



色素体 DNA の複製と修復

1. はじめに

色素体とは植物細胞内に存在する葉緑体やアミロプラスト、白色体など、二重の膜に包まれたオルガネラの総称である。細胞内共生により生じた色素体には独自の DNA が存在し、核とは異なる DNA 複製修復機構を持っている。細胞の分裂に伴って色素体 DNA も複製するが、その機構については不明な点が多い。

色素体は葉などでは葉緑体に分化しているが、葉緑体は活性酸素の発生源であり、その DNA は常に酸化など重篤な傷害を受けていると考えられる。色素体 DNA を安定に維持するためには DNA 修復が重要であるが、これまで色素体 DNA の修復機構についてはほとんど研究が進んでいなかった。

最近、色素体に局在する DNA ポリメラーゼが筆者らによりクローニングされるなど^{1,2)}新しい知見が得られつつある。ここでは高等植物の色素体 DNA の複製修復機構について概説する。

2. 色素体 DNA の DNA 複製および修復

2.1 色素体 DNA の複製機構

色素体は分裂組織などの未分化の細胞では原色素体として存在しているが、組織・器官特異的に分化し、例えば葉では光合成を行う葉緑体に、根ではデンプンの貯蔵を行うアミロプラストとなる。細胞の増殖や分化に伴って色素体も増殖し色素体 DNA も複製するが、そのコピー数はダイナミックに変化し、多いときには細胞あたり 10,000 コピー以上に達する。色素体 DNA の複製に必要な遺伝子は核 DNA にコードされており、色素体 DNA の複製やコピー数は核の制御下にあると考えられるが、その制御機構

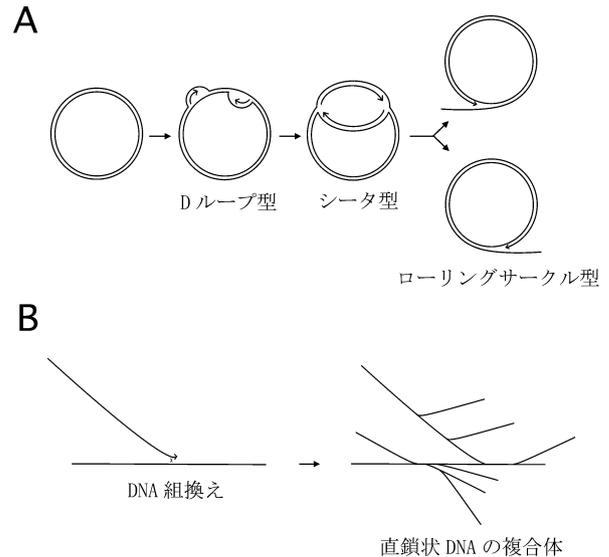


図1 色素体 DNA の複製モデル

(A) 古典的モデル, (B) 組換え依存型 DNA 複製モデル。

についてはほとんどわかっていない。

これまで電子顕微鏡による色素体 DNA および複製中間体の観察から、色素体 DNA は環状でありその複製は D ループ型からシータ型を経てローリングサークル型で行われていると考えられていた (図 1A)³⁾。一方で最近、色素体 DNA は直鎖状であり、多数の直鎖状 DNA が集合した複合体として存在しているという報告がなされ、これに伴い組換え依存型 DNA 複製と呼ばれる複製モデルが提唱された (図 1B)³⁾。このモデルでは、直鎖状 DNA の端が他の直鎖状 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。複数の直鎖状 DNA が組換えと複製を起こすことで、多数の直鎖状 DNA が集合した複合体が形成される。

しかし色素体 DNA の複製様式に関しては未だにはっきりしていないのが現状であり、今後の研究の進展が期待される。

2.2 色素体 DNA の修復機構

葉緑体は活性酸素の大きな発生源であり、その DNA は激しい傷害を受けている。色素体 DNA には光合成関連の遺伝子などがコードされており、色素体の機能を保つためには DNA 修復が重要である。

単細胞藻類のクラミドモナスの色素体には光回復酵素が局在し、光回復による修復が行われている⁴⁾。一方、高等植物の色素体では光回復が行われているという結果⁵⁾と行

われていないという結果⁶⁾の両方が報告されているが、少なくとも色素体(葉緑体)移行シグナルを持つ光回復酵素はシロイヌナズナおよびイネにはコードされていない⁷⁾。

色素体における除去修復など光回復以外のDNA修復経路に関してはほとんど知見が得られていないが、後述するように、DNAの組換えに関与するRecAホモログが色素体に局在し、また色素体DNAのコピー数が多いことを考えると、DNA組換えを介した修復経路が重要な役割を果たしている可能性がある。またシロイヌナズナではDNAが倍数体化することでDNA傷害に対する耐性が上昇することが知られており⁸⁾、色素体DNAも多コピー存在することでDNA傷害に対する耐性を高めているのかもしれない。

3. 色素体に局在するDNA複製修復因子

色素体DNAの複製および修復は数多くの因子により行われていると考えられる。これまでに色素体に局在することが知られているDNAの複製修復因子について解説する。

3.1 DNAポリメラーゼ

1970年代から色素体または葉緑体にDNAポリメラーゼ活性が存在することは知られており、様々な植物の色素体からDNAポリメラーゼタンパク質が精製され性状解析が行われてきた。ヒトなどのミトコンドリアには大腸菌のDNAポリメラーゼIと同じA-familyに属するDNAポリメラーゼ γ が局在しているが、色素体のDNAポリメラーゼの生化学的性質はDNAポリメラーゼ γ に比較的近かった。さらにタバコBY-2細胞の単離オルガネラ核を用いたDNAポリメラーゼの解析から、色素体核およびミトコンドリア核には互いに酷似しているDNAポリメラーゼが存在していることが示された⁹⁾。これは色素体とミトコンドリアの間でDNAポリメラーゼの共通化が起きた可能性を示唆しており興味深い。具体的などのようなDNAポリメラーゼが色素体またはミトコンドリアで機能しているかは長らく不明であった。

イネおよびシロイヌナズナのゲノム配列情報を調べると予想外なことにDNAポリメラーゼ γ は存在せず、代わりにA-familyに属する機能未知のDNAポリメラーゼが二つ存在していた^{2,7,10)}。筆者らが特異抗体を用いた細胞分画実験およびGFP融合タンパク質による細胞内局在解析を行ったところ、このタンパク質が色素体およびミトコンドリアに局在していることがわかり、これまで不明であった

植物の色素体およびミトコンドリアに局在するDNAポリメラーゼの実体が初めて明らかとなった。筆者らはこのDNAポリメラーゼの名称としてDNAポリメラーゼ π (pi, パイ)を提唱している。

DNAポリメラーゼ π は茎頂や根端、葉原基などの分裂組織で強く発現していたが、この発現パターンは色素体DNAのコピー数の増加の時期に一致することから、色素体DNAの複製や複製に伴う修復に関与すると考えられた^{1,2)}。GST融合タンパク質によるDNAポリメラーゼ π の詳しい生化学的解析(武内ら、未発表データ)から、この酵素はDNAポリメラーゼ活性と3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有し、また、DNA合成の忠実度は高いことがわかった。DNAポリメラーゼ π は大腸菌のDNAポリメラーゼIよりも高いプロセスビティ(DNA鎖伸長能)を持ち、DNAプライマーだけでなくRNAプライマーからも効率的にDNA合成を行うことができた。これらの結果は、DNAポリメラーゼ π が色素体DNAの複製に適した生化学的性質を持っていることを示している。DNAポリメラーゼ π は塩基除去修復のショートパッチ経路に必要なdRP(5'-deoxyribose phosphate)リアーゼ活性を持っていなかったが、一方でdRPを持つ基質に対して効率のよい鎖置換活性(strand displacement activity)を示した。このことからDNAポリメラーゼ π は色素体における塩基除去修復のロングパッチ経路のようなDNA修復経路に関与している可能性がある。

以上のように色素体に局在するDNAポリメラーゼの実体は明らかとなったが、その機能については不明な点が多い。今後の研究によりDNAポリメラーゼ π のDNA修復における機能や協同して働くタンパク質の存在や、二つあるDNAポリメラーゼ π の使い分けなどが明らかになれば色素体DNA複製および修復機構について更なる知見が得られるだろう。

3.2 DNAプライマーゼ

DNAポリメラーゼがDNAを合成するにはプライマーが必要であるが、エンドウマメの葉緑体から分子量115-120kDaのDNAプライマーゼが精製されている¹¹⁾。この酵素はssDNAを鋳型にしたプライマー合成反応を行うことから、色素体DNAの複製時にDNAプライマーゼとして機能していると考えられる。

3.3 DNAヘリカーゼ

DNAヘリカーゼはdsDNAをssDNAにほどく酵素であ

り、DNA複製や修復の様々な過程で働いている¹²⁾。これまでに、エンドウマメの色素体から2種類のDNAヘリカーゼ、CDHIおよびCDHII (chloroplast DNA helicase) が精製され性状解析が行われている¹²⁾。これらのDNAヘリカーゼの詳細な機能は不明であるが、CDHIIは複製フォークに似たDNAの形を基質として好むことから色素体DNAの複製に関与していると考えられる。

RecQと呼ばれるDNAヘリカーゼは原核生物から真核生物まで高度に保存されており、DNA修復や組換えにおいて重要な役割を担っている。高等植物には七つのホモログが存在しているが、これらの細胞内局在をGFP融合タンパク質の一過性発現により調べたところ、RecQ1とRecQsimの2種類はオルガネラ(色素体またはミトコンドリア)に局在していることが示された¹³⁾。詳細な機能は不明であるが、RecQ1のアミノ酸配列は大腸菌RecQと相同性が非常に高いことなどからオルガネラで機能していると考えられる。またRecQsimも、動物には存在せず植物に特異的に存在するタンパク質であることなどから色素体特異的に機能する因子である可能性が高く興味深い。

3.4 DNAトポイソメラーゼ

DNAトポイソメラーゼは、DNA複製や修復の過程で生じるDNAのゆがみや絡まりなどを解消する酵素で、I型とII型の2種類がある。I型は一本鎖DNAの切断により超らせんDNAの弛緩に関与し、II型はdsDNAを切断することによりDNA同士の絡まりの解消や結び目の解消に関与している。また大腸菌のDNAジャイレースはII型のトポイソメラーゼの一種であるが、他のトポイソメラーゼとは異なりATPのエネルギーを利用してDNAに超らせんを導入することができる。

これまでにカリフラワーの色素体などからトポイソメラーゼが精製され性状解析が行われている¹⁴⁾。また、色素体に局在するDNAジャイレースがシロイヌナズナで単離され、色素体DNAの分配に関与していることなどが明らかとなっている¹⁵⁾。

3.5 RPA

RPA (replication protein A) は、DNA複製や修復の時に形成される一本鎖DNAに結合して安定化するssDNA結合タンパク質である。また、DNAポリメラーゼなど多くのタンパク質と相互作用することが知られている。

RPAは70, 32, 14kDaの三つのサブユニットからなるヘテロ三量体であるが、高等植物には70および32kDaの

サブユニットが3種類ずつ存在しており、3種類のRPA複合体(A型, B型, C型)を形成していることがわかった¹⁶⁾。これらの細胞内局在を特異抗体により調べたところ、B型RPAは色素体に、AおよびC型は核に局在していることがわかった¹⁶⁾。B型RPAのノックダウン植物は致死であり、その詳細な機能は不明だが色素体DNAの複製修復に必須であると考えられる。植物は遺伝子の縮重が多くホモログを複数持つケースが多い。RPAの場合、3種類存在するRPAホモログのうちの一つが色素体に局在していた。このことは、縮重により複数存在するDNA複製修復遺伝子の一部が色素体やミトコンドリアで働いている可能性があることを示唆している。RPAの原核生物型のカウンターパートとして単量体のSSB (single-strand DNA binding protein) が知られている。色素体にSSBではなく真核生物型のRPAが存在していることは色素体の進化を考える上で興味深い。おそらく色素体の共生の過程で、核で機能していたRPAが色素体でも機能するようになったのであろう。

3.6 RecA

大腸菌のRecAは2本のDNA鎖を交換する反応である相同組換えに関与するタンパク質であり、2本のDNAの相同性の検索および相同鎖同士の交換反応を促進する。相同組換え反応は体細胞においては二本鎖切断修復などのDNA修復に重要な役割を果たしている。

エンドウマメやシロイヌナズナの核ゲノムにはRecAホモログがコードされており、これが葉緑体に局在していることが示されている¹⁷⁾。詳しい機能は不明であるが、色素体におけるDNA修復に関与していると考えられる。

3.7 その他

シアノバクテリアに近い生物の細胞内共生により生じた色素体のDNA複製修復に関与している因子は原核生物型のそれに近いことが予想される。イネやシロイヌナズナのゲノム配列中にはシアノバクテリアなどの原核生物や古細菌のDNA代謝系酵素とホモロジーを持つ遺伝子が多く存在しており、これらの遺伝子産物が色素体で機能している可能性がある。

4. おわりに

色素体が増殖し分化してその機能を発揮するためには、細胞の分裂や分化と密接に関連し制御された色素体DNAの複製機構と、活性酸素や紫外線による傷害からも遺伝情

報を維持できる DNA 修復機構が必須である。色素体 DNA の複製修復機構の研究の歴史は長いがまだまだ不明な点が多い。今後の研究の進展が期待される。

- 1) Mori, Y., Kimura, S., Saotome, A., Kasai, N., Sakaguchi, N., Uchiyama, Y., Ishibashi, T., Yamamoto, T., Chiku, H., & Sakaguchi, K. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **334**, 43–50.
- 2) Kimura, S., Uchiyama, Y., Kasai, N., Namekawa, S., Saotome, A., Ueda, T., Ando, T., Ishibashi, T., Oshige, M., Furukawa, T., Yamamoto, T., Hashimoto, J., & Sakaguchi, K. (2002) *Nucleic Acids Res.*, **30**, 1585–1592.
- 3) Bendich, A.J. (2004) *Plant Cell*, **16**, 1661–1666.
- 4) Petersen, J.L. & Small, G.D. (2001) *Nucleic Acids Res.*, **29**, 4472–4481.
- 5) Draper, C.K. & Hays, J.B. (2000) *Plant J.*, **23**, 255–265.
- 6) Hada, M., Hino, K., Buchholz, G., Goss, J., Wellmann, E., & Shin, M. (2000) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1288–1291.
- 7) Kimura, S. & Sakaguchi, K. (2006) *Chem. Rev.*, **106**, 753–766.
- 8) Hase, Y., Trung, K.H., Matsunaga, T., & Tanaka, A. (2006) *Plant J.*, **46**, 317–326.
- 9) Sakai, A., Takano, H., & Kuroiwa, T. (2004) *Int. Rev. Cytol.*, **238**, 59–118.
- 10) Sato, N., Terasawa, K., Miyajima, K., & Kabeya, Y. (2003) *Int. Rev. Cytol.*, **232**, 217–262.
- 11) Nielsen, B.L., Rajasekhar, V.K., & Tewari, K.K. (1991) *Plant Mol. Biol.*, **16**, 1019–1034.
- 12) Tuteja, N. (2003) *J. Exp. Bot.*, **54**, 2201–2214.
- 13) Saotome, A., Kimura, S., Mori, Y., Uchiyama, Y., Morohashi, K., & Sakaguchi, K. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **345**, 1283–1291.
- 14) Fukata, H., Mochida, A., Maruyama, N., & Fukasawa, H. (1991) *J. Biochem. (Tokyo)*, **109**, 127–131.
- 15) Wall, M.K., Mitchenall, L.A., & Maxwell, A. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 7821–7826.
- 16) Ishibashi, T., Kimura, S., & Sakaguchi, K. (2006) *J. Biochem. (Tokyo)*, **139**, 99–104.
- 17) Cao, J., Combs, C., & Jagendorf, A.T. (1997) *Plant Cell Physiol.*, **38**, 1319–1325.

木村 成介^{1,2}, 早乙女 愛¹, 武内 亮¹, 坂口 謙吾¹

(¹ 東京理科大学理工学部応用生物科学科,

² 現所属; カリフォルニア大学デービス校植物学部)

Plastid DNA replication and repair

Seisuke Kimura^{1,2}, Ai Saotome¹, Ryo Takeuchi¹ and Kengo Sakaguchi¹ (¹Department of Applied Biological Science, Faculty of Science and Technology, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda-shi, Chiba 278–8510, Japan; ²Presently, Section of Plant Biology, University of California, Davis)

投稿受付: 2006年11月21日

ヘム代謝が仲介する多様な生理活性

1. はじめに

2006年でGordon Research Conference (GRC)は75周年を迎えた。私にとっては1992年にTetrapyrrole Compound SessionのGRCに初めて機会を与えられて以来5度目の参加であった。多くの常連参加者は、多感な若き日に参加し、少なからぬ学問的刺激を受け、研究者への道を歩むきっかけになったと話す。私自身も2年に1度のGRCに参加する度に先端情報のみならず、独特の雰囲気により意欲を新たにし、研究活動の原動力にしている一人であり、最近では研究室の大学院生にも応募させ、国際的な刺激を受けるよう促している。生体内のメジャーなTetrapyrrole Compoundはヘムであることから、このSessionには世界中からヘム研究に携わる科学者が集まることになる。筆者はヘム合成系代謝異常症の分子生物学的な解析に端を発し、ヘム分解系の果たす多彩な役割の究明へと研究を展開している。ヘムタンパク質に関連した最近の話題は2003年に本誌でも特集が組まれ、その多様な生理機能がまとめられているので、参照していただきたいが、本稿ではこれまでに私が手掛けてきた研究成果を中心に、生体内の古くて新しい、普遍かつ神秘的なヘム代謝調節機構に関することをまとめてみたい。

2. ヘム合成系の障害による代謝異常症: 5-アミノレブリン酸脱水酵素 (ALAD) 欠損性ポルフィリン症 (ADP) における分子異常の多様性

ヘム合成に関与する8種類の酵素のうち、第2酵素ALAD (E.C. 4.2.1.24)の遺伝的欠損により発症するADP¹⁾は、劣性遺伝性であるため稀であり、現在のところ世界中でも6例が報告されているのみで日本では未だ報告はない。図1はこれまでに同定されたヒトALADの分子異常をまとめたものである。筆者らは3例目のADPから新規点変異と初めての2塩基欠失変異を発見し(図1, ⑧⑩)²⁾、その後の3症例の遺伝子解析を手掛けた。4例目のADPは高齢発症が特徴で、当初多血球血症と診断されていた。筆者らがALAD遺伝子を解析した結果、この患者は活性低下の原因となる点変異(図1, ⑦)をヘテロで持っていたが、何らかの要因でclonal expansionが起こり、多血球