

機関番号：12501

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770034

研究課題名 (和文) クロマチン免疫沈降法を利用した葉緑体転写制御機構の解析

研究課題名 (英文) Chromatin immunoprecipitation-based analysis of transcriptional regulation in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts

研究代表者

華岡 光正 (HANAOKA MITSUMASA)

千葉大学・大学院園芸学研究科・特任准教授

研究者番号：30508122

研究成果の概要 (和文)：本研究では、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法を植物の葉緑体研究に導入・確立することで、葉緑体転写制御を *in vivo* でリアルタイムにモニターできる解析系の開発と利用を目指した。シロイヌナズナの葉緑体シグマ因子の機能分担について解析を行った結果、生育に必須な SIG1 の標的遺伝子が発見されたとともに、ストレスに応答する SIG5 の新しいターゲットも見いだされ、環境変化に応じてシグマ因子を使い分けている仕組みをより詳細に明らかにすることができた。

研究成果の概要 (英文)：In this study, to further clarify transcriptional regulation in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts, Chromatin immunoprecipitation (ChIP)-based method has been established. Novel target promoters for SIG1, an essential sigma factor in *A. thaliana*, as well as those for SIG5, a multiple stress-induced chloroplast sigma factor were identified respectively. These results suggest that ChIP analysis is useful to understand transcriptional regulation of chloroplast genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：植物分子生物学

科研費の分科・細目：(分科) 基礎生物学 (細目) 植物分子生物・生理学

キーワード：葉緑体、転写制御、ChIP、環境応答、シロイヌナズナ、色素体分化、シグマ因子

1. 研究開始当初の背景

葉緑体は植物細胞に特有のオルガネラであるが、そこには光合成など多くの重要な代謝経路が局在しており、植物の独立栄養性や

生産力を支えている。葉緑体の構造や機能は植物体の組織や器官の分化に応じてダイナミックに変化する。また、光などの環境変化に迅速に応答することで光合成など各葉緑

体機能の活性が効率的に調節されている。これら諸過程においては、それぞれの葉緑体機能に関わる遺伝子の発現調節が特に重要な役割を果たす。これまでに、葉緑体遺伝子の発現制御、特に転写段階における調節機構については国内外で活発に研究が進められてきたが、変異株解析を中心とした分子遺伝学的手法や、*in vitro*系などの生化学的手法をベースとした従来のアプローチのみではその全体像の理解に限界があることが示されており、新たな方法論の開発、確立が必要とされていた。

2. 研究の目的

本研究では、酵母や動物において最近の転写制御研究を大きく進展させたクロマチン免疫沈降法 (ChIP 法) を植物の葉緑体研究に導入・展開し、葉緑体の分化や環境応答に際した各種転写制御因子の *in vivo* での挙動を直接モニターすることで、真の葉緑体転写制御系の全体像を改めて捉え直し、これまではっきりと見えてこなかった新しい転写制御モデルを世界に先駆けて提唱することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナの葉緑体転写制御機構を理解するための ChIP 解析系の導入、確立を行った。

(2) 実際に立ち上げた ChIP 解析系を利用して、環境変化に際した葉緑体シグマ因子の機能分担を解析し、*in vivo* での葉緑体転写制御の実体について検討を行った。

(3) シロイヌナズナ以外の植物における ChIP 解析系の導入を図るため、タバコ BY-2 細胞を用いた色素体分化の解析を進めた。

(4) ChIP 解析系の汎用性をさらに高めるため、技術的に先行しているシアノバクテリアや単細胞紅藻における ChIP 解析系の改良と、ゲノムワイド解析への応用を試みた。

4. 研究成果

(1) これまでシロイヌナズナの葉緑体転写制御研究に ChIP 法を利用した例がないため、解析系の立ち上げを集中的に進めた。具体的には、①DNA-タンパク質複合体の固定、②細胞全抽出物の調製、③特異抗体を用いた免疫沈降、④熱処理による複合体の解離、⑤DNA精製と qPCR 法による定量、の各段階で実験条件の検討と最適化を行った。モデル系として、既に抗体が準備済みであり、かつターゲット

のプロモーター (*psbA*, *psbD* BLRP) が明らかにされている SIG5 による転写制御を中心に解析を進めた。その結果、既に SIG5 のターゲットとして確認されていた *psbA* や *psbD* BLRP に加え、新たに *psaAB* や *psbBT* プロモーター領域にも SIG5 が特異的に結合していることを明らかにした。この結果は、SIG5 が特にストレス条件下で PSI、PSII 両光化学系複合体の反応中心タンパク質の発現に関与していることを示唆しており、また、ChIP 解析を行うことで初めて発見されたという点で、解析系の高い有効性も示された。

(2) ChIP 法を用いる最大の利点の一つは、欠損株が得られないような必須転写因子のターゲットやその環境応答などにおける役割を *in vivo* で直接的に示すことができることである。葉緑体で機能する転写因子のうち、例えばシグマ因子 SIG1 はシロイヌナズナでは生育に必須でありこれまでその機能解析が難航してきた。そこで、ChIP 法により SIG1 の役割を明らかにすることを試みた。その結果、イネで SIG1 の標的として報告されている *psaAB* プロモーターなどへの特異的な結合が確認された上に、*c1pP* などこれまで情報のない新たなプロモーターへの結合も検出することができた。以上の結果は、SIG1 が植物の生育においてどのような役割を果たしているかを知る上で重要な手がかりとなるものであり、この点からも ChIP 法が葉緑体の転写制御研究において有用であることが示された。

(3) 植物の様々な生理応答に関わる遺伝子発現制御の研究に ChIP 法を幅広く導入・展開することを目指し、非光合成色素体分化に関する研究を進めた。既にタバコ BY-2 細胞で示されている知見をもとに、シロイヌナズナ T87 細胞においても培地中に添加する植物ホルモンを置換することで、原色素体からアミロプラストへの分化誘導系の構築に成功した。また、これら培養細胞系におけるアミロプラスト分化には色素体の転写・翻訳活性が必要であること、またその制御に何らかのプラストシグナル伝達系が関与する可能性が示された。このような色素体分化における転写制御機構の理解においても今後 ChIP 法を利用した解析系が有効であると期待される。

(4) 高等植物の葉緑体で ChIP 解析系を安定に運用するためには、免疫沈降や定量 PCR 解析等の条件をさらに最適化する必要があると考えられる。また、将来的にゲノムワイドな転写制御パターンの解析を展開するために、ChIP-chip 解析や ChIP-seq 解析を使用できるプラットフォームを確立する必要がある。こ

のため、すでに技術的に先行しているシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 や単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* の ChIP 解析系をさらに改良し、より簡便で再現性の高い実験系の構築を行った。また、シアノバクテリアの強光ストレス応答をモデルに ChIP-chip 解析を行い、指標としている転写因子 RpaB の広範なターゲットプロモーターへの結合を確認することができた。これらの結果より、ChIP 解析系を利用した植物葉緑体転写制御の研究を今後さらに展開していく上で、一定の基盤技術の確立が達成できたと考えられた。

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 5 件)

- ①. Yuki Kobayashi, Sousuke Imamura, Mitsumasa Hanaoka and Kan Tanaka (2011) A tetrapyrrole-regulated ubiquitin ligase controls algal nuclear DNA replication. *Nature Cell Biology*, **13** (4), 483-487. (査読あり)
- ②. Mitsumasa Hanaoka, Takayuki Kawakami and Kan Tanaka (2010) Chloroplast isolation and run-on transcription assay in *Cyanidioschyzon merolae*. *Journal of Endocytobiosis and Cell Research*, **20**, 45-52. (査読あり)
- ③. Yuki Kobayashi, Mio Ohnuma, Tsuneyoshi Kuroiwa, Kan Tanaka and Mitsumasa Hanaoka (2010) The basics of cultivation and molecular genetic analysis of the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Journal of Endocytobiosis and Cell Research*, **20**, 53-61. (査読あり)
- ④. Yu Kanesaki, Yuki Kobayashi, Mitsumasa Hanaoka and Kan Tanaka (2009) Mg-protoporphyrin IX Signaling in *Cyanidioschyzon merolae*: Multiple pathways may involve the retrograde signaling in plant cells. *Plant Signaling and Behavior*, **4** (12), 1190-1192. (査読あり)
- ⑤. 今村壮輔、華岡光正、田中寛 (2009) 植物で明らかにされたリボソーム RNA 合成酵素の進化の道筋-植物特異的な TFIIB 型基本転写因子 pBrp の機能解

析- 化学と生物、Vol.47, No.11, pp. 740-742. (査読なし)

[学会発表] (計 31 件)

- ①. 華岡光正、岩崎秀雄、高井直樹、近藤孝男、田中寛「ChIP on chip 法を利用したシアノバクテリア強光応答転写制御の解析」日本農芸化学会 2011 年度大会、京都女子大学、2011 年 3 月 26 日
- ②. 本橋典子、江波和彦、小沢友希、中邨真之、田中寛、華岡光正「タバコ BY-2 細胞におけるアミロプラスト分化制御メカニズムの解析」第 52 回日本植物生理学会年会、東北大学、2011 年 3 月 22 日
- ③. 佐藤大地、田中寛、華岡光正「単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* における葉緑体ヒスチジンキナーゼの機能解析」第 52 回日本植物生理学会年会、東北大学、2011 年 3 月 22 日
- ④. 加藤麻衣子、石井健雄、東美由紀、田中寛、華岡光正「クロマチン免疫沈降法によるシロイヌナズナ葉緑体シグマ因子の機能解析」第 52 回日本植物生理学会年会、東北大学、2011 年 3 月 20 日
- ⑤. 江波和彦、小沢友希、木山貴史、田中寛、華岡光正「シロイヌナズナ細胞で誘導される色素体分化に伴った核遺伝子発現の制御機構」第 52 回日本植物生理学会年会、東北大学、2011 年 3 月 20 日
- ⑥. Mitsumasa Hanaoka Maiko Kato, Miyuki Azuma and Kan Tanaka “Chromatin immunoprecipitation-based Analysis of Transcriptional Regulation in *Arabidopsis thaliana* Chloroplasts.” BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会)、神戸国際会議場、2010 年 12 月 8 日
- ⑦. 華岡光正、本橋典子、小沢友希、田中寛「タバコ培養細胞 BY-2 におけるアミロプラスト分化に際した遺伝子発現制御系の解析」日本農芸化学会関東支部 2010 年度大会、千葉大学、2010 年 10 月 9 日
- ⑧. 田中寛、華岡光正 (招待講演)「光合成機能を守るコア制御ネットワーク」日本農芸化学会関東支部 2010 年度大会、千葉大学、2010 年 10 月 9 日
- ⑨. 華岡光正、加藤麻衣子、東美由紀、田中

- 寛「ChIP法を用いたシロイヌナズナ葉緑体シグマ因子の機能解析」第74回日本植物学会大会、中部大学、2010年9月10日
- ⑩. 廣岡俊亮、華岡光正、田中寛「シロイヌナズナ葉緑体シグマ因子SIG6の機能解析」第74回日本植物学会大会、中部大学、2010年9月10日
- ⑪. Mitsumasa Hanaoka, Takayuki Kawakami, Daichi Satoh, Sousuke Imamura and Kan Tanaka “The role of two-component system for light-dependent transcriptional regulation in *Cyanidioschyzon merolae* chloroplasts.” The 11th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, August 29, 2010, Tromsø, Norway.
- ⑫. 華岡光正、本橋典子、小沢友希、田中寛「アミロプラスト分化に際した色素体遺伝子発現の役割」日本農芸化学会2010年度大会、東京大学、2010年3月29日
- ⑬. 華岡光正、加藤麻衣子、東美由紀、田中寛「クロマチン免疫沈降法を利用したシロイヌナズナ葉緑体転写制御系の解析」第51回日本植物生理学会年会、熊本大学、2010年3月20日
- ⑭. 華岡光正、岩崎秀雄、近藤孝男、田中寛（招待講演）「ChIP法を用いたシアノバクテリア転写制御研究の新展開」かずさDNA研究所研究会「ラン藻の分子生物学2009」、かずさアーク、2009年12月5日
- ⑮. 華岡光正、本橋典子、小沢友希、田中寛「アミロプラスト分化に際した遺伝子発現制御」第73回日本植物学会大会、山形大学、2009年9月18日
- ⑯. Mitsumasa Hanaoka, Asako Seki, Yuki Akimoto and Kan Tanaka “RpaB-dependent transcriptional regulation during high light stress in cyanobacteria.” The 5th German-Japan Binational Seminar “From Photoreaction to Biomass: Phototrophs in Ecosystems and Biotechnology” June 4, 2009, Tsukuba, Japan.

〔図書〕（計1件）

- ①. Mitsumasa Hanaoka and Kan Tanaka (2010) Coordination of nuclear and plastid gene expression in red algae and green plants. In *Red Algae in the Genomic Age*, Joseph Seckbach and David Chapman (eds.), Springer, Berlin, Germany, pp. 171-190.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.h.chiba-u.jp/tenure/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

華岡 光正 (HANAOKA MITSUMASA)

千葉大学・大学院園芸学研究科・特任准教授

研究者番号：30508122

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし