

## クロマツ葉緑体の光合成関連蛋白質の構造について

續 順 子

On the Structure of a Photosynthetic Protein  
in Black Pine Chloroplast

Junko TSUDZUKI

生物材料を取り扱う学問分野においては、今後、組換え DNA 実験技術および DNA 塩基配列決定技術の活用が盛んになると思われる。なぜなら、遺伝子 DNA の構造を明らかにすることで、それがコードする蛋白質などの構造も解明出来るなど、様々な応用の道が開かれているからである。私は、私学研修員として国内研修の機会を与えられた平成元年4月から同9月までの間、これらの技術の修得のために、名古屋大学遺伝子実験施設(施設長：杉浦昌弘教授)において研究を行なった。

この研究では、クロマツ葉緑体 DNA の構造解析を進めたが、光合成に関与する主要な蛋白質をコードする遺伝子の塩基配列を解析し、これによってその蛋白質のアミノ酸配列を決めることが出来た。

植物の細胞内小器官である葉緑体は、光合成反応の場であって、地球上の生命活動を支えるエネルギーの生産を行なっている。葉緑体は独自の DNA と蛋白質合成系を持ち、光合成の過程に係わる多くの蛋白質を自ら合成している。

葉緑体の DNA は、120～190キロ塩基対 (kbp) からなる2本鎖の環状の分子で、1個の葉緑体に比較的多数の分子が存在しており、作物を中心とした多くの植物で予め分画された葉緑体から抽出精製されている。中でも、タバコ<sup>1)</sup>、イネ<sup>2)</sup>、ゼニゴケ<sup>3)</sup>においては、既にその全塩基配列が決定されており、ダイズ、コムギ、トウモロコシ、ホウレンソウなどでの解析が各国で進められている。

これらの植物は、ゼニゴケ以外すべて被子植物であり、裸子植物の葉緑体 DNA の解析は例が少ない。マツ科の植物では、暗所でも発芽種子の緑化が進行するなど、光合成系の発現に特徴があり、その葉緑体 DNA の解析は興味深い課題であると思われる。

また同じマツ科の葉緑体 DNA について幾つかの遺伝子の配置を検討した研究<sup>4)</sup>によれば、マツ科植物の葉緑体 DNA は、他の植物の葉緑体 DNA で一般的な10～76kbp におよぶ逆位反復配列を持たないようである。これは、被子植物では例外的にマメ科植物だけで報告されているもので、この点からも興味が深い。

近年、クロマツの幼葉から葉緑体 DNA が単離され<sup>5)</sup>、これを用いて研究を開始した。なお、今回解析したのは、葉緑体チラコイド膜上に形成される光合成系Ⅱにおいて電子伝達に関与する蛋白質で、P32あるいはD1と呼ばれるものをコードする遺伝子であり、Hallickら<sup>6)</sup>によって、psbA と命名されているものである。

## 実験材料および方法

クロマツ葉緑体 DNA：クロマツ葉緑体 DNA（以下 pDNA）については、王子製紙(株)育種研究所亀山研究室で作成されたクローンバンクの分与を受けた。これは、発芽後 2 週間のクロマツ（*Pinus thunbergii* Parl.）の芽生えから抽出精製された pDNA を、制限酵素 Pst I で 11 個の断片に切断し、各々を pBR322 ベクターに挿入したものである。表(1)にそれらのクローン名と挿入 DNA の大きさを示した。本報告では、これらのうち pPst I-5（以下、pP 5）および pPst I-6（以下、pP 6）を解析の対象とした。

表 1 クロマツ葉緑体 DNA の Pst I によるクローニング

| Clone Name | Flagment Size |
|------------|---------------|
| pPstI-1    | 29.9 kbp      |
| pPstI-2    | 20.6          |
| pPstI-3    | 13.8          |
| pPstI-4    | 13.7          |
| pPstI-5    | 12.1          |
| pPstI-6    | 9.7           |
| pPstI-7    | 9.0           |
| pPstI-8    | 6.7           |
| pPstI-9    | 2.04          |
| pPstI-10   | 1.55          |
| pPstI-11   | 1.05          |
| Total      | 120.14 kbp    |

Vector=pBR322 (4.4 kbp)

制限酵素、緩衝液、培地、DNA 定量：DNA の特異的切断用の制限酵素は、TAKARA 製、TOYOBO 製、あるいは BMY 製のものをを用いた。種々の反応に用いた緩衝液の組成は表(2)に示した。大腸菌の培養には、YT 培地（0.8% Bacto Tripton, 0.5% Yeast Extract, 0.5% NaCl, 1.2% Agar: プレート用 0.6% Agar: Soft-agar 用）あるいは、2 xYT 培地（1.6% Bacto Tripton, 1.0% Yeast Extract, 0.5% NaCl）に必要な抗生物質を添加して用いた。

DNA 定量には、260nm における吸光度を用い、1O.D.=50 $\mu$ g/ml とした。

アガロースゲル電気泳動：1 % アガロースゲルに 0.5ppm 臭化エチジウムを添加したプレート（5 cm $\times$  8 または 17 レーン）を用いて電気泳動を行った。泳動は CosmoBio 製 Mupid 2 を用い、TAE 緩衝液中、10V/cm で行った。泳動の位置マーカーには、Brom Phenol Bule（約 100bp の DNA に相当）を用いた。泳動後、紫外線照射下に DNA 断片の位置を特定し、Poraloid 写真撮影を行って各泳動断片の大きさを測定した。サイズマーカーには、 $\lambda$  フェージの EcoT4I 分解物あるいは  $\phi$  x174 フェージの Hinc II 分解物を単独あるいは組み合わせて使用した。

形質転換、目的プラスミドの選択、大量培養：形質転換の宿主菌には、Hanahan の方法<sup>7)</sup>に従って TFB 緩衝液中で処理したコンピテント大腸菌 MV1184 を用いた。これに挿入

表2 各種緩衝液の組成

| (pH)              | TE<br>8.0 | TAE<br>8.0 | TBE<br>8.0 | TFB<br>6.2 | Klenow<br>7.5 | Sequenase<br>7.5 |
|-------------------|-----------|------------|------------|------------|---------------|------------------|
| Tris-HCl          | 10        |            |            |            | 100           | 200              |
| Tris-Acetate      |           | 40         |            |            |               |                  |
| Tris-Borate       |           |            | 89         |            |               |                  |
| MES-KOH           |           |            |            | 10         |               |                  |
| EDTA              | 1         | 1          | 2          |            |               |                  |
| Glycerol          |           |            |            | 10%        |               |                  |
| NaCl              |           |            |            |            |               | 250              |
| RbCl              |           |            |            | 100        |               |                  |
| CaCl <sub>2</sub> |           |            |            | 50         |               |                  |
| MgCl <sub>2</sub> |           |            |            |            | 70            | 100              |
| MnCl <sub>2</sub> |           |            |            | 45         |               |                  |

無名数の単位は, mM

DNA を持つベクターを加え, 40分氷冷の後2分間42℃でヒートショックを与えてからアンピシリン含有のYT培地にX-gal, IPTGを加えたSoft-Agarとともに重層し, 培養した。ベクターがpUC118/119の場合は, 白色のコロニーを, M13mp18/19の場合は透明のプラークを選択した。選択したコロニーあるいはプラークは, 迅速単離法(Boiling Method)<sup>8)</sup>によってプラスミドの調製を行い, ベクターと挿入DNAを分離出来る適切な制限酵素で各プラスミドを切断し, アガロースゲル電気泳動によってそのサイズを判定した。

選択されたクローンは, 宿主大腸菌と共に2xYT培地で振盪培養し, 遠心分離後, 菌体の蛋白成分をリゾチーム, アルカリ, 界面活性剤で溶解除去し, フェノールおよびクロロホルム・イソアミルアルコールでDNA以外の成分を除去した後エタノール沈殿させ, TEに溶解して, 臭化エチジウムを添加したCsClの遠心密度勾配法によって, 単離精製した。

段階的欠損法(デレーション法)の適用: 1 kbp以上の挿入DNAを持つクローンについては, Yanisch-Perronらの方法<sup>9)</sup>に基づいて, まず, 挿入DNAとベクターのプライマー結合部位の間において, プライマー側で3'末端を突出させて切断する制限酵素と, 挿入DNA側に5'末端を突出させて切断する制限酵素を作用させて, 環状DNAを開裂させた。次に5'断端を攻撃してDNA分解を行うエクソヌクレアーゼⅢを30~45秒間隔で10段階の時間作用させ, 挿入DNAを5'側から約300bpずつ段階的に消化し, マングベーンヌクレアーゼを用いて末端を平滑化した。続いてライゲーション酵素によって開裂断端を接合させた。得られたデレーションクローンを形質転換し, Boiling Methodによる目的クローンの選択の後, 1本鎖DNAを調製した。

1本鎖DNA(ssDNA)の調製: pUC118/119ベクターを用いた場合には, これらをファージ化するM13KO7ヘルパーファージを感染させて, また, M13mp18/19ベクターはファージであるのでそのまま2xYT培地で培養した宿主菌から外液に放出されるファージからssDNAを分離した。遠心上清にポリエチレングリコール・NaClを加えてDNAを沈殿さ

せ、これを TE に溶解して、フェノール・クロロホルムで除蛋白し、得られた水層に 3 M 酢酸ナトリウムとエタノールを加えて沈殿させて、精製 ssDNA とした。

ジデオキシ法による配列決定：得られた ssDNA について、ジデオキシ法<sup>9),10),11)</sup>により塩基配列決定のための放射性同位元素で標識された DNA フラグメントの作成を行った。

・ 標識には<sup>32</sup>P-dCTP (Amersham 製：コード No. 10165) を用いた。

4 本のエッペンドルフチューブに 1  $\mu$ g の ssDNA をとり、合成酵素として Klenow 酵素 (TAKARA 製) を用いた場合は、Klenow 緩衝液、プライマー DNA を加えて 20 分間 20℃ に保持し、この間に 4 種類のデオキシヌクレオチドと各々に 1 種類のジデオキシヌクレオチドを加えた合成素材混合液を添加した。65℃, 30 分のアニーリングの後に<sup>32</sup>P-dCTP (400 ci/mmol) と Klenow 酵素を加えて合成反応を 20 分行い、チェイス用のジデオキシヌクレオチド混合液を加えて更に 20 分間反応を行わせた。ホルムアミドを添加し、2 分間 95℃ に加熱した後氷水中で急冷した。合成酵素として T7 ポリメラーゼ (TOYOBO 製) を用いた場合は、Sequenase 緩衝液、プライマー DNA を加えて 65℃ に 2 分間保持してから室温に戻し、DTT, ラベリング混液, <sup>32</sup>P-dCTP (1000 ci/mmol) と T7 ポリメラーゼを混和し、37℃ で 5 分間反応させた。ホルムアミドを添加し、2 分間 80℃ に保った後氷冷した。

得られた 4 種類の塩基毎のフラグメントプールは、各々 3  $\mu$ l を 6 % のアクリルアミドゲルプレート (厚さ 0.35mm, 長さ 675mm, 幅 200mm) の各々のレーンに注入し、TBE 緩衝液, 60W (～3000V) で泳動した。

挿入 DNA のどの部分のラダーを得るかによって、ホルムアミドマーカの泳動距離が 27cm, 70 (35+35) cm, 100 (35+35+30) cm となった時点で泳動を終了した。

泳動終了後ゲルプレートを装置から外し、ワットマン 3 MM 濾紙に吸着させて真空乾燥し、この乾燥ゲルを医療用 X 線フィルムに密着させて 18 時間程度放射線に暴露し、オートラジオグラムの上のラダーから塩基配列を決定した。

プラスミドシーケンセス：挿入 DNA の両端から 200～300bp 程度の塩基配列を読み出すには、2 本鎖のプラスミド DNA をアルカリ変性して 1 本鎖に解離させ、その片方の DNA 鎖と、挿入された DNA の外側のベクター部分で結合する M4 あるいは RV プライマーを用い、ジデオキシ法に準じて塩基配列を決定した。

Polymerase Chain Reaction 法 (PCR 法) による DNA の合成：DNA 標品の一部分の大量複製には、高温耐性である Taq-DNA 合成酵素を用い、高温 (94℃, 60 秒) で DNA を 1 本鎖へ融解し、低温 (37℃, 120 秒) で合成部分に対するプライマーとのアニーリングを行い、中温 (72℃, 180 秒) で DNA 合成反応を行う反応サイクルを 25 回繰り返し、与えられたプライマーのモル数に近い量の複製 DNA を得た。

厳密な温度と反応時間の制御には、TAKARA 製 DNA サーマルサイクラー (PJ1000) を用いた。標品 DNA の特定部分に結合させて合成反応開始位置となるプライマー DNA は、Applied Biosystems 製 DNA 合成装置 380A を用いて作成した。

合成された DNA の両端を適切な制限酵素で切り整えた後、M13mp18 および 19 ベクターに挿入し、上述の方法に従って塩基配列の決定を行った。

塩基配列の解析：シーケン斯拉ダーの読み取りと磁気ファイル化には、SDC 製デジタイザ TYPE 4 と付属のソフトウェアを用いた。

読み取られた塩基配列の編集、結合、既知の遺伝子の塩基配列との類似性の判定、アミ

ノ酸配列への変換，既知の蛋白質のアミノ酸配列との類似性の判定，アミノ酸配列の構造予測計算は，SDC 製 GENETYX システムを用いて行った。

既に報告された psbA 遺伝子の検索には，GenBank によって作成されている遺伝子配列データベース（Release 60.0, 1989）を用いた。

## 結果と考察

制限酵素地図：pP5-DNA および pP6-DNA はサイズが大きすぎ，ベクターである pBR322の構造も段階的欠損法の適用に適さないので，これらの切断と pUC 系プラスミドベクターへの乗せ替えを行った。

この方針を立てるために，各々のクローンについて，制限酵素地図を作成した。

表(3)，表(4)は，pP 5，pP 6 を各種制限酵素で切断し，アガロースゲル電気泳動で測定した切断断片のサイズをまとめたものである。各表の(A)には，各制限酵素単独で切断した結果を，また(B)には，各酵素と Pst I の両方で切断した場合の結果をまとめた。

これらの結果と各制限酵素が pBR322を切断する位置から決定された各クロンの制限酵素地図を，図(1)に示した。なお，図中 pP 5 については，後にサブクローンについて同様の処置を行って決定された制限酵素の認識部位も加えて表示した。

表 3 pP5 の各種制限酵素による切断結果

| (A)       | Enzyme | EcoRI | HindIII | PvuII | SalI | SphI | XbaI |
|-----------|--------|-------|---------|-------|------|------|------|
| Flagments |        | 11.1  | 12.0    | 11.5  | 9.7  | 11.5 |      |
|           |        | 3.5   | 4.5     | 3.2   | 6.7  | 6.9  | 2.1  |
|           |        | 1.8   |         | 1.8   |      |      | 1.4  |
|           |        |       |         |       |      |      | 1.0  |
|           |        |       |         |       |      |      | 0.8  |
| Total     |        | 16.4  | 16.5    | 16.5  | 16.4 | 16.6 | 16.8 |

| (B)       | Enzymes | HindIII<br>PstI | SalI<br>PstI | SphI<br>PstI | PvuII<br>PstI | EcoRI<br>PstI |
|-----------|---------|-----------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| Flagments |         | 11.1            | 8.3          | 6.6          | 11.5          | 7.5           |
|           |         | 3.6             | 3.8          | 5.5          | 3.0           | 3.6           |
|           |         | 1.0             | 2.9          | 3.0          | 1.4           | 2.8           |
|           |         | 0.8             | 1.5          | 1.4          | 0.4           | 1.8           |
|           |         |                 |              | ( )          |               | 0.7           |
| Total     |         | 16.5            | 16.5         | 16.5         | 16.3          | 16.4          |

( ) は，さらに小さな断片の存在が推定されることを示す。

表 4 pP6 の各種制限酵素による切断結果

(A)

| Enzyme    | EcoRI | HindIII | PvuII | ScaI |
|-----------|-------|---------|-------|------|
| Flagments | 7.6   | 9.9     | 10.8  | 7.1  |
|           | 3.8   | 1.6     | 3.4   | 5.0  |
|           | 2.6   | 1.6     |       | 2.0  |
|           |       | 1.1     |       |      |
| Total     | 14.0  | 14.2    | 14.2  | 14.1 |

(B)

| Enzymes   | PvuII | EcoRI | ScaI | HindIII |
|-----------|-------|-------|------|---------|
|           | PstI  | PstI  | PstI | PstI    |
| Flagments | 9.2   | 7.8   | 7.1  | 6.3     |
|           | 2.8   | 3.7   | 4.2  | 3.5     |
|           | 1.6   | 1.9   | 1.8  | 1.6     |
|           | 0.5   | 0.8   | 0.8  | 1.6     |
|           |       |       | ( )  | 0.9     |
|           |       |       |      | ( )     |
| Total     | 14.1  | 14.2  | 13.9 | 13.9    |

( ) は、さらに小さな断片の存在が推定されることを示す。

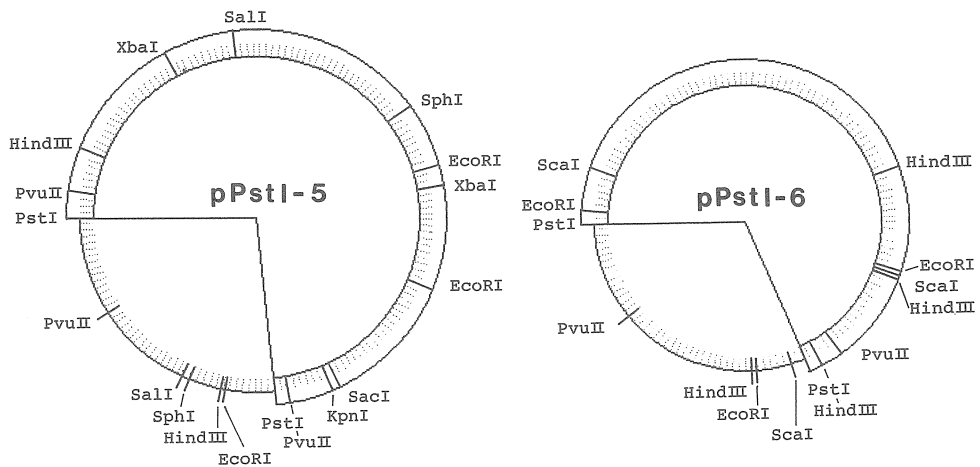


図 1 pPstI-5 および pPstI-6 の制限酵素地図

ベクター (pBR322) 部分は単線で、挿入 DNA 部分は二重線で表示した。放射状の小目盛は、0.1kbp を示している。各制限酵素による切断位置は、短い実線で示した。

サブクローニング：図(1)にまとめられた結果に基づいて、サブクローニングを行なった。pP5については、Pst I (3') と Sph I (5') で切断した断片 (5.5kbp) を同じ制限酵素で切開した pUC119ベクターに挿入して、pP5Sクローンを作成した。

このpP5S クローンをさらに様々な制限酵素で切断し、ベクターに挿入して多数のサブクローンを作成したが、プラスミドシーケンスの結果、Pst I と Sac I (5') で切断した断片 (0.85Kbp) を pUC119ベクターに挿入した pP5S2と、Kpn I (3') と EcoR I (5') で切断した断片 (2.0kbp) を pUC118ベクターに挿入した pP5S4サブクローンについて psbA の存在が確かめられたので、これらについて解析を進めた。

pP6については、EcoRI で切断した断片 (2.55kbp, pBR322の一部0.75kbp を含む) を同じ制限酵素で切開した pUC118ベクターに挿入して、pP6Eクローンを作成し、解析した。これらの過程を図(2)に示す。

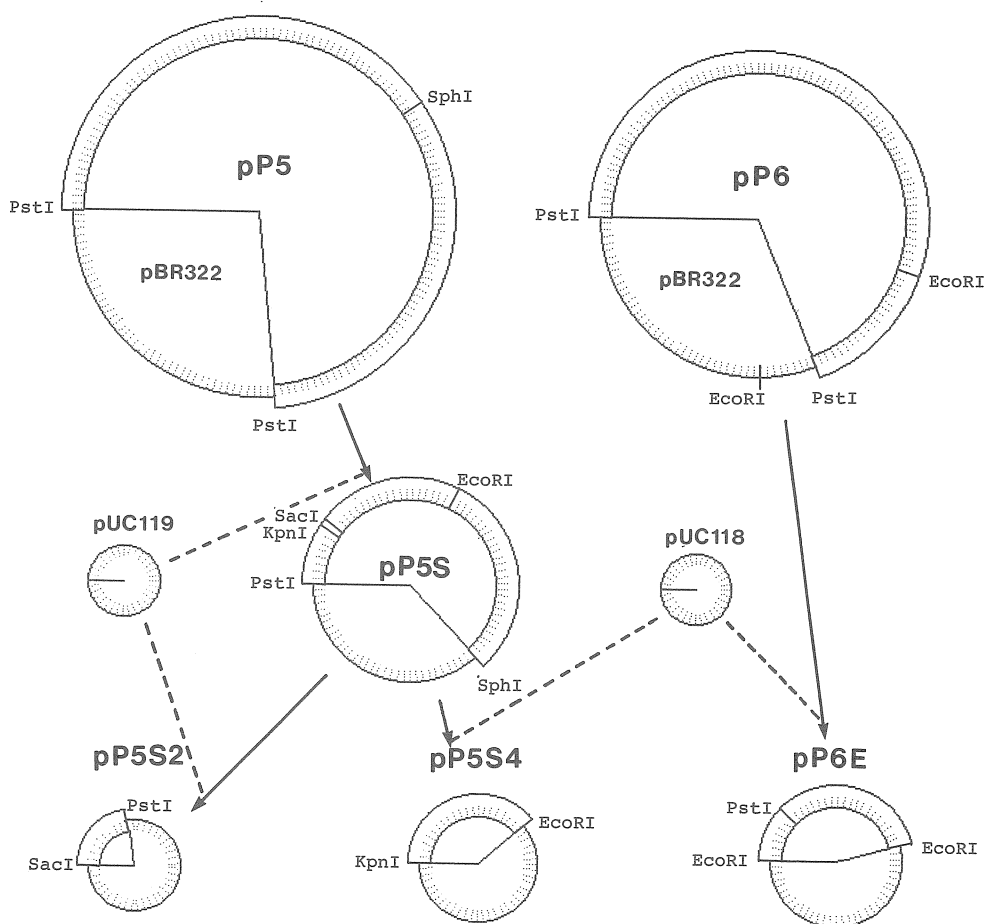


図2 pP5, pP6 のサブクローニング

ベクター、および挿入 DNA の表示は図(1)と同様である。矢印でクローニングの方向を示し、点線で使用したベクターを示した。制限酵素の切断部位は、関連のあるもののみを示した。

デレション反応：各クローンを大量培養して必要な DNA を調製し、pP5S4については Pst I と BamH I (5') で、また pP6E については Pst I と Xba I で切開して、デレション反応を行い、デレションクローンを調製した。図(3)に pP5S4 についての反応結果を示す。

シーケンス反応：pP5S2 および pP5S4、pP6E の各デレションクローンについて、ssDNA の調製を行い、ジデオキシ法によって塩基配列を決定した。各クローンの塩基配列の重なりあう部分を検出してそれらを結合することで、塩基配列を読み進めた。

PCR 法による欠損部位の補間：得られた塩基配列を編集し、他の植物由来の既知の psbA 遺伝子の配列と比較したところ、pP6E クローンに属する部分に100bp 程度の欠損がみられた。しかし、光合成反応の中心的役割を担う蛋白質の遺伝子に、そのような大規模な変異は考えにくく、これは、クローン調製過程において何らかの欠損が生じたものとの疑い

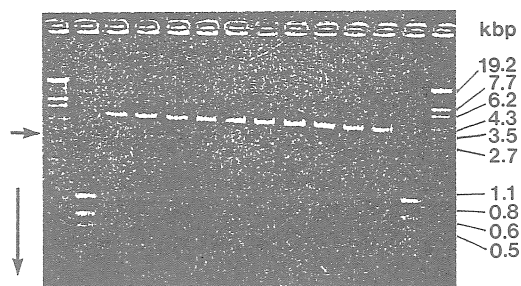


図3 デレションクローンのアガロースゲル電気泳動

下向き矢印は泳動の方向を示し、右向き矢印は、ベクターのサイズ (pUC118=3.2kbp) を示す。左右最外側のサイズマーカーは、λファージの EcoT4I 分解物、その内側は、ψx174 ファージの HincII 分解物である。

CTGTTTCTGG TTCTCTTCTT TATGGAAACA ATATTATCTC CGGTGCCATT ATTCCTACCT  
GACAAAGACC AAGAGAAGAA ATACCTTTGT TATAATAGAT GCCACGGTAA TAAGGATGGA

Primer 1 : [ATTATCTC CGGTGCCATT AT]→

CTGCA|GCTAT CGGTTTGCAC TTCTATCCCA TCTGGGAAGC [\*\*\*\*\*] \*\*\*\*\*  
GACGTCGATA GCCAAACGTG AAGATAGGGT AGACCCCTCG [\*\*\*\*\*] \*\*\*\*\*

PstI

\*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*  
\*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

\*\*\*\*\* [AGCTTCC GTCTAGGTAT GCGTCCTTGG ATTGCTGTTG  
\*\*\*\*\* [TCGAAGG CAGATCCATA CGCAGGAACC TAACGACAAC

CATACTCAGC TCCTGTTGCA GCTGCTACTG CCGTTTTCTT GATCTACCCT ATTGGTCAAG  
GTATGAGTCG AGGACAACGT CGACGATGAC GGCAAAAGAA CTAGATGGGA TAACCAGTTC

←[CATAC GGAGATCCTT AGAGA]: Primer 2

AA|ATCTTCTC TGACGGTATG CCTCTAGGAA TCTCTGGTAC TTTCAATTTC ATGATTGTAT  
TTTCGA|AGAG ACTGCCATAC GGAGATCCTT AGAGACCATG AAAGTTAAAG TACTAACATA

HindIII

図4 PCR 法を用いた pP6E の一部分の大量調製

塩基配列は相補鎖と共に表示した。合成したプライマーの塩基配列は、[ ] で囲んで示した。矢印は、DNA 合成の方向 (5'→3') を示している。\*\*のペアで示されているのが、欠損部位である。制限酵素の切断位置と点線枠については、本文参照。



を持った。そこで、この部位の前後の確定された配列を基礎として、2種類のプライマーDNA（各々20bp）を作成し、これを用いてPCR法を適用した。テンプレートにはpDNAを直接用いた。図(4)に、このPCR法の適用計画を示した。欠損が予想される配列位置の両側でテンプレートDNAと結合して合成反応のきっかけを与えるプライマー部位を選定したが、これには、4種類の塩基が偏りなく存在していて、また、合成されたDNAを等しい長さに切り出すために、お互いが挟む配列内に適切な制限酵素の認識部位を持つ領域を選んだ。

得られたDNAの塩基配列を決定したところ、期待されたとおり、この部分には既に読まれたよりも103多い塩基対が含まれていたため、これで欠損を補った。

なお、解析の結果、この欠損部分の先頭、図中で点線枠で囲んだ部分には、もう一つの点線枠内と同一の配列が存在していた。こうした同一塩基配列の縦列は、一般にDNA内部での遺伝子の転移に関係するものと考えられている。

確定配列：最終的に決定されたpsbA遺伝子のアミノ酸への翻訳が行われる領域の塩基配列を図(5)に示す。翻訳が開始されるATGコドンから、終了するTAAコドンまでは、合計1062の塩基で構成されており、353個のアミノ酸をコードしている。この部分の配列について、他の植物について報告されているpsbA遺伝子の塩基配列およびそれらがコードするアミノ酸配列との比較を行ない、その結果を表(5)に示した。ここで比較したどの植物の葉緑体においても、psbA遺伝子がコードしているアミノ酸の数は全て353個であり、また、対応する1062塩基の配列にはどの遺伝子の場合もイントロンを含んでいない。塩基配列の類似度も極めて高いが、アミノ酸配列の類似度は一層高い。これらは、この遺伝子がコードする光合成系Ⅱの蛋白質P32の機能が、大変重要でかつ完成されたものであることを示唆している。

表5 種々植物葉緑体のpsbA遺伝子の塩基配列、アミノ酸配列の比較

|           | 植物名                          | 相違塩基   | 類似度   | 相違アミノ酸 | 類似度   |
|-----------|------------------------------|--------|-------|--------|-------|
| 1：クロマツ    | <i>Pinus thunbergii</i>      | (1062) |       | (353)  |       |
| 2：ゼニゴケ    | <i>Marchantia polymorpha</i> | 132    | 87.6% | 14     | 96.0% |
| 3：コメ      | <i>Oriza sativa</i>          | 131    | 87.7% | 14     | 96.0% |
| 4：オオムギ    | <i>Hordeum vulgare</i>       | 121    | 88.6% | 12     | 96.6% |
| 5：セイヨウカラシ | <i>Sinapis alba</i>          | 114    | 89.3% | 11     | 96.9% |
| 6：ソラマメ    | <i>Clycine max</i>           | 132    | 87.6% | 14     | 96.0% |
| 7：ホウレンソウ  | <i>Spinacia oleracea</i>     | 123    | 88.4% | 14     | 96.0% |
| 8：タバコ     | <i>Nicotiana tabacum</i>     | 113    | 89.4% | 15     | 95.8% |

( )内は、比較の基準としたクロマツの塩基、アミノ酸数。

蛋白質の構造予測：蛋白質を構成するアミノ酸の第一次配列が決定されたので、これを手懸りとしてその構造の解析を試みた。図(6)に、各植物のpsbA遺伝子がコードするアミノ酸配列の詳細な比較結果を示したが、変異はN、C両末端に集中しており、配列中央部分は極めて安定であることが判る。配列の18番目と125番目に良く保存されたシステインが存在するが、これらがシスチン構造をとる可能性は低いと思われる。なぜなら、psbA遺

順 子

```

1          30          60
ATGACCGCAATTATA GAAAGACGCCGAAAGC GCAAATTTATGGAGT CGCTTCTGCGACTGG
MetThrAlaIleIle GluArgArgGluSer AlaAsnLeuTrpSer ArgPheCysAspTrp

          90          120
ATCACTAGCACTGAA AACCGTCTTTACATT GGATGGTTCGGCGTC TTGATGATCCCTACC
IleThrSerThrGlu AsnArgLeuTyrIle GlyTrpPheGlyVal LeuMetIleProThr

          150          180
CTATTGACCGCAACC TCTGTATTCATTATT GCTTTCATCGCAGCT CCTCCAGTAGATATT
LeuLeuThrAlaThr SerValPheIleIle AlaPheIleAlaAla ProProValAspIle

          210          240
GATGGTATTCTGTAA CCTGTTTCTGGTTCT CTTCTTTATGGAAAC AATATTATCTCCGGT
AspGlyIleArgGlu ProValSerGlySer LeuLeuTyrGlyAsn AsnIleIleSerGly

          270          300
GCCATTATTCCTACC TCTGCAGCTATCGGT TTGCACTTCTATCCC ATCTGGGAAGCAGCT
AlaIleIleProThr SerAlaAlaIleGly LeuHisPheTyrPro IleTrpGluAlaAla

          330          360
TCCGTCGATGAATGG CTATACAACGGGGGT CCTTACGAGCTAATC GTTCTACACTTCCTA
SerValAspGluTrp LeuTyrAsnGlyGly ProTyrGluLeuIle ValLeuHisPheLeu

          390          420
CTTGGTGTAGCTTGC TATATGGGTCGTGAG TGGGAGCTTAGCTTC CGTCTAGGTATGCGT
LeuGlyValAlaCys TyrMetGlyArgGlu TrpGluLeuSerPhe ArgLeuGlyMetArg

          450          480
CCTTGGATTGCTGTT GCATACTCAGCTCCT GTTGCAGCTGCTACT GCCGTTTTCTTGATC
ProTrpIleAlaVal AlaTyrSerAlaPro ValAlaAlaAlaThr AlaValPheLeuIle

          510          540
TACCCATTGGTCAA GGAAGCTTCTCTGAC GGTATGCCTCTAGGA ATCTCTGTACTTTC
TyrProIleGlyGln GlySerPheSerAsp GlyMetProLeuGly IleSerGlyThrPhe

          570          600
AATTTTCATGATTGTA TTCCAGGCTGAGCAC AATATCCTTATGCAT CCATTCCACATGTTG
AsnPheMetIleVal PheGlnAlaGluHis AsnIleLeuMetHis ProPheHisMetLeu

          630          660
GGTGTAGCTGGCGTA TTCGGCGGCTCTCTA TTCAGTGCTATGCAT GGTCTTTTGGTAACT
GlyValAlaGlyVal PheGlyGlySerLeu PheSerAlaMetHis GlySerLeuValThr

          690          720
TCCAGTTTGATCAGG GAAACTACTGAGAAT CAGTCCGCAAAATGCA GGTTACAAATTTGGT
SerSerLeuIleArg GluThrThrGluAsn GlnSerAlaAsnAla GlyTyrLysPheGly

          750          780
CAGGAGGAAGAAACC TACAATATTGTGGCT GCTCACGGTTATTTT GCCCGATTGATCTTC
GlnGluGluGluThr TyrAsnIleValAla AlaHisGlyTyrPhe GlyArgLeuIlePhe

          810          840
CAATATGCTAGTTTC AACAACTCCCGTTCT TTACATTCTTCTTA GCTGCTTGGCCGTA
GlnTyrAlaSerPhe AsnAsnSerArgSer LeuHisPhePheLeu AlaAlaTrpProVal

          870          900
GCAGGTATCTGGTTT ACCGCTCTAGGCATA AGCACTATGGCTTTC AACCTAAATGGATTTC
AlaGlyIleTrpPhe ThrAlaLeuGlyIle SerThrMetAlaPhe AsnLeuAsnGlyPhe

          930          960
AATTTCAACCAATCT GTAGTTGACAGTCAA GGCCGTGTAATTAAC ACTTGGGCTGATATC
AsnPheAsnGlnSer ValValAspSerGln GlyArgValIleAsn ThrTrpAlaAspIle

          990          1020
ATTAATCGTGCTAAC CTAGGTATGGAAGTT ATGCACGAACGTAAT GCTCACAACTTTTCCT
IleAsnArgAlaAsn LeuGlyMetGluVal MetHisGluArgAsn AlaHisAsnPhePro

          1050          1062
CTGGATCTAGCCGCT GTTGAATCTATTTC ATAGGTGGATAA
LeuAspLeuAlaAla ValGluSerIleSer IleGlyGly***

```

図5 クロマツ psbA 遺伝子のアミノ酸配列をコードする部分の塩基配列  
塩基配列の上の数値は、psbA 遺伝子のうちアミノ酸に翻訳される最初の塩基を1とし  
て付けたものである。対応するアミノ酸の三文字省略記号を塩基配列の直下に示した。

クロマツ葉緑体の光合成関連蛋白質の構造について

伝子がコードしている353アミノ酸配列の分子量は38,000程度であり、32,000程である最終産物の P32蛋白よりはかなり大きく、おそらく両末端から各々数10残基、計50程のアミノ酸残基の除去があると考えられるからである。

|    | 10         | 20          | 30         | 40         | 50         | 60         |
|----|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| 1: | MTALIERRES | ANLWSRFCDW  | ITSTENRLYI | GWFGVLMIPT | LLTATSVFII | AFIAAPPVDI |
| 2: | ...TL..... | ...SL.G.... | V.....     | .....      | .....      | .....      |
| 3: | ...L.....  | TS..G...N.  | .....      | .....      | .....      | .....      |
| 4: | ...L.....  | TS..G...N.  | .....      | .....      | .....      | .....      |
| 5: | ...L.....  | ES..G...N.  | .....      | .....      | .....      | .....      |
| 6: | ...L.....  | ES..G...N.  | .....      | .....      | .....      | .....      |
| 7: | ...L.....  | ES..G...N.  | .....      | .....      | .....      | .....      |
| 8: | ...L.....  | ES..G...N.  | .....      | .....      | .....      | .....      |
|    | 70         | 80          | 90         | 100        | 110        | 120        |
| 1: | DGIREPVSGS | LLYGNNIISG  | AIIPTSAAIG | LHFYPIWEAA | SVDEWLYNGG | PYELIVLHFL |
| 2: | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | .....      |
| 3: | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | .....      |
| 4: | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | .....      |
| 5: | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | .....      |
| 6: | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | .....      |
| 7: | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | .....      |
| 8: | .....      | .....       | .....      | .....      | ...H.....  | .....      |
|    | 130        | 140         | 150        | 160        | 170        | 180        |
| 1: | LGVACYMGRE | WELSFRIGMR  | PWIAVAYSAP | VAAATAVFLI | YPIGQGSFSD | GMPLGISGTF |
| 2: | .....      | ...Y.....   | .....      | .....      | .....      | .....      |
| 3: | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | .....      |
| 4: | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | .....      |
| 5: | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | .....      |
| 6: | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | .....      |
| 7: | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | .....      |
| 8: | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | .....      |
|    | 190        | 200         | 210        | 220        | 230        | 240        |
| 1: | NFMIVQAEH  | NILMHPFHML  | GVAGVFGGSL | FSAMHGSLVT | SSLIRETTEN | QSANAGYKFG |
| 2: | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | E.....     |
| 3: | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | E...E..R.. |
| 4: | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | E...E..R.. |
| 5: | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | E...E..R.. |
| 6: | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | E...E..R.. |
| 7: | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | E...E..R.. |
| 8: | .....      | .....       | .....      | .....      | .....      | E...E..R.. |
|    | 250        | 260         | 270        | 280        | 290        | 300        |
| 1: | QEEETYNIVA | AHGYPGRLIF  | QYASFNNRSR | LHFFLAAPV  | AGIWFTALGI | STMAFNLNCF |
| 2: | .....      | .....       | .....      | .....      | V.....     | .....      |
| 3: | .....      | .....       | .....      | .....      | V.....     | .....      |
| 4: | .....      | .....       | .....      | .....      | V.....     | .....      |
| 5: | .....      | .....       | .....      | .....      | V.....     | .....      |
| 6: | .....      | .....       | .....      | .....      | V.....     | .....      |
| 7: | .....      | .....       | .....      | .....      | V.....     | .....      |
| 8: | .....      | .....       | .....      | .....      | V.....     | .....      |
|    | 310        | 320         | 330        | 340        | 350        |            |
| 1: | NFNQSVVDSQ | GRVINTWADI  | INRANLGMEV | MHERNAHNFP | LDLAAVESIS | IGG        |
| 2: | .....      | .....       | .....      | .....      | ...APA     | VN.        |
| 3: | .....      | .....       | .....      | .....      | ...L.VP.   | LN.        |
| 4: | .....      | .....       | .....      | .....      | ...VPA     | N.         |
| 5: | .....      | .....       | .....      | .....      | ...P.      | N.         |
| 6: | .....      | .....       | .....      | .....      | ...IDAP.   | N.         |
| 7: | .....      | .....       | .....      | .....      | ...I.AP.   | TN.        |
| 8: | .....      | .....       | .....      | .....      | ...I.AP.   | TN.        |

図6 種々植物葉緑体の psbA 遺伝子がコードするアミノ酸配列の詳細比較  
アミノ酸は、一文字省略記号で表示し、クロマツ (1:) を基準として他はこれと相違するアミノ酸のみを示し、同一のものは、. で省略した。各行左側の番号は、表(5)の番号と対応している。

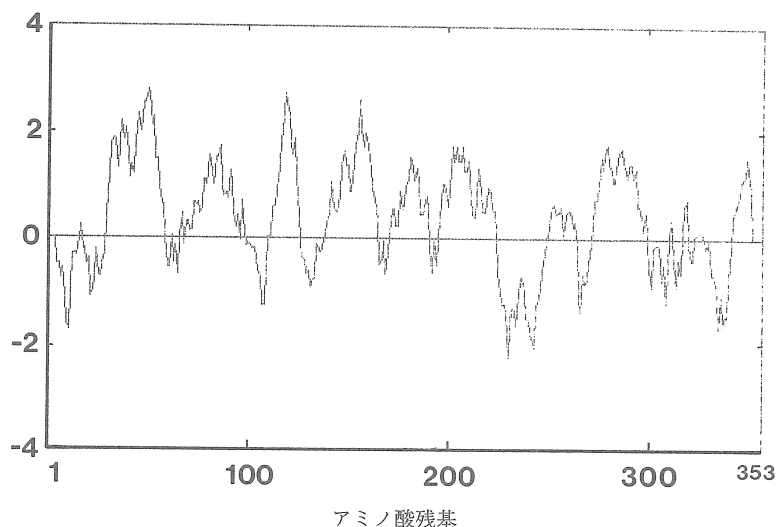


図7 クロマツ psbA 遺伝子がコードするアミノ酸配列の疎水性、親水性の分布  
アミノ酸配列を9アミノ酸の幅で走査し、その疎水性親水性の程度を表示した。縦軸の+の  
値は疎水性を、-の値は親水性の程度を示す。

図(7)は、クロマツ psbA 遺伝子がコードするアミノ酸配列について、疎水性および親水性の領域がどのように分布しているかを示すハイドロパシー・プロットである。図から、30～40アミノ酸を単位とした疎水性あるいは親水性の領域の明らかな分化が認められる。N, C 両末端を除いて、7～8グループほどの疎水性領域があるが、Garnier らの方法<sup>13)</sup>によれば、113～126, 141～163, 182～204, 314～337の領域には、 $\alpha$ ヘリックスや $\beta$ シートなどの構造が予測され、蛋白質の骨格を形成したり、P32蛋白質のチラコイド膜との結合に関与しているものと考えられる。また、230～240の親水性の領域は、前後を短い $\alpha$ ヘリックスで挟まれたランダムコイルと予測され、電子伝達に係わるのではないと思われる。なお、この領域にも幾らか種間の変異が見られること(図(6))は、注意すべき点であるかもしれない。

これらの予測をさらに進めるには、配列するアミノ酸の立体的配置を求める莫大なシュミレーション計算が必要であるが、最終的には、P32蛋白質をそれが活性を持つ形態で抽出精製して、予測結果の確認をしなくてはならない。これらは、共に今後の課題である。

#### 参考文献

- 1) Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Y-Shinozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B. Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H. & Sugiura, M.: EMBO J., **5**, 2043-2049 (1986)

- 2) Hiratsuka, J., Shimada, H., Whitier, R. F., Ishibashi, T., Sakamoto, M., Mori, M., Kondo, C., Honji, Y., Sun, C. R., Meng, B. Y., Li, Y. Q., Kanno, A., Nishizawa, Y., Hirai, A., Shinozaki, K. & Sugiura, M.: *Mol. Gen. Genet.*, **217**, 185–194 (1989)
- 3) Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T., Sano, S., Umesono, K., Shiki, Y., Takeuchi, M., Chang, Z., Aota, S., Inokuchi, H. & Ozeki, H.: *Nature*, **322**, 572–574 (1986)
- 4) Strauss, S. H., Palmer, J. D., Howe, G. T. & Doerksen, A. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **85**, 3893–3902 (1988)
- 5) Kondo, T., Ishibashi, T., Shibata, M. & Hirai, A.: *Plant Cell Physiol.* **27**, 741–744 (1986)
- 6) Hallick, R. B. & Bottomley, W.: *Plant Mol. Biol. Rep.*, **1**, 38–43 (1983)
- 7) Hanahan, D: in 'DNA cloning' ed. Glover, D. M., pp 109–136 TRL Press (1985)
- 8) 杉浦昌弘編 クローニングとシーケンス pp 175–177 農村文化社 (1989)
- 9) Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J.: *Gene*, **33**, 103–119 (1985)
- 10) Messing, J.: *Method in Enzymol.*, **101**, 20–78 (1983)
- 11) Mizusawa, S., Nishimura, S. & Seels, F.: *Nucl. Acids Res.*, **14**, 1319–1324 (1986)
- 12) Tabor, S. & Richardson, C. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**, 4767–4771 (1987)
- 13) Granier, J., Osguthorpe, D. J. & Robson, B.: *J. Mol. Biol.*, **120**, 97–120 (1978)