

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22570045

研究課題名(和文)バクテリア型色素体RNA結合因子による葉緑体分化制御機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of bacterial-type plastidial RNA binding protein required for chloroplast development

研究代表者

楠見 健介(Kusumi, Kensuke)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00304725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：低温下の葉緑体形成に必須の色素体RNA結合タンパク質NUS1について、イネ、シロイヌナズナの機能欠失株を用いて、機能解析を行った。in vitro RNA-タンパク質結合実験から、16S rRNAの5'上流隣接領域の転写開始点付近に対応するRNAに高い結合活性を示した。組織中にも同領域のRNAが存在することを確認した。native pageの結果、NUS1は約110kDa程度の複合体を形成していることが分かった。NUS1と同様に大腸菌NusB様の領域(NUSドメイン)を持つNUS2は、発現の組織特異性や、機能欠失株の表現型から、NUS1とは異なる機能を持つ事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：NUS1 protein is plastidial RNA binding protein essential for chloroplast biogenesis under low temperature. NUS1 is structurally similar to the bacterial protein NusB required for rRNA expression. NUS1 protein accumulated abundantly in the pre-emerged immature leaf whereas it disappeared in the mature leaf. NUS1 has a molecular weight of 30 kDa, and the BN-PAGE analyses showed that NUS1 was involved in the ~110kDa protein complex. Mobility gel shift assays indicated that NUS1 protein bound to 5' precursor region of chloroplast 16S rRNA. NUS1-deficient mutant showed severe leaf chlorosis at low temperature. In the chlorotic leaves of the mutant seedling, maturation of chloroplast rRNA was impaired and the chloroplast translation/transcription capacity was severely suppressed, suggesting that NUS1 has important roles in the regulation of chloroplast genetic system during early leaf development in rice.

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：色素体機能 光合成 転写装置 翻訳装置 RNA結合タンパク質 rRNA 葉緑体分化

### 1. 研究開始当初の背景

高等植物の色素体は組織や細胞の分化に応じて葉緑体やアミロプラストなどの各色素体タイプへ構造・機能を大きく変化させる。その際、色素体の構造変化に先立ち、転写・翻訳装置を始め色素体内の遺伝子発現装置の構成が大きく変化し、それにより多くの色素体遺伝子が色素体の機能に応じた発現制御を受ける。しかしそれらの制御因子やメカニズムの実体はよく分かっていない。イネは、葉の発生と出葉のタイミングに規則性があり、葉緑体分化の段階的な観察に向けた研究材料である。申請者はこれまでにイネを用いて、葉緑体の転写・翻訳装置が P4 と呼ばれる葉が抽出を開始する前の初期ステージに集中的に構築されることを明らかにした。また、イネの温度感受性葉緑体形成不全突然変異株 *virescent* の解析から、その原因遺伝子が色素体遺伝子発現装置の発現を P4 ステージにおいて特異的に統御していることを明らかにした。原因遺伝子の解析により、本研究の研究対象である *Virescent-1 (V<sub>1</sub>)* 遺伝子は、新規の葉緑体局在性タンパク質 (NUS1 と命名) をコードする事が分かった。これまでの解析から、NUS1 タンパク質は、C 末端側にバクテリアの転写終結装置 NUS のサブユニットである NusB の機能ドメイン (NUS ドメイン) と極めて相同性の高い領域を持ち、NusB と同様、16S rRNA をコードする色素体 *rrn* RNA の 5' 端領域に結合する。また、タンパク質複合体 (P-NUS と命名) を形成すると考えられる。NUS1 タンパク質は分化初期の葉緑体を含む P4 ステージ初期の若い葉組織でのみ蓄積し、成熟葉では消失することから、rRNA の発現を通じてこの時期の色素体遺伝子発現装置に重要な役割を持つことが予想される。また、NUS1 同様 NUS ドメインを持つタンパク質がもう一つ存在する (NUS2)。NUS2 は遺伝子の構成や、NUS ドメインの位置が NUS1 と異なるが、NUS1 同様葉緑体に局在し、RNA 結合能を持つこと、地上部の緑色組織で発現が高いこと、NUS1、NUS2 以外に NUS ドメインを持つ植物のタンパク質は現時点では他に見つかっていないことなどから、色素体内で NUS1 と相補的な役割を持つ可能性が高い。

### 2. 研究の目的

本研究では、色素体 RNA 結合タンパク質 NUS1、NUS2 と、それらを含むタンパク質複合体 P-NUS の解析を通じて、色素体の機能分化に関わる色素体遺伝子発現システム制御の分子メカニズムを明らかにする。そのために、NUS1、NUS2 が結合する葉緑体 RNA のシス領域の同定と、P-NUS の構成タンパク質の同定を主目的とする。これらの解析にあたっては、これまで用いてきたイネに加え、遺伝子操作と栽培が容易なシロイヌナズナを材料として併用する。

### 3. 研究の方法

以下の 3 つの研究計画を重点的に推進する。  
(1) P-NUS タンパク質複合体の構成タンパク質の同定・機能解析

抗 NUS1 抗体とイネ P4 ステージ葉から抽出したタンパク質を用いた免疫沈降もしくは、抗体カラムを用いた精製法で、NUS1 タンパク質と相互作用する特異的会合因子を単離する。二次元電気泳動により野生株と *v<sub>1</sub>* 変異株を用いて共沈したタンパク質の比較を行い、NUS1 と結合するタンパク質の候補をスクリーニングする。P4 ステージ葉からの葉緑体収量を上げるため、計画開始までにイネからの組織サンプル抽出法を改変する。これらがうまくいかなかった場合に備え、エピトープタグを付加した AtNUS1 タンパク質を発現する形質転換シロイヌナズナを作製する。既に AtNUS1 遺伝子の T-DNA タグ挿入変異株を入手し、イネ *v<sub>1</sub>* 変異株同様、クロロシス表現型を呈することを確認している。この系統を母株に AtNUS1 に GST タグおよび myc タグを付加したキメラ遺伝子をアグロバクテリウム法で導入する。表現型が復帰するものから遺伝子の発現を確認し、抗タグ抗体によりタンパク質検出ができる個体を選抜する。

(2) NUS1、NUS2 タンパク質が結合する葉緑体 RNA のシス領域の探索

バクテリアの NUSB タンパク質は *rrn* オペロンの mRNA の 5' UTR 領域を認識し結合することが知られている。申請者は RNA-Protein ゲルシフトアッセイにより NUS1 タンパク質が葉緑体の *rrn* mRNA の 5' UTR 領域に結合することを確認している。そこで、既に NUS1 タンパク質の結合が確認されている葉緑体 *rrn* mRNA の 5' 上流領域について、結合領域の同定を進める。

また、一次配列から NUS1 以外に NUSB ドメインを持つと推定される遺伝子 NUS2 は遺伝子の構成や、NUS ドメインの位置が NUS1 と異なるが、NUS1 同様葉緑体に局在し、RNA 結合能を持つこと、地上部の緑色組織で発現が高いこと、NUS1、NUS2 以外に NUS ドメインを持つ植物の遺伝子は現時点では他に見つかっていないことなどから、色素体内で NUS1 と相補的な役割を持っている可能性がある。NUS1 との機能比較に重点を置き、遺伝的解析が容易なシロイヌナズナを主材料に、発現部位の詳細、結合する RNA シス領域を検証する。

(3) *rrn* オペロンの発現と葉緑体 rRNA の成熟化における NUS1、P-NUS の作用同定

バクテリアの NusB タンパク質および NUS タンパク質複合体は、*rrn* オペロンの依存型転写終結因子である。現時点で植物の因子は見つかっていないが、一方で NUS1 タンパク質の *rrn* 5' UTR への結合や、*v<sub>1</sub>* 変異株において rRNA の成熟化が異常になることは、NUS1 と P-NUS が *rrn* オペロン上の遺伝子発現調節に関与することを示唆する。本研究では、*rrn* mRNA 全体をカバーする断片化プローブを用いて、*rrn* mRNA の共転写 プロセッシングのパターンを葉の発生段階を追ってモニターする。当初は葉の発生段階を観察しやすいイネを材料として実験をスタートし、特に NUS1 が豊富に蓄積する P4 前期から後期にかけて

の *rrn* mRNA のバリエーションと蓄積量の変化を調べ、野生株と *v1* 変異株の間で比較する。

#### 4. 研究成果

##### (1) P-NUS タンパク質複合体の構成タンパク質の同定・機能解析

まず、P-NUS 単離に先立ち、NUS1 が最も蓄積する葉の発生段階及び組織の絞り込みを行った。イネについては、P4 ステージに相当する第3葉完全展開時の第4葉の大きさ、および栽培条件を細かく変え、NUS1 タンパク質の蓄積量を検討した結果、4cm の P4 ステージ葉が NUS1 の蓄積と組織調製の容易性から最も実験に適していると結論づけた。シロイヌナズナについても同様の検討を行い、春化解除後、標準生育温度である 23 °C で3日栽培後、10-14日生育した地上部を用いると、NUS1 の発現、蓄積が高い組織サンプルを得られることが分かった。これらの組織からの抽出サンプルを用いて、Blue-Native PAGE/SDS-PAGE による二次元電気泳動展開により、抗 NUS1 抗体を用いて約 110kDa のスポットを検出することができた。このスポットは NUS1 欠失株では消失するため、P-NUS であると考えられる。しかし、これらの組織サンプルと抗 NUS1 抗体を用いた免疫沈降実験を行ったが、イネ、シロイヌナズナ共に、NUS1 と会合する因子は回収できなかった。非特異的な結合タンパク質が多く回収され、これらが検出を阻害している可能性があることから、次に cMyc-FLAG エピトープタグを NUS1 の C 末端に結合したキメラタンパク質を発現する形質転換体を作製した。研究計画では GST タグを用いる予定だったが、NUS1 タンパク質の機能への影響を考慮し、分子量がより小さい FLAG タグを用いた。シロイヌナズナとイネの両方に 35S の下流に上記のキメラタンパク質遺伝子を接続した遺伝子コンストラクトを導入し、NUS1 欠失株の表現型が復帰する植物体をスクリーニングし、抗 FLAG、cMyc 抗体でキメラタンパク質を検出することができた。NUS1 欠失株の表現型が復帰することから、これらのキメラタンパク質は組織中で NUS1 として正常に機能していると考えられる。

##### (2) NUS1、NUS2 タンパク質が結合する葉緑体 RNA のシス領域の探索

双子葉のモデル植物であるシロイヌナズナを用いて、NUS1 オルソログである AtNUS1 および NusB ドメインを持つもう1つのタンパク質 AtNUS2 の機能解析を行った。その結果 AtNUS1 は、OsNUS1 と同様に Build-Up ステージで特異的に発現し、低温環境により発現が誘導されることが分かった。また、AtNUS1 ノックアウト株においても低温生育により葉がクロロシスを起こし、葉緑体 rRNA の発現量の低下が見られた。高等植物の *rrn* オペロンの 5' 上流領域には、3つの転写開始点、PC、P1、P2があると報告されており、それら

の配列は高度に保存されているが、植物によりそれらの利用パターンは異なる。シロイヌナズナの場合、PC は *rrn16* の約 140 塩基上流、P1 は約 110 塩基上流、P2 は約 60 塩基上流に位置する。また、AtNUS1 は rRNA 前駆体の PC 転写開始点付近への強い結合能を持つことが分かった。これらの結果から、AtNUS1 は低温ストレス下における葉緑体 rRNA の発現の保全に重要な役割を持つ可能性が考えられる。一方、AtNUS2 は発現の組織特異性や、AtNUS2 ノックアウト株の表現型などが異なることから、葉緑体分化に関わる AtNUS1 とは異なる機能を持つと考えられる。

これらの結果を踏まえ、イネの NUS1 についても、*rrn* オペロンの 5' 上流領域を対象に RNA 結合実験を行った。葉緑体 *rrn* オペロンの 5' 上流領域を 60bp 前後の重複する 7つのサブ領域に分け、それぞれに対する <sup>32</sup>P-UTP でラベルした合成 RNA プローブを作製し、リコンビナント NUS1 タンパク質と *in vitro* での結合実験を行い、スロットプロットング後放射線シグナルを IP イメージャーで検出し、結合強度を数値化した。その結果、PC 転写開始点付近の RNA 結合活性を 1 としたとき、*trnV* 直下流は約 1.3、*rrn16* 隣接領域は約 1.2 と結合活性が高く、その他の領域は RNA 結合活性が低いことが分かった。

##### (3) *rrn* オペロンの発現と葉緑体 rRNA の成熟化における NUS1、P-NUS の作用同定

NUS1 の結合領域を含む *rrn* オペロンの 5' 上流領域について、同領域に対応する RNA が組織中に実際に存在するのか、また、それらの蓄積に対する生育温度や NUS1 の有無による影響を qRT-PCR によって調べた。*trnV* 上流から *rrn16* 下流までを 10 の領域に分け、各領域の RNA 量を qRT-PCR により定量した。解析試料として、野生株と NUS1 を欠失した *v1* 変異株をそれぞれ 20、30 の生育環境下で第3葉完全展開まで栽培し、NUS1 が多く蓄積する第3葉葉鞘内の第4葉から抽出した RNA から合成した cDNA を用いた。葉が正常に緑化し、野生株とほとんど表現型が変わらない 30 においては、NUS1 が結合する *rrn* オペロン 5' リーダー領域の RNA は、上流のコーディング領域である *trnV* に対応する RNA と同程度だった。このことは、転写開始点上流の領域に対応する RNA が存在していることを示しており、既知の転写開始点よりも上流からの転写、おそらくは *trnV* からの読み越し転写が *rrn* オペロンの発現につながっている可能性を示す。更に、5' リーダー領域の中でも、NUS1 が強い結合活性を示す *rrn* オペロンの PC 転写開始点付近に対応する RNA が他の領域に比べて多く蓄積していた。また、PC 転写開始点下流は、上流に比べ、対応する RNA 量が非常に多く、成熟 16S rRNA に対応する RNA はプレ rRNA にのみ存在する RNA よりも多く蓄積していた。一方、葉がクロロシスを起こす 20 の生育条件下の RNA 蓄積量は、30 と

比べて全体的に減少した。特に、転写開始点下流の RNA 蓄積量は 1/10 以下に大きく減少していた。30、20 生育の野生株、および 20 生育の  $v_1$  変異株の間で各領域の RNA 蓄積量を比較したところ、RNA 蓄積量を比較すると、成熟 16S rRNA に相当する領域で、野生株 30 > 野生株 20 >  $v_1$  20 の順で RNA 蓄積量が顕著に低下しており、NUS1 の欠失が低温生育条件下における rRNA の発現抑制を助長することが裏付けられた。

(4) 得られた成果の位置づけ、今後の展望  
本研究計画の動機となった、植物の低温感受性と葉緑体機能の関連については、その後多くの論文が出ており、トピックの一つとなっている。また、色素体 rRNA の発現に関与する因子がいくつか報告されたが、低温環境における rRNA と色素体遺伝子発現装置の保全機構は未だに明らかになっていない。transcriptionally active chromosome (TAC) を初め、色素体の転写・翻訳調節に関与する多くのタンパク質複合体が単離、同定されているが、NUS1 (NUS2) に関連するものは未報告である。これらのことから、NUS1 の新規性と重要性は変わっていないと考えられる。今後も本研究で積み残した NUS1 の会合因子の探索を行い、NUS1 が関わる葉緑体分化初期の遺伝子発現制御装置の解明を続ける予定である。

## 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9件)

Nomura, Y., Izumi, A., Fukunaga, Y., Kusumi, K., Iba, K., Watanabe, S., Nakahira, Y., Weber, A.P., Nozawa, A., and Tozawa, Y. (2014). Diversity in Guanosine 3',5'-Bisdiphosphate (ppGpp) Sensitivity Among Guanylate Kinases of Bacteria and Plants. *J. Biol. Chem.*, doi:10.1074/jbc.M1113.534768. (査読有り)

Kusumi, K., and Iba, K. (2014). Regulation of the chloroplast genetic system during early leaf development in rice. *Front Plant Sci. in press.* (査読有り)

Negi, J., Hashimoto-Sugimoto, M., Kusumi, K., and Iba, K. (2013). New Approaches to the Biology of Stomatal Guard Cells. *Plant Cell Physiol.* 55: 241-250. doi: 10.1093/pcp/pct145 (査読有り)

Negi, J., Moriwaki, K., Konishi, M., Yokoyama, R., Nakano, T., Kusumi, K., Hashimoto-Sugimoto, M., Schroeder, J.I., Nishitani, K., Yanagisawa, S., and Iba, K. (2013). A Dof Transcription Factor, SCAP1, Is Essential for the Development of Functional Stomata in Arabidopsis. *Current biology : CB* 23, 479-484. doi: 10.1016/j.cub.2013.02.001 (査読有り)

Kusumi, K., Measuring Stomatal Density in Rice. (2013) *Bio-Protocol.* (<http://www.bio-protocol.org/wenzhang.aspx?id=753>) (査読有り)

Sakamoto, H., Sakata, K., Kusumi, K., Kojima, M., Sakakibara, H., and Iba, K. (2012). Interaction between a plasma membrane-localized ankyrin-repeat protein ITN1 and a nuclear protein RTV1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 423, 392-397. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.05.136 (査読有り)

Kusumi, K., Hirotsuka, S., Kumamaru, T., and Iba, K. (2012). Increased leaf photosynthesis caused by elevated stomatal conductance in a rice mutant deficient in SLAC1, a guard cell anion channel protein. *J. Exp. Bot.* 63, 5635-5644. doi: 10.1093/jxb/ers216 (査読有り)

Kusumi, K., Sakata, C., Nakamura, T., Kawasaki, S., Yoshimura, A., and Iba, K. (2011). A plastid protein NUS1 is essential for build-up of the genetic system for early chloroplast development under cold stress conditions. *Plant J.* 68, 1039-1050. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04755.x (査読有り)

Monda, K., Negi, J., Iio, A., Kusumi, K., Kojima, M., Hashimoto, M., Sakakibara, H., and Iba, K. (2011). Environmental regulation of stomatal response in the Arabidopsis Cvi-0 ecotype. *Planta* 234, 555-563. doi: 10.1007/s00425-011-1424-x (査読有り)

[学会発表](計19件)

江原涼美、射場厚、楠見健介、葉の発生初期に特異的に働く葉緑体転写制御因子 NUS1 の解析、九州沖縄植物学会(第64回) 2014.5.25. 琉球大学(沖縄)

楠見健介、橋村綾菜、射場厚、イネの気孔閉鎖因子 SLAC1 の生育段階依存性、九州沖縄植物学会(第64回)2014.5.25. 琉球大学(沖縄)

楠見健介、橋村綾菜、射場厚、イネの気孔閉鎖因子 SLAC1 の機能の生育段階依存性、日本植物生理学会第55 会年會,2014.03.19. 富山大学(富山)

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、戸澤謙、植物葉緑体における ppGpp の主要標的分子はグアニル酸キナーゼである、日本植物生理学会第55 会年會,2014.03.19. 富山大学(富山)

裯宜淳太郎、楠見健介、宗正晋太郎、藤田麻友美、Julian Schroeder、射場厚、順遺伝子学的手法を用いた孔辺細胞特異的葉緑体機能の解析、日本植物生理学会第55 会年會,2014.03.19. 富山大学(富山)

楠見健介、射場厚、気孔閉鎖因子 SLAC1 を機能欠失したイネ突然変異株 slac1 の解析、日本植物生理学会第54 回年會,2013.03.22 岡山大学(岡山)

楠見健介, イネ *slac1* 変異株の解析, Annual FACE Meeting, 2013.03.05. 農業環境技術研究所 (筑波)

楠見 健介、堤 彩奈、射場 厚 高等植物の葉緑体機能と葉の分化制御機構, 九州沖縄植物学会例会, 2012.12.08. 熊本大学 (熊本)

楠見 健介、堤 彩奈、射場 厚, 低温ストレス下において葉緑体 rRNA の発現維持に関わる RNA 結合蛋白質 NUS1 の解析, 日本植物学会九州支部 (第 62 回), 2012.05.19. 佐賀大学 (佐賀)

楠見健介, 堤彩奈, 射場厚, 色素体 RNA 結合タンパク質 NUS1 は低温ストレス下における葉緑体転写・翻訳装置の発現維持に必須である, 第 53 回日本植物生理学会年会, 2012.03.17. 京都産業大学 (京都)

堤 彩奈、楠見 健介、射場 厚, 原核型 RNA 結合領域を持つ葉緑体タンパク質 NUS1 の解析, 九州 RNA クラブ, 2011.10.18. 熊本大学 (熊本)

楠見健介、廣塚祥子、熊丸敏博、射場厚, 気孔が常時開口するイネ突然変異株 *oss1ac1* の解析, 日本植物学会第 75 回大会, 2011.09.18. 東京大学 (東京)

坂本光、楠見健介、坂田桂子、小栗秀、射場厚, 塩ストレス応答性タンパク質 ITN1 と転写因子様タンパク質 RTV1 の相互作用に関する解析, 日本植物細胞分子生物学会大会, 2011.09.06. 九州大学 (福岡)

楠見健介、廣塚祥子、射場厚, 気孔閉鎖因子 SLAC1 を機能抑制したイネ突然変異株の解析, 日本植物学会九州支部 (第 61 回大会), 2010.05.22. 長崎大学 (長崎)

楠見健介、廣塚祥子、射場厚, 気孔閉鎖因子 SLAC1 を機能欠失したイネ突然変異株の単離と解析, 第 52 回日本植物生理学会年会, 2011.03.22. 東北大学 (仙台)

廣塚祥子、楠見健介、射場厚, 発生初期ステージのイネの葉における C/N バランス制御と葉緑体分化の寄与, 日本植物学会第 74 回大会, 2010.09.10. 中部大学 (名古屋)

溝山泰徳、楠見健介、射場厚, バクテリア型 RNA 結合領域を持つ葉緑体タンパク質 NUS の解析, 日本植物学会第 74 回大会, 2010.09.10. 中部大学 (名古屋)

楠見健介、坂田知佳子、溝山泰徳、射場厚, 葉緑体分化初期過程を制御する新規色素体 RNA 結合タンパク質 NUS1 の解析., 日本植物学会九州支部 (第 60 回大会), 2010.05.22. 九州大学 (福岡)

楠見健介、坂田知佳子、溝山泰徳、射場厚, 葉緑体分化初期過程を制御する色素体 RNA 結合タンパク質 NUS1 の解析., 第 51 回日本植物生理学会年会, 2010.03.20. 熊本大学 (熊本)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://plant.biology.kyushu-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楠見 健介 (Kusumi, Kensuke)

九州大学・大学院 理学研究院・助教

研究者番号: 00304725

(2) 研究分担者: なし

(3) 連携研究者: なし