

トランスポゾン Tam3 転移酵素タンパク質の細胞内局在性を制御する因

子の探索

生物資源科学専攻 植物育種科学講座 植物育種学 大東拓朗

【目的】

キンギョソウ (*Antirrhinum majus*) DNA トランスポゾン Tam3 は低温条件でのみ転移が活性化される。この低温依存性転移は、DNA メチル化や RNAi の様な転写・翻訳での制御ではなく、転移活性に必要となる Tam3 酵素タンパク質 (TPase) の膜局在化による核移行阻害に起因すると考えられている。また、Tam3TPase 配列内部の Zinc-finger ドメインが膜局在化に重要である事が報告されている。本研究では、近縁種において Zinc-finger ドメインを介した Tam3TPase の膜局在化の現象が種間でどの程度保存されているのか調査した。また、膜局在化に関わる制御因子の調査について報告する。

【材料・方法】

実験にはトランスポゾンが転移しない 25°C 条件に制御されたグロースチャンバー内で生育した植物体を使用した。*Antirrhinum majus*/*Antirrhinum barrelieri*/*Asarina scandens*/*Nicotiana benthamiana*/*Arabidopsis thaliana* を用いた。それぞれの近縁種に Tam3TPase と Zinc-finger ドメインを変異させた m10 をそれぞれ GFP で標識化して PEG 法により遺伝子導入した。観察細胞群の GFP 蛍光局在性を NCG 比で表した。NCG 比は核の蛍光強度の平均値を細胞質の蛍光強度で割った値である。また、制御候補因子 T3IF5/6 を Tam3TPase と共に *Arabidopsis* 細胞内に共発現させて NCG 比を比較した。BiFC 法で Tam3TPase と T3IF5/6 の相互作用性を調査した。新たな宿主因子の同定を目的として、イーストツーハイブリッド法 (以下 Y2H と記す。) を用いて、キンギョソウ cDNA ライブラリーから Tam3TPase と相互作用するタンパク質を探索し、調査した。

【結果・考察】

全ての近縁種で TPase と m10 の細胞内局在性 (NCG 比) の間に 1% 水準で有意差が出た。また、系統間比較をすると、*Antirrhinum* 属に近縁であるほどその差が大きかった。以上より、*Antirrhinum* 属と遠い種であっても Zinc-finger ドメインを介した細胞内局在性の制御の痕跡を確認できたが、近縁であるほどその制御の効果が大きいことから、*Antirrhinum* 属における Tam3TPase と相互作用する力の強い因子の存在が示唆された。宿主候補因子 T3IF5/6 は Tam3TPase の細胞内局在性を制御しなかった。BiFC 実験系では YFP 蛍光が検出されず、Tam3TPase との細胞内相互作用は確認されなかった。また、Y2H の結果、T3IF5/6 は Tam3TPase と相互作用しなかった。以上より、T3IF5/6 は Tam3TPase の細胞内局在性を制御する因子ではないと考えられた。Y2H のシーケンシングデータから、新たな候補因子 T-23 に注目した。RT-PCR で T-23 が常温で発現されているものの、低温では発現が抑制されている事が分かり、常温下の Tam3 転移抑制に関与している可能性を示唆した。今後は T-23 の細胞内局在性の調査と Tam3TPase に与える効果を確認する必要がある。