

## 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 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21570039  
 研究課題名（和文） 色素体による核遺伝子発現制御に関わるプラスチドシグナル因子と情報伝達系の解明  
 研究課題名（英文） Analysis of the plastid-derived signal transduction that regulate nuclear gene expression  
 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（和文）：

高等植物におけるプラスチドから核へのレトログレードシグナル(プラスチドシグナル)には、テトラピロール合成中間体に関わることが示唆されているが、依然としてその全体像は明らかではない。そこで、FOX ハンティング系統からプラスチドシグナルに関係する新規因子の同定を試み、FOX ラインに含まれるcDNA を解析した結果、bHLH 型転写因子や Kelch リピートを有する因子がシグナル伝達に関わる可能性がわかった。

## 研究成果の概要（英文）：

In higher plants, it has been hypothesised that there are unknown signals (“plastid signals”) derived from plastids to control nuclear gene expression. Analysis of *gun* mutants that have defects in this signal transduction pathway suggests the involvement of the tetrapyrrole intermediates (e.g. Mg-Protoporphyrin IX, MgProto) as signaling factors. Although the involvement of tetrapyrrole biosynthesis has been strongly suggested, the entity of the signal is still obscure. For better understanding of plastid signaling, we have been screening the gain-of-function type *gun* mutants using FOX-hunting (Riken Arabidopsis Full Length cDNA overexpressor) lines. We identified genes that encode a member of bHLH gene family and a kelch-repeat containing factor.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

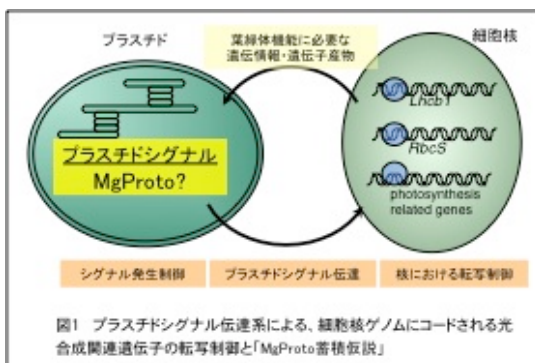
科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：葉緑体、オルガネラ、レトログレードシグナル、テトラピロール、ABA

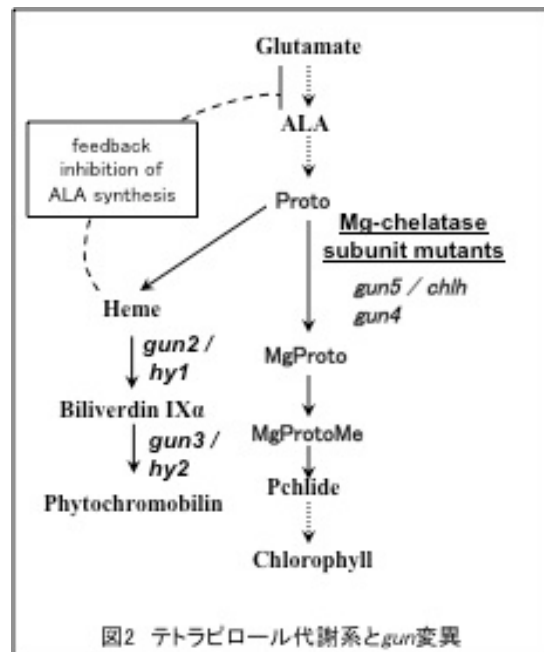
## 1. 研究開始当初の背景

植物のさまざまな器官に存在するプラスチドの正常な分化・機能には、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(図1)。

「プラスチドシグナル伝達系」はその一つであり、プラスチドの分化・機能状態を核に伝達し、オルガネラと核の協調的な遺伝子発現調節を行うと考えられている。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 (*Lhcb1* など) の発現が特異的に抑制される。プラスチドシグナル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 1-gun5*) の単離をブレイクスルーに、申請者および共同研究者の研究によって、テトラピロール合成系の遺伝子 (*GUN5/CHLH*, *GUN4* および *HY1*, *HY2*) がシグナリングに重要な役割を担っていることが明らかになった(図2)。これに続く研究から、プラスチドシグナルの実体がテトラピロール合成の中間産物(Mg-Protoporphyrin-IX, 以下 MgProto)であるという仮説(「MgProto 蓄積シグナル仮説」)が提唱され、広く一般に信じられてきた。すなわち、葉緑体の分化が阻害されると高レベルの MgProto が葉緑体内に蓄積し、これがシグナルとなって、核における遺伝子発現が抑



制されるというモデルである。ところが、申請者による最近の研究から、葉緑体分化阻害で MgProto は蓄積するどころか逆に激減すること、MgProto 蓄積量と *Lhcb1* の転写レベルに相関性が無いことが明らかになった。よって、「真の」プラスチドシグナル分子の同定が急務であり、これを本研究の最重要課題と設定した。



## 2. 研究の目的

GUN 遺伝子の大部分がテトラピロール合成に関わるタンパク質をコードすることから、依然としてテトラピロールの類縁物質がシグナルである可能性が高い。そこで、これまで対象とされてこなかったテトラピロール中間産物および未知の誘導体(分解産物)について重点的に探索を行う。さらに遺伝学的アプローチとして、従来とは異なる機能獲得型変異体ライン(Fox-hunting lines) から新規 *gun* 突然変異体を単離・解析することで、シグナル分子の手がかりを得る。

### 3. 研究の方法

①テトラピロール誘導体の検索については、抽出方法やHPCL分析方法の検討を行った。

②プラスチドシグナル分子と伝達系に関わる因子の検索(遺伝学的アプローチ)

従来と逆のアプローチとして、理化学研究所で開発された FOX-hunting ライン(完全長 cDNA 過剰発現システムを用いて機能獲得型 gun 変異体の単離を試みる。既存の FOX 形質転換体は本研究のスクリーニングに使えないため、Lhcb1-LUC プロモーターをゲノムに組み込んだアラビドプシス株 (CL 株) に対し、FOX-hunting ライブラリを自前で形質転換した。これを用い、カロテノイド合成阻害剤であるノルフラゾンあるいは原核型翻訳阻害剤で処理し、Lhcb1-LUC レポーターの発現を指標に変異体スクリーニングを行った。セカンドスクリーニングとして、RT-PCR 法によって Lhcb1 (または carbonic anhydrase, CA1) の発現量を定量する。RNA 抽出と RT-PCR は非常に労力を要する方法だが、申請者は簡便に RNA を抽出するプロトコルを開発しており、一日に数百サンプルの解析が可能である。スループットが低い方法であるが、変異体同定後の解析が容易であることを総合的に考えると、費用効果の高い方法である。

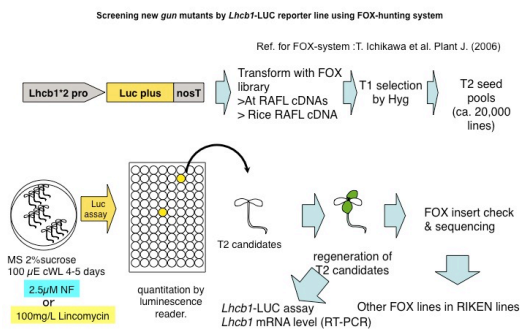
### 4. 研究成果

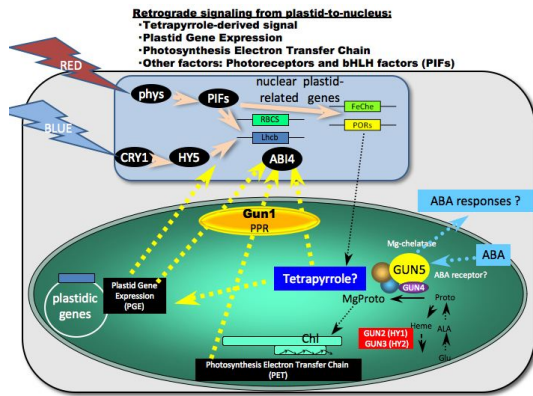
まず、自前の FOX-hunting 形質転換体の作製を行い、約 20,000 の T1 植物から T2 種子を

取得した。T2 種子集団を用いて変異体スクリーニングを行った。さらに表現型の詳細な解析とともに、変異体に導入された cDNA の同定を進めた。多段階の検定を経て、現在約 30 個の遺伝子が候補として取得されている。これら候補には、光情報伝達系に関わる bHLH 遺伝子ファミリーに属するものや、Kelch リピートを含む因子の他、機能未知のタンパク質をコードするものが含まれていた。また、真核細胞においてさまざまな増殖刺激に関わる TOR シグナルに関わるとされる因子も同定されている。これら遺伝子のノックアウト株も取得し、GUN との遺伝学的・生化学的な関連を現在詳細に解析している。

また、プラスチドシグナルと密接な関係をもつテトラピロール中間体の解析については、植物体内のヘム定量法の開発に携わった。さらに、ヘム合成に関わるフェロキターゼについては、そのアイソザイムの一つである FC1 過剰発現が gun 表現型を示すとの報告がなされているが、上記 FOX-hunting スクリーニングで見いだされた FC1 過剰発現体が実際に gun 表現型を示すことを確認した。

植物内のテトラピロール中間体の解析については、ノルフラゾン処理した植物体には MgProto などの中間体が蓄積していないが、一方で MgProto の合成に関わる酵素群の活性は維持されており、テトラピロール合成系の初期中間体アミノレブリン酸を与えることで、MgProto などの合成を急速に回復することが分かった。また、gun 変異体においてこの合成系の活性が高く維持されていることが分かった。テトラピロールの新規中間体の検索については、様々な抽出条件等を試みたが、新たな因子の発見には至っていないため、現在質量分析を用いた解析の計画を進めている。





## 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2件)

①Lee HJ, Mochizuki N, Masuda T, Buckhout TJ, Disrupting the bimolecular binding of the haem-binding protein 5 (AtHBP5) to haem oxygenase 1 (HY1) leads to oxidative stress in Arabidopsis.、J Exp Bot.、査読有り、63巻、2012、5967-5978、doi:10.1093/jxb/ers242

②Espinosa NA, Kobayashi K, Takahashi S, Mochizuki N, Masuda T. Evaluation of unbound free heme in plant cells by differential acetone extraction. Plant Cell Physiol.、査読有り、53巻、2012 1344-1354、doi: 10.1093/pcp/pcs067

[学会発表] (計1件)

① 衣幡春映、長谷あきら、望月伸悦、アラビドプシスにおける簡便な気孔観察を可能とする新規表皮剥離法、第76回植物学会大会、2012年9月15-16日、兵庫県立大学(兵庫県)

[その他]

ホームページ

[http://www.bot.kyoto-u.ac.jp/j/1\\_seiri.html](http://www.bot.kyoto-u.ac.jp/j/1_seiri.html)

## 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