

プラスチドへのタンパク質輸送に関与する新規細胞質因子の探索

食品安全・機能性開発学講座 機能性食品変換学分野

渡辺和弘

【背景と目的】植物特有の細胞小器官であるプラスチドにおいて機能するタンパク質の多くは、細胞質のリボソームで前駆体として合成された後、タンパク質透過装置を介してプラスチドへと選択的に輸送される。前駆体は、N 末端側に transit peptide (TP) と呼ばれる短いアミノ酸配列を有しており、TP がプラスチドへの選択的輸送に必須であることが明らかになっている。これまでのプラスチドへのタンパク質輸送に関する研究は、タンパク質透過装置の同定と機能解析を中心に行われてきた。一方で、細胞質内輸送メカニズムについてはほとんど知見がない。本研究では、プラスチドへのタンパク質輸送を制御する新規細胞質因子の同定を目的として行われた。

【方法】遺伝学的手法を用いた細胞質因子の同定を目指し、変異誘起の際の親株となる、Rubisco small subunit 由来の TP と hygromycin phospho-transferase および GFP の融合タンパク質を発現するシロイヌナズナ形質転換体 THG を作製した。THG を変異誘起の際の親株として使用することで、プラスチドタンパク質輸送に欠陥を持つ変異体を hygromycin 含有培地上で耐性株として選抜できるだけでなく、GFP 蛍光を指標として、タンパク輸送の様子を顕微鏡で直接観察することが可能となる。親株 THG に対して T-DNA 挿入もしくは EMS による変異誘発処理を行い、hygromycin 含有培地上で目的の変異体の選抜を行った。また、タンパク質レベルでの細胞質因子の同定を目指し、TP-GFP の N 末端にエピトープタグ (HA, FLAG, cMyc) を付加した融合タンパク質を発現する 3 系統のシロイヌナズナ形質転換体を作製した。このうち、HA 発現株を材料として抗 HA 抗体を用いた共免疫沈降を行った後、SDS-PAGE に供し、細胞質因子を探索した。

【結果及び考察】hygromycin 含有培地上で THG 以上に hygromycin 耐性を持つ 5 系統 (T-DNA 法により 1 系統, EMS 法により 4 系統) の変異体を選抜した。変異体の葉において、GFP 蛍光はプラスチドだけでなく細胞質でも観察されたことから、これらの変異体はプラスチドタンパク質の輸送に欠陥を持つ目的の変異体であることが推察された。変異体のゲノム上の変異導入部位を明らかにすることで、プラスチドタンパク質輸送に関連する新規因子の同定が期待される。また、抗 HA 抗体を用いた共免疫沈降により、HA-TP-GFP に加えて 15, 31, 42, 48, 56 kDa のタンパク質が単離された。これらのタンパク質は HA-TP-GFP と複合体を形成している新規細胞質因子であると推察された。