

論文内容の要旨

論文題目 A study on the dual targeting mechanism of monodehydroascorbate reductase to mitochondria and plastids

(モノデヒドロアスコルビン酸還元酵素のオルガネラ二重移行機構の研究)

氏名 小原 圭介

序

ミトコンドリアと色素体が細胞内共生により生じた半自立的なオルガネラであるという説は現在では広く受け入れられている。細胞内共生の後、両オルガネラが持っていた遺伝子の多くは宿主細胞の核に転移し、核内で転写され、細胞質において移行シグナル（それぞれ mitochondrial presequence および plastid (chloroplast) transit peptide）が付加された前駆体の形で翻訳されるようになった。つまり、両オルガネラは自らを構成するタンパク質の生成を宿主細胞に依っている。従って、両オルガネラタンパク質前駆体の遺伝子発現と移行の制御は、核が両オルガネラを制御する上で重要な問題である。植物細胞は、ミトコンドリアに加えて色素体も獲得したので、両オルガネラタンパク質の発現と移行は、混同をさけるためにより厳密に区別されなければならない。しかし、植物細胞核が両オルガネラタンパク質の発現と移行を通して、どの様に両オルガネラを制御し、調和をとってきたかはいまだ未知の部分が多い。そのような問題を研究する切り口の一つとして、一つの遺伝子由来の産物が両オルガネラに二重移行 (dual-targeting) するという現象に着目した。両オルガネラで似たような働きをするタンパク質の多くは核内の別々の遺伝子によってコードされている。しかし、一つの遺伝子由来のタンパク質がミトコンドリアと色素体の両方に移行するという現象が現在までに約 20 例程報告されてきており、核が両者がある部分では一括して制御する仕組みを進化の過程で獲得してきた可能性がある。そのよ

うな二重移行の仕組みを研究することで、タンパク質の供給を介した核による両オルガネラの制御の仕組みに迫ることができると考えた。現在までに報告されている両オルガネラへの二重移行のほとんどは、最終的に出来る一種類のタンパク質がミトコンドリア移行シグナルと色素体移行シグナルの中間的な「曖昧移行シグナル」を持つことにより両方に移行する、という翻訳後の制御によるものである。残りの例は、一種類の mRNA 上の複数の翻訳開始コドンから翻訳が起こり、複数種のタンパク質ができるという翻訳レベルでの調節である。私は、ミトコンドリアと色素体の両方で活性酸素の除去やレドックスの調節に働くと思われるモノデヒドロアスコルビン酸還元酵素に注目して研究を行い、核が転写レベルでの調節を通して両オルガネラへの二重移行を行っていることを発見した。

結果

(A) シロイヌナズナモノデヒドロアスコルビン酸還元酵素のゲノム構造の解析

研究材料としてゲノム配列の解読が完了したシロイヌナズナを用いた。シロイヌナズナのゲノム上には 5 つのモノデヒドロアスコルビン酸還元酵素様の配列が存在し、そのうちの 1 つ (At1g63940) からは、もう一つ別の読み枠が組めることが示唆されていた。この二つの読み枠からできるアミノ酸配列は N 末端領域にオルガネラへのシグナル配列らしき伸長領域を持っていた (便宜上この二つを MDAR と表記する)。複数のタンパク質局在プログラムを用いて、局在予測解析をしたところ、その 2 つのうち長い方 (MDAR-L) はミトコンドリア、短い方 (MDAR-S) は色素体へと移行されることが強く予想された。次にその 2 つのゲノム配列の解析を行った。その結果 MDAR-L と S は、同一の遺伝子にコードされており、何らかの仕組みにより 2 種類が作り分けられていることが示唆された。MDAR-L は MDAR-S よりも 7 アミノ酸を N 末端に余分に持っており、その他の配列は全く同一であった。ゲノム配列とアミノ酸配列の対応から、MDAR-L と S をコードできる読み枠を組み合わせることが出来た。MDAR-L の N 末端に突出した 7 アミノ酸をコードする部分内には、90 塩基のイントロンが想定された。

(B) MDAR-L と S の転写システムの解析

そこで、実際にそのような読み枠で MDAR-L と S の両方が *in vivo* においても転写されているかどうかを RT-PCR 法で確かめた。特異的に増幅された断片の配列を読んだところ、MDAR-L と S 共に、*in vivo* において上記の読み枠で転写されていることが確認された。このことにより MDAR は 1 つの遺伝子から少なくとも 2 種類の mRNA を転写していることが分かった。次に Cap Site Hunting 法により両者の転写開始点を決定した。MDAR-L の転写開始点は、翻訳開始点より 68 塩基上流にあり、MDAR-S の転写開始点は MDAR-L の第 1 イントロン内に存在することが分かった。これらのことから MDAR が転写開始点を使い分けて長短 2 種類の mRNA を作り分けていることが分かった。

(C) MDAR-L と S の局在解析

MDAR-L と S の細胞内局在を調べるために GFP (sGFP (S65T)) との融合遺伝子を設計し

た。MDAR-L と S の N 末端伸長領域部分（それぞれ Signal-L, S）およびコード領域全長（*cds*-L, S）と sGFP の融合遺伝子をカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモータに繋ぎ、シロイヌナズナの葉に一過的に導入した。Signal-L-GFP および *cds*-L-GFP はミトコンドリアに移行し、Signal-S-GFP および *cds*-S-GFP は色素体に移行した。これらのことからシロイヌナズナの MDAR 遺伝子が転写開始点を使い分けてミトコンドリア型、色素体型酵素を作り分けていることが分かった。MDAR-L の突出した 7 アミノ酸を含む領域は、mitochondria presequence に特徴的な、正電荷の両親媒正 α -ヘリックスを形成すると予想された。従って、MDAR-L は transit peptide の上流にその α -ヘリックスを付加することによりミトコンドリアに移行すると考えられる。

(D) MDAR-L と S の発現解析

MDAR-L と S の発現量が器官や状況に応じて変化するかどうかを調べるために、それぞれを特異的に増幅するプライマーを用いて、RT-PCR-Southern Blotting 法を行った。その結果、花において MDAR-L mRNA がより多く蓄積しており、逆に根において MDAR-S mRNA がより多く蓄積していた。また、光刺激が MDAR-L と S mRNA 量比に与える影響を調べたところ、光に対しては大きな変動は見られなかった。また、葉緑体において活性酸素を発生させるパラコート処理でも大きな変動は見られなかった。さらに、シロイヌナズナ培養細胞を用いて、増殖期と定常期で MDAR-L と S mRNA 量比を調べたが、大きな違いは見られなかった。これらのことから、MDAR-L と S mRNA の蓄積量の比は、光や活性酸素、分裂活性と関係なく、器官毎に変動することがわかった。

(E) MDAR のオルガネラ二重移行の一般性

モノデヒドロアスコルビン酸還元酵素のオルガネラ二重移行の一般性をイネで検証した。イネには 5 つのモノデヒドロアスコルビン酸還元酵素様の配列があるが、すでに発現が確認されている色素体型と思われる配列（OsMDAR-A1）が 1 つあり、ミトコンドリア型と思われる配列は報告されていなかった。そこで、シロイヌナズナと同様に、色素体型のさらに上流にアミノ酸を付加したミトコンドリア型の読み枠（OsMDAR-A2）が組めるのではと考え、エキソン・イントロン構造を保ったままそのような読み枠を組んだ。また、その読み枠での *in vivo* の発現を RT-PCR 法により確認した。OsMDAR-A1 cDNA との比較により、これら二つの読み枠は、シロイヌナズナとは異なり、スプライシング受容部位の択一的な使用により作り分けられていることが分かった。OsMDAR-A2 および OsMDAR-A1 の N 末端伸長領域と GFP の融合タンパク質は、それぞれミトコンドリアおよび葉緑体へと移行した。これらのことから、イネでもモノデヒドロアスコルビン酸還元酵素のオルガネラ二重移行が保存されていることが強く示唆されたが、mRNA の作り分け機構はシロイヌナズナとは異なっていた。

考察

本研究は、転写開始点の使い分けという転写レベルでの制御によって両オルガネラへの二

重移行が起こることを示した初めての例である（図1）。また、この現象がイネでも保存されている事を明らかにした。序で述べたように、これまでに報告されていたミトコンドリアと色素体への二重移行の例のほとんどは、両者の中間的な「曖昧移行シグナル」を持つタンパク質である。「曖昧移行シグナル」を持つタンパク質では最終的にできるタンパク質は一種類であり、状況に応じてどちらかのオルガネラに偏って移行することは比較的難しいと考えられる。一方、今回報告した MDAR の場合、MDAR-L は比較的是っきりした移行シグナルを tandem に持つといえる。そのような場合、両オルガネラにおける量比の調節が、転写開始点の使い分けにより容易に行える可能性があり、実際に少なくとも mRNA 蓄積量の比では花と根で大きく異なっていた。今後は、各器官や状況下で両オルガネラにおけるタンパク質量および活性を比較することで、「曖昧移行シグナル」を持つ一つのタンパク質ではなく二種類を作り分けることの意義が浮き彫りになる可能性があり興味深い。

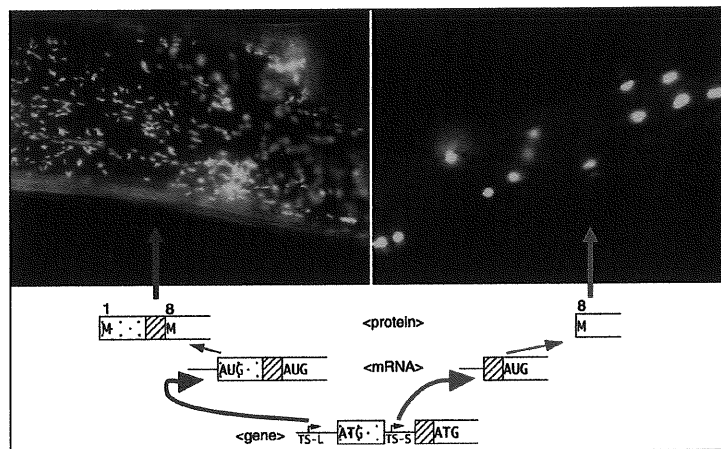


図1 モノデヒドロアスコルビン酸還元酵素のオルガネラ二重移行機構の概略
シロイヌナズナのモノデヒドロアスコルビン酸還元酵素は、二つの転写開始点（TS-L および TS-S）を使い分けることにより、長短二種類の mRNA を作り分ける。長い方由来のタンパク質はミトコンドリアへと移行し、短い方由来のタンパク質は葉緑体へと移行する。転写レベルでの制御により、一つの遺伝子から両オルガネラへとタンパク質を二重移行する初めての例である。