

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380205

研究課題名(和文)葉緑体遺伝子の選択的発現制御システムの解明とその活用

研究課題名(英文)Elucidation of mechanisms governing selectable expression of chloroplast genes and its application to plant improvement

研究代表者

小林 裕和 (Kobayashi, Hirokazu)

静岡県立大学・大学院食品栄養環境科学研究所・教授

研究者番号：80170348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,400,000円、(間接経費) 4,620,000円

研究成果の概要(和文)：葉緑体は、光を感知し、選択的に遺伝子発現を制御する。葉緑体ゲノムの主要な光合成遺伝子は、RNAポリメラーゼPEP (plastid-encoded RNA polymerase) により転写され、この作動を制御しているのが因子(SIG1)である。in vitro系および遺伝子欠失変異系統を用い、SIG1のリン酸化/脱リン酸化に介在するSIG1タンパク質キナーゼ(SOPK)およびSIG1タンパク質ホスファターゼ(SOPH)の同定を試みた。さらに、本制御系の「光スイッチ」としての葉緑体工学への有用性を見いだした。また玉露など遮光栽培茶における遺伝子発現を網羅的に解析した。

研究成果の概要(英文)：Gene expression in chloroplasts was selectively switched off by the modification of sigma factor 1 (SIG1). We performed genome-wide screening of Arabidopsis cDNA clones by in vitro detection of protein-protein interaction, followed by phosphorylation assay, resulting in identification of some SIG-one protein kinases (SOPKs). Under lighting conditions that preferentially excited PS I, expression profiles of the psaA gene for the reaction center protein of PS I in SOPK-knockout (KO) lines, were consistent with SIG1 being in its unphosphorylated state. Employment of GFP fused with these SOPKs revealed their localization in the cytosol. SIG-one protein phosphatase (SOPH) candidate genes were tried to be identified by similar strategies. This "light switch" was further employed for chloroplast engineering. On the other hand, "gyokuro" green tea enriched with amino acids, is made of tea leaves grown under a light-shaded condition. Such leaves were subjected to transcriptomic analysis.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：シグナル伝達 転写制御 タンパク質リン酸化 葉緑体 植物

1. 研究開始当初の背景

葉緑体局在タンパク質は、4,000 種類以内であると推定され、それらのうち、高等植物では、100 種類弱が葉緑体ゲノムにコードされている。他は、核ゲノムにコードされており、葉緑体移行に必要なトランジット・ペプチドによって葉緑体へ運ばれると考えられている。このように、葉緑体に特徴的な機能である光合成に介在する遺伝子は、葉緑体と核ゲノムに分散しているが、それらの多くの発現が光に依存していることが知られている。核遺伝子の発現は、フィトクロムやクリプトクロムのような光受容体の制御下にあると考えられているが、葉緑体内で完結する光による遺伝子転写制御については、分子機構が不明であった。

2. 研究の目的

高等植物の葉緑体は、生物による唯一の太陽光エネルギー獲得系である光合成機能と各種代謝経路を有し、この機能の改良により、世界規模での食糧供給、地球温暖化防止のための代替エネルギー (バイオ燃料) の生産、高齢社会に貢献し得る機能性食品・機能性成分の生産性の向上が期待される。また、葉緑体は、独立したゲノムとその発現系を伴った細胞内コンパートメントであり、外来タンパク質の大量合成・蓄積が期待できる。本研究代表者は、光の強度および波長 (赤色あるいは昼光色) を感知した葉緑体遺伝子発現の制御系を見いだした (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 10760-10764, 2010)。この現象に介在する機構を解明し、遺伝子発現の制御が可能な光技術を活用した葉緑体工学へと発展させる。

3. 研究の方法

(1) 植物材料：シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) Columbia (Col-0) を用いた。シロイヌナズナ欠失変異系統 (knockout, KO) は、Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) から入手した。チャ (*Camellia sinensis*) 品種「やぶきた」を実験に供した。

(2) タンパク質キナーゼ候補の葉緑体局在予測：SIG1 のリン酸化反応の場合は、葉緑体と細胞質基質の2つの可能性が考えられる。タンパク質局在予測プログラム (TargetP および ChloroP) により、葉緑体に局在するタンパク質キナーゼを絞り込んだ。

(3) タンパク質合成系：コムギ無細胞タンパク質発現系を用い、SIG1 はビオチン化により、シグマ因子 (SIG) をリン酸化するタンパク質キナーゼ SOPK (SIG1 protein kinase) 候補は、GST 融合タンパク質として合成し精製した。SOPK 候補として、RIKEN Arabidopsis Full-Length (RAFL) cDNA ライブラリーに登録されているタンパク質キナーゼの cDNA を鋳型として用いた。コムギ無細胞タンパク質発現系により、660 種のタンパク質キナーゼ

を合成した。

(4) タンパク質相互作用の評価系：コムギ無細胞タンパク質発現系とタンパク質間相互作用検出系である AlphaScreen (PerkinElmer) を組み合わせたハイスループット・スクリーニング手法によって、網羅的な解析を行った。これには、タンパク質キナーゼの葉緑体局在を問わず、上記 660 種のタンパク質キナーゼ候補を対象とした。

(5) SIG1 リン酸化反応：葉緑体局在化 SOPK 候補については、N 末端の TP (transit peptide) 領域を除いたタンパク質キナーゼ候補をコムギ無細胞タンパク質発現系を用いて合成した。SIG1 は、同様にコムギ無細胞タンパク質発現系により合成後、 λ -タンパク質ホスファターゼを用いて脱リン酸化し、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いたリン酸化反応に供した。

(6) 発現遺伝子 (EST) データベースの構築：「やぶきた」一番茶を1葉期~5葉期に渡り収穫した。RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) により RNA を調製し、全 RNA に対し、SMART cDNA Library Construction Kit (Clontech) により cDNA を合成した。TRIMMER-Direct cDNA Normalization Kit (Evrogen) を用い cDNA を均一化した。オリゴ dT 配列に GS FLX シーケンスプライマー配列を付加したビオチン付プライマーを用い PCR を行い、ソニケーションによる断片化の後、GS FLX 解析用アダプターをライゲーションした。ストレプトアビジン磁気ビーズで回収しアルカリ処理後、一本鎖 DNA シーケンスライブラリーとした。Genome Sequencer FLX+ System (Roche) により、塩基配列を決定し、EST データベースを構築した。これを基に、遺伝子発現の網羅的解析 eArray (8 X 60 k, Agilent Technologies) をデザインした。

4. 研究成果

(1) シグマ因子 (SIG) をリン酸化するタンパク質キナーゼ SOPK (SIG1 protein kinase) の同定：コムギ無細胞タンパク質合成系にタンパク質間相互作用検出系 AlphaScreen (PerkinElmer) を適用し、SIG1 と相互作用を示す 32 種のタンパク質キナーゼ候補を特定した。また、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いたリン酸化アッセイにより、コムギ抽出液中に SIG1 の Thr-170 をリン酸化する活性を見出した。リン酸化アッセイを用い、SIG1 をリン酸化するタンパク質キナーゼとして、シロイヌナズナからは4種に絞り込んだ。コムギ無細胞タンパク質合成系にタンパク質間相互作用検出系およびリン酸化アッセイを適用し、SIG1 をリン酸化するタンパク質キナーゼを2種に絞り込んだ。これらの遺伝子のシロイヌナズナ欠失変異系統 (knockout, KO) を Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC)

から入手し、赤色光 (700~710 nm) を感知した光化学系 I (PS I) 反応中心タンパク質遺伝子 *psaA* の発現を解析した。光合成電子伝達系阻害剤 DUMU に対する応答から、SOPK2 が本制御に係わっている可能性が示唆された。また、SOPK1 および SOPK2 の細胞内局在部位を緑色蛍光タンパク質 (GFP) を用いて観察し、葉緑体外への局在が認められた。

(2) リン酸化 SIG1 を脱リン酸化するタンパク質ホスファターゼ SOPH (SIG1 protein phosphatase) の同定 : コムギ無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質ホスファターゼを生産し、AlphaScreen によりリン酸化 SIG1 タンパク質との相互作用の検出を試みた。残念ながら、この方法では有意なシグナルが検出されず、リン酸化 SIG1 とタンパク質ホスファターゼとの相互作用 (結合力) は、SIG1 とそのタンパク質キナーゼとの相互作用に比べて弱いと判断された。したがって、タンパク質相互作用に基づく戦略に限界がある。タンパク質ホスファターゼ遺伝子の KO 系統候補を検索し、ABRC には 142 種類の遺伝子に対する系統が登録されていることを見いだした。これらのうち、119 種類の遺伝子産物は、葉緑体への局在の可能性が予測される。これらを手直し、自家受粉 2 世代目にタンパク質ホスファターゼ遺伝子 KO ホモ接合系統を選抜した。SOPH 遺伝子 KO 系統は、強白色光の照射に応答できず、*psaA* の発現抑制が解除されないことが想定される。これを指標にして、SOPH 遺伝子 KO 系統を 2 候補選抜した。

(3) 各種波長光照射による葉緑体遺伝子 *psaA* の発現制御の解析 : 野生型系統シロイヌナズナを用い、昼光色光を対照として、青色光 (450 nm) あるいは赤色・赤外光 (660~730 nm) を照射した際の *psaA* 遺伝子の発現を解析した。700~710 nm の光により、*psaA* 遺伝子の発現は最も抑制された。

(4) 葉緑体遺伝子の選択的発現制御系の活用 : SIG1 のリン酸化により転写が抑制される *psaA* 遺伝子のプロモーターを葉緑体形質転換が可能なタバコおよびレタスに活用する。そのために、レポーター遺伝子として、Chroma-Glo Luciferase (Promega) の CBR1uc (赤色) と CBG681uc (緑色) を用いた。これらレポーター遺伝子が葉緑体の一過性発現において有効であることを見いだした。

(5) 葉緑体形質転換可能植物種および栽培植物種への応用研究の準備 : 栽培植物種としては、静岡県が日本一の生産額を誇るチャに注目し、品種「やぶきた」の一番茶の新葉から mRNA を調製し、シーケンス用 cDNA ライブラリーを作製した。チャは栽培時の遮光により玉露あるいは白葉化茶になる。チャ葉 3' EST 高速シーケンス解析 (FLX+) を行い、独

自のデータベースを構築した。本 EST データベースに基づいて作製した 49,256 のコンテンツ (世界最高水準の網羅率) からなる eArray システム (Agilent Technologies) を活用し、トランスクリプトーム解析を実施した。これを光感知葉緑体遺伝子発現機構の解明の糸口とした。

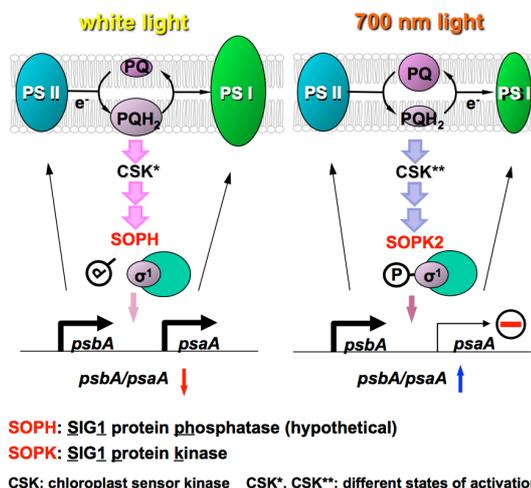


図1 σ 因子 SIG1 のリン酸化を介した葉緑体遺伝子選択的発現制御 (模式図)

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)

- ① K. Nakanishi, S. Narimatsu, S. Ichikawa, Y. Tobisawa, K. Kurohane, Y. Niwa, H. Kobayashi, Y. Imai: Production of hybrid-IgG/IgA plantibodies with neutralizing activity against Shiga toxin 1. PLOS ONE, 8, e80712, 2013, 査読有
- ② Y. Niwa., S. Watanabe, T. Ogawa, H. Nagasaki, Y. Nakamura, H. Nishimura, T. Hirayama, E. Kobayashi, Y. Nakamura, H. Kobayashi: Establishment of a tea custom array based on EST data obtained with next-generation sequencing. Proceedings of "The 5th International Conference on O-CHA (Tea) Culture and Science, ICOS 2013", PR-P-34, 2013

[学会発表] (計 22 件)

招待講演

- ① H. Kobayashi: Chloroplast biogenesis: Light-induced redox control of gene expression. Special Seminars (hosted by J.J. Harada, B.B. Buchanan), Univ. California, Davis and Univ. California, Berkeley, 2013 年 4 月 18 日~22 日, Davis and Berkeley, USA

- ② 小林裕和, 清水正則, 澤崎達也: タンパク質合成系としての優位性とその活用 --- σ 因子キナーゼおよび bHLH 標的 DNA の探索. 第 54 回 日本植物生理学会年会, 2013 年 3 月 21 日~23 日, 岡山
- ③ 小林裕和: 太陽エネルギー依存物質生産系である植物「葉緑体」のエンジニアリング. 中部公立 3 大学 新技術説明会, 2013 年 1 月 25 日, 東京
- ④ H. Kobayashi, M. Shimizu: Light-regulated adjustment of photosystem stoichiometry via phosphorylation status of sigma factor in chloroplasts. Annual Main Meeting, Society for Experimental Biology, 2012 年 6 月 29 日~7 月 2 日, Salzburg, Austria
- ⑤ H. Kobayashi: Enrichment and evaluation of flavonoids in plants treated with LED and engineered with all plant-derived genes. The 10th China-Japan International Symposium on Health Sciences, 2012 年 6 月 7 日~8 日, 杭州, 中国
- ⑥ H. Kobayashi: Chloroplast biogenesis: Light switch and internal factors for expression of plastid and nuclear genes. Special Seminars (hosted by J. Narangajavana, A. Incharoensakdi), Mahidol Univ. and Chulalongkorn Univ. 2011 年 9 月 8 日~9 日, Bangkok, Thailand
- ⑧ H. Kobayashi: Chloroplast biogenesis: Light switch and internal factors for expression of plastid and nuclear genes. Special Seminars (hosted by R. J. Spreitzer, J.C. Jang), Univ. Nebraska, Lincoln and The Ohio State Univ., 2011 年 7 月 26 日~28 日, Lincoln and Columbus, USA
- 一般講演
- ⑨ 丹羽康夫, 西村秀希, 平山隆志, 澤田有司, 平井優美, 長崎英樹, 中村保一, 小林栄人, 渡辺祥子, 小川剛史, 中村順行, 小林裕和: カスタムマイクロアレイを用いたチャ光制御遺伝子の発現解析. 第 55 回 日本植物生理学会年会, 2014 年 3 月 18 日~20 日, 富山
- ⑩ P. Chuenwarin, A. Shimazaki, M. Shimizu, M. Katsumata, H. Kobayashi: A protein phosphatase involved in light-regulated expression of photosynthesis genes in *Arabidopsis* chloroplasts. 第 55 回 日本植物生理学会年会, 2014 年 3 月 18 日~20 日, 富山
- ⑪ 青木亮裕, 清水正則, 澤崎達也, 小林裕和: 動物神経系 CRIPT と相同なシロイヌナズナ緑化抑制タンパク質. 第 55 回 日本植物生理学会年会, 2014 年 3 月 18 日~20 日, 富山
- ⑫ 丹羽康夫, 長崎英樹, 中村保一, 西村秀希, 平山隆志, 小林栄人, 渡辺祥子, 小川剛史, 中村順行, 小林裕和: チャの遺伝子の多くはブドウの遺伝子と最もよく似ていた. 第 36 回 日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3 日~6 日, 神戸
- ⑬ Y. Niwa, S. Watanabe, T. Ogawa, H. Nagasaki, Y. Nakamura, H. Nishimura, T. Hirayama, E. Kobayashi, Y. Nakamura, H. Kobayashi: Establishment of a tea custom array based on EST data obtained with next-generation sequencing. The 5th International Conference on O-CHA (Tea) Culture and Science. 2013 年 11 月 6 日~8 日, 静岡
- ⑭ 丹羽康夫, 渡辺祥子, 小川剛史, 中村順行, 小林栄人, 長崎英樹, 中村保一, 小林裕和: 高速シーケンサを用いたチャ葉由来 EST の解析. 日本植物学会 第 77 回大会, 2013 年 9 月 13 日~15 日, 札幌
- ⑮ 山本峻資, 清水正則, 小林裕和: 葉緑体における光色依存遺伝子発現「光スイッチ」. 第 54 回 日本植物生理学会年会, 2013 年 3 月 21 日~23 日, 岡山
- ⑯ P. Chuenwarin, A. Kato, M. Shimizu, T. Sawasaki, H. Kobayashi: Phosphorylation mechanisms of σ factor for light-regulated transcription in chloroplasts. 第 54 回 日本植物生理学会年会, 2013 年 3 月 21 日~23 日, 岡山
- ⑰ 渡辺祥子, 小川剛史, 小林栄人, 中村順行, 小林裕和, 丹羽康夫: ヤブキタ茶のカテキン合成酵素遺伝子. 第 17 回 日本フードファクター学会学術集会・第 9 回 日本カテキン学会 合同大会, 2012 年 11 月 10 日~11 日, 静岡
- ⑱ 丹羽康夫, 荻野彰子, 影島宏紀, 後藤新悟, 柴田考世, 小林裕和: 葉緑体への分化制御因子の同定とその起源. 第 24 回 高遠・分子細胞生物学シンポジウム, 2012 年 8 月 23 ~24 日, 長野
- ⑲ 島崎あづみ, P. Chuenwarin, 清水正則, 小林祐子, 勝又政和, 小林裕和: 遅延蛍光による非破壊的光合成評価法のシロイヌナズナへの活用. 第 53 回 日本植物生理学会年会, 2012 年 3 月 16 日~18 日, 京都
- ⑳ 荻野彰子, 丹羽康夫, 影島宏紀, 後藤新悟, 小林裕和: カルスの緑化を誘導する分泌型ペプチド CES102 は維管束で発現する.

第34回 日本分子生物学会年会, 2011年12月13日~16日, 横浜

②1 P. Chuenwarin, A. Kato, M. Shimizu, Y. Kobayashi, M. Katsumata, H. Kobayashi: Regulation in biogenesis of the chloroplast, an intracellular compartment, for production of foods and nutraceutical compounds. The 4th International Conference on Health and Longevity Sciences, 2011年10月21日~21日, 静岡

②2 Y. Niwa, A. Ogino, H. Kageshima, S. Goto, H. Kobayashi: Chloroplast differentiation by a secretory protein. XXIV SPPS Congress 2011, 2011年8月21日~25日, Stavanger, Norway

[図書] (計2件)

① M. Shimizu, K. Kawai, K. Kaku, T. Shimizu, H. Kobayashi: Application of mutated acetolactate synthase genes for herbicide resistance to plant improvement. "Herbicides, Theory and Applications" (edited by S. Soloneski, M.L. Larramendy), InTech, Rijeka, Croatia, pp. 193-212, 2011

② 小林裕和: 食糧と機能性成分生産のための植物の改良 / Engineering of plants for production of provisions and nutraceuticals. 「静岡県立大学グローバル COE プログラム --- 健康長寿科学教育研究の戦略的展開 / Global Center of Excellence for Innovation in Human Health Sciences」成果報告書, pp. 20-21, 2012

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 目的遺伝子を発現させるための光学スイッチ用コンストラクト

発明者: 小林裕和, 山本峻資, 清水正則

権利者: 静岡県公立大学法人

種類: 特許

番号: 2013-050728

出願年月日: 2013年3月13日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://sfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/pctech/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 裕和 (KOBAYASHI, Hirokazu)

静岡県立大学・大学院食品栄養環境科学研究院・教授

研究者番号: 80170348

(3) 連携研究者

清水 正則 (SHIMIZU, Masanori)

常葉大学・健康プロデュース学部・講師

研究者番号: 40468236

川島 博人 (KAWASHIMA, Hiroto)

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号: 50260336