

平成21年 5月25日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19570042

研究課題名（和文） 植物葉緑体カルシウム依存型緊縮制御因子の機能的役割の解明

研究課題名（英文） Study on functional roles of calcium-dependent stringent factor in plant chloroplasts

研究代表者

戸澤 謙 (TOZAWA YUZURU)

愛媛大学・無細胞生命科学工学研究センター・教授

研究者番号：90363267

研究成果の概要：植物の葉緑体はバクテリアの共生を起源とするため、様々なバクテリア型の制御システムが働いている。我々は、これまでに葉緑体がバクテリア型の緊縮制御と呼ばれる翻訳や転写の制御機構を有することが示してきた。この緊縮制御を引き起こす物質は ppGpp という核酸である。本研究では、植物の葉緑体がカルシウム濃度依存的に ppGpp を合成する酵素を有することをタンパク質レベルで証明し、本酵素遺伝子を CRSH (Calcium-activated RelA SpoT Homolog) と命名し、研究成果を世界に先駆けて報告した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：環境応答・葉緑体・カルシウム・転写制御・緊縮応答・ppGpp

## 1. 研究開始当初の背景

葉緑体はバクテリア（原核生物）の一種である光合成原核生物の共生に起源を持つ細胞内小器官（オルガネラ）であることから、その生物学的なシステムは基本的に原核生物型の装置を中心に構成されている。我々は本研究開始時までには葉緑体の原核生物型の転写酵素の機能解析を進め、イネおよびシロイヌナズナの葉緑体転写制御因子遺伝子を世界に先駆けて単離するなど、独自の研究を進めていた。さらに、葉緑体におけるユニ

クな核酸分子グアノシン 4 リン酸 (ppGpp) の生合成酵素 (RelA-SpoT Homolog, RSH) およびその遺伝子の存在を明らかにし、葉緑体内の遺伝子転写制御には、ppGpp による転写酵素機能修飾のメカニズムが存在する事を作業仮説として提唱してきた。

植物の ppGpp 合成酵素遺伝子および候補遺伝子として、当時までに大きく分類して3種類の遺伝子 (RSH1, RSH2 および RSH3) が報告されており、バクテリア緊縮制御因子に相当する葉緑体内のリボソーム依存型 ppGpp 合成酵素活性に関しては、我々がその

詳細を生化学的に明らかにしていた。我々は平行して植物以外の光合成真核生物としてクラミドモナスからも ppGpp 合成酵素遺伝子を単離しその機能解析を進め、ppGpp 合成系が葉緑体を有する真核生物に普遍的に存在することを遺伝子・酵素活性の両面より世界に先駆けて明らかにしていた。

## 2. 研究の目的

本研究の主たる目的は、我々が単離した新奇 ppGpp 合成酵素候補遺伝子 (CRSH) の機能を生化学的・遺伝学的に明らかにすることである。

下記の図 1 に模式的に示すように CRSH 遺伝子がコードするタンパク質は、アミノ末端に葉緑体移行シグナル、カルボキシ末端側に 2 つのカルシウム結合ドメインを有しており、バクテリアには見られない未報告なタイプのタンパク質構造を持つ。我々は CRSH タンパク質が葉緑体内における  $Ca^{2+}$  シグナルのセンサータンパク質の一つであると予想した。これはまだ世界的にも誰も提唱していない新たな作業仮説である。CRSH の存在は、カルシウム依存型酵素が植物特異的にカルシウムシグナルに連動して機能するシグナル伝達系として進化してきたことを想起させるものであり、真核生物のセカンドメッセンジャーである  $Ca^{2+}$  と、原核生物の代表的シグナル化合物である ppGpp が葉緑体にて「出会う」という生物学的に極めて興味深いシステムの存在を期待させるものである。

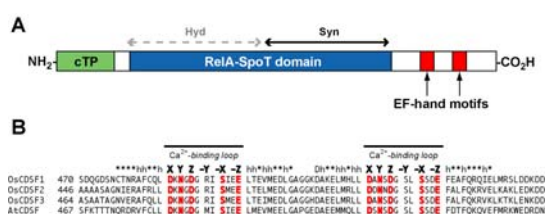


図 1. CRSH タンパク質のアミノ酸配列より予想される機能領域。A. 葉緑体移行シグナル (cTP), RelA/SpoT に同源性が高い領域 (RelA-SpoT domain) およびカルシウム結合モチーフ配列 (EF-hand motifs) を含む。B. 3 つのイネの CRSH タンパク質とシロイヌナズナの CRSH の EF-hand motif アミノ酸配列の比較。

## 3. 研究の方法

遺伝子がコードするタンパク質機能を解

明する手段としては、組換えタンパク質を作製し、その機能を試験管内で解析する生化学的手法や、植物の突然変異を利用した遺伝子変異株を用いる遺伝学的手法があるが、本研究では、大腸菌などの原核生物を利用する機能解析を進めるが、原核生物内では ppGpp による生育阻害とともに、細胞内に含まれる  $Ca^{2+}$  の影響による解析系構築の困難が想定された。従って、試験管内タンパク質合成系による組換えタンパク質の作製を主な生化学的手法として研究を遂行した。以下に具体的な手法を項目毎に記載する。

### (1) イネの新たな CRSH (RSH4) 相同遺伝子の単離と転写解析

#### ① cDNA 単離

イネ (日本晴れ) の発芽 20 日の実生より mRNA を精製し、cDNA 調製を行い PCR 法による遺伝子単離を行い、配列決定後に cDNA を転写解析用のプローブ調製およびタンパク質合成用のプラスミド構築に使用した。

#### ② CRSH 遺伝子の転写解析

単離した遺伝子の mRNA としての転写量を検証するために、ノザンハイブリダイゼーション法および RT-PCR 法による解析を行った。

### (2) 無細胞タンパク質合成による新奇 ppGpp 合成酵素の機能解析

#### ① CRSH1 タンパク質の葉緑体局在の検証

コムギ胚芽抽出液を利用した無細胞タンパク質合成系により、<sup>35</sup>S で放射能標識されたシステインおよびメチオニンを含む反応液中で CRSH の全長を含むタンパク質を合成した。このタンパク質を単離直後のエンドウ豆葉緑体と試験管内で共存させ、標識された CRSH タンパク質の葉緑体移行性について解析を進めた。対照区として、アミノ末端領域を欠損した CRSH 変異タンパク質を合成し、葉緑体移行効率の比較を行った。

#### ② 大腸菌変異株を用いた CRSH タンパク質の ppGpp 合成活性の検証

RelA や SpoT などの ppGpp 合成酵素は大腸菌から始めに発見されたため、類似タンパク質の遺伝子機能は大腸菌の RelA SpoT 欠損変異株を用いて行われることが多い。本研究においても、大腸菌の ppGpp 合成酵素遺伝子を完全に失った RelA SpoT 欠損株に CRSH 遺伝子を発現させ、大腸菌内の ppGpp 合成活性を検証した。

#### ③ 無細胞タンパク質合成系による CRSH タンパク質の ppGpp 合成活性の検証

大腸菌宿主による遺伝子組換え系では、ppGpp に強い転写抑制効果があるために ppGpp 合成酵素の調製が困難であった。従って本研究では、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて新奇 ppGpp 合成酵素を調製し、ppGpp 合成酵素の機能を生化学的に明らかにした。葉緑体内で成熟型として機能する CRSH タンパク質は、アミノ末端の葉緑体移行シグナルを切除したものである。この成熟型タンパク質を GST(グルタチオントランスフェラーゼ)との融合タンパク質として合成し、GST と CRSH タンパク質との境界に導入したプロテアーゼ部位で成熟型タンパク質を切り出すことにより CRSH タンパク質の精製を行なった。

#### ④ 変異導入による CRSH タンパク質の EF-hand モチーフの機能解析

Ca<sup>2+</sup>結合部位を欠損させた酵素タンパク質を合成し、Ca<sup>2+</sup>結合部位の除去により CRSH が Ca<sup>2+</sup>非依存的に活性を獲得するか否かについて明らかにした。平行して、カルシウムイオンを特異的にキレート(捕捉)する薬剤 BAPTA を利用して反応液中のカルシウムを人為的に除去した系での CRSH 酵素機能の解析を行った。さらに、Ca<sup>2+</sup>濃度条件を詳細に設定し、CRSH1 の活性化に必要な生理学的濃度条件を明らかにした。

#### ⑤ イネの CRSH1 変異株の選抜と遺伝子欠損変異株の取得

イネには Tos17 と呼ばれる動く遺伝子レトロトランスポゾンが存在し、この Tos17 が入り込むことで特定の遺伝子の機能が失われる変異株を用いるシステムが利用できる。CRSH1 遺伝子にこの Tos17 が入り込んだイネ変異株を取得し、その表現型を解析することにより CRSH の植物体全体での生物学的な役割が調査できることから、この変異株の取得を目指した。

### (3) シロイヌナズナの CRSH 遺伝子の機能解析

#### ① CRSH タンパク質の葉緑体局在性の検証

イネは単子葉植物のモデルであり、シロイヌナズナは双子葉植物のモデル生物である。植物に共通な CRSH 遺伝子の機能を解析するために、本項目ではシロイヌナズナの CRSH の機能解析を進めた。

#### ② ppGpp 合成活性の解析

イネの CRSH 同様に大腸菌変異株を利用した機能解析および無細胞タンパク質合

成系により合成したタンパク質の機能解析を進めた。

#### ③ 遺伝子発現抑制株の表現型解析

シロイヌナズナの CRSH 遺伝子の発現を人為的に抑制したアンチセンス mRNA 遺伝子発現変異株を作製し、表現型の解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) イネの CRSH 遺伝子産物の機能解析

バクテリア緊縮応答機構の制御物質 ppGpp ならびに ppGpp の合成酵素が植物の葉緑体に存在していることが近年明らかにされてきた。植物 ppGpp 合成酵素は、RSH (RelA-SpoT homolog)と命名され、一群の RSH は葉緑体に局在して機能することが示されている。我々は、植物(イネ、シロイヌナズナ)から新しいタイプの RSH 遺伝子を見出し、この遺伝子がコードするタンパク質の機能解析を進めた。

#### ① 遺伝子の単離と転写量の比較解析

イネゲノムの解析データより、イネには当初クローニングに成功した CRSH に配列が類似する遺伝子として他に 2 種類が存在することを新たに見いだした。これらは最終的に、従来の RSH 遺伝子と機能的にことなるため CRSH と新たに命名することになり、当初単離したものを CRSH1、新たに単離した遺伝子をそれぞれ CRSH2 および CRSH3 と命名した。それぞれが植物体内で mRNA として発現していることを検証するため、また、発現量の差を調査するため、ノザンハイブリダイゼーションならびに RT-PCR 法を用いた転写解析を行った。その結果、3 種類共通して緑色組織に特異的に発現していること、CRSH1 の発現が最も高いことなどが判明した。

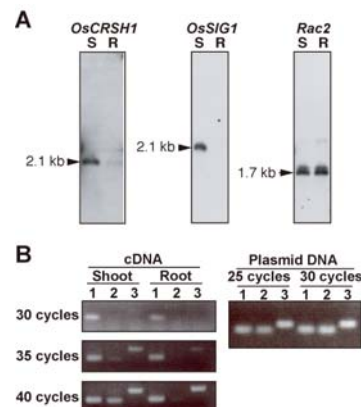


図2. イネの CRSH1 遺伝子の発現解

析結果. A. イネの CRSH1 遺伝子 (OsCRSH1) は対照区として用いた葉緑体転写制御因子遺伝子 (OsSIG1) と同様に緑色組織 (S) に特異的に発現し, 根 (R) にはほとんど発現していない. Rac2 は全ての組織で発現する遺伝子. B. イネの 3 種類の CRSH 遺伝子の発現量比較. 右は 25 サイクルの PCR でコントロールのプラスミドより増幅したそれぞれの遺伝子 DNA. 左側は, mRNA を鋳型とした RT-PCR の結果であり, サンプル 1 (CRSH1) の増幅が顕著であり他の 2 種 (2, CRSH2; 3, CRSH3) は転写量が低いため増幅しにくい.

## ② 遺伝子産物の葉緑体局在試験

エンドウマメ葉緑体を用いた試験管内移行実験を行ない, 成熟タンパク質の葉緑体移行を確認した. その結果, CRSH1 タンパク質はアミノ末端の配列をシグナル配列として利用することにより葉緑体に移行するとともに, アミノ酸配列より予想された部位でシグナル配列が切除され, 成熟型タンパク質となることが確認された.

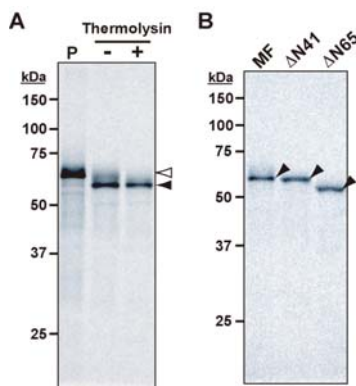


図 3. 葉緑体移行試験. レーン P は,  $^{35}\text{S}$  標識した全長 CRSH1 タンパク質, Thermolysin は葉緑体に移行しないタンパク質を分解するタンパク質分解酵素. 全長タンパク質が葉緑体に移行すると, 葉緑体膜に保護されて分解されずに検出される. 白抜き矢印は分解されずに検出された葉緑体に移行していないタンパク質. 高効率で葉緑体移行し, シグナル配列が切除された産物 (黒矢印) が検出されていること. 右の B は, アミノ末端を 41 残基あるいは 65 残基削除したタンパク質を A の葉緑体移行タンパク質と同時に SDS-PAGE にて解析したもの. シグナル切除型の成熟タンパク質は 41 残基欠損タンパク質とほぼ同一のタンパク質であることを示唆する.

## ③ CRSH タンパク質の ppGpp 合成活性の検証

成熟型タンパク質のアミノ酸配列には, C 末端側に 2 つの EF-hand モチーフが存在することから, カルシウムイオン結合による機能制御系の存在が予想された. そこで, 無細胞翻訳系によりこの新規タンパク質を合成・精製し, ppGpp 合成活性の解析を進めた. その結果, 生理学的に起こりうるカルシウム濃度の上昇により, 精製タンパク質の ppGpp 合成活性化が活性化されることを確認した.

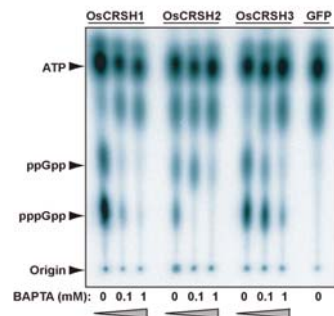


図 4. イネの 3 種の CRSH タンパク質の ppGpp 合成酵素活性.  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP と GTP を基質として反応させ, pppGpp を放射標識核酸として検出した. カルシウムイオンを特異的に捕捉する化合物 (BAPTA) を加え反応液中のカルシウムを除去すると pppGpp 合成活性が抑制される.

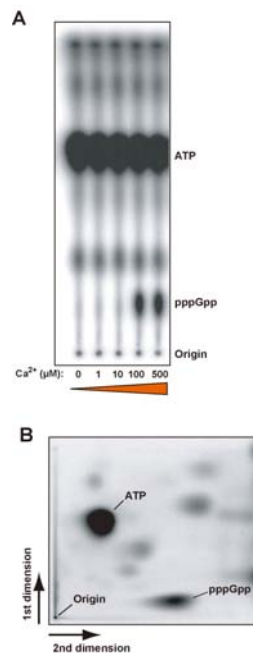


図5. ppGpp 合成活性. A. 一次元の薄層クロマトグラフィーによる解析. カルシウム濃度を上昇させることにより pppGpp が生成する. B. 二次元薄層クロマトグラフィーによる解析. 検出した pppGpp スポットを対照区と比較した.

- ④ EF-hand への点変異導入による ppGpp 合成活性のカルシウム依存性の検証  
 EF-hand 領域のアミノ酸を変異導入により置換することにより, カルシウム依存的 ppGpp 合成活性化作用が消失することを確認した.

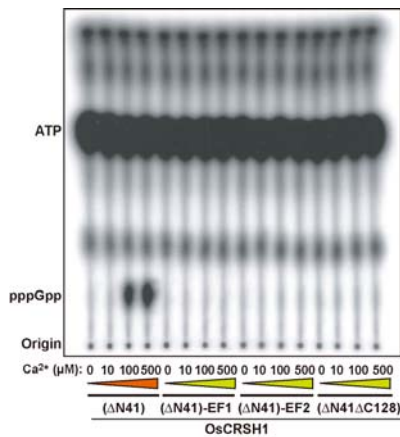


図6. EF-hand モチーフへの変異導入解析. EF-hand モチーフ内のカルシウムイオン結合部位のアミノ酸を他のアミノ酸に置換した変異型 CRSH1 タンパク質 (EF-1 および EF-2) を合成し, カルシウム依存的な pppGpp 合成活性を検証した. [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP と GTP を基質として反応させ, pppGpp を放射標識核酸として検出した. 変異を入れた 2 種のタンパク質とともに, EF-hand 自体を欠損したタンパク質も pppGpp 合成能を失っている.

⑤ 総括

以上より, 新たに見出した RSH はカルボキシ末端の EF-hand モチーフによるカルシウム活性制御を受ける新規 RSH タンパク質であることを確認し, 我々はこの新しい RSH を CRSH (Calcium-activated RSH) と命名した. 本研究により植物葉緑体内にカルシウムシグナルと連動する ppGpp シグナル系が存在する事を世界に先駆けて示し, 論文発表を行なった.

⑥ イネの変異株解析

イネゲノムの CRSH1 遺伝子領域に Tos17 が挿入した変異株に関してこれまでに 1 株を

遺伝子破壊株として選抜完了しているが, 今回, もう一つ独立の変位部位を有するイネ変異株の完全遺伝子破壊株の種子を採取する段階まで到達した. 興味深いことに, シロイヌナズナにおいて観察された種子形成不能などの表現型は見いだされなかった. シロイヌナズナの CRSH がゲノム中に単一遺伝子であるのに対し, イネゲノムには CRSH1, CRSH2, CRSH3 の 3 種類の遺伝子が存在する. 従って CRSH1 欠損に対し他の 2 種類の遺伝子が機能の補填を行っている可能性が高い. これらの変異株については引き続き解析を進めている.

(2) シロイヌナズナの CRSH 遺伝子の機能解析

① 葉緑体局在および ppGpp 合成酵素活性  
 エンドウ豆の実生より単離した葉緑体を用いて, イネの CRSH 機能解析の項目で記載した葉緑体移行試験を行った結果, シロイヌナズナの CRSH も同様にアミノ末端のシグナル配列を利用した葉緑体移行をすることを確認した. さらに, 特異的抗体をもちいた解析でもシロイヌナズナの葉緑体に CRSH が局在することを確認した. 無細胞タンパク質合成系により合成したシロイヌナズナの CRSH タンパク質も ppGpp 合成活性を有し, この活性がカルシウムにより誘導されることを確認した. これらの結果より, 双子葉植物においても単子葉植物イネと同様に, カルシウム依存的に機能する ppGpp 合成酵素遺伝子が存在することが証明された.

② CRSH 転写抑制による種子形成障害

CRSH 遺伝子の発現が著しく抑制された変異株の取得し, この変異株の解析より, CRSH タンパク質の機能の抑制が種子の分化を阻害してしまうことを新たに見出した. この結果は, 植物の生殖器官分化に CRSH 遺伝子およびそのタンパク質が正に機能していることを遺伝学的に示すものである. 結果は論文として報告した.

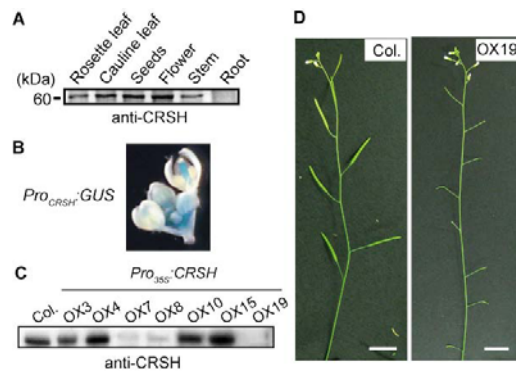


図7. シロイヌナズナの CRSH 遺伝子発現抑制株の種子形成異常. CRSH 遺伝子のアンチセンス mRNA を発現させたシロイヌナズナ変位株 (OX19) は, 野生型 (Col.) と比較して種子形成異常が見られる.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① 戸澤 讓, 笠井 光治, 七宮 英晃, 高等植物とバクテリアにおける多様な ppGpp 合成系とその利用. バイオサイエンスとインダストリー, 66, 293-297 (2008) 査読無.
- ② MASUDA Shinji, TOZAWA Yuzuru, OHTA Hiroyuki, Possible targets of “magic spots” in plant signaling. Plant Signaling & Behavior, 3, 1021-1023 (2008), 査読有.
- ③ MASUDA Shinji, MIZUSAWA Kazuki, NARISAWA Takakuni, TOZAWA Yuzuru, OHTA Hiroyuki, TAKAMIYA Kenichi, The Bacterial Stringent Response, Conserved in Chloroplasts, Controls Plant Fertilization. Plant Cell Physiology, 49, 135-141 (2008), 査読有.
- ④ TOZAWA Yuzuru, NOZAWA Akira, KANNO Takuya, NIRISAWA Takakuni, MASUDA Shinji, KASAI Koji, NANAMIYA Hideaki, Calcium-activated (p)ppGpp synthetase in chloroplasts of land plants. The Journal of Biological Chemistry, 282, 35536-35545 (2007), 査読有.

[学会発表] (計4件)

- ① 戸澤 讓, 七宮 英晃, 及川 彰, バクテリア起源 ppGpp 生合成酵素の機能的多様性. 第50回日本植物生理学会年会, 2009年3月21日, 名古屋大学
- ② 戸澤 讓, 七宮 英晃, 成沢 隆邦, 笠井 光治, 植物葉緑体におけるカルシウム依存型緊縮制御因子の機能解析. 第49回日本植物生理学会年会, 2008年3月22日, 札幌コンベンションセンター
- ③ 水澤 一樹, 増田 真二, 成沢 隆邦, 戸澤 讓, 太田 啓之, 高宮 健一郎, 2008年3月20日, 札幌コンベンションセンター
- ④ 成沢 隆邦, 七宮 英晃, 野澤 彰, 戸澤 讓, 植物葉緑体のカルシウム依存型 (p)ppGpp 合成酵素. 第30回日本分子生物学会年会, 2007年12月11日, 札幌コンベンションセンター

[図書] (計1件)

- ① TOZAWA Yuzuru, Chloroplast ppGpp synthesis system. Adaptive Gene Regulations-From Microorganisms to Organelles, 2008: 37-47, ISBN: 978-81-308-0266-4, Eds. FUJIWARA Makoto, TANAKA Kan, TAKAHASHI Hideo,

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸澤 讓 (TOZAWA YUZURU)

愛媛大学・無細胞生命科学工学研究センター・教授

研究者番号: 90363267

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

七宮 英晃 (NANAMIYA HIDEAKI)

愛媛大学・無細胞生命科学工学研究センター・助教

研究者番号: 50366944