

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570046

研究課題名(和文) プラスチドシグナルに関わるGUN遺伝子と概日時計制御因子、TORシグナルの解析

研究課題名(英文) Studies of new GUN plastid signal pathways

研究代表者

望月 伸悦 (Mochizuki, Nobuyoshi)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60280939

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)：葉緑体は細胞内共生で生じた真核植物細胞のオルガネラであり、その働きには細胞核や他のオルガネラとのコミュニケーションが大事である。本研究では、シロイヌナズナとゼニゴケを用いて、葉緑体から細胞核への情報を伝える仕組みを調べた。この情報伝達ではGUNと呼ばれる一連の遺伝子が働くことが分かっているが、新たなスクリーニング法によって、GBF1、TCTP、LKP2を単離した。これら新規因子の分子遺伝学的な解析を行い、GUNとの遺伝学的相互作用を明らかにした。

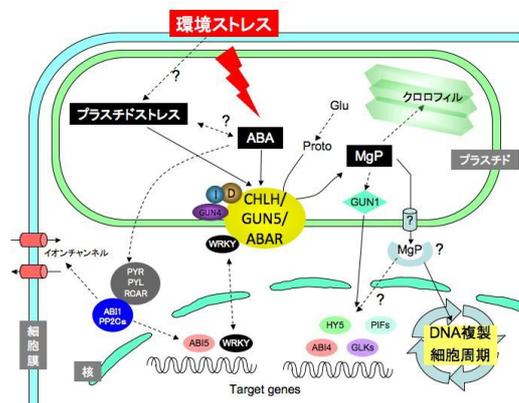
研究成果の概要(英文)：In eukaryote cells, communication between organelles is crucial for the cellular homeostasis. Since nuclear genome has most of genetic information in the cell, it is often considered the organelles are slaves of the nucleus. However, organelles such as plastid, which are endosymbiotic origin and have a small genome, transmit signals to the nucleus to control wide variety of cellular function. Our research aim is understanding the signal transduction pathway from chloroplasts to the nucleus (plastid signaling) using Arabidopsis and Marchantia. We isolated new class of plastid signaling mutants using FOX hunting screening. We found GBF1 and TCTP has genetic interaction with previously reported GUN genes.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：プラスチドシグナル

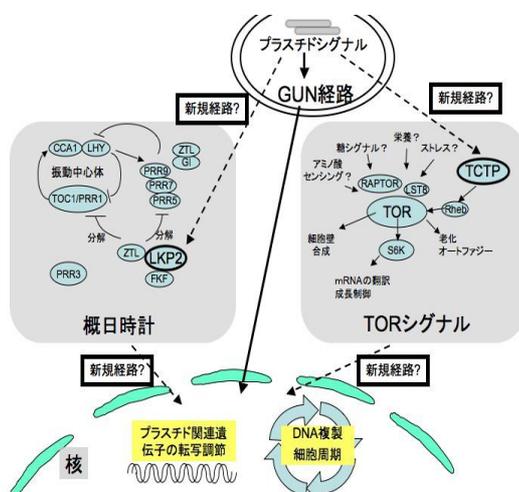
1. 研究開始当初の背景

細胞内共生によって外部から取り込まれ特殊化したオルガネラ(プラスチド・ミトコンドリア)は、これまでエネルギー生産や物質代謝の場と考えられてきたが、外部環境や内生のシグナルを伝達することで、真核細胞体制のコントロールに大きく寄与することが分かってきた。たとえば、低温や乾燥応答に重要なアブシジン酸(ABA)や傷害応答で働くジャスモン酸、病害応答に関与するサリチル酸はプラスチドで合成(または初発段階が開始)される。さらにプラスチドの機能状態(転写・翻訳阻害・細胞質からのタンパク質の輸送阻害および光酸化ストレス)は、プラスチド由来のシグナル(プラスチドシグナル)によって細胞質・細胞核に伝えられ、高等植物では細胞核におけるプラスチド関連遺伝子の転写を調節し、また原始紅藻シゾンでは細胞核 DNA の複製を調節している。申請者はこれまで、上述のプラスチドシグナル伝達系の解析を通し、プラスチド機能の新たな側面を明らかにしてきた。



プラスチドシグナルについては、アラビドプシスにおいて GUN 遺伝子を介したシグナル伝達経路がよく知られている。申請者および競争者らの研究により、テトラピロール合成系の遺伝子 (Mg-chelatase サブユニット *CHLH/GUN5*, *GUN4* など) や、プラスチド局在の PPR タンパク質の一つである GUN1 がシグナリングに重要であることが示されているが、その作用機序などの詳細は依然不明である。この状況を打開するため、申請者はプラスチドシグナル伝達に関わる新たな因子の同定を目指し、従来の機能欠損型突然変異体スクリーニングに加え、FOX-hunting システム(完全長 cDNA 過剰発現株)を用いた機能獲得型の *gun* 変異体単離を進めてきた。最近、bZIP 型転写因子 *GBF1* や LOV-Fbox-kelch 構造をもち概日時計や花成時期の制御で働く *LKP2* ならびに TOR シグナルに関わる *TCTP* (Translationally Controlled Tumor Protein) など、多数の有力な候補を単離することに成功した。
GBF1 は光応答性遺伝子のプロモーター内に存在する G-box 配列に結合して転写の促進・抑制をする事が知られている。*LKP2* については、同じファミリーに属する ZTL が概日時計の中心振動体のひとつである TOC1 や PRR5 と相互作用

し分解制御しており、*LKP2* も同様な制御に関わると考えられる。*TCTP* は酵母からヒトに至る真核生物で普遍的に見られる TOR シグナリングに関わる可能性が示唆されるとともに、さまざまな外部環境刺激に応答した増殖分化および老化の制御において主要な役割を果たすことが知られている。*TCTP* は TOR キナーゼの活性調節に関わる低分子 G タンパク質 Rheb の GEF として機能する可能性が示唆されている。植物でも *TCTP* の他に TOR およびその制御に関わる因子 (*RAPTOR*, *Lst8*) や標的タンパク質の候補 (*S6* キナーゼや *PDK1*) が見いだされており、それらが増殖制御や浸透圧、ABA などの環境刺激応答で働くことが示唆されている。さらに、*TCTP* については mRNA またはタンパク質が細胞間を移動してシステミックな生理応答に関わることも示唆されている点も興味深い。このように、*GBF1*, *LKP2*, *TCTP* については多数の先行研究が行われているが、プラスチドシグナルとの関連には目が向けられておらず、本課題における解析が初めての例となる。



2. 研究の目的

本課題では *GBF1*, *LKP2*, *TCTP* 過剰発現体および突然変異体の解析を中心に、これら新規因子がどのようにしてプラスチドシグナル伝達に関与するか、分子遺伝学的手法でアプローチしたい。また、本課題期間中に他の研究グループから、*TCTP* が細胞間移行して働くとの報告がなされたため、当初の計画に加え、システミックなプラスチドシグナルの可能性も検討することにした。また、ゼニゴケを用いたプラスチドシグナルおよび GUN シグナルの解析も行いたい。ゼニゴケは陸上植物の基部に位置するため、進化的な側面からプラスチドシグナルを考える好適な材料である。また、最近遺伝子破壊や遺伝子導入が可能となったため、分子遺伝学的な解析も可能である。

3. 研究の方法

(1) *GBF1*, *LKP2* はそれぞれ遺伝子ファミリー

を形成しているため、他のファミリーメンバーについても、プラスチドシグナル伝達に關与するか、過剰発現体や突然変異体を用いて調べる。

(2) プラスチドシグナル伝達における TOR シグナルの働きを、TCTP 過剰発現株および TOR、RAPTOR、LST8 等の過剰発現株を用いて調べる。

(3) 上記新規因子と既知の GUN 経路との関係について、過剰発現体における GUN 遺伝子の発現解析や、二重変異体を作製し、遺伝学的相互作用を検定する。

(4) FOX-hunting システムによるスクリーニングを継続し、さらに新たな機能獲得型のプラスチドシグナル伝達突然変異体を同定する。

(5) ゼニコケにおける GUN 経路および新規因子の機能保存性を比較検討する。

(5) 植物個体において、組織の一部でプラスチドシグナルを発生させ、そのシグナルがシステム的に他の組織・器官に伝達されるか検討する。この実験では、微細な植物組織を採取し、遺伝子発現解析等を行う必要があったため、共同研究者と共に、この技術開発も進めた。

4. 研究成果

(1) GBF および LKP ファミリー過剰発現の効果。

GBF1 に相同な遺伝子は GBF1 から GFP6 が知られている。このうち、GBF3 と GBF6 については過剰発現株が得られたので、プラスチドシグナルを調べたところ、いずれも正常であった。LKP2 類似遺伝子 ZTL と FKF1 過剰発現体を得ることが出来なかったため、プロモーターを変更した株の作製を進めたが、期間中に表現型の検定に至らなかった。

(2) TCTP および TOR シグナル関連遺伝子過剰発現株の解析。

TCTP 類似遺伝子は他に 1 つあり、これについて過剰発現体を調べたが、顕著な表現型はなかった。RAPTOR および Lst8 の過剰発現株についても、プラスチドシグナルについては顕著な表現型が見られなかった。

(3) GBF1 および TCTP と GUN との遺伝学的相互作用。

既知の gun 変異体を用いた解析では、GBF1ox と GUN4 の間で遺伝学的相互作用が新たに見いだされた。TCTPox と gun の間では相互作用が見られなかった。LKP2ox については、gun1 との遺伝学的相互作用を示唆する結果が得られており、詳細な解析を進めている。

(4) FOX ハンティングによる、新規プラスチドシグナル変異体の単離。

新たなスクリーニングを行い、HAT2 遺伝子過剰発現によってプラスチドシグナル伝達に異常が生ずることが分かった。HAT2 と GUN との遺伝学的相互作用を調べるため二重変異体の作製を進めた。

(5) プラスチドシグナルの器官間伝達について。

TCTP の mRNA またはタンパク質が器官間で伝達されるとの報告を受け、プラスチドシグナルの器官間伝達の可能性を検討した。本課題期間中終期に開始した計画であるため、技術開発を中心に進めた。京都大学長谷グループおよび日立製作所神原グループとともに、金属細管を使ったニードルを用いた微細組織の採取方法および、採取した微細組織からの cDNA 合成および RNAseq 解析法を確立した。本法を利用し、将来的にはシグナルの器官間伝達の詳細を解析したい。

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 8 件)

Kajiyama T, Fujii A, Arikawa K, Habu T, Mochizuki N, Nagatani A, Kambara H. Position-Specific Gene Expression Analysis Using a Microgram Dissection Method Combined with On-Bead cDNA Library Construction. *Plant Cell Physiol.* 2015 Jul;56(7):1320-1328 (2015).

Nito K, Kajiyama T, Unten-Kobayashi J, Fujii A, Mochizuki N, Kambara H, Nagatani A. Spatial Regulation of the Gene Expression Response to Shade in *Arabidopsis* Seedlings. *Plant Cell Physiol.* 56(7):1306-1319 (2015)

望月伸悦 プラスチドレトログレードシグナリングの発見とその研究、*生物科学* 66, 196-207 (2015)

Tomiya M, Inoue S, Tsuzuki T, Soda M, Morimoto S, Okigaki Y, Ohishi T, Mochizuki N, Takahashi K, Kinoshita T. Mg-chelatase I subunit 1 and Mg-protoporphyrin IX methyltransferase affect the stomatal aperture in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Res.* 127(4):553-563 (2014)

Ibata H., Nagatani A., Mochizuki N. Perforated-tape Epidermal Detachment (PED): A simple and rapid method for isolating epidermal peels from specific areas of *Arabidopsis* leaves. *Plant Biotechnology* 30, 497-502 (2013)

Lee HJ, Mochizuki N, Masuda T, Buckhout TJ. Disrupting the bimolecular binding of the haem-binding protein 5 (AtHBP5) to haem oxygenase 1 (HY1) leads to oxidative stress in Arabidopsis. *J Exp Bot.* 63(16):5967-5978 (2012).

Oka Y, Ono Y, Toledo-Ortiz G, Kokaji K, Matsui M, Mochizuki N, Nagatani A. Arabidopsis phytochrome a is modularly structured to integrate the multiple features that are required for a highly sensitized phytochrome. *Plant Cell.* 24(7):2949-2962 (2012).

Espinas NA, Kobayashi K, Takahashi S, Mochizuki N, Masuda T. Evaluation of unbound free heme in plant cells by differential acetone extraction. *Plant Cell Physiol.* 53(7):1344-1354 (2012).

〔学会発表〕(計 13 件)

望月伸悦、石崎公庸、西浜竜一、河内孝之、長谷あきら、プラスチックシグナル伝達における GUN1 の機能解析、第 57 回日本植物生理学会年会(2016)

Nagatani A., Otsuki R., Sakurai Y., Mochizuki N., Suzuki T. The First Step to Understanding Light-Responses in natura. 第 57 回日本植物生理学会年会(2016)

Ibata H., Nagatani A., Mochizuki N. Mg-chelatase H subunit: GUN5 controls three physiological functions in Arabidopsis 第 56 回日本植物生理学会年会(2015)

Nito K., Kajiyama T., Unten J., Fujii A., Mochizuki N. Kambara H. Nagatani A. Inter-organ communications during shade avoidance response. 第 57 回日本植物生理学会年会(2015)

Ohnishi I., Nito K., Mochizuki N., Kajiyama T., Fujii ., Kambara H., Nagatani A. Spatially gene expression profiling during apical hook opening. 第 57 回日本植物生理学会年会(2015)

長谷あきら、梶山智晴、綿引和己、望月伸悦、神原秀記、光刺激に対する遺伝子発現応答の組織/器官特異性 第 55 回日本植物生理学会年会(2014)

Ibata H., Ishizaki K., Nishihama R., Kohchi, T., Nagatani A., Mochizuki N. は Analysis of plastid signaling in *Marchantia* 第 55 回日本植物生理学会年会

(2014)

Mochizuki N. Study of plastid retrograde signaling Kyoto-Bristol symposium, plant biology session (2014)

運天淳子、細川陽一郎、小塚俊明、望月伸悦、長谷あきら シロイヌナズナの非陰応答における光シグナル伝達機構の時空間的解析、第 54 回日本植物生理学会年会(2013)

Espinas N., Kobayashi K., Sato Y., Mochizuki N., Masuda T. Allocation of Heme is Differentially Regulated by Ferrochelatase Isoforms in Arabidopsis Cells. 第 54 回日本植物生理学会年会(2013)

Espinas N., Kobayashi K., Sato Y., Mochizuki N., Masuda T. Heme partitioning in Arabidopsis cells suggests differential roles of ferrochelatase 1 and 2 (FC1 and FC2) in photosystem formation and hemoprotein supply. 第 53 回日本植物生理学会年会(2012)

衣幡春映、長谷あきら、望月伸悦 アラビドプシスにおける簡便な気孔観察を可能とする新規表皮剥離法、日本植物学会第 76 回大会(2012)

〔図書〕(計 1 件)

日本光生物学協会 光と生命の事典 編集委員会編 「光と生命の事典」(2016)

〔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://physiol2.bot.kyoto-u.ac.jp/HP3/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

望月 伸悦(MOCHIZUKI NOBUYOSHI)

京都大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号:60280939

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし