

C₄ 光合成遺伝子の発現調節機構

Molecular mechanism of gene expression for C₄ photosynthesis

代表研究者 東京大学教養学部助手 柳澤修 一
Res. Assoc., Dept. of Chemistry, College of Arts and Sciences,
The Univ. of Tokyo
Shuichi YANAGISAWA

All higher plants are classified into three groups, C₃ plants, C₄ plants and CAM plants by their photosynthetic CO₂ fixation pathways. The C₄ photosynthetic CO₂ fixation pathway that is associated with the differentiation of photosynthetic cells into two distinct cell types (mesophyll cells and bundle sheath cells) endows C₄ plants with higher rates of photosynthesis than C₃ plants, which are majority of plants. Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) is a key enzyme in this C₄ metabolism, catalyzing primary CO₂ fixation. It is known that the PEPC gene of maize is expressed only in mesophyll cells of leaves. It have been already demonstrated that the 5' flanking region of the maize PEPC gene directs the leaf-specific expression of a reporter gene in transgenic tobacco plants. In addition, maize leaf-specific nuclear factors (MNF1, MNF2a and MNF2b) binding to this PEPC gene promoter have been also identified, and one of them, MNF1, which interacts with the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter as well as the PEPC gene promoter seemed to be a candidate for a transcription factor regulating expression of several genes in leaf-tissues. The purpose of my study is revelation of the mechanism of leaf-specific expression of plant genes, especially C₄ photosynthetic genes, by cloning and characterization of MNF1 gene.

In order to obtain cDNA clone(s) encoding DNA-binding protein(s), a maize cDNA expression library was constructed in *λgt11* with mRNA prepared from maize green leaves. Two cDNA clones were isolated by the screening with a synthetic DNA corresponding to the MNF1-binding site of the CaMV 35S promoter. The products of these clones were termed MNB1a and MNB1b, respectively. Both MNB1a and MNB1b recognized two copies of AAGG motif in the MNF1-binding site on the CaMV 35S promoter as the important bases, as does MNF1. However, binding-specificities of MNB1a, MNB1b and MNF1 were similar but not identical to one another. The deduced amino acid sequence of MNB1a contained three regions rich in basic amino acids and one region rich in acidic amino acids. Since no known protein with a significant homology with MNB1a was found in a survey of the DNA database, MNB1a may be classified into a novel DNA-binding protein. On the other hand, that of MNB1b exhibited a significant homology with nonhistone high mobility group proteins. Since genomic Southern blot analysis suggested that the MNB1a gene belongs to a gene family, MNF1 might be another member of this gene family. Northern blot analysis with RNAs prepared from several tissues revealed that the MNB1a gene is expressed constitutively and that the mRNA of the MNB1b gene is produced more actively in mature leaves than in young leaves.

On purpose to isolate cDNAs originated from other members of the MNB1a multigene family, a cDNA library was constructed in *λgt10* with mRNA from maize green leaves. Two cDNA clones (MNB1a-8 and MNB1a-20) whose restriction maps were different from that of the MNB1a cDNA were isolated from this cDNA library by plaque hybridization method using the MNB1a cDNA as a probe. Nucleotide sequence analysis of these clones revealed that there is a highly conserved domain in each N-terminal region, although homologies among other regions of these clones are not expressive. Since this conserved region are rich in leucines (L), alanines (A) and glutamines (Q), this region was termed LAQ box. Tissue-specificities on the transcription of these newly isolated genes were analyzed by Northern blot analysis with RNAs from several tissues, namely green leaves, etiolated leaves, stems and roots. This analysis showed that the transcription of the

locus of the MNB1a-20 gene produces two kinds of transcripts, both of which are constitutive, and that the mRNA of the MNB1a-8 gene is produced more actively in roots than in other tissues, although the MNB1a-8 gene was expressed in all tissues examined. Finally, several genomic DNA fragments of *Arabidopsis thaliana* (dicot, C₃ plant) and single genomic DNA fragment of *Saccharomyces cerevisiae* were shown to be hybridizable with the maize (monocot, C₄ plant) MNB1a cDNA. This observation suggests conservation of the structure of MNB1a, presumably LAQ box, in the wide eukaryotic world and a correlation between duplication of the MNB1a gene and evolution from unicellular organisms to multicellular organisms.

These results of my study suggested an attractive hypothesis. The MNB1a multigene family, presumably including the MNF1 gene or the gene of a component of MNF1, might be developed during the evolution from unicellular organisms to multicellular organisms that require the mechanism of regulation of tissue-specific expression of genes. The products of the MNB1a gene family might come to participate in this mechanism.

研究目的

植物は光合成的炭酸固定の様式によって C₃ 植物と C₄ 植物に大別され、後者は前者に比べ格段に光合成能が高いことが知られている。C₄ 植物の炭酸固定回路は 2 種類の分化した光合成細胞（葉肉細胞と維管束鞘細胞）が協役して機能することによって成り立っており、C₄ 光合成に関与する遺伝子は、葉組織特異的に、さらには細胞タイプ特異的に発現していることが知られている。C₄ 植物には主要穀物であるトウモロコシが含まれるが、同じイネ科に属するイネや小麦などの他の主要穀物は C₃ 植物に属する。C₄ 植物は C₃ 植物から進化してきたと考えられており、C₄ 植物に進化するに当たって、複数の遺伝子が光合成遺伝子に進化したと考えられるが、どのような遺伝子構造の変化によってもたらされたものなのかは、未だ明らかでない。ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) は C₄ 植物において初期炭酸固定という重要な役割を担う酵素であるが、PEPC 遺伝子も C₄ 植物に進化するに当たって、光合成遺伝子に進化したと考えられている。すでに、C₄ 植物であるトウモロコシから PEPC 遺伝子の 5' 上流領域をクローン化しており、未発表データであるがトウモロコシの PEPC 遺伝子の 5' 上流領域が形質転換タバコ内で葉組織特異的な発現を制御していることを明らかにしている。また、PEPC 遺伝子プロモーターに結合する葉組織特異的核タンパク質 (MNF1, MNF2a,

MNF2b) を同定している。更に、MNF1 は PEPC 遺伝子プロモーターのみならずカリフラワーモザイクウィルスの 35S プロモーターにも結合することから、複数の遺伝子の葉組織での発現制御を行う因子ではないかと推定している。以上のことを背景に、葉組織特異的転写制御因子であると考えられる MNF1 遺伝子をクローニングし、C₄ 光合成遺伝子を中心に植物の葉組織特異的遺伝子発現機構を明らかにすることを目的として行われた。

研究経過

トウモロコシの緑葉から調製した mRNA と *lgt11* ベクターを用いて cDNA ライブラリーを作成した。この cDNA ライブラリーから、カリフラワーモザイクウィルスの 35S プロモーター上の MNF1 結合部位に対応する合成 DNA に結合することを指標として、二つの独立なクローン (MNB1a と MNB1b) を得た。ゲル・シフト法およびサウスウエスタン法によるこれらのクローンの産物の DNA 結合における塩基配列特異性、プライマー伸長法と塩基配列によるクローンの構造解析、サザン及びノザン・ハイブリダイゼーション法による解析を行った (表 1)。この結果はすでに論文として、*Journal of Biological Chemistry* 誌上で公表を行った。

MNB1a も MNB1b のいずれとも、MNF1 の挙動とは完全には一致せず、MNB1a と MNB1b は MNF1 とは同一ではないと見られたが、MNB1a

表 1. 本研究で同定されたトウモロコシの因子

因子名	認識配列	塩基配列特異性	発現の組織特異性	構造上の特徴
MNF1	AAGG	高	葉	?
MNB1a	AAGG	高	構成的	LAQ box
MNB1a-8	?	?	根>茎>葉	LAQ box
MNB1a-20	?	?	構成的	LAQ box
MNB1b	AAGG	低	成熟葉>若葉	HMG box

は多重遺伝子族のメンバーであることが明らかとなったので、さらに、トウモロコシの緑葉の mRNA 由来の cDNA ライブラリーを *λgt10* ベクター上に構築し、この cDNA ライブラリーから MNB1a と相同性を持つクローンのスクリーニングを行った。最終的に、MNB1a 多重遺伝子族に属し MNB1a と異なる 2 種類のクローンを単離し、解析を行った。MNB1a は既知のタンパク質とは相同性を示さない、新規なクラスに分類される DNA 結合タンパク質と考えられているが、解析の結果、MNB1a 遺伝子族のメンバー間で、相同性を持つ領域は非常に限られていることが分かり、この領域を LAQ ボックスと命名した。この研究結果については、現在、論文発表準備中である。

さらに、MNB1a と MNB1b の染色体 DNA クローンのクローニングを試みた。MNB1b の cDNA は翻訳領域を完全に含むが、5' 非翻訳領域を欠損していたので、この領域を持つ染色体 DNA クローンを得て、この領域の塩基配列を決定し、論文にまとめた。また、MNB1a 多重遺伝子族に属する 2 種類の染色体 DNA クローンを得、現在、LAQ ボックスとエクソン-イントロン構造の関係および MNB1a の分子進化とエクソンシャプニングモデルの関係の観点から解析を行っている。

一方、MNB1a の生理的役割、すなわち MNB1a の転写における役割を明らかにするための解析は、Jen Sheen 博士 (Department of Genetics, Harvard Medical School and Molecular Biology, Massachusetts General Hospital) の協力を得て、現在進行中である。MNB1a の cDNA をトウモロコシのプロトプラスト中で発現するように

構築したプラスミドと制御下に CAT 遺伝子を持つミニマムプロモーターの上流に MNB1a 結合配列を接続したプラスミドを作成した。現在、これらのプラスミドとトウモロコシのプロトプラストを用いたトランジェント・イクスプレッションの系による CAT 遺伝子の発現量から MNB1a の生理的役割について解析中である。

研究成果

トウモロコシの cDNA ライブラリーから、カリフラワーモザイクウィルスの 35S プロモーターの MNF1 結合領域に対応する合成 DNA に結合する二つのクローン (MNB1a と MNB1b) を得た。トウモロコシの核抽出液中の MNF1 はゲルシフト法による解析から、MNF1 結合配列上に 2 コピー存在する AAGG 配列が重要であることを明らかにしたが、MNB1a と MNB1b のいずれも MNF1 同様に AAGG 配列が重要であることがサウスウエスタン法による解析により確認された。しかしながら、MNF1 と MNB1a の塩基配列の認識が厳密であるのに対して、MNB1b の塩基配列特異性は低かった。また、MNF1 は 35S プロモーターと PEPC 遺伝子プロモーターの両方に結合するのに対し、MNB1a は 35S プロモーター上の MNF1 結合部位にしか結合せず、また、MNB1b は MNF1 が結合しない配列にも結合することから、MNB1a と MNB1b のいずれも MNF1 と同一ではないと考えられた。プライマー伸長法の結果から、MNB1a と MNB1b の cDNA のいずれも完全長に近いことが明らかとなったので、これらのクローンの塩基配列を決定することによりそのアミノ酸配列構造を求めたところ、MNB1b は HMG タンパク質と相同性を持つことが明らかとなった。一方、MNB1a は既知

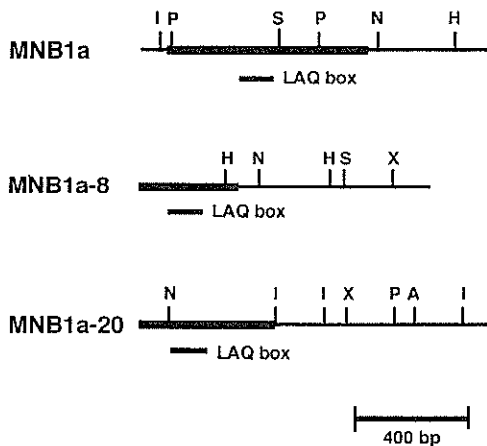


図1. MNB1a 遺伝子族に属する cDNA のクローンの制限酵素地図。

LAQ ボックスの位置と翻訳領域の位置を太線で示し、制限酵素 (I, *Sph*I; P, *Pst*I; S, *Sma*I; N, *Nru*I; H, *Hinc*II; X, *Xba*I; A, *Sac*I) の切断点部位も示した。

のタンパク質と相同性が見られず、新規なグループに属する DNA 結合タンパク質であると推察された。サザン・ハイブリダイゼーション法による解析から、MNB1b 遺伝子はシングル・コピー遺伝子と判断されたが、MNB1a は多重遺伝子族に属していることが明らかとなった。また、ノザン・ハイブリダイゼーション法による解析から、MNB1a 遺伝子は、緑葉、黄化葉、茎、根のすべてで構成的に発現しており、MNB1b 遺伝子は、すべての組織で発現しているが、若い葉より成熟した葉で発現量が高いことが明らかとなった。以上の結果から、カリフラワーモザイクウィルスの 35S プロモーターの MNF1 結合配列は、構造の相違な複数の DNA 結合タンパク質のターゲット部位であると考えられた。最近、HMG タンパク質の役割が関心を集めており、転写因子と DNA の複合体を安定化させる役割を担っている場合も知られてきているので、この現象は興味深いと思われる。一方、MNB1a と MNB1b のいずれも MNF1 と同一ではないと見られたが、MNB1a は多重遺伝子族に属することおよび結合に重要な配列がいずれも AAGG 配列であることから、この遺伝子族の他のメンバーが MNF1 である可能性

が高いと判断された。

そこで、MNB1a の cDNA をプローブとして、トウモロコシの緑葉の mRNA と *λgt10* ベクターを用いて作成した cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、2 種類の新たなクローン (MNB1a-8 と MNB1a-20) を単離した。これらの塩基配列から、アミノ酸配列を明らかにしたところ、MNB1a, MNB1a-8, MNB1a-20 間で、全体的には相同性がみられなかったが、45 アミノ酸から成るごく一部の領域に高い相同性がみられた。この領域は、ロイシン (L), アラニン (A), グルタミン (Q) を多く含むので、この領域を、LAQ ボックスと命名した (図1)。LAQ ボックスは新たなプロテイン・モチーフと考えられ、その機能に興味を持たれる。MNB1a-8 と MNB1a-20 が組織特異的な発現をしているかどうかを、ノザン・プロット法により解析したところ、MNB1a-20 遺伝子は構成的に発現しており、その転写産物は 2 種類あること、MNB1a-8 は葉、茎、根のいずれでも発現しているが、根での発現が他の組織に比べて高いことが明らかとなった。さらに、MNB1a の cDNA を用いたサザン・ハイブリダイゼーション法により、 C_3 ・双子葉植物のアラビドピシスには複数の MNB1a 相同物が存在するが、酵母には 1 コピーの相同物しか存在しないことが示された。この結果から、MNB1a の構造は広く真核生物に保存されており、また、MNB1a 遺伝子族は単細胞生物から多細胞生物に進化する途上、すなわち組織を形成する途上で遺伝子の重複により形成された可能性が示唆された。

今後の課題と発展

MNB1a 多重遺伝子族に、MNF1 が含まれているかどうかは現在のところ実験的直接的証拠はないが、MNB1a と MNF1 のターゲット配列が一致すること、また、MNB1a 多重遺伝子族に属するメンバーには組織に依存した発現を示すものが存在することから、おそらくは、MNF1 を含む MNB1a 多重遺伝子族が組織特異的転写制御に関与していると推察される。このことを明らかにしていくには、さらなる解析が必要であるが、ひとまずは、すでに進行中のトウモロコシのプロトプ

ラストを用いたトランジェント・イクスプレションの系を用いた MNB1a の転写制御能の解析の結果が待たれるところである。MNB1a 多重遺伝子族が C₄ 光合成遺伝子 (PEPC 遺伝子) の発現にも関与しているとするならば、MNB1a の相同物は、C₃・双子葉のアラビドピシスにも存在しているので、C₄ 光合成遺伝子が C₃ 植物内でも組織特異的な発現を行うことと矛盾せず、C₄ 光合成遺伝子は既存の組織特異的な発現のメカニズムを利用していると考えられる。

本研究で見つけられた DNA 結合タンパク質、MNB1a は、単細胞生物から多細胞生物に進化する過程で遺伝子の重複が起こったと考えられ、遺伝子の重複が組織特異的な遺伝子発現の制御機構の形成に関与している可能性があり、今後、さらなる解析によってこの点を明らかにしていくことが必要であろう。また、今回、発見された LAQ ボックスは、DNA タンパク質の未知のモチーフであり、その機能に興味をもたれるところである。DNA 結合ドメイン、転写制御ドメインなども考えられるが、疎水性のアミノ酸から成っていることから、可能性の一つとして hydrophobic interaction による 2 量体形成あるいは他のタンパク質の相互作用に必要なドメインである可能性が考えられる。MNB1a の構造、おそらくは LAQ ボックスは、広く真核生物に保存されている構造と見られ、重要な機能を担うドメインであることが推察される。

発表論文リスト

(原著論文)

1. Yanagisawa, S. and Izui, K. (1993): Molecular cloning of two DNA-binding proteins of maize that are structurally different but interact with the same sequence motif. *J. Biol. Chem.*, 268, 16028-16036.
2. Yanagisawa, S. and Izui, K.: DNA sequence of the maize genomic clone homologous to the cDNA of HMG protein. *Plant Mol. Biol.*, in

press.

3. Brunner, B., Flores, S., Yanagisawa, S., Izui, K., and Neuhaus, G.: Cell-specific expression of a C₄-type maize phosphoenolpyruvate carboxylase promoter sequence in tobacco. *Transgenic Res.*, in press.
4. Yanagisawa, S.: Multigene family of MNB1a that may be classified into a novel DNA-binding protein of maize, in preparation.

(口頭発表)

(英文)

1. Yanagisawa, S. and Izui, K. (1992): Molecular mechanism of PEPC gene expression in maize, Report of the Information Exchange Seminar on Molecular Regulation of Genes and Enzymes in Photosynthesis Japan-US Cooperative Photoconversion and Photosynthesis Research Program, pp. 59-62.
2. Yanagisawa, S. and Izui, K. (1992): Maize nuclear factors interacting with the C₄ photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase gene promoter, IXth International Congress on Photosynthesis, Research in Photosynthesis, Vol. III, 839-842.
3. Yanagisawa, S. (1993): Multigene family of MNB1a that may be classified into a novel DNA-binding protein of maize, LVII Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, Abstract, pp. 211.

(和文)

1. 柳澤修一, 泉井 桂 (1992): トウモロコシの DNA 結合タンパク質 MNB1a と MNB1b の認識配列とその染色体 DNA のクローニング. 第 65 回日本生化学会大会, 生化学, 64, 683.
2. 柳澤修一, 泉井 桂 (1992): トウモロコシの DNA 結合タンパク質 MNB1a 遺伝子群と MNB1b 遺伝子の構造解析. 第 15 回日本分子生物学会年会, 講演要旨集, pp. 227.
3. 柳澤修一 (1993): トウモロコシの DNA 結合タンパク質 MNB1a 遺伝子群の解析. 第 66 回日本生化学会大会, 生化学, 65, 1058.
4. 柳澤修一 (1993): 新規なタイプの DNA 結合タンパク質に分類される MNB1a 多重遺伝子群の保存領域 LAQ ボックス. 第 16 回日本分子生物学会年会, 講演要旨集, pp. 257.