

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05942

研究課題名(和文) プラスチドシグナルによる核遺伝子発現制御の普遍性と多様性

研究課題名(英文) General and Specific Nuclear Gene Regulation by Plastid Signals

研究代表者

華岡 光正 (HANAOKA, Mitsumasa)

千葉大学・大学院園芸学研究院・教授

研究者番号：30508122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、植物の葉緑体から核に情報を伝える「プラスチドシグナル」による遺伝子発現制御の普遍性と多様性を明らかにすることを目的とした。プラスチドシグナルによる核遺伝子発現制御を効率的・安定的にモニターするための実験系を構築し、特にアセチル化やメチル化によるヒストン修飾の変化を介したエピジェネティックな制御も下流応答に寄与することが示され、プラスチドシグナル伝達に関する新たな仕組みを明らかにすることができた。また、葉緑体と概日時計制御の関係や、光合成微生物におけるプラスチドシグナルについても一定の知見が得られ、プラスチドシグナルの多様性についても理解を深めることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プラスチドシグナル伝達については、植物分子細胞生物学分野における最重要課題の1つであり、以前より国内外の多くの研究者から注目が集まっている。本研究により、その新しい分子機構や生理応答の一端を明らかにできたことで、この分野の発展に大きく寄与できたと考えられる。また、本研究でも着目している核ゲノムと葉緑体ゲノムの遺伝子発現協調によって植物の光合成や代謝機能が調節されているので、過酷なストレス環境下に適応が可能な新たな作物の開発など、応用研究に向けての分子基盤としても重要性・将来性は高い。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to clarify the generality and diversity of the regulation of gene expression by "plastid signals," which is responsible for passing information from the chloroplast to the nucleus in plants. An experimental system was established to efficiently and stably monitor the regulation of nuclear gene expression by plastid signaling, and it was shown that epigenetic regulation through changes in histone modifications, especially acetylation and methylation, also contributes to downstream responses, revealing a new mechanism of plastid signaling. In addition, the relationship between chloroplasts and circadian clock regulation, as well as some findings on plastid signaling in photosynthetic microorganisms, have provided an understanding of the diversity of plastid signaling.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：プラスチドシグナル 葉緑体 エピジェネティック制御 GUN1 概日時計 光合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

葉緑体は植物の生存や生産性に直結する非常に重要なオルガネラであるが、光合成や代謝などの葉緑体機能に必要な遺伝子群は核ゲノムと葉緑体ゲノムに分かれてコードされているため、発達や環境変化に応じた両ゲノム上の遺伝子発現の協調が必要不可欠である。この協調には、核と葉緑体間の双方向シグナル伝達が重要な役割を果たすと考えられている。これまでに、シグマ因子などを介した核による葉緑体遺伝子発現調節に関する知見が蓄積しているが、葉緑体からの「プラスチドシグナル」による核遺伝子の発現制御については不明な点が多いとされてきた。研究代表者はこれまで、葉緑体分化や概日時計に応答した遺伝子発現協調機構について、双方向シグナル伝達に着目して研究を進めてきた。

プラスチドシグナルは、葉緑体の光合成やレドックス状態、代謝、活性酸素ストレスなど、葉緑体の様々な状態を核に伝えることで核遺伝子の発現をコントロールすることが知られている。この情報伝達に関わる因子として、葉緑体で機能する GUN1~GUN6 と呼ばれるタンパク質が知られている。これらのうち、GUN1 については、葉緑体内の多様なパラメーターを統御する重要な役割が指摘されているが、DNA や RNA に結合する PPR ドメインを持つタンパク質であることが分かっているだけで、その詳細な機能はほとんど明らかにされておらず、情報伝達における役割が重要視されている。さらに、下流の核遺伝子の発現制御様式や、様々な生理応答におけるプラスチドシグナルの寄与など、応答の多様性に関しても不明点が多く残されていた。

2. 研究の目的

本研究では、葉緑体の状態を核に伝えるためのプラスチドシグナル伝達について、その普遍性と多様性の解明を目的とした。特に、主要因子 GUN1 のターゲット DNA/RNA を同定することで多様な情報伝達に共通する葉緑体の応答を明らかにするとともに、下流の遺伝子発現調節の新しい様式としてエピジェネティック制御の可能性の検討や、葉緑体と概日時計機構の関係を探るなど、プラスチドシグナルによる多様な遺伝子発現制御の実体をさらに明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) プラスチドシグナルによる核遺伝子発現の制御を安定的に検出するための解析系の構築と最適化を行った。

(2) GUN1 特異抗体や FLAG タグを付加した GUN1 を発現する形質転換株を用いて、GUN1 のタンパク質レベルでの発現挙動の解析とターゲット DNA・RNA の同定を試みた。

(3) プラスチドシグナルによるエピジェネティックな制御を明らかにするために、核ゲノムのヒストン修飾や DNA メチル化の変化について検討を行った。

(4) 遺伝子発現応答の多様性を理解するため、核の概日時計機構に着目して葉緑体と核の間における発現協調メカニズムについて解析を行った。

(5) 高等植物に加え、光合成微生物においてもプラスチドシグナルに依存した核遺伝子の発現制御機構を調べ、シグナル伝達の普遍性と特異性について検討を行った。

4. 研究成果

(1) これまでの研究で、葉緑体の機能を低下させる薬剤であるノルフルラゾンもしくはリンコマイシンを含む培地でシロイヌナズナを生育させると、核コードの光合成関連遺伝子である *CAB3* や *RBCS* の転写量が減少することが示されている。また、*gun1* 変異株に同様の阻害剤処理を行うと、野生株と比べてこれら遺伝子の発現が抑制されないことが観察されている。しかし、このようなプラスチドシグナルの発生に適した阻害剤処理条件の設定については、過去の報告では植物の週齢や阻害剤濃度、光条件等がそれぞれ異なっており、いまだ明確な条件が定まっていない上に、いずれの方法も追試が難しく、再現性に課題が残されていた。本研究では、以降の解析を行うにあたり、簡便かつ安定的に薬剤処理による遺伝子発現パターンをモニターできる実験系を確立・最適化する必要があったため、プラスチドシグナル発生に適した供試植物の週齢、核コード光合成関連遺伝子、阻害剤の濃度、光条件の検討を行った。その結果、ノルフルラゾン処理においては、MS 寒天培地上で生育させた 2 週齢の植物を、10 μ M のノルフルラゾン溶液を含む MS 寒天培地に移し替え、84 時間白色光条件下で生育させた後、12 時間の暗条件、12 時間

の明条件、12時間の暗条件の順に光条件を変え、最後に24時間の白色光条件で生育させる条件が有効であることが分かった。一方、リンコマイシン処理においては、やはりMS寒天培地上で生育させた2週齢の植物を、500 μ Mのリンコマイシンを含むMS寒天培地に移し替え、120時間暗条件で生育後、24時間光照射した植物を用いたところ、プラスチドシグナルに依存した核遺伝子の発現応答を明確に、そして再現性良く検出することに成功した。

(2) GUN1のタンパク質レベルでの挙動を知るためには、また、ChIP・RIP解析によるターゲットDNA・RNAの同定を行うためには、特異性の高い抗体が必要である。そのため、複数種のウサギポリクローナル抗体を作成、ならびにFLAGエピトープタグをC末端側に付加したGUN1タンパク質を発現する形質転換株を作成・選別し、イムノブロット解析によるGUN1の検出を試みた。これまでの報告では、GUN1タンパク質の発現量は非常に少ないことが示されており、GFPとの融合タンパク質を過剰発現させた際により検出できるレベルであった(Wu *et al.*, 2018)。本研究でも、植物の生育条件や、抽出バッファー・タンパク質量・抗体の反応条件などを詳細に検討したが、安定的に検出することは非常に困難であった。発現量が少ないため、ChIP実験も有効な結合ターゲットの特定には至らなかった。本実験は、過剰発現株では*in vivo*での結合変化を捉えることはできないため、どうしても自身のプロモーター下で発現しているGUN1を対象として検討する必要があるため、今後も継続的に研究を進め、GUN1の動態の解明に挑戦したい。

(3) プラスチドシグナルの下流ではたらく核遺伝子の発現制御では、主に転写因子が関与するモデルが考えられているが、遺伝子発現制御には一般にヒストン修飾などを介したエピジェネティックな調節の存在も指摘されているため、プラスチドシグナルによる標的プロモーターのメチル化制御、ならびにヒストン修飾に関する解析を行った。まず、次世代シーケンサーによる網羅的なメチル化解析を行ったが、調査した複数の遺伝子領域の全てにおいて過剰にメチル化されていると思われる結果が得られ、偽陽性が疑われた。そのため、個別の遺伝子プロモーターについて解析を行ったところ、ヒストンH3のアセチル化修飾に加えてH3K4me3やH3K9me2などのメチル化修飾もプラスチドシグナルにより変化していることが示され、転写因子による制御に加えて、ヒストン修飾によるエピジェネティックな制御も重要な役割を果たす可能性が示された。

(4) プラスチドシグナルと概日時計の関係を検討するため、調節を受ける標的遺伝子の検討を行った。シロイヌナズナの野生株(C24)と概日時計変異株(*toc1-1*)を用いた発現解析を行った結果、葉緑体で強光ストレス応答に関わると考えられるPGR5・CAT2・ABA1・HCF173などの発現が、特に夜明け前後の時間帯において概日時計により制御されている可能性が示唆された。また、強光ストレスによって葉緑体の光合成機能にダメージを与えた際の表現型解析を行った。野生株と*toc1-1*変異株を用いて、連続明条件・明暗条件・明暗+強光ストレス条件下での生育を調べたところ、概日時計の変異株ではストレス条件下での白化が早まり、成長が大きな遅延することが示された。これらの結果から、葉緑体の光合成機能と核の概日時計は両者間のシグナル伝達経路を介して密接に関連していることが示唆された。

(5) 以上のようなプラスチドシグナル伝達の進化的な多様性を検討するため、単細胞紅藻*Cyanidioschyzon merolae*(シゾン)を用いた遺伝子発現制御の解析を行った。種々の原始的特徴を有するシゾンにおいては、ほとんどの核遺伝子の発現が光依存的に誘導されることが示されているが、フィトクロムなどの光受容体を介した制御の寄与は低いと考えられている。一方で、シゾンの葉緑体には、共生起源のシアノバクテリアで光環境応答に関わるとされている二成分制御系が保存されており、特にレスポンスレギュレーターの一つであるYcf27のオーソログは光強度の変化に応答すること示されたことから、この二成分制御系がシゾンにおいても光応答に密接に関わり、部分的にプラスチドシグナルを介した核遺伝子の発現制御にも関与している可能性が予想された。これまでの研究より、光に応答する一部の核遺伝子の発現が葉緑体のヒスチジンキナーゼ(HIK)に依存して誘導されることを見出していたが、その下流応答は不明であった。本研究では、シロイヌナズナにおける光転写制御との類似性を踏まえて、特にヘムとbZIP型転写因子による葉緑体から核へのシグナル伝達経路について検討を行った。その結果、HIKに依存して誘導される核遺伝子の発現は、暗条件におけるヘムの添加によっても同様に増加することが示された。また、光依存的な核遺伝子の転写制御に関与していると考えられるbZIP型転写因子のタンパク質量はヘムの添加により著しく減少することが分かった。さらに、ChIP-qPCR解析により、一部の核遺伝子のプロモーターへのbZIP2の結合が、光照射により有意に低下することが示された。これらの結果から、ヘムとbZIP型転写因子を介したプラスチドシグナル伝達によって一部の核遺伝子の転写が光依存的に制御されている可能性が示され、植物に共通した光シグナル伝達経路の存在が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yasuda Akira, Inami Daichi, Hanaoka Mitsumasa	4. 巻 66
2. 論文標題 RpaB, an essential response regulator for high-light stress, is extensively involved in transcriptional regulation under light-intensity upshift conditions in <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 73 ~ 79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2020.01.010	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 Hanaoka Mitsumasa	4. 巻 2020
2. 論文標題 New development of plastid signal research	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Impact	6. 最初と最後の頁 79 ~ 81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21820/23987073.2020.6.79	査読の有無 無
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 Natsuko Kagawa, Hiroya Iguchi, Masahumi Henzan and Mitsumasa Hanaoka	4. 巻 7
2. 論文標題 Drying the leaves of <i>Perilla frutescens</i> increases their content of anticancer nutraceuticals.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Food Sci Nutr.	6. 最初と最後の頁 1494-1501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/fsn3.993	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27件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 浦野航、林健太郎、華岡光正
2. 発表標題 概日時計が関与する葉緑体の光ストレス応答
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 猪瀬碧、平安山昌史、船城桐子、華岡光正
2. 発表標題 プラスチックシグナルによる核遺伝子発現の多様な制御
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 斎藤遙、大原ひかる、小林勇気、田中寛、五十嵐雅之、内海龍太郎、岡島俊英、華岡光正
2. 発表標題 Cyanidioschyzon merolaeにおけるレトログレードシグナルによる光転写制御
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 Akira Yasuda, Daichi Inami, Sousuke Imamura, Kan Tanaka, Mitsumasa Hanaoka
2. 発表標題 Transcriptional regulation under diverse light intensity changes by an evolutionarily conserved cyanobacterial two-component system.
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 Yuki Kobayashi, Miyako Kitagawa, Toko Yoshikawa, Hikaru Ohara, Mistumasa Hanaoka, Sousuke Imamura, Kan Tanaka
2. 発表標題 Analysis of E3 ubiquitin ligase Cul4 complex involved in light signal transduction in a primitive red alga Cyanidioschyzon merolae.
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 大原ひかる、安田暉、華岡光正
2. 発表標題 単細胞紅藻シゾンの葉緑体光環境に依存した遺伝子発現調節
3. 学会等名 第10回光合成学会・シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 華岡光正
2. 発表標題 高振幅シグマ因子群によるSynechococcusの概日転写制御
3. 学会等名 CyanoClock 2.0 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 華岡光正
2. 発表標題 シアノバクテリアの時間特異的な遺伝子発現調節
3. 学会等名 ラン藻ゲノム交流会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 華岡光正
2. 発表標題 光合成機能を支える核と葉緑体間のシグナル伝達
3. 学会等名 新光合成 & 光合成若手の会ジョイント若手ワークショップ2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mitsumasa Hanaoka
2. 発表標題 Evolution of light-dependent gene regulation mediated by chloroplast-to-nucleus retrograde signaling.
3. 学会等名 The 14th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大原ひかる、小林勇気、今村壮輔、田中寛、五十嵐雅之、内海龍太郎、華岡光正
2. 発表標題 単細胞紅藻シソンの光環境応答に関わる葉緑体から核への情報伝達
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 加川夏子、平安山昌史、井口広也、華岡光正
2. 発表標題 乾燥によるシソ生理活性物質の変動
3. 学会等名 日本生薬学会第66回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊南大地、徳山城永、小堀奈美、秋元勇輝、田中寛、華岡光正
2. 発表標題 シアノバクテリア <i>S. elongatus</i> PCC7942の高振幅シグマ因子群による時間特異的な転写制御
3. 学会等名 第18回微生物研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安田暉、伊南大地、華岡光正
2. 発表標題 シアノバクテリア <i>S. elongatus</i> PCC7942の光環境応答におけるRpaBの役割
3. 学会等名 第18回微生物研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川美也子、小林勇氣、吉川瞳子、大原ひかる、華岡光正、今村壮輔、田中寛
2. 発表標題 単細胞紅藻 <i>Cyanidioschyzon merolae</i> の光転写活性化におけるCu14複合体の機能解析
3. 学会等名 第18回微生物研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊南大地、徳山城永、小堀奈美、秋元勇輝、田中寛、華岡光正
2. 発表標題 シアノバクテリアの高振幅シグマ因子群による協調的な転写リズム形成
3. 学会等名 かずさDNA研究所研究会「ラン藻の分子生物学2019」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安田暉、伊南大地、華岡光正
2. 発表標題 多様な光強度変化に応答したシアノバクテリア強光応答遺伝子の発現制御
3. 学会等名 かずさDNA研究所研究会「ラン藻の分子生物学2019」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大原ひかる、安田暉、華岡光正
2. 発表標題 多様な光合成環境に依存した葉緑体遺伝子の転写制御
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 北川美也子、小林勇氣、吉川瞳子、大原ひかる、華岡光正、今村壮輔、田中寛
2. 発表標題 Analysis of E3 ubiquitin ligase Cul4 complex involved in light signal transduction in a red alga <i>Cyanidioschyzon merolae</i> .
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 平安山昌史、武川航大、加川夏子、華岡光正
2. 発表標題 青シソにおける二次代謝関連遺伝子発現のストレス応答と日周変動
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安田暉、田中寛、華岡光正
2. 発表標題 <i>Cyanidioschyzon merolae</i> の葉緑体遺伝子発現の光応答における二成分制御系の関与
3. 学会等名 第20回微生物研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 斎藤遥、大原ひかる、田中寛、華岡光正
2. 発表標題 Cyanidioschyzon merolaeにおけるヘムを介した光転写制御の解析
3. 学会等名 第20回微生物研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安田暉、佐藤大地、今村壮輔、田中寛、華岡光正
2. 発表標題 単細胞紅藻Cyanidioschyzon merolaeの葉緑体に保存されたHIK-Ycf27/Ycf29二成分制御系の重要性
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 砂田友輝、林健太郎、浦野航、華岡光正
2. 発表標題 概日時計により夜明け前から備える植物の光ストレス応答
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 斎藤遥、大原ひかる、小林勇氣、田中寛、五十嵐雅之、内海龍太郎、岡島俊英、華岡光正
2. 発表標題 Cyanidioschyzon merolaeの光応答転写制御におけるヘムの関与
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安田暉、今村壮輔、田中寛、華岡光正
2. 発表標題 単細胞紅藻シゾンの光強度に依存した葉緑体遺伝子発現変動と二成分制御系による調節
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 斎藤遙、大原ひかる、小林勇気、田中寛、五十嵐雅之、内海龍太郎、岡島俊英、華岡光正
2. 発表標題 紅藻シゾンにおけるレトログレードシグナルによる光転写制御とヘムの関与
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023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