

関西学院大学 研究成果報告

2019年 3月15日

関西学院大学 学長殿

所属：理工学研究科
職名：博士研究員
氏名：西村健司

以下のとおり、報告いたします。

研究制度	<input type="checkbox"/> 特別研究期間 <input type="checkbox"/> 自由研究期間 <input type="checkbox"/> 大学共同研究 <input type="checkbox"/> 個人特別研究費 <input checked="" type="checkbox"/> 博士研究員 ※国際共同研究交通費補助については別様式にて作成してください。
研究課題	C4光合成を可能にしたプロトン駆動力制御の進化 ・C4種フラベリアで高発現する葉緑体タンパク質の生化学的解析 ・C4型代謝関連因子の生化学的解析
研究実施場所	理工学部 宗景研究室
研究期間	2019年 1月 1日 ~ 2019年 3月 31日 (3ヶ月)

◆ 研究成果概要 (2,500字程度)

上記研究課題に即して実施したことを具体的に記述してください。

キク科 *Flaveria* 属植物は、C3型またはC4型の光合成様式を持つ異なる種が存在するため、近縁種を用いてC3からC4光合成への進化メカニズムを解析することができる。当研究室ではこれまでにC3種及びC4種 *Flaveria* の比較トランスクリプトーム解析から、C4種で顕著に発現上昇している遺伝子を多数見出した。本研究ではそのうちNPQ7 (non-photochemical quenching7) と RER3 (reticulata-related3) に着目して研究を行っている。

1. C4種フラベリアで高発現する葉緑体タンパク質の生化学的解析

NPQ7はhypothetical chloroplast open reading frame 20 (YCF20) familyに属するタンパク質である。C3モデル植物であるシロイヌナズナの遺伝子破壊株を用いた解析から、過剰な光エネルギーを熱として放出する熱散逸に異常があることが知られているが、その分子機能やC4光合成における生理的役割については明らかにされていない。これまでの当研究室の解析から、C4種 *Flaveria bidentis* のNPQ7はN末端側に葉緑体移行シグナルが存在する約23 kDaのタンパク質であり、その遺伝子発現抑制株は、野生株よりも淡緑色の葉を有し、かつ光合成装置の構築に異常がある可能性が示唆されている。本研究では、NPQ7の葉緑体内での詳細な生化学的特性についての新たな知見を得るために、C4種 *F. bidentis* 由来NPQ7の抗体作製を目指して、その抗原タンパク質の大腸菌内での大量発現・精製を試みた。NPQ7の機能ドメイン(葉緑体移行シグナルを排した配列

：約16 kDa) に相当する遺伝子配列をpET32aベクターに導入済みのコンストラクトをタンパク質発現用大腸菌BL21株に導入・培養し、0.5 mM IPTG存在下37℃で3時間His-tag融合NPQ7タンパク質の発現誘導を行った。回収した菌体は凍結融解と細胞破砕液で処理し、遠心分離にて全可溶性タンパク質を分画し、また不溶性画分は8 M尿素により可溶化することでそのタンパク質を抽出した。その後両画分をNi-NTAカラムに供して組換え体NPQ7タンパク質の精製を行った。得られた画分をSDS-PAGEにて分離後CBB染色したところ、NPQ7タンパク質と推定されるシグナルは検出されず、100 kDa近傍の高分子量タンパク質が精製画分に回収された。そこでタンパク質発現条件の検討を行い、同濃度のIPTG存在下29℃で3時間発現誘導後に精製してSDS-PAGEにて解析したところ、不溶性タンパク質由来の精製画分に目的サイズに近いシグナルが検出された。しかしその精製度は低く、これよりも短い複数の断片や上述の高分子量タンパク質が混在していた。後者は不明であるが、遠心限外ろ過フィルター等により除去できると考えられる一方、短い断片は合成途中での異常を反映している可能性が考えられる。導入したコンストラクトは設計上NPQ7のN末端側のHis-tagのみしか精製に使用できないため、C末端側にのみHis-tagを付加するpET21aにベクターを変更することで、効率よく全長NPQ7を取得することにした。また翻訳中の異常を克服するために、コドンバイアスを考慮した大腸菌株に変更してタンパク質発現を試みることにした。

2. C4型代謝関連因子の生化学的解析

RER3は網目状に葉脈が浮き出る表現型を示すシロイヌナズナ変異体から単離され、その遺伝子発現は主に維管束鞘細胞に見られる。メタボローム解析により同変異体はPEPを基質とするシキミ酸経路やTCA回路の中間代謝産物の蓄積に異常が見られるが、その詳細な機能や特にC4型代謝における役割については不明である。C4種*F. bidentis*のRER3は3つのパラログ (RER3A/3B/3C) が存在する。このうちRER3A遺伝子の発現量が最も高く、N末端側に葉緑体移行シグナルを持つ約35 kDaの3回膜貫通型タンパク質をコードする。当研究室ではこれまでにRER3Aアミノ酸配列由来のペプチド抗体が作製されており、これを用いたウェスタン解析により、フラベリアC3種に比べてC4種においてRER3の蓄積が顕著に高く、葉緑体内画分に存在して複合体を形成する可能性が示唆されている。本研究では、このペプチド抗体の特異性を検証するために、C4種*F. bidentis*由来RER3Aの組換え体タンパク質の大腸菌内での発現・精製を試みた。RER3Aの前駆体に相当する遺伝子配列をpET15bベクターに導入済みのコンストラクトを大腸菌BL21株に導入・培養後、まずはNPQ7同様に、0.5 mM IPTG存在下37℃で3時間タンパク質の発現誘導を行い、上述した方法により可溶性・不溶性画分からタンパク質を抽出し、N末端His-tag融合RER3Aの精製を試みた。しかしRER3に関しても目的サイズのタンパク質は検出されなかった。そこでNPQ7の場合と同様に発現誘導時の温度条件を29℃で3時間に変更して精製したところ、不溶性画分において目的分子量の約35 kDa近傍にシグナルが確認された。ところがこの場合も精製度は低く、RER3よりも低分子量の分子種やNPQ7の場合も見られた高分子量タンパク質が混在していた。この粗精製画分に対して上述のRER3ペプチド抗体を用いてウェスタン解析したところ、目的サイズのものとそれよりも低分子量の複数のシグナルを検出した。今後はより安定にRER3を発現し、かつ精製度を向上させて再試験する必要がある。安定的に発現させる手段のひとつとして、RER3の葉緑体移行シグナル配列を除く機能ドメインのみを発現するコンストラクトを作製することにした。またRER3の場合もその全長を効率よく回収するためにpET21aにベクターに変更し、大腸菌ホストもレアコドンが付加したものを使用することにした。

以上

提出期限：研究期間終了後2ヶ月以内

※個人特別研究費：研究費支給年度終了後2ヶ月以内 博士研究員：期間終了まで

提出先：研究推進社会連携機構 (NUC)

※特別研究期間、自由研究期間の報告は所属長、博士研究員は研究科委員長を経て提出してください。

◆研究成果概要は、大学ホームページにて公開します。研究遂行上大学ホームページでの公開に支障がある場合は研究推進社会連携機構までご連絡ください。