

令和 4 年 4 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14733

研究課題名(和文) 厳密な母性遺伝を保證するメス由来のオルガネラDNA保護機構の解明

研究課題名(英文) Organellar DNA protection mechanism that guarantees maternal inheritance

研究代表者

田草川 真理 (Takusagawa, Mari)

京都大学・理学研究科・特定研究員

研究者番号：90711599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：単細胞の緑藻・クラミドモナスの葉緑体では、メス由来の葉緑体DNAが適切に遺伝するメカニズムとして、オスの葉緑体DNAを選択的に分解していることが知られています。この現象の原因として、DNAは葉緑体の内部で核様体と呼ばれる構造を形成していることに着目して、メスの葉緑体核様体内ではタンパク質によってDNA分解から保護されている可能性を仮定しました。この観点から葉緑体核様体構成タンパク質群を同定して、そのタンパク質遺伝子の変異体の中から母性遺伝が攪乱されるものを探し、その候補タンパク質の機能を調べることで、「分解・保護するオルガネラDNAの選択」がどのように行われているかに迫ろうとしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、葉緑体核様体構造の一端が明らかになりました。葉緑体核様体の構造は葉緑体DNAの複製、遺伝子発現、遺伝など様々な機能に影響すると考えられるため、今後、葉緑体機能の新たな制御システムの構築につながる可能性があります。またミトコンドリア核様体の主要タンパク質との構造的類似性をもつタンパク質が見つかることから、葉緑体機能だけでなくミトコンドリア機能の理解も深まるものと考えられます。将来的には、ヒトのミトコンドリア機能不全による病気の治療への光明となることを期待しています。

研究成果の概要(英文)：In the chloroplasts of the unicellular green alga *Chlamydomonas*, it is known that male chloroplast DNA is selectively degraded as a mechanism for proper maternal inheritance. As the cause of this phenomenon, I focused on the nucleoid, a DNA-protein complex inside the chloroplast, because it is possible that female DNA is protected from degradation inside chloroplast nucleoid. From this point of view, I identified the chloroplast nucleoid proteins, searched for mutants of the gene that disturb maternal inheritance, and investigated the function of the candidate proteins.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：葉緑体 クラミドモナス 核様体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

有性生殖をおこなう生物において、細胞核の遺伝情報を担う DNA は両親から平等に子に遺伝する一方で、ミトコンドリアや葉緑体の DNA は片親、多くは母親のみから遺伝する。この母性遺伝と呼ばれる現象は、動物や菌類、多くの植物や藻類に至るまで、普遍的に観察される。これまでに、単細胞緑藻のクラミドモナスの葉緑体を用いた解析によって、葉緑体の母性遺伝は、接合子の葉緑体の内部でオス由来の葉緑体 DNA が選択的に分解される一方、メス由来の葉緑体 DNA が残ることにより成立していることが報告されている。このオスのオルガネラ DNA の分解は動物を含む幅広い生物群で観察され、現在ではこの能動的な DNA 分解が母性遺伝の原動力であると示されている。では、なぜメスのオルガネラ DNA は分解されないのだろうか。この単純な疑問、DNA 分解にまつわるメス側の DNA 保護メカニズムに着目した研究は、これまで行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、オスの葉緑体における選択的 DNA 分解機構として、メスの核様体内で DNA がタンパク質によって DNA 分解酵素から物理的に保護されている可能性を仮定した。この観点から、葉緑体核様体を精製する技術を開発、プロテオーム解析を通じて新規の葉緑体核様体タンパク質群を同定し、その中にあった HBD1 (High Mobility Group B protein 1) に着目した。HBD1 は、動物のミトコンドリア核様体に多量に存在し、ミトコンドリアのヒストン様タンパク質とも呼ばれるタンパク質と相同性があるため、この HBD1 がメスの葉緑体 DNA を分解から物理的に保護する実体ではないかと考え、「分解・保護するオルガネラ DNA の選択」の分子機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) HBD1 の機能解析

HBD1 の DNA 結合能の解析

HBD1 が直接葉緑体 DNA へ結合性し、DNA を保護する可能性を検討するために、組換えタンパク質を用いてゲルシフト法で調べる。直接結合可能な場合は、配列特異性の有無を確認するために、葉緑体 DNA 上の特徴的な配列を用いて解析する。

HBD1 遺伝子破壊株の表現型解析

近年発展してきたゲノム編集技術を用いて HBD1 の遺伝子破壊株を作製して、核様体の形態に与える影響、母性遺伝に与える影響を調べる。

(2) マイクロ流路を用いた核様体動態の可視化

DNA の選択的分解の様子を確認するためには、マイクロ流路中に遊泳する細胞をトラップして、一つの接合子について継時的に観察を行う。

4. 研究成果

(1) HBD1 の機能解析

HBD1 の DNA 結合能の解析

組換えタンパク質を発現・精製して、ゲルシフトを行ったところ、タンパク質量の増加に比例して、DNA の電気泳動度の減少(ゲルシフト)が確認されたことから、DNA 結合能を持つことが確認できた。また葉緑体に由来しない DNA として、DNA の制限酵素断片を使用した時でもバンドのシフトが確認できたため、配列特異性は低いと考えられた。そこでさらに詳細に配列特異性を確認するため、表に示す葉緑体 DNA 上の配列を選択して同解析を行った。しかしこれらの様々な特徴をもつ DNA 配列間でもゲルシフトの結果に違いは見出されなかった。この結果は、やはり HBD1 が葉緑体 DNA 上のどの領域にも結合することができるという結果を支持している。

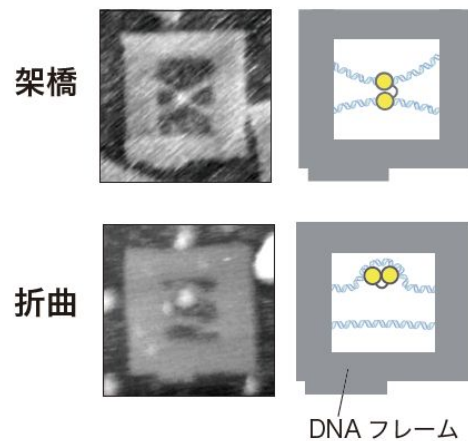
| # | product | gene | region | GC % |
|---|---------|----------|----------|------|
| 1 | rRNA | 23S rRNA | intron | 54% |
| 2 | rRNA | 23S rRNA | | 54% |
| 3 | protein | rpl16 | exon | 38% |
| 4 | tRNA | trnS | | 48% |
| 5 | protein | rbcL | promoter | 10% |
| 6 | protein | rbcL | 5'UTR | 28% |
| 7 | protein | rbcL | exon | 50% |
| 8 | protein | atpB | promoter | 20% |

| | | | | |
|----|---------|------|--------|-----|
| 9 | protein | atpB | exon | 40% |
| 10 | protein | psbA | intron | 38% |
| 11 | protein | psbA | exon | 38% |
| 12 | protein | petA | exon | 46% |

HBD1 遺伝子破壊株の表現型解析

ゲノム編集により HBD1 遺伝子を破壊して顕微鏡で核様体の様子を観察したところ、葉緑体核様体が細かく散ったことから、この 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。この葉緑体核様体の拡散は、2つの DNA 結合部位をもつ野生型の遺伝子を導入することでのみ修復され、1つの DNA 結合部位をもつ短い改変型 HBD1 遺伝子では修復されなかったことから、2つの DNA 結合部位をもつことの重要性が示唆された。

さらに HBD1 組換えタンパク質を使って 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(Bending)と DNA 鎖の架橋(Bridging)の両方を行うことが明らかになった。つまり、葉緑体には二つの DNA 結合ドメインをもつ 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、核様体構造の構築に貢献していることが示された (Takusagawa et al. 2021.PNAS)。また HBD1 遺伝子破壊株同士を掛け合わせることで、接合から接合胞子形成までは進行するものの、正常な子孫の発生確率が低下することが明らかになった。



(2) マイクロ流路を用いた核様体動態の可視化

葉緑体 DNA の選択的分解の様子を確認するために、マイクロ流路中に遊泳する細胞をトラップして、一つの接合子について継時的に観察を行う実験系を立ち上げる予定であった。しかし栄養細胞では有効であったマイクロ流体デバイスでも、接合子に対しては細胞の保持に難があり適切に使用できないことが判明した。そこでアガロースゲルパットを使用した観察法に切り替え、繊細で壊れやすくかつ運動力の強い細胞も、長時間の連続観察が可能になった。まだ DNA を蛍光染色して可視化する方法に関しては最適化の余地があるが、少なくとも葉緑体核様体局在のタンパク質と蛍光タンパク質の融合タンパク質を発現したクラミドモナス株を利用することで、接合後から葉緑体融合が起こるまでの間に、葉緑体核様体の蛍光が消失していく様子を観察できるようになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 4件）

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 西村芳樹、田草川真理 | 4. 巻 12 |
| 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 植物科学の最前線 (BSJ-Review) | 6. 最初と最後の頁 3-12 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24480/bsj-review.12a2.00195 | 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 - |

〔学会発表〕 計24件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

| |
|--|
| 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 CreHBD1タンパク質は、クラミドモナスの葉緑体核様体を組織化するDNAクリップとして機能する |
| 3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 西村芳樹, 浜地貴志, 小林優介, 田草川真理, 鹿内利治 |
| 2. 発表標題 葉緑体核様体の相転移による均等分配機構 |
| 3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 西村芳樹, 浜地貴志, 小林優介, 田草川真理, 鹿内利治 |
| 2. 発表標題 DNA supercoiling制御を基盤とする葉緑体核様体の遺伝機構 |
| 3. 学会等名 日本植物学会第85回大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 西村芳樹, 浜地貴志, 小林優介, 田草川真理, 鹿内利治 |
| 2. 発表標題 葉緑体DNA ligaseはDNA Supercoilの制御をととして葉緑体核様体の形態を司る |
| 3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会 |
| 4. 発表年 2021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 ゲノム編集により得られた緑藻クラミドモナスの葉緑体核様体タンパク質変異株の解析 |
| 3. 学会等名 第10回日本光合成学会年会およびシンポジウム |
| 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 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Mari Takusagawa, Takashi Hamaji, Kumi Hidaka, Masayuki Endo, Hiroshi Sugiyama, Toshiharu Shikanai and Yoshiaki 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 (国際学会) |
| 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 2019年度新学術領域研究「植物新種誕生の原理」若手の会 |
| 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 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タンパク質がグ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 Mari Takusagawa, Yusuke Kobayashi, Yoichiro Fukao, Isamu Miyakawa, Toshiharu Shikanai, Osami Misumi, and Yoshiki Nishimura. |
| 2. 発表標題 Organelle nucleoid-associated HMG-box proteins may have been evolved independently through tandem domain duplications. |
| 3. 学会等名 Gordon Research Conference, Mitochondria and Chloroplasts. (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Mari Takusagawa, Yusuke Kobayashi, Yoichiro Fukao, Isamu Miyakawa, Toshiharu Shikanai, Osami Misumi, and Yoshiki Nishimura. |
| 2. 発表標題 Biological analysis of plastid nucleoid-associated HMG-box protein in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . |
| 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 Mari Takusagawa, Yusuke Kobayashi, Yoichiro Fukao, Isamu Miyakawa, Toshiharu Shikanai, Osami Misumi, and Yoshiki Nishimura. |
| 2. 発表標題 Organelle nucleoid-associated HMG-box proteins may have been evolved independently through tandem domain duplications. |
| 3. 学会等名 第14回植物縦横無尽の会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 田草川真理, 小林優介, 深尾陽一郎, 日高久美, 遠藤政幸, 杉山弘, 宮川勇, 鹿内利治, 三角修己, 西村芳樹. |
| 2. 発表標題 核様体局在のHMGBタンパク質がDNA結合ドメインを2つもつ利点 |
| 3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 田草川真理 |
| 2. 発表標題 ミトコンドリアと葉緑体に共通するDNA収納問題の解決法 |
| 3. 学会等名 平成30年度 第2回(通算第19回) 共生科学研究センター内セミナー |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|