

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19580118
 研究課題名（和文） 緊縮制御因子（ppGpp）による植物ストレス応答機構の解明
 研究課題名（英文） Elucidation of the mechanism of plant stress responses induced by ppGpp
 研究代表者
 高橋 公咲 (TAKAHASHI KOSAKU)
 北海道大学・大学院農学研究院・助教
 研究者番号：30374662

研究成果の概要：グアノシ 5' -二リン酸 3' -二リン酸 (ppGpp) は、葉緑体の原核型 RNA ポリメラーゼを選択的に阻害することが明らかになった。ppGpp の光親和性プローブである 6-thioppGpp を合成し、葉緑体の原核型 RNA ポリメラーゼとクロスリンク実験を行ったところ、ppGpp は β' サブユニットに結合していることが判明した。また、タバコおよび緑藻類の ppGpp 合成酵素遺伝子変異株を作製した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：緊縮制御、ppGpp、ストレス応答、RNA ポリメラーゼ

1. 研究開始当初の背景

バクテリア独自のストレス応答機構である緊縮制御は、環境ストレスに応答して一時的にバクテリアの生育を抑制し、新しい環境への適応を促進させるために RNA 合成の抑制等、多くの代謝系に関与する多面的制御機構である。この緊縮制御を司る中心物質がグアノシ 5' -二リン酸 3' -二リン酸 (ppGpp) である。

これまで ppGpp は、バクテリアにしか存在しないとされてきた。近年、その合成タンパク質をコードする遺伝子 (*rsh* および *crsh*) が植物からも見出された。その後、植物の ppGpp 分析法が開発され、ppGpp は植物中にも存在し、葉緑体に局在することが明らかと

なった。また、植物体内の ppGpp 濃度は環境ストレスにより誘導される植物ホルモンシグナル伝達経路を介して誘導され、葉緑体 RNA ポリメラーゼ活性を阻害することが明らかとなった。

葉緑体はシアノバクテリアに由来すると考えられており、その遺伝システムはバクテリアに類似している。これらの実験結果から、植物においても ppGpp がシグナル分子として機能していることが示唆された。しかしながら、植物における ppGpp の作用に関する研究は、これまでほとんどなされていなかった。

2. 研究の目的

ppGpp の葉緑体遺伝子転写・翻訳制御機構

を明らかにし、ppGpp が植物ストレス応答にどの様に関わっているか、そのメカニズムを解明する。そして、バクテリアから植物への進化の過程で、ppGpp の有する生理作用がどのように保持されてきたのか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ppGpp のタバコ葉緑体および原色素体の RNA ポリメラーゼ転写活性に対する作用

色素体は、未分化の原色素体では核に遺伝子がコードされたファージ型葉緑体 RNA ポリメラーゼ (NEP) が主に機能し、葉緑体に分化した後では、葉緑体ゲノムに遺伝子がコードされた原核型葉緑体 RNA ポリメラーゼ (PEP) が主に機能している。ppGpp の両 RNA ポリメラーゼの転写活性に対する作用を調べる。

(2) ppGpp の葉緑体 RNA ポリメラーゼの結合部位の同定

ppGpp の光親和性プローブである 6-thioppGpp を合成する。本プローブと葉緑体 RNA ポリメラーゼをクロスリンクさせ、その結合部位を各種分析手法により同定する。

(3) ppGpp 合成酵素遺伝子過剰発現株の葉緑体タンパク質のプロテオーム解析

タバコ (*Nicotiana tabacum*) の ppGpp 合成酵素遺伝子過剰発現株を作製する。本遺伝子過剰発現株と野生株の葉緑体タンパク質抽出液を 2 次元電気泳動に供し、ppGpp が葉緑体のいずれのタンパク質の発現に関与しているのか解析する。

(4) 緑藻類の ppGpp 産生誘導物質の探索

緑藻類 (*Chlamydomonas reinhardtii*) の ppGpp 産生誘導物質を各種クロマトグラフィーにより精製する。得られた化合物は NMR 等の各種機器分析を行い、その化学構造を決定する。

4. 研究成果

(1) ppGpp のタバコ葉緑体および原色素体の RNA ポリメラーゼ転写活性に対する作用

タバコ葉から葉緑体を分離し、原核型葉緑体 RNA ポリメラーゼ画分 (PEP) を調整した。タバコ培養細胞 BY-2 から原色素体を分離し、ファージ型葉緑体 RNA ポリメラーゼ画分 (NEP) を調整した。両画分に対する ppGpp の転写阻害活性を調べた。その結果、ppGpp は PEP の転写活性を濃度依存的に阻害した。

一方、NEP に対して ppGpp はほとんど作用しなかった。これらの結果から、ppGpp は PEP を選択的に阻害することが明らかとなった。従って、ppGpp は主に色素体が原色素体から葉緑体に分化した後に、その遺伝システムに作用し、葉緑体の機能に影響を与えることが示唆された。

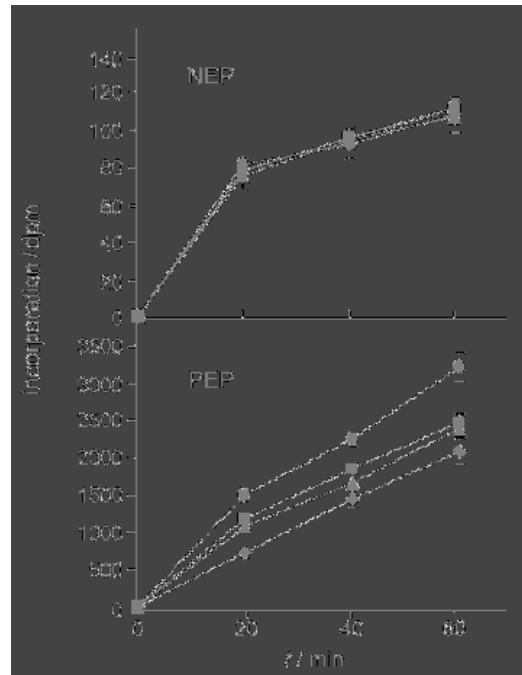


図 1. NEP 及び PEP に対する ppGpp の転写阻害活性. ppGpp 濃度; ●, 無添加; ■, 200 μM; ▲, 500 μM; ◆, 1000 μM.

(2) ppGpp の葉緑体 RNA ポリメラーゼの結合部位の同定

ppGpp の光親和性プローブである 6-thioppGpp を 6-thioguanosine を出発物質として 4 段階の化学反応および 1 段階の酵素反応を用いて合成した。

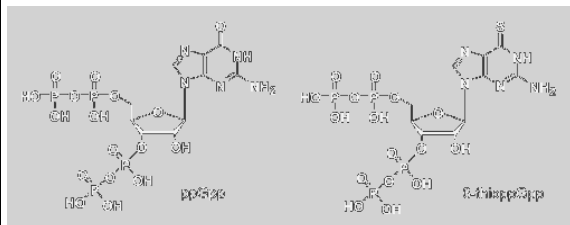


図 2. ppGpp および 6-thioppGpp の化学構造.

ハウレンソウ (*Spinacia oleracea*) より各種クロマトグラフィーを用いて PEP を粗精製した。この PEP に対して 6-thioppGpp は ppGpp とほぼ同様の転写阻害活性を示した。従って、その化学構造の類似性も考慮すれば、両化合物は PEP の同じ部位に結合し、転写活性を阻害していることが推定された。そこで、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を基質としたニリン酸転位反応により $[\text{}^{32}\text{P}]\text{6-thioppGpp}$ を調整した。本放射性プローブを PEP 溶液に添加し、30 分インキュベート後、紫外線照射することでクロスリンクさせた。PEP 中のいずれのサブユニットに $[\text{}^{32}\text{P}]\text{6-thioppGpp}$ が結合したのか確認するために、放射性プローブがクロスリンクした PEP を SDS-PAGE 電気泳動した後オート

ラジオグラフィーで確認した。放射性プローブが結合していると推定されるタンパク質バンドをゲルから切り出し、MALDI-TOF-MSにより解析したところ、 β' サブユニットに結合していることが判明した。大腸菌において ppGpp は RNA ポリメラーゼの β' サブユニットに結合することが明らかにされている。PEP の β' サブユニットは大腸菌の RNA ポリメラーゼの β' サブユニットと高い相同性がある事から、ppGpp の両 RNA ポリメラーゼの阻害様式は類似していることが示唆された。

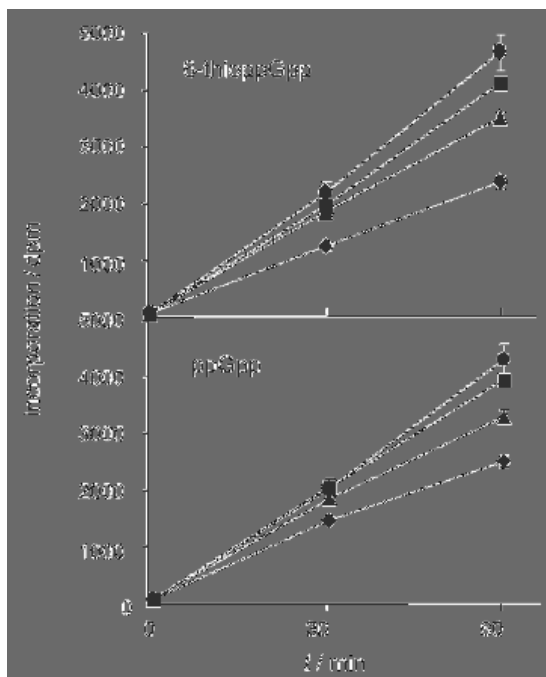


図 3. ホウレンソウ葉緑体 RNA ポリメラーゼ反応に対する ppGpp および 6-thioppGpp の阻害活性。化合物濃度；●，無添加；■，200 μ M；▲，500 μ M；◆，1000 μ M。

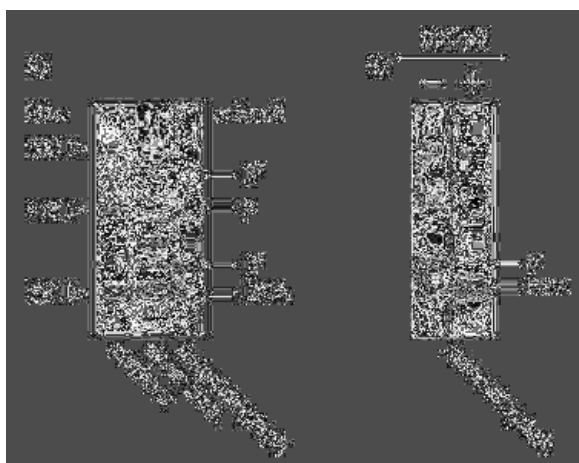


図 4. $[^{32}\text{P}]6\text{-thioppGpp}$ と PEP とのクロスリンク実験。A) $[^{32}\text{P}]6\text{-thioppGpp}$ がクロスリンクした PEP の SDS-PAGE 電気泳動。B) 100 倍量の ppGpp を添加した競合阻害実験。

(3) ppGpp 合成酵素遺伝子過剰発現株の葉緑体タンパク質のプロテオーム解析

シロイヌナズナの ppGpp 合成酵素遺伝子を PCR 法によりクローニングした。本遺伝子を植物遺伝子導入用バイナリーベクターに組み込んだ。本ベクターを導入したアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) をタバコの葉切片に感染させた。約 1 ヶ月後に形成された不定芽は順化させた後、培養土に移植、栽培し、種子を得た。この種子から得られた植物体は、カナマイシン耐性を指標として選抜し、耐性のある植物体を ppGpp 合成酵素遺伝子過剰発現株とした。本遺伝子過剰発現株は現在生育中である。今後は、本株を用いて遺伝子発現量の解析、表現型の観察、ppGpp 量の分析を行い、ppGpp 合成酵素遺伝子が機能しているのか否かを確認する。その後、本遺伝子過剰発現株と野生株の葉緑体タンパク質抽出液を 2 次元電気泳動に供し、ppGpp が葉緑体のいずれのタンパク質の発現に関与しているのか解析する予定である。

(4) 緑藻類の ppGpp 産生誘導物質の探索

緑藻類 (*C. reinhardtii*) に高浸透圧、高温および高塩濃度等の各種環境ストレスを与え、ppGpp 合成酵素遺伝子発現量の変化を半定量的 RT-PCR 法により調べた。しかし、いずれのストレス条件においても遺伝子発現の変化は見られなかった。また、同様の条件下、ppGpp 含有量の変化を HPLC で分析したが、その変化は確認できなかった。従って、ppGpp の誘導条件を見出すことはできず、緑藻類の ppGpp 産生誘導物質を発見することはできなかった。しかし、バクテリアと高等植物の中間に位置する緑藻類の ppGpp の機能解析は葉緑体の進化を考察するうえで重要である。現在、アグロバクテリウムを用いて *C. reinhardtii* の ppGpp 合成酵素破壊株を作製し、その性質を解析中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

M. Sato, K. Takahashi, Y. Ochiai, T. Hosaka, K. Ochi, K. Nabeta, Bacterial Alarmone, Guanosine 5'-Diphosphate 3'-Diphosphate (ppGpp), Predominantly Binds the β' Subunit of Plastid-Encoded Plastid RNA Polymerase in Chloroplasts. ChemBioChem, 10, 1227-1233, 2009. 査読有り。

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) グアノシン 5'-二リン酸 3'-ニリン酸の葉緑体 RNA ポリメラーゼ結合部位に関する研究

佐藤道大、高橋公咲、保坂毅、越智幸三、鍋田憲助 (平成 20 年 9 月 30 日、第 50 回天然

有機化合物討論会、福岡市)

(2) 6-thioppGpp の葉緑体 RNA ポリメラーゼとの相互作用

佐藤道大、高橋公咲、保坂毅、越智幸三、鍋田憲助 (平成 20 年 3 月 28 日、日本農芸化学会 2008 年度大会、名古屋市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 公咲

北海道大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：30374662

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし