝子命名と異なる場合がある。また、シアノバクテリアの 因子遺伝子の命名については、いまだ研究者間で同意されていない。

ていることが報告されているが、大腸菌の³²のように特別なストレスに反応している可能性も考えられる²²⁾。

2. 因子の進化

細菌主要因子の保存配列との相同性を利用して、1996年に真核生物である原始紅藻(*Cyanidium caldarium*, *Galdieria sulphuraria*)より核コード因子遺伝子がクローニングされた。その間、筆者らを含む複数の研究グループにおいて、高等植物からの因子遺伝子のクローニングが試みられていたが、細菌因子遺伝子との相同性を利用した高等植物因子遺伝子のクローニングは不可能であった。シロイヌナズナのゲノムプロジェクトの一環として、EST (expressed sequence tag) データベースが拡充し、これを利用して1997年にシロイヌナズナ因子のcDNAがクローニングされた(*SIG1*, *SIG2*, および *SIG3*)。その後、シロイヌナズナにおいては核ゲノム全塩基配列決定が終了し、現在までに6個の因子遺伝子が同定されている。高等植物の因子について系統樹解析を行うと、大きく6つのクラスターに分けられる。これらのなかにシアノバクテリアのような主要因子は同定はされていないため、現時点ではシアノバクテリアのようなグループ分けは困難である。

シアノバクテリアとプラスチドは祖先を共有すると考えられるが、因子の系統樹において、シアノバクテリアを含む原核生物クラスターと高等植物クラスター内での因子の相同性は、原核生物クラスターの方が高い。高等植物の因子については、Sig1とSig4の共通祖先、Sig2とSig3の共通祖先、Sig5、およびSig6の4種類にまず分岐し、それぞれ異なる進化を遂げたと考えられる。興味深いことに、ヒメツリガネゴケ(*Physcomitrella patens*)の2種類の因子のうち、Sig1 (PpSig1)が高等植物のグループに、Sig2 (PpSig2)が原核生物の分岐鎖に位置する。高等植物のSig1クラスターは単子葉植物型と双子葉植物型とに二分されるが、ヒメツリガネゴケSig1はそれら両方に対して側系統となる。一方、進化的にシアノバクテリアと高等植物の中間に位置すると考えられる真核藻類については、緑藻(*Chlamydomonas*

reinhardtii)および原始紅藻の一部は、それぞれ因子の系統樹のルートから直接分岐する。意外なことに、残りの原始紅藻因子は、シアノバクテリア主要因子(グループ1)を含む分岐鎖に収まり、コケ類の進化に興味をもたられる。大腸菌³³(RpoS)と相同なグループ2に属するシアノバクテリアの因子については、SigBとSigDが近縁であり、SigCがこれらと祖先を共有する。SigEはこのグループの中において、進化の早い時期に分岐したと考えられる。

3. PEPによる発現調節

コムギ(*Triticum aestivum*)を用いたrun-on転写実験^{*5}により、光合成遺伝子である*psbA*(光合成光化学系II反応中心D1タンパク質^{*6}遺伝子)、*psbD*(光合成光化学系II反応中心D2タンパク質遺伝子)、*psbC*、および*psbE*遺伝子の転写活性が比較された。その結果、暗順化した葉身の基部に存在するRNAポリメラーゼは、*psbA*、*psbD*、*psbC*、および*psbE*遺伝子を転写し、明所で生育させた葉身の先端部のRNAポリメラーゼは、*psbA*および*psbD*遺伝子を高発現させることが明らかになった²³⁾。変異を導入した*psbA*プロモーターを用いた*in vitro*転写実験において、葉身基部に由来するRNAポリメラーゼによる転写は、-10および-35プロモーター配列を必要とするのに対し、葉身先端部RNAポリメラーゼは-35プロモーター配列を必要としないことが示された²³⁾。また、コムギの*psbD*遺伝子は複数のプロモーターをもち、光の種類などで使用されるプロモーターが異なることが知られており、そのプロモーターの一つであるLRP(light-responsive promoter)からの転写は概日リズムに支配されている²⁴⁾。さらに、*SigA* mRNAも同様に概日リズムを示し、このリズムが光合成遺伝子の概日リズムに関与している可能性が示唆された²⁵⁾。これらの結果は、プロモーター特異性の異なる複数の因子の介在、および光合成に伴い破壊されるD1タンパク質(*psbA*産物)を迅速に更新するための因子を介した制御を予測させる。

*5 run-on転写実験
試験管内において、通常[³²P]UTPの存在下で単離された核や葉緑体における転写伸張反応を継続させ、合成されたRNA量をハイブリダイゼーションにより定量する方法。これにより、単離時の生体内転写活性を見積もることができると。

*6 D1タンパク質
歴史的には、単離葉緑体に放射性アミノ酸を取り込ませ、合成された主なペプチドを分子量の大きい順に名付けた際の“ピークD”タンパク質の一つ。これは、葉緑体ゲノムにコードされる*psbA*遺伝子の産物であり、光化学系II反応中心タンパク質の一つである。

シロイヌナズナでは, *sig2* 変異系統を用いた実験より²⁶⁾, *SIG2* がプラスチドの発達に重大な役割を果たしていることが明らかになった. *sig2* 変異系統は, 通常生育条件においても植物体が黄緑色を呈し葉緑体が十分発達しなかった²⁶⁾. また, 葉緑体の発達は顕著に阻害されるのに対し, エチオプラストの発達はそれほど影響を受けなかった. 詳細な解析が行われ, *SIG2* が少なくとも4つのtRNAの転写に関与しており, そのため *psbA* や *rbcL* (RuBisCO L サブユニット遺伝子) 等の光合成遺伝子の発現が翻訳段階で抑制されていることが明らかになった^{26), 27)}.

複数の因子が認識するプロモーターの特異性を検討するために, シロイヌナズナ *SIG1*, *SIG2*, および *SIG3* をそれぞれ強制発現させたタバコ培養細胞 BY-2 形質転換系統を作製し, 各系統におけるプラスチド遺伝子発現がモニターされた. その結果, これらの *SIGs* は *psbA*, *pabD*, および *rbcL* の発現を促進したが, その程度は各 *SIG* によって異なり, *SIG1* および *SIG3* は主に光化学系の遺伝子 (*psbA* および *pabD*) の発現を促進し, *SIG2* は *rbcL* の発現を促進した. *psbA*, *pabD*, および *rbcL* のプロモーターには, 真正細菌型で知られている保存配列 (-35 領域 5'-TTGACA-3', -10 領域 5'-TATAAT-3') が存在した. すなわち *psbA* および *pabD* の -35 領域は 5'-TTGA--C-3' が, -10 領域は 5'-TAT-CTG-3' が保存されており, *rbcL* の -35 領域は 5'-TTGC--T-3' が, -10 領域は 5'-AATA-3' が保存されていた. したがって, *SIG1* および *SIG3* はより真正細菌型のプロモーター構造に近い配列に対して, また *SIG2* は少し異なった配列に対して親和性が高いことが明らかとなった (Yoshimoto ら; 未発表).

◆ 4. シグナル伝達

1. 因子生合成における制御

葉緑体遺伝子は, 光にตอบสนองして発現することが知られているため, この過程における因子の関与に興味もたれる. 光形態形成異常あるいは光制御遺伝子発現異常シロイヌナズナ突然変異体を用いて, 因子遺伝子の発

現を調べたところ, すべての因子は核遺伝子で知られている光シグナル伝達系の支配下にあることが明らかになった. このことは, 因子が核から葉緑体へのシグナル伝達を担っていることを示唆する. また, コア酵素 サブユニットをコードする *rpoB* の発現も同様な支配下にあることから, *rpoB* を転写する NEP も 因子と同様の光シグナル伝達系の支配下にあるものと考えられる. 波長の異なる光による照射実験を行い, 因子およびプラスチド光合成遺伝子の発現を調べたところ, 赤色光, 近赤外光および青色光ともに 因子の発現を促進した. このときのプラスチド光合成遺伝子発現をみると, 赤色光および青色光において 因子遺伝子の発現と相関は低かった (Shimizu ら; 未発表). これは, プラスチド遺伝子発現に重要な因子が, 翻訳および翻訳後の修飾の制御を受けるためと考えられる.

プラスチド光合成遺伝子は緑葉で発現し, 非光合成組織である根では発現しない. この種の緑葉特異的遺伝子発現は, 核にコードされる光合成についても同様にみられる. 核にコードされた光合成遺伝子として RuBisCO S サブユニット遺伝子 (*RBCS*) およびクロロフィル *a/b* 結合タンパク質遺伝子 (*CAB*, *LHC*) 両遺伝子群の発現に着目し, これら遺伝子のプロモーターの制御下に各種レポーター遺伝子を置いたシロイヌナズナ形質転換系統を作製した. 形質転換植物系統に対し, アクティベーションタギング^{*7} を含む各種変異処理を行い, レポーター遺伝子発現産物活性により選抜し, *ces101* (callus expression of *RBCS*), *des1* (depressed expression of *RBCS*), および *des2* 系統を得た. アクティベーションタグされた *ces101* 系統カルスは緑色を呈し, ノーザン解析による *RBCS* 遺伝子の発現量は野生系統カルスの約 700 倍であった. また, 葉緑体光合成遺伝子発現を制御する 因子遺伝子 *SIG1* の発現も増大していた (Goto ら; 未発表). さらに, EMS 処理 *des1* 変異系統においては, *SIG2* の発現が低下していた.

2. タンパク質修飾による制御

緑藻の D1 タンパク質 (*psbA*) は, 暗条件下

*7 アクティベーションタギング

植物においては T-DNA あるいはトランスポゾンとして, 既知の DNA 断片をゲノムにランダムに挿入し突然変異体を得る方法をタギングとよぶ. このうち, DNA 断片にエンハンサー (カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーター中の配列など) を含ませ, 挿入されたエンハンサーの近くの遺伝子の転写を活性化することにより変異体を選抜する方法.

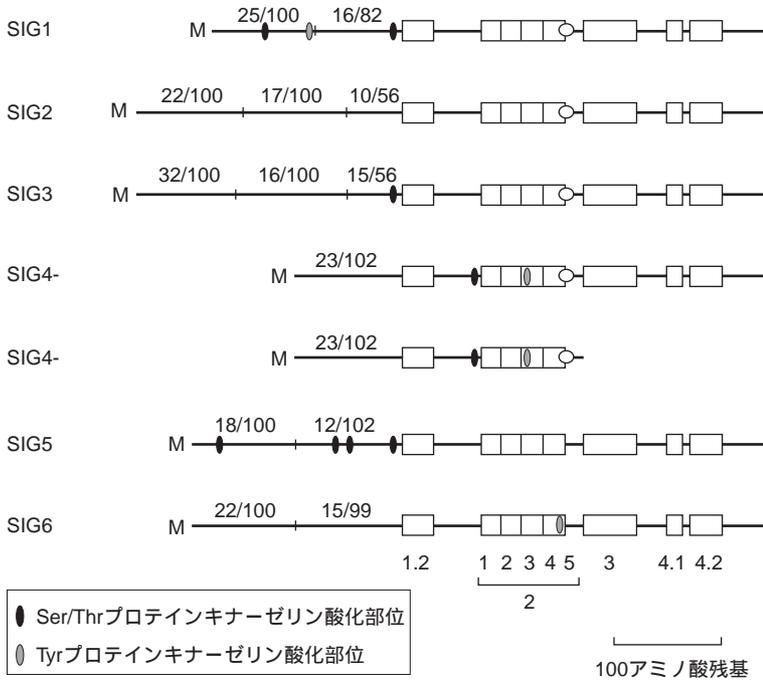


図2 シロイヌナズナ 因子のリン酸化可能部位

リン酸化部位は、MacVector 7.1.1 (Oxford Molecular Group, Inc.) および Prosite (<http://kr.expasy.org/cgi-bin/scanprosite/>) により推定した。これらのいくつかについては、推定されるリン酸化部位を削除したペプチドによるシロイヌナズナ形質転換システムを作成し、それらリン酸化部位の因子活性への影響を確認した。図中下側の数字(1.2, 2.1, 2.2...)等は、因子の保存ドメイン領域名を示す。各ペプチド上の数字は、100 アミノ酸残基当たりのセリン(Ser)とスレオニン(Thr)の合計残基数を示す(プラスチドへの取込みに必要なトランジットペプチドは、SerとThrに富んでいる)。SIG4 遺伝子からは、RNA の選択的スプライシング(alternative splicing)により2種類のペプチドが産生されると考えられる。

において cPDI (chloroplast protein disulfide isomerase) がリン酸化されることにより cPABP (chloroplast polyadenylate-binding protein) が不活化され、翻訳が抑制される²⁸⁾。オオムギ (*Hordeum vulgare*) では、*psbD* LRP からの発現にリン酸化が関与している²⁹⁾。このように、リン酸化/脱リン酸化は、光合成遺伝子の転写および翻訳レベルでの発現調節に重要である。リン酸化は対象酵素を直接活性化あるいは不活性化するため、それによる調節は迅速である。シロガラシ (*Sinapis alba*) においては、*in vitro* リン酸化実験によって、Ser/Thr プロテインキナーゼによる様因子 (SLF) のリン酸化が認められ、暗条件下では SLF52 および SLF29 がリン酸化される^{30)~32)}。さらに、葉緑体より Ser/Thr プロテインキナーゼの遊離型と PEP 結合型が単離され、PEP のリン酸化に関与していることが明らかとなり、これらは PTK (plastid transcription kinase) と名付けられた³⁰⁾。

一方、葉緑体においては、光化学系 I (PS I) と光化学系 II (PS II) の間で電子伝達を行うプラストキノンの酸化還元状態が光条件によって変動する。シロガラシでは、プラストキノンの酸化還元状態により、PS I および PS II

の反応中心タンパク質の遺伝子 *psaAB* と *psbA* が転写レベルで制御されていた。すなわち、プラストキノンの酸化状態では *psbA* の転写が促進され、還元状態では *psaAB* の転写が促進されることが run-on 転写実験より明らかになった³³⁾。

PTK は、グルタチオンの還元型 (GSH) / 酸化型 (GSSG) (チオール / ジスルフィド) 変換により、活性が制御されることが確かめられた³⁴⁾。GSH を用いた *in vitro* 実験では、PTK 活性は大きく減少したが、GSSG や DTT 等では活性に差はみられなかった³⁴⁾。また、強光下において GSH の絶対量は減少したが、GSSG の減少が著しいため、GSH/GSSG 比としては増加し、光合成遺伝子の転写活性も増大した。生育光では、GSH/GSSG 比は、強光時の 30% 程度までに減少し、光合成遺伝子の転写産物量も強光時の 50% 近くまで減少することが確認された³⁴⁾。これらの結果は、因子のリン酸化を介しているかは断定できないが、強光条件下では、GSH/GSSG 比の増加による PTK の不活性化により、PEP の脱リン酸化状態を促し、転写活性が増大することを想定させる。

シロイヌナズナ 因子には、複数の Ser/

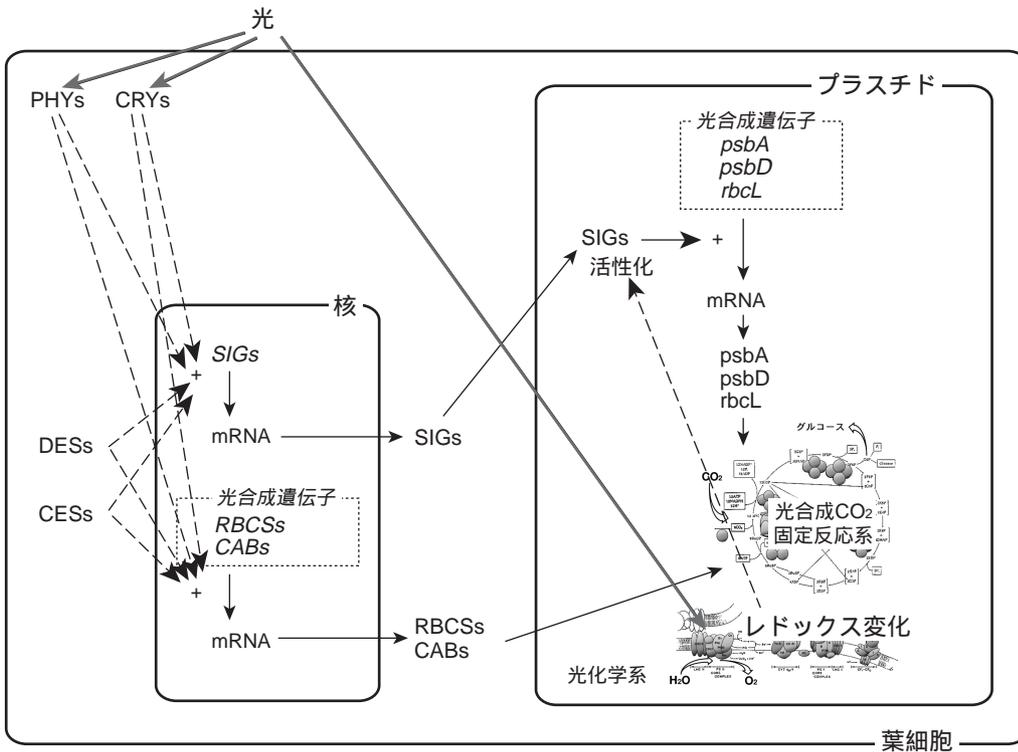


図3 因子を介した葉緑体光合成機能発現制御機構の仮説(口絵参照)

葉緑体ゲノムにコードされる光合成遺伝子の発現は、光依存かつ緑葉特異的に転写レベルで制御されている。この転写活性は、PEPを構成する因子の種類、量、および質の変化により調節されている。種類および量は、既知の光シグナル伝達系および未知の光合成器官特異的核遺伝子発現シグナル伝達系の制御下にあると思われる。また、質的变化としては、光化学系由来レドックスの変動による因子の活性制御があげられる。光合成装置のうち、その遺伝子が核ゲノムにコードされるものは赤で、プラスチドゲノムにコードされるものは緑で示した。イタリック体表示は遺伝子を、通常文字表示は遺伝子産物タンパク質を表わす。PHY; フィトクロム, CRY; クリプトクロム, RBCS; RuBisCO Sサブユニット, CAB; クロロフィル *a/b*-結合タンパク質(LHC), *psbA*; 光合成光化学系 II 反応中心D1 タンパク質, *psbD*; 光合成光化学系 II 反応中心D2 タンパク質, *rbcL*; RuBisCO Lサブユニット, DES; 緑葉 *RBCS* 発現低下突然変異野生型遺伝子産物 (depressed expression of *RBCS*), CES; カルス *RBCS* 発現アクティベーションタグ遺伝子産物 (callus expression of *RBCS*)。

Thr プロテインキナーゼリン酸化部位が予測される(図2)。これらのいくつかを欠失した因子を強制発現するシロイヌナズナ形質転換システムを作製した。この形質転換システムを暗順応の後、葉緑体遺伝子発現で解析したところ、リン酸化部位欠失システムでは遺伝子発現が野生型因子強制発現システムより約2倍高かった(Shimizuら;未発表)。このことは、因子のリン酸化を介した葉緑体遺伝子発現の光制御を示唆する。

葉緑体ゲノムにコードされる光合成遺伝子は、光依存かつ緑葉特異的に転写レベルで制御されていると考えられる。この転写活性は、PEPを構成する因子の種類、量、および質

の変化により調節されていると考えられる。種類および量は、既知の光シグナル伝達系および未知の光合成器官特異的核遺伝子発現シグナル伝達系の制御下にあると思われる。また、質的变化としては、光化学系由来レドックスの変動によるリン酸化が関与していると考えられる(図3)。

おわりに

高等植物は、光合成により太陽エネルギーを利用して独立栄養的に成長する能力を有する。また、環境の変化に対する応答・適応能力をもち、個体としては一定個所に固着して

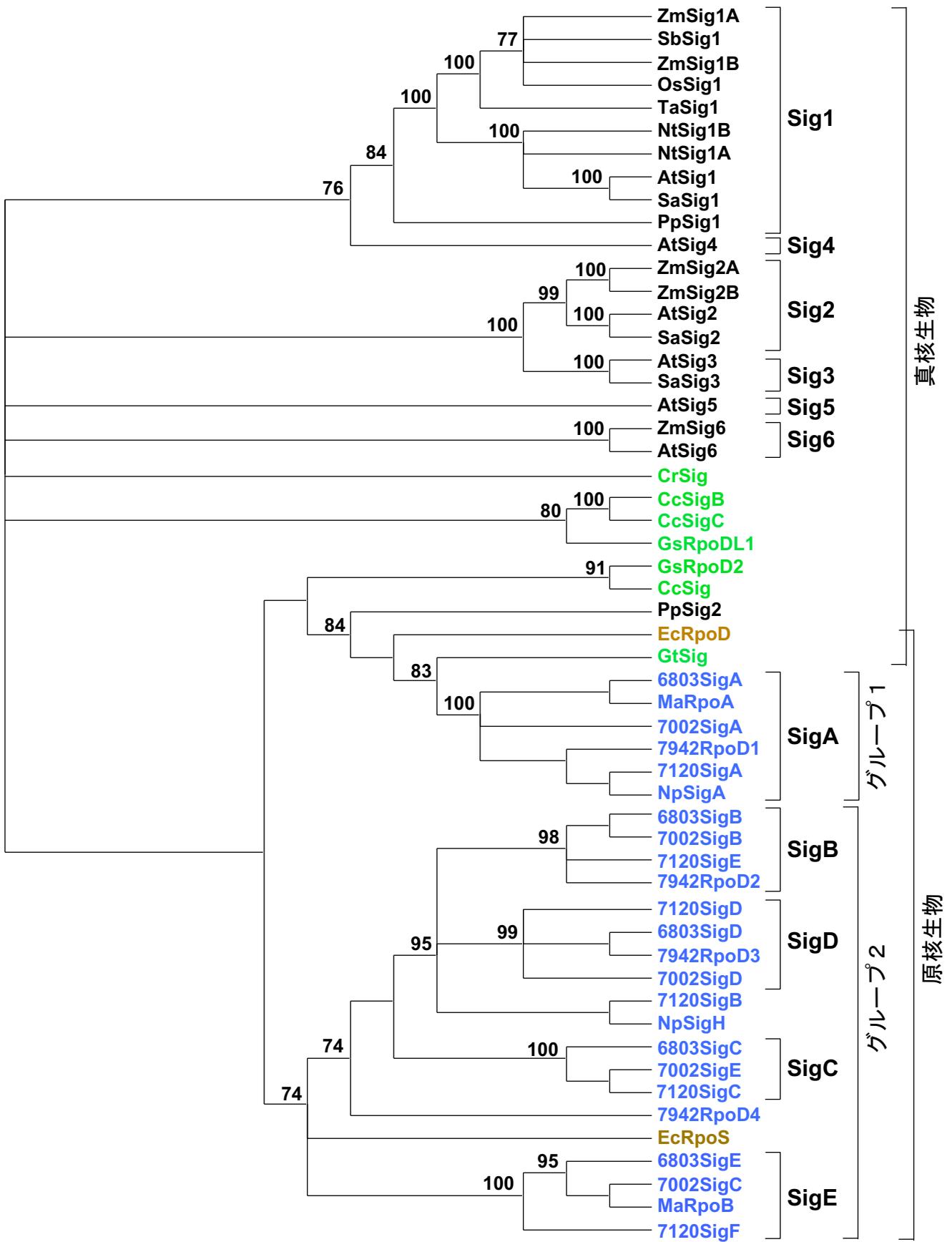
一生を終える。この植物の2大特徴を最も集約した形で表しているのが葉緑体であるといえる。すなわち、葉緑体は光合成を行うがゆえに、昼夜において光化学系の酸化還元(レドックス)状態がドラスティックに変化し、これが葉緑体ゲノムにコードされる光合成遺伝子発現を制御すると考えられる。これにより、夜明けとともに光合成を行うように光合成装置がウォーミングアップされ、日暮れと同時に装置がスリープ状態になることが想定される。また、昼間、過剰な光を受けた際には、光を受け止める部品の形成を抑制し、過剰な光エネルギーから葉緑体を守るのではないだろうか。このような遺伝子発現制御において、葉緑体遺伝子の転写を司るRNAポリメラーゼ

の活性調節が注目される。

21世紀は、地球環境と調和した維持的な社会の成熟が望まれる。これを実現するために、大きな課題である食糧不足および炭酸ガスによる地球温暖化の問題の解決に向けて、さらに工業原料生産における化石資源依存から脱却するために、光合成機能を有する植物の活用が必要不可欠である。葉緑体は、光合成機能に加えて、細胞内における物質生産・蓄積の場であり、さらに葉緑体ゲノムへの遺伝子導入は、植物の母性遺伝の性質から、花粉による環境への組換え遺伝子の拡散を防ぐことができるという特徴を有する。したがって、葉緑体遺伝子発現制御機構の解明には、大きな社会的貢献も期待されている。

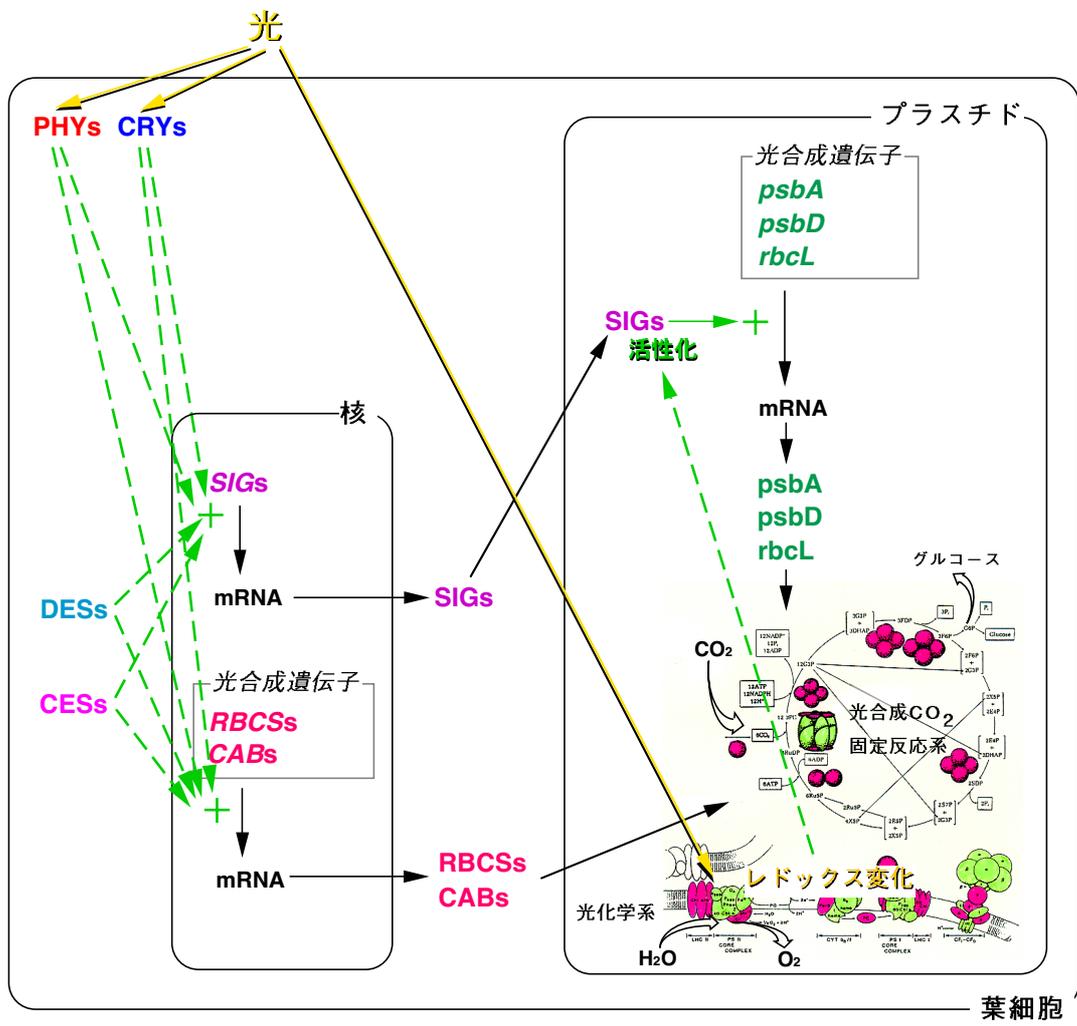
引用文献

- 1) Kobayashi, H.: in *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 7B: The Photosynthetic Apparatus: Molecular Biology and Operation, eds. Bogorad L. et al., pp.395-415, Academic Press, San Diego (1991)
- 2) Kobayashi, H. et al.: *EMBO J.* 9, 307-313 (1990)
- 3) Deng, X.-W. et al.: *Cell* 49, 379-387 (1987)
- 4) Mullet, J.E.: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39, 475-502 (1988)
- 5) Baumgartner, B.J. et al.: *Plant Physiol.* 101, 781-791 (1993)
- 6) 清水正則ほか: *蛋白質・核酸・酵素* 45, 123-131 (2000)
- 7) Isono, K. et al.: *Plant Physiol.* 114, 623-630 (1997)
- 8) Isono, K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 14948-14953 (1997)
- 9) Tanaka, K. et al.: *FEBS Lett.* 413, 309-313 (1997)
- 10) Hedtke, B. et al.: *Science* 277, 809-811 (1997)
- 11) Morden, C.W. et al.: *EMBO J.* 10, 3281-3288 (1991)
- 12) Lerbs-Mache, S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1531-1535 (1993)
- 13) Shinozaki, K. et al.: *EMBO J.* 5, 2043-2049 (1986)
- 14) Ohyama, K. et al.: *Nature* 322, 572-574 (1986)
- 15) Hu, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1531-1535 (1990)
- 16) Stewart, A. ed.: *Trends in Genetics, Genetic Nomenclature Guide*, pp. 3-43 (1995)
- 17) Kaneko, T. et al.: *DNA Res.* 3, 109-136 (1996)
- 18) Gruber, T.M. et al.: *Arch. Microbiol.* 169, 211-219 (1998)
- 19) Wösten, M.M.S.M.: *FEMS Microbiol. Rev.* 22, 127-150 (1998)
- 20) Khudyakov, I.Y. et al.: *J. Bacteriol.* 183, 6667-6675 (2001)
- 21) 藤田信之: *医学・生物学のためのソフトウェア集1, 一歩進んだMacintosh, 加部一彦ほか(編), 南江堂* (1993)
- 22) Bhaya, D. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3188-3193 (1999)
- 23) Satoh, J. et al.: *Plant J.* 18, 407-415 (1999)
- 24) Nakahira, Y. et al.: *Plant Physiol.* 118, 1079-1088 (1998)
- 25) Morikawa, K. et al.: *FEBS Lett.* 451, 275-278 (1999)
- 26) Shirano, Y. et al.: *FEBS Lett.* 485, 178-182 (2000)
- 27) Kanamaru, K. et al.: *Plant Cell Physiol.* 42, 1034-1043 (2001)
- 28) Kim, J. et al.: *Science* 278, 1954-1957 (1997)
- 29) Cristopher, D.-A. et al.: *Plant Physiol.* 113, 1273-1282 (1997)
- 30) Tiller, K. et al.: *EMBO J.* 12, 1745-1753 (1993)
- 31) Baginsky, S. et al.: *Plant Mol. Biol.* 34, 181-189 (1997)
- 32) Baginsky, S. et al.: *Plant Mol. Biol.* 39, 1013-1023 (1999)
- 33) Pfannschmidt, T. et al.: *Nature* 397, 625-628 (1999)
- 34) Baena-Gonzalez, E. et al.: *Plant Physiol.* 127, 1044-1052 (2001)



カラー口絵

図1 植物 σ 因子 (σ^{70} ホモログ) の系統樹



カラー口絵

図3 σ 因子を介した葉緑体光合成機能発現制御機構の仮説