

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 —

平成 25 年 4 月 23 日受付

武内 亮^{*1}
中山 北斗^{*2}
金井 良博^{*3}
内山 幸伸^{*4}
坂口 謙吾^{*3}
木村 成介^{*2}

要 旨

細胞内共生により生じた葉緑体は、核とは異なる独自の DNA 複製機構を持っている。これまで、葉緑体 DNA の複製開始に必要な DNA プライマーゼは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いう仮説を立てて研究を進めている。本研究では、ホモロジーモデリングなどの手法により T7gp4、動物および植物の TWINKLE のアミノ酸配列を比較し、植物では DNA プライマーゼドメインが高度に保存され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。

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

葉緑体は、光合成を行う細胞内小器官である。細胞内共生により生じた葉緑体には独自の DNA が存在し、核とは異なる DNA 複製機構を持っている。細胞分裂時に核 DNA が複製するのに伴って葉緑体 DNA も複製するが、その様式については不明な点が多い。

*1 Division of Basic Sciences, Fred Hutchinson Cancer Research Center

*2 京都産業大学総合生命科学部

*3 東京理科大学総合研究機構

*4 東京理科大学理工学部

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る²。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、葉緑体の DNA が複製される際に働く DNA プライマーゼと DNA ポリメラーゼも見つかっていなかった。しかしながら、筆者らによって世界で初めて葉緑体で働いている DNA ポリメラーゼ (DNA ポリメラーゼ π) が発見されたことがブレイクスルーとなり³、葉緑体 DNA 複製様式についての知見が得られるようになってきた。

これまでに行われた電子顕微鏡による葉緑体 DNA および複製中間体の観察結果などから、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考えが一般的であった (プライマーゼ依存型 DNA 複製モデル)⁴ (図 1)。一方で、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も提唱された (組換え依存型 DNA 複製モデル)⁴ (図 1)。

この2つのモデルのうち、どちらが正しいかは未だに明らかとなっていない。両者の違いは、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、もし葉緑体で DNA ポリメラーゼ π と共同してはたらく DNA プライマーゼが発見できれば、どちらのモデルが正しいかを明らかにすることができる。

これまでに、筆者らは葉緑体 DNA の複製に関わる遺伝子の研究を進めて来た。その中で、植物の TWINKLE が、葉緑体に局在して DNA プライマーゼとして働いているのではないかという仮説をたて研究を進めている。もし、植物の TWINKLE が DNA プライマーゼ活性を有していれば、プライマーゼ依存型 DNA 複製モデルを強く支持する結果となり、葉緑体 DNA の複製様式の解明への大きな前進となる。

本研究では、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かどうかを検討した。その結果、植物の TWINKLE が葉緑体 DNA の複製開始に関与する DNA プライマーゼである可能性が示唆されたので報告する。

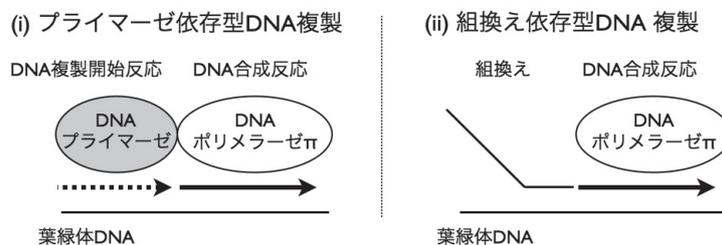


図 1 葉緑体 DNA 複製の様式として提唱されている 2 つのモデル
(i) プライマーゼ依存型 DNA 複製 (ii) 組換え依存型 DNA 複製

2. 材料と方法

2.1 イネの TWINKLE (*OsTWINKLE*) の同定と配列決定

DNA プライマーゼドメインを有する遺伝子をイネのゲノムから探索し、T7 ファージの DNA ヘリカーゼ/プライマーゼである T7gp4 (T7 bacteriophage gene 4 protein) のイネホモログを見いだした。T7gp4 のヒトのホモログは *TWINKLE* (*HsTWINKLE*) と呼ばれているので、今回同定したイネの T7gp4 ホモログを *OsTWINKLE* (*Oryza sativa TWINKLE*) と名付けた。T7gp4 やヒトの *TWINKLE* との比較から、*OsTWINKLE* の CDS (Coding Sequence) と考えられる領域を決定し、プライマー (5'-ACGCGTCTGACTCATGGCCGCCTCCGCTGCCGCCGGCGGGGAC-3') と (5'-TTTTCGGGGTGTCTCCTTTCTATCCGCCGGCGTTTTTCCTTTT-3') を設計した。このプライマー対を用いて、イネの茎頂由来の cDNA をテンプレートに PCR をおこない、*OsTWINKLE* の CDS を含む断片を得た。この断片の DNA 配列を常法により決定し、DDBJ Nucleotide database に登録した (Accession number AB444635)。

2.2 アミノ酸配列の解析およびホモロジーモデリング

相同性検索やアラインメントなどのアミノ酸配列解析は、MEGA および GENETYX-MAC を使用して行った。ホモロジーモデリングは Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) を用いて行い、Mac Pymol (<http://www.pymol.org/>) 使用して描画した⁵。

3. 結果と考察

3.1 イネ *TWINKLE* (*OsTWINKLE*) の同定

葉緑体の DNA 複製に働く DNA プライマーゼを同定することを目的として、イネのゲノム配列中に存在する DNA プライマーゼドメインを持つ遺伝子を網羅的に探索した。多くの遺伝子が見つかったが、その中で、T7 ファージの T7 bacteriophage gene 4 protein (T7gp4) のホモログに注目した。T7gp4 は、DNA ヘリカーゼと DNA プライマーゼの両方の活性を有する DNA ヘリカーゼ/プライマーゼで、T7 bacteriophage gene 5 protein (T7gp5) という DNA ポリメラーゼと協調して、T7 ファージの DNA の複製を行っている^{6,7}。

T7gp5 のヒトホモログは *TWINKLE* (*HsTWINKLE*) と呼ばれ、ミトコンドリアに局在している⁸。*HsTWINKLE* は、ミトコンドリア DNA の複製において DNA ヘリカーゼとして働いているが、DNA プライマーゼ活性はないことがわかっている^{8,9}。イネのゲノムにコードされていた T7gp4 のホモログ (*OsTWINKLE*) の細胞内局在を、GFP 融合蛋白質をタマネギの表皮細胞で一過性に発現させることで調べたところ、ミトコンドリアではなく、葉緑体に局在していることがわかった (木村ら、未発表)。もし、*OsTWINKLE* が DNA プライマーゼ活性を有していれば、葉緑体 DNA の複製に関与する DNA プライマーゼである可能性があり興味深い。

3.2 アミノ酸配列のアラインメントによる比較

T7gp4 は N 末端領域に DNA プライマーゼドメイン, C 末端領域には DNA ヘリカーゼドメインを持っている⁶。T7gp4 と植物(イネ, ヒメツリガメゴケ(コケ植物), イヌカタヒバコケ(シダ植物))および動物(ヒト, ショウジョウバエ, 線虫, アフリカツメガエル, マウス)の TWINKLE のアミノ酸配列のアラインメントを作成し, DNA プライマーゼドメインと DNA ヘリカーゼドメインの配列を比較した。図 2 を見るとわかるように, すべての TWINKLE において DNA ヘリカーゼドメインは高度に保存されていた。DNA プライマーゼドメインに注目すると, 植物の TWINKLE では保存性が高かったが, 動物の TWINKLE では保存性が低かった。これは, 動物の TWINKLE に DNA プライマーゼ活性がないことと一致する。植物の TWINKLE の DNA プライマーゼドメインの場合, コケ植物やシダ植物も含めて T7gp4 との類似性が高かった。T7gp4 の部位特異的突然変異導入実験により

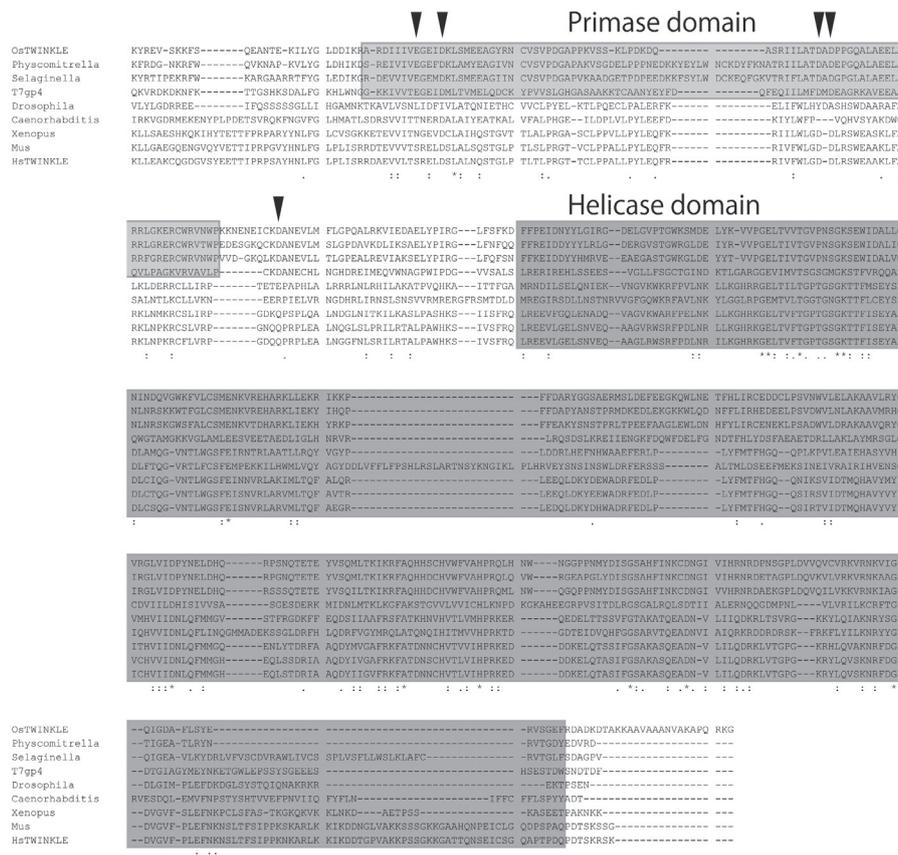


図 2 T7gp4 および TWINKLE のアミノ酸配列の比較

それぞれの配列の由来は次の通り。Physcomitrella, *Physcomitrella patens* (ヒメツリガメゴケ); Selaginella, *Selaginella moellenendorffii* (イヌカタヒバ); Drosophila, *Drosophila melanogaster* (ショウジョウバエ); Xenopus, *Xenopus laevis* (アフリカツメガエル); Mus, *Mus musculus* (ハツカネズミ)。矢じりは DNA プライマーゼ活性に必要なアミノ酸残基を示している。

DNA プライマーゼ活性に必要なアミノ酸が 5 残基同定されている。これらのアミノ酸は図 2 の矢じりで示されているが、植物の TWINKLE では全ての残基が保存されていた。以上の結果から、植物の TWINKLE は動物と異なり DNA プライマーゼ活性を保持しているのではないかと考えられた。

3.3 ホモロジーモデリングによる比較

さらに詳しく OsTWINKLE が DNA プライマーゼ活性を有するかどうかを検討するため、ホモロジーモデリングを利用した比較解析を行った。ホモロジーモデリングとは、立体構造が明らかとなっている蛋白質を鋳型(テンプレート)にして、それと相同性の高いタンパク質の立体構造を予測する手法である⁵。T7gp4 の立体構造はすでに明らかとなっているので、これをテンプレートにして、OsTWINKLE と HsTWINKLE の DNA プライマーゼドメインの立体構造を構築した(図 3)。

図 3 は、得られたモデルを示しており、上から T7gp4, OsTWINKLE, HsTWINKLE である。一見して、T7gp4 と OsTWINKLE の立体構造はお互いに良く似ていることがわかる。一方、T7gp4 と HsTWINKLE はあまり似ていない。DNA プライマーゼドメイン内で高度に保存されているアミノ酸側鎖(活性部位)はスティックで表されているが、これらも OsTWINKLE では全て保存されている一方、HsTWINKLE では保存されていなかった。T7gp4 ではジンクバインディングドメインと呼ばれる部分が基質 DNA への結合に重要で、このドメインを完全に取り除くと RNA プライマーが合成されなくなることが知られている⁶。モデルを見ると、このドメインは OsTWINKLE でも保存性が低かった。

以上の結果から考察すると、OsTWINKLE の DNA プライマーゼドメインは、T7gp4 の DNA プライマーゼドメインと 24% の同一性があり、かつ、活性部位が保存されているので、DNA プライマーゼ活性を有する可能性が高いと考えられた。ただし、ジンクバインディングドメインの保存性が低いので、基質 DNA への結合性は T7gp4 と比較しては弱い、もしくはアフィニティーが異なると考えられる。

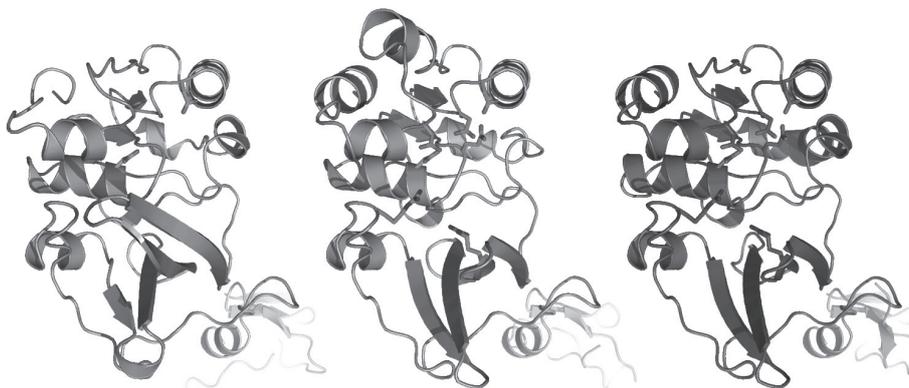


図 3 T7gp4 および TWINKLE ホモロジーモデリングによる比較
(左)HsTWINKLE, (中)OsTWINKLE, (右)T7gp4

3.4 今後の展開

ホモロジーモデリングなどによるアミノ酸配列の比較からは、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た。今後、OsTWINKLE が葉緑体 DNA 複製に関わる DNA プライマーゼであることを証明するには、大腸菌発現系で発現・精製した OsTWINKLE の組換え蛋白質の DNA プライマーゼ活性を測定する必要がある。現在、大腸菌発現系を構築しているが、分解されやすい蛋白質であるようで、残念ながらインタクト(未分解)の組換え蛋白質の完全精製にはいたっていない。発現ベクターの再構築や精製方法の改良などにより、DNA プライマーゼ活性測定に供試可能な組換え蛋白質を得ることを試みている。

また、OsTWINKLE が葉緑体の DNA 複製に関与している DNA ポリメラーゼ π と協同して働いているかを調べる必要もある。T7gp4 が協同して働いている T7gp5 は A ファミリーに属する DNA ポリメラーゼで、DNA ポリメラーゼ π も A ファミリーに属していることから、TWINKLE と DNA ポリメラーゼ π が相互作用する可能性は高い。

今後の研究により、植物の TWINKLE が DNA プライマーゼ活性を持ち、かつ、DNA ポリメラーゼ π と協同して働くことを示すことができれば、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と期待される。

参考文献

1. 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).
2. Kimura, S. & Sakaguchi, K. DNA repair in plants. *Chem Rev* 106, 753-766 (2006).
3. 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).
4. Bendich, A. Circular chloroplast chromosomes: the grand illusion. *Plant Cell* 16, 1661-1666 (2004).
5. Kelley, L. A. & Sternberg, M. J. E. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* 4, 363-371 (2009).
6. Kato, M., Ito, T., Wagner, G., Richardson, C. C. & Ellenberger, T. Modular architecture of the bacteriophage T7 primase couples RNA primer synthesis to DNA synthesis. *Mol Cell* 11, 1349-1360 (2003).
7. MENDELMAN, L. V., NOTARNICOLA, S. M. & Richardson, C. C. Roles of bacteriophage T7 gene 4 proteins in providing primase and helicase functions in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 10638-10642 (1992).
8. Tyynismaa, H. *et al.* Twinkle helicase is essential for mtDNA maintenance and regulates mtDNA copy number. *Human molecular genetics* 13, 3219-3227 (2004).
9. 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).

Homology modeling suggested that plant TWINKLE protein has both DNA primase and DNA helicase activities and may functions as plastidial DNA replication enzyme

Ryo TAKEUCHI
Hokuto NAKAYAMA
Yoshihiro KANAI
Yukinobu UCHIYAMA
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 and DNA helicase.

In animal cells, TWINKLE protein, which is is homologue of bacteriophage T7gp4, is known to be localized to mitochondria. While T7gp4 has both DNA primase and helicase activities, animal TWINKLE protein has only DNA helicase activity due to sequence change in DNA primase domain. Plant genome encodes TWINKLE protein, and our preliminary subcellular localization analysis showed that rice TWINKLE protein is targeted to plastid. Amino acid sequence comparison and homology modeling analysis showed that the plant TWINKLE proteins retain sequence homology for DNA primase domain of the T7gp4. These results suggested that the plant homologue of TWINKLE functions as a DNA primase and DNA helicase during plastidial DNA replication.

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