

シロイヌナズナ *CGS1* 遺伝子にみられる
転写後制御に関わる突然変異株の分離と解析

学位論文内容の要旨

mRNA の安定性による制御は迅速で厳密な制御を可能にする遺伝子発現レベルでの制御機構である。制御された mRNA 分解は単なる不要な mRNA の除去ではなく、積極的な発現制御である。移動することのできない植物では、こうした転写後制御が環境要因の変化に対応する重要な手段のひとつであると考えられる。

CGS1 遺伝子にコードされるシロイヌナズナのシスタチオニッペ-シンターゼ (CGS) はメチオニン生合成の鍵段階を触媒する。他の多くの生合成経路の鍵段階を触媒する酵素とは異なり、CGS はアロステリック酵素ではなく、*CGS1* 遺伝子の mRNA がメチオニン添加に応答して不安定化することにより負のフィードバック制御を受ける。遊離メチオニンを過剰に蓄積するシロイヌナズナ *mtol* 突然変異株は、*CGS1* 遺伝子の第 1 エキソンにアミノ酸の置換を伴う 1 塩基置換を生じており、このフィードバック制御に欠損を持つ。

CGS1 遺伝子の転写後制御機構の mRNA レベルでの解析を可能にする実験系を確立することを目的として、*CGS1* 遺伝子の第 1 エキソンにレポーター遺伝子をつなぎ、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーターの制御下に置いた融合遺伝子を導入したトランスジェニック・シロイヌナズナを作出した。作出したトランスジェニック・シロイヌナズナは、メチオニン添加により導入遺伝子のレポーター活性が減少するとともに、融合遺伝子の mRNA の蓄積量も減少した。これにより、*CGS1* 遺伝子の第 1 エキソン領域が mRNA の安定性による制御を行うために必要十分な領域であることが明らかになった。また、異なるレポーター遺伝子を持つトランスジェニック・シロイヌナズナ同士の掛け合わせによる解析では、互いに他方のレポーター活性に影響を与えなかったことから、第 1 エキソンポリペプチドがシスに働くことが遺伝学的に明らかになった。

CGS1 遺伝子における転写後制御は、少なくとも、制御のエフェクター分子の認識と mRNA の分解という 2 つの段階により構成される。シス領域として十数アミノ酸残基からなる領域の重要性が示されているが、この領域が制御の全てを担っているとは考

えがたく、制御機構にかかわる他の因子が存在していると考えられる。このようなトランスに働く因子を遺伝学的に同定することを目的として、CGS1 遺伝子の転写後制御にかかわる因子の機能欠損型の突然変異株の分離を行った。

トランスジェニック・シロイヌナズナ GFPc4 株は、CGS1 遺伝子第 1 エキソンに発光クラゲの緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子をつないで CaMV 35S プロモーターの制御下に置いた融合遺伝子を導入した株である。この GFPc4 株をメチオニンを添加した条件下で生育させると GFP 蛍光が減少する。一方、この制御に関わる因子に変異が生じれば高い GFP 蛍光を示すことが期待される。そこで、GFPc4 株を親株として突然変異誘起処理を行い、親株よりも高い GFP 蛍光を示す突然変異株の分離を行った。約 50,000 株のスクリーニングにより、導入遺伝子の発現量が増加している突然変異株を 12 株分離した。このうちの 8 株については導入遺伝子の CGS1 遺伝子第 1 エキソン内にアミノ酸置換をもたらす塩基置換が存在しており、新たな *mtol* 変異株と考えられた。残りの 4 株については CGS1 遺伝子第 1 エキソン内に変異は存在せず、目的とする突然変異株であることが期待された。

得られた 4 株の候補株について CGS1 mRNA の蓄積量をノーザンブロット解析により調べたところ、2 株の候補株では親株の 2 倍近くの CGS1 mRNA を蓄積していた。CGS1 遺伝子の転写後制御のエフェクター分子はメチオニンの代謝産物である S-アデノシルメチオニン (SAM) である。SAM の蓄積量が減少する変異であっても同様の表現型が期待されるが、これら 2 株の変異株では SAM の蓄積量が親株よりも増加していた。従って、SAM の減少により CGS1 遺伝子の発現が増加したのではなく、CGS1 遺伝子の転写後制御に関わる未知の因子に変異が生じたために転写後制御が十分に働かなくなった突然変異株であることが示唆された。

このうちの 1 株では、転写阻害剤を用いた解析により CGS1 mRNA の安定性が増加していることが示され、*cms1* (CGS1 mRNA stability) 変異株と名付けた。*cms1* 変異を詳細にマップし、ポジショナルクローニングにより原因遺伝子 *CMS1* を同定した。*CMS1* 遺伝子は 1,673 アミノ酸から成る機能未知のタンパク質をコードしており、*cms1* 変異株では 507 番目のトリプトファンが終止コドンに、また 1,146 番目のグリシンがアルギニンに変異していた。*CMS1* タンパク質は MATH ドメインと呼ばれる機能ドメインがタンデムに 4 つ並んでいる前半部と、既報のタンパク質ドメインモチーフとは相同性を持たない後半部により構成される。MATH ドメインはホモ多量体形成に関与すると考えられているが、*CMS1* 遺伝子についてはこれまでに報告はなく、また MATH ドメインを 4 つ持っているタンパク質についての報告もこれまでにない。一方、CGS1 mRNA の蓄積量が増加していたもうひとつの突然変異株では、レポーター遺伝子に依存した翻訳の増加がみられ、翻訳に関わる突然変異株であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査 教授 内藤 哲
副査 教授 伴戸 久徳
副査 教授 木村 淳夫

学位論文題名

シロイヌナズナ *CGS1* 遺伝子にみられる 転写後制御に関わる突然変異株の分離と解析

本論文は本文 48 頁と 22 図、2 表からなる和文論文であり、参考論文 3 編が添えられている。

mRNA の安定性による制御は細胞内の状態に対応して迅速で厳密な制御を可能にする。メチオニン生合成の鍵段階を触媒するシロイヌナズナのシスタチオニγγ-シンターゼ (CGS) は、他の多くの生合成経路の鍵段階の酵素とは異なり、アロステリック酵素ではない。CGS をコードする *CGS1* 遺伝子は、メチオニン添加に応答して mRNA が不安定化することにより負のフィードバック制御を受けている。本論文は、*CGS1* 遺伝子 mRNA 安定性の制御に関わる突然変異株を分離・解析したものである。得られた成果は以下の通りである。

1. *CGS1* 遺伝子第 1 エキソン領域の機能解析

CGS1 遺伝子発現制御の mRNA レベルでの解析を可能にする実験系を確立することを目的として、*CGS1* 遺伝子の第 1 エキソンにレポーター遺伝子をつなぎ、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーターの制御下に置いた融合遺伝子を導入したトランスジェニック・シロイヌナズナを作出した。このトランスジェニック・シロイヌナズナでは、メチオニン添加により導入遺伝子のレポーター活性が減少するとともに、融合遺伝子の mRNA の蓄積量も減少した。これにより、*CGS1* 遺伝子の第 1 エキソン領域が mRNA の安定性による制御を行うために必要かつ十分な領域であることを明らかにした。また、異なるレポーター遺伝子を持つトランスジェニック・シロイヌナズナ同士の掛け合わせによる解析を行い、第 1 エキソンポリペプチドがシスに働くことを遺伝学的に明らかにした。

2. *CGS1* 遺伝子発現の転写後制御にかかわる突然変異株の分離

トランスジェニック・シロイヌナズナ GFPc4 株は、*CGS1* 遺伝子第 1 エキソンに発

光クラゲの緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子をつないで CaMV 35S プロモーターの制御下に置いた融合遺伝子を導入した株である。この GFPc4 株をメチオニンを添加した条件下で生育させると GFP 蛍光が減少するが、この制御に関わる因子に変異が生じれば高い GFP 蛍光を示すと期待される。この考えに基づき、GFPc4 株を親株として突然変異誘起処理を行い、親株よりも高い GFP 蛍光を示す突然変異株の分離を行った。

約 50,000 株のスクリーニングにより、導入遺伝子の発現量が増加している突然変異株を 12 株分離した。このうちの 8 株については導入遺伝子の *CGS1* 遺伝子第 1 エキソン領域内にアミノ酸置換をもたらす塩基置換が存在しており、新たな *mtol* 変異株と考えられた。残りの 4 株については *CGS1* 遺伝子第 1 エキソン内に変異は存在せず、少なくとも *CGS1* 遺伝子の発現制御に関わる因子に生じた変異であることが示された。得られた 4 株の変異株について *CGS1* mRNA の蓄積量をノーザンブロット解析により調べたところ、この内の 2 株では *CGS1* mRNA の蓄積が親株の約 2 倍に増加しており、mRNA レベルでの発現制御に関わる変異であると考えられた。

3. *CGS1* 遺伝子 mRNA 安定性の制御に関わる突然変異と原因遺伝子の同定

得られた変異の 1 株では、転写阻害剤を用いた解析により *CGS1* mRNA の安定性が高まっていることを示した。*cms1* (*CGS1* mRNA stability) 変異株と名付けたこの変異を詳細にマップし、ポジショナルクローニングにより原因遺伝子 *CMS1* を同定した。*CMS1* 遺伝子は 1,673 アミノ酸から成る機能未知のタンパク質をコードしており、*cms1* 変異株では 507 番目のトリプトファンが終止コドンに、また 1,146 番目のグリシンがアルギニンに変異している。

予想されるアミノ酸配列の解析により、*CMS1* タンパク質は MATH ドメインと呼ばれる機能ドメインがタンデムに 4 つ並んでいる前半部と、既報のタンパク質ドメインモチーフとは相同性を持たない後半部により構成されると考えられる。MATH ドメインはホモ多量体形成に関与するとされているが、*CMS1* 遺伝子についてはこれまでに報告はなく新規遺伝子であった。また、MATH ドメインを 4 つ持っているタンパク質についての報告もこれまでにない。

以上のように、本研究では、*CGS1* 遺伝子 mRNA の安定性制御に関わるシロイヌナズナ変異株を分離し、新規遺伝子 *CMS1* を同定した。これまでに高等植物において mRNA の安定性制御に関わる変異株の報告は 2 例しかなく、原因遺伝子が同定されたのは本研究が最初の例である。mRNA の安定性の制御機構を明らかにする上で重要な研究であり、学術的に高く評価できる。

よって、審査員一同は、鈴木昭徳が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。