

<研究紹介>

シロイヌナズナのトランスポゾンタグラインを用いた アルビノ原因遺伝子の解析

本橋令子（理化学研究所・ゲノム科学総合研究センター・植物機能情報研究グループ・植物変異開発研究チーム）

私は学生時代からトランスポソンの研究に大変興味があり、卒業後理化学研究所の篠崎一雄主任研究員のもとでシロイヌナズナのトランスポゾンタグライン作製の仕事を始めた。その頃はシロイヌナズナのゲノムプロジェクトが各国で始まり、ゲノム研究時代の幕開けの時代であった。トウモロコシのトランスポゾン *Ac/Ds* を用いたタグライン作製にもいろいろな苦労はあったが、ライン数が増えるのは嬉しい事であった（現在 17668 ライン <http://rarge.gsc.riken.go.jp/> より入手可能）。作製したタグラインを用いて、何か形質に注目して遺伝子の機能解析を始めるに当たり、どんな変異体をスクリーニングしようかと思いつくこと数ヶ月・・・私の所属するラボは環境ストレス応答の解析を網羅的に行っていたので、環境ストレス応答に関係する変異体のスクリーニングは専門家に任せ、自分は自然環境改善に寄与できるような植物固有のテーマでスクリーニングを行おうと考えた。そこで、篠崎先生の理解と助言により始めたのが、光合成活性を持つ葉緑体の特徴であるクロロフィルを欠くアルビノの表現型を示す変異体のスクリーニングであった。

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。このような核コードの葉緑体タンパク質の内、葉緑体形成に必須なものを網羅的に調べるために、9425 ラインの遺伝子破壊系統よりアルビノ変異体 87 ラインを単離した。その内、トランスポソンの挿入が原因でアルビノの表現型を示したラインは 38 ラインであった。これらの変異体を *albino or pale green (apg) mutant* と名付けた。*apg* 変異体の出現率は 0.4% で、タグ効率は 44% であった。現在までに 40 ラインのアルビノ変異体を集めることができた。得られた *apg mutant* の表現型には *pale green*、*albino*、黄色、双葉が白い変異体、斑入りなどがあり、植物体のサイズも野生型と大きさが変わらない変異体から小さいものまで、様々であった。各原因遺伝子 *APG* の構造と *Ds* の挿入位置には傾向はなかった。*Ds* の挿入の際に複数の遺伝子を含む大きな欠失が生じているラインも存在した。また、*TatC* 遺伝子は *Ds* 挿入のホットスポットであり、アルビノ 40 ラインのうち 8 ラ

インが *TatC* 遺伝子への挿入変異体であった。また、アノテーションされていない遺伝子に *Ds* が挿入してアルビノになったラインも確認された。各原因遺伝子 *APG* がコードするタンパク質の細胞内局在を TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) により予測した結果、葉緑体タンパク質は 25 ライン、ミトコンドリアタンパク質は 5 ライン、その他に核や細胞質に局在するタンパク質が 5 ラインあり、必ずしも葉緑体蛋白質が破壊されたことによりアルビノなどの表現型質を示すわけではなく、ミトコンドリア蛋白質もアルビノ原因遺伝子となる可能性があることが分かった。各アルビノ原因遺伝子 *APG* の シロイヌナズナゲノム中のコピー数をデータベースを用いて調べた結果、ほとんどが 1 コピーだった。相同性検索により、アルビノ原因遺伝子がどのような機能を持つか調べた結果、光合成や色素合成に関与する遺伝子以外に、タンパク質や脂質などの輸送に関わる遺伝子、転写のコントロール、翻訳など、様々な機能をもつ遺伝子が含まれていた。機能未知の遺伝子を破壊している変異体も 16 ラインあり、この原因遺伝子の機能を探る手がかりとして、葉緑体の形態、色素分析、強光などのストレス応答、発現解析を用いて機能の解明をおこなって行きたいと考えている。さらに各アルビノ原因遺伝子間の関係についても、今後考察していきたいと考えている。

得られた *apg* mutants の内、いくつかのラインについて詳細な解析を行っている。*apg1* mutant は、*pale green* 表現型を示し、野生型と比較すると小さく、土植えすると枯死した。また、クロロフィル量は野生型のクロロフィルの 1/5 量であり、光に弱く、光合成収率が 0 で、糖を加えないと生育できない。この *apg1* は葉緑体形成に異常が見られ、グラナラメラが減少し、不規則に並んでいる。また、好オスミウム顆粒も大きく異常な形をしており、グラナラメラの減少によりチラコイド膜に存在する脂質が集積していると考えられた。このような *pale green* で葉緑体異常を示す変異の原因遺伝子 *APG1* をクローニングした結果、一次配列はタバコとほうれん草の 37kDa 葉緑体内包膜タンパク質 (Dreses-Werringloer et al., 1991) と高い相同性を示した。この 37kDa タンパク質は、リン酸トランスロケータの次に内包膜に多く存在するタンパク質であることが 1982 年に Joyard 博士らによって報告されていた (Joyard et al., 1982)。GFP 融合タンパク質を用いた解析から、*APG1* の N 末領域が葉緑体への移行シグナルであることが確認された。また、この *APG1* 遺伝子は、メチルトランスフェラーゼと相同性があり、基質である S-アデノシルメチオニンが結合するモチーフと、産物である S-アデノシルホモシステインが結合するモチーフを持ち、C 末部分が膜に貫通していると考えられた。*APG1* は葉緑体の内包膜の主要な構成蛋白質で、細胞分裂の盛んな若い組織で多く発現していることから、葉緑体形成初期に包膜で働くメチルトランスフェラーゼであると考えられた。そこで、内包膜に多く存在し、メチル化のステップを経て合成されるプラストキノンと α -トコフェロールの量を HPLC によって *apg1* と野生型で調べてみた。 α -トコフェロールのピークは残念ながら野生型でも検出できなかったが、野生型において検出できるプラストキンは、*apg1* では検出できなかった。この結果から、*APG1* は内包膜におけるプラストキノンのメチル化に関与していることが示唆された。20 年前に 37kDa の内包膜タンパク質を単離、精製した J. Joyard 博士が去年来日した際に、*APG1* について大変有意義なディスカッションをすることが出来た。博士の助言の甲斐もあり、論文として報告することが出来た (Motohashi et al., 2003)。

apg2 は完全なアルビノの変異体であった。このようにシビアな表現型を示す *apg2* の葉緑体は、全く内膜構造がなくなり、白い大きな液胞のようなものと好オスミウム顆粒が目立つ異常なプラストイドになっていた。このアルビノ変異の原因遺伝子 *APG2* は、*Ds* の挿入の Hot spot になっており、染色体 2 番の長腕 NOR の近傍の遺伝子であった。*APG2* は構造からチラコイド膜を 6

回貫通する内在性膜タンパク質と考えられ、*APG2* と相同性をもつ遺伝子をデータベースによって調べたところ、バクテリアの形質膜や葉緑体のチラコイド膜へのタンパク質透過に関与する膜透過装置（トランスロケーター）の一つである、 Δ pH 依存性経路の構成因子である *tatC* と高い相同性があった。このトランスロケータは *Sec*、*SRP* 依存性経路と異なり ATP や GTP のようなエネルギーやストロマ因子を必要とせず、プロトンの濃度勾配によってチラコイドにタンパク質を透過させる。バクテリアですでに配列が得られている *tatC* 及び、*tatC* ホモログと配列を比較したところ、N 末の部分がシロイヌナズナ *APG2* では長くなっており、この部分が葉緑体移行シグナルであることが GFP 融合タンパク質によって確認された。次に *APG2* 遺伝子がどのような組織で発現しているかを調べた。花や根ではほとんど発現しておらず、葉などの光合成器官で強く発現していることがわかった。このことから、*APG2* は光合成の盛んな組織で、核コードの葉緑体蛋白質である OE23、OE17、PSI-N などの光合成蛋白質を盛んにトランスロケートしていると考えられた。*apg2* で葉緑体蛋白質がどうなっているか調べたところ、 Δ pH 依存性経路によりチラコイドに移行するタンパク質である酸素発生複合体の 23K タンパク質 (OEC23) は、*apg2* では検出されなかった。また、*SRP* 依存性経路によりチラコイドに移行するタンパク質であり、光化学系 II の反応中心である D1 蛋白質、集光性複合体である LHC も *apg2* では検出されなかった。一方、ルビスコの大サブユニット、小サブユニットは野生型とほとんど変わらなかった。各遺伝子の発現は *apg2* においても正常であったことから、これらの蛋白質が検出されないことはチラコイドへ移行されずに、分解されたと考えられる。また、 Δ pH 依存性経路によりチラコイドタンパク質が輸送されないため、チラコイドが形成されず、他の輸送経路で輸送されるチラコイドタンパク質も分解されたと考えられる (Motohashi et al., 2001)。

apg3 は、*green* を帯びたアルビノ表現型を示す。原因遺伝子 *APG3* をクローニングした結果、原核生物の polypeptide chain release factor の RF-1 と高い相同性を示した。RF-1 は翻訳の最終段階で、ポリペプチドがついた t-RNA がリボソームの p-site に結合した時、mRNA の示す終止コードの A-site の UAA、UAG を認識し、完成したポリペプチド鎖をリボソームから遊離させる働きを持つ。*APG3* が真核生物の終結因子ではなく原核生物の終結因子と相同性があることは興味深い。さらに N 末領域の相同性低い領域が葉緑体への移行シグナルであると予想されたことから、この *APG3* 遺伝子が原核生物型の葉緑体の翻訳終結因子であると考えられた。

研究を始めた当初は独りで進めていたアルビノ変異体の解析も、現在は明賀史純研究員と学生の高崎高紀君がメンバーに加わり、その解析の幅を広げている。また、上記のようなシビアな変異だけでなく、微妙な表現型に着目した変異体のスクリーニングを東京大学の園池先生と共同で行っている。今後は、藍藻の遺伝子破壊株とシロイヌナズナにおける相同遺伝子の破壊株の表現型比較や、T-DNA tag line、activation tag line から得られたアルビノ変異体の比較解析など、他の研究グループとの積極的な情報交換と研究協力をより一層進めていきたいと考えている。そのような協力体制のもとで多くの光合成や葉緑体形成に関与する遺伝子の機能が解明されることにより、葉緑体機能、光合成機能を増強させた植物の作出にも近付けるのではないかと期待している。

Dreeses-Werringloer, U., Fischer, K., Wachter, E., Link, T.A. and Flügge, U.-I. (1991) *J. Biochem.* 195, 361–368.

Joyard, J., Grossman, A., Bartlett, S.G., Douce, R. and Chua, N-H. (1982)
J. Biol. Chem. 257, 1095–1101.

Motohashi, R., Ito, T., Kobayashi, M., Taji, T., Nagata, N.,

Asami, T., Yoshida, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2003)
Plant J. 34, 1–13.

Motohashi, R., Nagata, N., Ito, T., Takahashi, S., Hobo, T., Yoshida, S.
and Shinozaki, K. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 10499–10504.