

植物の光合成遺伝子システムに特有なコアプロモーター構成の起源と役割

●小保方潤一

名古屋大学遺伝子実験施設 遺伝子解析分野

〈研究の目的と進め方〉

ゲノムは、生物進化の過程で新しい遺伝子群を生みだし、それらに機能発現の場を与えてきた。「新しい遺伝子を生み出す能力」は、ゲノムの存在原理にかかわる本質的な属性の一つである。ゲノムの中で新しい「構造遺伝子」が出現するメカニズムについては、エキソンシャフリングやタンパク質のドメイン・モジュール構造をはじめとする膨大な研究が行われてきたが、一方、ゲノムがどのようにして「新しいプロモーター」を生みだし、それを進化させるのかという点については、まだ殆ど理解が進んでいない。本研究は、この問題に切り込む糸口として、「光合成核遺伝子システムのコアプロモーター構成」に着目した。

真核生物遺伝子のコアプロモーターは、一般にTATAボックスやイニシエーターなど数種類のコンセンサス配列から構成されているが、植物の光合成核遺伝子群はこれらの配列の出現頻度に特有の偏りがある。特に、光化学系反応中心複合体を構成するサブユニットの遺伝子には、TATAボックスなどの既知のモチーフが殆どみられない。植物のもつ光合成遺伝子システムは、進化的にみると、細胞内共生したシアノバクテリアに由来しており、シアノバクテリアが共生オルガネラを経て葉緑体に進化する過程で、光合成遺伝子群は原核型ゲノムから核に転移し、そこで新たに真核型のプロモーターを獲得したと考えられている（図1）。

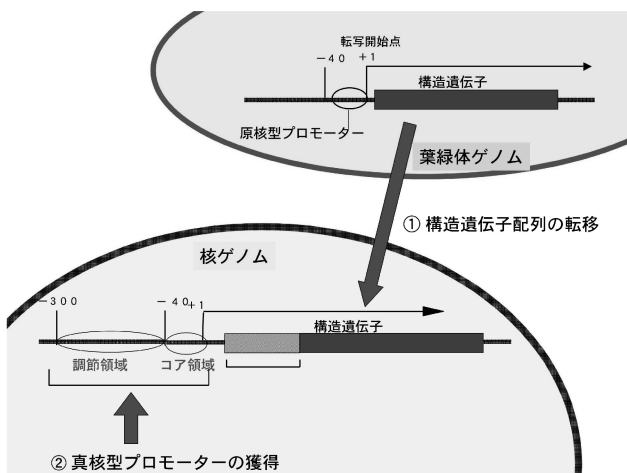


図1 光合成核遺伝子群の起源は葉緑体ゲノムにある。

本研究では、光合成核遺伝子群が特有なコアプロモーター構成をもつ理由を、「プロモーターの起源」と「光合成遺伝子の転写制御」という二つの側面から解析し、その生物学的意味を明らかにしようとした。

〈研究開始時の研究計画〉

本研究を開始した時点では、現存する光合成遺伝子群のプロモーター構成がTATA-less型に大きく偏っている理由として、次の二つの可能性を考えた。

（仮説1：プロモーターの獲得起源説）

オルガネラから核に転移した構造遺伝子が核ゲノム内で新たにプロモーターを獲得する場合、確率的にTATA-less型プロモーターの方が獲得され易かった。

（仮説2：コアプロモーターの機能分化説）

TATAボックス型コアプロモーターの機能特性は、光合成遺伝子の発現調節には適していないため、結果的にコアプロモーターの比率がTATA-less型に大きく偏った。

そこで、本研究は、この二つの仮説の妥当性を実験的に検討するため、以下の4点について解析を進めた。

- (1) 光合成遺伝子群のコアプロモーター構造の解明
- (2) コアプロモーター類型と転写制御との関係
- (3) 葉緑体から核への遺伝子転移機構の解析
- (4) 「転移した構造遺伝子」が「真核型プロモーター」を獲得するメカニズムについてのモデル実験

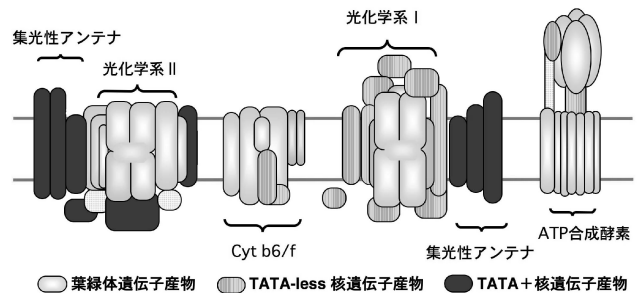


図2 植物の光合成装置とそれをコードする遺伝子の関係模式図

〈研究期間の成果〉

研究開始当初は、前記の2つの仮説は互いに矛盾して、両立はしないだろう、と考えていた。しかし、実際に上記の4点について解析を進めたところ、次第に、どちらの仮説もそれなりに可能性のあることがわかってきた。そこで、この研究で得られた一連の知見を矛盾なく説明するために、新たな研究の枠組みを設定する必要が生じた。

以下では、上記4点に関する諸知見を整理するとともに、それらを矛盾なく説明するための作業仮説を提示する。

【1】光合成遺伝子システムのコアプロモーター構成

葉緑体のチラコイド膜にある光合成装置について、遺伝子のゲノム局在とコアプロモーター構造を、wet実験とデータベース検索を組み合わせて解析した。そのまとめを図2に示した。葉緑体コードのサブユニットが個々の機能複合体の中心部分を構成し、その周囲をTATA-less型核遺伝子の産物がとり囲み、さらにその周囲に、TATAボックス型遺伝子の産物である集光性アンテナ複合体が配置している。この図からわかるように、集光性アンテナ成分の遺伝子を除くと、TATAボックスの出現頻度はかなり低く、その傾向は光化学系1成分で顕著である。

表1に、シロイヌナズナの光化学系1遺伝子群のコアプ

ロモーター構成をまとめた。TATAボックスとイニシエーター (Inr) の組み合わせでコアプロモーターを4つの類型に分けると、光化学系I関連遺伝子群では所謂 -/+ 型 (どちらもない型) が多数を占める。このような一連の解析から、光合成装置にはTATAボックス型遺伝子の出現頻度が低いこと、また、同じ光合成関連装置であっても、機能単位毎に、コアプロモーター類型の出現頻度には大きな偏りのあることが明らかになった。

表1 光化学系成分遺伝子のプロモーター構成
コアプロモーター類型 転写開始点の分布 遺伝子名

Core promoter subtype	Transcription start distribution	Gene names
I TATA	数塩基の範囲内で転写される	<i>psaD2 psaG</i>
II TATA Inr	+1 1塩基から転写される	<i>fedA</i>
III Inr	+1 1塩基から転写される	<i>psaE2 psaG psaF psaN</i>
IV	数十塩基の範囲に多数の開始点	<i>psaD1 psaG petC psaE1 psah1 petE psaF psal</i>

【2】コアプロモーターの類型と転写制御

コアプロモーターの類型と機能の関係を明らかにするため、個々の遺伝子のコアプロモーター配列を改変してキメラプロモーターを作製し、それをレポーター遺伝子に連結してから、植物体にパーティクルガンで導入した。次いで、レポーター遺伝子の転写量やシグナル応答をトランジェント発現系で解析した。タバコの光化学系I遺伝子 *psaDb* は表1のIII型 (-/+ 型) のコアプロモーターを持っているが、このプロモーターからの転写は Inr 配列に依存した光活性化を示した (図3)。

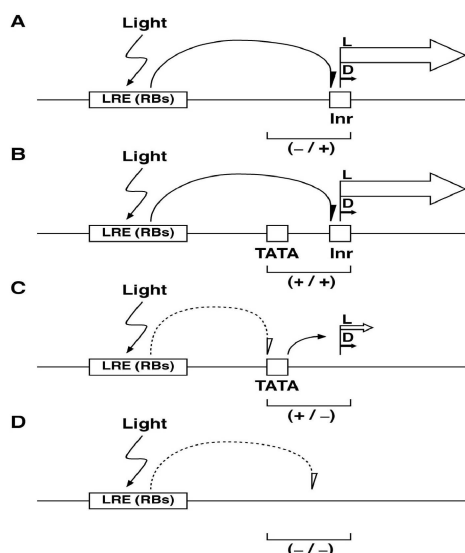


図3 タバコの光化学系I遺伝子 *psaDb* では、上流の光応答因子 (LRE) を介したシグナルはイニシエーター (Inr) 配列特異的に転写を活性化する。

表2 上流調節領域とコアプロモーターの選択性

Regulatory region	Core promoter subtypes			
	I TATA	II TATA Inr	III Inr	IV
I <i>CaMV35S</i>	○	○	△	×
II <i>Lhcb1</i>	○	◎	△	×
III <i>psaDb</i>	△	○	○	×
IV <i>psaH1</i>	△	○	○	○
IV <i>psaE1</i>	×	×	×	<i>psaE1</i> ○ others ×

同様な解析を様々な植物遺伝子のプロモーターについて行ったところ、転写制御が正常に生じるためには、上流調節領域とコアプロモーター類型の正しい組み合わせが必要であることが明らかになった (表2)。

以上の結果は、類型の異なる植物コアプロモーターの間には機能的な分化が生じていること、従って、光化学系成分遺伝子群が特異的なコアプロモーターの偏りをもつのは、それらの遺伝子群の発現制御機構に関与している可能性の高いことを、示している。

【3】葉緑体から核への遺伝子転移機構

そもそも、葉緑体ゲノムから核への遺伝子転移はどのように生じるのだろうか? そのヒントを探るため、核ゲノム上に残されているであろう葉緑体DNAの転移の痕跡を網羅的に解析した。核ゲノムに含まれている葉緑体DNA由来の配列を nupDNA (= nuclear-localized plastid DNA) と名付けたが、イネでは、12本の核染色体上で、nupDNAの挿入部位が700カ所以上見いだされた (図4)。また、それらの nupDNA 配列の合計はイネの核ゲノム全体の2%に上った。

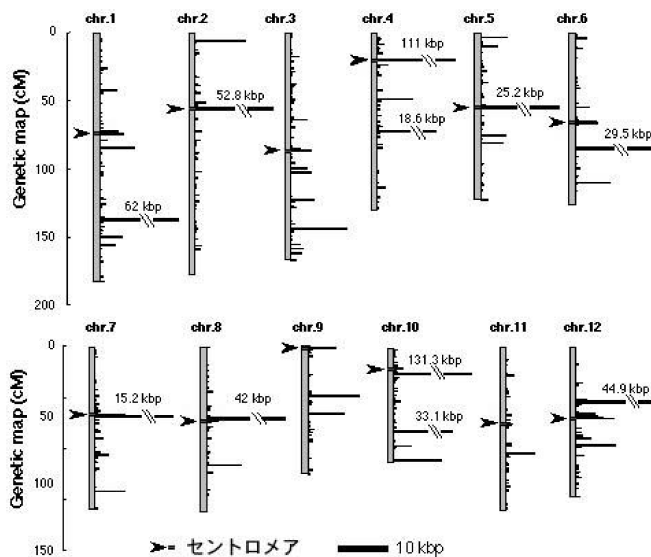


図4 イネの染色体には700カ所以上の部位で葉緑体DNA断片が挿入されている。横棒の長さが nupDNA の大きさを示している。

個々の nupDNA について、その大きさ、構造、染色体上の挿入部位などを解析し、さらに、現在の葉緑体DNAとの塩基置換の頻度から、個々の断片がいつごろ葉緑体ゲノムから核ゲノムに転移したのかを推定した。その結果、葉緑体ゲノムと核ゲノムの興味深い関係が明らかになった。

nupDNA断片の年齢分布を調べると、図5の挿入グラフのように、核に転移してからまだ若い断片が多数を占め、古くなると急速にその割合が減る傾向がみられた。このような年齢分布は、核ゲノムが葉緑体DNAの頻繁な流入と排出の平衡状態にあることを示唆している。それぞれの年齢のnupDNA集団について、DNA断片の大きさや構造などを比較し、それらをこの年齢分布に加味すると、染色体上でのnupDNAの動態が浮き彫りになった。すなわち、「葉緑体DNAは、いったん核に取り込まれると、激しい断片化やシャフリングを受けて次第に細片となり、やがて核から排出されて消失すること」が強く示唆された。

nupDNAの半減期から推定すると、イネでは、葉緑体から核に転移したDNAの80%が100万年以内に排出され消失したことになる。また、葉緑体DNAから核への転移頻度も、従来の予想より遙かに高いと推定された。その結果、1ヘクタールの水田を考えると、毎年新しいnupDNAを持った種子系統が数千のオーダーで出現していると予想された。

以上の解析結果は、葉緑体ゲノムと核ゲノムの間には、図5に示すような定常的なDNAフラックス(=一定の流速を持った流れ)があると考えられ、うまく説明することができる。また、このDNAフラックスには、ミトコンドリアゲノムや転写物(RNA)を介した流入経路も関与しているが、それらの経路の寄与は、葉緑体DNAの直接転移から比べると、遙かに小さいことも同時に明らかとなった。

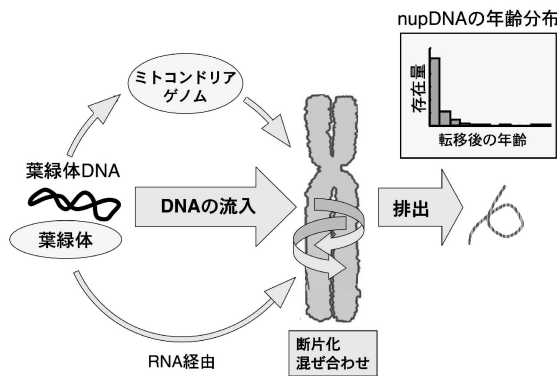


図5 葉緑体-核 DNA フラックス。DNA が定常的に流入しているため、核ゲノム上の nupDNA の年齢分布は若い方に偏る。

nupDNAの転入や排出の速度は染色体上の部位によっても異なっており、セントロメアの周辺では特に流入、排出の頻度が著しい(図6)。この領域は、染色体間のsegmental duplicationが生じやすい部位として知られているが、オルガネラゲノムと核ゲノムのシャフリングについても重要な役割を担っているらしい。

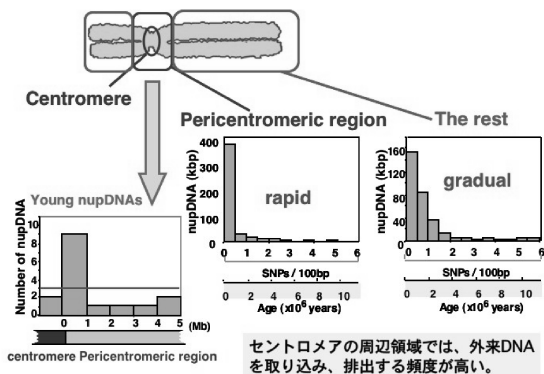


図6 nupDNAの流入・流出の頻度はセントロメアの近傍で著しい。

核の中に、葉緑体DNAの配列を特異的に認識して、nupDNAの転入・排出を引き起こす機構があるとは考えにくい。そうではなく、nupDNAの動態は、葉緑体DNA断片がたまたまjuncDNAとして入り込んだ染色体部位のDNA鎖の挙動を示していると考えられる。nupDNAの激しい動態は、真核染色体のもつ高いシャフリング活性を映し出している。

【4】「転移した構造遺伝子」が「真核型プロモーター」を獲得するメカニズムについてのモデル実験

前項の解析で、葉緑体DNAは頻繁に核ゲノムに転移し、また、核の中では頻繁にDNA鎖のシャフリングが生じていることが明らかになった。すると、核ゲノムにタンパク質遺伝子がランダムに挿入された場合、それらが偶然プロモーターを獲得して転写されるには、どのようなケースがあり得るのだろうか、という疑問が生じる。そこで、シロイヌナズナを使ったモデル実験を行った。

プロモーターの無いルシフェラーゼ(LUC)遺伝子を、Tiプラスミド由来のベクターとAgrobacteriumを介してシロイヌナズナの核ゲノムに挿入し、トラッピング植物系統を作成した。まず、T1世代(形質転換当代)でLUCが発現している個体を一次選抜し、T2世代の植物で、LUC遺伝子のゲノム上の挿入部位を決定した。その結果、非常に興味深い知見が得られた。

少なくともT2とT3世代の植物では、既存遺伝子のトラッピングになっていない植物系統、すなわち、ゲノムの遺伝子間領域や既存遺伝子の反対鎖にLUCレポーター遺伝子が挿入された系統でも、従前の予想を遙かに上回る頻度で、LUCレポーターの発現が検出された。

そこで、これら遺伝子間挿入型のLUC発現系統について、5' RACE等の手法を用いて、転写開始点を解析した。その結果、これらのトラップ系統では、トラッピングレポーターの挿入以前には本来転写物のみられたかったゲノム領域に、新たな転写開始点の生じたことが、強く示唆された。言い換えれば、「構造遺伝子の挿入によるプロモーター新生」が現象としてあり得ることが非常に強く示唆された。

さらに、このようにして検出された「新生プロモーター候補」を集積し、それらのコアプロモーター構成を検討した。この研究については現在もサンプル数を増やして解析作業を続けているが、予備的な知見では、「新生プロモーター」のコアプロモーター領域では、各種のコアプロモーター類型がランダムに出現する傾向がみられた。

本項の解析結果は、本報告の冒頭で述べた「ゲノムが新しいプロモーターを生み出すメカニズム」について、重要なヒントを投げかけている。

【5】以上の知見から、光合成核遺伝子プロモーターの起源と機能分化をどのように説明するか？

本研究で得られた知見を、葉緑体から核への遺伝子転移の時系列にあわせて整理すると、以下のようになる。

- 1) 葉緑体から核にむかうDNAフラックスがある。
- 2) 核ゲノムには常に大量の葉緑体遺伝子配列が運び込まれるが、その殆どは機能を持った遺伝子転移には結び

つかない。

- 3) プロモーターの新生：核ゲノムに新しい構造遺伝子が挿入されると、その遺伝子の近傍に新規プロモーターが出現するケースがある。
- 4) 新生プロモーターの構造：新生コアプロモーターでは、様々な類型のコアプロモーターがランダムに出現するように見える(解析を継続中)。
- 5) コアプロモーターの類型は転写制御と関係がある。
- 6) 光合成装置では、機能単位毎にコアプロモーター類型に偏りがある。

これらの知見は、研究開始当初の2つの仮説がともにある程度正しいことを示唆している。そこで、これらの知見を矛盾なく説明する新しい研究の枠組みが必要になった。筆者らは、光合成遺伝子プロモーターの起源や進化を説明する作業仮説として、新たに図7に示したモデルを考えている。このモデルの鍵は、当初の二つの仮説に、「萌芽遺伝子の大量生成と大量淘汰」という軸を加えたことである。

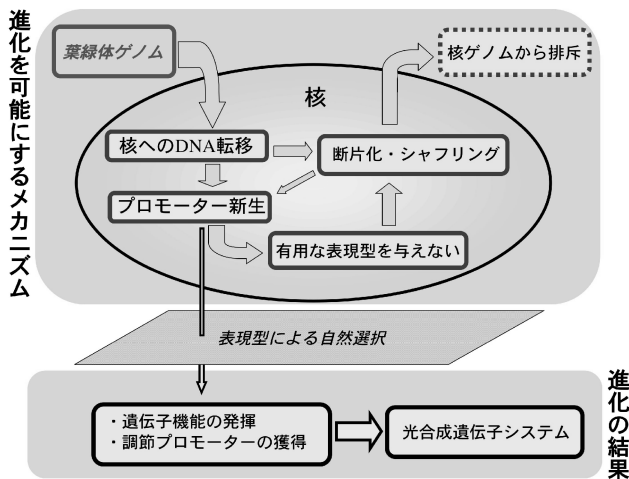


図7 葉緑体ゲノム由来の構造遺伝子が核ゲノムに転移し、機能

〈国内外での成果の位置づけ〉

細胞内共生の過程では、共生者のゲノムから核へ、遺伝子が移動することが知られている。しかし、このような遺伝子移動の機構は全くのブラックボックスとされており、実験科学の研究対象とはみられていなかった。しかし、本研究によって、(1)染色体DNAのシャフリング活性と、(2)染色体DNAにおける新規転写単位の発生、という二つの分子生物学的現象がこの遺伝子移動を引き起こす鍵であることが示唆された。従って、今後の細胞進化の研究に新しい方向が示された。

上記の知見のうちの前者は、「葉緑体-核DNAフラックスの発見」としてPlant Cell誌に論文を公表したが、原著論文としては月間第3位のダウンロード数にランクされるなど、大きな反響があった。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

「プロモーター獲得モデル実験」では、スクリーニング等に用いる植物系統の作成や維持に多大の労力を要する。また、「新生プロモーター」の活性は微弱で不安定なケースが多かった。これらの理由により、「プロモーター獲得モデル実験」については所定期間内で未了の実験が多く残り、本報告書作成時点で、解析作業を継続している。

〈今後の課題〉

- ・「コアプロモーターの機能分化」を生んでいるメカニズムについて、さらに踏み込んだ解析が必要である。
- ・「プロモーター獲得モデル実験」で見出された「新生プロモーター」について、植物の世代を重ねたときの遺伝的安定性を検討する必要がある。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- (1) 202281154
Nakamura, M., T. Tsunoda and Obokata, J. (2002) Photosynthesis nuclear genes generally lack TATA boxes: a tobacco PhotosystemI gene responds to light through an initiator. Plant J. 29:1-10
- (2) 0301161423
Matsuo, M., and Obokata, J., (2002).
Dual roles of photosynthetic electron transport in Photosystem I biogenesis: Light induction of mRNAs and a chloromatic regulation at post-mRNA level, Plant Cell Physiol, 43, 1189-1197.
- (3) 0301161427
Sherameti, I., Nakamura, M., Yamamoto, Y.Y., Pfannschmidt, T., Obokata, J. and Oelmueller, R. (2002) Polyribosome loading of spinach mRNAs for photosystem I subunits is controlled by the photosynthetic electron transport: A crucial cis-element in the spinach PsaD gene is located in the 5'-untranslated region. Plant J. 32:631-639
- (4) 0404172206
Nagao, I., Obokata, J. (2003)
A poly(U) motif in the 5' untranslated region enhances the translational efficiency of β -glucuronidase mRNA in the transgenic tobacco. Plant Science 165, 621-626
- (5) 0402121045
Miyamoto, T., Obokata, J. and Sugiura, M. (2004)
A site-specific factor interacts directly with its cognate RNA editing site in chloroplast transcripts. Proc Natl Acad Sci USA 101:48-52
- (6) 0602171049
Nakamura, M., Tsunoda, T., Yoshitsugu, T. and Obokata, J. (2004) Core promoter diversity and photosynthesis gene regulation. Endocytobiosis Cell Res 15: 300-308
- (7) 0602171134
Nagao, I., Masuyama, K., and Obokata, J.
In vitro evolution of translational regulatory cis-elements. Endocytobiosis Cell Res 15: 385-389
- (8) 0602171105
Matsuo, M., Ito, Y., Yamauchi, R. and Obokata, J. (2005)
Rice nuclear genome continuously integrates, shuffles and eliminates the chloroplast genome to cause chloroplast-nuclear DNA flux. Plant Cell 17:665-675
- (9) データベース 0301161438
Nakamura, M., Tsunoda, T., and Obokata, J.
TATA-less promoters in Plants
<http://www.gene.nagoya-u.ac.jp/~obokata-g/index-e.html>
- (10) 特許 0602171245
Obokata, J. and Nagao, I. (2003)
Methods of screening potential translational regulatory elements of mRNAs. (US Patent No.:6558909 15/06/2003)
- (11) その他 0301161436

小保方潤一(2002)

葉緑体から核へ移った遺伝子—新しい発現制御系はどのように生まれたか? 遺伝 56,73-77

(12)その他0602171153

小保方潤一 (2005)

葉緑体DNAの核への転移.蛋白質核酸酵素 vol.50
pp.1843-1844