

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2008
課題番号：19570038
研究課題名 (和文) 色素体と核を結ぶ情報伝達に関わるテトラピロール中間体とその受容体の解明
研究課題名 (英文) Analysis of tetrapyrrole intermediates in the retrograde signaling from plastid to nucleus.
研究代表者
望月 伸悦 (MOCHIZUKI NOBUYOSHI)
京都大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：60280939

研究成果の概要：

色素体の機能に依存した光合成関連遺伝子の転写制御において、これまでの定説ではテトラピロール合成中間体 **MgProtoIX** の蓄積量が重要であると考えられてきたが、本研究によって、その蓄積量は転写制御と直接の関連性がないことが明らかとなった。更に、**CRY1** および **HY5** とテトラピロール合成系 **GUN** 遺伝子との間に、遺伝学的相互作用があることを見いだした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：植物分子遺伝学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物生理・分子

キーワード：色素体、クロロフィル、受容体、情報伝達、転写制御

1. 研究開始当初の背景

植物のさまざまな器官に存在するプラスチドは、外部環境刺激や内因性要因に応じて多様に分化を遂げる。このような分化には、プラスチドゲノムに加え核ゲノム遺伝子の働きが必須であり、それらの遺伝子産物を2つのゲノムからバランス良く供給する機構が存在する。このような調節において、「プラスチドシグナル」は、プラスチドの分化・機能状

態を核に伝達する中心的な役割を果たすと考えられている。たとえば、プラスチドの分化が遅延・停止すると、このシグナル伝達系を経由して核ゲノムにコードされた光合成関連遺伝子 (*Lhcb* や *RbcS*) の発現が特異的に低下する。

プラスチドシグナル伝達系の実体は長らく不明だったが、このシグナル伝達系が異常になった突然変異体 (*gun*) の単離をブレイクスルーとして、申請者が

Mg-chelatase の H サブユニット

(GUN5/CHLH) がシグナル伝達に重要である事を発見した。更に、申請者および共同研究者グループが、テトラピロール代謝系がシグナリングと密接な関係を持つことを示し、それを端緒として、その合成中間体の一つ MgProtoIX がシグナル分子であると考えられるようになった。また、遺伝学的解析によって、GUN5(CHLH)が、MgProtoIX の合成を行うと共に、そのシグナリングに関与することが示唆されている。更に、最近テトラピロールの研究とは別のラインから、GUN5/CHLH タンパク質がアブジジン酸(ABA)受容体 (ABAR) であり、ABA を感受した GUN5/CHLH/ABAR が、そのシグナルを伝達して核における ABA 応答遺伝子の転写制御を引き起こすことが報告された。以上のような背景のもと、プラスチドシグナリングにおけるテトラピロール代謝および Mg-chelatase 特に GUN5(CHLH)タンパク質の機能に高い関心が向けられていた。

2. 研究の目的

上で述べたように、プラスチドから核への情報伝達に関わる機能分子の同定とその認識機構を明らかにすることが本研究の最大の目的である。現時点では、その有力候補であるテトラピロール合成中間体、特に MgProtoIX と Mg-chelatase の解析を中心に研究を進める。プラスチドから核への情報伝達機構を明らかにすることで、植物における葉緑体の分化調節機構に関する理解が進むと期待できる。また、このようなオルガネラ相互作用は真核細胞で普遍的に見られる現象であり、プラスチドシグナル伝達とそれらの機構との比較を行う事で、細胞内共生成立のメカニズムに関する理解が進むと期待できる。

3. 研究の方法

具体的には、以下の4点について研究を進めた。(1)シグナル分子として有力視されている MgProtoIX の蓄積量について、様々な条件において詳細な定量を行う。(2)MgProto 受容体として有力な候補である Mg-chelatase H サブユニット (CHLH) 遺伝子に変異を生じた gun5 変異体アレルにおける CHLH タンパク質の蓄積量を調べるため、CHLH に対する抗体を作製した。この抗体を用いて CHLH 量の評価を行った。(3)CHLH タンパク質の細胞内局在性については、GFP 融合型 CHLH (CHLH-GFP) を導入した植物はアルビノになるため、発現誘導型プロモーターに連結した CHLH-GFP コンストラクトを作製し、植物への導入を行う。(4)GUN5/CHLH を細胞内で異所的に発現させる実験については、色素体移行シグナルを欠失した GUN5/CHLH タンパク質を発現する形質転換体を作製する。(5)赤色光受容体 phyB と青色光受容体 CRY1、ならびに HY5 とプラスチドシグナル伝達の関係性を調べるため、gun 変異体との二重変異体を作製して解析を行う。

4. 研究成果

(1)まず、植物から MgProtoIX を抽出する方法を検討した結果、従来の方法では分解産物等が大量に生ずる事が分かった。そのため、抽出方法を改良し、分解を殆ど起こさない条件で実験を行った。様々な条件下で生育させた植物における MgProtoIX の蓄積量を定量した結果、MgProtoIX の蓄積量とプラスチドシグナル伝達の活性には相関性が無いことを見いだした。(2)上記の方法で抗 CHLH 抗体を作製し、gun5 変異体アレルにおける CHLH タンパク質の蓄積量を調べたところ、予備的な結果であるが

タンパク量が低下しているもの、タンパク量が変化しないものがあることが分かった。(3)CHLH タンパク質の細胞内局在については、CHLH-GFP コンストラクトを導入した植物を用い、様々な条件で局在が変化するか検討し、予備的結果では、CHLH は予想通りプラスチドに局在し、それ以外の部位では検出できなかった。また、プラスチドにダメージを与えても局在性に有意な変化は見られなかった。(4)細胞内におけるCHLH の異所的発現については、形質転換体を作製中である。(5)cry1 および hy5 と gun の相互作用については、従来報告されている gun1 で表現型の増強が確認できたが、さらにそれ以外の gun 変異体についても、CRY1 および HY5 との遺伝学的相互作用があることが分かった。

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 4 件)

- ① Kobayashi K, Mochizuki N, Yoshimura N, Motohashi K, Hisabori T, Masuda T, Functional analysis of Arabidopsis thaliana isoforms of the Mg-chelatase CHLI subunit, *Photochem Photobiol Sci*, 7, 1188-1195, 2008, 査読有
- ② Mochizuki N, Tanaka R, Tanaka A, Masuda T, Nagatani A., The steady-state level of Mg-protoporphyrin IX is not a determinant of plastid-to-nucleus signaling in Arabidopsis., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 15184-15189, 2008, 査読有
- ③ Oka Y, Matsushita T, Mochizuki N, Quail PH, Nagatani A., Mutant screen distinguishes between residues necessary for light-signal perception and signal transfer by phytochrome B., *PLoS Genet.*, 4, e1000158, 2008, 査読有
- ④ Kong SG, Kinoshita T, Shimazaki K, Mochizuki N, 他, The C-terminal kinase fragment of Arabidopsis phototropin 2 triggers constitutive

phototropin responses., The C-terminal kinase fragment of Arabidopsis phototropin 2 triggers constitutive phototropin responses., 51, 862-873, 2007, 査読有

[学会発表] (計 10 件)

- ① 望月伸悦、プラスチドシグナル伝達におけるテトラピロール代謝系の関わり、第 11 回オルガネラワークショップ、2009/3/20、名古屋
- ② 堀恵悟、望月伸悦、増田建、シロイヌナズナの Mg-キラーゼのサブユニット CHLH のボルフィリン結合性の解析、第 50 回日本植物生理学会年会、2009/3/21、名古屋
- ③ 小野裕也、岡義人、Gabriela Toledo-Ortiz、小鍛冶敬生、望月伸悦、長谷あきら、フィトクロム A と B の機能文化の構造的基盤、第 50 回日本植物生理学会年会、2009/3/21、名古屋
- ④ 高野雄也、小塚俊明、望月伸悦、長谷あきら、シロイヌナズナの葉肉プロトプラストを用いた避陰応答における光信号伝達と植物ホルモンの相互作用の解析、第 50 回日本植物生理学会年会、2009/3/21、名古屋
- ⑤ 望月伸悦、Relationship between plastid-to-nucleus signaling and tetrapyrrole biosynthesis、国際シンポジウム "Bacteria made Organelles made Eukaryotic Cells"、2008/11/29、東京
- ⑥ 望月伸悦、The role of tetrapyrrole intermediates in plastid signaling、2008 Japan-Switzerland Workshop: Photosynthetic Adaptation and Chloroplast Dynamics、2008/10/8、奈良
- ⑦ 望月伸悦、レトログレードシグナリングにおけるテトラピロール代謝の役割、日本植物学会第 72 回大会シンポジウム、2008/9/25、高知
- ⑧ 望月伸悦、田中亮一、田中歩、長谷あきら、プラスチドシグナル伝達とテトラピロール合成制御、第 49 回日本植物生理学会年会、2008/3/20、札幌
- ⑨ 小林康一、望月伸悦、吉村奈穂、本橋健、久堀徹、増田建、シロイヌナズナの Mg-キラーゼのサブユニット CHLI アイソフォームの機能解析、第 49 回日本植物生理学会年会、2008/3/20、札幌
- ⑩ 庄野由里子、板山俊一、高橋征司、望月伸悦、明賀史純、篠崎一雄、本橋令子、永田典子、白色子葉形態を示すシロイヌナズナ突然変異体を用いた色素体分化の解析、第 49 回日本植物生理学会年会、

2008/3/20、札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

望月 伸悦 (MOCHIZUKI NOBUYOSHI)

京都大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：60280939

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし