様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2006～2008
課題番号：18370023
研究課題名（和文）　トランジットペプチドを要しない色素体へのタンパク質輸送機構の解明

研究課題名（英文）　Study for mechanism of non-transit peptide protein transport system to plastids

研究代表者
榊原　均（SAKAKIBARA HITOSHI）
独立行政法人理化学研究所・生産機能研究グループ・グループディレクター
研究者番号：２０２４２８５２

研究成果の概要：
土壌細菌アグロバクテリウムのサイトカイニン（CK）合成酵素 Tmr は、トランジットペプチド領域を持たないにもかかわらず、宿主植物色素体内に局在し高活性の CK（ゼアチン）を合成する。本研究では Tmr タンパク質の色素体内への移行に関わる機構を部分的に明らかにした。また Tmr のイソ酵素である Tzs タンパク質の結晶構造を決定し、Tmr の色素体移行に必要な領域の絞り込みに成功した。さらに色素体内でゼアチンを合成することの生物学的な重要性を明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2006 年度	6,200,000	0	6,200,000
2007 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2008 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総　計	15,000,000	2,640,000	17,640,000

研究分野：植物分子生物・生理学
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：サイトカイニン、アグロバクテリウム、色素体、土壌微生物、タンパク質、植物

１．研究開始当初の背景

植物細胞内には色素体と呼ばれるオルガネラが存在する。色素体内に存在するタンパク質の大半は核ゲノムにコードされ、翻訳後に色素体内に輸送される。このような色素体タンパク質は、一般的にアミノ末端に付加配列（トランジットペプチド）を持つ前駆体として翻訳され、Toc-Tic 複合体と呼ばれる輸送装置を介して色素体内に運ばれる。

しかしアグロバクテリウム由来のサイトカイニン合成酵素 Tmr は、この一般則に当てはまらない。Tmr は *Agrobacterium tumefaciens* が持つ Ti-プラスミドの T-DNA 領域にコードされているが、Tmr はトランジットペプチド領域を持たないため、宿主植物細胞の色素体内に局在するとは考えられていなかった。しかし我々の研究により、Tmr は宿主植物の色素体ストロマ内に局在し、かつ色素体内で合成される HMBDP を基質としてゼアチン合成を行っていることが明らかに

なった。このことは外来遺伝子産物である Tmr タンパク質が宿主細胞の色素体内に移行する輸送システムが存在することを示している。さらに T-DNA 領域全体ではなく Tmr 遺伝子のみを植物に導入しても Tmr タンパク質は色素体内に移行されることから、Tmr タンパク質自身に植物細胞内での色素体移行システムにリクルートされる能力があると予想された。

２．研究の目的

本研究では、以下の２点を目的とした。

(1) Tmr タンパク質のプラスチド内への輸送機構の仕組みを明らかにする。

(2) Tmr が色素体内に移行する能力を獲得した生物学的な意義を明らかにする。

３．研究の方法

(1) Tmr タンパク質のプラスチド内への輸送機構の仕組みの解明

①試験管内での転写翻訳系を利用し、Toc-Tic 系による Tmr タンパク質の葉緑体内移行能力を検定する。

②膜輸送系の変異体を用いて Tmr の色素体移行への影響を調べることで、Toc-Tic 系以外のシステムによる輸送の関与について検討する。

③色素体移行能力に関わる Tmr の高次構造的特徴を明らかにするため、イソ酵素である Tzs の結晶構造を決定する。Tmr と Tzs のキメラタンパク質の色素体への移行能力を検定することで、移行に必要な領域と、そのタンパク質分子上における立体的な配置を明らかにする。

(2) Tmr の色素体移行能力獲得の生物学的な意義

①色素体移行能力を持つアグロバクテリウムの Tmr、色素体移行能力を持たない Tzs、および、色素体移行能力を持つシロイヌナズナの AtIPT1 について基質特異性等の生化学的特徴付けを行なう。

②アグロバクテリウムの Ti-プラスミド上の Tmr 遺伝子を相同組換え法により Tzs, AtIPT1 に置換した、組換えアグロバクテリウムを作出し、バラおよびコダカラベンケイに接種する。それぞれの腫瘍形成とホルモン蓄積様式を解析することで、サイトカイニン合成の場と生産されるサイトカイニンの分子種の違いが腫瘍形成に及ぼす影響を調べる。

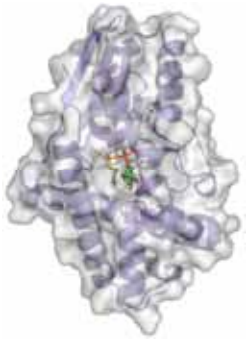
４．研究成果

(1) Tmr タンパク質のプラスチド内への輸送機構の仕組みの解明

①葉緑体移行効率が高いフェレドキシン(Fd)、グルタミン合成酵素(GS)の試験管内での転写・翻訳系を構築し、Tmr とともにそれらの葉緑体移行効率を複数回にわたり比較したところ、Fd, GS の葉緑体内への移行は認められたのに対し、Tmr では全く認められず、Tmr 通常の Toc-Tic 系を介して輸送されるタンパク質とは異なる経路を介する可能性が示唆された。もしくは Toc-Tic 系によって輸送されるものの、宿主植物側の別のコンポーネントが必要である可能性も考えられた。

②Tmr-GFP 融合タンパク質を CaMV プロモーター制御下で一過的に発現させる系を構築し、膜輸送系に異常をきたす変異体シロイヌナズナ表皮細胞に導入し、GFP 蛍光の局在パターンを解析した。その結果、変異体内で GFP 蛍光は葉緑体内にほとんど認められなかった。しかし、葉緑体自体の形態にも大きな異常が見られた。以上のことは Tmr が Toc-Tic 経路ではなく膜輸送系を介して色素体に輸送されることを示唆しているものの、変異体の二次的な影響により、Toc-Tic 系によるタンパク質の輸送効率の低下の可能性も考えられた。

③*Agrobacterium tumefaciens* の Ti-plasmid 上にコードされる Tzs についてその構造を決定し、生合成反応が SN2 求核置換反応によるものであることを明らかにした。Tzs を対象タンパク質としたのは Tmr の大量精製が極めて困難だったからである。



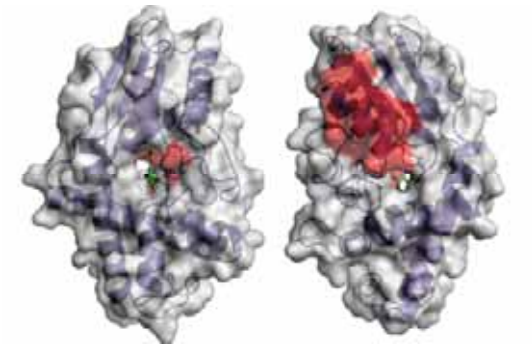
Tzs の結晶構造

高等植物型 IPT と土壌細菌型 IPT 間での基質特異性の違いの決定に関わるアミノ酸残基を同定した。これらの残基は活性中心付近に集中しており、プラスチド移行能力との関連は低いものと推察された。

Tmr/Tzs 間での広い領域を置換したキメラタンパク質を作製し、一過的発現系を用いて色素体への移行能力の有無を検討した。

キメラタンパク質を用いた色素体への移行能力の検定

葉緑体移行が確認されている Tmr と、同じく土壌微生物の IPT でありながらも葉緑体移行能力を持たない Tzs のキメラタンパク質を多種類作成し、それらの GFP 融合タンパク質をパーティクルガン法により植物細胞内で一過的に発現させることにより、Tmr の葉緑体移行に必要な領域の絞り込みを行った。その結果、Tmr タンパク質のアミノ末端から 12 番目から 36 番目のアミノ酸領域に葉緑体移行に必要なアミノ酸残基もしくはその高次構造が存在することが明らかとなった。Tzs の結晶構造をもとに絞り込み領域のタンパク質分子上での分布を調べたところ、この領域のは基質結合領域である P-ループの一部を含み、タンパク質表面に露出している残基もあった（下図、赤色領域）。この領域がタンパク質の葉緑体への移行の認識に関わっているものと予想された。



色素体への移行に関わる領域（赤色）

Enzyme	Substrate	*Km* (μM)	*Kcat/Km*
Tmr	DMAPP HMBDP	10.1 ± 0.5 13.6 ± 2.5	1.7×10^5 2.0×10^4
Tzs	DMAPP HMBDP	7.9 ± 0.6 8.2 ± 0.4	4.1×10^5 1.8×10^5
AtIPT1	DMAPP HMBDP	8.3 ± 0.6 ND	

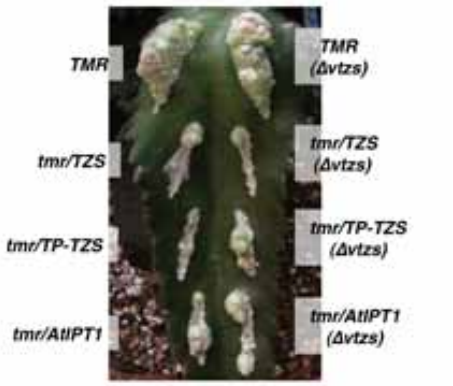
Tmr, Tzs, AtIPT1 の酵素学的特性比較

(2) Tmr の色素体移行能力獲得の生物学的な意義

①アグロバクテリウムの Tmr、Tzs、および、シロイヌナズナの AtIPT1（色素体局在型）について基質特異性等の生化学的特徴付けを行ない、Tmr, Tzs はともに DMAPP に加え HMBDP も同等の親和性で基質として利用できることを明らかにした。

②アグロバクテリウムの Ti-プラスミド上の Tmr 遺伝子を相同組換え法により Tzs, AtIPT1 に置換した、組換えアグロバクテリウムを作出し、バラおよびコダカラベンケイに接種し、それぞれの腫瘍形成とホルモン蓄積様式を解析した。その結果、Tmr を Tzs に置換した *Agrobacterium* 変異体の感染では、イソペンテニル型のサイトカイニン蓄積が起こったが、ゼアチン型サイトカイニンはほとんど蓄積せず、腫瘍形成もほとんど起こらなかった。一方、AtIPT1 に置換したものはイソペンテニル型サイトカイニンの顕著な蓄積がみられたと同時に、腫瘍も形成された。野生型 *Agrobacterium* ではゼアチン型のサイトカイニンが蓄積し、かつ腫瘍が形成された。

Tmr と Tzs はサイトカイニン生合成に関する酵素学的性質はほとんど変わらないことから、Tmr の色素体移行能力と、色素体内での優先的な HMBDP 利用によるゼアチンの生合成が効率の良い腫瘍形成に重要であることが示唆された。また、AtIPT1 ではイソペンテニル型サイトカイニンを蓄積したものの腫瘍形成が起こったことから色素体内でのサイトカイニン合成が腫瘍形成に重要であることが示唆された。



変異体アグロバクテリウムの腫瘍形成検定

本研究により、Tmr タンパク質の色素体への輸送システムと、色素体局在の生物学的重要性の一端を明らかにできたと考えている。今後は Tmr タンパク質の色素体移行に関わる輸送システムの更なる解析に加え、色素体内で Tmr が HMBDP を優先的に利用できる仕組み等を明らかにしていく必要があると考えている。

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７件）

① Kamada-Nobusada, T. and Sakakibara, H. (2009) Molecular basis for cytokinin biosynthesis. *Phytochemistry* 70: 444-449. 査読有

② 黒羽剛、榊原均 (2008) サイトカイニンの生合成と情報伝達 *遺伝* Vol. 62, pp24-29. 査読無

③ Sugawara, H., Ueda, N., Kojima, M., Makita, N., Yamaya, T. and Sakakibara, H. (2008) Structural insight into the reaction mechanism and evolution of cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 2734-2739. 査読有

④ Hirose, N., Takei, K., Kuroha, T., Kamada-Nobusada, T., Hayashi, H. and Sakakibara, H. (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J. Exp. Bot.* 59: 75-83. 査読有

⑤ 榊原均、経塚淳子 (2007) サイトカイニンの生合成と新規活性化経路 *蛋白質核酸酵素* Vol. 52, pp1322-1329. 査読無

⑥ Sakakibara, H., Takei, K., and Hirose, N. (2006) Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development. *Trends in Plant Science* 11: 440-448. 査読有

⑦ Sakakibara, H. (2006) Cytokinins: Activity, biosynthesis and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 431-449. 査読有

〔学会発表〕（計５件）

① 上田 七重，小嶋美紀子，鈴木克周，榊原均，(2009) クラウンゴール形成時におけるプラスチド内でのゼアチン型サイトカイニンの直接合成の重要性，第 50 回日本植物生理学会年会，名古屋，3 月 23 日

② 榊原 均，上田 七重，菅原 肇 (2009) イソペンテニルトランスフェラーゼの構造解析－サイトカイニン生合成の構造的基盤－，第50回日本植物生理学会年会，名古屋，3 月 21 日

③ 上田 七重，菅原 肇，槇田 庸絵，小嶋美紀子，山谷 知行，榊原 均 (2008) サイトカイニン合成酵素の立体構造を基にした分子進化と基質特異性の解析，第 49 回日本植物生理学会年会，札幌，3 月 22 日

④ Sakakibara, H. (2007) Regulation of cytokinin metabolism: a new insight into the hormone function. 19th International Conference on Plant Growth Substances (International Plant Growth Substance Association), Puerto Vallarta, Mexico, July 22.

⑤ 榊原均、武井兼太郎、信定知江、上田七重 (2006) 植物のサイトカイニン生合成におけるプラスチドの役割，日本分子生物学会 2006 フォーラム,名古屋，12 月 8 日

〔その他〕

ホームページ
http://labs.psc.riken.jp/brt/

６．研究組織

(1)研究代表者

榊原　均（SAKAKIBARA HITOSHI）
独立行政法人理化学研究所・生産機能研究グループ・グループディレクター
研究者番号：20242852

(2)研究協力者

上田　七重（UEDA NANAE）
独立行政法人理化学研究所・生産制御研究チーム・テクニカルスタッフ