

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K07444

研究課題名(和文) GUNプラスチドシグナル伝達の分子機構と植物陸上化にともなう進化の研究

研究課題名(英文) Study of the molecular mechanisms and evolution of GUN1 plastid signaling

研究代表者

望月 伸悦 (Mochizuki, Nobuyoshi)

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号：60280939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：プラスチドシグナル伝達新規GUN遺伝子の同定と、シグナル中心因子であるGUN1の分子機能の進化について調べた。(1) tRNA塩基修飾因子およびcarboxypeptidase様タンパクをコードする候補遺伝子が得られた。(2) シャジクモ、ゼニゴケ、シロイヌナズナGUN1遺伝子を用いて生理機能比較を行ったところ、プラスチド依存的な核遺伝子の発現調節機能は、GUN1の進化初期から保存されていることがわかった。RNA編集の調節については、植物が陸上進出以降に獲得されたと考えられる。プラスチド内の翻訳調節への関与は、すくなくとも苔類では獲得されていなかったことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GUNシグナルを初めとするレトログレードシグナルについては、ハイインパクトな雑誌に報告が相次いでいるが、シグナルの実体や分子機構の詳細は不明である。また、植物の緑化はフィトクロムなど光受容体が主に制御すると考えられてきたが、プラスチドシグナルも大きな役割を果たす事が分かりつつあり、本研究で緑化制御の新たな理解が進むと期待される。PPRについては、GUN1が属するPPR-SMRタンパクは未知の部分が多く、本研究による分子機構解明がそのブレイクスルーになる。GUNシグナルの進化について理解が進めば、植物陸上化におけるGUN1シグナルとプラスチド進化のつながりと生物学的意義が明らかになる。

研究成果の概要(英文)：Photosynthesis-related genes encoded in the nuclear genomes are co-ordinately regulated by GUN-signal transduction pathways. Novel approaches were conducted to identify factors involved in GUN plastid signaling. We identify genes encoding proteins related to the plastid tRNA modification and cytosolic carboxypeptidase activity. (2) Analysis of GUN1 orthologues derived from Chara braunii, Marchantia polymorpha and Arabidopsis thaliana revealed that GUN1 first evolved the function in the plastid-dependent regulation on nuclear genes. GUN1 involved in RNA-editing after the plant colonization to the land. GUN1-dependent regulation of plastid translation was evolved at latest in angiosperm.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：プラスチドレトログレードシグナル 葉緑体 PPR

1. 研究開始当初の背景

プラスチド(葉緑体)は、10-20億年前に宿主細胞に細胞内共生したラン藻型の祖先生物に由来し、今では植物のみならず地球上の生命に不可欠な光合成や物質生産を行うオルガネラとなった。ラン藻型祖先生物が持っていた遺伝情報の大部分は宿主細胞核に水平移動したが、プラスチドは細胞核を巧みに操り、必要な遺伝情報を引き出す術(GUN レトログレード制御)を発達させた。GUN シグナルはプラスチドの機能状態を核に伝え、プラスチド機能に関連する遺伝子(PhANGs)の発現を調節している。他にも強光・低温・酸化ストレスや糖、ホルモンに対する応答、光形態形成や葉の器官形成など、多岐にわたる生理応答に関与することが報告されている。GUN シグナル伝達では、プラスチド内の(1)テトラピロール代謝、(2)転写・翻訳、(3)レドックス変化で生ずるシグナルを、プラスチドに局在する GUN1 タンパクが統合し、下流の因子に伝え、核における遺伝子発現を制御する【図1】。研究開始当初において、GUN シグナリングに関わる遺伝子や、シグナル分子の候補が報告されていたが、GUN1 がどのような分子・機構でシグナルを認識し、プラスチドから細胞質・核へ伝えるか分かっていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、GUN1 がプラスチドシグナルを伝える分子機構解明である。具体的な内容は以下の通りである。

第一の目的は、生化学的・遺伝学的手法により GUN1 と相互作用してシグナリングに関係する因子の同定である。GUN1 は PPR-SMR (pentatricopeptide repeat-small mutS relate) タンパクであることから、DNA・RNA・タンパクと相互作用して働くと予想される【図1】。アラビドプシス GUN1 高発現株 (GUN1ox) を用いて GUN1 相互作用因子の単離と解析を進める。

第二の目的は、順遺伝学的手法で GUN1 と遺伝学的に相互作用する因子

の同定である。最近、弱光下での光形態形成(緑化)が葉緑体の分化に依存することが明らかとなり、これが GUN1 特異的なプラスチドシグナルの制御を受けることが分かった【図2】。この表現型を指標に、gun1 と同様の表現型を示す変異体、あるいは gun1 のサプレッサーを単離することで、GUN1 と遺伝学的に相互作用する新規遺伝子を取得する【図3】。

第三の計画では、GUN1 シグナルの分子機構について、進化生物学的なアプローチを試みる。テトラピロール・転写・翻訳・レドックスなどは、原始紅藻シゾンでもプラスチドからのシグナルとして働くことが示唆されており、これらのシグナルは真核細胞の進化において比較的初期から使われていたと考えられる。しかし、GUN1 オースログ遺伝子はシゾンに存在せず、分子系統解析によると、陸上植物に最も近縁のシャジクモ類で初めて出現することが分かった【図4】。したがって、GUN1 が GUN シグナルの中心に位置するようになったのは比較的最近と考えられる。そこで、シャジクモ類や基部陸上植物であるゼニゴケ・ヒメツリガネゴケの GUN1 オースログおよび GUN1 タンパクの分子構造比較や分子機能の進化を調べ、第一および第二の計画で得られる知見を総合して、GUN1 タンパクのシグナリング分子機構を解明する。

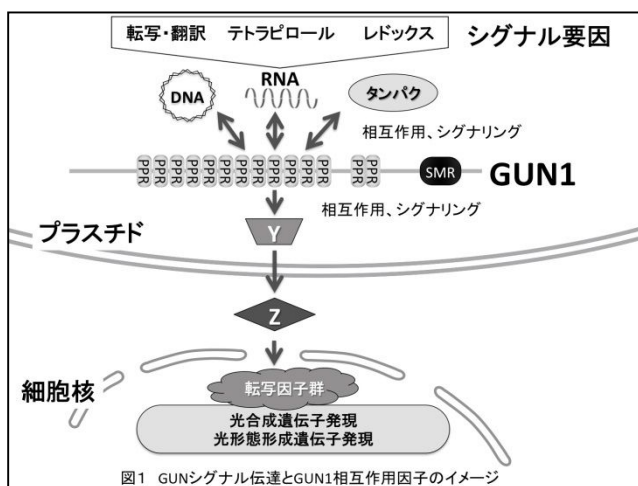
(C1)シャジクモ類・蘚類・苔類・シダ類・裸子・被子植物 GUN1 オースログの構造を詳細に比較し、さらにアラビドプシスに導入して、プラスチドシグナルを伝達できるか解析する。また、(C2)遺伝子破壊やゲノム編集が可能な種については GUN1 を欠損させ、GUN1 機能がどのように変化(進化)してきたか探る。すでにゼニゴケの MpGUN1 がアラビドプシスの gun1 変異を相補する事が分かっており、遺伝子破壊株も取得している。これらの解析によって、植物陸上化に伴うプラスチド機能制御および GUN1 プラスチドシグナル伝達の進化を理解する。

3. 研究の方法

(A1) *in vivo*における GUN1 の DNA・RNA ターゲットの探索

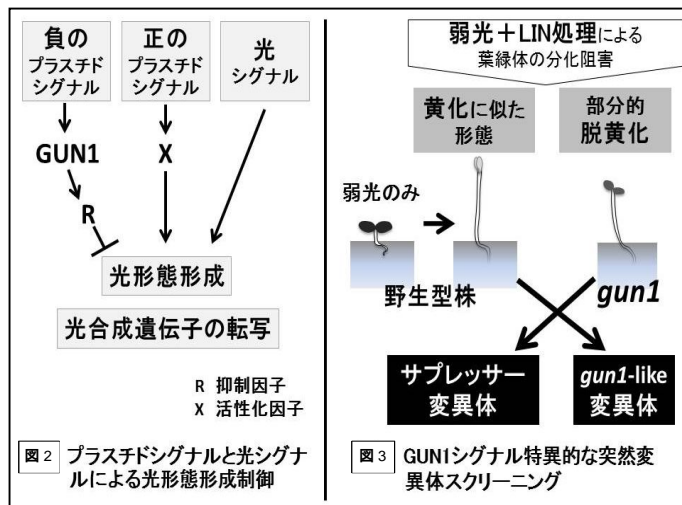
GUN1ox 株を用いた ChIP-seq および RIP-ChIP 法により、GUN1 と結合する DNA および RNA ターゲットを探索した。タグ配列の異なる GUN1ox 株 (FLAG, 3xHA, 4xMyc, GFP) を用い、これらで共通して出現する配列を GUN1 特異的なターゲットとして解析した。RIP-ChIP 法については、最近開発された全葉抽出物を使った手法を用いた。

(A2) GUN1 相互作用タンパクの同定・解析



GUN1ox 株を用い、Co-IP/MS 法によって GUN1 と相互作用するタンパクを同定した。(A1)と同様に、異なるタグを持つ GUN1ox 株から共通して検出された相互作用タンパクを中心に解析を進めた。

(B1) *gun1* サプレッサー変異の単離・解析
 弱光(1 μ E)条件下でリンコマイシン(LIN)を与えて葉緑体の発達を抑制すると、野生型株は黄化芽生えと似た応答(胚軸の徒長、子葉の展開阻害)を示す。*gun1* 変異体はこの条件でも胚軸が短く、子葉が展開する。つまり、光受容体からの正のシグナルを、葉緑体機能不全による(GUN1)シグナルが拮抗的に抑制する【図2、3】。この表現型は非常に鋭敏かつ判別が容易なため、*gun1* サプレッサー変異体の一次選抜に用いた。この中には光シグナル変異体も含まれると考えられるため、光応答に特異的な表現型を指標に二次選抜を行い、GUNシグナル特異的な因子を絞り込んだ。



(B2) プラスチド非依存的に光形態形成を行う突然変異体の単離・解析
 GUN1ox 株では GUN1 シグナルが強まり、光合成関連遺伝子の発現が 20-30%まで抑制されており(未発表データ)、光形態形成についても強く抑制されると考えられる。そこで、GUN1ox 株を親株に、(B1)と同様の条件下で、(*gun1*と同様に)子葉が展開する変異体を選抜した【図3】。この方法で、GUN1と同じ経路で働く新規因子を同定することができる。GUN1ox 株には内生 GUN1 とタグ付きの GUN1 が存在するため、単なる *gun1* 欠損変異体が得られる可能性が極めて低く、新たな因子が取得できるのが本法の優れた点である。

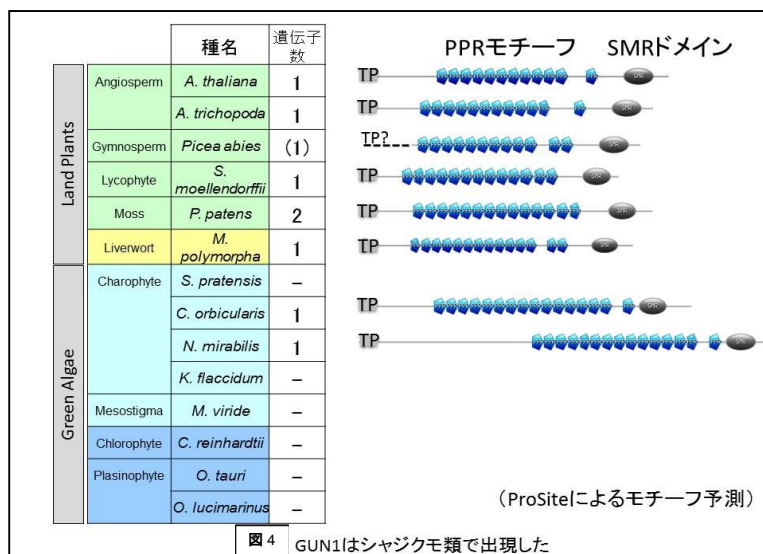
(C1) シャジクモ類・蘚類・苔類・シダ類・裸子・被子植物 GUN1 オーソログの構造比較および、GUN1 機能の保存性の解析
 GUN1 オーソログの配列アライメントとアラビドプシス *gun1* ミスセンス変異アリル(12種類)との比較により、機能的な重要性和配列保存性が高い領域を割り出す。また GUN1 オーソログを *gun1* 変異体に導入し、表現型の相補を調べた。ゼニゴケ MpGUN1 を導入したアラビドプシス株は既に確立しており、この株の GUN1 シグナル機能を調べた。

(C2) ゼニゴケ、ヒメツリガネゴケにおける GUN1 機能の解析
 ゼニゴケの MpGUN1 破壊株について、活発に葉緑体が分化する組織(葉状体切片の再生組織や発芽胞子)および様々なストレス条件における表現型を詳細に比較するとともに、プラスチドおよび核遺伝子の発現を RNAseq 法で調べた。

4. 研究成果

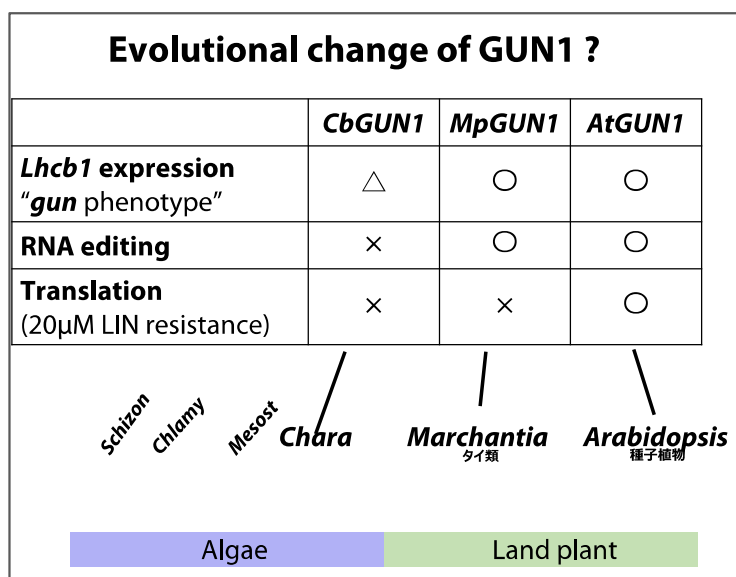
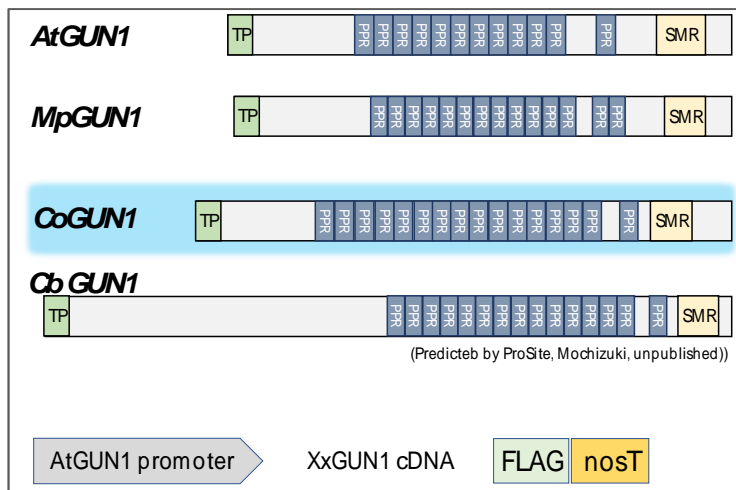
(A) Co-IP 実験で得られた GUN1 相互作用タンパクについては、新規なものが得られていないので、実験条件等の再検討をおこなうこととし、他の計画を優先して進めることにした。
 (B1) *gun1* サプレッサーについては、tRNA 塩基修飾因子が候補として得られた。この遺伝子についてノックアウト株を取得し、表現型の確認と *gun1* との掛け合わせをすすめている。
 (B2) 新規 *gun* 変異体の単離については、細胞質に局在することが予想される carboxypeptidase 様タンパクをコードする遺伝子が得られた。遺伝ノックアウト株で同様な表現型を示すことが確認できた。既知の *gun* 変異体との遺伝学的相互作用解析を進めている。

(C) シャジクモやゼニゴケ GUN1 オルソログを導入したアラビドプシス *gun1* トランスジェニック株において、GUN1 プラスチドシグナルが関わる3つの生理機能について調べたところ、表に示すような結果が得られた。プラスチド依存的な核遺伝子の発現調節機能は、GUN1 の進化初期から保存されていることがわかった。RNA 編集の調節については、植物が陸上進出以降に獲得されたと考えられ



る。プラスチド内の翻訳調節への関与は、すくなくとも苔類では獲得されていなかったと考えられる。

上記、(B) および (C) について論文発表の準備を進めている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yagi H, Nagano AJ, Kim J, Tamura K, Mochizuki N, Nagatani A, Matsushita T, Shimada T.	4. 巻 72
2. 論文標題 Fluorescent protein-based imaging and tissue-specific RNA-seq analysis of Arabidopsis hydathodes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Exp Bot.	6. 最初と最後の頁 1260-1270
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jxb/eraa519	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hajime Ikeda , Tomomi Suzuki, Yoshito Oka A. Lovisa S. Gustafsson , Christian Brochmann, Nobuyoshi Mochizuki and Akira Nagatani	4. 巻 -
2. 論文標題 Divergence in red light responses associated with thermal reversion of PHYTOCHROME B between high- and low-latitude species	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nph.17381	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Shimizu, T. Kacprzak, S. M. Mochizuki, N. Nagatani, A. Watanabe, S. Shimada, T. Tanaka, K. Hayashi, Y. Arai, M. Leister, D. Okamoto, H. Terry, M. J. Masuda, T.	4. 巻 116
2. 論文標題 The retrograde signaling protein GUN1 regulates tetrapyrrole biosynthesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 24900-24906
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/532036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Kim S, Mochizuki N, Deguchi A, Nagano AJ, Suzuki T, Nagatani A.	4. 巻 177
2. 論文標題 Auxin Contributes to the Intraorgan Regulation of Gene Expression in Response to Shade.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 847-862
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1104/pp.17.01259.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kacprzak SM, Mochizuki N, Naranjo B, Xu D, Leister D, Kleine T, Okamoto H, Terry MJ.	4. 巻 179
2. 論文標題 Plastid-to-Nucleus Retrograde Signalling during Chloroplast Biogenesis Does Not Require ABI4.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 18-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.18.01047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Page Mike T., Kacprzak Sylwia M., Mochizuki Nobuyoshi, Okamoto Haruko, Smith Alison G., Terry Matthew J.	4. 巻 174
2. 論文標題 Seedlings Lacking the PTM Protein Do Not Show a genomes uncoupled (gun) Mutant Phenotype	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 21 ~ 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.16.01930	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

[学会発表] 計10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 望月伸悦、坂山英俊、西山智明、長谷あきら
2. 発表標題 プラスチドシグナルとGUN1機能の進化
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会(松江)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 望月伸悦、坂山英俊、西山智明、長谷あきら
2. 発表標題 プラスチドシグナルとGUN1機能の進化
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八木宏樹、永野惇、田村謙太郎、望月伸悦、長谷あきら、嶋田知生
2. 発表標題 RNA-seqによる排水組織特異的な発現遺伝子の同定
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nobuyoshi Mochizuki, Sylwia M. Kacprzak, Belen Naranjo, Duorong Xu, Dario Leister, Tatjana Kleine, Haruko Okamoto, and Matthew J. Terry
2. 発表標題 Re-evaluation of the role of ABI4 in plastid-to-nucleus retrograde signalling during chloroplast biogenesis
3. 学会等名 Retrograde signalling from endosymbiotic organelles (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nobuyoshi Mochizuki, Sylwia M. Kacprzak, Belen Naranjo, Duorong Xu, Dario Leister, Tatjana Kleine, Haruko Okamoto, and Matthew J. Terry
2. 発表標題 ABI4 is not required for plastid-to-nucleus GUN retrograde signalling during chloroplast biogenesis
3. 学会等名 International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Biogenesis 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今井翔、廣澤ひかる、鈴木孝征、小鍛治敬生、望月伸悦、長谷あきら、上口智治
2. 発表標題 GlobalProliferativeArrestに関わるシロイヌナズナFIREWORKS遺伝子の同定
3. 学会等名 日本植物生理学会 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 望月伸悦, 長谷あきら
2. 発表標題 シロイヌナズナ実生の脱黄化における葉 緑体シグナル伝達系の解析
3. 学会等名 日本植物生理学会 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tatsuru Masuda, Takayuki Shimizu, Nobuyoshi Mochizuki, Akira Nagatani, Satoru Watanabe, Kacprzak Sylwia, Haruko Okamoto, Terry Matthew
2. 発表標題 GUN1 regulates tetrapyrrole biosynthesis in Arabidopsis
3. 学会等名 日本植物生理学会 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 望月 伸悦, 鈴木 友美, 長谷 あきら
2. 発表標題 強い陰環境におけるphyA依存的な避陰応答抑制に関する研究
3. 学会等名 日本植物生理学会 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 望月伸悦、長谷あきら
2. 発表標題 脱黄化制御におけるGUN1シグナル伝達系の解析
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

植物生理学研究室ホームページ
<http://physiol2.bot.kyoto-u.ac.jp/HP3/>
<http://www.biol.sci.kyoto-u.ac.jp/laboratory/291/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------