

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570054

研究課題名(和文) 葉緑体 ppGpp シグナルの人工構築による植物緊縮制御の解析

研究課題名(英文) Characterization of plant stringent regulation by introducing artificial ppGpp-signal system

研究代表者

戸澤 譲 (TOZAWA, Yuzuru)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：90363267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円

研究成果の概要(和文)：本課題では、植物葉緑体におけるppGppの機能を明らかにするために研究を進めた。葉緑体抽出液を用いた試験管内翻訳系を構築し、ppGppが葉緑体タンパク質合成を阻害することを明らかにした。続いて、エネルギー分子として重要なGTP合成の鍵酵素であるグアニル酸キナーゼがさらに低濃度のppGppにより活性阻害を受けることを明らかにし、少なくともGTP合成とタンパク質合成へのppGppシグナルの寄与を世界に先駆けて証明した。さらに、化合物テオフィリンにより駆動するリボスイッチを利用した遺伝子発現制御系をラン藻において構築することに成功し、それをタバコ葉緑体ゲノムに適用し形質転換植物を得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have performed experiments for clarifying function of ppGpp in plant chloroplasts. By establishing in vitro translation system from isolated chloroplasts, we have demonstrated that chloroplast translation activity is inhibited by ppGpp. Further, we have shown that activity of guanylate kinase, a key enzyme for GTP biosynthesis in chloroplasts, is potently inhibited by ppGpp. We have thus proven that ppGpp regulates chloroplast translation and GTP biosynthesis in plants. Moreover, we have established cyanobacterial genetic system that enables induction of protein-expression by theophylline administration based on riboswitch system. The system has also been applied to transformation of tobacco chloroplast genome.

研究分野：分子生物学

キーワード：葉緑体 翻訳制御 核酸代謝 緊縮制御 ppGpp

### 1. 研究開始当初の背景

原核生物に普遍的に存在する緊縮制御系では、グアノシン2リン酸(GDP)のリボース3'位にアデノシン3リン酸(ATP)のピロリン酸が付加したグアノシン4リン酸(ppGpp)がシグナル物質として機能する。ppGppはバクテリアのglobal regulatorとも称され、その細胞内標的は、DNA複製、RNA合成、翻訳、核酸合成など多岐に渡ることが知られている。多くの病原性バクテリアにおいては、ppGppが宿主感染に重要な機能を果たすことが徐々に明らかにされ、医学研究分野に力点が置かれた研究も進んでいる(Potrykus K and Cashel M. *Annu Rev Microbiol* 62, 35-51, 2008)。さらに、この緊縮制御系がバクテリアを共生起源とする真核生物の葉緑体にも存在することが明らかになった。しかしながら、葉緑体における緊縮制御の機能的役割に関しては多くの未解明点が残されている。

申請者は、これまでに葉緑体機能には原核生物型のppGpp生合成系が複数存在することを生化学および分子生物学的な手法により明らかにしてきた。まず、クラミドモナスを材料としてppGpp合成酵素が葉緑体に局在し、実際にppGpp合成酵素触媒活性を有することを初めて証明し(Kasai K et al. *Nucleic Acids Res* 30, 4985-4992, 2002)。単離したエンドウマメ葉緑体の抽出液を用いて、実際に生化学的にppGpp合成酵素の活性の存在を示し(Kasai K et al. *Nucleic Acids Res* 32, 5732-5741, 2004)。さらには、バクテリアには存在しない植物特有なカルシウム依存型ppGpp合成酵素(CRSH)の存在とその機能について世界に先駆けて明らかにしてきた(Tozawa Y et al. *J Biol Chem* 282, 35536-35545, 2007)。並行して、枯草菌(*Bacillus subtilis*)より、大腸菌など今まで知られていたRelA/SpoTタイプ以外のppGpp合成酵素(SAS, small alarmone synthase)(YjbM/YwaC)を発見し、栄養ストレス以外のトリガーにより緊縮制御が誘発されることを証明した(Nanamiya H et al. *Mol Microbiol* 67, 291-304, 2008)。その発表論文はFaculty of 1000 Biologyに選出されるなど世界的にも評価を得ている。

### 2. 研究の目的

植物葉緑体の緊縮制御を司る複数のppGpp合成・分解酵素機能の生化学的解析を通じて、シグナル機構について個別に明らかにするとともに、標的の一つと予測する葉緑体翻訳装置の標的分子を生化学的に明らかにする。同時に、新技術を取り入れた分子生物学的解析により、個々の誘発因子がもたらす植物内の生理学的変化を解明する。植物は多様な組織に分化するため、観察し難い生理学的な動態に関する研究には、リボスイッチを応用したタンパク質発現誘導システムの

導入を図ることにより、人為的に誘導合成したppGpp合成がもたらす植物内の生理学的な変化を詳細に調査し、ppGppシグナル伝達の下流部分の全容解明を目指した。

### 3. 研究の方法

本研究期間内には、葉緑体の緊縮制御機構の解明を目指して、次の3項目について実験を進めた。

(1) 葉緑体の翻訳伸長因子を対象としてタンパク質とppGppの相互作用解析を進め、ppGppによる翻訳活性制御機構を分子レベルで検証した。

(2) ppGpp分解酵素の生化学的な機能解析をコムギ無細胞翻訳系を利用したタンパク質合成系により進め、ppGppシグナルの一過性を形成する機構を酵素機能の観点より明らかにすることを旨とした。

(3) ppGppの植物生理学的機能を検証するため、タバコの形質転換系を用いて、テオフィリン誘導型のppGpp合成酵素発現システムを新たに構築し、人工的な緊縮制御因子の誘導がもたらす植物の生理学的変化について、光合成関連タンパク質の発現解析を中心として解明を進めた。

### 4. 研究成果

平成23年度は、確立したエンドウマメの単離葉緑体由来の試験管内タンパク質合成系を利用し、ppGppの翻訳への阻害的機能を証明し、論文および学会で報告した(Nomura等, *Plant Mol Biol*, 2011)。植物細胞には細胞質、葉緑体、ミトコンドリアと3カ所に異なるタンパク質合成システムが存在する。そのために、通常の細胞破壊により得られる抽出液では特定のタンパク質合成装置の機能解析は実施不可能である。従って、まず細胞より葉緑体のみを高度に精製し、この単離葉緑体の抽出液を利用することによりはじめて葉緑体内のタンパク質合成システムの解析が可能となる。これまでに葉緑体のタンパク質合成系の構築に成功した研究室は名古屋大学のタバコのシステムのみであったため、エンドウマメ葉緑体タンパク質合成系の構築は技術的にも高い達成度であると考えられる。エンドウマメを利用する葉緑体タンパク質合成系の試験管内再構成系は、予想を上回る安定な翻訳活性を示し、ppGppのタンパク質合成における作用点の一つが翻訳伸張サイクルであることを再現良く確認することができた。

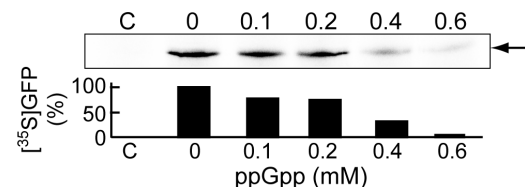


図1. ppGppは高濃度で葉緑体翻訳活性を阻害する。

さらに、従来植物個体での試験に留まってい

た幾つかの抗生物質が実際に葉緑体タンパク質合成系を抑制する事も明らかにし、環境中の抗生物質の作用に関して新たに科学的根拠に基づく情報を与える事ができた。一方、共同研究者との枯草菌を材料とするバクテリア緊縮制御の研究においても新しい発見をし、葉緑体にも保存されている YvyD というリボソーム結合タンパク質の寄与を世界に先駆けて明らかにした。

さらに立教大学と共同で、バクテリア緊縮制御機構における新規のシグナル物質の存在とその機能を明らかにすることに成功し、投稿論文が受理された (Tagami ら, MicrobiologyOpen)。この成果は、葉緑体内のシステムとも共通性を有する可能性が高く、今後のバクテリアおよび植物葉緑体における緊縮制御機能の解明に極めて重要な科学的発見と考えている。

平成24年度には(1) ppGpp による葉緑体翻訳活性の阻害様式の解明、(2) ppGpp 分解系系の機構解明、(3) リボスイッチシステムの導入によるバクテリアと真核生物における緊縮制御系増幅系の構築、の3項目の実施を計画していたが、これまでに項目(1)については ppGpp による植物葉緑体の翻訳活性阻害様式を明らかにして論文発表を完了した。項目(2)については、植物葉緑体 RSH1 タンパク質の ppGpp 分解酵素を生化学的解析により明らかにし、学会発表を行った。当初分解酵素と予想した RSH2 および RSH3 のタンパク質についても生化学的解析を進めたが、予想に反してこれらのタンパク質は ppGpp 合成活性のみを有し ppGpp 分解活性を持たないことを確認した。項目(3)については、葉緑体の起源であるラン藻をモデルとしたリボスイッチ構築に成功し、学会にて報告を行った。平成24年には、これらの成果に加え、新たな葉緑体 ppGpp 作用点として guanylate kinase を同定することに成功した。ラン藻より新規 ppGpp 分解酵素遺伝子を見出し、そのタンパク質を組換え大腸菌により合成、精製し、酵素機能解析を行った。その結果、既存の

Theophylline-dependent riboswitch system



図2 . テオフィリン ( theophylline ) は mRNA の構造を変化させて翻訳開始を誘導する。

ppGpp 合成・分解酵素の分解酵素ドメインのみからなる最小単位の酵素タンパク質であることが判明した。これらの成果についても学会発表を行った。

平成25年度には(1) 高等植物の葉緑体における ppGpp 標的分子として、新たに

guanylate kinase (GK) を同定し、論文発表を行った。また(2) テオフィリン誘導型リボスイッチ制御系をラン藻を宿主として構築し、これについても論文発表を完了した。

TABLE . Kinetic parameters of GKs

Enzyme	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$V_{max}$ ( $\mu M s^{-1}$ )	$K_m^{GMP}$ ( $\mu M$ )	$k_{cat}/K_m^{GMP}$ ( $s^{-1} mM^{-1}$ )	$K_i^{ppGpp}$ ( $\mu M$ )
<b>OsGKpm</b>	$23 \pm 2.0$	$2.3 \pm 0.2$	$73 \pm 12$	$317 \pm 26$	<b><math>2.8 \pm 0.2</math></b>
OsGKc	$70 \pm 3.0$	$7.0 \pm 0.3$	$202 \pm 12$	$344 \pm 10$	$>500$
EcGK	$209 \pm 12$	$2.1 \pm 0.1$	$156 \pm 20$	$1347 \pm 94$	$>500$
<b>BsGK</b>	$52 \pm 2.0$	$5.2 \pm 0.2$	$165 \pm 12$	$314 \pm 11$	<b><math>13 \pm 2.0</math></b>

Data are means  $\pm$  SD from three repeated experiments.

表1 . イネ葉緑体 GK (OsGKpm) の ppGpp 感受性をイネ細胞質 GK (OsGKc)、大腸菌および枯草菌の GK (EcGK および BsGK) と比較した結果を示す。

これらの成果は国内学会でも報告した。さらに、タバコ葉緑体ゲノムの相同組換えによりテオフィリン誘導型リボスイッチと枯草菌 ppGpp 合成酵素遺伝子 yjbM を利用した人工 ppGpp 合成系の構築を進め、複数の組換え体の選抜まで終了した。最終年度はさらに、好熱菌由来の ppGpp 分解酵素の X 線結晶構造解析も完了し、新たな触媒機構と考えられる結果を得た。また、枯草菌や葉緑体では ppGpp 標的となる GK の機能比較を進めた結果、維管束植物葉緑体の GK と異なり、ラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC6803 の GK では ppGpp 感受性が異なることを見出し、現在研究が進んでいるモデル生物のラン藻の GTP 生合成系については、単なる葉緑体のプロトタイプと見なすことはできないことを確認した。この結果は、維管束植物の葉緑体の進化が単純にラン藻様バクテリアの共生のみに起源を有するのではなく、共生過程でラン藻以外のバクテリア遺伝子が GTP 生合成系の構築に寄与した可能性をも示唆している。

## 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18件)

- Nomura Y, Nozawa A, Tozawa Y. Biochemical analysis of ppGpp effect on adenylosuccinate synthetases, key enzymes in purine biosynthesis. Biosci. Biotechnol. Biochem. 78:1022-1025 (2014) 査読有 doi: 10.1080/09168451.2014.910103.
- Nomura Y, Izumi A, Fukunaga Y, Kusumi K, Iba K, Wakanabe S, Nakahira Y, Weber APM, Nozawa A, Tozawa Y. Diversity in Guanosine 3',5'-Bisphosphate (ppGpp) Sensitivity Among Guanylate Kinases of Bacteria and Plants. J. Biol. Chem. 289:15631-15641 (2014) 査読有 doi: 10.1074/jbc.M113.534768.

Nakahire Y, Ogawa A, Asano H, Oyama T, Tozawa Y. Theophylline-dependent Riboswitch as a Novel Genetic Tool for Strict Regulation of Protein Expression in Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC7942. *Plant Cell Physiol.* 54:1724-1735 (2013) 査読有 doi: 10.1093/pcp/pct115.

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* 115-143 (2012) 査読有 doi: 10.1002/mbo3.16.

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 (2012) 査読有 doi: 10.1007/s11103-011-9858-x.

〔学会発表〕(計10件)

泉厚志、野村勇太、福永芳規、野澤彰、戸澤讓。最小ドメイン型 ppGpp 加水分解酵素 SAH の同定およびその機能構造解析。2014 年度日本農芸化学会。2014 年 3 月 30 日、英王プラザホテルおよび明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市)

野村勇太、泉厚志、福永芳規、楠見健介、射場厚、中平洋一、野澤彰、戸澤讓。植物葉緑体のプリンスクレオチド合成制御における ppGpp の役割。2014 年度日本農芸化学会。2014 年 3 月 28 日、英王プラザホテルおよび明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市)

野村勇太、泉厚志、福永芳規、楠見健介、射場厚、中平洋一、野澤彰、戸澤讓。植物葉緑体における ppGpp の主要標的はグアニル酸キナーゼである。第 55 回日本植物生理学会年会。2014 年 3 月 20 日、富山大学(富山県富山市)

野村勇太、楠見健介、戸澤讓。葉緑体局在型の ppGpp 標的候補分子の生化学的機能解析。日本植物生理学会。2013 年 03 月 22 日、岡山大学(岡山県岡山市)

中平洋一、小川敦司、浅野宏幸、小山時隆、戸澤讓。ラン藻のための新規遺伝子発現制御技術の開発。日本植物生理学会。2013 年 03 月 22 日、岡山大学(岡山県岡山市)

野村勇太、高津愛、戸澤讓。葉緑体の

ppGpp 分解酵素 RSH1 の機能解析。日本分子生物学会 2012 年 12 月 14 日、福岡国際会議場(福岡県博多市)

泉厚志、中平洋一、野村勇太、福永芳規、戸澤讓。バクテリアの最小ドメイン型 ppGpp 分解酵素の発見およびその機能構造解析。日本分子生物学会 2012 年 12 月 11 日、福岡国際会議場(福岡県博多市)

野村勇太、高林泰斗、戸澤讓。植物オルガネラ膜輸送体蛋白質の完全インビトロ合成・再構成系による機能解析。日本農芸化学会 2012 年度大会。2012 年 3 月 24 日、京都女子大学(京都府京都市)

Yuhta Nomura, Taito Takabayashi, Hiroshi Kuroda, Yasushi Yukawa, Kwanchanok Sattasuk, Mitsuru Akita, Akira Nozawa, Yuzuru Tozawa 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 22 日 松山全日空ホテル(愛媛県松山市)

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。2011 年 9 月 16 日 宮崎大学(宮崎県宮崎市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)  
取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸澤讓 (TOZAWA, Yuzuru)  
埼玉大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号: 90363267

(2) 研究分担者

小川 敦司 (OGAWA, Atsushi)  
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授  
研究者番号: 30442940