

相同性を持ち、一次配列上は同一のタンパク質と考えられる。また、Anx4 はカルシウム濃度依存的に膜と結合し、ナトリウム濃度依存的に解離することが知られている。さらに、所属する研究室では、ZAP36 が ATP を結合することを酵素反応論的に明らかにしている。しかしながら、既存の ATP 結合モチーフを分子内に持ち合わせていない。そこで、ATP 結合型 ZAP36 の X 線結晶構造を決定し、新規モチーフの同定とエキソサイトースにおける役割を構

造生物学的に明らかにすることを目指した。その結果、ナトリウム結合型の結晶構造を決定でき、その構造からナトリウム濃度依存的解離の分子機構を提唱した。

使用内訳

タンパク質調製用試薬 (10 万円)、タンパク質調製用消耗品 (10 万円) タンパク質結晶化試薬 (20 万円)、タンパク質結晶化用消耗品 (10 万円)。

植物ビタミン C 生合成調節に関わる VTC2 の機能解析

島根大学生物資源科学部 石川孝博

植物は、D-マンノース (Man) と L-ガラクトース (Gal) の誘導体を代謝中間体とする Man/Gal 経路を主要経路として、アスコルビン酸 (AsA, ビタミン C) を生合成している。VTC2 は、Man/Gal 経路構成酵素のひとつ GDP-L-Gal フォスフォリラーゼをコードする遺伝子としてシロイヌナズナ AsA 欠乏変異体から同定され、AsA 生合成調節の鍵遺伝子であることが推測されている^{1,2)}。またシロイヌナズナには、VTC2 のパラログとして VTC5 が存在する。本研究は、VTC2/5 の機能解析を行い、植物 AsA 生合成調節機構を解明することを目的としている。

1. VTC2/5 遺伝子の光応答性の検討

我々はこれまでに、Man/Gal 経路を構成する 8 個の構成酵素遺伝子の中で VTC2 が光に対して最も顕著に発現応答することを報告している¹⁾。そこで、VTC2 の光応答

性を詳細に解析するため、VTC2 および VTC5 のプロモーターの光応答性を検討した。各遺伝子の転写開始点から上流約 1.5 kbp をプロモーター領域としてシロイヌナズナゲノム DNA より単離し、ルシフェラーゼ遺伝子を含む改変型 pBI ベクターに導入した (図 1A)。定法に従ってシロイヌナズナに形質転換し、多数の T1 植物体を得た。得られた T1 植物体を用いてルミノイメージアナライザーによりルシフェラーゼ活性を画像化し、プロモーターの光応答性を評価した。その結果、VTC2 および VTC5 とともに光照射 2 時間以内に発現応答することが示された (図 1B)。VTC5 では特に若い葉において顕著な発現誘導が観察された。植物の AsA は、光により生合成が誘導される。今回の結果により、AsA 合成量の増加に先駆けて、VTC2/5 の発現誘導は光応答の早い段階で起こることが示された。

2. VTC2/5 の細胞内局在性の検討

VTC2 および VTC5 タンパク質の細胞内局在性を検討するため、各遺伝子のタンパク質コード領域を Gateway 法により CaMV35S プロモーター下流に導入し、パーテ

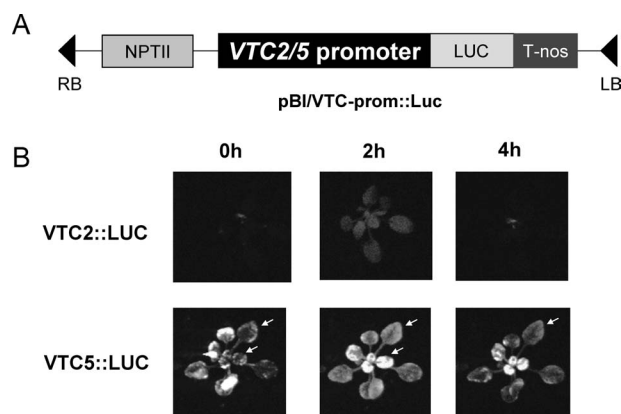


図 1 VTC2 および VTC5 プロモーターの光応答性の評価。A. 遺伝子導入用プラスミドの構成。B. ルシフェラーゼを指標にした VTC2/5 プロモーターの光応答。各 T1 植物を 24 時間暗適応させた後、 $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の光照射を行い経時的にルミノイメージアナライザーにより画像化した。

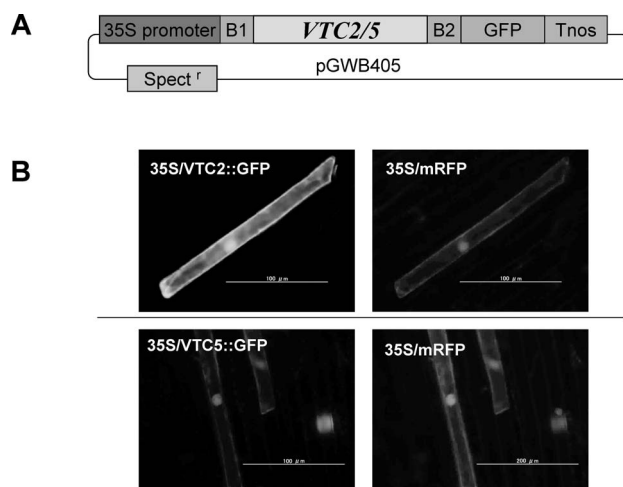


図 2 VTC2 および VTC5 の細胞内局在性の検討。A. 遺伝子導入用プラスミドの構成。B. VTC2 (上段) および VTC5 (下段) の局在性を示す GFP の蛍光画像。

ィクルガンを用いて長ネギ表皮細胞に GFP との融合タンパク質として一過的発現させた。導入の際、発現確認用に mRFP を共導入した。その結果、VTC2 および VTC5 とともに細胞質と核の両方に局在することが強く示唆された(図 2)。

3. VTC2/5 相互作用タンパク質の探索

VTC2 および VTC5 の核への局在が示唆されたことから、VTC2/5 タンパク質は他のタンパク質因子と相互作用し、核内で何らかの機能を発現していることが推測された。そこで、VTC2/5 の核内における役割を明かにするため、酵母 Two-Hybrid 法による相互作用タンパク質の探索を試みた。VTC2 および VTC5 をベイトにシロイヌナズナ cDNA ライブラリーから相互作用タンパク質を探索した結果、VTC2 および VTC5 に対してそれぞれ 7 個と 6 個の候補遺伝子を得、現在各候補タンパク質の相互作用性について確認を進めている。

ミトコンドリア膜小胞を利用したザゼンソウ熱産生因子の生化学的解析

岩手大学農学部 稲葉(伊東)靖子

緒言

我が国の寒冷地に自生するザゼンソウは、氷点下を含む外気温の変動にもかかわらず、肉穂花序と呼ばれる生殖器官の体温を 20℃前後に維持できる発熱植物である。本植物の熱産生には、脱共役タンパク質 UCP とシアン耐性呼吸酵素 AOX の関与が示唆されており、ともにミトコンドリアに局在する膜タンパク質である^{1,2)}。UCP や AOX はミトコンドリア呼吸鎖と連携して ATP の産生レベルを抑えるため、ミトコンドリアは恒常性を維持しようとしてさらに呼吸を活発化して、その結果、大きな代謝熱が発生すると考えられている。実際に、多くの発熱植物において発熱が観察される組織では呼吸が活発であり、発熱レベルと呼吸活性には正の相関が観られる。

発熱植物における UCP や AOX の役割は、単離ミトコンドリアの呼吸活性を詳細に解析することによりその一端が明らかとされてきた。ところが、現時点ではザゼンソウを含むすべての発熱植物において遺伝学的な解析を行うことが困難であるため、UCP や AOX を欠損したミトコンドリア呼吸鎖の解析はまったく行われていない。そこで本研究では、ザゼンソウの AOX および UCP に特異的な抗体カラムを作成して、AOX や UCP を生化学的にミトコンド

4. 今後の展望

今回、VTC2 および VTC5 の機能解析を進めた結果、両遺伝子プロモーターは顕著な光応答性を示すこと、VTC2/5 タンパク質は核への局在が認められることが明かになった。今後、プロモーター中の光応答性シス因子の同定・解析および、VTC2/5 タンパク質の核内での役割解明を進めていき、光による AsA 生合成調節の分子機構を明かにしたいと考えている。

最後に、本研究の遂行にあたりご援助いただいた財団法人農芸化学研究奨励会に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) Dowdle, J., Ishikawa, T., Gatzek, S., Rolinski, S. and Smirnoff N. Plant J. **52**: 673-689 (2007).
- 2) Ishikawa, T. and Shigeoka, S. Biosci. Biotechnol. Biochem., **72**, 1143-1154 (2008).

リア膜から除去する方法の確立を目指した。

方法および結果

1. 抗 UCP および抗 AOX 抗体カラムの作成

ザゼンソウで主として発現する UCP (SrUCPA) 遺伝子の全長を PCR により増幅して、pET-43.1a の *SmaI/XhoI* サイトに連結してプラスミド pET-NusA-SrUCPA を作成した。(SrUCPA の N 末端側には、TEV プロテアーゼ切断

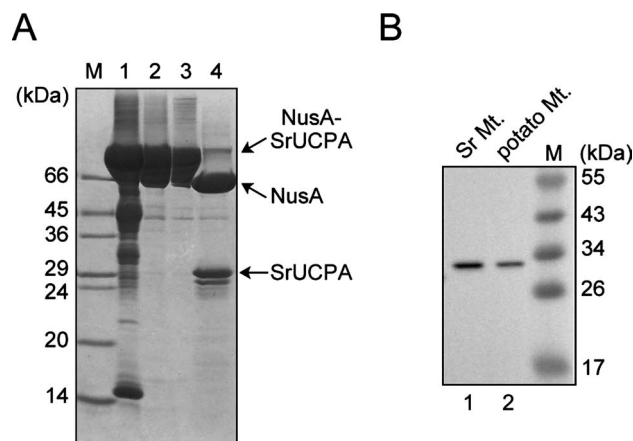


図 1 抗 SrUCPA 抗体の作成 (文献 3 より改変)

(A) NusA-SrUCPA の発現と精製。NusA-SrUCPA を発現させた大腸菌の粗抽出液 (レーン 1)、ニッケルカラムで精製した NusA-SrUCPA (レーン 2)、脱塩精製後 (レーン 3)、TEV プロテアーゼによる切断後 (レーン 4)。 (B) 抗 SrUCPA 抗体を使用したイムノブロットング。Sr Mt: ザゼンソウミトコンドリア, potato Mt: ポテトミトコンドリア。