

# 葉緑体シグマ因子結合タンパク質 Sib1 の機能解析

(応用生物学分野) 原田 礼忠

## < 緒言 >

葉緑体(色素体)は、120~180 kbp ほどの環状二本鎖 DNA を独自にもつオルガネラで、そのゲノムは 130 余りの遺伝子をコードしている。高等植物の葉緑体には、二種類の転写装置(RNA ポリメラーゼ)が存在する。一つは、色素体ゲノムにコードされた真性細菌型 RNA ポリメラーゼ(Plastid - Encoded Plastid RNA Polymerase 以降 PEP と呼ぶ)で、もう一つは、核にコードされたファージ型 RNA ポリメラーゼ(Nuclear - Encoded Plastid RNA Polymerase 以降 NEP と呼ぶ)である。光合成遺伝子の多くは PEP により転写される。PEP の構造は、四種のサブユニットで構成されるコア酵素と、色素体シグマ因子から成り、シグマ因子がプロモータを認識することで転写が開始される。色素体シグマ因子は、葉緑体に複数種存在し、その遺伝子は核ゲノムにコードされている。アラビドプシスの核ゲノムには 6 種類の色素体シグマ因子の遺伝子が存在しており、At Sig1 ~ At Sig6 と名づけられている。葉緑体分化や環境応答に伴って異なったシグマ因子群が働き、葉緑体の転写パターンが変化すると考えられている。

一方、バクテリアでは、シグマ因子結合タンパク質と呼ばれる一群の因子が存在し、遺伝子特異的に転写を制御している例が知られている。最近、葉緑体シグマ因子の一つ Sig1 の領域 4 (-35 認識部位)に特異的に結合するタンパク質がクローニングされ、Sib1 (sigma factor binding protein 1) と命名された。葉緑体でも、バクテリアと類似な機構でシグマ因子の機能が制御されている可能性が考えられる。しかし Sib1 は既知のタンパク質との相同性が低いタンパク質であり、その機能は解明されていない。葉緑体アレイを使うと葉緑体にコードされた 100 数十の遺伝子の発現パターンを網羅的に調べることができる。本研究では、アラビドプシス葉緑体遺伝子の一部を使った葉緑体アレイを作成し、Sib1 過剰発現体およびアンチセンス発現体の葉緑体転写パターンへの影響を調べた。

## < 材料と方法 >

### . 植物と生育条件

森川ら(2001)が作製したシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*, columbia) Sib1 センス系統 4 種(S1/S15/S18/S57)、アンチセンス系統 4 種(AS16/AS20/AS24/AS27)、ベクターコントロール系統 2 種(101-8/101-56)の T<sub>3</sub> 世代および野生型(columbia)を実験に用いた。各植物は、24 日間、定常光(7.78  $\mu$  mol/m<sup>2</sup>)で 25 °C で育てた。約 0.5 g の口ゼツタ葉を採取し RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)を用いて細胞全 RNA を抽出した。また、森川らは、強光下(92.86  $\mu$  mol/m<sup>2</sup>)においた Sib1 過剰発現体の若いシードリング葉緑体が未発達することを報告している。そこで強光下(150  $\mu$  mol/m<sup>2</sup>)および弱光下(7.0  $\mu$  mol/m<sup>2</sup>)で 10 日間育てたシードリングからの RNA も調整した。

### . 葉緑体 DNA アレイの作製

葉緑体アレイにプロットする遺伝子として 17 種類を選んだ。シロイヌナズナのゲノム DNA をテンプレートに各遺伝子特異的プローブを用いた PCR を行い、目的葉緑体遺伝子を増幅した。この増幅断片を PCR 精製 kit(Qiagen)で精製し、分光光度計により DNA 濃度を測定した。さらに、50 ng の精製断片を電気泳動し、DNA 濃度、増幅断片のサイズ、精製度を確認した。その後、各 DNA プローブは変性処理を行い、100 ng ずつナイロン膜にドットプロットした。

### . RNA ラベリング

細胞全 RNA 2  $\mu$ g を鋳型に各 DNA プローブの 3'プライマー-0.4 pmol の混合物を用いて逆転写反応を行った。この時、反応液に [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP(50  $\mu$ Ci)を基質として加え cDNA を <sup>32</sup>P ラベルした。ラベルした cDNA は放射能測定後、1,000,000 cpm 相当を 8ml のハイブリダイゼーションバッファーに加え、60 °C で 18 時間ハイブリダイズした。ハイブリダイズ後のナイロン膜は、0.2 x SSC、0.1% SDS 溶液中で 65 °C、15 分間の洗浄の洗浄を 2 回行い、オートラジオグラフィーかけた。

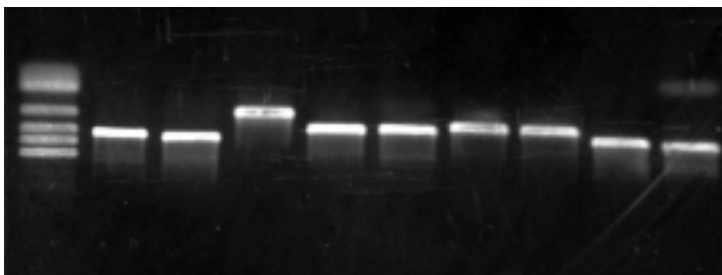
## < 結果と考察 >

### 葉緑体 DNA アレイ

図 1 に、DNA プローブとして用いた PCR 断片の電気泳動図を示す。今回用いたプローブは、光合成遺伝子 10 種(psbA/psaA/psbB/psbD/psbEFLJ/psbC/atpA/atpB/rbcL/ndhF)、tRNA 遺伝子 2 種(trnDYE/trnV)、rRNA 遺伝子 1 種(rrn16)、RNA ポリメラーゼ遺伝子 3 種(rpoA/rpoB/rpoC1)、ORF

遺伝子 1 種(ORF350)である。各断片は 700 bp ~ 800 bp の長さで、全て予想サイズに一致した。又、各サンプルは特異的な増幅断片のみを含み、その量は完全に一定であった。そこで、各葉緑体遺伝子プローブと、Sib1 およびコントロール DNA2 種(pBSK+, DNA/Hind digest)をナイロン膜に 100ng ずつプロットし葉緑体アレイを作製した。

DNA trnEYD ndhF atpA ORF350 psbC rpoC1 trnV psaA psbD



trn16 rbcL rpoB rpoA psbEFLJ psbB atpB

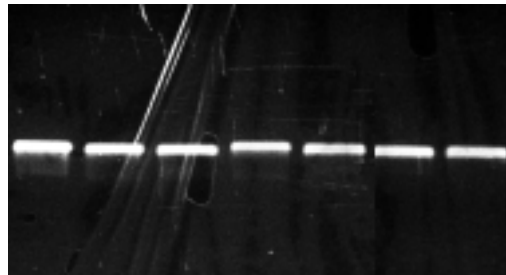


図 1 電気泳動による PCR 断片の確認

各 PCR 断片 50 ng をアガロース電気泳動にかけた。バンドシグナルは DNA 濃度に比例する。各バンドは完全に同じ強度であった。

### DNA アレイによる葉緑体遺伝子の発現解析

定常光照射で育てたアラビドプシスのセンス系統(S-18)、およびコントロール系統(101-8)から調整した RNA を用いてハイブリダイズを行った。図 2 に、各プローブにハイブリダイズした放射能をシンチレーションカウンタで測定した。ベクターコントロールの 101-8 系統では、pabA > rrn16、psbB > rbcL、psbD、trnEYD の順で強くハイブリダイズしていた。これは、独立して DNA アレイを使った別の実験でも同じ結果を示した。しかし、他のハイブリシグナルの弱いプローブでは、コントロール実験間でデータのバラつきが見られた。次に、S18 のセンス系統とベクターコントロールの 101-8 系統の比較を行った。S18 系統の場合も psbA シグナルが最も強く、rrn16、psbB、rbcL、psbD、などのシグナルがそれに次いでいた。実験間のバラつきが大きく、明確な結論は言えないが、S18 系統ではコントロール系統との大きな遺伝子発現パターンの差は無いように思われる。今後、ナイロン膜へのプロットングおよびハイブリダイズ条件を最適化し、プローブ数を増やすと共に、全てのセンス、アンチセンス系統での遺伝子発現パターンを調べる。これにより、シグマ因子結合タンパク質 Sib1 によって特異的に制御されるプロモータを同定できると期待できる。

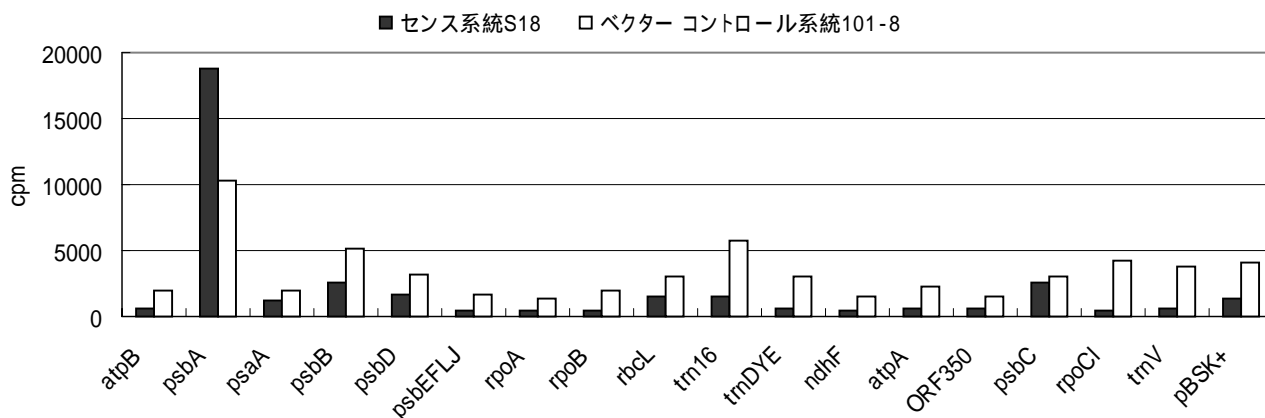


図 2 : 各プローブにハイブリダイズしたプローブの放射能.

各プローブ部位をナイロン膜から切り出し、その放射能を液体シンチレーションカウンタで計測した。

### <参考文献>

森川一也(2001) : Dr thecis