

# シロイヌナズナの COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN3 と相互作用する DEAD ボックスタンパク質の機能解析

生命分子化学講座 生物化学分野  
多羽田 大助

(背景と目的) 植物は、耐冷性、耐凍性を獲得する多様な機構を持っており、それらの解明及び関連遺伝子の応用は、寒冷地農業に適した品種の開発に寄与する。低温ショックドメインタンパク質(CSP)は、細菌において低温ストレス下で高度に蓄積し、低温により不活性化した RNA の2次構造を解消する RNA シャペロンである。これまで当研究室では、シロイヌナズナの CSP3 欠損株では耐凍性が低下し、過剰発現株では耐凍性が増強されることを見出し、CSP3 の耐凍性獲得における重要性を明らかにしている。更に、その作用メカニズムを明らかにするため、Yeast Two-Hybrid 法を用いた CSP3 相互作用タンパク質のスクリーニングを行ったところ、2種類の DEAD ボックスタンパク質、AtRH7(PR75)および AtRH15 が同定された。DEAD ボックスタンパク質は共通の核酸結合ドメインおよび ATPase ドメインを持つタンパク質の総称で、その多くは ATP を消費して RNA の二重らせんを解離する RNA ヘリカーゼ(RH)活性を持つ。シロイヌナズナゲノムには 50 種類以上存在し、そのうちいくつかはストレス応答への関与が指摘されている。本研究では、AtRH7 と AtRH15 について、植物細胞中での CSP3 との相互作用を確認すること、並びにそれら遺伝子のストレス応答性および生理機能を解析することを目的とした。

(方法) CSP3 と RHsとの相互作用を確かめるため、タマネギ表皮細胞を用いた Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) 法による解析を行った。RHs のストレス応答性は、低温、塩、乾燥ストレス処理を施したシロイヌナズナ実生を用い、半定量的 RT-PCR によって発現量の変化を比較した。RHs の機能を調べるため、大腸菌の DEAD ボックスタンパク質 CsdA 欠損による低温感受性株 MC4100 ( $\Delta csdA$ ) に発現ベクターを導入し、RHs が CsdA の機能を相補できるか調べた。

(結果) BiFC 法による YFP の蛍光と、GFP 融合タンパク質の細胞内局在との比較から、RH7 は核小体および核質に局在し、そこで CSP3 と相互作用することが示された。RH15 は核及び細胞質に局在するが、CSP3 との相互作用は細胞質においてのみ見られた。半定量的 RT-PCR により、RH7 は塩ストレス下でのみ、RH15 は低温、塩、乾燥ストレスによって発現が誘導されることが明らかになった。大腸菌  $\Delta csdA$  株に対する相補性試験では、RH7 を導入した組換え体が低温下における生育の回復を示した。

(考察及び結論) CSP3 は RNA ヘリカーゼと相互作用することから、RNA の2次構造を巻き戻すタンパク質間で複合体が形成されている可能性が示唆された。RH15 と CSP3 が細胞質では相互作用し核内ではしないことが示すように、CSP3 は局在部位特異的にパートナーを選択しており、それにより広範囲のターゲット RNA に作用していると考えられる。一方、大腸菌  $csdA$  に対する相補性は RH7 のみが示した。CsdA は低温下で蓄積した不要 RNA の分解に関与する RNA ヘリカーゼと考えられており、この結果は2つのヘリカーゼの基質特異性の差によるものと考えられる。