

環境ストレス応答に関与するFBN5タンパク質と相互作用する疎水性分子の探索

国際文理学部 環境科学科 大坪 繭子

研究目的

シロイヌナズナFBN5タンパク質は、11グループあるfibrillinファミリーに属する脂質結合タンパク質である。強光や低温ストレスに応答し、葉緑体内の酸化還元状態を葉緑体の外へ伝達するメカニズムに関与することが分かっている (Otsubo et al. 2018)。本研究では、FBN5が強光・低温以外のストレスにも関与しているかを明らかにするために、モデル植物としてよく利用されている単細胞の緑藻クラミドモナスを用いて窒素欠乏ストレス下でのFBNタンパク質の役割を明らかにすることを目的とした。

背景

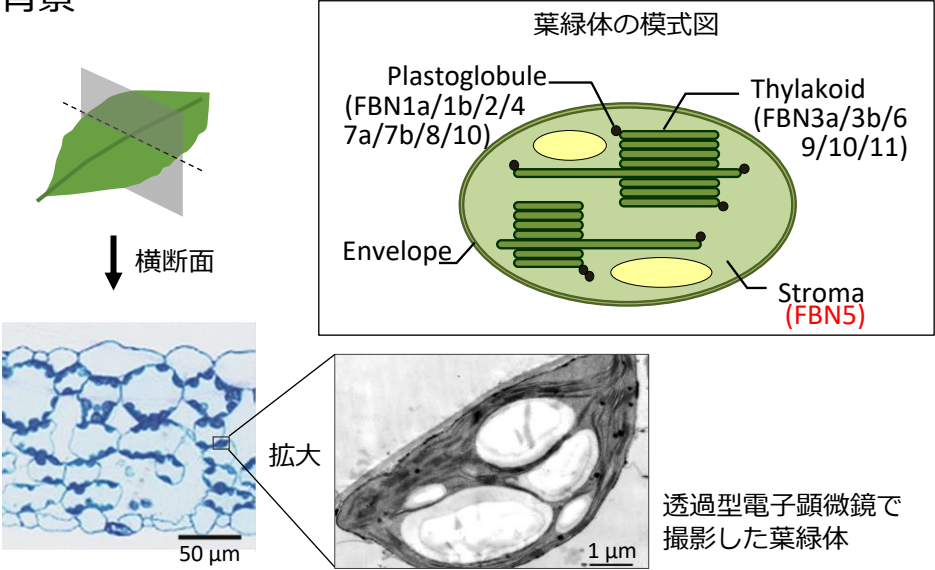


図1 葉緑体の構造とFBNタンパク質の局在

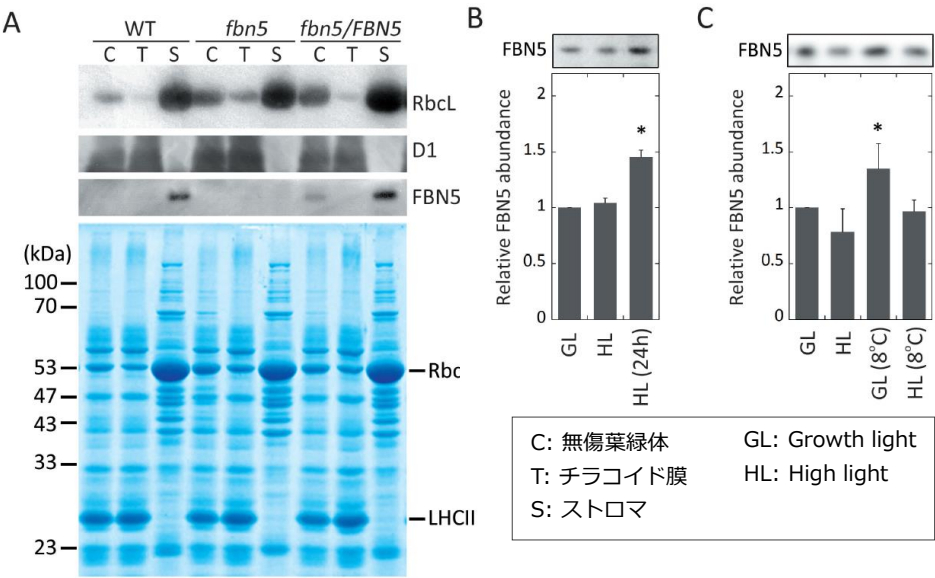


図2 チラコイド膜とストロマ画分における FBN5 抗体を用いたイムノブロット解析

植物の葉には表皮細胞の下に多くの葉肉細胞が並んでおり、その葉肉細胞内に数多くの葉緑体が存在している (図1)。葉緑体の中に局在する脂質結合タンパク質Fibrillin (FBN) はそのほとんどがチラコイド膜やチラコイド膜が膨らんでできた脂質の豊富な小胞 (plastoglobule) に存在しているが、低温ストレス応答遺伝子として見つかった *FBN5* がコードする FBN5 タンパク質は、水溶性画分であるストロマに局在していることが分かった (図2, Otsubo et al. 2018)。

シロイヌナズナにおいては、FBN5 が欠失すると光合成電子伝達を担うプラストキノン (PQ-9) が減少し、光によるダメージを軽減するメカニズムが機能しなくなることが明らかになった。また、電子伝達が行われるチラコイド膜のグラナ構造 (膜が積み重なった状態) が無秩序な構造に変化していた。本研究では、シロイヌナズナのような多細胞生物と比べて環境変化の影響を受けやすい、単細胞の緑藻であるクラミドモナスを用いて、FBN をコードする遺伝子と協働的に発現を増減させる遺伝子群を検出するために RNA シークエンス (RNA-seq) 解析を行うことにした。

方法 (RNA-seq による遺伝子発現の網羅的解析)

- 窒素源を除いたクラミドモナス CC-408 細胞を 1×10^7 cells/mL になるように調整し、明所 ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) 下で所定の時間培養した。一酸化窒素 (NO) 供与試薬である SNAP は、窒素源を除くと同時に添加した (終濃度 = 0.2 mM)。
- 任意の時間経過後、 1×10^7 cells 相当の細胞を採取し、RNA を抽出した。
- 次世代シーケンサーにより得られた RNA-seq データは、fastqc, fastp でクオリティチェック、クオリティコントロール (トリミング) を行った。
- STAR を用いて得られたリードを、ゲノム配列 (CreinhardtiiCC_4532_707_v6.0.fa と CreinhardtiiCC_4532_707_v6.1.gene.gtf を用いて作成した STAR index) にマッピングした。
- RSEM を用いて発現量を算出した。得られた TPM (transcripts per million) 値を用いて、発現量グラフを作成した。

結果 (RNA-seq による遺伝子発現の網羅的解析)

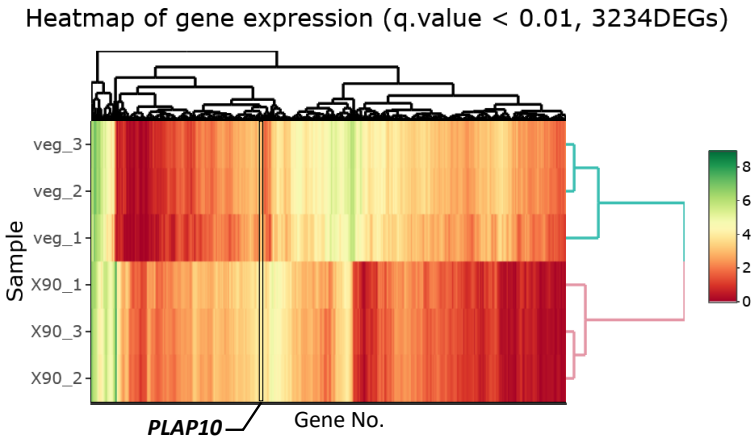


図3 窒素欠乏ストレス90分後における発現変動遺伝子群の可視化

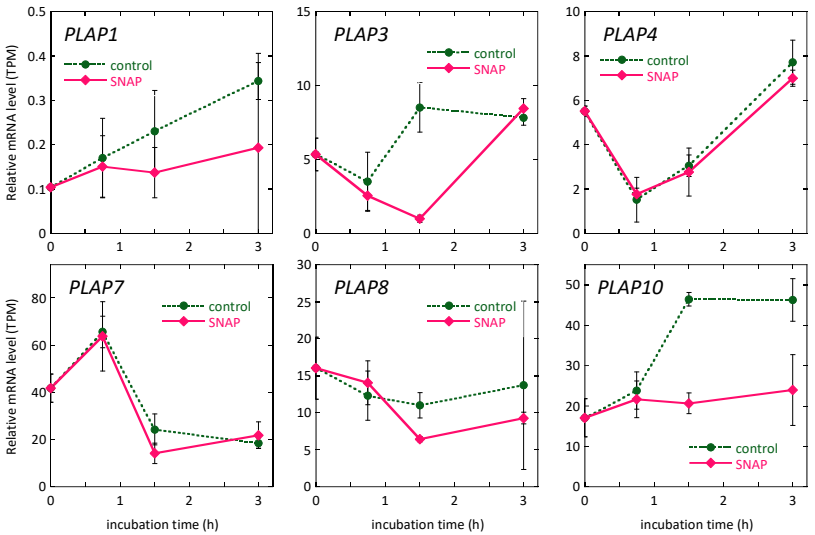


図4 クラミドモナスPLAPをコードする遺伝子の発現変化

窒素欠乏ストレス条件下での遺伝子発現の変動を明らかにするため、RNA シークエンス (RNA-seq) により約16000遺伝子の発現量を調べた。ストレス前後で比較すると、ストレス開始90分で3234遺伝子の発現が変動していた (図3)。葉緑体に局在するストレス応答遺伝子 *FBN* (クラミドモナスでは *PLAP* と呼ばれる) の発現量の変動を図4に示した。*PLAP1* と *PLAP10* は、窒素源の枯渇により発現が上昇しており、その上昇はSNAP処理により抑制される傾向であることが分かった。

今後の展開

本研究では、これらの発現変動遺伝子 (DEGs) の中から *PLAP* (*FBN*) と共発現する遺伝子群を検出し、どのような経路または機能カテゴリの遺伝子が含まれているかどうかを調べるために、GO (Gene Ontology) エンリッチメント解析を行う予定である。さらに、窒素欠乏ストレスによりおこる配偶子分化に関与する遺伝子群の同定を行うことで、クラミドモナス細胞が窒素源の欠乏を感知し、その情報を伝達するメカニズムを明らかにできると考えている。