ミニレビュー

[Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol. 71, No. 11, pp. 1173~1176, 1997]

葉緑体 DNA 結合タンパク質†

佐藤文彦, 中野雄司*

(京都大学大学院農学研究科, *理化学研究所)

Key words : chloroplast ; DNA binding protein ; nucleoid ; transcription ; DNA structure

遺伝子の発現は転写, 転写後, 翻訳, 翻訳後の様々な段階において制御されている。葉緑体においてはこれまで転写後の各段階における制御に注目が集まってきたが, 転写段階が葉緑体の分化の初期過程において特に重要な機能を担っていることは間違いない。しかし, ゼニゴケやタバコなど全塩基配列が決定された葉緑体ゲノムの中には DNA 結合タンパク質をコードする遺伝子はなく, ごく最近, σ 因子遺伝子が単離されるまで, 葉緑体の転写制御遺伝子に関する研究は極めて限られたものであった(中平氏ら, 田中氏の稿参照)。一方, 葉緑体の分化に伴って DNA とタンパク質により形成される核様体の構造が大きく変化することが明らかになり, 核様体の単離とその構成タンパク質の解析が進められている。DNA の高次構造が遺伝子発現において重要な役割を果たすことは, 近年, 原核生物・真核生物を問わず, 注目されているところである。本稿では, 核様体タンパク質を中心に葉緑体 DNA 結合タンパク質研究の現状と展望について紹介する。

1. 葉緑体の特異的転写調節因子

遺伝子の発現は, そのプロモーター領域に特異的に結合する転写因子によって制御されている。葉緑体遺伝子においても, この特異的結合性を指標に転写因子の同定が試みられている(表 1)⁽¹⁻⁴⁾。これらはいずれもゲルシフト法, フットプリント法によって特異的結合

領域が特定されているが, いずれも未だその cDNA の単離に至っておらず, 今後の研究の進展が待たれる(中平氏らの稿参照)。

2. 葉緑体核様体タンパク質

葉緑体 DNA は核様体と呼ばれる DNA とタンパク質の複合体として存在する⁽⁵⁻⁷⁾(図 1)。葉緑体の分化度に応じ, 核様体の形態が変わることより, 核様体タンパク質が葉緑体遺伝子発現において重要な役割を果たしていると考えられる。葉緑体 DNA は多コピー存在することから, この核様体を生化学的に精製し, その構成タンパク質を解析するというアプローチによって, いくつかの葉緑体 DNA 結合タンパク質が同定されている。我々は, タバコ緑色培養細胞の葉緑体核様体中に存在する塩基性で分子量 41 kD の DNA 結合タンパク質 CND 41 (Chloroplast-nucleoid DNA binding protein) をサウスウエスタン法によって同定し, その cDNA を核様体 DNA 結合タンパク質として初めて単離した^(7,8)。CND 41 は核コードの新規タンパク質であり, 成熟タンパク質の N 末端にリジンに富む α -helix 構造が予想された。また, DNA 結合モチーフとして知られる zinc finger motif の存在が示唆された。さらに, データベース検索の結果, N 末端の高リジン領域を除く後半部分約 350 アミノ酸の領域に, mucoropepsin をはじめとするアスパラギン酸プロテアーゼと約 25% と低いながらも相同性が示され, 特にその活性ドメインが完全に保存されていることが明らかとなった。

一方, 大腸菌の大量発現系において CND 41 の DNA 結合活性が確認され, 特に N 末端の高リジン領域が DNA 結合性に必須であることが認められた。CND 41 は約 100 kb に渡る広範囲の葉緑体 DNA 断片と結合性を示し, より非特異的 DNA 結合タンパク質と考えられる。

抗体を作成し, タバコの各組織における CND 41 タンパク質の発現量を解析した結果, CND 41 は光合成を

† Chloroplast DNA Binding Proteins and Chloroplast Nucleoid

Fumihiko SATO and Takeshi NAKANO* (Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, *Laboratory of Plant Functions, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN))

表 1 葉緑体遺伝子プロモーター領域に特異的に結合するタンパク質

タンパク質名	分子量(kD)	特異的結合領域	転写活性に関して推定される機能	植物種	文献
CDF 1	115	<i>rbcL</i> -16~-101	?	maize	1
CDF 2	33	<i>rrn</i> -35~-57	抑制	spinach	2
—	36	<i>psbD/C</i> -37~-50	促進	rice	3
AGF	—	<i>psbD/C</i> AAG Box (-39~-68)	促進	barley	4

図 1 タバコ緑色培養細胞から精製された葉緑体核様体の電子顕微鏡写真

活発に行う細胞・組織（緑葉，光独立栄養培養細胞株^(9,10)）においては蓄積が少なく，光合成活性の低い細胞・組織（茎，非選抜緑色細胞株，白色細胞株）において蓄積が多いこと，またその蓄積は糖により増加することが認められた。一方，これらの細胞における葉緑体遺伝子転写産物（*psbA*，*psbD/C*，*rbcL*，16 S-23 S rRNA 等）の量を測定したところ CND 41 タンパク質の発現量と葉緑体遺伝子産物の発現量に，負の相関を認めた。これらのことは CND 41 が葉緑体遺伝子の負の転写制御因子であることを示唆するものであった。実際，アンチセンス形質転換タバコ培養細胞を作成し，CND 41 量を低下させた場合，葉緑体遺伝子産物の発現量が増加することが明らかになった。以上の結果から，我々は CND 41 が，糖等のシグナルに応答し，葉緑体の遺伝子発現を全般的に抑制するリプレッサーとして機能していると考えている。

CND 41 は多い場合，葉緑体当たり約 50 万分子，葉緑体 DNA 当たり約 1000 分子と多量に存在することから，CND 41 が核様体構造形成を介して遺伝子発現に関与している可能性がある。核様体構造あるいは DNA の高次構造が転写制御に関与していることは原核細胞

においても報告されている（次項参照）。一方，原核生物やミトコンドリアには DNA 結合活性とプロテアーゼ活性の双方を併せ持つ Lon プロテアーゼが存在することが知られている⁽¹¹⁾。Lon プロテアーゼは放射線耐性や細胞分裂，フィラメンテーションなど多面的調節に関わるばかりでなく，転写調節因子等重要なタンパク質分解を行なうことから，CND 41 が DNA の高次構造形成以外の機構により転写のみならず転写後の機構にも関与している可能性も考えられ，今後の解析に興味を持たれる。

一方，CND 41 以外にもエンドウの幼葉の葉緑体包膜画分からは，サウスウエスタン法によって分子量 115 kD の DNA 結合タンパク質 PEND が同定されている⁽¹²⁾。DNA の複製時，DNA は膜に固定される必要がある。事実，葉緑体分裂期，葉緑体核様体は葉緑体包膜付近に存在する^(6,12) が，PEND は葉緑体核様体を葉緑体包膜に結合させるアンカーの役割を担っていると推定されている。

タバコ白色培養細胞のプロプラスチド（原色素体）核様体においては，分子量 69 kD の DNA 結合タンパク質がサウスウエスタン法によって同定されている⁽¹³⁾。このタンパク質は，葉緑体画分には存在しないことから，CND 41 同様色素体分化の初期に何らかの働きを行っているものと推定されるが，詳細な機能は不明である。

3. 葉緑体 DNA の高次構造調節タンパク質

核様体タンパク質としては同定されていないが，葉緑体 DNA の高次構造を変化させ，葉緑体遺伝子発現に関与すると考えられるタンパク質が，原核生物における機能既知の遺伝子との相同性を利用して単離されている。

藻類の一種である *Cryptomonas* は，葉緑体ゲノム上に *rbcS* を未だ有する，葉緑体ゲノムの分子進化上興味深い材料である。この *Cryptomonas* 葉緑体ゲノム上に，

表 2 塩基配列が決定されている葉緑体 DNA 結合タンパク質

タンパク質名	分子量(kD)	推定される機能	植物種	文献
CND 41	41	転写の抑制	tobacco	7, 8
HlpA	10	DNA 湾曲化	<i>Cryptomonas</i>	11
RecA	42	DNA 相同組換え, DNA 修復	<i>Arabidopsis</i>	14

大腸菌のヒストン様タンパク質 HU とアミノ酸レベルで 37% の相同性を示す遺伝子 *hlpA* が同定された⁽¹⁴⁾。大腸菌で大量発現した *Cryptomonas hlpA* は大腸菌 HU と類似の DNA 湾曲化活性を示している⁽¹⁵⁾。一方、大腸菌の HU 抗体により分子量 17 kD のタンパク質がハウレンソウにおいて検出されているものの⁽¹⁶⁾、葉緑体ゲノム上にはこの *hlpA* 遺伝子は存在せず、核コードの相同遺伝子の報告もない。

RecA は、原核生物に広く存在し、DNA 相同組換えや DNA 修復を行うタンパク質であるが、*Arabidopsis* から大腸菌 RecA とアミノ酸レベルで 53% の相同性を示す cDNA が単離されている⁽¹⁷⁾。この cDNA 自身を用いた活性は確認されていないが、DNA 相同組換えによる葉緑体の形質転換が機能していること⁽¹⁸⁾は、この葉緑体型 RecA の関与を示唆するものと考えられる。

原核生物ゲノムの高次構造は、DNA ジャイレース、トポイソメラーゼ I による DNA 超らせん構造の形成、解消によって制御され、更にはこの構造変化が遺伝子の転写活性を調節している。葉緑体においても、これらの 2 種の酵素活性が存在することや超らせん構造が葉緑体遺伝子の転写活性に影響を与えていることが示唆されている^(19,20)。in vitro で plasmid DNA の超らせん構造を解消する活性を指標にしてトポイソメラーゼ I の同定が試みられ、カリフラワーから 54 kD⁽²¹⁾、エンドウから 69 kD⁽²²⁾ のタンパク質が精製されている。DNA ジャイレースの葉緑体における同定例はない。

4. おわりに

昨年、葉緑体の起源と考えられるランソウ *Synechocystis* PCC 6803 の全ゲノム塩基配列が決定された⁽²³⁾が、配列中には CND 41 と相同な配列は存在しなかった。また、ゼニゴケやイネのような単子葉植物にも抗 CND 41 抗体と反応するタンパク質は検出されていないことより、CND 41 は比較的最近出現してきたタンパク質であると考えられる。原始的なランソウが原始的真核細胞に共生して以来、葉緑体と核間のコミュニケーション機構も多様に進化してきたと考えられ

る。また、CND 41 は単独で機能しているのではなく、他の調節因子と相互作用しながら機能していると考えられる知見も得られている(佐藤未発表)。葉緑体の DNA 結合タンパク質の発現制御の解析は二つのゲノムの共生関係の進化の過程をたどる有力な手段であるとともに、導入遺伝子の発現制御機構をより精密化するための基盤的知見を与えるものと期待している。

- (1) E. Lam, L. Hanley-Bowdoin, N.-H. Chua : *J. Biol. Chem.*, **263**, 8288-8293 (1988).
- (2) R. Iratni, L. Baeza, A. Andreeva, R. Mache, S. Lerbs-Mache : *Genes Develop.*, **8**, 2928-2938 (1994).
- (3) K.-Y. To, M.-C. Cheng, D.-F. Suen, D.-P. Mon, L.-F. O. Chen, S.-C. G. Chen : *Plant Cell Physiol.*, **37**, 660-666 (1996).
- (4) M. Kim, E. Mullet : *Plant Cell*, **7**, 1445-1457 (1995).
- (5) P. Hansmann, H. Falk, K. Ronai, P. Sitte : *Planta*, **164**, 459-472 (1985).
- (6) 黒岩晴子, 黒岩常祥 : “植物の分子細胞生物学”, 細胞工学別冊 3, 1995, p.15.
- (7) T. Nakano, F. Sato, Y. Yamada : *Plant Cell Physiol.*, **34**, 873-886 (1993).
- (8) T. Nakano, S. Murakami, T. Shoji, S. Yoshida, Y. Yamada, F. Sato : *Plant Cell*, **9**, 1673-1682 (1997).
- (9) S. Takeda, F. Sato, K. Ida, Y. Yamada : *Plant Cell Physiol.*, **19**, 215-221 (1990).
- (10) S. Takeda, K. Ida, F. Sato, Y. Yamada, Y. Kaneko, H. Matsushima : *Research in Photosynthesis*, **1**, 223-226 (1992).
- (11) G. K. Fu, M. J. Smith, D. M. Markovitz : *J. Biol. Chem.*, **272**, 534-538 (1997).
- (12) N. Sato, C. Albrieux, J. Joyard, R. Douce, T. Kuroiwa : *EMBO J.*, **12**, 555-561 (1993).
- (13) Y. Nemoto, S. Kawano, K. Kondoh, T. Nagata, T. Kuroiwa : *Plant Cell Physiol.*, **31**, 767-776 (1990).
- (14) S. Wang, X.-Q. Liu : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10783-10787 (1991).
- (15) H. Wu, X.-Q. Liu : *Plant Mol. Biol.*, **34**, 339-343 (1997).
- (16) J.-F. Briat, S. Letoffe, R. Mache, J. Rouviere-Yaniv : *FEBS Lett.*, **172**, 75-79 (1984).
- (17) H. Cerutti, M. Osman, P. Grandoni, A. T. Jagen-

- dorf : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 8068-8072 (1992).
- (18) L. A. Allison, L. D. Simon, P. Maliga : *EMBO J.*, **15**, 2802-2809 (1996).
- (19) S. M. Stirdivant, L. D. Crossland, L. Bogorad : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4886-4890 (1985).
- (20) E. Lam, N.-H. Chua : *Plant Mol. Biol.*, **8**, 415-424 (1987).
- (21) H. Fukata, A. Mochida, N. Maruyama, H. Fukasawa : *J. Biochem.*, **109**, 127-131 (1991).
- (22) S. K. Mukherjee, M. K. Reddy, D. Kumar, K. K. Tewari : *J. Biol. Chem.*, **269**, 3793-3801 (1994).
- (23) T. Kaneko, S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka, E. Asamizu, Y. Nakamura, N. Miyajima, M. Hirose, M. Sugiura, S. Sasamoto, T. Kimura, T. Hosouchi, A. Matsuno, A. Muraki, N. Nakazaki, K. Naruo, S. Okumura, S. Shimpo, C. Takeuchi, T. Wada, A. Watanabe, M. Yamada, M. Yasuda, S. Tabata : *DNA Res.*, **3**, 109-136 (1996).
-