

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：16301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21570047
 研究課題名（和文） 植物細胞内の緊縮制御因子シグナルによる葉緑体機能制御の機構解明

研究課題名（英文） Study on stringent response 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（和文）：光合成バクテリアの共生を起源とする植物葉緑体は、光合成など重要な機能を持つオルガネラで、バクテリア型の ppGpp という核酸が仲介するシグナル伝達系を持つ。本研究では、ppGpp が関与する葉緑体の機能制御機構の解明をめざし、まず葉緑体内のタンパク質合成系への影響を調査した。これまでに、エンドウマメ葉緑体の試験管内タンパク質合成系技術を新たに構築し、ppGpp が葉緑体タンパク質合成を直接制御することを世界に先駆けて示すことができた。

研究成果の概要（英文）：Chloroplasts are derived from symbiosis of photosynthetic bacteria, and have ppGpp-mediated signal transduction system. In order to clarify the functional roles of ppGpp-signal in chloroplasts, we have investigated functions of ppGpp in the protein synthesis. Here we have established in vitro translation system based on extracts of isolated pea chloroplasts, and demonstrated that ppGpp directly regulates protein synthesis activity of chloroplasts in vitro.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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・ppGpp・翻訳・緊縮制御

1. 研究開始当初の背景

申請者は、葉緑体における ppGpp の合成酵素(RSH 蛋白質)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シグマ因子のみならず ppGpp による機能修飾機構が存在する事を仮説として提唱してきた(後述のこれまでの研究業績を参照)。さらに、植物以外の光合成真核生物クラミドモナスからも ppGpp 合成酵素遺伝子を単離

し機能解析を進め、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世界に先駆けて明らかにしてきた。加えて、葉緑体転写酵素の研究において、イネおよびシロイヌナズナより転写制御因子シグマ因子遺伝子を単離・解析するなどの研究成果を挙げてきた。

申請者は、平成19～20年度に推進した基盤研究Cにおいて新奇 ppGpp 合成酵素

CRSH の機能解析を進めた。酵素カルボキシ末端の Ca^{2+} 結合ドメインへの Ca^{2+} 結合を介して CRSH が ppGpp 合成酵素機能を活性化することを確認し、CRSH 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ろうと予測するに至っている。

一方、申請者らは枯草菌などの特定の種類のバクテリアには、従来研究されてきた大腸菌型の RelA/SpoT とは異なる ppGpp 合成酵素 (YwaC/YjbM ファミリー) が広く存在することを発見し、環境ストレス応答タンパク質であるこれらの酵素機能を生化学的・遺伝学的に明らかにした。この発見は ppGpp シグナルがバクテリアにおいても栄養条件変化への緊縮応答分子のみならず、細胞外環境ストレスへの応答分子でもあることを示唆している。

関連する過去の主な研究業績

- Masuda et al. *Plant Signaling & Behavior*, 3: 1021-1023 (2008)
- Masuda et al. *Plant Cell Physiol.*, 49:135-141 (2008)
- Nanamiya et al. *Mol. Microbiol.*, 67:291-304 (2008)
- 戸澤ら. バイオサイエンスとインダストリー, 66:293-297 (2008)
- Tozawa et al. *J. Biol. Chem.* 282: 35536-35545 (2007)
- Tozawa et al. *Plant J.* 52: 124-132 (2007)
- Kubota et al. *Plant Cell Physiol.* 48: 186-192 (2007)
- 戸澤, 越智. 蛋白質核酸酵素, 50:(14) 1860 (2005)
- Kasai et al. *Nucleic Acids Res.*, 32: 5732-5741 (2004)
- Kusumi et al. *Plant Cell Physiol.*, 45: 1194-1201 (2004)
- Kasai et al. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 68: 973-977 (2004)
- Kasai et al. *Nucleic Acids Res.* 30: 4985-4992 (2002)
- Tozawa et al. *Nucleic Acids Res.* 26: 415-419 (1998)
- Tanaka et al. *FEBS Lett.* 413: 309-313 (1997)

2. 研究の目的

(1) ppGpp 標的候補酵素タンパク質の合成・精製および機能解析

申請者が予想する植物の ppGpp 標的酵素タンパク質は、GTP(GDP)結合領域を有するタンパク質である。その多くには大腸菌に類似酵素があり、さらにそれらの機能上、大腸菌 DNA 組換え系では多量調製が困難な可能性が高い。本研究では ppGpp 標的タンパク質調製にはコムギ無細胞系を利用し、生化学

的解析により各候補タンパク質の ppGpp による活性調節機構を検証することとした。

(2) ppGpp 標的候補超分子タンパク質複合体の機能解析

一般的酵素はタンパク質合成により調製可能であるが、転写・翻訳装置のような超分子複合体については、同様な研究手法が適用できない。そこで、既に単離法を確立済みのエンドウマメ葉緑体の抽出液を用いた試験管内翻訳系を利用して、葉緑体翻訳装置に対する ppGpp 作用を生化学的に検証することとした。

(3) 植物遺伝子変異株を利用した ppGpp シグナルの生理学的機能の解析

双子葉のモデル植物であるシロイヌナズナにおいては CRSH 遺伝子がシングルコピーであり、その欠損変異ホモ個体がとれないことを確認している。その一方、単子葉モデル植物であるイネにおいては CRSH が 3 コピー同一染色体上に存在し、申請者はこのうち発現量が最も高い CRSH1 が破壊された変異株ホモ接合体種子を選抜済みで CRSH の遺伝学的研究材料として利用可能なことを確認済みである。この変異株を用いて新奇 ppGpp 合成酵素の果たしている機能的役割を解析するため、イネ葉緑体遺伝子の転写プロファイルをリアルタイム PCR 系により網羅的に解析するとともに、ラジオアイソトープによる細胞内タンパク質標識により、キレート薬剤を利用した細胞内 Ca^{2+} シグナルの人為的 On/Off による葉緑体内 de novo タンパク質合成活性の変動を解析する。得られる結果は (1) (2) の変異株解析における葉緑体遺伝子の網羅的発現解析の結果と補完的なデータとなり、in vivo と in vitro の両面より、ppGpp シグナルの植物生理学的な機能を明らかにすることができる。

3. 研究の方法

(1) ppGpp 標的候補酵素タンパク質の合成・精製および機能解析

大腸菌宿主による遺伝子組換え系では ppGpp に強い転写・翻訳抑制効果があるために ppGpp 合成酵素の調製が困難であり、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた調製法が効果的であった。また、葉緑体局在型タンパク質の多くにはアミノ末端にシグナル配列が付加しており、このシグナル領域の適切な切除がその後の安定した酵素活性の再構成に重要である。ppGpp 標的候補については既に幾つかを論文で紹介しているが、本研究では、候補タンパク質 Adenylo-succinate synthetase (AdSS) の合成と精製を進め、ppGpp, GTP ならびに GDP による各核酸分子の濃度依存的酵素活性制御について生化学的な解析データを収集した。

(2) ppGpp 標的候補超分子タンパク質複合

体の機能解析

本項目では、申請者の研究室で確立されたエンドウマメ葉緑体抽出液を利用した試験管内翻訳系を利用し、ppGpp/GTP/GDPの濃度比の変動による葉緑体タンパク質合成装置の機能制御がどのように起こるか、詳細に検証を進めた。

(3) 植物遺伝子変異株を利用した ppGpp シグナルの生理学的機能の解析

申請者は、ppGpp 合成酵素遺伝子 CRSH1 がゲノム上で破壊されたイネ日本晴由来 Tos17 挿入変異株を独自に選抜し、既に変異株のホモ接合体由来の種子を保有し、稔実性試験等の基本的試験を終了している。本研究では、日本晴野生株を対照区として、この CRSH1 破壊変異株の葉緑体クロロフィル含有量を指標として表現型の差異を確認できる栽培条件・ホルモン条件などの探索を進めた。

4. 研究成果

(1) ppGpp 標的候補酵素タンパク質の合成・精製および機能解析

全ゲノム配列が決定されたモデル植物のシロイヌナズナより Adenylo-succinate synthetase (AdSS) タンパク質をコムギ無細胞タンパク質合成で調製するためのプラスミドを構築し、タンパク質合成を行った。良好な合成効率が確認できたタンパク質について、さらに末端に His6 タグを付加した精製用の AdSS タンパク質発現ベクターを構築し、タンパク質合成および精製を行った。ppGpp による活性阻害の検証を進めたが、大腸菌で過去に報告がされているケースと異なり、葉緑体の AdSS に対する ppGpp の阻害効果は確認されなかった。そこで、大腸菌の AdSS タンパク質も同様に合成・精製して追試験を行ったが、同様に ppGpp による阻害は確認できなかった。これは、酵素機能のアッセイ系における基質 GTP の反応生成物である GDP の蓄積による阻害効果の方が勝り、ppGpp 阻害が artifact として検出された可能性を示唆している。

以上より、ppGpp は葉緑体内の AMP 生合成系の制御因子ではないという結論に至った。

本研究においては、この結果も加味し、これまでの RSH タンパク質の諸情報を総説としてまとめ、査読付きの国際誌 *Plant Biology* に論文発表を行った。また国内誌「植物の成長調節」に和文総説として発表した。

(2) ppGpp 標的候補超分子タンパク質複合体の機能解析

①葉緑体インビトロ (試験管内) タンパク質合成系 (翻訳系) の新規構築

本研究では、まず葉緑体の 70S リボソーム

を主体とするタンパク質合成装置を対象とする機能解析系の構築に注力した。

翻訳活性の高いエンドウマメ葉緑体抽出液の調製のために、まず栽培条件の再検討から始める必要があった。これまでに確立した葉緑体タンパク質移行実験用のエンドウマメ葉緑体の単離条件とは、光照射時間が異なる条件で葉緑体単離をすると抽出液の翻訳効率が向上することが判明した。続いて、名古屋市立大学の湯川泰教授との共同で、湯川研究室で構築した GFP 合成プラスミドを利用して、調製したエンドウマメ葉緑体抽出液の翻訳系の至適化を図った。mRNA 濃度、ATP および GTP 濃度について至適条件を決定した。至適条件においては、GFP の翻訳が 150 分以上継続する活性の高い試験管内翻訳系の構築に成功した (図 1)。

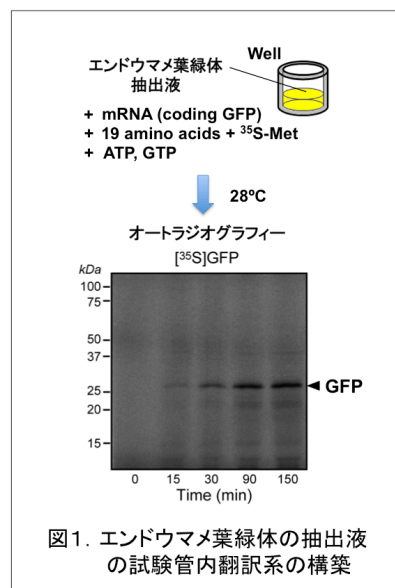


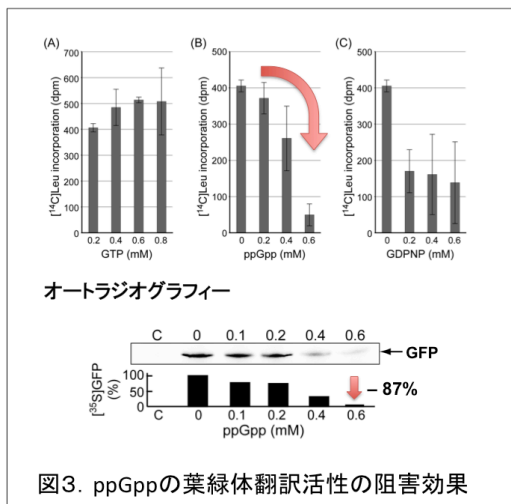
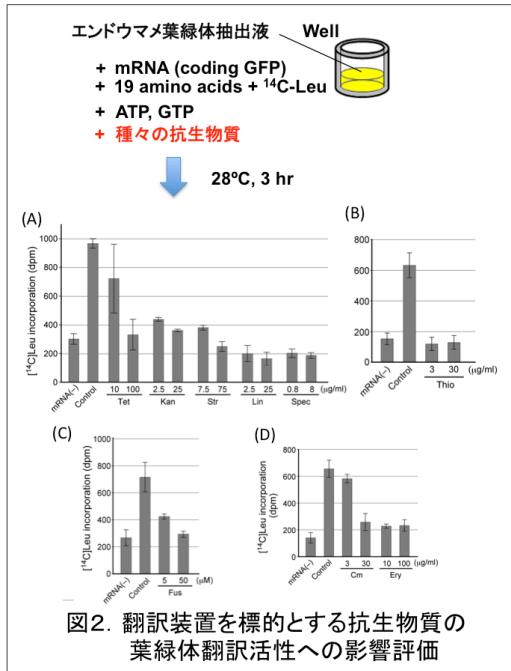
図 1. エンドウマメ葉緑体の抽出液の試験管内翻訳系の構築

②葉緑体インビトロ翻訳系を利用した翻訳阻害剤の影響評価

葉緑体の翻訳系は除草剤の標的としても研究が進んでおり、その経緯から幾つかのバクテリアを標的とする抗生物質も阻害効果を有することが植物に対する散布試験などの結果より示唆されてきた。しかしながら「直接的に」翻訳系に対する阻害効果を検証した例がまだ無かった。そこで、まず、翻訳系を標的とする抗生物質を揃え、葉緑体翻訳系への阻害効果について、広範な濃度条件で解析を進めた。その結果、フシジン酸 (Fus)、リンコマイシン (Lin)、スペクチノマイシン (Spec)、チオストレプトン (Thio)、クロラムフェニコール (Cm)、エリスロマイシン (Ery)、テトラサイクリン (Tet)、カナマイシン (Kan)、ストレプトマイシン (Str) など合計 9 種類の市販抗生物質が葉緑体の翻訳をバクテリア同様に阻害する事を確認した (図 2)。

③ ppGpp の葉緑体翻訳系への影響評価

次に ppGpp の葉緑体翻訳系への阻害効果を検証するために、非加水分解性の GTP アナログをコントロールとして、翻訳活性の解析を進めた。その結果、ppGpp には明確な翻訳阻害効果があることが判明した (図 3)。

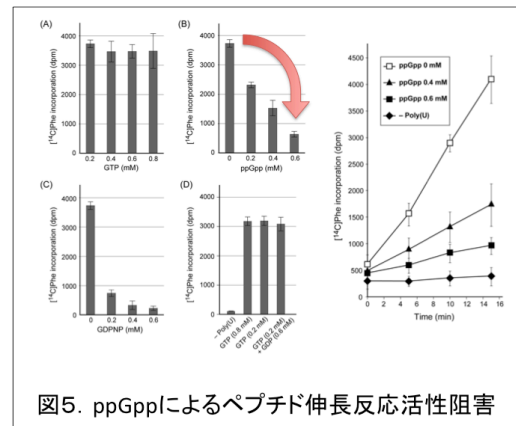
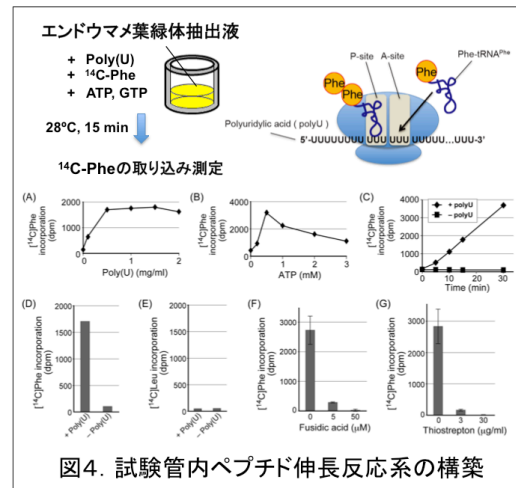


④ 葉緑体翻訳系のペプチド伸長反応測定系の新規構築と ppGpp による阻害効果の検証

ppGpp の翻訳阻害様式の詳細を明らかにするために、翻訳のペプチド伸長反応を特異的に検出できる実験系を新たに構築した。この系を利用することにより、バクテリアのペプチド伸長阻害に機能する2種類の抗生物質、フンジン酸およびチオストレプトンが、効果的に葉緑体翻訳系のペプチド伸長活性を抑制することを確認した (図 4)。さらに、ppGpp がこれらの抗生物質とほぼ同様な濃度範囲においてペプチド伸長反応を特異的

に阻害する事を明らかにすることができた (図 5)。

これらの結果より、ppGpp の葉緑体内の標的がタンパク質合成装置であることを証明することができた。これらの結果をまとめて、Plant Molecular Biology 誌に論文として発表を済ませ、学会発表を行った。



(3) 植物遺伝子変異株を利用した ppGpp シグナルの生理学的機能の解析

CRSH1 欠損イネ変異株に関しては独立した2系統の維持を進めている。これまでのところ、採用した栽培条件下においては、いずれもクロロフィル含有量の変動を指標とした表現型の差異が確認できていない。現在も継続して、表現型を示す栽培条件の探索を進めている。

(4) その他の成果

共同研究の成果として、我々がこれまでに進めてきた枯草菌の新奇 ppGpp 合成酵素遺伝子 ywaC の解析が進み、この遺伝子の発現が、枯草菌の 70S リボソームの2量体形成に機能すること、さらにこのリボソームの2量体形成には YvyD タンパク質が必須であることを分子遺伝学的に明らかにすることができた。成果は Journal of Bacteriology および

MicrobiologyOpen に発表した. YvyD は植物の葉緑体に存在することより、翻訳制御の研究対象として検討を進めている。

この他にも、新奇の ppGpp 分解酵素を葉緑体の起源とされるラン藻に見出しており、今後も、特に光合成機能の制御に軸足を置いた ppGpp の機能解析の研究を進展させる予定である。尚、平成 24 年度からの 3 年間の予定で基盤研究 (C) に採択されており、現在も上記の研究を継続中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ①□ Nomura Y, Takabayashi T, Kuroda H, Yukawa Y, Sattasuk K, Akita M, Nozawa A, Tozawa Y. ppGpp inhibits peptide elongation cycle of chloroplast translation system in vitro. **Plant Mol Biol** 78:185-196 査読有, 2012
- ②□ Tagami K, Nanamiya H, Kazo Y, Maehashi M, Suzuki S, Namba E, Tozawa Y, Morimoto, T, Ogasawara N, Kageyama Y, Ara K, Ozaki K, Yoshida M, Kuroiwa H, Kuroiwa T, Ohashi Y, Kawamura F. Expression of a small (p)ppGpp synthetase, YwaC, in the (p)ppGpp⁰ mutant of *Bacillus subtilis* triggers YvyD-dependent dimerization of ribosome. **MicrobiologyOpen** 査読有, 2012
- ③□ Tozawa Y, and Nomura Y. Signaling by the global regulatory molecule ppGpp in bacteria and chloroplasts of land plants. **Plant Biology** 13: 609-709 査読有, 2011
- ④□ Natori Y, Tagami K, Murakami K, Yoshida S, Tanigawa O, Moh Y, Masuda K, Wada T, Suzuki S, Nanamiya H, Tozawa Y, and Kawamura F. Transcription activity of individual rrn operons in *Bacillus subtilis* mutants deficient of (p)ppGpp synthetase genes, relA, yjbM and ywaC. **Journal of Bacteriology** 査読有, 191, 4555-4561, 2009
- ⑤□ 戸澤 讓, 笠井光治, 高等植物における ppGpp 合成系とその生理学的機能解析をめざして, 植物の生長調節, 査読無, 42 巻, 119-124, 2010,

[学会発表] (計 5 件)

- ①□ 野村勇太, 高林泰斗, 戸澤 讓, エンドウマメ葉緑体インビトロ翻訳系の構築と翻訳阻害剤の影響評価, 日本農芸化学会 2012 年度大会
- ②□ Nomura Y, Takabayashi T, Kuroda H,

Yukawa Y, Sattasuk K, Akita M, Nozawa A, Tozawa Y, Establishment of pea chloroplast "organelle-free" protein synthesis system for assessment of translation inhibitors, The 9th Matsuyama International Symposium on Cell-Free Sciences. (2011 年 9 月),

- ③□ 野村勇太, 戸澤 讓, in vitro 翻訳系による葉緑体タンパク質合成制御系の解析, 平成 23 年度日本農芸化学会西日本支部・中四国支部合同大会,
- ④□ 野村勇太, 高林泰斗, 戸澤 讓, 植物葉緑体における ppGpp の機能的役割の解析, 日本農芸化学会 2011 年度大会,
- ⑤□ 野村勇太, 及川彰, 戸澤 讓, 植物およびバクテリアの ppGpp 定量法, 日本農芸化学会 2010 年度大会,

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

http://www.ehime-u.ac.jp/~cellfree/biomolecular/biomolecular_eng_rsc1.html

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) 研究協力者

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

野村 勇太 (NOMURA YUHTA)

愛媛大学・大学院理工学研究科・博士後期課程 2 年生