

平成 21 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19870023
 研究課題名（和文） 葉緑体特異的リボソームタンパク質による葉緑体翻訳調節機構の解析
 研究課題名（英文） Functional analysis of Plastid-Specific ribosomal Protein.
 研究代表者
 堀 孝一（HORI KOUICHI）
 立教大学・理学部・ポストドクトラルフェロー
 研究者番号 70453967

研究成果の概要：葉緑体における翻訳は植物の物質生産において大きな原動力である。私は葉緑体の翻訳制御に関わっていることが期待されるタンパク質 PSRP-1 および PSRP-3 の機能を、葉緑体の起源と考えられるシアノバクテリアにおいて解析した。その結果、PSRP-1 は環境ストレスに応答し、環境に応じた生存に有利な翻訳状態を作り出していること、PSRP-3 は基本的な翻訳因子として働いている事を示した。これらの結果は葉緑体における翻訳制御を解析し比較していくにあたって重要な知見となると思われる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,370,000	0	1,370,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,720,000	405,000	3,125,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 植物生理・分子

キーワード：葉緑体、翻訳制御、PSRP、シアノバクテリア

1. 研究開始当初の背景

葉緑体はシアノバクテリアの祖先が細胞内共生することによって形成されたと考えられ、独自のゲノム DNA とバクテリア型のタンパク質翻訳系を持つ。この葉緑体内における翻訳は植物の物質生産において大きな原動力である。この翻訳機能は光や環境、細胞の分化によって制御されていることが知られている。しかしながらその制御機構は明らかではない。葉緑体のリボソームには、細胞質やミトコンドリアのリボソームには存在しない葉緑体特異的リボソームタンパク質 (plastid-specific ribosomal protein,

PSRP) が 7 種存在することが知られている。また PSRP 遺伝子群は核ゲノムに存在し、核による遺伝子発現制御下にある (例外的に紅藻の PSRP3 は葉緑体に存在する)。これらの PSRP の具体的な機能は明らかではないが、葉緑体の翻訳機能の制御に関わっていることが期待される。

2. 研究の目的

本研究は PSRP の翻訳における機能、環境変動に対する挙動を明らかにすることによって、葉緑体における翻訳制御機構とその個体レベルの生命現象への影響の一端を明ら

かにすることを目的とする。

3. 研究の方法

葉緑体の起源は、細胞内共生したシアノバクテリア様の原核生物であると考えられており、葉緑体となった後も独自にバクテリア型のタンパク質翻訳系を持つ。また PSRP-1 および PSRP-3 の遺伝子を保持しており、葉緑体における PSRP-1、PSRP-3 の機能を明らかにするために、シアノバクテリアの PSRP-1、PSRP-3 の機能を明らかにすることを試みた。

そのためにシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 において PSRP-1 および PSRP-3 の欠失株と過剰発現株を作成し生育比較を試みた。

4. 研究成果

(1) PSRP-1の機能解析

Synechocystis sp. PCC6803において *psrp-1*欠失株および過剰発現株を作成した。次にシアノバクテリアPSRP-1タンパク質を大腸菌で発現、精製し、特異的な抗体を作成し、過剰発現株のPSRP-1を測定した結果、野生株の数倍量のPSRP-1が蓄積していることがわかった。

これら変異株の各種生育条件における表現型の解析を行った。連続光条件や明暗周期条件では生育速度に差異はみられなかったが、高温ストレス条件+明暗周期条件では*psrp-1*欠損株において、定常期の生育の抑制が観察された（図1）。

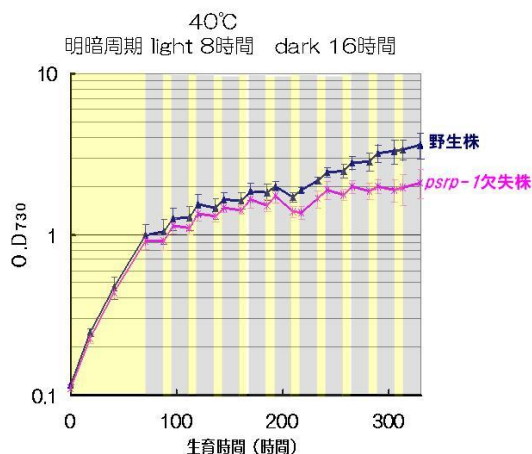


図1 液体培養における *psrp-1*破壊株の生育比較 - 1

しかしながら高温条件のみでは生育に差が見られず、さらに種々の生育条件を検討した結果、高温ストレス条件+高密度条件から培養開始した場合において

*psrp-1*欠損株では、定常期の生育の抑制が観察された（図2）。

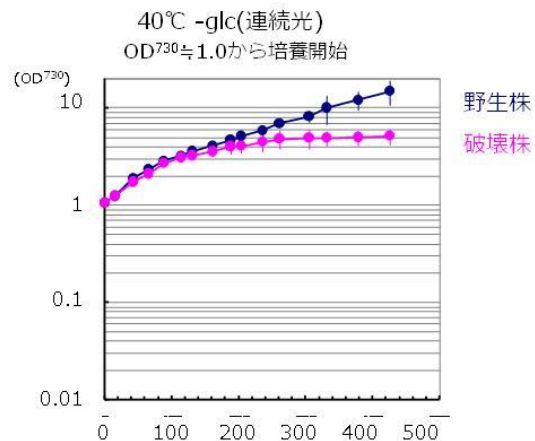
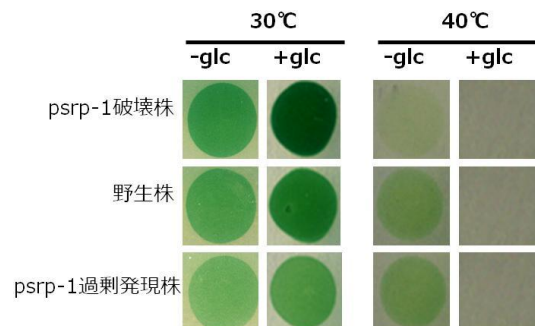


図2 液体培養における *psrp-1*破壊株の生育比較 - 2

また固体培地においては30°Cにおいては、*psrp-1*過剰発現株の生育が抑制され、*psrp-1*欠損株の生育は促進された。一方で40°Cにおいては、*psrp-1*欠損株は野生株、*psrp-1*過剰発現株と比べて速やかに死滅した（図3）。

図3 固体培地における *psrp-1*変異株の生育比較



*psrp-1*欠損株は、液体培養の環境で高菌密度+高温ストレス下では定常期の生育が抑制され、固体培地において高温ストレス下では逆に野生株より速やかに死滅し、一方、固体培地において30°Cでは野生株より生育が促進したことから、PSRP-1は生育を抑制する一方で、ストレス耐性を上昇させることが明らかとなった。

*psrp-1*過剰発現株ではPSRP-1が過剰に存在しているにもかかわらず液体培養では野生株と生育に差がないのに対し、固体培地上では生育が抑制された。このことはPSRP1と共同して翻訳制御に

働く因子が存在していることを示唆する。大腸菌には2種類のPSRP-1類似タンパク質が存在しており、Hibernation promoting factor (HPF)とYfiAと呼ばれている。HPFはRibosomal modulation factor (RMF)と呼ばれるタンパク質と共に働き、70Sリボソームのダイマーであり100Sリボソームの形成に関わることが示されている。しかしながらシアノバクテリアや植物にはRMFは存在していない。したがって今回存在が示唆されたPSRP-1と共同して働く因子は新規な翻訳制御因子であることが期待される。

この新規なPSRP-1と共同して働く因子は、極端な高密度条件や貧栄養状態、乾燥状態など多くの高いストレスが細胞に加わる固体培地の環境や、液体培養（明暗条件+高温ストレス条件）、または液体培養（高密度条件+高温ストレス条件）で誘導されていると考えられることから、PSRP-1は自然環境下ではバイオフィームのような状況において、環境ストレスに応答し、PSRP-1および共同して働く因子が翻訳を制御することにより、環境に応じた生存に有利な翻訳状態を作り出し、増殖することよりも過酷なストレス状況に耐える状態を作り出していることが示唆された。

葉緑体の形成に伴い、*psrp-1*遺伝子が葉緑体ゲノムから核ゲノムにコードされるようになったことは、細胞内共生したシアノバクテリアの外部環境の認識を宿主細胞に依存するようになったためと考えられる。またそのことにより植物は外部環境に応答してPSRP-1を利用して葉緑体の翻訳状態を制御していることが期待される。

(1) PSRP-3の機能解析

Synechocystis sp. PCC6803において *psrp-3*欠失株および過剰発現株の作成を試みた。*psrp-3*欠失株の作成は、ゲノム内の *psrp-3*遺伝子を完全に破壊した株を取得することができず、一部のゲノムDNAにおいて野生型 *psrp-3*遺伝子が残る、PSRP-3部分欠失株となった。これは葉緑体ゲノムと同様に、シアノバクテリアゲノムはマルチコピーであるためであり、*psrp-3*遺伝子の完全な欠失は致死であると考えられる。また作成した *psrp-3*部分欠失株では増殖速度の大きな抑制が見られた。*psrp-3*過剰発現においては増殖速度が野生型と有意さはなく、PSRP-3の蓄積量が増殖の律測段階となっていないことが示された(図4)。さらに *psrp-3*遺伝子の転写は光によって誘導されたことから、

光環境に応答した翻訳調節に関与していることが示唆された。

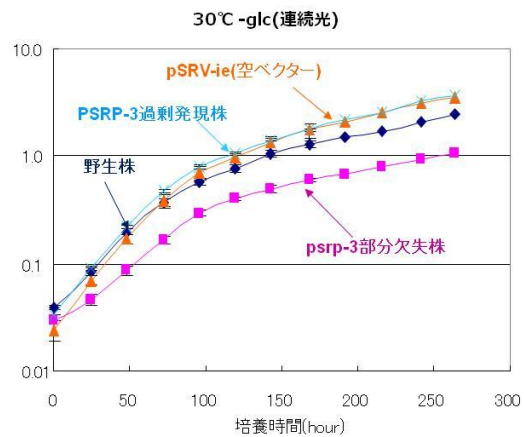


図4 液体培養における *psrp-3*変異株の生育比較

またLAHG (Light-activated heterotrophic growth) 条件において光合成非依存にグルコースを炭素源として生育を比較したところ、光成独立栄養条件における生育と同様にPSRP3変異体では増殖速度の大きな抑制が見られた。したがってPSRP-3は光依存的に翻訳に関わるだけではなく、基本的な翻訳因子として働いていることが期待された。

*psrp-3*遺伝子はほとんどのシアノバクテリアに存在しているが、シアノバクテリアの中で早い時期に分岐したグロエオバクテリアには例外的に存在しないことが。よって、グロエオバクテリアの分岐後、葉緑体の起源となったシアノバクテリアが出現する前に *psrp-3*遺伝子は出現したと考えられる。このことは紅藻においては *psrp-3*遺伝子が葉緑体ゲノムにコードされていることから支持される。*psrp-3*遺伝子も *psrp-1*遺伝子と同様に葉緑体ゲノムから核ゲノムにコードされるようになったことは、外部環境の認識を宿主細胞に依存するようになったためと考えられ、植物は外部環境に応答してPSRP-3を利用して葉緑体の翻訳状態を制御していることが期待される。

PSRP-1およびPSRP-3の解析の結果は、葉緑体翻訳系の制御においてもシアノバクテリアから継承されている可能性が高い。これらの結果は葉緑体における翻訳制御を解析し比較していくにあたって重要な知見となると思われる。またさらに植物独自に発展したと考えられる外部環境の認識機構と、葉緑体翻訳制御系への情

報伝達経路を明らかにしていくことが葉緑体における翻訳制御機構とその個体レベルの生命現象への影響を明らかにする上で重要であると考えられる。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 長岡敦子、福澤惇平、堀孝一、関根康彦 シアノバクテリアに存在する葉緑体特異的リボソームタンパク質 PSRP-1 の機能解析、第50回植物生理学会年会、名古屋、2009年3月22日
- ② 長岡敦子、堀孝一、福澤惇平、関根康彦 シアノバクテリアのリボソームタンパク質 PSRP-1 の機能解析、第31回分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会 合同大会、神戸、2008年12月12日

[図書] (計 1 件)

- ① 編/稲田利文、塩見春彦 羊土社 RNA 実験ノート(下) 第3章-5 RNAi の植物への応用 p118 - p125

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀 孝一 (HORI KOUICHI)
立教大学・理学部・ポストドクトラルフェロー
研究者番号 70453967

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし