

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24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22710188

研究課題名（和文） ホモタグラインを用いたストレス環境下での光合成変異体の単離と機能解析

研究課題名（英文） Gene Discovery for chloroplast proteins involved in stress response and photosynthesis in Arabidopsis using the homozygous knockout lines.

研究代表者

明賀 史純 (MYOUGA FUMIYOSHI)

独立行政法人理化学研究所・機能開発研究グループ・研究員

研究者番号：10342859

研究成果の概要（和文）：

本研究は葉緑体タンパク質を破壊した約1,300ラインのホモ挿入植物体を用いて、環境ストレスを与えた時の感受性が異常になる変異体とクロロフィル蛍光を測定した時の光合成機能が異常になる変異体との単離を目指したものである。ホモ挿入体を様々なストレススクリーニングを行った結果、6つの感受性が異常な変異体を単離した。その内既知の遺伝子を除く2つの遺伝子に関して詳細な機能解析を行った。変異体アレルによる表現型の再現性確認と変異体への遺伝子導入による相補性試験とを行い原因遺伝子を確定した。さらに形質転換体の作製により発現組織と細胞内局在を明らかにした。本研究により環境ストレスに関わる重要な葉緑体タンパク質を同定し、その機能を分子レベルで明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We have collected about 1,300 homozygous *Ds* or T-DNA tagged-lines without a visible phenotype for genes encoding chloroplast proteins in *Arabidopsis*. By means of biochemical measurements of these homozygous plants grown on agar plates containing various reagents, we have identified 6 mutants with different capabilities to survive under severe stress conditions. Most of them showed abnormal responses to paraquat that generate superoxide radicals which damage cell membrane and cytoplasm during photosynthesis. Moreover, by screening of chlorophyll-fluorescence images, we also identified 13 photosynthetic mutants with altered photosynthetic-fluorescence parameters. Judging from both screening results, our systematic collection of homozygous mutants is a powerful tool for the screening of chloroplast mutants with abnormal stress responses and could be proved to be an advantage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,600,000	480,000	2,080,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：葉緑体、プラスチド、変異体、タグライン、ホモライン、環境ストレス、クロロフィル蛍光、シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

我々はシロイヌナズナ全 ORF 約 27,000 の中から、葉緑体への移行に必要なトランジットペプチドを持つタンパク質（葉緑体タンパク質）をコードする 2,090 の遺伝子を予想し、これにトランスポゾンまたは T-DNA が挿入したタグライン 3,286 ラインを網羅的に収集した。これらのタグラインは、選択培地中での発芽率の観察、表現型の観察、PCR によるホモ・ヘテロの選抜、により変異体の表現型のカタログ化とホモライン化を行った。その結果、葉緑体を破壊したタグラインの約 8 割（1,290 ライン）はホモ挿入体が得られたが、約 1 割（111 ライン）は異常な表現型を示す変異体と、約 1 割（122 ライン）はホモ挿入体を得られない致死変異体が存在することを明らかにした。収集した変異体の遺伝子情報や表現型情報は、「The Chloroplast Function Database」を作成し、ウェブ上で一般に公開した (<http://rarge.psc.riken.jp/chloroplast/>)。このデータベースは、AGI Locus ID・ライン番号・タンパク機能・表現型カテゴリーで変異体が検索可能である。また、ホモ化挿入体コレクションは葉緑体機能を調べるためのスクリーニングのツールとして強力で有用なリソースである。通常条件下で見た目に異常が見られない変異体の中にも、ある条件下では葉緑体機能、特に光合成機能の異常として可視化することができる。このため、この葉緑体蛋白質を破壊した変異体リソースを使ったスクリーニングは、大変有効である。

2. 研究の目的

葉緑体タンパク質を破壊した約 1,300 ラインのホモ挿入体を用いて、強光・高温及び乾燥の環境ストレスを与えた時のクロロフィル蛍光を測定し、光合成機能が異常になる植物体の単離を目指す。クロロフィル蛍光測定による光合成パラメーターは、個体差が大きいためスクリーニングにより変異体を単離することは極めて困難であるが、ライン化された均一なホモラインリソースの使用によりこれを解決できる。そして、得られた変異体がコードする遺伝子の詳細な機能解析を行い、環境ストレスと葉緑体（光合成）との相互関係を分子レベルで理解することを目的とする。

3. 研究の方法

植物生育培地で生育させたホモ挿入体の芽生えを、強光・高温および乾燥処理下に置き、2次元クロロフィル蛍光測定装置により

光合成パラメーターが異常な変異体を単離する。ストレス処理は、基底耐性能を測定するために一度に強力なダメージを与える処理と、順化に関わる獲得耐性能を測定するために一度弱いストレスを与えた後に強いストレスを与える処理との2通りとする。複数のアレルによる表現型の再現性確認または相補性試験を行い、得られた変異体の原因遺伝子を同定する。原因遺伝子の機能解析のために、ホモログ遺伝子を欠損した多重変異体や過剰発現体・タグを付加した形質転換体を作成し、特異抗体を作製する。発現解析・局在解析・耐性能の測定・酵素活性の測定・オーム解析による比較・相互作用因子の同定等を行う。

4. 研究成果

(1) 葉緑体タンパク質のホモ挿入体の種子 1,290 ラインをライン番号順に 8 個体ずつ植物育成寒天培地中に播種した。培地には活性酸素発生試薬であるメチルビオロゲン(MV)とアロキサン、NO 発生試薬であるニトロプルシッドナトリウム(SNP)、乾燥応答に関わる植物ホルモンのアブシジン酸(ABA)、塩(NaCl)、高濃度のショ糖を加え、植物インキュベーターで約 2 週間育てた。また試薬を入れない培地上に播種し、播種後 10 日目の芽生えの植物体に強光によるストレス処理を行った。これらのストレス条件下で感受性が異なる変異体を単離するためのスクリーニングを行った。

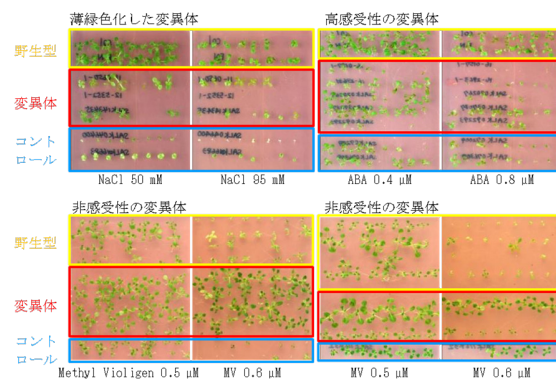


図 1. ストレス感受性に異常を示した変異体

(2) 光合成パラメーターが異常な変異体を単離するために植物体を通常の生育培地上で 10 日間育てた。これらの植物体を用いて CCD カメラによる 2 次元クロロフィル蛍光測定装置により光合成パラメーター(F_0 , F_v/F_m , $\Phi PSII$, qP , NPQ , Rfd)を測定し、パラメーター値が

異常な変異体を単離するためのスクリーニングを行った。

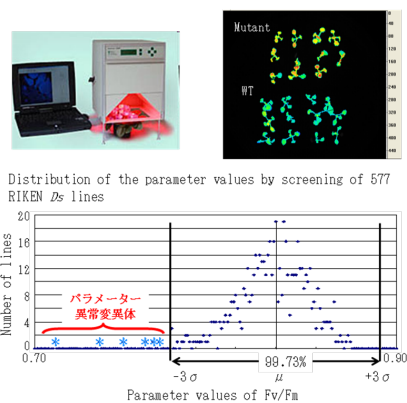


図2. 光合成パラメーターに異常を示した変異体

- (3) 一次スクリーニング後、二次スクリーニングを行い、ストレス耐性試験の再現性を調べた。この結果、感受性が異常な変異体を6つ単離した。その内既知の遺伝子は3つあり、残る3つの遺伝子は機能がこれまでに明らかになっていないものであった。そこで既知遺伝子を除く2つの遺伝子に関してさらに詳細な機能解析を行った。
- (4) 得られた変異体の原因遺伝子を確認するため、遺伝子の異なる位置にタグが挿入したアレルを複数単離し、ストレスに対する感受性の再現性を調べた。その結果、変異体のバックグラウンド(エコタイプ)に起因する個体差は存在したが、薬剤に対する耐性は再現性が得られた。
- (5) 変異体に遺伝子(プロモーター配列を含む遺伝子全体)を導入してストレス耐性能が元に戻るかを調べる相補性試験を行った。その結果、遺伝子を導入した形質転換体において野生型と同レベルの感受性を示した。このことから導入した遺伝子の欠損がストレス感受性の異常をもたらしたことが明らかとなった。
- (6) カリフラワーモザイク35Sプロモーターに原因遺伝子を連結させたコンストラクトを作製し、野生型植物体に形質転換した。RNA抽出しRT-PCRによる発現解析により、遺伝子の発現が向上した高発現体のラインを選抜した。
- (7) 遺伝子の上流約1 kbのプロモーター配列とGUS/LUCとの融合コンストラクトを作製し、野生型植物体に形質転換した。この形質転換体を選抜しGUS染色を行った結果、原因遺伝子が植物体の未分化組織で発現していることが分かった。このことから原因遺伝子が葉緑体の発達過程で働くものと考えられた。
- (8) HA、FLAG、GFPタグの融合タンパク

質を発現させた植物体などの形質転換体を作成した。GFP融合タンパク質を発現した形質転換体を用いた共焦点顕微鏡観察結果により、GFP融合タンパク質が葉緑体に局在することが分かった。このことから原因遺伝子がコードするタンパク質は、葉緑体移行に必要なトランジットペプチドを持つことが明らかとなった。

- (9) ClustalWによる系統解析から、原因遺伝子のホモログや相互作用遺伝子候補が存在することが分かった。そこで、ホモログ遺伝子内部にT-DNAまたはDsが挿入した変異体を単離した。このホモログ遺伝子の変異体を用いてストレス耐性試験を行ったが、野生型と比較して顕著な差は見られずストレス耐性能に変化は見られなかった。現在、ホモログ遺伝子同士の多重変異体の作出を行っている。
- (10) 合成ペプチドをウサギに免疫し特異抗体(ポリクローナル抗体)を作製した。この抗体はタンパク質の葉緑体内局在や発現解析に使用する予定である。

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4件)

- ① Yamaguchi M, Takechi K, Myouga F, Imura S, Sato H, Takio S, Shinozaki K, Takano H.
Loss of the Plastid Envelope Protein AtLrgB Causes Spontaneous Chlorotic Cell Death in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* 53: 125-134, 2012, 査読有
- ② Peng L, Fukao Y, Myouga F, Motohashi R, Shinozaki K, Shikanai T.
A chaperonin subunit with unique structures is essential for folding of a specific substrate. *PLoS Biol.* 9: e1001040, 2011, 査読有
- ③ Bryant N, Lloyd J, Sweeney C, Myouga F, Meinke D.
Identification of nuclear genes encoding chloroplast-localized proteins required for embryo development in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 155: 1678-1689, 2011, 査読有
- ④ Tanaka R, Rothbart M, Oka S, Takabayashi A, Takahashi K, Shibata M, Myouga F, Motohashi R, Shinozaki K, Grimm B, Tanaka A.

LIL3, a light-harvesting-like protein, plays an essential role in chlorophyll and tocopherol biosynthesis. 107: 16721-16725, 2010, 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 明賀 史純、Anett Z Kiss、田中 亮一、永田 典子、Christiane Funk、Stefan Jansson、篠崎 一雄
「LHC スーパーファミリーのメンバーであるシロイヌナズナ OHP1 は光合成に必須である」第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 16-18 日、京都
- ② 文 順姫、赤池 由佳、板山 俊一、明賀 史純、篠崎 一雄、永田 典子、本橋 令子
「シロイヌナズナのアルビノ原因遺伝子 APG11、APG12 機能の解析」第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 16-18 日、京都
- ③ 明賀 史純、Anett Z Kiss、田中 亮一、永田 典子、Christiane Funk、Stefan Jansson、篠崎 一雄
「Two one-helix proteins of the Lhc gene family are essential for photosynthesis in Arabidopsis thaliana」第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13-16 日、横浜
- ④ 近藤 (小山内) 久益子、明賀史純、流水 利恵、篠崎一雄
「シロイヌナズナの葉緑体型 rhomboid プロテアーゼ AtRb110 の機能解析」第 52 回日本植物生理学会年会、2011 年 3 月 20-22 日、仙台
- ⑤ 永田典子、佐藤由佳、藤原誠、吉田茂男、明賀史純、篠崎一雄、本橋令子
「異常色素体と正常葉緑体が混在した細胞をもつシロイヌナズナ斑入り突然変異体の解析」第 52 回日本植物生理学会年会、2011 年 3 月 20-22 日、仙台

[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]

ホームページ等

<http://labs.psc.riken.jp/gdrg/research2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

明賀 史純 (MYOUGA FUMIYOSHI)

独立行政法人理化学研究所・機能開発研究グループ・研究員

研究者番号：10342859