

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 11 年度博士課程進学  
氏名 中里 恵美  
指導教官 高橋 秀夫

## 論文題目

単細胞緑藻クラミドモナスにおける葉緑体 *recA* 遺伝子の構造と発現解析

生物にとって、複製や修復等の「DNA の維持」に関わる機能は必要不可欠である。この機能に関わる蛋白質の一つに大腸菌で特に詳しく研究されている *RecA* がある。*RecA* ホモログは原核生物から真核生物まで広く保存されており、構造的にも機能的にも大腸菌 *RecA* と類似性が高い。従って、*RecA* は生命現象の中核に関わる重要な蛋白質であると言える。

植物特有のオルガネラである葉緑体は、原始ラン藻が真核細胞に内部共生した結果発生したとされる。その根拠として、葉緑体は独自の DNA を持ち、核とは違う原核細胞型の転写、翻訳装置を持つことが挙げられる。また、これまでのところ不明な点が多いが、複製や修復といった機能も、原核細胞型のシステムで制御されていることが予想されていた。葉緑体 DNA の遺伝子数は進化の進んだ植物ほど少ない傾向がある。これは、進化の過程で葉緑体から核に遺伝子が移行したり、あるいは消失したりすることにより、葉緑体の機能が核ゲノムに依存するようになった結果と考えられる。葉緑体 DNA の維持機能にしても、葉緑体ゲノムに対応する遺伝子が見つからないことから、核ゲノムから供給されているのではないかと予想されていた。これらの予想を裏付けたのは、1992 年に高等植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) における、核コー

ドで葉緑体で機能すると考えられる大腸菌の RecA ホモログの同定である。シロイヌナズナ RecA (以下 AtRecA) は、N 末端側に葉緑体移行シグナルに特徴的なセリン・スレオニン残基に富む配列を持つことから、核から葉緑体に輸送されて機能する蛋白質と考えられた。この時、DNA の維持が原核型システムに依存するならば、AtRecA が核にコードされていることはつまり「葉緑体が DNA の損傷時には何らかのシグナルを核に伝達して RecA の発現、翻訳や輸送を促して葉緑体 DNA の維持を図っている」ことが予想されていた。この予想が確固たるものとなったのは、1993 年に提唱された「プラスチドシグナル」という概念である。プラスチドシグナルとしては、クロロフィル合成経路の中間体や活性酸素、カロテノイド等様々な候補が挙がっており、1993 年から現在までにそれぞれに解析が進んでいるが、ほとんどが光合成関連遺伝子に関してであって RecA のような核酸代謝関連遺伝子は全くと言って良いほどプラスチドシグナルの観点からは解析されていない。そこで、単細胞緑藻のクラミドモナスの RecA に着目し、プラスチドシグナルとの関連について解析することにした。クラミドモナスは一細胞あたりただ一つの葉緑体を持ち、高等植物と比較すると葉緑体の分化の形態や葉緑体 DNA のコピー数の少なさからも非常に単純な構造である。葉緑体から核へのプラスチドシグナルによる RecA の制御を検討するには適した生物であると考え、本研究では、クラミドモナス葉緑体 RecA の同定、構造解析からプラスチドシグナルの観点での発現制御の検討を行った。

#### 1) クラミドモナス葉緑体 RecA (CrRecA) の構造解析

大腸菌 RecA のアミノ酸配列をもとに、かずさ DNA 研究所によって進められたクラミドモナス EST (generate expressed sequence tags) プロジェクトデータベース (URL : <http://www.kazusa.or.jp/en/plant/chlamy/EST/>) から相同配列を検索したところ、対応する配列を含む EST クローンが一種同定された (CM055g08-r)。このクローンの挿入部分は約 2.3kb であり、cDNA 配列を決定したアミノ酸配列を予想したところ、クラミドモナス RecA (以下 CrRecA) 全長 ORF (414a.a.) が含まれていた。CrRecA は N 末端側に葉緑体移行シグナル (トランジットペプチド) に特徴的なセリン・スレオニン残基に富む配列が見い出され、さらにオンライン上の複数のシグナル配列予想プログラム (TargetP, ChloroP, PSORT 等) で複合的に解析した結果からも CrRecA は葉緑体に移行するシグナルを持つことが示された。さらに、アライ

ンメント解析によって見いだされた他の生物の RecA 蛋白質と相同性の高い部分 (320 アミノ酸) を用いて系統樹を作成したところ、CrRecA はラン藻 (*S.sp.PCC6803*、*S.platensis*.) の RecA や、AtRecA と同じクラスターを形成した。また、進化の過程において、ラン藻が分岐した後に CrRecA が分岐して出来た可能性が示唆された。また、CrRecA 全長 ORF と GFP (Green fluorescent protein) の融合タンパク質発現ベクターを作成し、パーティクルガン法によりタバコの葉に打ち込み CrRecA の局在を共焦点レーザー顕微鏡により観察したところ、CrRecA は葉緑体に局在することが確認された。次に、CrRecA は大腸菌の RecA ホモログである事から、大腸菌との機能的類似性を検討した。大腸菌の *recA* 欠損株において、DNA 損傷剤であるマイトマイシン C (MMC) を添加し、T7 プロモーターの下流に CrRecA 全長を導入した pUC19 ベクターを形質転換して薬剤抵抗性を検討したところ、一部機能的な相補が確認された。以上の事から、クラミドモナス RecA は大腸菌 RecA のホモログで核コードで葉緑体で機能する蛋白質であり、機能的にも大腸菌と類似していることが明らかになった。

## 2) *CrrecA* の発現制御とプラスチドシグナル

大腸菌 RecA は、DNA 損傷時に組み換え修復を行うことで DNA の維持を図る。そこで CrRecA に関しても同様に、DNA 損傷を与える薬剤によって転写レベルで発現誘導が起こるかどうかをノザン解析により検討した。ブレオマイシン、MMS (メチルメタンスルホン酸) は共に DNA を切断、損傷を与える薬剤であるが、これらを培地中に添加すると 6 時間後に顕著な発現誘導がおこった。また、葉緑体の光合成電子伝達系から電子を受け取り、活性酸素を発生させる農薬パラコート (メチルピオロゲン) を添加したところ、2 時間で劇的な発現誘導が確認された。添加した薬剤はすべて DNA 損傷を引き起こすものであるが、いずれも活性酸素の発生を伴う。特にパラコートは、光依存で急激に活性酸素が発生することで殺草作用を起こす農薬である。よって、活性酸素が *CrrecA* の発現誘導に重要な役割を担うことが予想された。活性酸素はプラスチドシグナルの候補の一つとして挙げられており、*CrrecA* の発現に関しても活性酸素自身が核へのシグナルとなっているのか、あるいは活性酸素と他のプラスチドシグナルとが関与し合って *CrrecA* の発現を誘導するのかどうかは、プラスチドシグナルの pathway を考える上で非常に興味深い。そこで、パラコート添加時に、活性酸素同様にプラスチドシグナルの候補として挙がってい

るクロロフィル合成系路前駆体の MgPROTO ( Mg-protoporphyrin IX ) と MgPROTOMe( Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester ) の細胞内プール量の変化を測定した。また、パラコート添加時の細胞内での CrRecA の局在を観察するため、抗大腸菌 RecA モノクローナル抗体を使用して蛍光抗体染色法による観察も行った。その結果、パラコート添加前には全くシグナルが検出されなかったが、添加後 2 時間で葉緑体の核様体に集まる強いシグナルが検出された。大腸菌において RecA は、DNA 損傷時に切断された一本鎖 DNA にフィラメント状に集合、結合して修復を開始することから、CrRecA も同様に損傷を受けた葉緑体 DNA の修復に関わることが予想された。

#### まとめ

単細胞緑藻クラミドモナスから、大腸菌 RecA のホモログである CrRecA の cDNA 配列を同定、アミノ酸配列を予想した。CrRecA は葉緑体移行シグナルを N 末端側に持つ核コードの蛋白質で、GFP 融合タンパク質の一過性発現の観察により、葉緑体局在と解った。さらに、葉緑体内に光依存で活性酸素を発生させる農薬パラコートを培地中に添加したところ、劇的な CrrecA の発現誘導がノザン解析で判明した。これは、活性酸素がプラスチドシグナルとして核に伝達されて、CrrecA の誘導を必要に応じて促している可能性が考えられる。しかし同時に、プラスチドシグナルの候補として挙げられている、クロロフィル合成経路の中間体の MgPROTO や MgPROTO Me と活性酸素とのシグナル伝達 pathway における関与や前後関係も興味深い。そこで、パラコート添加時の細胞内 MgPROTO、MgPROTOMe プール量の変化を測定することで、活性酸素とクロロフィル中間体のシグナル pathway 上の相互関係を解析した。また、葉緑体 DNA の複製や修復に関しては知見が少なく、実際に RecA が葉緑体 DNA の維持、修復に関与しているのかどうかは直接的な報告はされていない。そこで、抗体蛍光染色によりパラコート添加時のクラミドモナス細胞内での RecA 蛋白質の動向を観察したところ、パラコート添加により、クラミドモナス細胞内で劇的に CrRecA タンパク質のシグナルが増加し、葉緑体の核様体に集まっている様子が観察された。よって、葉緑体においても DNA の維持という観点では、原核型 (大腸菌と類似した) システムで行われていると示唆された。