

シロイヌナズナのタグラインを用いた葉緑体タンパク質の解析

Functional genomics of nuclear-encoded chloroplast proteins using tagged lines in *Arabidopsis thaliana*

研究代表者：本橋令子，准教授，静岡大学 農学部
Reiko Motohashi, Associate Professor,
Shizuoka University Faculty of Agriculture

和文アブストラクト

光合成は、地球上のほとんどの生物が生きていく上で欠かすことのできない酸素を供給する重要な反応であり、その光合成を行っているのは葉緑体である。また、葉緑体はビタミンや植物ホルモンなどの物質生産の場でもある。このような重要な機能を持つ葉緑体は核とは独立した独自の転写、翻訳機構を持っているが、核の支配から完全に独立した細胞小器官ではない。

シロイヌナズナの葉緑体のゲノム上には約 80 程度の遺伝子がコードされているが、葉緑体自体を構成するタンパク質の大部分は核ゲノムにコードされている。この約 2,090 の核コードの葉緑体タンパク質のうち、現在まで、藍藻や他の生物との相同性から機能が推察できる葉緑体タンパク質の機能解析は進んできたが、高等植物独自の機能と考えられる他の生物との相同性のない葉緑体タンパク質の機能解析は進んでいないのが現状である。このような核コードの葉緑体タンパク質遺伝子の破壊株を集め、光合成、光応答と物質生産など、幅広い葉緑体機能に関与する遺伝子の同定を行う。

英文アブストラクト

Plastids share a common ancestor with modern cyanobacteria. They possess their own genetic systems and protein synthetic machinery. During evolution, most genes once present in the plastids were transferred to the nuclear genome. For this reason, the development of chloroplasts requires the integrated activities of both chloroplasts and nuclear genome.

Only 80 plastid proteins are encoded on the plastid genome in *Arabidopsis thaliana*. Most of plastid proteins are encoded by the nuclear genome, synthesized as precursors in the cytosol, and then transported to the proper regions for their functions within chloroplasts. Plastid proteins can be identified by computational prediction of the N-terminal presequences (chloroplast transit peptides, cTPs) of their cytoplasmic precursor proteins.

To study function of nuclear-encoded chloroplast proteins, we have started to collect Ds-tagged lines that 2090 plastid proteins with a cTP predicted to be encoded by nuclear genomes in *Arabidopsis thaliana*.

We start to analyze their functions of 2090 plastid proteins. We take three approaches as follows.

(1) To determine essential nuclear-encoded genes for chloroplast development, we are screening tagged lines to isolate mutants with albino or pale green (apg) phenotypes. Identified APG genes have sequence homology with housekeeping proteins involved in photosynthesis, translation, transcription, translocation and so on.

(2) To screen mutants with wild-type phenotype but defective in photosystem, we isolate mutant showing different fluorescence kinetics from that of wild type using chlorophyll fluorescence monitoring system.

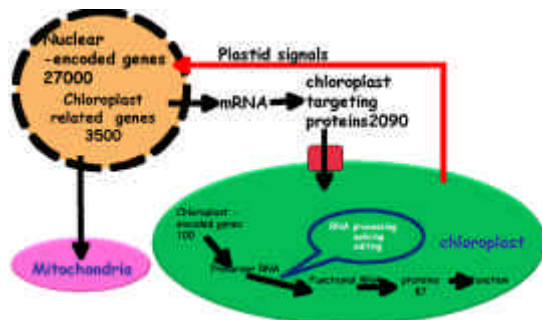
(3) In chloroplasts, not only carbohydrates but also fatty acids, amino acids and other molecules are synthesized. To understand regulatory-networks of metabolite in chloroplast, we obtained metabolic profiles of *apg1* (the 37 kDa inner envelope membrane polypeptide related plastoquinone biosynthesis), *apg2* (TatC homologue of a Δ pH-dependent protein transporter in thylakoid membrane) and *apg3* (translation system in chloroplast) using integration of metabolomics. FT-ICRMS (Fourier Transform-Ion cyclotron Resonance-Mass spectrometry) is a nontargeted, high-throughput analytical system for metabolomics analysis in which crude by means of direct injection without prior separation metabolites by chromatography. We observed about 500 *m/z* values (mass peaks) from each analysis of 100% methanol extracts in 3-week-old *apg* mutants and the results were subjected to PCA. We attempt to obtain metabolic profiles of these tagged lines.

本文

1. 研究目的

モデル植物のシロイヌナズナにおいては、葉緑体ゲノムの全塩基配列は 1999 年に決定され、核ゲノムの全塩基配列は 2000 年に決定された。核ゲノムにコードされる全遺伝子 27,000 種は、トランスポゾンタギングや T-DNA タグラインの整備により、データベースを利用すれば、任意の遺伝子の破壊株の種子を入手することができる。本研究計画は上記のようにゲノム解析が終了し、かつ破壊株等の遺伝資源が豊富に整備されているシロイヌナズナを用い、2090 の核ゲノムコードの葉緑体タンパク質遺伝子の破壊株を集め、分子遺伝学的、生理学的、生化学的解析等を組み合わせた多角的かつ網羅的な解析アプローチにより葉緑体タンパク質の網羅的な解析を行うことを目的としている。

葉緑体の形態形成、光合成、光応答、物質生産に関する新規の葉緑体タンパク質遺伝子を多数同定することは、二酸化炭素固定能や貯蔵物質の集積能向上など



の同化能力強化による植物生産性の向上

を行うための重要な情報となる。また、現在までに、葉緑体タンパク質の網羅的な解析を行った研究はなく、豊富なパイオリソースがそろった現在、多くの破壊株を用いて葉緑体タンパク質の研究を行うことはとても重要である。

さらに、本研究はシロイヌナズナの葉緑体タンパク質遺伝子変異体を用いた、詳細なトランスクリプトーム解析、プロテオーム解析、あるいはメタボローム解析へと発展させ、ポストゲノム時代の一領域を築くための第一段階の研究として、今後の大きな発展が期待できる。

同定された葉緑体の形態形成、光合成、光応答、物質生産に関する葉緑体タンパク質遺伝子の過剰発現植物体を作成し、光合成機能や葉緑体機能の向上を目標としている。

2. 研究経過

1) 2090 の核コードの葉緑体タンパク質遺伝子の破壊株を収集した。

我々が作製したトランスポゾンタグライン 17600 ラインより、予測プログラムにより予測された 2090 の核コードの葉緑体タンパク質遺伝子の破壊株を集め、ホモ変異体株を作製した。また、トランスポゾンタグラインの中に破壊株がないものは、ABRC ストックセンター (SALK T-DNA tag lines <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) より T-DNA のタグラインより集め、約 70% の破壊株を収集することができた。

2) 上記の破壊株を用いて、クロロフィル

蛍光、老化、クロロフィル分解などを指標に様々なスクリーニングを行った。また、多数のアルビノ変異体の単離を単離することができた。収集した破壊株のうち約 700 ラインの表現型を観察した結果、約 10% が形態異常や色素異常が観察された。

3) 可視的な表現型の変化が見られない変異体のフェノタイピングを行うために、代謝物プロファイリングによってフェノタイピングを行う。

超高分解能を持つフーリエ変換イオンサイクロトロン型質量分離装置 FT-MS を用い、代謝産物に影響がでている変異体のスクリーニングを行う。変異体より、代謝産物の網羅的データから遺伝子機能同定をおこなうために、メタボロミクスデータによって、どのようなグループ分けができ、それが想定される当該遺伝子機能と一致するか検討する。そのために、各種光合成阻害剤処理した植物体の代謝産物の網羅的データを蓄積させる。その後、変異体のデータや光合成阻害剤処理植物のデータの比較検討を行う。データ解析として、主成分分析 (principal component analysis; PCA) や階層的クラスタリング (hierarchical cluster analysis; HCA) を行う。

上記の研究計画を行う前に、既に原因遺伝子の機能が解っている *apg* 変異体を用いて、メタボロミクス解析を行った。

4) 2) のスクリーニングによって得られたアルビノ変異体について下記の実験を行い、原因遺伝子の機能を類推した。

a) 光合成収率測定器 (MINI-PAM: アースサイエンス社) を用いた、クロロフィル蛍光強度により F_v/F_m などのパラメーターの測定。

b) 強光、弱光条件下での生育による光依存的白化の有無の観察。

c) 電子顕微鏡観察による葉緑体の形態の観察。

5) *apg* 変異体のプロテオーム解析: *apg* 変異体のプラスチドの単離し、野生型の葉緑体タンパク質と比較を行い、原因遺伝子の機能を類推する。単離したプラスチドより、単離したプラスチドを抽出し 2D-PAGE を用い、変異体と野生型の葉緑体タンパク質の比較を行ない、異なるタンパク質のスポットの同定を MALDI-TOF MS 法により行なっている。

3. 研究成果

1) 核コードの葉緑体タンパク質遺伝子の破壊株の収集、及びそのホモ個体の表現型解析はほぼ完了し、たくさんのアルビノ変異体が得られ、大きな成果があった。

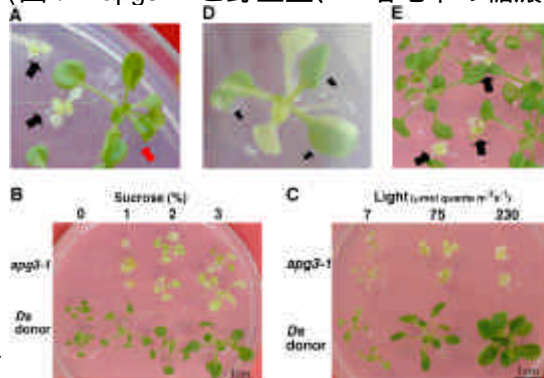
2) 収集した破壊株を用いて、様々なスクリーニングを行った結果、老化やクロロフィル分解に関係する変異体は単離することはできなかったが、共同研究者によって、葉緑体遺伝子の editing factor が単離され、成果が PNAS に研究論文として発表された。

3) メタボロミクス解析: FT-MS を用い、*apg* 変異体の網羅的な代謝物プロファイリングにより、フェノタイピングを行なった。さらに、GC-MS を用い *apg* 変異体よりメタボロームデータを得、メタボロームデータとアジレントのマイクロアレーを用いたトランスクリプトームデータの統合し、アルビノ原因遺伝子の機能解析を行なった。

apg 変異体のメタボロミクスデータにより、グループ分けし、その分類体系が想定される当該遺伝子機能と一致するか検討したが、代謝系の遺伝子の変異体と葉緑体の形態形成に關与する遺伝子の変異体をわけることができたが、葉緑体の形態形成遺伝子間の顕著なメタボロミクスデータの違いは検出できず、機能解析に役立てることは難しく、成果は 100% あったとは言えない。

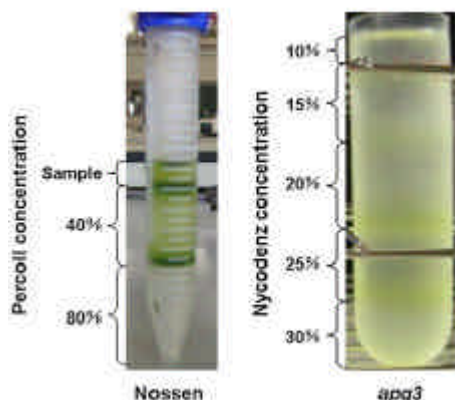
4) 得られたアルビノ変異体の *apg3* を詳細に解析した。*apg3* 変異体の原因遺伝子が葉緑体で機能するリボソーム解離因子 1 であることを証明した。葉緑体で機能するリボソーム解離因子 1 が機能できなくなったことにより、リボソーム解離因子 1 によりリボソームから解離される葉緑体タンパク質が正常に作られないため、アルビノ変異体になった。

(図: A: *apg3-1* と野生型、B: 培地中の糖濃



度の影響、C:光強度の影響、D:apg3-1 より生じた復帰変異部位、トランスポゾンが転移し、原因遺伝子から抜け出た箇所が表現型が回復し緑になる、E:apg3-2,apg3-1のアレル)

5) apg 変異体のプロテオーム解析のためにアルビノ変異体のプラスチドの単離法を確立した。



(図：ノッセンの葉緑体とアルビノ変異体 apg3 のプラスチド)

4. 今後の課題と発展

核コードの葉緑体タンパク質遺伝子の破壊株より、クロロフィル蛍光が異常な変異体がいくつか単離された。得られた変異体の原因遺伝子の機能とクロロフィル蛍光の表現型の関係の解析を行うことによって、光合成機能に関するタンパク質の同定が可能になる。また、得られたアルビノ変異体の多くの原因遺伝子が mRNA の安定性、プロセッシングに参与するものであった。今後、これらの原因遺伝子の機能解析を進め、核コード葉緑体タンパク質による葉緑体ゲノム遺伝子の転写後調節の研究に大きく貢献する。多くの葉緑体ゲノムコードのタンパク質の転写後調節をコントロールすることにより、翻訳活性が上がり、葉緑体機能の強化が期待できる。アルビノ変異体の網羅的な代謝プロファイリング法を確立し、アルビノ変異体のメタボロミクスデータにより、グループに分けることができ、それが想定される当該遺伝子機能と一致するか検討したが、

代謝系の遺伝子の変異体と葉緑体の形態形成に関する遺伝子の変異体をわけることができたが、葉緑体の形態形成遺伝子間の顕著なメタボロミクスデータの違いは検出できなかった。

5. 発表論文リスト

Reiko MOTOHASHI, Takanori YAMAZAKI, Fumiyoshi MYOUGA, Takuya ITO, Koichi ITO, Masakazu SATOU, Masatomo KOBAYASHI, Noriko NAGATA, Shigeo YOSHIDA, Akitomo NAGASHIMA, Kan TANAKA, Seiji TAKAHASHI, and Kazuo SHINOZAK

Chloroplast ribosome release factor 1 (Atcprf1) is essential for chloroplast development. *Plant Molecular Biology*. (2007) 64:481-497.

Kenji Okuda, Fumiyoshi Myouga, Reiko Motohashi, Kazuo Shinozaki, Toshiharu Shikanai

Conserved domain structure of pentatricopeptide repeat proteins involved in chloroplast RNA editing. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2007) 104: 8178-8183

Takanari Ichikawa, Miki Nakazawa, Mika Kawashima, Haruko Iizumi, Hirofumi Kuroda, Youichi Kondou, Yumi Tshara, Kumiko Suzuki, Akie Ishikawa, Motoaki Seki, Miki Fujita, Reiko Motohashi, Noriko Nagata, Tomoko Takagi, Kazuo Shinozaki and Minami Matsui

The FOX hunting system: an alternative gain-of-function gene hunting technique. *Plant J*. (2006) 45 : 974 –985

Fumiyoshi Myouga, Reiko Motohashi, Takashi Kuromori, Noriko Nagata and Kazuo Shinozaki

An Arabidopsis chloroplast-targeted Hsp101 homologue, APG6, has an essential role in chloroplast development as well as heat-stress response. *Plant J*. (2006) 48 : 249 –260