

第 34 回 (平成 18 年度) 研究奨励金受領者研究報告

コンディショナル遺伝子破壊法を用いた葉緑体前駆体タンパク質受容体の機能解析

岩手大学 21 世紀 COE プログラム 稲葉丈人

緒言

葉緑体は光合成細菌が真核細胞に共生することで生まれた植物固有のオルガネラである。もともと葉緑体ゲノムが持っていた遺伝子のほとんどは進化の過程で核ゲノムに移ってしまったため、葉緑体機能の分化・構築はサイトゾルからのタンパク質輸送によって支えられている。そのタンパク質輸送を司るのが葉緑体タンパク質透過装置 Toc-Tic 複合体である。中でも、前駆体タンパク質受容体は、サイトゾルにおいて 3000 種類にも及ぶ葉緑体タンパク質を正確に認識する重要な役割を持つ。

従来、葉緑体タンパク質輸送の研究は、生化学的手法を中心に行われてきた。この過程においては一種類の受容体 Toc159 のみが同定されたが、近年、シロイヌナズナの全ゲノム配列が解読された結果、複数の前駆体タンパク質受容体 (Toc159/132/20) の存在が明らかになった。そのため、受容体間で何らかの使い分けがされている、という仮説が考えられるようになった。これまでのところ、遺伝子破壊株を用いて基質タンパク質の同定が試みられてきたが、これらの植物では幼植物の段階から葉緑体の発達が著しく阻害されるために二次的な影響が大きく、明確な結果を得るには至っていない。

そこで、本研究では誘導的遺伝子破壊株を用いて個々の受容体の基質となる前駆体タンパク質を同定し、受容体の機能分担機構を明らかにすることを目的とした。

結果及び考察

1. コンディショナル遺伝子破壊株の作出

まず、前駆体タンパク質受容体遺伝子の特異的にノックアウトするため、*TOC159* をコンディショナルに遺伝子破壊するエストロジェン誘導性 RNAi ベクターを構築し、これをシロイヌナズナに導入した。

また、植物では過剰発現体を作出すると、過剰発現させた遺伝子の自発的なサイレンシングがある程度の頻度で起こることが知られている (co-suppression)。そこで *TOC159* を過剰発現するコンストラクトも作製し、シロイヌナズナに導入した。

それらの植物を用いてターゲット遺伝子である *TOC159* の発現を調べたところ、RNAi コンストラクトを持つシロイヌナズナではエストロジェン処理後も *TOC159* の発現低下が見られなかった。一方、過剰発現体の中には生育途中で白化する植物が見られた (図 1A, Albino)。これらの植物から RNA を抽出して *TOC159* の発現を調べたところ、著しく発現が低下していた (図 1C, *TOC159*)。そこで、以後の解析にはこれらの植物を用いた。

2. Toc159 前駆体タンパク質受容体の機能解析

次に、これらの植物を用いて、白色部分 (Albino) 及び緑色部分 (Green) における葉緑体タンパク質の蓄積を調べた。その結果、白色部分においては光合成関連タンパク質である GUN4, OE23, LHCB の蓄積が低下していることが明らかになった。一方、非光合成タンパク質であるピルビン酸脱水素酵素 E1 α サブユニット (E1 α) や IEP37 の蓄積はほとんど影響を受けていないことが明らかになった。このことは Toc159 が光合成関連タンパク質の輸送に関与していることを示唆している。

次に、これらのタンパク質の遺伝子レベルでの発現を調べるため、RT-PCR を行った。その結果、予想外に光合成関連タンパク質遺伝子の発現が低下していることが分かった。一方、非光合成タンパク質遺伝子の発現は低下していなかった。このことから、光合成関連タンパク質の輸送阻害により葉緑体機能が低下し、結果的に特定の遺伝子の発現を抑えていることが示唆された。

今後の展開

現在までの成果により、Toc159 タンパク質が主に光合成関連タンパク質の輸送に関与していることが明らかになってきた。一方で、本研究の予想外の成果により、*TOC159* の発現が抑制された植物では光合成関連タンパク質遺伝子の発現そのものが低下していることも明らかになった。このことは、タンパク質輸送と核遺伝子発現の協調的な働きが葉緑体分化に必須であることを示唆している。今後は葉緑体-核間コミュニケーションの包括的な解析により、タンパク質輸送によるオルガネラ機能・分化の制御機構に迫りたい。

最後に、本研究を行うにあたり研究奨励金を賜りました財団法人農芸化学研究奨励会に深謝いたします。

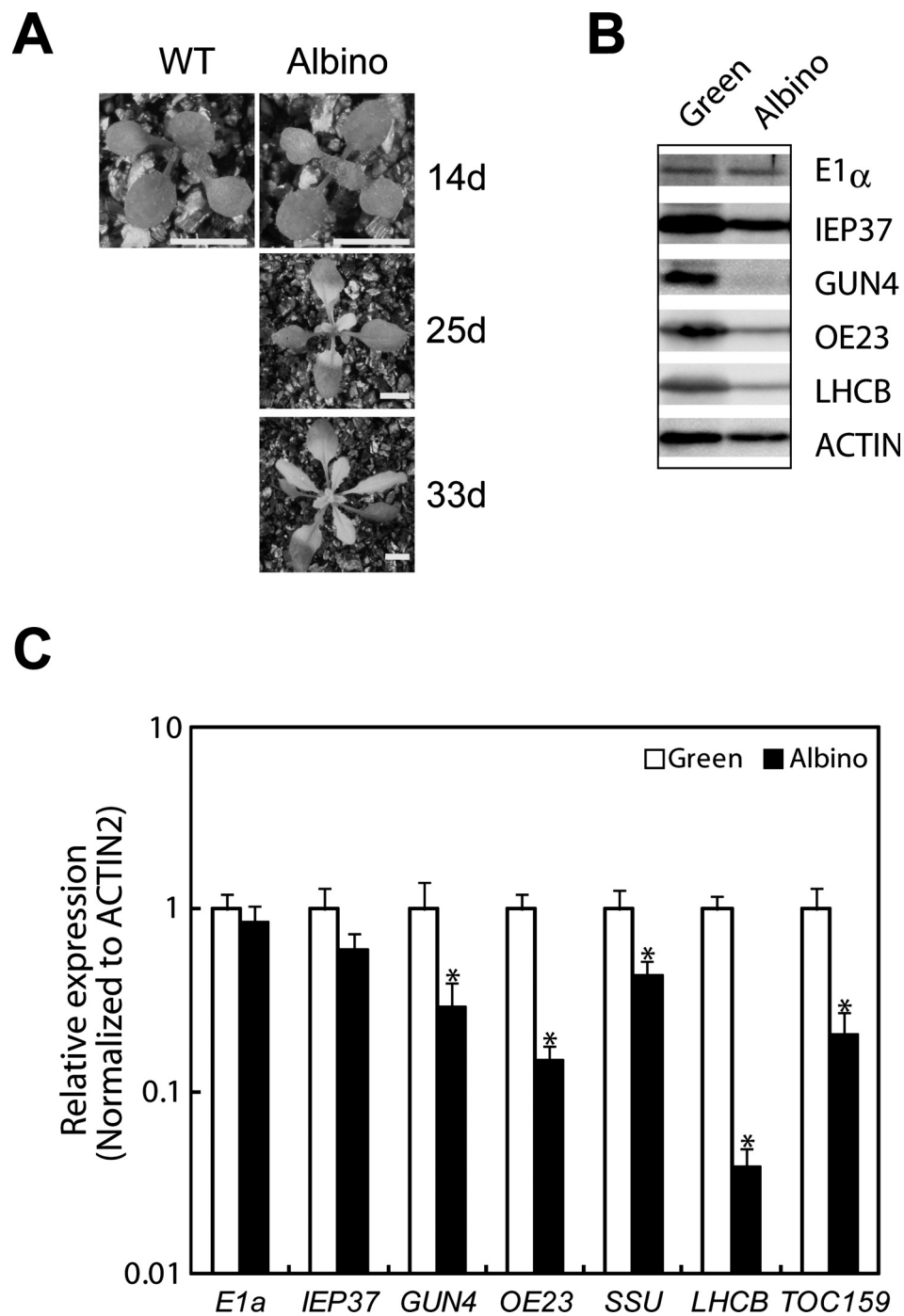


図 1 *TOC159* サイレンシング株の作出と解析
 A. 作出した植物の表現型。Albino の植物は日数を経過するごとに白化している。
 B. サイレンシング株のウェスタンブロット解析
 C. RT-PCR 法を用いたサイレンシング株における遺伝子発現解析