

《農芸化学奨励賞》

細胞内輸送を介した植物の多様な環境応答機構に関する研究



岩手大学 21 世紀 COE プログラム 准教授 稲葉 丈人

移動手段をもたない植物にとって、自身を取り巻く環境を感知して生長を制御することは、生存するうえで最も重要な応答の一つである。こうした応答は、センサー分子によるシグナルの受容と、その下流で起こる遺伝子発現の調節、さらには遺伝子にコードされるタンパク質の機能発現により達成されている。筆者は、光や温度に応答して植物細胞内で起こる一連の反応を解析することで、細胞内輸送を介した植物の多様な環境応答機構に関する新しい知見を得た。以下にその内容を紹介する。

1. 小胞輸送を介した光による茎伸長制御機構に関する研究

植物の生長制御のうち、最も重要な反応の一つが光形態形成である。このときに起こる代表的な反応が「茎伸長の停止」と「葉緑体分化による光合成機能の獲得」である（図1）。言い換えれば、光がない場所では植物は「もやし」のように盛んに茎を伸長させて光を探し続ける。このような性質は、自然界で生育する植物が光合成に適さない不良環境を感知し、他の植物が作る日陰から逃れる反応（Shade avoidance 反応）にも利用されている。したがって、植物がどのように光環境に応答して茎伸長を制御しているか理解することは、植物の生存戦略の一端を理解する上で必要不可欠である。

こうした背景を踏まえ、筆者は暗所の茎伸長部位で特異的に発現する膜輸送因子 *PRA2* 遺伝子の発現制御機構と細胞内局在の解析を行った。まず、*PRA2* 遺伝子のプロモーター領域を解析し、光抑制にかかわる転写制御配列 DE1 を同定し、DE1 がさまざまな光受容体からシグナルを受け取れることを明らかにした。また、酵母ワンハイブリッド法により DE1 に結合する転

写因子 DF1 をクローニングした。モデル植物の全ゲノム配列が明らかになった現在では、さまざまな植物で光抑制される遺伝子プロモーター上に DE1 が保存されていることが明らかになってきた。

一方、*Pra2* タンパク質は Ypt3/Rab11 ファミリーに属する Rab GTPase であることから、細胞内の特定のコンパートメントで茎伸長制御に必要な膜輸送を行っていると予想された。そこで、*Pra2* タンパク質の機能の一端に迫るため、分子系統解析と細胞内局在解析を行った。まず、分子系統解析により、高等植物にはヒトや酵母の 10 倍近いおよそ 25 個の Ypt3/Rab11 タンパク質が存在すること、さらに植物特有の大きなサブグループが存在することを明らかにした。すなわち、このファミリーは植物固有の膜輸送において重要な役割を果たしていることが示唆された。次に細胞分画法および GFP 融合タンパク質を用いて *Pra2* タンパク質の細胞内局在を調べ、*Pra2* タンパク質がエンドソームやゴルジ体近傍に局在することを明らかにした。この結果から、*Pra2* タンパク質はエンドソームやゴルジ体近傍での膜輸送に関与することで、茎伸長という植物の高次生命現象を制御していることが示唆された。

2. 葉緑体の機能構築にかかわるタンパク質輸送に関する研究

前述のように、光形態形成反応においては葉緑体分化と光合成機能の獲得が起こるため、これに必要な遺伝子群が劇的に誘導される。葉緑体には約 3,000 種類を超えるタンパク質が存在すると言われているが、葉緑体ゲノムにコードされているタンパク質は 100 個程度で、残りの大部分は核ゲノムにコードされている。そのため、遺伝子発現の光誘導に応答してプロプラス

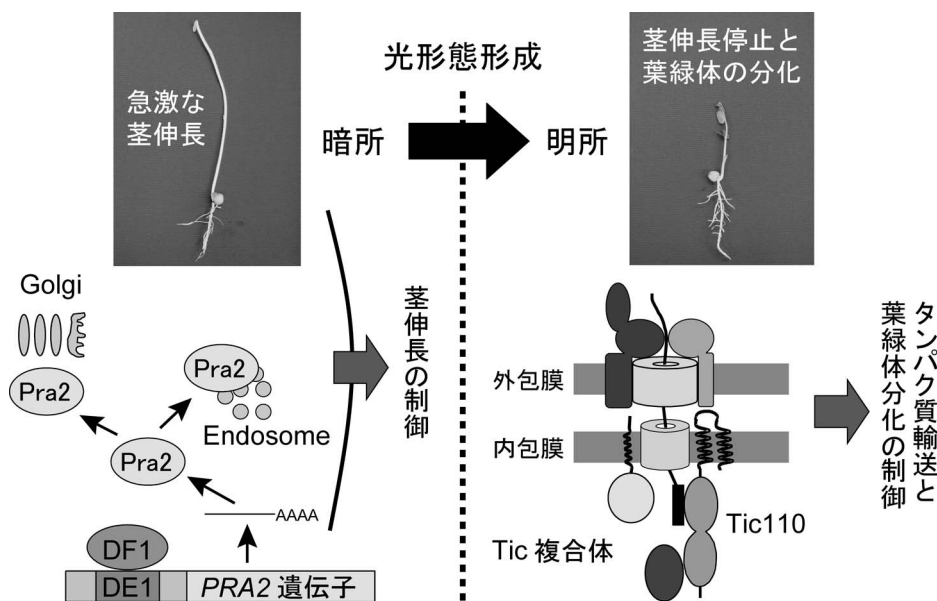


図1 光シグナルによる植物の形態制御と細胞内輸送

チドを葉緑体に分化させるには、合成されたタンパク質を葉緑体内に効率的に取り込むシステムが必要である。葉緑体機能の構築に必要な核コードタンパク質の輸送を行うのが、葉緑体包膜上に存在するタンパク質透過装置 Toc-Tic 複合体である(図 1)。外包膜側の Toc 複合体は前駆体タンパク質受容体やβ-バレル型のチャンネルを含んでおり、輸入されるタンパク質の選択的な認識に重要な役割を果たしている。Toc 複合体は安定した複合体を形成しているため、それまでの研究で個々の因子の機能や作用機構が明らかになりつつあった。しかしながら、内包膜側の Tic 因子は安定した複合体を形成しないため、複合体を精製することも困難であり、生理的な役割もほとんど明らかになっていなかった。

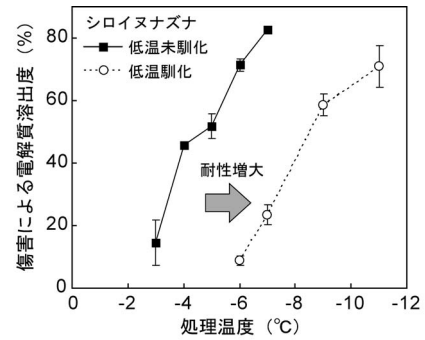
このような背景のもと、筆者は葉緑体内包膜におけるタンパク質透過の分子機構を解明するため、Tic 複合体の主要構成因子であることが分かっていた Tic110 タンパク質に着目し、その機能解析を行った。まず、生化学的解析により、Tic110 タンパク質は N 末端の膜貫通ドメインを介して内包膜にアンカーされており、約 100 kDa の可溶性ドメインは葉緑体ストロマに面していることを明らかにした。この 100 kDa のストロマ側ドメインのうち、N 末端側が前駆体タンパク質の葉緑体移行シグナルに結合し、輸送途中の前駆体タンパク質がサイトゾルに逆戻りするのを防いでいることも明らかにした。一方、ストロマ側ドメインの C 末端側は、Hsp93 や Tic40 などの他の Tic 因子と相互作用することで、前駆体タンパク質の輸送効率を調節していることを示した。さらに、シロイヌナズナの遺伝子破壊株を用いた解析で、Tic110 のこうした働きが植物の生存に必須であることも明らかになった。

3. 低温応答における葉緑体タンパク質の役割に関する研究

自然界においては、夏から冬への移行に伴い植物は生理機能や細胞の構造を大きく変化させ、その結果高い耐寒能力を獲得する。このような一連の「体の作り換え」のことを「低温馴化」という。低温馴化能をもつ植物は、ある一定期間、凍結しない程度の低温にさらされると、次に襲ってくるさらに低い温度に対して凍結耐性を獲得する(図 2)。こうした低温馴化の過程において、植物は数多くの遺伝子の発現を誘導し、最終的にそれらのコードするタンパク質が細胞内の各所で機能を発揮することで、低温に対する耐性を獲得していると考えられる。したがって、細胞あるいはオルガネラレベルでの低温耐性獲得機構を理解するには、それら低温応答性タンパク質がどこに局在し、どのような分子機能をもつのか解明する必要がある。

このような背景を踏まえ、筆者らは、低温から葉緑体を守る分子機構を明らかにするため、低温誘導性葉緑体タンパク質の同定と機能解析を行った。まず、低温誘導性遺伝子 *COR15A* にコードされる機能未知葉緑体タンパク質 Cor15am を解析した。Cor15am の葉緑体内における局在を調べたところ、大部分は葉緑体ストロマに局在することが明らかになった。また、試験管内アッセイ系を用いて Cor15am タンパク質がさまざまなストレスから基質タンパク質を保護すること、さらに葉緑体ストロマに基質が存在することも明らかにした。加えて、Cor15am のタンパク質保護活性は、基質に直接相互作用して凝集を防ぐことによるものであることも示した。

一方、葉緑体包膜は凍結により損傷を受けることが知られて



低温馴化による凍結耐性の増大

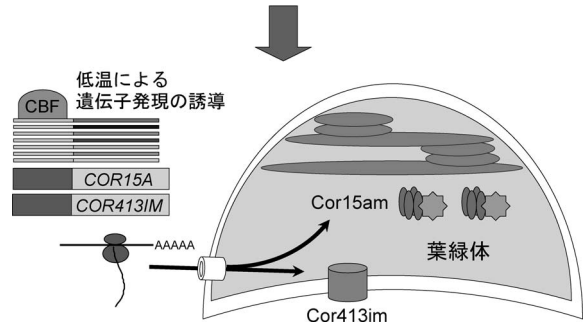


図 2 低温応答における低温誘導性葉緑体タンパク質の役割

いたが、低温により誘導され包膜にターゲティングされるタンパク質はほとんど見つかっていなかった。そこで筆者らは、マイクロアレイのデータや細胞内局在予測プログラムを用いて、葉緑体移行シグナルをもつ低温誘導膜タンパク質を探索した。その結果、低温誘導性遺伝子ファミリー *COR413IM* にコードされているタンパク質が葉緑体膜タンパク質をコードしていることが示唆された。そこで、生化学および細胞生物学的解析を行ったところ、Cor413im タンパク質は葉緑体内包膜に局在することが明らかになった。また、*COR413IM* はゲノム配列が明らかになっている植物の中ではシロイヌナズナにのみ 2 コピー存在するが、そのうちの 1 コピーがあれば十分な凍結耐性が得られることも明らかにした。今後の研究で Cor413im タンパク質の分子機能や作用機構が明らかになれば、葉緑体包膜タンパク質の機能発現による植物の低温耐性獲得機構が明らかになっていくと期待される。

本研究は主に名古屋大学大学院生命農学研究科、マサチューセッツ大学アムハースト校および岩手大学で行ったものです。光による茎伸長制御機構に関する研究を行う機会を与えてくださった名古屋大学大学院生命農学研究科の佐々木幸子先生、永野幸生先生(現 佐賀大学・准教授)、および葉緑体へのタンパク質輸送に関する研究を行う機会を与えてくださったマサチューセッツ大学アムハースト校の Danny J. Schnell 先生に心より御礼申し上げます。また、私に独立して研究を行う機会を与えてくださった岩手大学 21 世紀 COE プログラムと、研究室をゼロから立ち上げ研究の発展に貢献してくれた大川久美子、柿崎智博、鈴木優子、中山克大の各氏に心より感謝いたします。おわりに本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会東北支部長の平 秀晴先生(岩手大学教授)ならびにご支援を賜りました諸先生方に厚く御礼申し上げます。