

シロイヌナズナ葉緑体遺伝子群における転写発現挙動の解析

(応用生物) 大庭篤

1 序論

植物は、光を光合成のためのエネルギーとして利用するだけでなく、形態形成や環境応答のための最も基本的な環境シグナルとしても利用している。生命活動のエネルギーとして光を利用する植物は、周囲の光環境情報を的確に認識する必要があるためである。光の情報の中でも、青色光と赤色光といった光の波長は植物にとって重要な環境情報であり、植物の生長や、生殖器官である花芽の誘導、光合成器官である葉緑体の分化などは、光の波長の光に応じた制御を受ける。2000年に全ゲノム配列の解読が完了したモデル植物シロイヌナズナを中心に、ゲノム情報を元にして、種々の光シグナル伝達に関わるレセプターやシグナル伝達因子の同定が進んでいる。

高等植物において、光合成反応は植物特有の細胞内小器官(オルガネラ)である葉緑体で行われる。葉緑体は核とは半独立的なオルガネラであり、環状二本鎖の独自のゲノムを有する。葉緑体ゲノム上には約40の光合成にかかわる遺伝子、および約60のハウスキーピング遺伝子がコードされている。しかし、葉緑体中で機能するタンパク質の全ての情報が葉緑体ゲノム上にコードされているわけではなく、葉緑体機能にかかわるタンパク質複合体の多くは、その構成サブユニットが葉緑体ゲノムと核ゲノムの両者に分かれてコードされている。例えば、光化学反応中心を持つ重要な複合体光化学系II(PSII)複合体は、約20種のサブユニット構成タンパク質の内、13種は葉緑体ゲノムに、残りは核ゲノムにコードされている。両ゲノム間に分かれてコードされた複数の遺伝子群がそれぞれ光環境に応じて適切に発現する必要がある。また、両ゲノム間での密接な情報交換も重要となる。

このような葉緑体ゲノム上の遺伝子が発現していく過程では、様々な段階で制御を受けるが、それらの内、発現の初期過程である転写反応も光環境による制御を受ける。葉緑体遺伝子の転写には、バクテリオファージ型のNEP(nuclear-encoded plastid RNA polymerase)と、バクテリア型のPEP(plastid-encoded plastid RNA polymerase)の2種類のRNAポリメラーゼが関与しており、特にPEPは主に光合成関連遺伝子の転写を司る。この酵素は、バクテリアの転写酵素と非常に良く似たサブユニット構成をしており、転写反応を触媒するコア酵素(、、'、"サブユニット)部分と、バクテリアにおいては転写反応を開始段階で制御する機能を持つシグマ因子群から成っている。原核生物ではシグマ因子が複数存在しており、これらが周囲の環境の変化や細胞の成長段階に応じて使い分けられて異なる遺伝子を認識することにより転写を制御している。これまでに、シロイヌナズナでは少なくとも6種類のシグマ因子遺伝子がクローニングされているが、それぞれの機能については解析が始まったばかりである。また、この酵素は構成タンパク質が二つのゲノムに分かれてコードされている。コア酵素を構成するタンパク質の遺伝子は葉緑体ゲノム上に、転写開始制御に関わるとされるシグマ因子の遺伝子は核ゲノムにコードされている。以上のことから、PEPの転写反応は、シグマ因子群を介して核ゲノムによる制御を受けるものと考えられている。このように、葉緑体遺伝子の発現は転写の段階で核ゲノム系の影響下にある。

高等植物は、細胞質中に複数種の光受容体を有する。これらの受容体は光の波長によって使い分けられており、植物は青色光や赤色光といった光の波長を検知することができる。これまでに、赤外光の受容体としてフィトクロム、青色光およびUV-Aの受容体としてクリプトクロム、青色光受容体としてフォトトロピンが知られている。光の波長や強度に応じて受容体を使い分けられていることを反映し、光の波長に依存して発現する遺伝子が存在する。例えば、PEPにより転写される葉緑体遺伝子 *psbD* 遺伝子は青色光に応答した転写活性を示す。この遺伝子は、PS

の光化学反応中心を構成する中心的なタンパク質である D2 タンパクをコードする。 *psbD* 遺伝子の上流にある光応答プロモーター (*psbDBLRP*) は、青色光に反応して活性化されるが、最近、葉緑体シグマ因子 Sig5 が核から葉緑体へ青色光シグナルを伝達し、*psbDBLRP* の活性化をすることが判明した。この Sig5 をコードする遺伝子 *AtSIG5* も、青色光特異的に発現する。

このように、植物体が光の波長に応じて葉緑体遺伝子の活性を制御する機構については一部明らかにされつつある。しかしながら、植物細胞の光シグナル伝達系は非常に複雑なネットワークを構成しているため、その一端が判明しているに過ぎない。そこで、本研究では光の情報伝達に関わる分子機構の全容解明を目指し、光の波長に依存して発現する遺伝子群の同定を試みた。まずは、マクロアレイ法を用いて *SIG5* 遺伝子と同様に青色光特異的に発現する遺伝子をシロイヌナズナにおいて網羅的に探索した。青色光情報伝達に関わる因子や、光の波長に依存して発現し光合成活性制御に関わる新規遺伝子の同定を目指した。次に、RT-PCR 法およびノザン解析を用いて、葉緑体遺伝子の中から青色光あるいは赤色光により特異的に発現する遺伝子群を探索した。発現挙動が一致する遺伝子が複数見出されれば、それらの上流プロモーター配列を比較することにより、転写制御に関わる共通の因子の同定が可能となる。最後に、前述の二つの方法によって見出されるであろう新規の光シグナル伝達因子遺伝子が、実際に *in vivo* で転写にかかわっているのかを検証するためのシステムの確立を行った。目的遺伝子をプロトプラスト中で一過的に強制発現させ、run-on 転写実験により葉緑体中における転写活性の変動を測定する。この実験手法は、比較的迅速に転写活性を調べることが可能である。本実験においては、*AtSIG5* をプロトプラストに導入し、Sig5 が直接に *psbD* 遺伝子の光応答転写を制御し得るのかを検証した。

2 結果および考察

2.1 青色光・赤色光特異的に発現する遺伝子の網羅的な探索

植物体は、細胞質中に複数種の光受容体を有する。これら受容体は光の波長によって使い分けられており、植物は青色光や赤色光といった光の波長を検知することができる。光受容体を構成する蛋白質は、全てが核ゲノムコードである。したがって、植物体が受容した光の波長の情報は、核ゲノムにおける遺伝子発現を介し、オルガネラ遺伝子まで到達することになるが、この間に関与し得る光シグナル伝達経路の全容は未だ明らかにされていない。そこでまず、青色および赤色発光ダイオード (470nm、660nm) を用い、波長特異的に反応する遺伝子について網羅的な探索を行った。青色光に特異的に発現する遺伝子を探索する際には、青色光特異的に発現するシグマ因子遺伝子 *SIG5* の発現を指標とした。*SIG5* 遺伝子の発現が誘導される光条件で生育させた植物体を解析対象に用いれば、他の青色光情報伝達に関わる因子や、この波長の光に依存して発現する光合成活性制御に関わる新規遺伝子の同定が期待でき、光受容体からオルガネラ遺伝子に至るまでの細胞内シグナル伝達系の全容解明につながるものと考えられる。

遺伝子発現解析にはマクロアレイシステムを用いた。本研究では、かずさ DNA 研究所が保有するシロイヌナズナ EST クローン 13,520 個をプロットしたマクロアレイを利用した。

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*, Columbia 株) を 22 日の明条件下で播種後 30 日間育成した。16 時間の暗処理をおこなった後に、シロイヌナズナに青色光 (470nm, 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) および赤色光 (660nm, 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) を 2 時間照射した。各植物体のロゼット葉から mRNA を抽出し、これらを鋳型として RT-PCR 反応を行い、各生育条件下におけるロゼット葉中における *SIG5* (*AtSIG5*) および *sib1* 遺伝子の mRNA 蓄積量を測定した。これまでの知見同様 *SIG5* が mRNA 蓄積レベルで青色光特異的に誘導され、*sib1* の発現は光波長に依存していないことが確認され、今回もちいた光照射条件および試料調製条件が適当であることが確認された。

次に、抽出した mRNA を鋳型として逆転写反応を行い、マクロアレイのハイブリダイゼーションに用いる cDNA プローブの作成を行った。プローブの標識には [^{-32}P]dCTP を用いた。0.1 μg のプローブを含むハイブリパッファーマー中でマクロアレイをハイブリダイゼーションを行

った。オートラジオグラフィーにより、青色光、赤色光によって発現が誘導される遺伝子を可視化したところ、ほとんどの遺伝子で青色光・赤色光の両サンプルの発現が同程度であったが、青色光により特異的に誘導される遺伝子が 186 個(全 13520 個中)存在していた。(表 1)

表 1 青色光特異的に発現が見られた遺伝子の応答の強さと局在

* 目視で、+++は+の@倍程度、++は+の@倍程度

Location	+++*	++*	+*
C : Chloroplast	8	11	22
M : Mitochondrion	0	4	8
S : Secretory pathway	2	5	11
- : any other loction	0	0	66
: no data	0	0	48

次に、青色光特異的に応答する 186 遺伝子の中から 9 遺伝子に注目し、これらの遺伝子産物が実際に照射光の波長に依存して発現しているかどうかについて、RT-PCR 法による検証を行った。マクロアレイの cDNA プローブ作成に用いた際と同じ試料(青色光、あるいは赤色光を照射した植物体の口ゼット葉)から TotalRNA を精製し、0.0625 μg を鋳型として全量 25 μl の反応系で RT-PCR を行った。9 遺伝子のうち 3 遺伝子については RT-PCR における増幅量とマクロアレイの発現パターンは一致していないが、のこりの 6 遺伝子に関しては双方のパターンが一致していた。よってこれら 6 種の遺伝子について、青色光の照射による遺伝子発現の活性化が、mRNA 蓄積レベルで生ずることが見出された。これらの遺伝子に関し、コードしているタンパク質の機能、あるいは青色光情報伝達系上での役割等については、現段階では不明である。これら個々について、さらなる解析が必要である。

2.2 青色光・赤色光特異的に発現する葉緑体遺伝子の同定

葉緑体遺伝子の個々の機能は知られているが、多くの場合それらの遺伝子群に共通して存在するであろう光応答発現の分子機構については不明である。同じ波長の光に誘導される葉緑体遺伝子群が複数同定することができれば、上流プロモーター配列を比較することにより、転写を共通に制御している転写因子の同定が可能となる。そこで、幾つかの葉緑体遺伝子群について、光波長特異的な発現が見られないか解析を行った。mRNA 蓄積のレベルでの遺伝子発現量の解析に、まずは RT-PCR 法を用いた。シロイヌナズナを播種後 30 日間明条件下で生育し、16 時間の暗処理をおこなった後に、青色光(470nm, 5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)および赤色光(660nm, 5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)を 2 時間照射した。各植物体の口ゼット葉から TotalRNA を抽出し、これらを鋳型に RT-PCR を行うことにより、*psbD*, *rrn16*, *rrn23*, *rpoA*, *ndhH*, *petA*, *ndhG*, *orf184*, *orf350*, *psbEFLJ*, *rbcL*, *rpl33*, *rpoB*, *trnA*, *trnG*, *trnL*, *trnI*, *atpA*, *atpB*, *psaA*, *psbA*, *psbC*, *rpoC1*, *rps2*, *rps4*, *trnV* 遺伝子の発現量を測定したところ、*rpoA* の青色光による遺伝子発現量の減衰、*petA*(図 1)および *ndhH* の赤色光による光応答、*orf184* の赤色光における遺伝子発現量の減衰、*rpoB* および *rbcL*(図 1)の光応答など、本手法によりこれまで知られていなかった新規の光応答現象が示唆された。また、これまで知られているように *psbD* が赤色光特異的に光応答することも確認した(図 1)。



図 1 RT-PCR 結果(一部)

次に、RT-PCR によって同定された光応答遺伝子のうち *psbD*, *petA*, *pabEFLJ*, *rbcL*, *rpl33* についてノザン解析を行い、遺伝子発現量を定量するとともに、RT-PCR 結果との再現性について確かめた。コントロールとして光に依存せずに一定の発現量を示す *psbA* を用いた。シロイヌナ

ズナを播種後 30 日間明条件下で生育し、24 時間の暗処理をおこなった後に、青色光 (470nm, 5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) および赤色光 (660nm, 5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) を 2 時間照射した。対照実験として明条件のみで育成した植物体および暗処理のみをおこなった植物体も準備した。各植物体のロゼット葉から Total RNA を抽出し、ノザンプロットングをおこなった。遺伝子特異的プローブの標識には [^{-32}P]dCTP を用い、各植物体から得た Total RNA 7.5 μg に対して 50ng のプローブを 55 で 20 時間ハイブリダイズさせた。メンブレンを最終的に 0.1 \times SSC, 0.1% SDS で洗浄したのちイメージングプレートに 20h 時間露光した。psbD, psbA の 2 遺伝子については RT-PCR の結果と一致していたが、petA, psbEFLJ, rpl33, rbcL のように RT-PCR とノザン解析とで、手法により得られた結果が一部一致しないものもあった。したがって、現段階では RT-PCR を本実験の目的のための初期解析ツールとして導入することは一般的には不適切であると結論せざるを得ない。しかしながら、psbD 遺伝子の場合のように RT-PCR とノザン解析とで同様の結果 (青色光特異的な発現) を示す場合もあることから、ノザン解析を行っていない他の遺伝子についてはノザン解析による検証が必要である。

2.3 青色光応答転写に関わるシグマ因子 Sig5

既に所属する研究室では、AtSIG5 が青色光特異的に発現することを mRNA レベルで確認している。青色光による psbD BLRP の活性化には AtSig5 の関与することも示唆されている。しかし、このシグマ因子が psbD BLRP に結合し発現調節を行っていることを示すような、より直接的な証拠はこれまで得られていなかった。そこで、シグマ因子 Sig5 を一過的に過剰発現させたプロトプラストを用いて run-on 転写実験を行うことにより、Sig5 が直接に psbD 遺伝子の光応答転写を制御し得るのかを検証した。

35S CaMV プロモーター下に AtSIG5 を接続したベクターを作成し、これを PEG 法によりロゼット葉から調製したプロトプラスト中に導入した。シロイヌナズナを播種後 28 日間明条件下で生育し、24 時間の暗処理をおこなった後にロゼット葉からプロトプラストを単離した。7.5 $\times 10^6$ 個のプロトプラストに対し、125 μg の CaMV35S プロモーターをもつ過剰発現ベクター pTM-AtSIG2 および pTM-AtSIG5 をそれぞれ形質転換した。[^{-32}P]UTP 存在下で run-on 転写を行い、各スポット 3 μg の遺伝子に特異的 DNA プローブを固定したメンブレンと 60 で 17 時間ハイブリダイズさせた。DNA プローブには psbA, psbB, psbD, psbEFLJ, ndhF, psaA, rpoA, rpoB, rbcL, atpB, pBR, trnEYD, rrn16S, AtSIG1 およびベクター pUC18 を用意した。メンブレンを洗浄した後、イメージングプレートに 50 時間露光し、図 2 の結果を得た。これらの結果は、Sig2 および Sig5、両者ともに 70 型の良く似たシグマ因子であるにもかかわらず、それぞれが異なるプロモーターを認識することを示している。また、psbD の転写活性の上昇は Sig5 においてのみ観察された。この結果は、Sig5 が psbD BLRP に結合し活性上昇に作用していることをより直接的に示すものである。青色光が受容された後に、その情報が psbD に至るまでのシグナル伝達系において、Sig5 が核と葉緑体間を仲介する転写制御因子として機能していることが確認された。

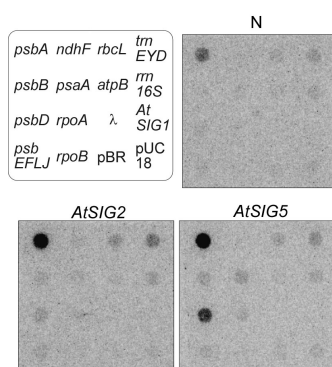


図 2: Sig2、および Sig5 を過剰発現させたプロトプラストを用いた Run-on 転写実験

パネル左上: 各メンブレン上にスポットされているプローブ遺伝子

N : 形質転換を行っていないプロトプラスト

AtSIG2: Sig2 を過剰発現させたプロトプラスト

AtSIG5: Sig5 を過剰発現させたプロトプラスト