

氏名(本籍)	鬼塚 拓男	(神奈川県)
学位の種類	博士(理学)	
学位記番号	博論第147号	
学位授与年月日	平成20年3月13日	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
	人間文化研究科	
論文題目	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) の遺伝子発現及びタンパク質産生メカニズムに 関する研究	
論文審査委員	(委員長) 教授 植野 洋志	教授 佐伯 和彦
	准教授 酒井 敦	教授 塚本 幾代

## 論文内容の要旨

炭酸固定反応を触媒する Rubisco は、二酸化炭素濃度に応じて産生量が調節されており、低二酸化炭素濃度条件下で Rubisco の量が増えることが知られている。しかしながら二酸化炭素濃度に応答して Rubisco の産生量が変化するメカニズムは不明であった。本研究の第1部では Rubisco 遺伝子発現の二酸化炭素濃度依存性のメカニズムを明らかにするため、単細胞性のシアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC7002 を材料として用い、Rubisco をコードする遺伝子の二酸化炭素濃度依存的発現に関する分子生物学的解析を行っている。

第1章では *Synechococcus* sp. PCC7002 の *rbc* オペロンをクローニングし、Rubisco をコードする領域及びその周辺の配列を決定した。続いて、Rubisco をコードする *rbc* 遺伝子の転写が二酸化炭素濃度変化に応答することを定量 RT-PCR 法で調べ、*rbc* 遺伝子の発現が二酸化炭素濃度変化に対して負に制御されていることを実証した。さらに、*rbc* 遺伝子の上流域を分割し、レポーター遺伝子アッセイにより各断片の転写活性を測定することにより、*rbc* 遺伝子上流、開始コドンを中心として -306 から -250 の間に、二酸化炭素濃度変化に応答して転写を負に制御する二酸化炭素濃度応答性エレメントが存在することを示した。

第2章ではデコイ型二本鎖ヌクレオチドを利用した実験の結果が述べられている。本学位論文提出者は、*rbc* 遺伝子上流 -306 から -250 の間に存在する AT-rich element (30bp) に着目し、相当するデコイ配列をシアノバクテリアへの導入した結果、*rbc* 転写活性と Rubisco 産生の二酸化炭素濃度

依存性が AT-rich element のデコイ導入によって消失することを確認した。この結果は、AT-rich element が高二酸化炭素条件下で *rbc* 遺伝子の転写活性を抑制し、Rubisco の産生量を抑えていることを意味する。

第3章では蛍光標識法と DNA シークエンサーによる分析を組み合わせた蛍光ゲルシフト法の開発について、成果が述べられている。新手法は定量性に優れ、複数の転写因子の同時測定も可能であることが示された。続いて、第2章で明らかにした二酸化炭素応答性配列 (AT-rich element) を用い、蛍光ゲルシフト法による転写因子の検出を試みた。その結果、AT-rich element に特異的に転写因子が結合すること、そして、この転写因子の結合量が高二酸化炭素濃度条件下で増えることが判明した。本結果から、この転写因子は高二酸化炭素濃度に応答して誘導され、AT-rich element に特異的に結合することで Rubisco の発現を抑制していると考えられる。

第4章では二酸化炭素応答性配列に結合する転写因子を明らかにするため、AT-rich element に結合するタンパク質の精製を行った。その結果、分子量16kDa のタンパク質が精製された。精製タンパク質の N 末端配列を決定し、得られた配列をもとにデータベース検索を行った結果、配列が一致するタンパク質の情報は得られなかったが、相同性のあるタンパク質としてシアノバクテリア PCC6803株由来の *slr0822* 及び *slr0359* が見いだされた。

一方、Rubisco はタンパク質の折り畳み及び複合体形成のモデルタンパク質として、古くから実験材料に用いられてきた。Rubisco の large subunit の折り畳みに関与するタンパク質としてシャペロニンが知られているが、シャペロニンによる Rubisco の再構成は必ずしもうまくいかず、Rubisco の成熟には他の因子が関与する可能性が示唆されている。そこで、提出者は Rubisco の成熟に関わるタンパク質の候補として Rbc X に注目した。Rbc X の遺伝子は *rbcL* と *rbcS* の両遺伝子の間に存在するが、その機能に関しては不明な点が多い。本研究の第2部では *rbcX* 遺伝子と Rbc X タンパク質の機能及び構造を明らかにすることを目的に実施した研究の成果が報告されている。

第1章では、*Synechococcus* sp. PCC7002 の *rbcX* 遺伝子破壊株を調製し、その特性、特に Rubisco の産生に及ぼす影響を調べた。しかしながら、*rbcX* 遺伝子の完全破壊は致命的であったため、部分破壊株を用いて実験を進めた結果、Rubisco タンパクの産生量が *rbcX* の遺伝子破壊により減少することが明らかになった。同様の結果は大腸菌発現系での *rbcX* 破壊実験でも得られ、また *rbcX* 発現プラスミドを用いた相補実験によって Rubisco タンパクの産生量は回復した。一方、*rbcX* 遺伝子の破壊前後で *rbc* mRNA の量に変化はなかった。続いて、Rubisco の L8S8形成に対する *rbcX* 遺伝子の効果を調べた結果、*rbcX* を発現させることにより L8S8形成が促進されることがわかった。

第2章ではタンパク質としての Rbc X の機能を解析するため、*rbcX* 遺伝子産物 (Rbc X) を発現、精製し、Rubisco の *in vitro* 発現系への添加実験を行った。その結果、Rbc X は濃度依存的に Rubisco の L8S8形成を促進するとともに、Rbc X 添加により可溶化 Rbc L 及び Rbc S の量が増加した。続い

て、大腸菌 GroES/EL 存在下における、Rbc X の効果を *in vitro* で調べた。大腸菌 GroES/EL は Rbc L の folding を促進することが知られているシャペロニンである。実験の結果、Rbc X は GroES/EL 存在下で Rubisco の L8S8形成と可溶化 Rbc S の産生を濃度依存的に促進したが、Rbc L の産生を促進しなかった。以上の結果から、Rbc X は Rbc L の folding 以降の Rubisco assembly の過程を促進している可能性が示唆された。

第3章では Rbc X の X線結晶構造解析の結果についてまとめられている。結晶構造から、Rbc X は強固なダイマーを形成していることが分かった。超遠心分析により分子量を測定した結果、Rbc X は溶液中でもダイマーを形成していることが判明した。Rbc X のモノマーは5本の $\alpha$ ヘリックスが折りたたまれたユニークな構造をしており、PDBに構造上の類似タンパクは見られなかった。また、Rbc X のダイマー表面には負に荷電した領域が存在し、興味深い。一方、負に荷電した領域の反対側の窪み付近と Rbc X ダイマーの角部分にアミノ酸の保存性が高い領域があり、機能との相関から興味を持たれた。

以上、提出者は第1部において、Rubisco をコードする *rbc* 遺伝子の発現の二酸化炭素濃度依存性に関して、そのメカニズムを明らかにした。この現象は、タンパク質コード領域上流に存在する二酸化炭素応答性エレメントに起因する転写制御によるものであり、二酸化炭素応答性エレメントは Rubisco のコード領域上流の-291~-262に存在する AT rich element (5' -ATTTTATGGCTTTT TTAGGTATTTTGTAA- 3') であった。AT rich element には転写因子が結合し、この転写因子の結合量が二酸化炭素濃度に依存して変化することにより、Rubisco の産生が制御されていた。また、提出者は第2部において *rbcX* 遺伝子と Rbc X タンパク質に関する機能解析及び構造解析を行った。機能解析の結果、Rbc X は Rbc L の folding 以降の Rubisco assembly の過程を促進している可能性が示され、また、X線結晶構造解析の結果から、Rbc X のユニークな構造が明らかになった。

## 論文審査の結果の要旨

光合成により二酸化炭素を固定する ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) のカルボキシラーゼ活性は食物連鎖の基底を成し、生物界で最も重要な酵素反応と言える。従って、本酵素の発現メカニズムや成熟過程の理解は、将来、人工的に高機能 Rubisco を生み出し、作物収量の向上を図る上で、極めて重要な知見になると考えられる。

本学位論文提出者は、二酸化炭素濃度による Rubisco の発現調節に注目し、第1部においてそのメカニズムを明らかにしている。第1部の概要は以下のとおりである。

第1章では Rubisco をコードする *rbc* 遺伝子及びその周辺配列を決定し、また、発現解析により *rbc* 遺伝子発現の二酸化炭素濃度依存性を確認した。さらに、レポータージーンアッセイにより、二酸化炭素濃度応答性エレメントが開始コドンを開始点として-306から-250の間に存在することを示した。

第2章では、デコイ型二本鎖ヌクレオチドを利用した実験法により、第1章で示した二酸化炭素濃度応答性エレメントの中に存在する AT-rich element が高二酸化炭素条件下で *rbc* 遺伝子の転写活性を抑制することを明らかにした。なお、本実験は、デコイ型二本鎖ヌクレオチドを用いた実験法が原核生物にも適用可能であることを示した初めてのケースであることは特筆に値する。

第3章では、簡便で定量性に優れた蛍光ゲルシフト法の開発の詳細が述べられている。そして、この新しい手法を用いて、AT-rich element に特異的に転写因子が結合することが確認され、さらに、この転写因子の結合量が高二酸化炭素濃度条件下で増加することを明らかにした。

第4章では AT-rich element に結合するタンパク質を精製し、N末配列を決定するとともに、得られた配列から相同性のあるタンパク質としてシアノバクテリア PCC6803株由来の *sl10822* 及び *sl10359* を見いだした。

以上、提出者は第1部の結論として、以下のような二酸化炭素濃度による Rubisco の発現調節メカニズムを提唱している。すなわち、Rubisco コード領域上流の-291~-262に存在する AT rich element (5'-ATTTTATGGCTTTT TAGGTATTTTGTA-3') に結合する転写因子の結合量が二酸化炭素濃度に依存して変化することにより、*rbc* 遺伝子の転写が制御され、その結果 Rubisco の産生が調節される。

上記の内容は Rubisco 発現の二酸化炭素濃度依存性のメカニズムを明らかにした初めての報告であり、評価に値する。今後研究が進展し、AT rich element に結合する転写因子のクローニングや二酸化炭素センサーが明らかになれば、人工的に Rubisco の産生を操作し、高二酸化炭素条件下で

の二酸化炭素固定量の向上や植物生産量の増大に応用できる可能性がある。なお、本研究中で開発された蛍光ゲルシフト法やデコイ型二本鎖ヌクレオチドの原核生物への適用実験等の新しい手法は、世の中の転写研究の一助になると期待される。

続いて、本学位論文提出者は Rubisco の成熟に関わるタンパク質の候補として Rbc X に注目し、第 2 部において *rbcX* 遺伝子と Rbc X タンパク質の機能及び構造の解析を行っている。第 2 部の概要は以下のとおりである。

第 1 章では *rbcX* の遺伝子破壊実験及び相補実験により、*rbcX* 遺伝子産物が Rubisco タンパクの産生と L8S8 ホロ酵素の成熟を促進することを明らかにした。なお、*rbcX* 遺伝子産物は Rubisco の転写は促進しなかった。

第 2 章では *in vitro* 発現実験により、Rbc X が Rubisco large subunit の folding 以降の Rubisco assembly の過程を促進している可能性が示された。

第 3 章では Rbc X の X 線結晶構造解析の結果が述べられている。Rbc X のモノマーは 5 本の  $\alpha$  ヘリックスが折りたたまれたユニークな構造をしており、PDB に構造上の類似タンパクは見られなかった。また、Rbc X は通常ダイマーを形成していることが判明した。Rbc X のダイマー表面には負に荷電した領域が存在し、興味深い。また、負に荷電した領域の反対側の窪み付近と Rbc X ダイマーの角の部分にアミノ酸の保存性が高い領域があり、機能との相関から興味を持たれる。

以上、Rbc X の一連の研究は Rubisco の効率的な産生と活性化、延いては二酸化炭素固定量の向上や植物生産量の増大につながる新しい道筋を切り開いた点で評価できる。無論、Rbc X が Rubisco assembly の過程をどのように制御しているのか、構造、機能の両面から詳細な分子メカニズムを明らかにしていくことが今後の課題であるが、その成果は産業面、応用面へと展開していく可能性が期待される。

本研究の第 1 部の研究成果は 3 編の論文として国際的な学術雑誌 (Refereed Journals) に掲載されている。また、第 2 部第 1 章の成果は 1 編の論文として国際的な学術雑誌 (Refereed Journals) に掲載されており、特許も出願済である。また、第 2 部第 2 章の成果は 1 編の論文 (英文) として執筆が完了し、今後投稿する予定である。

以上の点から、本学位論文は奈良女子大学博士 (理学) を授与するに十分な内容を備えているものと判断される。