

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580303

研究課題名(和文)スサビノリ葉緑体タンパク質合成系の乾燥耐性メカニズム

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of desiccation-tolerance in the *Pyropia yezoensis* chloroplast translation system

研究代表者

山口 健一 (YAMAGUCHI, Kenichi)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・准教授

研究者番号：90363473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：乾燥耐性をもつ紅藻スサビノリの葉状体世代は、産業上重要な乾海苔(板ノリ)の原料となる。代表者らは、乾燥加工された板ノリに70S型の粒子を保った葉緑体リボソームが大量に含まれていることを最近見出した。本研究では、プロテオミクスの手法を用いて葉緑体リボソームに乾燥耐性や熱安定性を賦与する可能性のあるタンパク質因子を探索した。その結果、葉緑体のストロマに局在すると考えられる新規なLEA様タンパク質が見出された。また、スサビノリの葉緑体リボソームと葉緑体翻訳因子のタンパク質組成は常温菌(例：大腸菌)のものによく似ていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Desiccation-tolerant leafy gametophyte of the red alga *Pyropia yezoensis* is commercially important marine crop for the major source of dried Nori (Nori sheets). We recently found that dried Nori contains abundant chloroplast ribosomes as 70S-type particles. In this study, we explored proteinaceous factors, which may confer desiccation-tolerance and heat-stability, by means of proteomic approaches. Consequently, we found novel LEA-like proteins that are likely localized in the chloroplast stroma. We also suggest that the protein composition of *P. yezoensis* chloroplast ribosome and its translation factors resembles that of mesophilic bacteria (e.g., *E. coli*).

研究分野：水圏生命科学

キーワード：リボソームタンパク質 LEA 葉緑体 スサビノリ

1. 研究開始当初の背景

我が国の伝統水産加工食品“海苔”の主原料である紅藻アマノリ属スサビノリはアマノリ属の中でも乾燥や凍結による脱水ストレスに強い抵抗性をもつ特徴がある。緑色植物においては、LEA(Late Embryogenesis Abundant)と呼ばれる脱水ストレス発現誘導性のタンパク質ファミリーが脱水耐性に重要な役割を果たすと考えられているが、スサビノリにおいては LEA の存否が不明で乾燥耐性因子は特定されておらず、脱水耐性の分子機構についての知見が極めて乏しい。

スサビノリと同じウシケノリ科の *Porphyra columbina* においては、乾燥に伴ったフィコエリスリン(PE)とフィコシアニン(PC)の顕著な増加と活性酸素(ROS)消去酵素群の活性上昇が観察されており、PE、PC、および ROS 消去酵素群が乾燥時の酸化ストレス耐性に関与するタンパク質因子であることを示唆する報告がなされている(Contreras-Porcia *et al.*, *JXB*, 2011)。

一方、代表者らは、緑色植物からの葉緑体リボソームの迅速・簡易調製法(Yamaguchi, *Methods Mol. Biol.*, 2011)を紅藻向けに改良し、タンパク質含量の高い上級品の市販乾海苔からリボソーム単離を試みたところ、ほぼ無傷と思われる 70S の形状を保った葉緑体リボソームが大量に得られることを見出した。市販の乾海苔は、その製造工程において、高温(60~80℃)で長時間脱水処理されている。それにも関わらず、超分子複合体の葉緑体リボソームが 70S の形状を保った状態で得られたことから、代表者らはスサビノリ葉緑体タンパク質合成系の乾燥耐性メカニズムに興味を抱いた。

原始紅藻スサビノリは、植物系統進化とゲノミクスの観点から、シアノバクテリアに近いプロトタイプの葉緑体リボソームをもつと推定されるが、タンパク質組成の実態は不明である。植物の葉緑体リボソームが耐熱菌由来 rRNA 安定化タンパク質 Thx のホモログ(PSRP-4)や葉緑体特異的リボソームタンパク質 PSRPs をもつことから、スサビノリの葉緑体リボソームが乾燥や熱に耐えるための安定化タンパク質をさらに付加的にもつ可能性もあると考えた。そこで、葉緑体リボソームの乾燥耐性に関与する可能性のあるストロマ局在性タンパク質の探索と葉緑体リボソームの安定化に寄与するリボソームタンパク質の探索を試みることにした。

2. 研究の目的

スサビノリにおいても *P. columbina* 同様に、乾燥に伴うフィコビリタンパク質(PCやPE)の顕著な増加が観察されるのか、また ROS 消去酵素のタンパク質レベルの発

現上昇が見られるのかを検証すること。また、スサビノリの葉緑体タンパク質合成系の乾燥耐性に寄与するタンパク質性因子を探索すること。

3. 研究の方法

(1) スサビノリ葉状体の乾燥過程のディファレンシャルプロテオミクスおよび葉緑体リボソームの乾燥耐性に関与する可能性のあるストロマ局在性タンパク質と葉緑体翻訳因子の探索

材料として、有明産の支柱式養殖ノリを用い、非干出・非乾燥の対照に培養株 TU-1 を用いた。乾燥前後の細胞の生存はエリスロシン染色により確認した。フィコビリタンパク質の比較定量は分光法と SDS-PAGE のバンド強度比較により行った。タンパク質の発現プロファイリングは、TRIzol 試薬を用いて調製したトータルタンパク質の二次元電気泳動(2DE)パターンを取得後、Prodigy SameSpots を用いた定量比較解析により行った。主要スポットについては、MS/MS イオンサーチ法による同定を行った。

(2) スサビノリ葉緑体 70S リボソームのプロテオミクス

ショ糖密度勾配超遠心により分離した 70S 画分のタンパク質を SDS-PAGE 後、MS/MS イオンサーチ法によるタンパク質の同定を行った。

(3) スサビノリ葉緑体 70S リボソームを用いた無細胞翻訳系の構築

再構成型無細胞タンパク質合成キット PUREflex を用い、大腸菌リボソームをスサビノリ葉緑体 70S リボソームに置換して翻訳活性を調べた。

4. 研究成果

(1) スサビノリ葉状体の乾燥過程のディファレンシャルプロテオミクスおよび葉緑体リボソームの乾燥耐性に関与する可能性のあるストロマ局在性タンパク質と葉緑体翻訳因子の探索

P. columbina での報告(Contreras-Porcia *et al.*, *JXB*, 2011)とは異なり、乾燥過程でのフィコビリタンパク質(PE および PC)の量は一定であった。また、ROS 消去酵素を含め、その他のタンパク質においても有意な発現量増加は認められなかった(Fold change, >1.5; ANOVA, $p < 0.05$)。一方で、主要な 2DE スポットの MS/MS 解析により、ニンジン胚のグループ 3 LEA タンパク質 DC8 と弱い配列相同性を有する新規な LEA 様タンパク質(71 kDa)を同定した。また、釜慶大学の Nam 博士らとの共同研究において、スサビノリの熱アルコール可溶画分から、緑色植物の LEA とは配列相同性がないが、N 末端 20 残基に LEA 様の天然変性領域をもつタンパク質 PYP1(6 kDa)を見出した(図 1)。これらの LEA 様タン

パク質は、乾燥（干出）させていない培養株 TU-1 においてもタンパク質の発現が認められたことから、緑色植物の乾燥誘導性 LEA とは異なり、恒常的に発現し、短時間（数時間）で起こる干出による乾燥に備えているものと考察した。さらに、可溶性タンパク質のプロテオミクスから葉緑体翻訳伸長因子 EF-Tu および EF-Ts を同定できた。同定された EF-Ts の構造（アミノ酸配列および質量）は、緑色植物由来の EF-Ts よりもバクテリアの EF-Ts と類似していた。

(2) スサビノリ葉緑体 70S リボソームのプロテオミクス

ショ糖密度勾配超遠心分離により調製した 70S 画分（図 2）のプロテオーム解析により、21 種（S3, S4, S5, S7, S19, S20, L1, L2, L3, L4, L5, L6, L9, L13, L14, L16, L18, L27, L28, L31, および L32）のバクテリア型オーソログを同定することができた。これら全ての翻訳関連タンパク質は、葉緑体ゲノムコードであった。スサビノリ核ゲノムの塩基配列が現状ドラフト配列であるため、少数の核ゲノム由来産物が今後見つかる可能性は残るが、結論として、紅藻の葉緑体翻訳系は緑色植物のものと比較して細菌（常温菌）の翻訳系により近い組成と構造をもつこと、また翻訳関連タンパク質の発現において、緑色植物では核ゲノム支配的であるのに対して紅藻では葉緑体ゲノム支配的であることがほぼ明らかになった。

(3) スサビノリ葉緑体 70S リボソームを用いた無細胞翻訳系の構築

大腸菌の無細胞翻訳系のリボソームのみを本研究で調製したスサビノリ葉緑体 70S リボソームに置き換えてタンパク質合成を試みたが、検出できるレベルのタンパク質合成を観察できなかった。大腸菌由来の翻訳因子との不和合性があるかもしれない。無細胞翻訳系の構築のためのスサビノリ由来翻訳因子の調製が今後の課題となる。

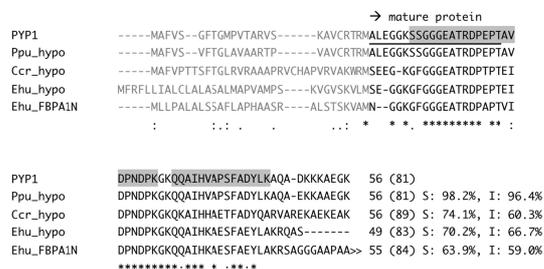


図 1 スサビノリ葉状体由来の新規な LEA 様タンパク質 PYP1 と配列相同性を示す紅藻およびハプト藻由来の機能未知タンパク質のアラインメント

グレーの文字で示した N 末端領域は葉緑体移行シグナル（トランジットペプチド）と考えられる。アンダーラインは、プロテ

インシーケンサにより配列を決定した領域。グレーボックスは、MS/MS イオンサーチにより帰属した領域を示す。

アスタリスク（*）は、同一のアミノ酸、コロンの（:）は、保存性の高いアミノ酸、ピリオド（.）は、保存性の低いアミノ酸を示す。C 末端側に示された数値は、成熟タンパク質のアミノ酸残基数、括弧内に前駆体タンパク質のアミノ酸残基数を示す。S: 配列相同性。I: 配列同一性。

Ppu_hypo: 紅藻パープレアアマノリの機能未知タンパク質。Ccr_hypo: 紅藻ヤハズツノマタの機能未知タンパク質。Ehu_hypo: ハプト藻 *Emiliania huxleyi* の機能未知タンパク質。Ehu_FBPA1N: *Emiliania huxleyi* のフルクトース-1,6-ビスホスファターゼアイソフォーム A1 の機能未知 N 末端ドメイン。

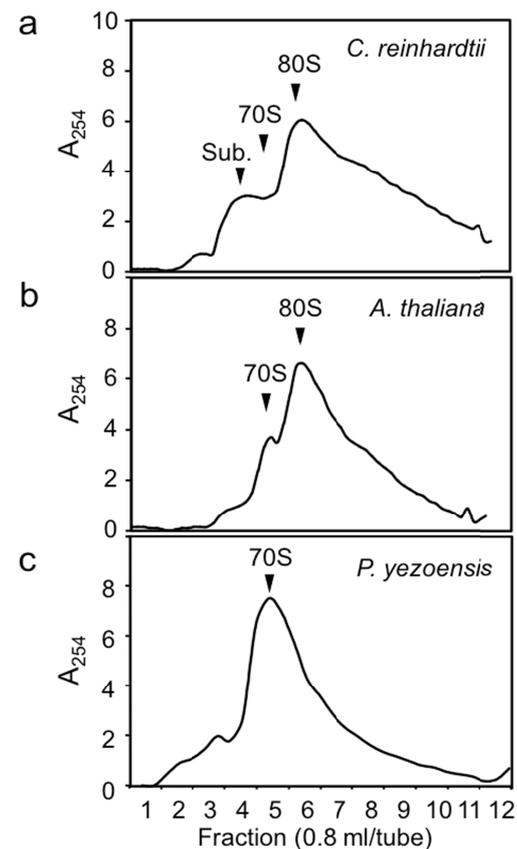


図 2 ショ糖密度勾配超遠心による葉緑体 70S リボソームの分離

a, 緑藻クラミドモナス; b, 高等植物アラビドプシス; c, 紅藻スサビノリ。

クラミドモナスとアラビドプシスにおいては、細胞質リボソームの 80S 粒子が全リボソームの主要成分であるが、スサビノリ（乾ノリ）では、70S 粒子に相当する葉緑体リボソームが主要成分である。フラクション番号 5 の画分のプロテオーム解析により、21 種の葉緑体リボソームタンパク質（S3, S4, S5, S7, S19, S20, L1, L2, L3, L4, L5,

L6, L9, L13, L14, L16, L18, L27, L28, L31, および L32) を同定できた。

< 引用文献 >

Contreras-Porcia, L., Thomas, D., Flores, V., and Correa, J.A. Tolerance to oxidative stress induced by desiccation in *Porphyra columbina* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Exp. Bot.* 62, 1815-1829 (2011).

Yamaguchi, K. Preparation and proteomic analysis of chloroplast ribosomes. *Methods Mol. Biol.* 775, 241-264 (2011).

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 Choi, Y.H., Yamaguchi, K., Oda, T., and Nam, T.J. Chemical and mass spectrometry characterization of the red alga *Pyropia yezoensis* chemoprotective protein (PYP): protective activity of the N-terminal fragment of PYP1 against acetaminophen-induced cell death in Chang liver cells. *Int. J. Mol. Med.* 35, 271-276 (2015) 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

1 山口健一, 森悠江, 柴田-山脇萌美, 金井剛志, 桑野和可, 小田達也 (2015) スサビノリ葉状体タンパク質の二次元電気泳動に有効な TRIzol 法と段階的可溶化によるサブプロテオーム分画 日本水産学会 2014 年度春季大会, 東京海洋大学品川キャンパス, 東京都港区, 2015.3.27~2015.3.31

2 山口健一, 島祐理, 河野なつみ, 柴田-山脇萌美, 山倉那央, 金井剛志, 桑野和可, 小田達也 (2014) スサビノリ葉状体の乾燥下のタンパク質発現プロファイリングと非乾燥誘導性 LEA 様タンパク質の同定 日本水産学会 2014 年度秋季大会, 九州大学箱崎キャンパス, 福岡県福岡市東区, 2014.9.19~2014.9.22

3 山口健一 (2014) 葉緑体タンパク質合成系のプロテオミクス: 緑色植物と紅藻 第

37 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 久山レイクサイドホテル, 福岡県粕屋郡久山町, 2014.9.11~2014.9.13

4 山脇萌美, 山口健一, 小田達也 (2012) スサビノリプロテオームの二次元電気泳動に適したサンプル調製法の検討 日本水産学会 2012 年度秋季大会, 水産大学校, 下関, 2012.9.15~2012.9.16

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山口 健一 (YAMAGUCHI, Kenichi)
長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・准教授
研究者番号: 90363473

(2) 研究分担者

小田 達也 (ODA, Tatsuya)
長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・教授
研究者番号: 60145307

桑野 和可 (KUWANO, Kazuyoshi)
長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・教授
研究者番号: 60301363