

植物の TWINKLE は葉緑体 DNA 複製に関わる DNA プライマーゼか？

—細胞内局在の検討—

平成 26 年 4 月 24 日受付

稲 垣 麻 美^{*1}
内 山 幸 伸^{*1}
金 井 良 博^{*2}
坂 口 謙 吾^{*2}
木 村 成 介^{*3}

要 旨

光合成の場である葉緑体には DNA が存在し、核とは異なる独自の DNA 複製機構を持っている。葉緑体 DNA の複製機構には不明な点が多く、複製開始に必要な DNA プライマーゼも同定されていなかった。筆者らは、T7 ファージの T7 bacteriophage gene 4 protein (T7gp4) という DNA ヘリカーゼ/プライマーゼのホモログである TWINKLE が、植物では葉緑体に局在して DNA 複製を開始する DNA プライマーゼとして働いているのではないかと考えて研究を進めている。本研究では、パーティクルガン法により TWINKLE-GFP 融合蛋白質を一過的に植物細胞内で発現させることで細胞内局在解析をおこない、TWINKLE 蛋白質が葉緑体に局在していることを明らかにした。この結果は、植物の TWINKLE が葉緑体 DNA の複製に働く DNA プライマーゼであることを強く示唆するものである。

キーワード：葉緑体、DNA プライマーゼ、DNA ヘリカーゼ、TWINKLE、DNA 複製

1. はじめに

生物の持つ遺伝情報の多くは、核の DNA (核 DNA, ゲノム DNA) に書き込まれている。一方、細胞内共生により生じた細胞小器官である葉緑体やミトコンドリアには核とは異なる独自の DNA が存在し、それぞれ葉緑体 DNA, ミトコンドリア DNA (総称してオルガネラ DNA) と呼ばれている。

細胞分裂に先立ち、核 DNA は DNA 複製機構により倍化する。核 DNA の複製は、DNA 複製を開始する DNA プライマーゼと、DNA 鎖を伸長する DNA ポリメラーゼが協同して働く事で行われてい

*1 東京理科大学理工学部

*2 東京理科大学総合研究機構

*3 京都産業大学総合生命科学部

る¹。独自の DNA をもつ葉緑体は、核とは異なる DNA 複製機構を持っていることが知られているが、葉緑体の DNA 複製がどのように行われているかについては長らく不明であった²。

葉緑体の DNA 複製機構については、これまで全く異なる 2 つもモデルが提唱されている。1 つは、葉緑体 DNA は環状であり、核 DNA と同様に DNA プライマーゼにより DNA 複製が開始され、DNA ポリメラーゼによって DNA 鎖が伸長するというモデルである（プライマーゼ依存型 DNA 複製モデル）³（図 1）。もう 1 つは、葉緑体 DNA は直鎖状であり、DNA プライマーゼは葉緑体には存在せず、直鎖状 DNA の末端が他の直鎖状 DNA に組換えにより進入し、そこを起点として DNA 複製が開始されるというモデルである（組換え依存型 DNA 複製モデル）³（図 1）。両者のモデルとも複製中間体の観察などの結果から提唱されたモデルで、どちらが正しいモデルであるかは結論が出ていない。

筆者らは葉緑体 DNA の複製機構の研究を進め、葉緑体で働いている DNA ポリメラーゼ（DNA ポリメラーゼ π ）を初めて発見するなどの成果をあげてきた⁴。その中で、T7 ファージの T7 bacteriophage gene 4 protein (T7gp4) という DNA ヘリカーゼ／プライマーゼのホモログである TWINKLE が、植物では葉緑体に局在して DNA 複製を開始する DNA プライマーゼとして働いている可能性を見だし、それを確認するための研究を進めている⁵。前述の葉緑体 DNA の複製機構に関する 2 つもモデルの違いは、葉緑体 DNA の複製に DNA プライマーゼが関与するか（プライマーゼ依存型 DNA 複製モデル）、しないか（組換え依存型 DNA 複製モデル）であり、もし植物の TWINKLE が葉緑体で働く DNA プライマーゼであることを証明できれば、プライマーゼ依存型 DNA 複製モデルが正しいことを明らかにできる。

これまでに、ホモロジーモデリングなどのアミノ酸配列の解析から、植物の TWINKLE が DNA プライマーゼ活性を有している可能性を示唆してきたが⁵、TWINKLE が葉緑体に局在しているかどうかは不明であった。本研究では、パーティクルガンを用いた OsTWINKLE-GFP 融合蛋白質の一過性発現解析により、細胞内局在を検討した。その結果、植物の TWINKLE が葉緑体に局在していることが明らかとなったので報告する。

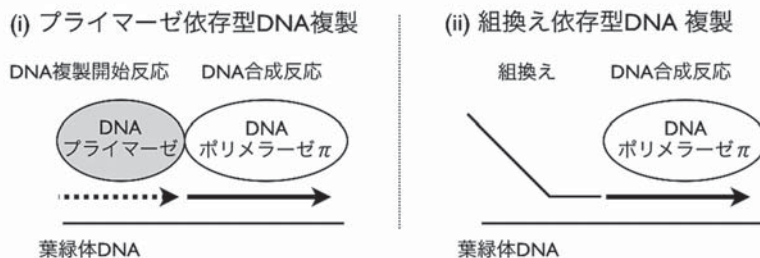


図 1 葉緑体 DNA 複製様式のモデル

(i) プライマーゼ依存型 DNA 複製 (ii) 組換え依存型 DNA 複製

2. 材料と方法

2.1 細胞内局在解析用プラスミドベクターの作成

OsTWINKLE 蛋白質の細胞内局在を解析するために必要となるプラスミドベクターを作成した。イネの cDNA を鋳型とし、OsTWINKLE に特異的なプライマー対 (5'-ACG CGT CGA CTC ATG GCC GCC TCC GCT GCC GCC GGC GGG GAC-3' および 5'-TTT TCG GGG TGT CTC CTT TCC TAT CCG CCG GCG TTT TCC TTT T-3') を用いて PCR をおこない、*OsTWINKLE* の CDS を含む断片を得た。この断片を、CaMV35S-sGFP (S65T) ベクターに常法によりサブクローニングし、OsTWINKLE-GFP 融合プラスミドを作成した⁶。

2.2 パーティクルガン法を用いた一過性発現による細胞内局在の解析

OsTWINKLE の細胞内での局在を、パーティクルガン法による OsTWINKLE-GFP 融合蛋白質の一過性発現により解析した。1.0 μ m の金粒子を、5 μ g の OsTWINKLE-GFP 融合プラスミドでコーティングし、パーティクルガン (BioListic PSD-1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad)) を用いてタマネギの表皮細胞もしくはソラマメの孔辺細胞に打ち込んだ。タマネギの表皮細胞に対しては、圧力が 900 psi、ラブチャーディスクと試料の距離は 6 cm で打ち込みを行った。ソラマメの孔辺細胞に対しては、圧力が 1,350 psi、ラブチャーディスクと試料の距離は 3 cm で打ち込みを行った。その後、室温で約 6 時間乾燥しないように静置し、蛍光顕微鏡で OsTWINKLE-GFP 融合タンパク質の細胞内局在を観察した。

3. 結果と考察

3.1 イネ TWINKLE (OsTWINKLE) の細胞内局在の解析

OsTWINKLE 蛋白質が細胞内のどこに存在するかを調べるために、OsTWINKLE-GFP 融合蛋白質の一過性発現による細胞内局在解析を行った。まず、カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターの下流に、OsTWINKLE 蛋白質および緑色蛍光蛋白質 GFP (Green Fluorescent Protein) のコード領域を結合したベクターを作成した⁶。次に、パーティクルガン法を用いて、ベクターをタマネギの表皮細胞に打ち込み、35S プロモーターの働きにより、一過的に OsTWINKLE-GFP 融合蛋白質を細胞内で発現させた。細胞内で発現した OsTWINKLE-GFP 融合蛋白質は、OsTWINKLE 蛋白質が本来局在する場所と同じ場所に局在することが期待されるため、GFP シグナルを観察することで細胞内局在を調べることができる。

OsTWINKLE-GFP 融合蛋白質をタマネギの表皮細胞内で発現させると、細胞質にドット状のシグナルが多数観察された (図 2)。このことから、OsTWINKLE 蛋白質は少なくとも核局在ではないことが明らかとなった。また、タマネギの表皮細胞における予想される葉緑体の大きさや数と観察されたシグナルの大きさと数が良く似ていることから、葉緑体に局在している可能性が考えられた。しか

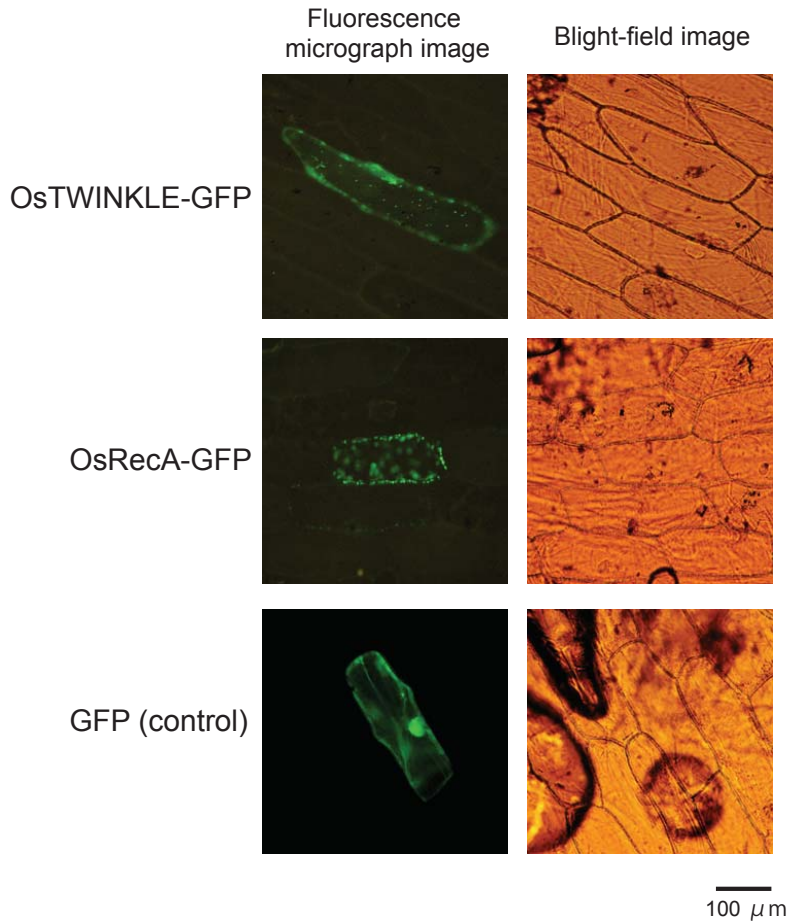


図2 タマネギの表皮細胞における OsTWINKLE 蛋白質の細胞内局在
左列は GFP 蛍光像、右列は同視野の透過光像を示す。GFP シグナルは緑色に観察されている。(上) OsTWINKLE-GFP 融合蛋白質の細胞内局在 (中) OsRecA-GFP 融合蛋白質の細胞内局在 (下) GFP 蛋白質の細胞内局在

し、タマネギの表皮細胞では直接葉緑体を観察することが難しいため、OsTWINKLE 蛋白質が葉緑体に局在するかどうかははっきりとはわからなかった。そこで、葉緑体に局在することが知られている葉緑体型 RecA 蛋白質についても同様な細胞内局在解析を行い、結果を比較した (図2)。OsRecA-GFP 融合蛋白質は細胞質に多数のドット状のシグナルとして観察され、これは OsTWINKLE-GFP 融合蛋白質の局在パターンと良く似ていた。以上の結果から、OsTWINKLE 蛋白質は、タマネギの表皮細胞では葉緑体局在であることが強く示唆された (図2)。コントロールとして、GFP を単独で発現させた場合は、細胞内に一様にシグナルが観察されており、OsTWINKLE や OsRecA で観察されたドット状のシグナルはそれぞれの蛋白質に特異的なものであることが確認できた。

さらに詳しく細胞内局在を観察するため、同様の解析をソラマメの孔辺細胞についても行った。孔

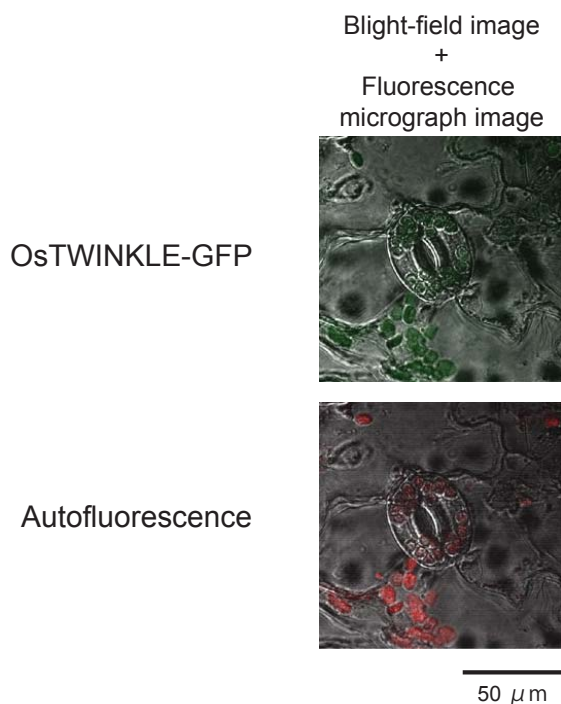


図3 ソラマメの孔辺細胞における OsTWINKLE 蛋白質の細胞内局在
 (上) OsTWINKLE-GFP 融合蛋白質の局在。OsTWINKLE-GFP のシグナルが緑色に観察されている。(下) 自家蛍光による葉緑体の可視化。葉緑体が赤色に観察されている。図は蛍光像と透過光像と蛍光像をマージしてある。

辺細胞は、気孔（葉の表皮に存在する開口部）を構成する細胞である。通常の表皮細胞は葉緑体をもっていないが、孔辺細胞には葉緑体が存在する。細胞自体も大型で、葉の表面に位置しているため、葉緑体の観察が容易な細胞である。孔辺細胞内において、OsTWINKLE-GFP 融合タンパク質を一過的発現させたところ、粒状の GFP シグナルが観察された。このシグナルは、葉緑体の持つクロロフィルという光合成色素が発する自家蛍光（赤）と完全に一致していることから、OsTWINKLE-GFP 融合タンパク質はソラマメの孔辺細胞においても葉緑体に局在していることが明らかとなった（図3）。

3.2 葉緑体移行シグナルの解析

葉緑体に局在する蛋白質をコードする遺伝子の多くは、進化の過程で宿主の核ゲノムに移行しており、OsTWINKLE 遺伝子も核ゲノムに存在している。このような核コードの葉緑体蛋白質は、細胞質で翻訳された後、葉緑体の包膜を通過して葉緑体の中に移動する必要があるが、多くの場合、アミノ末端に葉緑体移行シグナルとなるトランジットペプチドを有している。葉緑体移行に関わるトランジットペプチドは、数十から数百のアミノ酸からなるもので、リジン、アルギニン、セリン、スレオニンに富み、酸性アミノ酸が少ないといった特徴があるが、特異的なモチーフがあるわけではない。

ある蛋白質に葉緑体移行シグナルがあるかどうかを推測するためのアルゴリズムが複数提案されている。

前述の実験から、OsTWINKLE 蛋白質は葉緑体に局在しているか明らかになったが、その一次配列上に葉緑体移行シグナルがあるかどうかを、「Predator」と呼ばれるプログラムで解析した⁸。その結果、高い確率で葉緑体に局在する可能性が示唆された。これは、細胞内局在解析の結果と一致しており、OsTWINKLE が葉緑体で働いていることを強く支持するものである。また、「TargetP」というプログラムで予測したところ⁹、葉緑体移行に関わるトランジットペプチドと合わせてミトコンドリアへの移行に関わるトランジットペプチドを持つ可能性が高いという結果が得られた。OsTWINKLE 蛋白質は、葉緑体のミトコンドリアの両方で働いている可能性がある。

3.3 今後の展開

本研究では、OsTWINKLE の細胞内局在を明らかにすることを目的として研究を進めた。GFP 融合蛋白質の一過性発現による細胞内局在解析や、葉緑体移行シグナルの解析の結果から、OsTWINKLE 蛋白質は葉緑体に局在していることは間違いがないと思われる。一方、TargetP による解析からは、OsTWINKLE が葉緑体のミトコンドリアの両方に局在する可能性が示唆された。モデル植物のシロイヌナズナの TWINKLE 蛋白質については、葉緑体とミトコンドリアの両方に局在しているという研究結果が報告されている¹⁰。また、ヒトの TWINKLE はミトコンドリア局在であり¹¹、OsTWINKLE が葉緑体 DNA とミトコンドリア DNA の両方の DNA 複製に関係していることも考えられ興味深い。

さて、OsTWINKLE が、葉緑体 DNA の複製に関わる DNA プライマーゼであることを最終的に証明するためには、OsTWINKLE 蛋白質が DNA プライマーゼ活性を有することを明らかにする必要がある。以前に行ったホモロジーモデリングなどによるアミノ酸配列の解析からは、OsTWINKLE が T7gp4 と同様に DNA プライマーゼ活性を有していることが示唆されている。大腸菌発現系で発現・精製した OsTWINKLE の組換え蛋白質についての生化学的な解析を現在行っているが、DNA ヘリカーゼ活性については検出されているものの、DNA プライマーゼ活性については検出されていない。DNA プライマーゼ活性測定は技術的に難しいため、さらなる条件検討が必要なのではないかと考えている。今後の研究により、植物の TWINKLE が DNA プライマーゼ活性を持つことを明らかにできれば、葉緑体 DNA 複製のメカニズムの解明に向けた大きな一歩となるだろう。

4. 参考文献

1. Kimura, S. & Sakaguchi, K. DNA repair in plants. *Chem Rev* 106, 753-766 (2006) .
2. 木村成介, 早乙女愛, 武内亮 & 坂口謙吾. 色素体 DNA の複製と修復. *生化学* 79, 438-441 (2007) .
3. Bendich, A. Circular chloroplast chromosomes: the grand illusion. *Plant Cell* 16, 1661-1666 (2004) .
4. Kimura, S. *et al.* A novel DNA polymerase homologous to Escherichia coli DNA polymerase I from a higher

- plant, rice (*Oryza sativa* L.) . *Nucleic Acids Res* 30, 1585-1592 (2002) .
5. 武内亮, 中山北斗, 金井良博, 内山幸伸, 坂口謙吾, 木村成介 . 植物の TWINKLE は葉緑体 DNA 複製に関わる DNA プライマーゼか？ - アミノ酸配列の比較による検討 -. 京都産業大学総合学術研究所報 8, 49-55 (2013) .
 6. Chiu, W., Niwa, Y., Zeng, W., Hirono, T., Kobayasi, H, Sheen, J. Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr Biol* 6, 325-330 (1996) .
 7. Nakazato, F., Fukuzawa, H., Tabata, S., Takahashi, H., Tanaka, K. Identification and expression analysis of cDNA encoding a chloroplast recombination protein REC1, the chloroplast RecA homologue in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 2608-2613 (2003) .
 8. Small, I., Peeters, N., Legeai, F., Lurin, C., Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics* 6, 1581-1590 (2004) .
 9. Emanuelsson, O, Brunak, S., Heijne, G., Nielsen, H. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. *Nature Protocols* 2, 953-971 (2007) .
 10. Carrie, C., Kuhn, K., Murcha, M. W., Duncan, O., Small, I., Otoole, N., Whelan, J. Approaches to defining dual-targeted proteins in Arabidopsis. *Plant J.* 57, 1128-1139 (2009)
 11. Jemt, E. *et al.* The mitochondrial DNA helicase TWINKLE can assemble on a closed circular template and support initiation of DNA synthesis. *Nucleic Acids Res* 39, 9238-9249 (2011) .

Subcellular localization analysis of plant TWINKLE protein

Asami INAGAKI
Yukinobu UCHIYAMA
Yoshihiro KANAI
Kengo SAKAGUCHI
Seisuke KIMURA

Abstract

Plastids are major organelles found in plant cells and contain their own genomes. Plastids are thought to have unique DNA replication systems, where DNA primase and DNA helicases are responsible for synthesis of primers and DNA unwinding, respectively. While earlier studies have identified DNA primase and helicase activities in a plastid fraction but little is known about genes encoding the plastidial DNA primase. Here we characterized a rice homologue of *TWINKLE* (*Oryza sativa* cv. Nipponbare, termed *OsTWINKLE*), which is an autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia (adPEO)-associated gene that encodes mitochondrial DNA helicase in mammalian cells. Subcellular localization analyses using GFP fusion protein showed that *OsTWINKLE* is distributed in plastids. These results suggested that the plant homologue of *TWINKLE* functions as a DNA primase during plastidial DNA replication.

Keywords : Plastid, DNA primase, DNA helicase, *TWINKLE*, DNA replication