

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20510188

研究課題名（和文） シロイヌナズナ無細胞転写解析法による光依存転写機構の解析

研究課題名（英文） Regulation assay of light dependent transcription using a cell-free system derived from Arabidopsis

研究代表者

湯川 泰 (YUKAWA YASUSHI)

名古屋市立大学・大学院システム自然科学研究科・教授

研究者番号：70381902

研究成果の概要（和文）：シロイヌナズナ培養細胞で成長の速い MM2d 株を材料に、無細胞転写解析系を確立した。MM2d 細胞は通常の暗条件下での培養で黄化下細胞となるが、光を当てて培養することにより緑化した細胞を調製することができる。そこで、それぞれの細胞から細胞核を単離し、無細胞転写解析系を作成した。明培養および暗培養由来の無細胞系をもちいて、シロイヌナズナの光合成遺伝子であるリブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (*rbcS*) 遺伝子の光依存転写制御を解析することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Two Cell-free transcription assay systems were established from rapidly growing Arabidopsis cultured cell MM2d line. The cultured cells were etiolated when the cells were growing under dark condition and were greening when the cells were growing under light condition. Using these two different colored cells, *in vitro* transcription systems were established. And then, using the two *in vitro* transcription systems, we have successfully assayed light dependent transcription regulation using Arabidopsis ribulose-1, 5-bis-phosphate carboxylase / oxygenase (*rbcS*) genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：植物分子生物学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：光依存、転写制御、シロイヌナズナ、無細胞、遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

動物酵母においては、無細胞転写系 (*in vitro* 転写系) が確立されており、転写の分子メカニズムの解明は飛躍的に進んだ。一方、植物における遺伝子制御、特に転写に関する分子生物学的知見は、*in vitro* 転写法の欠如のため極めて乏しかった。これは植物細胞に固い細胞壁と大きな液胞が存在するため、植物学者の幾度と無く行ってきた植物由来の

*in vitro* 転写系確立の努力を阻んできたためであった。そのような状況で、我々の持っていたタバコ培養細胞由来の無細胞転写解析系は、植物の *in vitro* 転写系の数少ない成功例であった。しかし、タバコのゲノム情報不足は研究の足かせとなり、顕花植物の中ではゲノム情報が早くに整い遺伝学的な知見の豊富なシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の *in vitro* 転写系の必要性が増

していた。しかし、シロイヌナズナには植物が小さすぎるという決定的な弱点があった。細胞も核も小さく、生化学的な研究を行うのに誰もが二の足を踏んでいた。そんな状況の中、ケンブリッジ大学で作られたシロイヌナズナの MM2d 株は成長が比較的はやく、細胞も大きな塊とはならない性質の良い培養細胞であり、*in vitro* 転写系作成用に非常に有望であると判断された。さらに、この細胞は光を当てて培養すると葉緑体を分化させ緑化するという特徴を併せ持ち、光合成関連遺伝子の解析にとっても都合がよいと考えられた。

## 2. 研究の目的

(1) シロイヌナズナ培養細胞から単離核を調製し、*in vitro* 転写解析系の作成手法を確立する。

シロイヌナズナからの *in vitro* 転写系の確立例は存在せず、本研究により新たに開発し、シロイヌナズナの遺伝学的知見および全ゲノム配列を有効利用して遺伝子の転写制御機構を分子レベルで解明する。

(2) 明条件下で培養した緑の細胞と暗条件下で培養した黄化した培養細胞からそれぞれ *in vitro* 転写系を作成し、光依存的遺伝子の発現を解析する。

MM2d 細胞を明条件下で培養し、葉緑体を分化した緑色の培養細胞を大量調製して、そこから *in vitro* 転写系を作成する。シロイヌナズナには過去の研究により光制御配列がある程度同定されており、それらの配列を変異することで、本実験で得られた明培養および暗培養由来の *in vitro* 転写系で光応答性の転写制御が解析可能なことを示す。

## 3. 研究の方法

申請者の培ってきたタバコの *in vitro* 転写系のノウハウを最大限生かし、シロイヌナズナの無細胞解析系を開発する。材料として、シロイヌナズナの培養細胞としては異例に成長速度のはやい MM2d 株を用いる。MM2d 細胞はまた、均質な懸濁培養が可能で、プロトプラストを大量に調製可能で生化学的作業に非常に有利である。光を当てて育てれば緑色になり、暗条件下で育てれば黄化する特徴がある。また、パーコールを媒体とした遠心分離によりプロトプラストから液胞を除去したミニプロトプラストを調製することができるため、生化学的材料として優れている。

対象とする解析遺伝子は、もっとも転写能の高いカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターやシロイヌナズナの U2 snRNA 遺伝子を用いて反応条件を至適化する。その他、光合成に関連する *rbcS* 遺伝子や、光合成とは関係のないキチナーゼ遺伝子などの比較

的転写量の高いものを使って、光依存の遺伝子発現に関わる制御因子を同定する。

## 4. 研究成果

(1) シロイヌナズナ MM2d 暗培養細胞からの *in vitro* 転写系の作成

手始めとして、タバコ培養細胞 BY-2 の *in vitro* 転写系作成の手順に従い、MM2d 細胞からの調製を幾度と無く試みたが、全く良好な結果は得られなかった。そこで、MM2d 細胞からタンパク質変性の原因物質を多く含む液胞を除去する手順を加え調製を試みた。その結果、良好な転写活性を確認するに至った。転写反応は U2 snRNA 遺伝子を用いて至適化し、カリウムイオン濃度がタバコの系に比較して低く 25 mM にした場合で最も高い活性を示した。

また転写活性は、タバコの  $\beta$  グルカナーゼ遺伝子、タバコの *rbcS* 遺伝子、トマトの *rbcS* 遺伝子、シロイヌナズナの U3 snoRNA 遺伝子、U6 snRNA 遺伝子、7SL RNA 遺伝子からも認められたが、 $\alpha$  アマニチンによる転写阻害実験から、MM2d 細胞から得られた核抽出液中には RNA ポリメラーゼ III (PoI III) の活性は認められず、全て RNA ポリメラーゼ II (PoI II) による活性であった。したがって、PoI III 依存性の tRNA 遺伝子の活性は認められなかった。

得られた転写活性は比較的安定しており、反応開始後 6 時間まで持続した。

(2) 明培養した緑化 MM2d 細胞からの *in vitro* 転写系の作成

上記の暗培養細胞からの調製手順をもとに、明培養により緑化した細胞から *in vitro* 転写系の作成を試みたが、転写活性は得られなかった。理由を考察した結果、葉緑体由来の還元力によりタンパク質変性が促進されていることを仮定した。そこで、核単離バッファーおよび抽出バッファーに抗酸化剤として 1% アスコルビン酸ナトリウムを添加することで、転写活性を示す核抽出液を調製することに成功した。転写活性は、シロイヌナズナの U2 snRNA 遺伝子、タバコの  $\beta$  グルカナーゼ遺伝子、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター、タバコ *rbcS* 遺伝子、トマト *rbcS* 遺伝子、シロイヌナズナ *rbcS* 遺伝子で良好な転写活性を得た。しかし、TATA-less 遺伝子に属する光化学系 I 遺伝子であるタバコ *psaD* および *psaH* 遺伝子からの転写活性は認められなかった。

(3) 光依存転写制御の解析

シロイヌナズナには 4 コピーの *rbcS* 遺伝子 (*rbcS1A*, *rbcS1B*, *rbcS2B*, *rbcS3B*) が存在し、それぞれが異なる発現の光応答性や組織特異性を有していると考えられる。それぞ

れの遺伝子には光応答性制御配列 (LRE) が同定されている。したがって、それら LRE に変異を導入した遺伝子を用いてそこからの転写が明培養および暗培養由来の *in vitro* 転写系で異なるかを検証した。

*rbcS* 遺伝子には LRE として IbAM5, I-box, G-box がクラスター化した CMA5 (conserved modular array 5) が種を超えて保存されている。シロイヌナズナでは *rbcS2B*, *rbcS3B* に存在することが確認され、*rbcS1B* にも類似の配列が見つかる。しかし *rbcS1A* には I-box, G-box は存在するが、IbAM5 配列に保存性のある配列が存在しない。

そこで、*rbcS1B*, *rbcS2B*, *rbcS3B* それぞれの IbAM5 配列および IbAM5 類似配列、*rbcS1A* の場合には IbAM5 が存在する位置の配列に変異を導入した遺伝子を作成した。これら遺伝子の野生型と変異型をそれぞれ鋳型として、シロイヌナズナの明/暗 *in vitro* 転写系によって、転写活性の変化を比較した。その結果、*rbcS1B*, *rbcS2B*, *rbcS3B* において、変異を導入した遺伝子の暗培養由来の *in vitro* 転写解析で転写量が上昇した。このことは、暗条件で IbAM 配列に依存した転写抑制作用があることを示している。つまり、暗条件で転写抑制因子が IbAM5 に結合することを示唆するデータと考えられる。また、*rbcS1A* においては上記のような結果は見られなかった。

#### (4) 国内外における位置づけとインパクト

本実験で得られた実験データは、国内外において始めてのものである。本研究により確立されたシロイヌナズナの *in vitro* 転写系は明/暗の転写制御を区別して解析できるものであり、光合成関連遺伝子を代表とした光制御を受ける遺伝子についての転写レベルでの発現制御を分子レベルで解析できる初めてのツールであるといえる。国内外で積極的に活用されれば、停滞していた植物における転写制御の研究を推進することができると考えられる。

#### (5) 今後の展望

本研究において、光依存性の転写制御を遺伝子上の光応答配列を壊すことによって明らかにした。しかし、光依存発現を示す *rbcS* 遺伝子の転写は、暗条件由来の *in vitro* 転写系によっても決してゼロにはならず、実際の転写制御を完全に反映したものとはならなかった。このことは、光依存の転写制御が DNA のクロマチンレベルの高度な構造変化によって成されている可能性を強く示すものであり、今後、本研究で作成した *in vitro* 転写系をもとに、クロマチンレベルでの研究に適應することを考えていかなければならないと考える。

#### 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 1 件)

- ① Yasushi Yukawa, Giorgio Dieci, Mircko Alzapiedi, Asako Hiraga, Katsuaki Hirai, Yoshiharu Yamamoto and Masahiro Sugiura. A common sequence motif involved in selection of transcription start sites of Arabidopsis and budding yeast tRNA genes. *Genomics*, 2011, 97:166-172. 査読有り

[学会発表] (計 18 件)

- ① 町田 瑠璃子、柴田 恵利、大谷 美沙都、杉山 宗隆、杉浦 昌弘、湯川 泰: シロイヌナズナにおける USE 結合タンパク質複合体の単離解析、第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 9 日、神戸
- ② Juan Wu, Toshihiro Okada, Masahiro Sugiura, Yasushi Yukawa: Functional analysis of novel small RNA in *Arabidopsis thaliana*, BMB2010, Dec, 8th, 2010, Kobe
- ③ 宮崎 綾香、岩田 真也、杉浦 昌弘、湯川 泰: シロイヌナズナ光合成遺伝子の光依存転写制御の解析、第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 8 日、神戸
- ④ Juan Wu, Toshihiro Okada, Masahiro Sugiura, Yasushi Yukawa: Functional analysis of novel small RNA in *Arabidopsis thaliana*, International Symposium on Biodiversity Sciences "Genome, Evolution and Environment", August, 1st-2nd, 2010, Nagoya
- ⑤ Juan Wu, Toshihiro Okada, Masahiro Sugiura, Yasushi Yukawa: Functional analysis of novel small RNA in *Arabidopsis thaliana*, 21st International Conference on Arabidopsis Research, June, 8th, 2010, Yokohama
- ⑥ 岩田 有加、杉浦 昌弘、湯川 泰: 高等植物 mRNA スプライシングの *in vitro* 解析、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 11 日、横浜
- ⑦ 大羽 由衣、湯川 眞希、杉浦 昌弘、湯川 泰: 葉緑体 mRNA の 5' 非翻訳領域とタンパク質コード領域の適合性検証、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 11 日、横浜
- ⑧ 柴田 恵利、大谷 美沙都、杉山 宗隆、杉浦 昌弘、湯川 泰: シロイヌナズナにおける USE 結合転写因子複合体の単離解析、

- 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 11 日、横浜
- ⑨ 二村 博、杉浦 昌弘、湯川 泰：シロイヌナズナ新規低分子 RNA 欠損株のオーキシン応答性、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 10 日、横浜
- ⑩ 山本 裕子、湯川 眞希、杉浦 昌弘、湯川 泰：タバコ培養細胞由来細胞質 *in vitro* 翻訳系の開発、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日、横浜
- ⑪ 呉 娟、岡田 敏浩、湯川 泰：シロイヌナズナの新規低分子 RNA の機能解析、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 10 日、横浜
- ⑫ 呉 娟、岡田 敏浩、湯川 泰：シロイヌナズナの新規低分子 RNA の機能解析、第 73 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム、2009 年 5 月 23 日、名古屋
- ⑬ 黒田 洋詩、足達 由佳、湯川 泰、杉浦 昌弘：葉緑体 mRNA の 5' 翻訳領域の切断と翻訳効率、日本植物生理学会第 50 回年会、2009 年 3 月 22 日、名古屋
- ⑭ 大羽 由衣、湯川 眞希、杉浦 昌弘、湯川 泰：タバコ葉緑体翻訳反応における 5' 非翻訳領域とコード領域の適合性検証、日本植物生理学会第 50 回年会、2009 年 3 月 22 日、名古屋
- ⑮ 足達 由佳、黒田 洋詩、杉浦 昌弘、湯川 泰：葉緑体 psbD-psbC 翻訳開始機構の解析、第 31 回日本分子生物学会年会 第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年 12 月 10 日、神戸
- ⑯ 岩田 真也、杉浦 昌弘、湯川 泰：シロイヌナズナ培養細胞核由来の *in vitro* 転写系の開発、第 31 回日本分子生物学会年会 第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年 12 月 9 日、神戸
- ⑰ 西田 満帆、杉浦 昌弘、湯川 泰：イネ新規 non-coding RNA の探索、第 31 回日本分子生物学会年会 第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年 12 月 9 日、神戸
- ⑱ 岩田 真也、杉浦 昌弘、湯川 泰：シロイヌナズナ培養細胞核由来の *in vitro* 転写系の開発、日本遺伝学会第 80 回大会、2008 年 9 月 5 日、名古屋

[その他]

ホームページ等

<http://www.nsc.nagoya-cu.ac.jp/~yyuk/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

湯川 泰 (YUKAWA YASUSHI)

名古屋市立大学・大学院システム自然科学  
研究科・教授

研究者番号：70381902

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：