

## 光のシグナル伝達機構-光スイッチ機構の解明

### Molecular mechanism of light-regulated gene expression

代表研究者	広島大学工学部助教授 Assoc. Prof., Faculty of Enging., Hiroshima Univ. Takashi YAMADA	山田 隆
協同研究者	広島大学工学部教授 Prof., Faculty of Enging., Hiroshima Univ. Tokichi MIYAKAWA	宮川 都吉
	広島大学工学部教授 Prof., Faculty of Enging., Hiroshima Univ. Yoshikatsu MUROOKA	室岡 義勝

For most photosynthetic organisms, light plays at least two important roles; to supply energy for biosyntheses and to regulate physiological states of the cells. The quality and quantity of light changing continuously can be perceived by sophisticated signal transduction systems developed in these organisms. The photoreceptor phytochrome is involved in the regulation of expression of many higher plant genes. Phytochrome exists in two photochemically interconvertible forms. In dark grown cells, phytochrome is synthesized as the inactive Pr form that can be converted to the active Pfr form by light.

The transcription of photosynthetic genes including *rbcS* and *cabII*, encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the chlorophyll a/b-binding protein of photosystem II, respectively, are regulated by phytochrome action. In the aquatic monocot *Lemna gibba*, the *rbcS* gene family consists of 12-14 members, among which SSU5B is the most abundantly expressed in response to phytochrome action (1). A protein trans-factor, LRF-1, that binds to a specific sequence (cis element) upstream of SSU5B has been identified in nuclear extract of *Lemna gibba* (2). A transient gene expression assay system, where a reporter gene with the regulatory element of SSU5B was introduced into *Lemna* intact tissue by particle bombardment showed clear light responsiveness of the gene expression (3).

The expression of another photosynthetic gene *psbA*, encoding the photosystem II thylakoid protein D1 was also examined in the unicellular green alga *Chlorella* (4). *psbA* is located in the large inverted repeat of chloroplast DNA. Northern hybridization revealed a characteristic cycling of accumulation of *psbA* transcripts during the synchronized cell cycle regulated by light. Many mutants with variations in this cycle have been obtained. To characterize each mutation, it is essential to introduce a reporter gene into the cells to see its expression pattern.

Since no transformation vector is available for *Chlorella* cells, we screened for viruses infecting *Chlorella* cells to establish a host-vector system. So far many large icosahedral viruses have been found and characterized (5). These viruses possess very interesting features such as (i) the large linear hairpin DNA genome, (ii) restriction-modification system, (iii) bacteriophage-like lytic cycle, and (iv) cytoplasmic replication. Further molecular characterization of the viruses is now in progress.

We have also established a powerful way to accumulate genetic information about *Chlorella* cells. Molecular karyotypes for six strains of four *Chlorella* species were obtained by using an alternating-field gel electrophoresis system which employs contour-clamped homogeneous electric fields (CHEF). Using hybridization techniques, several genes including *rbcS* and *cabII* were mapped on the separated chromosomes of *C. vulgaris* C169 (6). Since *Chlorella* chromosomes are small enough to separate and isolate individually by CHEF gel electrophoresis under ordinary

conditions, they should serve as excellent materials to study the fundamental molecular structure of plant-type chromosomes.

## 研究目的

光はこの地球上の生きとし生ける物の“Life”を制御する重要な環境因子である。特に、植物においては物質合成のエネルギー源となるのみでなく、生活環のあらゆる段階での分化決定因子となる。時々刻々変化する外環境は、光シグナルとして精確に植物細胞に認識され様々な“応答”に結びつく。この光シグナルの受容から情報変換プロセスを経て特定の形質発現制御（光スイッチ）反応に結びつく一連の機構を分子レベルで解明することを本研究の主目的とする。問題を単純化し、本質に迫る最も良い系として単細胞緑藻（クロレラなど）を材料とし、分子生物学・分子遺伝学・バイオテクノロジー手法を駆使する。研究実施計画は3項目から成っており、(1) 光のON-OFF制御による同調培養系を用いて各増殖相における特定遺伝子の発現パターンと遺伝子構造との相関性を調べ制御因子を特定すること、(2) 形質転換系を確立して、光感应性遺伝子組換え体の発現特性、及び各種突然変異体の対応を調べ、シグナル伝達プロセスを系列化すること、(3) 植物型染色体の基本的分子構造を明らかにし、染色体工学に向けての情報を得ることなどを行う。

## 研究経過及び成果

光合成生物にとって、光は物質合成エネルギーであると同時に重要な環境シグナルとなる。すなわち、時々刻々変化する光の質と量は、細胞の生理的状态をコントロールし、発生や分化を制御する上で重要な意味をもつ。高等植物において、光シグナルの主たる受容体はフィトクロームであり、この蛋白質の二つの分子型 [Pr (赤色光吸収型) ⇌ Pfr (近赤外光吸収型)] の相互変換によって情報が細胞内へ伝えられる。アオウキクサ (*Lemna gibba*) のリブローズニリン酸カルボキシラーゼ (RuBisCO) 小サブユニット遺伝子 (*rbcS*) と光系 II・クロロフィル結合蛋白質遺伝子 (*cabII*) の発現は、転写レベルでこのフィトクロ

ム系によって制御されている<sup>1)</sup>。私共は、*Lemna gibba rbcS* 遺伝子ファミリーの一員 *ssu5B* の発現調節 *cis* 因子を見いだしており<sup>2)</sup>、その機能をレポーター遺伝子を用いたホモログスランジェント発現法（パーティクルガン法）により証明している<sup>3)</sup>。さらに、この *cis* 因子に結合する核蛋白質の存在とその活性がフィトクロームによって制御されることを示した<sup>2)</sup>。一方、光合成遺伝子のうち光系 II のキノン Q<sub>B</sub> 結合蛋白質 (D1) 遺伝子 *psbA* の発現特性を単細胞緑藻クロレラで調べた。*psbA* はクロレラ葉緑体 DNA の逆位反復配列（全塩基配列決定）上に全く同じ配列で2コピー存在しており、352アミノ酸からなるポリペプチドをコードしている<sup>4)</sup>。Northern hybridization 法により、光同調培養細胞を用いて mRNA レベルを調べると、各増殖相に対応して顕著な光依存的周期性がみられた。明期3時間で、*psbA* の mRNA 量はピークに達し、その後徐々に減少し暗期の基底レベルまで低下する。この発現特性に異常をきたした種々の突然変異株を分離した。また核性遺伝子 *rbcS*, *cabII* についても同様なアプローチを試みている。

光同調増殖クロレラ細胞において、増殖相特異的に発現する各種遺伝子の発現制御域 *cis* 因子をレポーター遺伝子に結合し、これを細胞に導入し発現させることによって、光シグナル伝達中間過程の突然変異を検出することができる。遺伝子の細胞導入・発現に有効に利用できるベクターを開発する目的で、クロレラに感染するウイルスを自然界に求めた。*Chlorella* sp NC64A 株を宿主検定菌として、日本中各地の池の水をスクリーニングし、多数のウイルスを発見した<sup>5)</sup>。これらウイルスは非常に効率よく宿主菌を溶菌し、またウイルス粒子の量産および回収は極めて容易であった。ウイルス粒子は径 125 nm~200 nm の正二十面体構造をしており、ゲノムとしてきわめて珍しい線状 dsDNA を有していた。パルスフィールド電

気泳動法により決定した DNA のサイズは 340~370 kbp であり、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) ゲノムの約 40 倍に相当し、巨大 DNA のクローニングに有望なものと思える。クローニングベクターとしての利用をめざして、ウイルスゲノムのマッピング、各種遺伝子のクローニング、*in vitro* のパッケージング等進行中である。

一方、クロレラには有性生活史が存在せず、酵母やクラミドモナスのような遺伝解析が不可能である。このことがクロレラの分子生物学研究の大きな制約となっていた。私共は全く別の方向からクロレラゲノム解析を行った。すなわち、クロレラ数種のプロトプラストを材料としてパルスフィールド電気泳動法 (CHEF) による全染色体の分離 (核型決定) と遺伝子マッピングを行った<sup>6)</sup>。例えば、*C. vulgaris* C169 株では全染色体 16 本が分離でき、合計のゲノムサイズは 38.8 mbp (酵母の約 2 倍) であった。これは今まで知られている真核光合成生物で最小のゲノムサイズである。よって、光合成遺伝子クローニングの材料としてクロレラは最適といえる。また、光合成関係の遺伝子 *cabII* や *rbcS* を、分離した個別染色体にマッピングできた。*cabII* は第 16 番、*rbcS* は第 11 番染色体に位置していた。染色体の制限酵素地図との組合せにより、基本的には全ての遺伝子のマッピングが可能となった。さらに、各染色体固有のゲノミックライブラリーを調製でき、特異的遺伝子のクローニングが容易になった *C. vulgaris* C169 の第 1 番染色体は、サイズが 980 kbp であり、植物型染色体では最小の物である。この染色体の分子構造を明らかにすることによって、植物型染色体の基本像を得ることができる。これをモデルにして、植物染色体工学へと発展させたい。以上より、光による遺伝子発現調節機構の解明を中心に捉えたクロレラの分子生物学的研究に新しい道が開け、今後の発展が期待できるといえよう。

#### 今後の課題と発展

(1) 実験の単純化: 光のシグナル伝達機構については、その入口と出口についてのみ情報が集積している。すなわち、フィトクローム及び青色光

受容体をシグナル受容体とする入口部分と、遺伝子発現スイッチとなる *cis*-因子と *trans*-因子の相互作用の出口部分である。これまでに、幾つかの系から得られている *cis*-と *trans*-因子に関する情報には、混乱があり、再現性の疑わしいものが多々含まれている。それは、高等植物を材料とする複雑な発現系と Ti-プラスミドを用いた無差別形質転換系に主たる原因がある。現在、研究の大勢は、インタクト組織に直接遺伝子を導入し、一過性発現によって因子を同定する方向に動いている (パーティクルガン法)。いずれにしても問題の本質に迫るためには、系の単純化が必要であり、我々が開発しつつあるような単細胞の系が将来的に有効となる。

(2) クロレラ宿主・ベクター系: 特に、光シグナル伝達系の肝心な中継部分を究明するためには、突然変異の分離と遺伝解析が必須である。現在、酵母が注目され、人間を中心とした高次生命現象に関与する遺伝子の機能解析に用いられている理由も、この“遺伝学的便利さ”にある。クロレラの系をより扱いやすくするためにウイルスベクターを用いた、形質転換系を早急に開発する必要がある。

(3) 染色体工学: 本研究の成果の中で、今後の発展に向けて特に力を注ぎたいものに染色体工学がある。我々が開発したクロレラ染色体分離の系から 1 mbp 以下の比較的扱い易い植物型最小染色体が得られた。この染色体のライブラリーを現在作製中であり、テロメアー、セントロメアー、複製開始領域、反復配列などの基本構造を解明しつつある。基本ユニットの再構成により人工染色体モデルを構築でき、これは基礎・応用両面から非常に重要なものとなる。

(4) クロレラウイルスの解析: 本研究の主題とは直接関係しないが、我々が見いだしたクロレラウイルスは以下に述べるような科学上重要な特性を有し、今後の研究対象として、興味深い。

(i) クロレラウイルスは、線状ヘアピン DNA をゲノムとしており、この特殊な構造をした DNA の複製機構に興味もたれる。クロレラウイルスは、同調感染が容易であり、かつ大量増殖

できる故, *in vitro* の系などを含めて絶好のヘアピン DNA 複製機構解明のモデル材料となりうる。

(ii) クロレラウイルスの感染機構はバクテリオファージに似ており, 堅い宿主細胞壁を溶解して孔を開ける。この酵素は従来知られていない基質特異性を有する可能性がある。

(iii) クロレラウイルスは特異的な DNA メチル化機構を有しており, 真核生物における DNA メチル化の生物学的意義を調べる道具として利用できる。

(iv) クロレラウイルスは, 遺伝子発現・転写・翻訳・複製に必要な一連の遺伝子群を有しており, これらの産物は一般分子生物学の道具として利用できる。

#### 文 献

- 1) Silverthorne, J., Wimpee, C. F., Yamada, T., and Tobin, E. M.: Differential expression of individual genes encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in *Lemna gibba*. *Plant Mol. Biol.*, **15**, 49-58 (1990).
- 2) Buzby, J. S., Yamada, T., and Tobin, E. M.: A light-regulated DNA-binding activity interacts with a conserved region of a *Lemna gibba* *rbcS* promoter. *Plant Cell*, **2**, 805-814 (1990).
- 3) Tobin, E. M., Brusslan, J. A., Buzby, J. S., Karlin-Newman, G. A., Kehoe, D. M., Okubara, P. A., Rolfe, S. A., Sun, L., and Yamada, T.: Phytochrome regulation of transcription: Biochemical and genetic approaches. in "Phytochrome Properties and Biological Action. ASI Cell Biol. Ser." ed. by B. Thomas, pp. 167-172, 1991.
- 4) Yamada, T.: Repetitive sequence-mediated rearrangements in *Chlorella ellipsoidea* chloroplast DNA: Completion of nucleotide sequence of the large inverted repeat. *Curr. Genet.*, **19**, 139-147 (1991).
- 5) Yamada, T., Higashiyama, T., and Fukuda, T.: Screening of natural waters for viruses which infect *Chlorella* cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 3433-3437 (1991).
- 6) Higashiyama, T., and Yamada, T.: Electrophoretic karyotyping and chromosomal gene mapping of *Chlorella*. *Nucleic Acids. Res.*, **19**, 6191-6195 (1991).