

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370015

研究課題名（和文） 単細胞紅藻における細胞周期・核転写の光活性化機構

研究課題名（英文） Mechanism of light dependent activation of the cell cycle and the nuclear transcription in a unicellular red alga

研究代表者

田中 寛（TANAKA KAN）

東京工業大学・資源化学研究所・教授

研究者番号：60222113

研究成果の概要（和文）：

藻類に及ぼす光の効果について単細胞紅藻シズンを用いて解析した。細胞周期の開始期では、光合成系による光受容→MAPK カスケード→特定 CDK の活性化の順でシグナルが伝わり、オルガネラ DNA 合成が誘導されていた。また、葉緑体テトラピロールシグナルが、G1 サイクリンの分解阻害により核 DNA 合成を誘導する機構を解明した。核転写活性化でも光合成系が光受容に関わるが、そのシグナルは DNA の合成制御とは別経路で伝えられていた。

研究成果の概要（英文）：

Effects of light illumination on algal cells were analyzed using unicellular red alga, *Cyanidioschyzon merolae*. During the cell cycle initiation, light is perceived by the light reaction system, and the signal is transferred through MAPK cascade to result in specific CDK activation and organelle DNA replication. In addition, tetrapyrrole signal from the chloroplast was found to inhibit degradation of G1 cyclin, which activates the nuclear DNA replication. In case of light activation of the nuclear transcription, the light reaction is also suggested to be the receptor, but the signal transduction pathway is likely diverged from the early step.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2010年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2011年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、植物分子生物・生理学

キーワード：環境応答、細胞周期、転写制御

1. 研究開始当初の背景

植物は進化上、シアノバクテリアに近い光合成細菌が細胞内共生し、単細胞の藻類として誕生したと考えられている。現生の藻類の中でも、イタリアの温泉から単離された *Cyanidioschyzon merolae*（シズン）は構造的に最も植物の原型に近く、さらに日本国内のチーム（本研究代表者を含む）で決定され

た完全ゲノム配列により、極めてコンパクトなゲノムと最小の遺伝子構成が示された。従って、シズンは様々な植物細胞における複雑な現象を、単純化して理解するのに最適なモデル生物であると考えられた。真核細胞は太古の細胞共生により進化したと考えられているが、本研究代表者はこのシズン細胞の研究により、細胞共生の分子機構から真核細胞の基本構築を理解しようと考え、様々な研究

を進めてきた。本研究は、植物と光の関わりのうちでも基本的な、細胞増殖・細胞周期と光転写活性化について、シズンを用いてその基本的な分子機構を明らかにしようと考えたものである。

2. 研究の目的

シズン細胞を暗条件から明条件に移すと G1 期で静止していた細胞が S 期に入るが、この際にはまずオルガネラ DNA 複製 (ODR) がまず起こり、それに引き続いて G1/S 移行に対応する CDKA の活性化と核 DNA 複製 (NDR) が起こる。ODR を特異的薬剤 (ナリジキシン酸) で阻害すると、CDKA 活性化および NDR が阻害される。しかし、培地中に暗所でクロロフィル (テトラピロール) 合成中間体である Mg-Protoporphyrin IX (MgProto) を添加すると、ODR を介さず光非依存的に CDKA 活性化および NDR を誘導することができた。従って、光による NDR の活性化は直接でなく、光による ODR の活性化がテトラピロールシグナルを介して CDKA 活性化と NDR を誘導していることが判明した (小林ら PNAS2009)。このことは、光による ODR の開始が細胞周期の制御に最も重要であることを示している。そこで本研究では、まず光による ODR の活性化機構について解析を進め、光シグナルがオルガネラ DNA 複製、核における転写活性化を誘導する道筋の大枠を理解し、具体的因子の同定、および分子機構の解明を進める。他方、光の照射は DNA 複製のみならず、核における転写活性化をも誘導する。これまでのマイクロアレイを用いた解析の結果、核にコードされた遺伝子の約 10% が暗→明シフトから 30 分以内に一斉に活性化を受けることが判明している。本研究では、光による核遺伝子の転写活性化機構を解析し、上記 ODR との関連を考察することで、光と植物細胞の関わりの根本について明らかにしていく。

あらゆる植物細胞において、光が細胞の増殖や分化に決定的な役割を果たしていることには疑いの余地がない。しかし高等植物を見る限り、葉緑体における光捕集は必ずしも細胞増殖に必須でない (例えば根の生長)、特異的光レセプターの活性化は時に植物体全体の挙動 (光形態形成) を左右する。このように、どの道筋が根幹か枝葉かを判断するのは高等植物においては至難といえる。これは長い進化の間に、根幹的な細胞制御機構の上に様々なネットワークが積み上げられた結果に他ならない。最小のゲノムサイズと遺伝子重複を特徴とするシズンを用いて基本的な細胞制御構造を理解し、その上に複雑化したネットワークを重ね合わせることで、普遍的な植物と光との基盤関係を明らかにすることができるだろう。

3. 研究の方法

シズン細胞を用いたこれまでの解析により、光照射は暗所で G1 期に静止している細胞のオルガネラ DNA 複製 (ODR) を開始させるとともに、核ゲノム全遺伝子の 10% 程度の転写を短時間で活性化することが判明している。様々な細胞内プロセスに対する阻害剤のスクリーニングにより、これまでに ODR 開始が DCMU や DBMIB のような葉緑体電子伝達系阻害剤、CDK 阻害剤ロスコビチン、MAPK カスケードの MAPKK 阻害剤、プロテアソーム阻害剤などで阻害され、対応するシグナル伝達因子の関与が示唆された。これら因子の関与を調べる上で、シズンでは候補となる因子が非常に少ないことから、絞り込んだ因子に対する網羅的な解析を中心にシグナル伝達経路を明らかにしていく。また光による転写活性化については、光電子伝達系が ODR 活性化と同様にセンサーとして関わるものの、下流のシグナル伝達に MAPK や CDK は関わらない。高等植物では光転写活性化に COP9 シグナルソーム (CNS) が関与するが、CNS はシズンにも存在する。シズンにおいて CNS の光転写活性化との関与を調べるため、CNS 因子の遺伝子破壊により光転写活性化への影響を調べる。また、光活性化される遺伝子の調節領域のヒストン修飾の状態を調べ、転写活性との関係を明らかにすることで分子機構に迫る。

4. 研究成果

(1) 光による細胞周期開始機構

① 光受容から ODR 開始まで

ゲノム配列決定の結果、シズンには植物にみられるフィトクロム、フォトロボリン型の光受容体。また、典型的なクリプトクロムも存在しないことが明らかとなっている。また、光合成電子伝達系の阻害剤である DCMU、DBMIB により DNA 合成の開始が完全に阻害される。従って、最初の光受容は光合成明反応系自体であることが強く示唆される。ここで葉緑体から発されたシグナルは、その下流に細胞質の MAPK カスケード、特異的 CDK の活性化に引き継がれるが、葉緑体が本来は別生物に由来することを考えれば、細胞膜外のシグナルを膜コンポーネント→MAPK カスケード→CDK につなぐ、典型的な真核型情報伝達系の一種であることができた。

3 段階のコンポーネントからなる MAPK カスケードについて、シズンでは 7 種の MAPKKK、1 種の MAPKK、3 種の MAPK がゲノム配列から同定される。この MAPKK を阻害剤で阻害することで ODR の開始が阻害されるため、何れかのリン酸化カスケードがシグナル伝達に必須であることが判る。3

種の MAPK のうち、どのキナーゼが ODR 開始に関わるかを調べるため、本研究ではまず光照射により ODR が開始される過程について、これら MAPK の発現について検討した。特異的抗体を用いた解析の結果、MAPK1 が恒常的に発現しているのに対し、MAPK2、MAPK3 は ODR の開始期と一致して一過的な増加が観察された。従って、MAPK2 もしくは MAPK3 の関与が示唆された。さらに、3 種の MAPK 遺伝子について遺伝子破壊実験を行なった結果、MAPK1 と MAPK2 が欠損可能な遺伝子であることが判明した。ODR は細胞の生存に必須な機能と考えられることから、MAPK3 を ODR 開始に関わるキナーゼであると想定できた。

MAPK カスケードは ODR 開始に必要なものであるが、その十分性を調べるために MAPK の活性化を起こす薬剤であるアノソマイシンを暗所で添加し、ODR が起こるかどうかを調べた。しかし、ODR が誘導されなかったことから、MAPK の活性化だけでは ODR 開始に不十分である。この条件での ODR を起こせないか検討を更に進めた結果、培地中にヘムを添加することで部分的に ODR を誘導することができることを発見した。緑色植物では、ヘムは葉緑体で合成されるテトラピロール分子である。しかし我々は別の研究で、ヘム合成の最終段階に関与する酵素である Fe キラターゼが、シズンではミトコンドリアに局在すること。また、Fe キラターゼ活性がミトコンドリアに見いだされることを明らかにしている。従って、ODR の開始には、葉緑体から MAPK カスケードを経由するシグナル伝達と、ミトコンドリアで合成されるヘムの両方が必要であることが判明した。以前の研究で、ミトコンドリアの電子伝達系の阻害剤が ODR 開始を阻害することも見いだしており、この結果はミトコンドリアからのシグナル伝達が同時に ODR 上流で機能することを示す極めて重要な意味を持っている。

次に、MAPK の下流ではたらくと想定される CDK 複合体について検討した。ゲノム情報により、シズンは 3 種の CDK、および 4 種のサイクリンタンパク質を持つことが想定される。これらタンパク質の発現について ODR 開始期に観察したところ、CDKB とサイクリン 4 の発現が ODR 開始と相関することが明らかとなった。また、CDKB 抗体を用いて CDKB 複合体を免疫沈降して活性測定系を構築した結果、実際に CDKB 活性が ODR 開始期に上昇していることが示された。従って、これらの結果は CDKB-サイクリン 4 複合体が ODR 開始に関わることを支持するものといえる。以上の解析により、葉緑体による光受容から CDK までの大筋のモデルが見えて来たものと考えられるが、i) 葉緑体から MAPKKK にどのようにシグナル伝達が

なされるのか。ii) CDK の活性化がどのように ODR を誘導するのか。iii) ヘムの作用機作、などを今後解明していく必要がある。

② 葉緑体からの MgProto シグナルによる NDR 活性化機構

ODR が起こると、葉緑体から放出される MgProto の作用により NDR が活性化される (小林ら PNAS2009)。この MgProto の作用が、細胞内で特異的なタンパク質分解に関わるプロテアソームの阻害剤 (エボキソマイシン) の添加により模倣されることから、MgProto の作用は特定のタンパク質の分解を阻害することによると推定された。一方、植物ホルモンの一種であるオーキシンの作用は、特定のユビキチンリガーゼの F ボックスタンパク質に結合し、特異的なユビキチン化とプロテアソームによる分解を阻害することによることが解明されていた。この分子機構と MgProto の作用機作との関連性を調べるため、シズンのもつ 4 種の F ボックスタンパク質 (Fbx1-4) を大腸菌で過剰発現して精製し、MgProto との結合性について検討した。その結果、4 種のうち Fbx3 が MgProto と特異的に結合することが明らかになった。さらに Fbx3 は、NDR の活性化に関わるサイクリン 1 と特異的に結合すること。サイクリン 1 タンパク質が細胞内でポリユビキチン化されること。試験管内で、MgProto の添加により Fbx3 とサイクリン 1 の結合が解消すること等が示されたことから、以下の作業モデルを示すことに成功した：

暗所など、細胞内の MgProto が低い状態では Fbx3 タンパク質がサイクリン 1 を認識し、ユビキチン化している。これにより、サイクリン 1 は速やかにプロテアソームによる分解を受けている。ODR 後、未知の機構により MgProto が葉緑体から細胞質へと放出される。この MgProto は Fbx3 と結合して Fbx3 の構造変化を誘起し、サイクリン 1 の認識を阻害。ユビキチン化を阻害されたサイクリン 1 は安定化し、CDKA と結合することで CDKA を活性化、NDR を誘導することとなる。

このモデルはさらに、Fbx3 の欠損株を取得することにより検証された。Fbx3 を欠くシズンでは、ナリジキシ酸のような ODR 阻害剤の存在下でも、ODR を経ずに NDR が起きることが実験的に示された。今回発見した分子機構は、葉緑体の成立後、暗所で葉緑体が不活性な状態で、核が独自に複製することを防ぐ分子機構であり、細胞共生と植物細胞の成立に重要な役割を果たすものであった可能性が高い (小林ら Nature Cell Biol. 2011)。

(2) 光による細胞周期開始機構

暗所の細胞に光を照射すると、大多数の核遺伝子の活性化が起こる。このようなゲノムワイドな制御の分子機構を探るため、植物での光応答に関わる **DET1** 遺伝子のシゾンホモログについて遺伝子破壊株を取得した。野生型と比較して、暗所における葉緑体 mRNA 群の増加が観察されたが、現在までに定性的に明暗で恒常的に発現する遺伝子は見出されず、更なる解析が必要な状況にある。一方、明暗条件と相関して増減するヒストン修飾について検索を行った。まずシゾンからのヒストンタンパク質の抽出条件を検討したのち、入手可能な修飾ヒストン特異的モノクローナル抗体を用いたウェスタン解析を行なった。その結果、試みた抗体のうち、ヒストン **H3** では **K9** アセチル化、**K9** アセチル化 + **S10** リン酸化、**K9** トリメチル化、**K9** ジメチル化、**K27** トリメチル化、**K9** アセチル化 + **K14** アセチル化、ヒストン **H4** では **K20** ジメチル化について検出することができ、これら修飾の存在が示唆された。特に、**H3K9** 部位のアセチル化が暗シフトで増加することを見出した。さらに解析を進めた結果、この修飾は暗条件ではなく、暗条件で誘導される分裂期に蓄積していることが明らかとなった。現在、この修飾による転写活性化等につき解析を進めている。

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 27 件)

- ① Yu Kanesaki, Sousuke Imamura, Ayumi Minoda and Kan Tanaka. External light condition and cell cycle phases coordinate accumulation of chloroplast and mitochondrial transcripts in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *DNA Res.*, 査読有, 2012. (published online)
- ② Mio Ohnuma, Tsuneyoshi Kuroiwa and Kan Tanaka. Optimization of cryopreservation conditions for the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 査読有, 57, 2011, pp. 137-143.
- ③ Satoru Watanabe, Mio Ohnuma, Jun Sato, Hirofumi Yoshikawa and Kan Tanaka. Utility of a GFP reporter system in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 査読有, 57, 2011, pp. 69-72.
- ④ Yuki Kobayashi, Sousuke Imamura, Mitsumasa Hanaoka and Kan Tanaka. A tetrapyrrole-regulated ubiquitin ligase controls algal nuclear DNA replication. *Nature Cell Biol.*, 査読有, 13, 2011, pp. 483-487.

- ⑤ Ayumi Minoda, Andreas Weber, Kan Tanaka and Shin-ya Miyagishima. Nucleus-independent control of the Rubisco operon by the plastid-encoded transcription factor Ycf30 in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Plant Physiol.*, 査読有, 154, 2010, pp. 1532-1540.
- ⑥ Sousuke Imamura, Masaru Terashita, Mio Ohnuma, Shinichiro Maruyama, Ayumi Minoda, Andreas Weber, Takayuki Inouye, Yasuhiko Sekine, Yuichi Fujita, Tatsuo Omata and Kan Tanaka. Nitrate assimilatory genes and their transcriptional regulation in a unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*: Genetic evidence for nitrite reduction by a sulfite reductase-like enzyme. *Plant Cell Physiol.*, 査読有, 51, 2010, pp. 707-717.
- ⑦ Takashi Osanai, Masahiko Imashimizu, Asako Seki, Shusei Sato, Satoshi Tabata, Sousuke Imamura, Munehiko Asayama, Masahiko Ikeuchi and Kan Tanaka. ChlH, the H subunit of Mg-chelatase, is an anti-sigma factor for SigE in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, 106, 2009, pp. 6860-6865.
- ⑧ Sousuke Imamura, Yu Kanesaki, Mio Ohnuma, Takayuki Inouye, Yasuhiko Sekine, Takayuki Fujiwara, Tsuneyoshi Kuroiwa and Kan Tanaka. R2R3-type MYB transcription factor, CmMYB1, is a central nitrogen regulator in *Cyanidioschyzon merolae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, 106, 2009, pp. 12548-12553.

他

[学会発表] (計 32 件)

- ① Kan Tanaka. Involvement of chloroplast and mitochondrion in algal cell cycle initiation. 日本分子生物学会ワークショップ. 2011. 12. 15, パシフィコ横浜.
- ② Kan Tanaka. Plant Cell Cycle Control by Plastid-Derived Signal. Gordon Research Conference, Mitochondria and Chloroplast. 2010. 7. 12, Lucca, Italy.
- ③ 田中 寛. オルガネラと細胞共生のモデル真核微生物—シズン—. 日本農芸化学会シンポジウム. 2010. 3. 30, 東京大学.
- ④ Kan Tanaka. Organelle-derived signal regulates plant cell cycles. Germany-Japan Binational Seminar (DFG-JSPS), 2009. 6. 5, 筑波ホテル.

他

[図書] (計 2 件)

① Kan Tanaka. Chloroplast transcriptional machinery of red alga: Conservation of four types of transcriptional regulators in non-green chloroplasts. In *Porphyra yezoensis*. Ed. Koji Mikami. Nova Science Publishers. 2012, pp. 39-59.

② Mitsumasa Hanaoka and Kan Tanaka. Coordination of nuclear and plastid gene expression in red and green plants. In *Red Algae in Genomic Age, Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology* 13. Eds. Joseph Seckbach, David J. Chapman and Andreas Weber. Springer Science. 2010, pp. 171-190.

[その他]

紹介記事 (ホームページ)

① 論文④に関して、

小林勇氣・田中 寛. 葉緑体に由来するテトラピロールシグナルはサイクリンのポリユビキチン化を阻害することで核における DNA 複製を開始させる. *ライフサイエンス新着論文レビュー*

(<http://first.lifesciencedb.jp/archives/2501>).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 寛 (TANAKA KAN)

東京工業大学・資源化学研究所・教授

研究者番号 : 60222113