

立教大学学術推進特別重点資金（立教 S F R）
大学院生研究
2004年度研究成果報告書

研究科名	立教大学大学院			理学 研究科	生命理学 専攻
指導教員	所属・職名		氏 名		
	生命理学科・助教授		関根 靖彦 印		
自然・人文の別	自然	・ 人文	個人・共同の別	個人	・ 共同 3名
研究課題	葉緑体における RecA 相同タンパク質の機能解析				
研究代表者	在籍研究科・専攻・学年		氏 名		
	理学研究科生命理学専攻 博士前期過程 2年		井上 貴之 印		
研究組織	在籍研究科・専攻・学年		氏 名		
	理学研究科生命理学専攻 博士後期過程 1年		小田原 真樹		
	理学研究科生命理学専攻 博士前期過程 2年		桑沢 重隆		
研究期間	2004年度				
研究経費	500 千円				

研究の概要 (200~300字で記入、図・グラフ等は使用しないこと。)

植物特有のオルガネラである葉緑体は、空気中の二酸化炭素を固定し、地球上の生物の生存に必須の有機物の合成を行なう。この葉緑体に存在する DNA は、活性酸素や太陽光から受ける紫外線(UV)により頻繁に損傷を受けており、葉緑体の機能維持には DNA 損傷の修復が不可欠であると予想されるが、その機構は不明である。本研究は原始紅藻(シゾン)とヒメツリガネゴケの2つの植物を各々の特色を活かした形で用いて、葉緑体 DNA の修復に関与していると考えられる RecA 相同タンパク質の機能解析及びこのタンパク質と共同して働くタンパク質の同定を行うことにより、ほとんどが未知である葉緑体 DNA の修復機構の解明を目指す研究を行う。

キーワード (研究内容をよく表しているものを3項目以内で記入。)

[葉緑体] [RecA] [DNA 組換え修復]

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)

我々はヒメツリガネゴケの核ゲノムにバクテリアの *recA* 遺伝子と相同性が高い 2 つの遺伝子を発見し、*PprecA1*、*PprecA2* と命名した。さらに *PpRecA1* タンパク質はミトコンドリアへ、*PpRecA2* タンパク質は葉緑体へ移行することを見出した。DNA 損傷剤の投与により *PprecA2* 遺伝子の発現が誘導されることから、*PprecA2* 遺伝子が葉緑体 DNA の修復に関与していることを示唆した。また、シズンの核ゲノムには *recA* 相同遺伝子が唯一存在し、我々は *CmrecA* と命名した。高等植物では複数存在する *recA* 相同遺伝子がシズンでは 1 つしかコードされていないため、葉緑体とミトコンドリアの両方で機能している可能性が予想される。本研究はヒメツリガネゴケにおいて *PprecA2* 遺伝子及び遺伝子産物の機能解析を、シズンにおいて *CmRecA* タンパク質の局在解析及び *CmRecA* と共同して作用するタンパク質群の探索を行い、ほとんどが未知である葉緑体 DNA の修復機構の解明を目的とした。具体的には (1) *PprecA2* 遺伝子の変異株を作成とその性質の解析、(2) *CmRecA* タンパク質に特異的な抗体の作製と、その抗体及び GFP を用いた局在解析、(3) シズンのゲノムデータベース探索や DNA チップを用いた解析による葉緑体 DNA 修復に関与すると予想される遺伝子の網羅的探索を中心として解析を行った。その結果、葉緑体 DNA の修復を示唆する結果を得ることが出来た。

(1) ヒメツリガネゴケ *PprecA2* 遺伝子の変異株を作成とその性質の解析

申請時には *PprecA2* 遺伝子は植物の生育に必須であると考えられたため、部分的に機能が欠損した株を作成する予定であった。しかし、*PprecA2* 遺伝子の破壊株を取得することに成功し、この株の表現型の解析を行った。

既に取得済みである *PprecA1* 破壊株は、細胞が野生株に比べて太く短くなり、細胞分裂を経るごとに細胞の成長異常の程度が増加する。これは、*PprecA1* 遺伝子の欠損がミトコンドリア機能の異常をもたらし、細胞の生育を著しく悪化させていることを予想させ、*PprecA1* 遺伝子の機能の重要性を伺わせる。ミトコンドリア、葉緑体機能の重要性を考えると、*PprecA2* 破壊株も *PprecA1* 破壊株と同様の生育異常を引き起こすと予想された。ところが当初の予想とは異なり、得られた *PprecA2* 破壊株の通常培養条件下での生育、葉緑体や細胞構造の形態の解析を行ったが、野生株との違いは見られなかった。これは、ヒメツリガネゴケにおける *PprecA1*、2 遺伝子が果たしている機能の違いや葉緑体とミトコンドリアの DNA 修復機能の違いを示唆すると考えられる。葉緑体では *PprecA2* が関与する組換え経路とは別の組換え経路が存在している可能性が考えられるため、外来的に Dominant Negative 型 *RecA* を発現させて DNA 組換え機能を阻害する株も作成中である。

現在までの相補実験や発現解析の結果から *PprecA2* の DNA 修復への関与が示唆されたため、*PprecA2* 破壊株は DNA 損傷剤に対する抵抗性が低下していることが予想された。そこで、様々な DNA 損傷剤を添加したときの生育を野生株と比較した。添加した DNA 損傷剤は葉緑体 DNA の他にも核 DNA、ミトコンドリア DNA に損傷を引き起こすため、野生株、破壊株ともに生育阻害が起こってしまった。しかし、葉緑体で特異的に作用し葉緑体内の活性酸素量を増大させる薬剤であるパラコートを追加したところ、*PprecA2* 破壊株のみに顕著な生育阻害が見られ、パラコートに対する抵抗性が低下していた。これは、*PprecA2* が葉緑体 DNA の修復に関与していることを示唆する。

研究成果の概要 つづき**(2) シゾン CmRecA タンパク質に特異的な抗体の作製とその抗体及び GFP を用いた局在解析**

高等植物では複数存在する *recA* 相同遺伝子がシゾンでは 1 つ (*CmrecA*) しかコードされていないことから、CmRecA がどこに移行して機能するかは興味深い問題である。CmRecA-GFP 融合タンパク質をヒメツリガネゴケで発現させたところ、葉緑体ではなく、ミトコンドリアに移行していた。核コードの遺伝子が翻訳開始点の違いやスプライシングのされ方によって、2 種類のタンパク質を産生し、各々葉緑体とミトコンドリアへ移行する例は知られている。*CmrecA* の配列を解析したところ、推定される開始コドンの下流に開始コドンとなりうるコドンを見出した。この 2 つの開始コドンを翻訳開始点として使い分けることで、葉緑体とミトコンドリアの両方へ移行させている可能性を検証するため、それぞれの開始コドンから翻訳が始まるような *CmrecA*-GFP の融合遺伝子を作成し、現在その局在を解析中である。

シゾン細胞内での CmRecA の局在を解析するため、CmRecA 特異的な抗体を作製した。現在、この抗体を用いた免疫蛍光染色法、免疫電子顕微鏡法によって CmRecA の局在を解析中である。

(3) ゲノムデータベース探索、DNA チップを用いた解析による葉緑体 DNA 修復に関与すると予想される遺伝子の網羅的探索

DNA 組換え修復は、RecA タンパク質のみで行なわれるのではなく、他の因子との共同作業によって完遂される。従って、葉緑体 DNA の組換え修復も PpRecA2 と共同して働く因子が存在すると考えられる。全ゲノム配列が解読されているシゾンやシロイヌナズナのゲノムデータベースで、*recA* 相同遺伝子を発見したときと同様にバクテリアの組換えに関与する因子の探索を行なった。その結果、シロイヌナズナから DNA 組換えの後期過程に関与するタンパク質である *recG* と相同性の高い遺伝子を発見し、これを *AtrecG* と命名した。名古屋大学吉岡助教授の協力を得て、*AtrecG* cDNA を単離した。現在、*AtrecG* の DNA 修復能を大腸菌 *recG* 変異の相補実験により調べている。

生物が様々な環境変化に応答するためのシステムとして、遺伝子発現の調節があり、その中でも転写レベルにおける調節が第一の遺伝子発現調節機構として重要な役割を果たしている。大腸菌における DNA 損傷に対する応答もこれに準じ、細胞内に生じた DNA 損傷によって活性化された RecA タンパク質が引き金となり、ゲノムに存在する一連の (*recA* 遺伝子を含む) DNA 修復系遺伝子群の転写が誘導される (SOS 応答)。また、既に報告したように DNA 損傷剤処理により *PprecA2* mRNA の発現レベルが上昇する。このように葉緑体 DNA 修復では、葉緑体 DNA が損傷を受けたというシグナルを核 DNA に何らかの形で伝えられることによって、核にコードされる葉緑体 DNA 修復に関与する遺伝子の発現が誘導されると考えられる。シロイヌナズナの DNA チップを用いて、DNA 損傷剤処理によって発現が誘導される遺伝子を網羅的に探索した。2 倍以上の発現の上昇が見られる遺伝子のうち、オルガネラへの移行に必要なシグナルペプチドを持つ、DNA 修復に関与するモチーフを持つ (DNA 結合モチーフ、ヘリカーゼモチーフ、ヌクレアーゼモチーフなど) を条件に絞り込んだ結果、百数十の遺伝子を見出した。現在、それらの遺伝子がシゾンやイネなどで相同遺伝子が存在し、植物で共通して持つ遺伝子であるかどうかを解析中であり、この絞り込みで得られた遺伝子の幾つかを解析する予定である。