

氏 名 真 野 昌 二

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第337号

学位授与の日付 平成10年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Studies on alternative splicing in higher plants

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 飯 田 滋  
教 授 西 村 幹 夫  
教 授 村 田 紀 夫  
助 教 授 吉 国 通 庸  
教 授 中 村 研 三 (名 古 屋 大 学)

## 論文内容の要旨

Alternative splicing has emerged in recent years as a widespread mechanism for regulating gene expression and generating isoform diversity. It has been a subject of major interest, both in its own right as an important biological regulatory mechanism, and also because it has provided insights into some fundamental aspects of splicing. The analysis of alternative splicing has been mainly performed in mammals and some important information about the mechanism such as the identifications of *trans* factors and *cis* regulatory elements were obtained. However, recent studies demonstrated the involvement of alternative splicing in the synthesis of some enzymes in plants. He analyzed about alternative splicing of two enzymes in pumpkin. One is hydroxypyruvate reductase (HPR) that is known for a leaf peroxisomal enzyme and the other is chloroplastic ascorbate peroxidase (APX).

From the two kinds of cDNA cloning for HPR and the determination of their nucleotide and genomic sequences, it has been proposed that alternative splicing could function in the synthesis of their mRNAs [1]. Therefore, he tried to detect the presence of two HPR proteins in pumpkin cells. The immunofluorescent microscopy using an antibody against HPR showed that HPR1 and HPR2 proteins are localized in leaf peroxisomes and the cytosol, respectively. These localizations were confirmed by the analysis using transgenic plants that expressed fusion proteins with green fluorescent protein. Based on these results and the nucleotide and deduced amino acid sequences, it was concluded that alternative splicing controlled the production of the targeting signal to peroxisomes, resulting in the determination of two HPR proteins. That is, a single HPR gene has two pairs of the GT-AG doublets in the region encoding the carboxy terminus, and the way to splice affects the presence of the targeting signal. The immunoblot analysis revealed that the accumulations of two electrophoretically similar polypeptides corresponding to HPR1 and HPR2 proteins were increased during germination of pumpkin cotyledons and enhanced by light. Moreover, the RT-PCR analysis showed that this light induction shifted the splicing pattern from the production of almost equal amounts of HPR1 and HPR2 mRNAs to mainly production of HPR2 mRNA. These results suggest that alternative splicing of HPR pre-mRNA is regulated developmentally and by light [2]. The existence of only HPR2 in stamen tissues in addition to the fact of the much induction of HPR2 protein compared to HPR1 provides the interest of the physiological role of HPR2, but the function of HPR2 protein in the cytosol remains unclear.

To date, cDNAs for HPR in higher plants have been cloned from pumpkin [1] and cucumber [3]. HPR cDNA in cucumber encodes the protein without the targeting signal, namely, the HPR2-type protein. However, it was indicated that another HPR protein with the targeting signal to microbodies existed in cucumber, because the cucumber HPR gene also has two pairs of the GT-AG doublets at the same position of

pumpkin HPR gene. It is therefore important to examine whether another plants have the HPR proteins. Five *Arabidopsis* EST clones homologous to pumpkin HPR have been registered at the Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) at Ohio State University. The determination of their nucleotide sequences encoding the carboxy termini revealed that all EST clones encode the HPR1-type protein. It was confirmed that only one polypeptide was recognized by antibodies against HPR. At the result of the genomic sequence, *Arabidopsis* HPR gene has one kind of the GT-AG doublet, although the HPR gene exists as a single copy like does pumpkin HPR gene. These results show that alternative splicing does not undergo in *Arabidopsis* [4]. The immunoblot analysis demonstrated that pumpkin and cucumber, of tested plants, seem to have two kinds of HPR proteins, whereas another plants seem to have one HPR protein, indicating that all plants do not necessarily need the cytosolic HPR.

Plant cells have four kinds of APX. Of these, two APXs are localized in the stroma (sAPX) and on the thylakoid membrane (tAPX) in chloroplasts, and they are considered as the scavengers of hydrogen peroxide. From the partial sequence at the amino termini and the biochemical properties, it was speculated in their laboratory that sAPX and tAPX might be produced by alternative splicing. Therefore, he tried to isolate sAPX cDNA clone in pumpkin and determine its nucleotide sequence. As compared with the sequence of pumpkin tAPX cDNA [5], sAPX cDNA showed the complete identity except the region encoding the carboxy domain that contained the thylakoid membrane spanning region. The analysis of genomic structure clarified the presence of one donor site and two acceptor sites, indicating that the way to use each acceptor site determined the inclusion of the thylakoid membrane spanning region. The immunobot analysis revealed that this alternative splicing are also regulated developmentally and by light. Moreover, the regulation of tissue-specific manner is present [6].

At the results of these two examples, it was demonstrated that alternative splicing which produces variants whose subcellular or suborganellar localizations are different exists in higher plants. Interestingly, this alternative splicing showed the light-dependency and the tissue-specific manner. Tissue specificity is the phenomena as same as seen in alternative splicing in mammals. However, the light-dependency is specific to plants, indicating the presence of the novel mechanism of the signal transduction. Also, these data suggest that the conversions of microbodies (from glyoxysomes to leaf peroxisomes) and chloroplasts (from etioplasts to chloroplasts) are closely related to the regulation of HPR and chloroplastic APXs by alternative splicing, respectively.

[1] Hayashi M., Tsugeki R., Kondo M., Mori H and Nishimura M. (1996) Plant Mol. Biol., 30, 183-189.

- [2] Mano S., Hayashi M. and Nishimura M. (1998) *Plant Cell*, (submitted)
- [3] Greenler J.M., Sloan J.S., Schwartz B.W. and Becker W.M. (1989) *Plant Mol. Biol.*, 13, 139-150.
- [4] Mano S., Hayashi M., Kondo M. and Nishimura M. (1997) *Plant Cell Physiol.* 38, 449-455.
- [5] Yamaguchi K., Hayashi M. and Nishimura M. (1996) *Plant Cell Physiol.* 37, 405-409.
- [6] Mano S., Yamaguchi K., Hayashi M. and Nishimura M. (1997) *FEBS Lett.* 413, 21-26.

## 論文の審査結果の要旨

オルタナティブ・スプライシングは、1遺伝子より生じた前駆体RNAが異なったスプライシングを受けることにより、複数のmRNAを生み出す転写後の調節を担う重要なメカニズムである。

申請者は、植物におけるオルタナティブ・スプライシングのメカニズムの解明を目的として、カボチャのヒドロキシピルビン酸レダクターゼ(HPR)と葉緑体局在型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)の各アイソフォームの細胞内局在性、及びその制御機構について解析した。HPRはこれまで緑葉ペルオキシソームに局在するグリコール酸経路の酵素として同定されてきた。しかしながら、申請者の研究室で単離された2種類のHPR cDNAは、オルタナティブ・スプライシングにより、緑葉ペルオキシソームとサイトソルに存在するHPRタンパク質が生成されることを示唆していた。申請者は、この2種類のHPRタンパク質の細胞内局在性を調べるため、HPR活性の測定、間接蛍光抗体実験、形質転換植物体における解析を試みた。その結果、緑葉ペルオキシソームのみならず、サイトソルでも高いHPR活性を検出し、また、間接蛍光抗体及び Green fluorescent proteinとの融合タンパク質を導入した形質転換植物体の解析から、確かに2種類のHPRタンパク質が緑葉ペルオキシソームとサイトソルに存在することを明らかにした。さらに、このカボチャの2種類のHPR mRNAの発現は、光により制御されていることが明らかとなり、興味深いことにサイトソル局在型のHPR mRNAが顕著に誘導され、実際に対応するサイトソル型タンパク質の光による顕著な蓄積が観察された。また、このオルタナティブ・スプライシングは組織特異性を示し、雄しべでは、サイトソル局在型HPRのみが存在することを明らかにした。これまで、植物タンパク質のオルタナティブ・スプライシングにおけるメカニズムについては全く解析が行われておらず、特に、光によりオルタナティブ・スプライシングの制御が行われている結果は、これが初めての報告であり、新規のRNA合成系の存在を明らかにしたという点で注目される。このHPRのオルタナティブ・スプライシングは種特異的であり、植物の進化上の見地からも大変興味深い。

また、葉緑体局在型APXに関しても、ストロマとチラコイド膜という異なる部位に局在するAPXの生成にオルタナティブ・スプライシングが関与していること、その制御が光によりなされていること、組織特異性を示すことを明らかにした。以上の結果は、HPRとAPXのオルタナティブ・スプライシングが、ペルオキシソームと葉緑体の発達や各組織における機能と密接に関係していることを示すものであり、オルガネラの分化と機能発現に関する新たな調節系が存在することを明らかにしたものである。特に、光制御によるオルタナティブ・スプライシングの存在は動物やウイルスの系では見られない新規のメカニズムであり、高等植物におけるmRNA情報発現に重要な知見を提供すると考えられる。

本研究の成果の一部は、既に2報の報文として印刷されており、現在、1報を投稿中である。以上の内容により、本研究は、学位論文として十分な内容を持つものと判定した。

また、学位論文として提出された研究成果について口頭発表させた後、審査委員が論文内容について諮問した。さらに、申請者の関連研究分野の一般知識及びその背景となる基礎知識についても口答諮問により審査した。これらの諮問に対する申請者の返答はいずれも適切だった。また、英語の能力に関しては、英文で書かれた学位論文および筆頭著者と

して国際誌に発表した論文を検討した結果、研究者として十分な語学力を持っていると判断した。これらの結果をもとに、審査委員会は申請者の持つ研究能力および学力は学位取得に値するものと判断した。