

アミロプラスト DNA の発現の制御機構に関する研究

Regulatory mechanism of gene expression of amyloplast DNA

代表研究者	名古屋大学教授 Prof., Res. Inst. for Biochem. Regulation, Nagoya Univ. Takashi AKAZAWA	赤 沢 堯
協同研究者	名古屋大学助手 Res. Assoc., Radio Isotope Center, Nagoya Univ. Hirokazu KOBAYASHI	小 林 裕 和
	名古屋大学院生 Grad. Student, Res. Inst. for Biochem. Regulation, Nagoya Univ.	Jarunya NGERNPRASIRTSIRI

- (1) It was found that DNA methylation serves as a regulatory mechanism of gene expression in amyloplasts of Sycamore cells.
- (2) DNA methylation was shown to be responsible for the differential expression of C_4 photosynthesis genes in mesophyll and bundle sheath cells of greening maize leaves.
- (3) Total physical map was made for the amyloplast genome of sycamore (*Acer pseudoplatanus*).
- (4) DNA methylation was found to be responsible for the transcriptional regulation of nuclear gene expression for photosynthesis in nongreen plant cells.
- (5) DNA methylation was shown to be responsible for the transcriptional regulation of plastid gene expression during transitional conversion of chloroplast to chromoplasts.
- (6) Modulation of DNA methylation and gene expression in higher plant cells were shown to be influenced by base analog and phytohormone treatment.

研究目的

20世紀における高等植物細胞生物学研究の最も大きい成果の一つは、クロロプラストの遺伝子発現に関するものである。いうまでもなくそれは光合成機能を担うこのオルガネラの構造と機能の解明と密接に関連している。植物細胞にはクロロプラストと類縁のいくつかのプラスチドがある。例えば、アミロプラスト、クロモプラストなどである。それらがクロロプラストと進化、発生的に深い関連をもっているであろうことは古来仮説的に論じられてきた。しかし、極く近年にいたるまでそれを実体的に証明する手がかりは得られなかった。この中でアミロプラストはデンプンを蓄積するという特異な性格をもつところから、植物生理学的に重要な意義をもっている。私どもはシ

カモアカエデ (*Acer pseudoplatanus*) の培養細胞からアミロプラストを純粋に単離することにはじめて成功したが、さらにその DNA 分子にはクロロプラスト DNA がもつ光合成遺伝子と同じ塩基配列が存在することを明らかにした。しかしそれら遺伝子はほとんど発現していない (不活性)。このことから、何らかの制御機構が働いていると考えられるが、私どもは、その原因がアミロプラスト DNA のメチル化に基づくことをつきとめた。DNA の二重らせん構造の発見以来核遺伝子の発現制御にはメチル化が関与するとの考えが一般的なものとされ、教科書に広く記載されている。しかしこれまでクロロプラスト DNA はメチル化されていないと信じられてきた。これらのことを振り返るとき、アミロプラスト遺伝子発現の制御

がメチル化によることを証明した私どもの研究のもつ意義は大きい、幸いなことに、私どもは光合成能を獲得したシカモアカエダの緑色変異株をもっている、このような研究上の優位性にも立脚して、アミロプラストとクロロプラスト DNA の遺伝子発現の制御機構を厳密に比較しながら詳しく解析することを本研究の主目的とする。

研究の経過

本研究を申請時記述した計画の大綱は、シカモア液体培養細胞（白色野生株ならびに光合成能を獲得した緑色細胞）からアミロプラストおよびクロロプラスト DNA を分離し、それらの構造を比較し、またその光合成遺伝子発現調節機構を解析することであった。特にアミロプラストにおいては抑制（不活性化）されている光合成遺伝子の発現が DNA のメチル化によることを厳密に証明することが研究の中心であった。この当初の研究計画は極めて順調に進行した。

メチル化による遺伝子発現制御という命題を一般化するため、代表的 C₄ 植物、トウモロコシ幼植物の 2 細胞をも材料として研究した。さらにトマト果実の完熟期のクロロプラスト-クロモプラスト転換過程においても同様なメカニズムが観察されることを証明した。

研究成果

時間的経過にしたがって研究進展を述べる。

(a) シカモア白色細胞のアミロプラストにおける光合成遺伝子発現の制御はアミロプラスト DNA のメチル化によることの証明¹⁾。

シカモア白色細胞および緑色細胞から、アミロプラスト DNA、クロロプラスト DNA を分離しそれぞれの構成塩基を HPLC で分析した結果前者に多種類のメチル化された成分が多量に含まれていることを証明した。メチル化された DNA を特異的に認識することができる DNA 加水分解（制限）酵素によってアミロプラスト、クロロプラスト DNA を切断後、光合成遺伝子を probe とする hybridization 実験の結果、メチル化されたアミロプラスト DNA がそれら遺伝子発現の抑制（不活性化）に寄与していることを明らかにした。E. coli DNA polymerase を用いる *in vitro* 転写

系においてメチル化されたアミロプラスト DNA は転写鋳型活性をもたないことを証明した。

(b) 緑化過程におけるトウモロコシ幼植物の mesophyll および bundle sheath 細胞の光合成遺伝子の発現の 2 面性 (differential expression) には DNA メチル化が一義的要因として働いていることの証明²⁾。

C₄ 植物葉の 2 種細胞 (mesophyll/bundle sheath) においては、光合成に関連する遺伝子 (例えば *rbcL*, *rbcS*, *ppc*, *pdk*) の発現に 2 面性がある。すなわちこれら遺伝子がいずれか一方の細胞においては抑制または不活性化されていることが広く知られているが、上 (a) に記述したと同じ実験手段を用いて、その様な不活性化の一義的要因として DNA のメチル化が関与していることを証明することができた。

(c) アミロプラスト DNA の physical map の作製³⁾。

λ Fix vector を用いて、極く少量のシカモアアミロプラスト DNA を有効に cloning することに成功し、ついでその全 physical map を作製した。アミロプラストゲノムは 141.7 kbp のヌクレオチド鎖から成り、その遺伝子の構造的配列の様式にはこれまで報告されているタバコクロロプラスト DNA のそれと同じであることが証明された。

(d) シカモア白色細胞においては核 DNA のメチル化がクロロプラスト DNA のそれと共役して光合成遺伝子発現の制御の一義的要因として働いていることの証明⁴⁾。

光合成に関連する遺伝子発現のなかで、*rbcL*/*rbcS* の相互の働きはこれまでもっとも詳細な研究の対象とされてきた。すなわちクロロプラスト DNA 中に存在する *rbcL* と、核 DNA 中にある *rbcS* の両者は密接に coordinate (synchronize) して発現が調節されている。上 (a) に記した様に、私どもはシカモア白色細胞アミロプラストにおいては、その DNA のメチル化が *rbcL* の発現の抑制に深く関与していることを明らかにしたが、白色細胞にはそれと coordinate して *rbcS* の transcript が全く検出されないこと、核 DNA のメチ

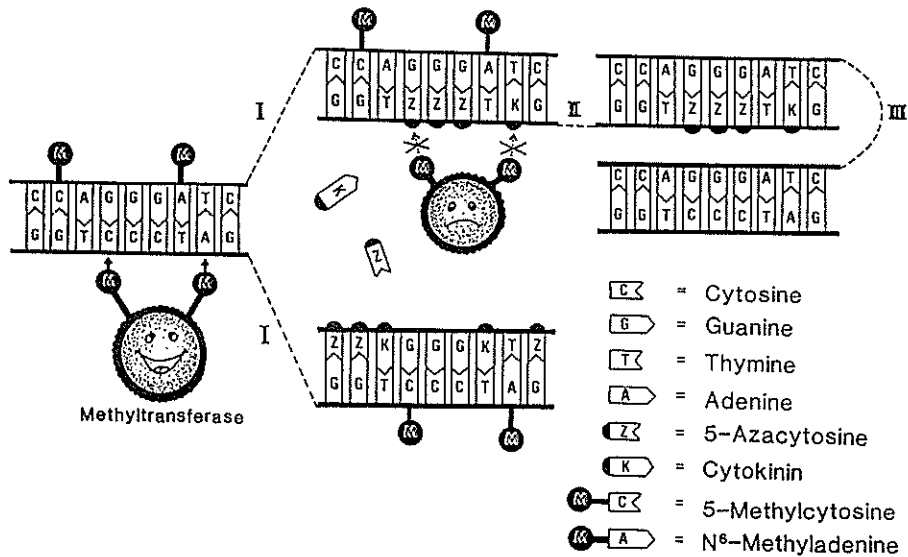


図 1.

ル化修飾がその一義的要因となっていることを証明した。ここで用いられた実験的手段は基本的には (a) に記したものと同一であるが、就中、Hela lysate を用いた *in vitro* 核 DNA 転写活性測定実験は、メチル化された DNA 分画が鋳型活性を全くもたないことを明らかにした。さらに二つの核遺伝子 *cab*, *woxA* についても全く同様な実験結果が得られた。

(e) トマト果実完熟期におけるクロロプラスト→クロモプラスト変換と光合成遺伝子発現不活性は DNA メチル化が一義的要因として働いていることの証明^{5, 6)}。

シカモア白色、緑色細胞を用いるクロロプラスト、アミロプラスト DNA のメチル化の解析は特殊な実験系であるという弱点をもつことを否定できない。これに対して、トマト果実におけるクロロプラスト→クロモプラスト変換は植物生育時にみられる連続的プラスチド変換系である、しかも光合成活性は平行的に低下、消滅することから、DNA メチル化と遺伝子発現制御の相対的關係を解明する上から格好の実験系である。(a) で述べたと基本的には同じ実験方法を用いて、クロモプラスト DNA 分子の選択的メチル化修飾が、いくつかの光合成遺伝子 (例えば *rbcL*, *psbA*, *atpA*,

atpBE の発現抑制の一義的要因となっていることを証明した。就中 run-on 転写系および *in vitro* 転写系が有効な実験系であることが証明された。

(f) 光合成遺伝子の発現がクロロプラストとアミロプラストにおいては明確に異なることの *in vivo* 実験系による証明⁷⁾。

シカモア細胞を用いる私どもの光合成遺伝子発現調節に関する研究は、主として *in vitro* 実験系を中心として進められてきたけれども、*in vivo* レベルにおいてこれを証明することが決定的に重要なことは言うまでもない。この目的のために核遺伝子 (*rbcS*, *cab*, *psbO*) ならびにプラスチド遺伝子 (*rbcL*) を probe として調べた一連の実験から、緑色細胞とは対照的に白色細胞においてはこれら遺伝子の transcript が全く検出されないことが明らかになった。このことは白色シカモア細胞においては光合成遺伝子の発現 (RNA の生成) が遺伝子転写レベルにおいて調節されていることを強く示唆するものである。

(g) 白色シカモア細胞のアミロプラストの光合成遺伝子発現は、DNA メチル化によって一義的に抑制されていることの証明—*in vitro* run-off 転写実験系の確立⁸⁾。

上記 (f) のアミロプラスト DNA の転写制御機構

を分子レベルにおいて精細に調べるために、白色、緑色シカモア細胞から分離したアミロプラストおよびクロロプラスト DNA の鋳型活性を、それぞれの細胞から得たプラスチド抽出液 (RNA ポリメラーゼ) を用いた *in vitro* 転写活性測定実験に供した。その結果、アミロプラスト DNA は全く鋳型活性をもっていないことが明らかになった。平行して行った DNA 構成塩基成分のメチル化分析の結果、アミロプラスト DNA 分子においては、抑制された光合成遺伝子含有画分のメチル化修飾 (特に 5-メチルシトシン) の度合が極めて顕著なことが明らかになった。これに対して、光合成遺伝子が発現しているクロロプラストゲノムにおいてはメチル化修飾はほとんど検出されなかった。

(h) 白色シカモア細胞の光合成遺伝子発現の抑制は hypomethylating agent 処理によって再発現 (活性化) される⁹⁾。

白色シカモア細胞では、光合成に関連する遺伝子 (核およびプラスチド) が抑制されているが、その第一義的要因として DNA のメチル化修飾が働いていることをいろいろのレベルの実験で証明した (上記)。このメカニズムをより積極的に証明するための実験手段として、いわゆる hypomethylating agent (脱メチル化剤) —5-azacytidine および *N*-benzyladenine (サイトカイニン) によって白色細胞を処理し、DNA メチル化分析ならびに、平行して光合成遺伝子 (*rbcL*, *rbcS*, *cab*, *atpA* など) の発現パターンを詳しく検討した。その結果これらの薬剤処理によっていったん抑制されていた光合成遺伝子の発現が再び活性化されるという極めて重要な結果が得られた。この事実はより直接的に DNA メチル化と遺伝子発現の相関関係を支持するものである (図 1)。

今後の課題と発展

はじめにも述べたように、当初の計画に照すとき 2 年間に挙げえた研究成果は可成り顕著なものであったと考えている。これは貴財団の本研究に対する助成によるところが大きいこと、ここに心から謝意を述べるものである。

しかしながら、遺伝子発現の制限機構の解明と

いうことは分子生物学、細胞生物学における基本的命題といっても決して過言ではなく、DNA メチル化修飾が複数 (multivalent) の調節メカニズムの一つとして働いていることは否定できない。しかもシカモア白色細胞由来のアミロプラスト DNA に関しては、その実験遂行上の優位性が幸いし、光合成遺伝子の発現調節とメチル化の相関関係を証明することができた意義は大きいと考えている。ただ、この発見を更に分子的レベルで明らかにするためには、特定の遺伝子 (例えば *rbcL*) 分子の塩基配列上のメチル化の部位を特定するという困難な命題が残されている。この重要な研究課題のための実験は現在進行中である。

発表論文

- 1) Ngernprasirtsiri, J., Kobayashi, H. and Akazawa, T. (1988): DNA methylation as a mechanism of transcriptional regulation in nonphotosynthetic plastids in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 4750-4754.
- 2) Ngernprasirtsiri, J., Chollet, R., Kobayashi, H., Sugiyama, T. and Akazawa, T. (1989): DNA methylation and the differential expression of C4 photosynthesis genes in mesophyll and bundle sheath cells of greening maize leaves. *J. Biol. Chem.*, 264, 831-8248.
- 3) Ngernprasirtsiri, J., Kobayashi, H. and Akazawa, T. (1990): Application of an efficient strategy with a phage vector for constructing a physical map of the amyloplast genome of sycamore (*Acer pseudoplatanus*). *Archives of Biochem. Biophys.*, 276, 172-179.
- 4) Ngernprasirtsiri, J., Kobayashi, H. and Akazawa, T. (1989): Transcriptional regulation and DNA methylation of nuclear genes for photosynthesis in nongreen plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 7919-7923.
- 5) Ngernprasirtsiri, J., Kobayashi, H. and Akazawa, T. (1988): DNA methylation occurred around lowly expressed genes of plastid DNA during tomato fruit development. *Plant Physiol.*, 88, 16-20.
- 6) Kobayashi, H., Ngernprasirtsiri, J. and Akazawa, T. (1990): Transcriptional regulation and DNA methylation in plastids during transitional conversion of chloroplasts to chromoplasts. *The EMBO Journal*, 9, 307-313.
- 7) Ngernprasirtsiri, J., Kobayashi, H. and Akazawa, T. (1990): Expression of photosynthetic genes is distinctly different between chloro-

- plasts and amyloplasts in the liquid cultured cells of sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) *Cell Structure and Function*, 15, 273-283.
- 8) Ngernprasirtsiri, J., Kobayashi, H. and Akazawa, T. (1990): DNA methylation is a determinative element of photosynthesis gene expression in amyloplasts from liquid cultured cells of sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.). *Cell structure and Function*, 15, 285-293.
- 9) Akazawa, T. and Ngernprasirtsiri, J. (1990): Modulation of DNA methylation and gene expression in higher plant cells as influenced by case analog and phytohormone treatment. *Eur. J. Biochem.*, in press.