

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02460

研究課題名(和文) 葉緑体がもつ染色体「核様体」のダイナミズムに挑む

研究課題名(英文) Exploring the dynamism of chloroplastic chromosomes, nucleoids

研究代表者

西村 芳樹 (Nishimura, Yoshiki)

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号：70444099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：DNAの折りたたみは、DNAを持つすべての生命体にとって普遍的な問題である。葉緑体やミトコンドリアは、それぞれ独自の多コピーゲノムを維持しているが、具体的なDNAの折りたたみ機構はわからないことが多かった。本研究において我々は、緑藻クラミドモナスのプロテオミック解析をとおり、葉緑体核様体において、ミトコンドリアの主要な核様体タンパク質であるTFAM/Sbf2pに構造的に類似したタンパク質「HBD1」の同定に成功した。DNAオリガミ/原子間力顕微鏡による解析の結果、HBD1は2つのHMG-boxドメインでUターンやクロスストランドブリッジを形成してDNAを折りたたむことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

葉緑体において、2つのDNA結合部位(HMG-boxドメイン)を持つタンパク質(HBD1)が、DNAクリップとしてDNAを折り曲げ、架橋することでDNAを折りたたみ、核様体を構築していることが示された。ここで得られた知見は葉緑体工学における葉緑体ゲノムの安定性や遺伝子発現制御に関する新技術開発、さらにヒトを含む動物・植物におけるミトコンドリア核様体の機能解析への応用、医学・農学をふくむ様々な分野への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：Compaction of bulky DNA is a universal issue for all DNA-based life forms. Both Chloroplasts and mitochondria maintain their own multi-copy genomes organized as nucleoids, but the mechanism of DNA compaction remains obscure. Here, we discovered a chloroplast nucleoid protein (HBD1) that is highly similar to major mitochondrial nucleoid proteins transcription factor A, mitochondrial (TFAM), and ARS binding factor 2 protein (Abf2p) in terms of possessing two DNA-binding high mobility group box (HMG-box) domains. Our analyses of HBD1 based on DNA origami/atomic force microscopy showed that HBD1 is capable of compacting DNA by introducing U-turns and cross-strand bridges with the two HMG-box domains, indicating that proteins with two HMG-box domains could compact DNA in both mitochondrial and chloroplast nucleoids.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：葉緑体DNA 核様体

1. 研究開始当初の背景

光合成は、地球上の生命活動の基盤として欠くことができない。その光合成を担っているのは、植物や藻類がもつ直径わずか5マイクロメートルほどの小さな細胞内小器官である葉緑体（色素体）である。葉緑体には、シアノバクテリア様の祖先から引き継がれた独自の葉緑体 DNA があり、これらには光合成装置の構築や葉緑体の形成に必須の遺伝子群がコードされている。

葉緑体 DNA は裸で葉緑体内に浮遊しているわけではなく、多様なタンパク質によって折りたたまれて「核様体」とよばれる構造を形成している。葉緑体核様体は、いわば葉緑体にとっての染色体であり、細胞周期、光や栄養などの環境に応じてその形態を柔軟に変化させながら、葉緑体 DNA 複製・修復、遺伝子発現、遺伝などを司っていると推定される。これまでに我々は、葉緑体核様体が分裂に先立って葉緑体全体に拡散し、分裂完了後にふたたび凝集する過程をライブイメージングで捉えることに初めて成功してきたが(Kamimura et al., 2018)、そうした葉緑体核様体の形態変化を制御する分子機構は謎にまつまっていた。

2. 研究の目的

本研究では葉緑体核様体構築に関わる因子の同定をとおして、葉緑体核様体の形態制御の分子メカニズムの解明を目指した。

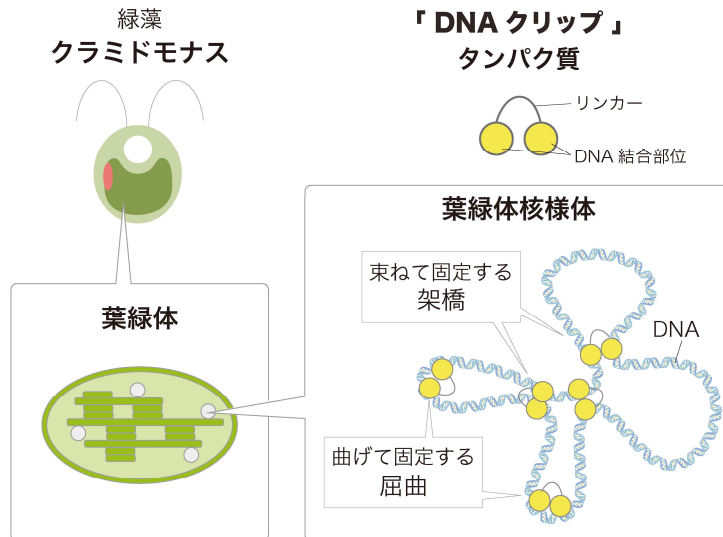
3. 研究の方法

葉緑体核様体の精製とプロテオミク解析をおこない葉緑体核様体の新規構造タンパク質をコードする遺伝子を探索し、ゲノム編集技術による遺伝子破壊とゲノム断片の形質転換による相補実験、局在解析、さらに DNA オリガミと高速原子間力顕微鏡をもちいた分子解析により、その遺伝子産物の機能を解明する。

4. 研究成果

葉緑体核様体の構成因子を明らかにするために、我々は緑藻クラミドモナスから精製した葉緑体核様体に含まれるタンパク質群について網羅的な質量分析を行った。同定された多数のタンパク質群の中に、二つの DNA 結合部位 (High mobility group (HMG) box domain) をもつタンパク質が見つかった (HBD1)。この構造は、ミトコンドリア核様体の主要構成タンパク質である TFAM/Abf2p と相同性が高かった。HBD1 に対する抗体を調整し、間接蛍光抗体染色法をおこなったところ、HBD1 タンパク質は葉緑体核様体に局在した。さらに HBD1 組換えタンパク質をもちいたゲルシフト解析により、DNA 結合能をもつことが示された。In vivo での機能を明らかにするため、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術により *HBD1* 遺伝子を破壊してみると、葉緑体核様体がほどけて細かく拡散したことから、HBD1 タンパク質が葉緑体核様体の折りたたみに貢献していることが示唆された。*HBD1* 破壊株の葉緑体核様体の拡散は、2つの HMG domain をもつ遺伝子を導入することで相補された一方、HMG domain を1つしかもたない遺伝子では相補されなかったことから、2つの HMG domain をもつことの重要性が示された。*HBD1* 遺伝子を、酵母 Abf2p 欠損株に導入したところ、ミトコンドリア核様体を修復することができたことから、HBD1 が TFAM/Abf2p と類似の機能をもつことが示された。さらに HBD1

タンパク質の DNA との結合様式を、高速原子間力顕微鏡と DNA オリガミをもちいた手法で詳細に観察してみると、HBD1 タンパク質が DNA の折り曲げと架橋の両方を行うことが示された。以上より、葉緑体には二つの HMG-box domain をもつ HBD1 が存在し、それが「DNA クリップ」として葉緑体 DNA を折りたたみ、架橋することで、核様体の構築に貢献していることが明らかになった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Nishimura Yoshiki, Shikanai Toshiharu, Kawamoto Susumu, Toh-e Akio	4. 巻 10
2. 論文標題 Step-wise elimination of alpha-mitochondrial nucleoids and mitochondrial structure as a basis for the strict uniparental inheritance in <i>Cryptococcus neoformans</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-59277-9	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 -
1. 著者名 Kamimura Yoshitaka, Kobayashi Yusuke, Nishimura Yoshiki	4. 巻 85
2. 論文標題 Dynamic Motion of Chloroplast Nucleoids Captured by the Microfluidic System	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 CYTOLOGIA	6. 最初と最後の頁 177-178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1508/cytologia.85.177	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 Kobayashi Yusuke, Odahara Masaki, Sekine Yasuhiko, Hamaji Takashi, Fujiwara Sumire, Nishimura Yoshiki, Miyagishima Shin-ya	4. 巻 184
2. 論文標題 Holliday Junction Resolvase MOC1 Maintains Plastid and Mitochondrial Genome Integrity in Algae and Bryophytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1870-1883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.20.00763	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 -
1. 著者名 Kayama Motoki, Chen Jun-Feng, Nakada Takashi, Nishimura Yoshiki, Shikanai Toshiharu, Azuma Tomonori, Miyashita Hideaki, Takaichi Shinichi, Kashiya Yuichiro, Kamikawa Ryoma	4. 巻 18
2. 論文標題 A non-photosynthetic green alga illuminates the reductive evolution of plastid electron transport systems	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Biology	6. 最初と最後の頁 126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12915-020-00853-w	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 -

1. 著者名 Higashi, H., Kato, Y., Fujita, T., Iwasaki, S., Nakamura, M., Nishimura, Y., Takenaka, M., Shikanai, T.	4. 巻 -
2. 論文標題 The pentatricopeptide repeat protein PGR3 is required for the translation of petL and ndhG by binding their 5'UTRs.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol	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) なし	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 -

1. 著者名 Takusagawa, M., Kobayashi, Y., Fukao, Y., Hidaka, K., Endo, M., Sugiyama, H., Hamaji, T., Kato, Y., Miyakawa, I., Misumi, O., Shikanai, T., Nishimura, Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 HBD1 protein with a tandem repeat of two HMG box domains is a DNA clip to organize chloroplast nucleoids in Chlamydomonas reinhardtii.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. USA	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) なし	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 -

1. 著者名 上村嘉誉, 西村芳樹	4. 巻 -
2. 論文標題 マイクロ流体デバイスが捉えた葉緑体核様体分裂の瞬間	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Morphology	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) なし	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 -

1. 著者名 西村芳樹, 田草川真理	4. 巻 -
2. 論文標題 色素体核様体の構造と分裂機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BSJ review	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) なし	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 -

1. 著者名 Yamamoto, K., Hamaji, T., Kawai-Toyooka, H., Matsuzaki, R., Takahashi, F., Nishimura, Y., Kawachi, M., Noguchi, H., Minakuchi, Y., Umen, J.G., Toyoda, A., Nozaki, H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Three genomes in the algal genus Volvox reveal the fate of a haploid sex-determining region after a transition to homothallism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. USA	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) なし	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 -

1. 著者名 Nishimura Yoshiki, Shikanai Toshiharu, Kawamoto Susumu, Toh-e Akio	4. 巻 10
2. 論文標題 Step-wise elimination of -mitochondrial nucleoids and mitochondrial structure as a basis for the strict uniparental inheritance in Cryptococcus neoformans	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-59277-9	査読の有無 無
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 Kajikawa Masataka, Yamauchi Marika, Shinkawa Haruka, Tanaka Manabu, Hatano Kyoko, Nishimura Yoshiki, Kato Misako, Fukuzawa Hideya	4. 巻 60
2. 論文標題 Isolation and Characterization of Chlamydomonas Autophagy-Related Mutants in Nutrient-Deficient Conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 126 ~ 138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcy193	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 西村芳樹
2. 発表標題 葉緑体核様体のダイナミクスを司るもの
3. 学会等名 シンポジウム「葉緑体学事始 ~ 植物研究が開拓する「細胞とオルガネラの間」の新境地をめざして~」日本植物学会第84回大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村芳樹
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスで捉えた葉緑体核様体のダイナミズム
3. 学会等名 シンポジウム「異分野融合が推進するイメージング研究」 日本植物学会第84回大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井祥，鹿内利治，西村芳樹
2. 発表標題 核様体の膜アンカーは葉緑体分化時の核様体の分散に必要である
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村芳樹
2. 発表標題 葉緑体核様体分裂のダイナミズムを捉える
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村芳樹
2. 発表標題 葉緑体がつもつ「染色体」のダイナミズム
3. 学会等名 名古屋大学 GTRオンライン植物科学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石原静圭、坂下幸汰、石田悠介、木森義隆、西村芳樹、小林優介、西村いくこ、岩淵功誠
2. 発表標題 葉緑体核様体にみられる光応答反応 ~光分散・暗集合反応~
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sho Fujii, Toshiharu Shikanai, Yoshiki Nishimura.
2. 発表標題 Anchoring of nucleoids to the thylakoid membrane is essential for distribution of plastid DNA during chloroplast development.
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nishimura, Y., Hamaji, T., Kobayashi, Y., Takusagawa, M., Shikanai, T.
2. 発表標題 Chloroplast DNA ligase controls the shape of chloroplast nucleoids through the modulation fo DNA supercoils.
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村芳樹
2. 発表標題 葉緑体核様体の伝達戦略
3. 学会等名 第14回クラミドモナス研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村芳樹、小林優介、三角修己
2. 発表標題 葉緑体核様体分裂のダイナミズム
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 田草川真理, 浜地貴志, 深尾陽一郎, 日高久美, 小林優介, 遠藤政幸, 杉山弘, 鹿内利治, 西村芳樹
2. 発表標題 HMGタンパク質がクラミドモナスの葉緑体DNA凝集をコントロールする
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 浜地貴志
2. 発表標題 緑色植物進化における葉緑体DNAリガーゼのバクテリア型から真核生物型への機能移譲
3. 学会等名 第15回京大植物縦横無尽の会ワークショップ(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田草川真理, 浜地貴志, 日高久美, 遠藤政幸, 杉山弘, 鹿内利治, 西村芳樹.
2. 発表標題 葉緑体核様体構造タンパク質と母性遺伝の関連性の発見
3. 学会等名 第14回植物縦横無尽の会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石原静圭、坂下幸汰、石田悠介、木森義隆、西村芳樹、小林優介、西村いくこ、岩淵功誠
2. 発表標題 葉緑体核様体の新奇光応答反応～光分散・暗集合反応～
3. 学会等名 第8回近畿植物学会講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梶川昌孝、山内万里花、新川はるか、田中学、幡野恭子、西村芳樹、加藤美砂子、福澤秀哉
2. 発表標題 オートファジーに依存した緑藻 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> の生存と油脂蓄積
3. 学会等名 2019年度藻類談話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村芳樹
2. 発表標題 葉緑体の「染色体」が魅せるダイナミズム
3. 学会等名 第9回 機能制御学セミナー/第4回 新領域開拓セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mari Takusagawa, Takashi Hamaji, Kumi Hidaka, Masayuki Endo, Hiroshi Sugiyama, Toshiharu Shikanai and Yoshiki Nishimura
2. 発表標題 HMG1 has common domain structure to major mitochondrial nucleoid protein and controls the level of cpDNA compaction in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
3. 学会等名 Japan-US binational meeting
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Hamaji, Yusuke Kobayashi, Shohei Yamaoka, Toshiharu Shikanai, Yoshiki Nishimura
2. 発表標題 Bacterial-to-eukaryotic takeover of chloroplast DNA ligase function in land plants.
3. 学会等名 Marchantia Workshop 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村芳樹、小林優介、浜地貴志、松尾拓哉、鹿内利治
2. 発表標題 葉緑体局在型DNAリガーゼの同定とその欠損株における葉緑体核様体異常
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浜地貴志、小林優介、山岡尚平、鹿内利治、西村芳樹
2. 発表標題 緑色植物における葉緑体DNAリガーゼのバクテリア型から真核生物型への機能移譲
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村芳樹、小林優介、浜地貴志、松尾拓哉、鹿内利治
2. 発表標題 葉緑体核様体のかたちを司るDNAリガーゼの同定
3. 学会等名 第13回クラミドモナス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浜地貴志, 小林優介, 山岡尚平, 鹿内利治, 西村芳樹
2. 発表標題 緑色植物進化における葉緑体DNAリガーゼのバクテリア型から真核生物型への機能移譲
3. 学会等名 第13回クラミドモナス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田草川真理、浜地貴志、鹿内利治、西村芳樹
2. 発表標題 葉緑体核様体タンパク質HMG1は2つのDNA結合ドメインで核様体のサイズを制御する
3. 学会等名 第13回クラミドモナス研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学大学院理学研究科植物分子遺伝学研究室 https://sites.google.com/view/shikanailab/research/nishimura-group

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
---------	---------