

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15819

研究課題名（和文）色素体核様体の膜アンカーポイントが司る核様体構造と色素体分化の制御

研究課題名（英文）Membrane-anchoring of plastid DNA involves in regulation of nucleoid morphology and plastid gene expression

研究代表者

藤井 祥 (Fujii, Sho)

弘前大学・農学生命科学部・助教

研究者番号：20867717

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：葉緑体分化過程では、葉緑体内のチラコイド膜上でDNA-タンパク質複合体である核様体が構造を大きく変え、光合成関連遺伝子の発現が上昇する。これらの過程を制御するメカニズムを明らかにするため、葉緑体RNAポリメラーゼのDNAに対するゲノムワイドな結合パターンの解析手法を確立し、チラコイド膜の形成が遺伝子発現に与える影響と、チラコイド膜上のDNA結合タンパク質の機能解析を行った。色素体遺伝子の転写と翻訳には、チラコイド膜を構成する膜脂質合成の合成が必要であることが分かった。さらに、チラコイド膜に核様体をアンカーするタンパク質が、核様体構造や色素体RNAポリメラーゼの機能制御に関与することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の色素体は、器官や環境に応じて柔軟に分化することで、光合成やデンプン蓄積をはじめとする多様な代謝を担い、色素を蓄積して植物の多様ないろどりを創出する。本研究の成果は、チラコイド膜の形成や核様体の形態変化が、色素体の遺伝子発現制御に関与することを示している。植物の光合成や成長を最適化するには、色素体の遺伝子発現を適切に制御することが不可欠であるため、本研究の知見は人類が植物を食料や資源として活用する際の基礎的な情報となる。本研究で確立した色素体RNAポリメラーゼの機能をゲノムワイドに分析する方法は、任意の植物試料に適用可能であり、今後の植物学研究において広く活用されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：During chloroplast development, the morphology of the plastid DNA-protein complex known as nucleoids changes in parallel with the induction of photosynthesis-associated genes. To uncover the mechanism underlying these processes, we first established a protocol to analyze the genome-wide DNA-binding pattern of plastid-encoded RNA polymerases. We also investigated the involvement of thylakoid formation in plastid gene expression and roles of membranous DNA-binding protein in chloroplast development. By analyzing the gene expression patterns in thylakoid-deficient mutants, we found that synthesis of thylakoid lipids is crucial for the transcription and translation in plastids. Our results indicate that the activation of plastid-encoded RNA polymerase depends on plastid lipid synthesis. We also revealed that the DNA-binding protein in the thylakoid are required for regulation of nucleoid morphology during chloroplast development and induction of gene expression under stressful conditions.

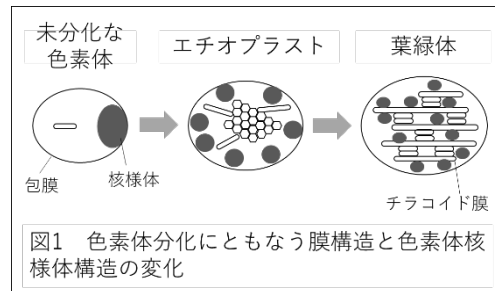
研究分野：植物生理学

キーワード：葉緑体 核様体 遺伝子発現 膜脂質 DNA結合タンパク質 RNAポリメラーゼ

1. 研究開始当初の背景

植物の色素体は、器官や環境に応じて柔軟に分化することで光合成やデンプン蓄積を担い、また花や果実、野菜に彩を添える。こうした色素体分化機構の解明は、植物科学における重要課題の一つである。例えば暗所で発芽した被子植物の子葉は淡黄色で光合成活性をもたないが、光が当たると12時間以内に緑化し、光合成活性を獲得する。この現象は、暗所で発達する色素体であるエチオプラストが、光によって急速に葉緑体へと分化することで可能となる。葉緑体の分化はチラコイド膜の形成や光合成遺伝子の大規模な発現変動を含むダイナミックな過程である。

色素体には独自のゲノム DNA が存在する。色素体 DNA は多数のタンパク質とともに「核様体」とよばれる複合体を形成し、膜にアンカーされている。葉緑体分化の過程ではチラコイド膜の発達と同時に、核様体の構造も大きく変化する (Sakai et al., 2004; 図1)。また、この過程において色素体における光合成遺伝子の発現が上昇することから、チラコイド膜と核様体の相互作用が葉緑体分化において重要な機能を有しているのではないかと考えられてきた (Krupinska et al., 2013)。しかしながら、チラコイド膜上における核様体の構造の変化を司る分子機構や、チラコイド膜が色素体の遺伝子発現に影響を与えるメカニズムについては未解明の点が多く残されていた。申請者らは、シロイヌナズナにおいて色素体膜脂質の合成が核様体の構造変化や色素体ゲノムにコードされた遺伝子の発現に必要であることを見出していたことから (Kobayashi et al., 2013, 2015; Fujii et al., 2014, 2019)、チラコイド膜の形成過程における色素体遺伝子の発現に関わるタンパク質や核様体膜アンカー因子の機能を解析することで、葉緑体分化の制御機構に関する新奇な知見を得ることができると考えた。



2. 研究の目的

本研究では、葉緑体分化の過程においてチラコイド膜上で核様体が構造が変化する仕組みと、色素体遺伝子の発現が制御されるメカニズムを解き明かすことを目指した。この目的を達成するため、以下の3つの視点から研究を行った。

- ①色素体の遺伝子発現について、転写レベルをゲノムワイドに検出する手法の確立
- ②葉緑体分化時の色素体遺伝子の発現誘導におけるチラコイド膜の役割の探索
- ③葉緑体分化時における核様体の構造を制御する因子の同定とその機能解析

3. 研究の方法

以下の内容についてモデル植物シロイヌナズナを用いた実験を行った。

- ① 色素体の遺伝子発現パターンを網羅的に検出するため、葉緑体 RNA ポリメラーゼの1つである PEP (Plastid-encoded RNA polymerase) のクロマチン免疫沈降を行った。RNA ポリメラーゼに結合した DNA を精製したのち、全ゲノムシーケンスを行うことで転写活性の高いゲノム領域を検出した。この手法 (ptChIP-seq 法) の妥当性を検証するために、野生株と RNA ポリメラーゼと DNA の結合に必要なシグマ因子 SIG2 と SIG6 の欠損変異体において行った。
- ② 色素体の遺伝子発現におけるチラコイド膜の役割を明らかにするため、チラコイド膜の形成を抑制したときの色素体の mRNA 量とタンパク質量を解析した。チラコイド膜を構

成する膜脂質のうち、大部分はガラクト脂質の MGDG と DGDG であるため、MGDG 合成酵素の発現が抑制された *amiR-MGD1* 形質転換体と DGDG 合成酵素を欠損した *dgd1-1* 変異体を用いた。さらに、存在量は微小であるがチラコイド膜の発達に不可欠なリン脂質 PG の合成系を欠く変異体 *pgp1-2* についても解析した。膜脂質の特異的な役割を明らかにするため、葉緑体の発達に必要なクロロフィル合成系が抑制された変異体 *chlh*, *chlm*, *chl27* についても解析し、膜脂質変異体との比較を行った。

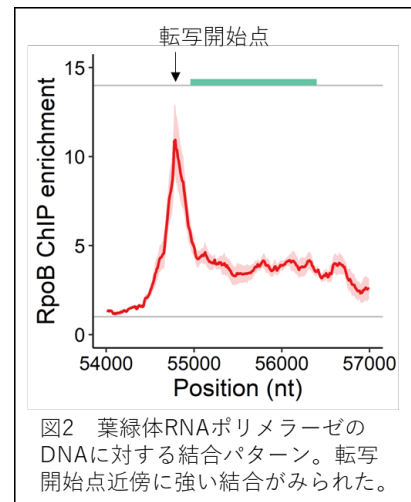
③ 色素体核様体の構造にはチラコイド膜の形成が重要であるという仮説のもと、核様体をチラコイド膜にアンカーするタンパク質 MFP1 の機能解析を行った。MFP1 タンパク質を欠損する *mfp1* 変異体について、核様体の構造を共焦点レーザー顕微鏡で解析するとともに、遺伝子発現への影響について①で構築した葉緑体クロマチン免疫沈降-シーケンス法を用いた分析を行った。

4. 研究成果

①色素体遺伝子発現のゲノムワイドなパターンの解析手法 (ptChIP-seq 法) ¹⁾

複数の条件検討を通して、色素体 RNA ポリメラーゼの 1 つである PEP の DNA に対する結合パターンを高感度に検出するためには、植物試料を 4% のホルムアルデヒドで 4 時間処理し、DNA と RNA ポリメラーゼを架橋することが最適であることを見出した。この方法によって、色素体の RNA ポリメラーゼは転写開始点近傍に特に強く結合することが明らかとなった (図 2)。さらに、tRNA や rRNA をコードする領域に RNA ポリメラーゼが強く結合しており、タンパク質をコードする領域に対する RNA ポリメラーゼの結合はごく一部の光合成関連遺伝子の領域を除いて比較的弱いことが分かった。

葉緑体では、特定の配列をもつ DNA 領域に RNA ポリメラーゼを呼び込み、転写を促進するタンパク質であるシグマ因子 (SIG) が複数機能する。このシグマ因子のうち、SIG2 と SIG6 欠損した植物において、ptChIP-seq 解析を行ったところ、特定の遺伝子領域で DNA に対する RNA ポリメラーゼの結合が著しく低下していたことから、この手法は生体内の RNA ポリメラーゼの挙動を正確に検出できると考えられる。興味深いことに、SIG6 欠損変異体では特定の tRNA 遺伝子領域において RNA ポリメラーゼの結合量が顕著に低下していた。これまで SIG6 は主に光合成遺伝子の転写誘導を行うと考えられてきたが、本研究の結果は SIG6 の主たる役割が tRNA の転写誘導である可能性を示している。



②色素体遺伝子発現におけるチラコイド膜の役割 ^{2),3)}

色素体ゲノムにコードされた光合成遺伝子の転写や翻訳は、葉緑体が発達するときに活性化される。チラコイド膜脂質のうち、ガラクト脂質 MGDG と DGDG の合成を抑制した場合、葉緑体発達過程における光合成遺伝子の mRNA とタンパク質の蓄積が抑制されることが分かった。とくに、タンパク質の蓄積の抑制は mRNA レベルの抑制よりも葉緑体分化の早い段階で生じていたことから (図 3)、ガラクト脂質は葉緑体における転写と翻訳のそれぞれの段階に必要とされていると考えられる。葉緑体リン脂質である PG の合成を抑制

した場合にも、色素体遺伝子の mRNA 量が抑制されており、なかでも PEP によって転写される遺伝子の発現が特異的に影響を受けていることが分かった。また、PG 欠損変異体の遺伝子発現パターンが SIG6 欠損変異体と類似していたことから、PG は葉緑体 RNA ポリメラーゼのうち PEP の機能と深く関連していることが示唆された。なお、脂質合成変異体と同様に葉緑体分化が抑制されるクロロフィル合成変異体では、色素体遺伝子の発現があまり抑制されなかった。この結果は、色素体遺伝子発現には色素体における脂質合成が必要であることを示している。チラコイド膜脂質の合成は、核様体の構造を変化させることが知られているため (Kobayashi et al., 2013, 2015), 核様体内での DNA 構造やタンパク質間相互作用が膜脂質によって制御されており、その結果として色素体遺伝子発現にも影響を与えるのかもしれない。実際に、脂質合成変異体では、色素体の RNA ポリメラーゼや転写因子の発現量は大きく抑制されておらず、核様体をチラコイド膜にアンカーするタンパク質 MFP1 の発現レベルが特異的に低下していた。この結果は、上記の仮説を支持するものであると考えられる。

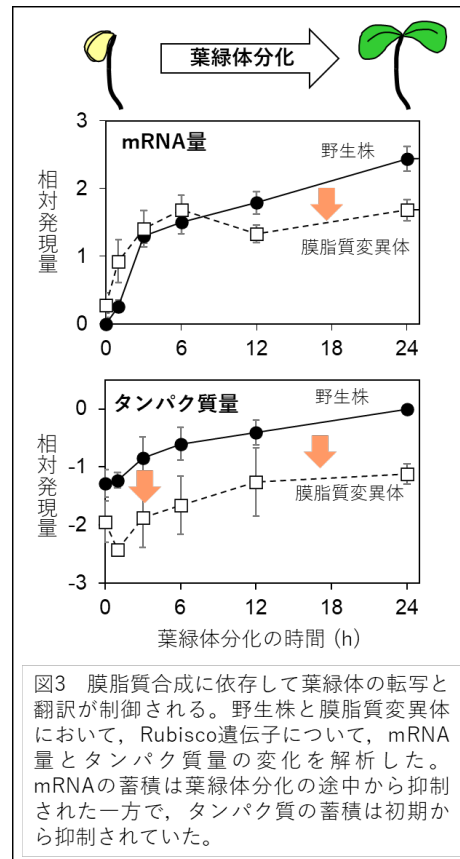


図3 膜脂質合成に依存して葉緑体の転写と翻訳が制御される。野生株と膜脂質変異体において、Rubisco遺伝子について、mRNA量とタンパク質量の変化を解析した。mRNAの蓄積は葉緑体分化の途中から抑制された一方で、タンパク質の蓄積は初期から抑制されていた。

③葉緑体分化過程において核様体の構造を制御する因子

色素体の核様体は、葉緑体が分化する過程で包膜からチラコイド膜へと移動・分散する。葉緑体分化過程における核様体の構造制御には、チラコイド膜上に局在する DNA 結合タンパク質が重要であると考え、そのような機能をもつ可能性が提唱されていた MFP1 タンパク質について解析した。MFP1 タンパク質を欠損する変異体では、葉緑体分化時の核様体の分散が抑制されたことから、このタンパク質が核様体の構造制御の鍵を握っていると考えられる。また、MFP1 欠損変異体では強光ストレスに応答した色素体の光合成関連遺伝子の発現誘導が抑制されることを突き止めた。ptChIP-seq 法を用いた解析から、RNA ポリメラーゼの DNA に対する結合に MFP1 が必要である可能性を見出している。

本研究の成果は、色素体核様体の構造と色素体遺伝子発現の制御におけるチラコイド膜の重要性を示している。特に、チラコイド膜上における MFP1 を中心とする核様体膜アンカーポイントが核様体の構造と機能の制御に関与しているという新しい知見を得ることができた。今後さらに研究を進めることで、葉緑体の機能制御における未解明のメカニズムを明らかにできると考えられる。さらに、色素体における特定の RNA ポリメラーゼの機能状態をゲノムワイドに検出できる ptChIP-seq 法を確立した。ptChIP-seq 法は、様々な条件の植物試料に対して適用可能であるため、今後の色素体機能制御の研究において広く活用され、研究分野の発展に寄与することが期待される。

- 1) Palomar et al., (2022) *Plant J.* **111**: 1139-1151.
- 2) Fujii et al., (2022) *J. Exp. Bot.* **73**: 2952-2970.
- 3) Fujii et al., (2024) *Plant Cell Physiol.*, in press.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Palomar V. Miguel, Fujii Sho, Rothi M. Hafiz, Jaksich Sarah, Coke Adriana N., Wang Joyful, Wierzbicki Andrzej T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Transcription-directed membrane association organizes the chloroplast nucleoid structure	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	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） 10.1101/2023.05.12.540520	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 該当する
1. 著者名 Yoshihara Akiko, Kobayashi Keiko, Nagata Noriko, Fujii Sho, Wada Hajime, Kobayashi Koichi	4. 巻 194
2. 論文標題 Anionic lipids facilitate membrane development and protochlorophyllide biosynthesis in etioplasts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1692 ~ 1704
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plphys/kiad604	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 Fujii Sho, Wada Hajime, Kobayashi Koichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Orchestration of Photosynthesis-Associated Gene Expression and Galactolipid Biosynthesis during Chloroplast Differentiation in Plants	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Plant And Cell Physiology	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） 10.1093/pcp/pcae049	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 Palomar V. Miguel, Jaksich Sarah, Fujii Sho, Kucinski Jan, Wierzbicki Andrzej T.	4. 巻 111
2. 論文標題 High resolution map of plastid encoded RNA polymerase binding patterns demonstrates a major role of transcription in chloroplast gene expression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 1139 ~ 1151
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tpj.15882	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 Fujii Sho, Kobayashi Koichi, Lin Ying-Chen, Liu Yu-chi, Nakamura Yuki, Wada Hajime	4. 巻 -
2. 論文標題 Impacts of phosphatidylglycerol on plastid gene expression and light induction of nuclear photosynthetic genes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	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) 10.1093/jxb/erac034	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22件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 黒滝悠志、藤井祥
2. 発表標題 色素体RNAポリメラーゼに結合するチラコイド膜局在タンパク質NIPが遺伝子発現に与える影響
3. 学会等名 日本植物学会第87回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野戸康生, 川島祐介, 石川将己, 西村芳樹, 藤井祥
2. 発表標題 葉緑体DNA結合タンパク質MFP1を中心とした核様体の膜アンカーポイント構造の解明
3. 学会等名 日本植物学会第87回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤井祥, 中村友輝, 和田元, 小林康一
2. 発表標題 膜脂質合成が引き起こす色素体の遺伝子発現変動
3. 学会等名 日本植物学会第87回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Akiko Yoshihara, Keiko Kobayashi, Noriko Nagata, Hajime Wada, Sho Fujii, Koichi Kobayashi
2. 発表標題 Roles of plastid phospholipid PG and sulfolipid SQDG in etioplast development and de-etiolation of Arabidopsis thaliana.
3. 学会等名 15th International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors in Photosynthetic Organisms (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sho Fujii, Hajime Wada, Koich Kobayashi
2. 発表標題 Galactolipid biosynthesis involves in GUN1-mediated regulation of photosynthesis-associated genes.
3. 学会等名 15th International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors in Photosynthetic Organisms (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Akiko Yoshihara, Keiko Kobayashi, Noriko Nagata, Hajime Wada, Sho Fujii, Koichi Kobayashi
2. 発表標題 lastid anionic lipids PG and SQDG are important for etioplast development and de-etiolation of Arabidopsis thaliana.
3. 学会等名 9th Asian-Oceanian Symposium on Plant Lipids (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤井祥, 野戸康生, 黒滝悠志, 小林康一, 永田典子, 中村友輝, 増田建, 和田元
2. 発表標題 葉緑体分化過程における光依存的な遺伝子発現とクロロフィル合成にはチラコイド膜脂質の合成が不可欠である
3. 学会等名 東北植物学会第13回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 黒滝悠志, 藤井祥
2. 発表標題 色素体の遺伝子発現制御におけるファージ型RNAポリメラーゼ結合タンパク質NIPの役割
3. 学会等名 東北植物学会第13回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野戸康生, 川島祐介, 石川将己, Miguel Palomar, Andrzej Wierzbicki, 西村芳樹, 藤井祥
2. 発表標題 葉緑体DNA結合タンパク質MFP1は遺伝子発現の制御タンパク質を膜上に集積する
3. 学会等名 東北植物学会第13回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sho Fujii
2. 発表標題 Plastid lipid biosynthesis facilitates light-responsive gene expression and chlorophyll biosynthesis during chloroplast biogenesis.
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 野戸康生, 小林康一, 川島祐介, 石川将己, 藤井祥
2. 発表標題 ホスファチジルグリセロールは葉緑体の遺伝子発現制御にどのように関与するのか
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 藤井 祥, V Miguel Palomar, Sarah Jaksich, Jan Kucinski, 黒滝 悠志, 野戸 康生, 鹿内 利治, 西村 芳樹, Andrzej T Weirzbicki
2. 発表標題 ptChIP-seq法による色素体RNAポリメラーゼPEPのゲノムワイドなDNA結合パターンの探索
3. 学会等名 第12回日本光合成学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井 祥, V Miguel Palomar O, Andrzej T Wierzbicki, 鹿内 利治, 西村 芳樹
2. 発表標題 色素体核様体の膜アンカー因子MFP1は核様体の表面積拡張と効率的な転写誘導に必要である
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井祥, 小林康一, 中村友輝, 和田元
2. 発表標題 葉緑体分化における膜脂質合成と光合成遺伝子発現の協調的な制御
3. 学会等名 第34回植物脂質シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井祥, 辻本侑生
2. 発表標題 八戸伝統野菜「糠塚きゅうり」の色変化メカニズム
3. 学会等名 東北植物学会第12回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野戸康生、藤井祥
2. 発表標題 葉緑体DNA結合タンパク質MFP1とチラコイド膜の相互作用の解析
3. 学会等名 東北植物学会第12回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野戸康生, 西村芳樹, 藤井祥
2. 発表標題 Exploratory research on interacting factors of MFP1, a DNA-binding protein in the thylakoid membrane.
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 藤井 祥, 秋田 佳恵, 大目 歩果, 梶川 瑞恵, 和田 元, 永田 典子, 小林 康一
2. 発表標題 Galactolipids contribute to balancing two differential structures of etioplast membranes
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 藤井祥, 鹿内利治, 西村芳樹
2. 発表標題 葉緑体分化時に核様体を広げる膜アンカー因子MFP1
3. 学会等名 第11回日本光合成学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井祥, 鹿内利治, 西村芳樹
2. 発表標題 葉緑体分化時の遺伝子発現を支える核様体の膜アンカー因子MFP1
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2021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 藤井祥, 鹿内利治, 西村芳樹
2. 発表標題 葉緑体分化時の核様体の分散にはMFP1による色素体DNAの膜アンカーが必要である
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------