

平成22年 5月 26日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007 ~ 2009

課題番号：19770050

研究課題名（和文） 母性遺伝の分子機構を探る

研究課題名（英文） Exploring the molecular mechanism of maternal inheritance

研究代表者 西村 芳樹

(Nishimura Yoshiki)

京都大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：70444099

研究成果の概要（和文）：

ミトコンドリア(mt)や葉緑体(cp)の母性遺伝は多くの生物に共通する普遍的現象である。これまで母性遺伝は、精子と卵子のサイズの違いで説明されてきた。しかし実際には、雄 mt/cpDNA の積極的な分解により引き起こされる劇的な過程であることがわかってきている。今回、緑藻クラミドモナスにおける母性伝変異体の獲得、解析を通して、性を制御するホメオティック遺伝子が母性遺伝を支配していることが明らかになってきた。

研究成果の概要（英文）：

Uniparental inheritance of mitochondrial (mt) and chloroplast (cp) DNA is a phenomenon common to diverse taxa of plants and animals. Uniparental inheritance was long thought to be a passive outcome, based on the fact that eggs contain multiple numbers of organelles, while the contributions from male gametes are limited. However, it is likely to be more dynamic process, including the active digestion of male mt/cpDNA. In this project, *Chlamydomonas* mutants defective in uniparental inheritance of cpDNA were obtained and analyzed, which revealed that a homeotic gene that regulate the sexual development is also a key factor for uniparental inheritance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：細胞分子遺伝学

科研費の分科・細目：基礎生物学／形態・構造

キーワード：母性遺伝、cpDNA、mtDNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 「背景」

ミトコンドリアや葉緑体は、細胞核とは異なる独自の遺伝子群を有し、それらはヒトを含む多くの動植物において母親のみから子

孫に伝達される。こうした葉緑体やミトコンドリアの母性遺伝は一体どのような機構に基づいているのだろうか。一般的には、卵と精子のサイズの違いが重要な役割を果たしていると言われる。即ち、雌配偶子(卵)は

大きく、多数の色素体（葉緑体）やミトコンドリアを含むのに対し、雄配偶子（精子）は小さく、それらを僅かな量だけ含むに過ぎない。この量差が母性遺伝の基盤であると考えられている (Birky, PNAS 1995)。この説明は説得力があるが、これに大きく矛盾するのが、単細胞緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) における母性遺伝である。

単細胞緑藻クラミドモナスは、雄雌同形の配偶子で生殖を行う。そのため両親は子孫に等量の葉緑体 DNA を寄与する。にも関わらず、葉緑体 DNA は母性遺伝する。1972年、Sagerらは放射線同位体を用いて雌雄の葉緑体 DNA を識別し、接合後 24 時間後までに、雄葉緑体 DNA の相対量が減少することを示した (Sager and Lane, PNAS 1972)。そして1982年、黒岩らは DNA 特異的色素を用いた蛍光顕微鏡観察を行い、接合子の雄の葉緑体 DNA 輝点が接合後 60 分で完全に消失することを発見した (Kuroiwa *et al.*, Nature 1982)。さらに1999年、申請者は生きた細胞の中で雄の葉緑体 DNA 輝点の消失を観察する事に成功した (Nishimura *et al.*, PNAS 1999: 図1)。これらの研究により、母性遺伝が雄の細胞質遺伝子の積極的破壊という、劇的な過程に基づく現象であることが強く示唆される事となった。

(2) 「母性遺伝において雄葉緑体 DNA は積極的に分解される」

この輝点の消失に関しては、葉緑体 DNA の分解ではなく拡散を示すとする強い反論があった (Boynton, *et al.*, 1990)。雄葉緑体 DNA の輝点消失の時期 (接合後 60 分) が、生化学的方法によって示された雄葉緑体 DNA 現象の時期 (接合後 6-24 時間後) に対してあまりにも早かったためである。

接合を行った細胞液中には未接合の配偶子や、雄葉緑体 DNA の分解が未完了の接合子が混在する。雄葉緑体核様体の蛍光消失の意義を分子レベルで明らかにするためには、細胞を集団として扱う従来の生化学、分子生物学的手法では不十分であり、顕微鏡で観察される1個の細胞を回収して直接分子解析を行うという、新しい方法論の確立が必須であった。そのため申請者らは顕微鏡下で1個の細胞や細

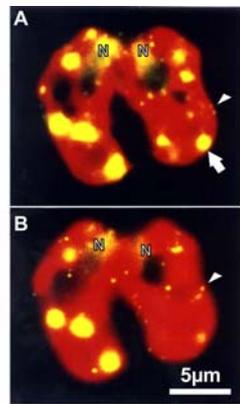


図1 生きた単細胞緑藻クラミドモナス接合子をdsDNA選択的蛍光色素SYBR Green I (黄色)によって染色した。赤色は葉緑体のクロロフィルの自家蛍光。細胞核(N)、ミトコンドリア核様体(矢頭)、葉緑体核様体(矢印)の3ゲノムが同時に可視化されている。接合直後(A)では、雌雄の葉緑体(左右)にほぼ同数の葉緑体核様体が観察されたが、60分後(B)、雄の葉緑体核様体(右)は完全に消失する。

胞内小器官を赤外線レーザーにより非接触的に捕捉する技術(光ピンセット)を改良し、さらに1細胞を分子解析する超高感度PCR法を開発した。その結果、顕微鏡で観察された接合子の雄葉緑体 DNA 輝点の消失が、雄葉緑体 DNA の完全な分解により引き起こされることを明らかにした (Nishimura *et al.*, PNAS 1999)。この成果は、雄葉緑体 DNA の積極的分解が母性遺伝の分子基盤であることの証明を成すと共に、一つの細胞や細胞内小器官の個性が、今後の分子生物学的研究対象となり得ることを示した。

単細胞緑藻クラミドモナスは、雄雌同形の配偶子で生殖を行う。そのため両親は子孫に等量の葉緑体 DNA を寄与する。にも関わらず、葉緑体 DNA は母性遺伝する。1972年、Sagerらは放射線同位体を用いて雌雄の葉緑体 DNA を識別し、接合後 24 時間後までに、雄葉緑体 DNA の相対量が減少することを示した (Sager and Lane, PNAS 1972)。そして1982年、黒岩らは DNA 特異的色素を用いた蛍光顕微鏡観察を行い、接合子の雄の葉緑体 DNA 輝点が接合後 60 分で完全に消失することを発見した (Kuroiwa *et al.*, Nature 1982)。さらに1999年、私達は生きた細胞の中で雄の葉緑体 DNA 輝点の消失を観察する事に成功した (Nishimura *et al.*, PNAS 1999: 図1)。これらの研究により、母性遺伝が雄の細胞質遺伝子の積極的破壊という、劇的な過程に基づく現象であることが強く示唆される事となった。それでは、この現象は一体どのような遺伝子群によって制御されているのだろうか？

2. 研究の目的

本研究計画では、「Green Yeast」ともよばれる単細胞緑藻クラミドモナスの葉緑体母性遺伝の変異体を単離し、その原因遺伝子の同定、機能解析をおこなうことで、母性遺伝の制御機構を遺伝子レベルで解明することを目的とする。

3. 研究の方法

先行研究の結果から、接合直前に雌(mt+)配偶子を紫外線で照射すると、母性遺伝が阻害されることが示されている (図2)。そこで、雌を対象としてパロマイシン耐性遺伝子断片 (*AphVIII*) の非特異的挿入による変異導入 (Insertional mutagenesis: タギング) をおこない、それを葉緑体にスペクチノマイシン耐性遺伝子をもつ雄の葉緑体形質転換体とかけあわせ、スペクチノマイシン耐性がより高頻度に次世代に遺伝するものをスクリーニングすることで母性遺伝変異体を探索する (図2)。

さらに選抜された変異体について SYBR

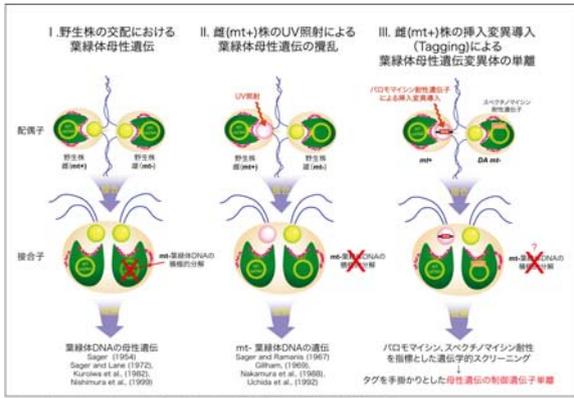


図2 クラミドモナスのタグgingによる母性遺伝変異体単離の戦略
 (I)野生株同士の交配(I)においては、雄(mt-)の葉緑体DNAが積極的に分解される事により母性遺伝が引き起こされる。(II)雌(mt+)を接合前にUV照射すると母性遺伝が起きなくなる事が約40年前から知られている。(III)そこで、mt+株を対象とした挿入変異導入を行ったタグgingラインを葉緑体にスペクチノマイシン耐性遺伝子(aadA)を組み込んだ雄株(DA mt-)と交配させ、子孫にスペクチノマイシン耐性が遺伝するものをスクリーニングすることにより、母性遺伝変異体を単離する。

Green I 染色やNative-PAGE スクレアーゼ検出法を用いた基本的な表現型解析を行い、遺伝子同定に向けて有力な候補を絞り込む。得られた変異体について、TAIL-PCR をおこない、*AphVIII* 遺伝子挿入部位の近傍配列を得る。得られた配列情報をもとに、クラミドモナスのゲノムデータベース(Joint Genome Institute)を対象としたBLAST 解析をおこない、原因遺伝子の候補を絞り込む。原因遺伝子の候補について、接合前後の発現様式解析、全長 cDNA、ゲノム配列による相補実験をとおして原因遺伝子の特定をする。特定された原因遺伝子については、ホモロジーサーチ、組換え蛋白質の生化学的解析を行うことにより、その母性遺伝における機能を推定し、母性遺伝の分子機構解明の足掛かりとする。

4. 研究成果

計画した葉緑体変異体スクリーニングは、予想以上に困難をともなった。葉緑体母性遺伝は野生株においても 5-10%の「漏れ」があり、これがスクリーニングの大きなバックグラウンドとして問題となった。これを乗り越えるために、タグgingによって得られた株を一つ一つ維持し、丹念にテスター株(雄のスペクチノマイシン耐性葉緑体形質転換体)と交配させて変異体を探索していく必要があった。ようやく、2082 株についてスクリーニングを行った結果、母性遺伝が異常な株として、一連の(*bp*)株が得られた。

(1)「母性遺伝が全く起こらない株：*bp31*」
*bp31*では、雄葉緑体 DNA の分解が完全に停止するばかりでなく、ペリクル形成、接合胞子への分化といった接合子成熟過程全般が停止した(図3)。遺伝子発現様式を qPCR 解析により詳細に検証したところ、*bp31*では野生株の接合で観察されるような配偶子特異的遺伝子の抑制、多数の接合子特異的遺伝子の急激な活性化を伴う遺伝子発現の著しい変化が失われており、接合子形成後も配偶子の遺伝子発現様式が持続することがわかった。

この原因遺伝子を同定すべく、TAIL-PCR、ゲノム PCR 解析を繰り返した結果、接合子の成熟に深く関わるホメオティック遺伝子が浮かび上がって来た。この遺伝子産物は、接合子で雌の蛋白質と会合することにより接合子特異的なプログラムを開始すると報告されており、母性遺伝がこのプログラムの一つのモジュールとして制御されている可能性が見えて来た。性と母性遺伝が遺伝子レベルで結びつこうとしている(Nishimura et al., 投稿準備中)。

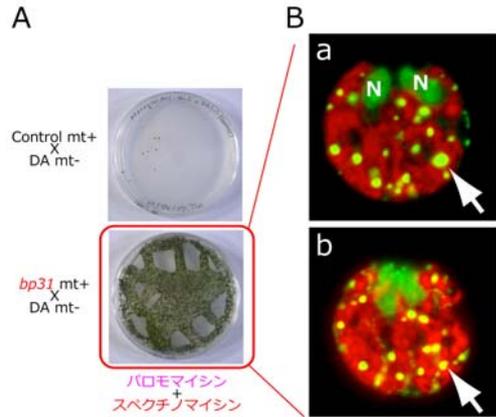


図3 (A) コントロール株あるいは *bp31* (細胞核にパロモマイシン耐性遺伝子をもつ) をテスター株(葉緑体にスペクチノマイシン耐性遺伝子をもつ) と交配した接合子をパロモマイシンとスペクチノマイシンを含む培地上で培養した結果。コントロール株では、雄の葉緑体ゲノムが分解されるため、ほとんどコロニーは得られないが、*bp31* では多くの細胞がスペクチノマイシン耐性を示す。(B)SYBR Green I 染色した *bp31* 接合子の蛍光顕微鏡像。赤は葉緑体(クロロフィル)自家蛍光。葉緑体中の黄色い起点(矢印)が葉緑体核様体。N は細胞核。*bp31* を雌株にすると、葉緑体核様体は接合 30 分後(a)、接合 90 分後(b)とも変化がなくなり、雄の葉緑体核様体消失は全く観察されない。

(2)「予想外の表現型を示す葉緑体母性遺伝変異体」

変異体スクリーニングの過程で、雌の葉緑体核様体が不安定になる株が得られた。これらは雌核様体の保護機構を解明するうえでの重要な鍵になると思われる。(図4)

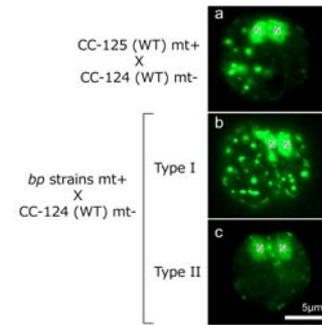


図4 葉緑体母性遺伝変異体(*bp*)株の中には、*bp31* のように雄の葉緑体核様体消失が起こらなくなるもの(b: Type I)以外に、雄の葉緑体核様体が不安定化されるものもあった(c: Type II)。

(3)「葉緑体ヘテロプラスミーの遺伝」

1つの葉緑体には、およそ 80-100 コピーの葉緑体ゲノムが含まれていると言われる。一般的に、葉緑体ゲノムは均質であると考えられているが、クラミドモナス変異体 *spa19* は、PS+と PS-と命名された二種類の葉緑体ゲノムを持つ。*spa19* 変異体の栄養細胞では、PS+は PS-の約 3-4 倍程度存在する。これを

母親として野生株の雄と交配すると、PS-は正常な母性遺伝をして全ての子孫に遺伝した。しかしPS+は子孫の約25%にしか遺伝しなかった。この変則的な母性遺伝について理解をするべく、接合過程の様々な段階でPS+/PS-比の解析を行ったところ、配偶子誘導過程と接合胞子の減数分裂直前に、PS+/PS-比が減少することが明らかになった。そこで接合過程のPS+とPS-の複製活性を比較するために、BrdU-免疫抗体沈降-PCR解析法を導入し、栄養細胞と配偶子で比較した。その結果、PS+の複製活性はPS-に比べ、配偶子で著しく低下することが明らかになった。この結果は、母性遺伝において母親のゲノムが無制限に次世代に受け渡される訳ではないことを示している(Nishimura and Stern, Genetics in press)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

①Nishimura, Y., Stern, D. B., Differential replication of two chloroplast genome forms in heteroplasmic *Chlamydomonas reinhardtii* gametes contributes to alternative inheritance patterns, Genetics, 査読あり, in press).

②Nishimura, Y., Uniparental inheritance of cpDNA and the genetic control of sexual differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*, J. Plant Res. 査読有り, 123巻, 2010, 149-162

③西村芳樹、鹿内利治、葉緑体RNAの成熟と寿命、蛋白質核酸酵素、査読無し、54巻、2009、2098-2101

[学会発表] (計16件)

①西村芳樹、クラミドモナス葉緑体母性遺伝変異体BP31の解析からみえてきた接合子成熟プログラム、第51回日本植物生理学会年会、2010年3月18日-21日、熊本県、熊本大学

②上田実、石崎公庸、大和勝幸、河内孝之、鹿内利治、西村芳樹、新規ゼニゴケ核ゲノム形質転換選抜用マーカーの開発、第51回日本植物生理学会年会、2010年3月18日-21日、熊本県、熊本大学

③西村芳樹、生殖プログラムと葉緑体母性遺伝ー母性遺伝変異体BP31の解析ー、植物細胞生物学若手の会、2009年12月21日、奈良県、奈良先端科学技術大学院大学

④西村芳樹、葉緑体母性遺伝の分子機構の探求、日本植物学会第73回大会「奨励賞受賞講演」、2009年9月18-20日、山形県、山形大学

⑤宮城敦子、平林孝之、高橋秀幸、西村芳樹、高原健太郎、川合真紀、内宮博文、強害帰化雑草エゾノギシギシのメタボローム解析、第50回日本植物生理学会年会2009年3月21-24日、愛知県、名古屋大学

⑥西村芳樹、生殖プログラムと葉緑体母性遺伝ー母性遺伝変異体BP31の解析ー、第1回京大植物縦横無尽の会、2009年3月17日、京都府、京都府立大学

⑦西村芳樹、葉緑体とミトコンドリアの遺伝制御機構、第2回連携大学院セミナー京都、2009年3月14日、京都府、京都大学

⑧Nishimura, Y., Exploring the molecular mechanism of maternal inheritance, International symposium "Bacteria made organelles made eukaryotic cells" 2008年11月29-30日、東京都、東京大学

⑨西村芳樹、母性遺伝の機構を探るー緑藻クラミドモナスをモデルとしてー、光計測技術と生物発光リアルタイム測定システムの応用 第2回研究会、2008年11月6日、愛知県、名古屋大学

⑩Nishimura, Y., Molecular Mechanism of Maternal Inheritance -Reverse and Forward Genetic Approaches-, Japan-Swiss Workshop on Photosynthetic Adaptation and Chloroplast Dynamics, 2008年10月7-11日、奈良県、ホテルフジタ奈良

⑪西村芳樹、松島智美、川合真紀、内宮博文、母性遺伝の分子機構ークラミドモナスEZYI遺伝子の逆遺伝学的解析ー、日本植物学会第72回大会、2008年9月24-27日、高知県、高知大学

⑫宮城敦子、高橋秀幸、西村芳樹、高原健太郎、川合真紀、内宮博文、タデ科ギシギシ属の代謝物解析、日本植物学会第72回大会、2008年9月24-27日、高知県、高知大学

⑬Nishimura, Y., Matsuura, H., Kato, K., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., and Stern, D. B., Repression of translation caused by antisense transcripts in chloroplasts, 13th International *Chlamydomonas* Conference (EMBO workshop on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*), 2008年5月27日-6月1日、イェール、フランス

⑭西村芳樹、松島友美、川合真紀、内宮博文、クラミドモナス接合子特異的遺伝子EZYIの機能解析、第49回日本植物生理学会年会、2008年3月20日、北海道、北海道大学

⑮Nishimura, Y., Uchimiya, H., and Stern, D. B., Biased maternal inheritance of heteroplasmic chloroplast genomes possibly caused by preferential replication, 第10回国際細胞共生学会、2007年9月10-13日、グムンデン、オーストリア

⑩西村芳樹、葉緑体におけるアンチセンスRNA、第71回植物学会大会シンポジウム「植物トランスクリプトーム解析の最前線」、2007年9月8日、千葉県、東京理科大学

〔図書〕(計1件)

①西村芳樹、クラミドモナスで片親遺伝のしくみを探る、モデル生物ハンドブック、第9章、2009、p62-63、化学同人

〔その他〕

ホームページ等

http://www.bot.kyoto-u.ac.jp/annual/5_iden.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 芳樹 (NISHIMURA YOSHIKI)
京都大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：70444099