

報告番号 ※ 乙-第 4432号

主論文の要旨

題名

植物ミトコンドリア F_1F_0 ATPase
サブユニット遺伝子の構造と発現

氏名 森上 敦

主論文の要旨

報告番号

※ 第

号

氏名

森上 敦

F_1F_0 ATPaseは酸化的リン酸化の最終反応をつかさどりADPと無機リン酸からATPを合成する F_1F_0 ATPaseの可溶性画分である。この酵素は動物・植物・真菌類のミトコンドリア、細菌形質膜、葉緑体に存在し、その構造や発現についての解析が細菌や動物の酵素を中心に行われているが、植物の F_1 ATPaseの研究はこの酵素の重要性にも関わらず遅れている。そこで、本研究では植物ミトコンドリアに存在する F_1 ATPaseについて、サブユニットの構造とサブユニット遺伝子発現の二つの見地から研究を行った。

【 F_1 ATPaseサブユニット遺伝子の発現】

植物の F_1 ATPaseを構成するサブユニット遺伝子は核とミトコンドリアの両ゲノムに分かれているので、それぞれの発現調節機構の解析が必要であるが、本研究ではミトコンドリア支配である α サブユニット遺伝子の構造やその領域の発現についての解析をおもに行った。

エンドウ植物ミトコンドリア F_1 ATPase α サブユニット遺伝子の構造と発現

エンドウのミトコンドリア F_1 ATPaseの α サブユニット遺伝子の単離を大腸菌と葉緑体の F_1 ATPase α サブユニット遺伝子をプローブとして行ったところ、 α サブユニット翻訳領域を含む遺伝子が4種単離された。この4種の遺伝子の制限酵素地図の作成とその比較を行うと、 α サブユニット翻訳領域の一部を反復配列として、その上流に2種、その下流に2種の配列が存在し、これが組合わさることにより4種の遺伝子が生じていることが明らかになった。植物ミトコンドリアゲノムには反復配列が存在し、それを介した相同組換えによりミトコンドリアゲノムの再編成が行われることが知られている。今回の結果は α サブユニットの翻訳領域の一部がエンドウミトコンドリアゲノムの相同組換えに関わる反復配列となっていることを示すものと思われた。

組換えが生じることにより、4種の遺伝子のうち2種については α サブユニット全翻訳領域が存在するが、後の2種の遺伝子についてはC末端領域が α サブユニットの配列とは別の配列に置きかわった遺伝子となっていた。これらの遺伝子の発現を調べると α サブユニットの全翻訳領域を含む遺伝子の発現は認められたが、C末端側が別の配列におきかわった新規な遺伝子の産物は検出できなかった。

エンドウミトコンドリア F_1F_0 ATPase α サブユニットーサブユニット9遺伝子領域の転写地図

α サブユニット遺伝子の転写産物の解析の途上、2種の α サブユニット遺伝子の上流域に由来する転写産物が多量に存在することを見いだしたので、この

領域の全塩基配列の決定を行った。その結果、 F_1F_0 ATPaseサブユニット9遺伝子が α サブユニット遺伝子上流逆鎖に存在することが明らかになった。そこで、 α サブユニットとサブユニット9両遺伝子の転写産物についての解析をノーザンブロットハイブリダイゼーション、S1マッピング法、プライマー伸長法を用いて行った。

α サブユニット遺伝子の転写産物は4種類存在するが、転写産物の5'末端は2カ所に限られた。4種の長さの転写産物が存在するのは3'末端の違いによると思われる。サブユニット9遺伝子の転写産物は3種類存在し、それぞれ5'末端の位置が異なっていた。サブユニット9遺伝子の翻訳領域下流にはGAGG配列の後に2重のステムループ構造をとり得る配列が存在し、この2番目のステムのすぐ下流に全てのサブユニット9遺伝子転写産物の3'末端が存在した。このステムループ構造は転写終結に働くのか、RNAの安定性に関わっているのかわからないが、非常によく似た二次構造が他の植物ミトコンドリア遺伝子の翻訳領域下流にも存在した。

α サブユニットとサブユニット9遺伝子の併せて5種の転写産物の5'末端近傍の配列の比較を行ったが、共通な配列は見つけることができなかった。しかし、サブユニット9遺伝子のいちばん長い転写産物の5'末端近傍の配列は最近明らかにされた植物ミトコンドリア遺伝子のプロモーターのコンセンサス配列に一致していた。よってサブユニット9遺伝子のいちばん長い転写産物はプロセッシングを受けていない一次転写産物であると推定された。

転写産物地図から α サブユニット遺伝子の一番長い転写産物とサブユニット9遺伝子の一番長い転写産物は互いに同じ遺伝子領域の逆鎖を転写していることが明らかになった。重複している部分は705塩基であった。また α サブユニットの一番長い転写産物の5'末端はサブユニット9遺伝子の2番目に長い転写産物と4塩基分だけ相補的に重なっていた。しかしこの様に相補的なRNAが存在することがRNAのプロセッシングにどのように関わっているかについては明らかではない。

【植物の F_1 ATPaseを構成するサブユニットの構造】

細菌・葉緑体・動物や酵母のミトコンドリアより単離された F_1 ATPaseは5つのサブユニットからなっていることから、一般に F_1 ATPaseは5サブユニット構造を取っていると考えられてきた。しかし双子葉植物のミトコンドリアから単離された F_1 ATPaseは他生物の F_1 ATPaseよりサブユニットが一つ多い6種類のサブユニットからなっていた。そこで木村らがサツマイモミトコンドリア F_1 ATPaseの

マイナーサブユニット γ 、 δ 、 δ' 、 ϵ サブユニットのタンパク質を単離し、そのN末端アミノ酸配列の決定を行ったところ、 γ 、 ϵ サブユニットはそれぞれ動物の F_1F_0 ATPaseの γ 及び ϵ サブユニットと相同なサブユニットであることが判明した。また、 δ サブユニットは動物の F_1F_0 ATPaseの F_0 画分に存在するOSCP (oligomycin sensitivity-conferring protein)と相同性があることが明らかにされた。しかし δ サブユニットのN末端アミノ酸配列35残基に相同なアミノ酸配列は動物の F_1F_0 ATPaseを構成するサブユニットの中には見いだせなかった。そこで、筆者らはサツマイモの δ' サブユニットのアミノ酸に対応するオリゴヌクレオチドプローブを用いて、 δ' サブユニットのcDNAの単離を行った。単離されたcDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列を他生物の F_1 ATPaseのサブユニットのアミノ酸配列と比較を行うと δ' サブユニットは動物・菌類ミトコンドリアの F_1 ATPase δ サブユニットと31-36%の相同性が見られ、細菌・葉緑体 CF_1 の ϵ サブユニットとは14-25%の相同性があることが明らかになった。サツマイモの δ' サブユニットのアミノ酸配列は他の相同なサブユニットのものよりも若干大きなタンパク質で δ' サブユニットには他の相同なサブユニットにはない33残基から49残基のアミノ酸配列がN末端に存在した。 δ' サブユニットのN末端アミノ酸配列を他生物の F_1 ATPaseサブユニットと比較を行ったときに相同なサブユニットが見つけれなかったのはこれが理由である。今回の結果より、6サブユニットからなる双子葉植物のミトコンドリア F_1 ATPaseは動物のミトコンドリア F_1 ATPaseの5種のサブユニットに動物では F_1F_0 ATPaseの膜画分 F_0 に分画されるOSCPが加わった形をしていることが明らかになった。

これ以外に、N末端のアミノ酸配列はわかっているが、全一次構造が決定されていない γ 及び ϵ サブユニットのcDNAの単離も行い、構造の決定をおこなった。塩基配列から推定されるアミノ酸配列をウシのミトコンドリアの γ サブユニット及び ϵ サブユニットと比較を行うとそれぞれ37%と36%の相同性が見られた。