

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24248061

研究課題名(和文)核・葉緑体制御ループによる葉緑体ゲノム機能の統御機構

研究課題名(英文)Regulatory mechanisms for the chloroplast genome functions through the nucleus-chloroplast signaling loops

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,500,000円

研究成果の概要(和文)：植物細胞の核と葉緑体が互いをコントロールする制御ループについて、両ゲノムの転写と複製に注目して研究を行った。原始紅藻シゾンを用いることで系を単純化し、葉緑体やミトコンドリアからのシグナル伝達がオルガネラ・核、両方のDNA合成に必須であることを示した。また、葉緑体ゲノム転写の大枠を核から決定するシグマ因子群の特異性を解明すると共に、逆に光が葉緑体を介して核ゲノム転写に作用する経路について検討した。

研究成果の概要(英文)：We have examined the regulatory loop in which the nucleus and the chloroplast of plant cells control each other, especially stressed in the genome transcription and replication. The experimental system was simplified by using the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*, and it was shown that signals derived from the chloroplast as well as the mitochondrion were essential for both of the organelle and nuclear DNA replications. We have also made clear specificities of nuclear-encoded chloroplast sigma factors, and studied the signaling pathway from light-activated chloroplast to the nuclear genome transcription.

研究分野：進化細胞生物学

キーワード：真核細胞 細胞核 葉緑体 シグマ因子 テトラピロール レトログレードシグナル シグナル伝達
シゾン

1. 研究開始当初の背景

植物の葉緑体は、シアノバクテリアの細胞内共生に由来するオルガネラである。細胞共生に入る以前のシアノバクテリアでは、生命活動に必要な遺伝情報の全ては自身のゲノムにコードされていたはずだが、現在の葉緑体ゲノムからは祖先シアノバクテリア由来の遺伝子の多くが失われ、また核ゲノムに移動することで、現在の葉緑体ゲノムにはごく少数の遺伝子しかコードされていない。大部分の葉緑体タンパク質が核コードであるため、これまでは核が葉緑体機能を一方的に支配していると考えられることが多かった。しかし、葉緑体の状況に応じて核コード葉緑体遺伝子の発現が調節されることから、葉緑体から核へのシグナル伝達（レトログレードシグナル伝達）が想定され、実際に植物を用いた遺伝学的解析によりシグナルの存在が示されている。しかし、テトラピロール分子や活性酸素種など、幾つかの独立したシグナル伝達系が明らかになっているものの、高等植物における細胞制御は極めて複雑であり、分子機構の実体が解明されるには至っていない。

2. 研究の目的

葉緑体の構築には、葉緑体遺伝子と、核ゲノムにコードされた葉緑体タンパク質遺伝子の機能の双方が必要であり、その正常な機能には核と葉緑体との緊密な連携が必要である。本研究では、極めて原始的で単純な細胞構造をもつ単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (シゾン) を材料とし、葉緑体の構築に関わる機能調節を核から葉緑体へ、葉緑体から核へのシグナル伝達をつないだ情報ループと考える。特に、葉緑体から発信されて、核ゲノムの複製や遺伝子発現に至るレトログレードな情報伝達。また逆に、核が葉緑体ゲノムの複製や遺伝子発現を調節する分子機構を解析し、共生以前の別個の生物が統合されてきた進化や、その動態を明らかにすることを目的とした。ここで得られた情報を基盤として、高等植物の複雑な細胞制御の中核の理解も目標として研究を進めた。

3. 研究の方法

本研究では核ゲノムと葉緑体ゲノムの転写調節（研究項目1）と複製調節（研究項目2）について、核から葉緑体へ、葉緑体から核へ発信されるシグナルとその伝達経路について解析を行う。(1) 核から葉緑体に向かう転写調節としては核コードのシグマ因子機能解析を中心に進め、葉緑体ゲノムにコードされる自律的な転写調節因子との相互作用にも注目する。(2) 葉緑体から核へ向かう転写調節としては、葉緑体における光受容とそこから核へのシグナル伝達に注目して解析を行う。(3) 葉緑体ゲノムの複製については、光シグナルの受容からゲノム複製に至るシ

グナル伝達系の解明に焦点をあてる。そして、(4) 核ゲノムの複製に至るシグナル伝達系を含め、3種ゲノムの複製調節に関する全体像を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 核による葉緑体ゲノム転写調節：
シゾン核ゲノムにはSIG1~4の4種シグマ因子がコードされ、これら遺伝子産物が葉緑体内に輸送されることで、葉緑体ゲノムにコードされたバクテリア型RNAポリメラーゼのプロモーター認識特異性を決定している。

4種シグマ因子遺伝子の発現について様々な環境条件で解析を行った(Kanesaki et al., 2013)。その結果、SIG2遺伝子の発現が最も光条件に応答しており、明所でのみSIG2タンパク質の蓄積が観察されることが判った。SIG2の過剰発現株、相補RNAの発現による発現抑制株を構築し、葉緑体遺伝子発現の変化を網羅的に解析した結果、SIG2が特異的に葉緑体コードのフィコビリゾーム（光捕集複合体）遺伝子の転写を活性化することを明らかにした(Fujii et al., 2013)。さらに酸化ストレス時に、SIG2タンパク質が速やかに分解されることで新規PBS遺伝子発現を停止すること。この分解にはシグマ因子の領域4のシステイン側鎖間におけるS-S結合が関与することを示した(Fujii et al., in prep.)。

一方、SIG4遺伝子産物が強光ストレス時に蓄積することを見いだした。そして、SIG4過剰発現株、発現抑制株を用いた葉緑体遺伝子発現解析、クロマチン免疫沈降(ChIP)解析により、SIG4が葉緑体 *psbA*, *ycf17* 遺伝子のプロモーターを直接に認識することを示した(Fujii et al., 2015)。*psbA* 遺伝子は光化学系IIの活性中心タンパクをコードしており、強光時に損傷した活性中心の修復に関わると考えられる。*Ycf17* は緑色植物LHCに類似した一回膜貫通型タンパク質であり、光化学系IIにおける過剰光エネルギーの散逸に関わると考えられる。本研究とは別の解析により、SIG1は葉緑体リボゾームRNA遺伝子の転写に特異性が高く、細胞の増殖サイクルと深く関係することが示唆されている(Imamura et al., unpublished)。また、SIG3は様々な環境変化でも一定量の蓄積が観察され、葉緑体ゲノム全体からの基盤的転写に対応する可能性が考えられる。以上のことから、4種シグマ因子による葉緑体ゲノム転写に関するアウトラインを本研究により描くことに成功した。

シグマ因子とは別に、シゾン葉緑体ゲノムには *Ycf27*~*30* の4種バクテリア型転写因子がコードされている。このうち *Ycf27* と *Ycf29* はそれぞれシアノバクテリア *RpaB*, *Rre1* に相当する保存された転写因子であり、シアノバクテリアにおける解析を併せ、異なる刺激に対応したストレス応答に対応することが

明らかになってきた。これまでのところ、シグマ因子との標的の重複は観察できていないが、時間的にはこれら転写因子が短時間、シグマ因子が中長期的な葉緑体転写応答に関わることが示唆された。

(2) 葉緑体による核ゲノム転写調節：

H₂O₂ の培地への添加で酸化ストレスを負荷すると、葉緑体 PBS 遺伝子発現が抑制されるが、これは核コードシグマ因子 SIG2 タンパク質量の低下によっていた。当初、葉緑体内の情報が核に伝わることによる SIG2 発現量の低下を想定して解析を行ったが、これは SIG2 タンパク質自身の Cys 残基に依存したレドックス制御によることが判明した (Fujii et al., in prep)。これは葉緑体における転写制御について、葉緑体内の情報が葉緑体外には出ず、葉緑体内で自律的に処理されて応答している例であり、高等植物と比較して原始的なシゾンでは葉緑体の自律性が高いことを示唆する結果と考えられる。

一方で、暗明シフトによる核ゲノム全般の転写活性化は、光合成明反応系の阻害剤である DCMU で阻害されず、DBMIB で阻害される。これは葉緑体内の情報が核に伝えられる明確な証拠といえるが、葉緑体側でシグナルを発信する因子の特定には至っていない。核内におけるシグナル受容因子としては、高等植物において暗形態形成に関わる COP1、DET1 遺伝子がシゾン核ゲノムに同定されている。本研究では現在までに、これら遺伝子の欠損株の取得に成功したので、核ゲノム転写への影響評価を今後進めていく。

(3) 葉緑体ゲノムの複製制御：

暗所で G1 期に同調したシゾン細胞を明所に移すと、短時間のうちに葉緑体とミトコンドリアのゲノム複製が開始する。この光照射による複製開始は DCMU でも DBMIB でも、光合成明反応の阻害剤により阻害されることから、この光の認識に葉緑体に関わることは確実である。また、ここから DNA 複製に至るシグナル伝達因子としては、MAPKK 阻害剤によりシグナルが遮断されることから MAP キナーゼカスケードの関与が示唆される。また、Anisomycin により MAP キナーゼを強制的に活性化し、さらにここにヘムを細胞外から与えることで、暗所でも葉緑体・ミトコンドリアゲノム複製を誘導できることを見いだした。これは葉緑体で検知された光シグナルが、葉緑体内から細胞質に伝えられ、再びオルガネラ内に伝えられてゲノム複製を引き起こす情報伝達ループの存在を示している。シゾンでは、ヘム合成の最終段階を触媒するヘムキラーゼ酵素はミトコンドリアに局在し (Watanabe et al., 2013)、ヘムはミトコンドリアでのみ合成される。従って、ミトコンドリアが正常に機能していることが細胞周期開始に必須となっている。合わせて考えれば、葉緑体とミトコンドリアの両方の生理状態をモニターする細胞周期チェックポイント

機能がここに働いていると考えることができるだろう (Kobayashi et al., unpublished)。

アブシジン酸 (ABA) は植物の重要なホルモンの一つであり、休眠やストレス耐性獲得において重要な役割を果たしている。この ABA の合成遺伝子がシゾンゲノムに見いだされることから、シゾンにおける ABA の機能解析を行った。ABA 検出系を確立し、様々なストレス条件に曝したシゾン培養を用いて検出を試みた結果、塩ストレスにより ABA 合成が誘導されることを発見した。また、培地中に ABA を添加することで、シゾン細胞の増殖が抑制されることも見いだした。シゾン細胞の培養は強酸性培地で行うため、酸に不安定な ABA 生理活性の検定は困難であったが、培地中に継続的に ABA を添加することで阻害効果を確定することができた。

ABA の増殖抑制効果の作用点を調べるために詳細な検討を行った結果、オルガネラゲノムの複製が阻害されることを確認した。従って、ABA の作用は葉緑体・ミトコンドリアから発するシグナル伝達に関わっている。関連のシグナル伝達への影響を調べる過程で、ABA による阻害作用が同時にヘムを培地中に添加することで打ち消されることを見いだした (Kobayashi et al., in prep)。従って、ABA の効果は細胞内のヘムシグナルのクエンチングによるものと考えられ、現在、その詳細な分子機構を解析中である。

ABA はストレス時に葉緑体で合成される分子であり、ここでは葉緑体の障害を細胞周期につなげるシグナルとして機能している。シゾンにおける細胞周期の開始はオルガネラゲノム複製に始まるが、この開始にはチェックポイント制御が関わっており、葉緑体明反応からのシグナル、およびミトコンドリアからのヘムシグナルがその進行に必要である。これらのシグナルが揃った上でも、葉緑体におけるストレス障害が起きた際には ABA が放出されることで、ミトコンドリアシグナルを阻害することで細胞周期の進行に割り込み、妨げることができる。このように、葉緑体とミトコンドリアの機能が何重にもチェックされた上でオルガネラゲノムの複製が開始される分子機構が明らかとなった。さらに、ここに関わるシグナル伝達系は細胞質にあることから、オルガネラだけでなく細胞質の機能の健全性もチェックした上で細胞周期の進行が許可されていると考えることができる。

(4) 核ゲノムの複製制御：

暗所で G1 期に同調した細胞では、オルガネラゲノムの複製を阻害すると核ゲノム複製も同時に阻害される。この分子機構の解析の結果、葉緑体からゲノム複製に伴って放出されるシグナル (Mg-protoporphyrin IX; MgP) が核 S 期開始のチェックポイント通過に必須であることが明らかになった

(Kobayashi et al., 2009)。MgP シグナルの非存在下では、S 期チェックポイントキナーゼである CDKA の活性化に必須の Cyclin1 が Fbx3 タンパク質を含むユビキチンリガーゼによりユビキチン化され、速やかに分解されている。Fbx3 タンパク質に MgP シグナルが結合すると、Cyclin1 のユビキチン化が阻害されることで Cyclin1 が安定化され、結果として CDKA が活性化されて核 S 期が開始される (Kobayashi et al., 2011)。

この分子機構では細胞周期において、葉緑体が核 S 期開始の引き金を引く意義を持っているが、進化の観点から見ると別の意味が見えてくる (Tanaka & Hanaoka, 2013)。光合成真核生物としての植物の起源は、シアノバクテリアが真核細胞内に共生した時点に求められる。細胞共生以前、宿主となった真核細胞は非光合成細胞であり、光とは深い関係を持たずに明暗を問わず生育していたはずである。ここにシアノバクテリアが共生したことにより、暗所では生育できない藻類が誕生した。葉緑体に関係なく、宿主となった真核細胞が暗所でも生育を続けられ、暗所の葉緑体は細胞内で増殖することができないので、初期の共生関係は解消せざるを得なかったであろう。暗所で宿主細胞周期を止める分子機構の進化が起きたことで、葉緑体との共生が安定に保持されたと考えると都合が良い。シゾンにおいて葉緑体と核のゲノム複製を共役させる因子として Fbx3 を同定したが、Fbx3 が他の因子とは独立性が高く、それだけで暗所での増殖を抑えていることは興味深い。暗所でも生育できる真核細胞を母体として、暗所での共生関係を維持するための進化が起きた結果、光に依存する藻類の性質が生じたと考えられる。

(5) その他

シゾン細胞への遺伝子導入効率の改善など、解析系の改善を進めた (Ohnuma et al., 2014)

シゾン核染色体、セントロメア領域の確定を行った (Kanesaki et al., 2015)

本研究では、葉緑体と核との転写・翻訳の調節について、特に光との関係に留意しつつ解析を行った。その結果、明らかになった分子機構から、細胞共生による進化の道筋の考察までが可能となってきた。進化的な考察と細胞生物学・分子生物学的な解析を往復することにより、今後は更に詳細な細胞制御の枠組みを明らかにできると考えている。

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 24 件)

Gaku Fujii, Sousuke Imamura, Atsuko Era, Shin-ya Miyagishima, Mitsumasa Hanaoka

and Kan Tanaka. The nuclear-encoded sigma factor SIG4 directly activates transcription of chloroplast *psbA* and *ycf17* genes in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 査読有, 2015. (published online)

Yu Kanesaki, Sousuke Imamura, Motomichi Matsuzaki and Kan Tanaka. Identification of centromere regions in chromosome of a unicellular red alga, *Cyanidioschyzon merolae*. *FEBS Lett.*, 査読有, 2015, **589**, 1219-1224.

Mio Ohnuma, Takashi Yokoyama, Takayuki Inouye, Yasuhiko Sekine, Tsuneyoshi Kuroiwa and Kan Tanaka. Optimization of polyethylene glycol (PEG)-mediated DNA introduction conditions for transient gene expression in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 査読有, 2014, **60**, 156-159.

Satoru Watanabe, Mitsumasa Hanaoka, Yusaku Ohba, Tomohiro Ono, Mio Ohnuma, Hirofumi Yoshikawa, Shigeru Taketani and Kan Tanaka. Mitochondrial localization of ferredoxin in a red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Plant Cell Physiol.*, 査読有, 2013, **54**, 1289-1295.

Takayuki Fujiwara, Kan Tanaka, Tsuneyoshi Kuroiwa and Tatsuya Hirano. Spatiotemporal dynamics of condensins I and II: Evolutionary insights from the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Mol. Biol. Cell*, 査読有, 2013, **24**, 2515-2527.

Gaku Fujii, Sousuke Imamura, Mitsumasa Hanaoka and Kan Tanaka. Nuclear-encoded chloroplast sigma factor SIG2 activates chloroplast-encoded phycobilisome genes in a red alga, *Cyanidioschyzon merolae*. *FEBS Lett.*, 査読有, 2013, **587**, 3354-3359.

Zeenat B. Noordally, Kenyu Ishii, Kelly A. Atkins, Sarah J. Wetherill, Jelena Kusakina, Eleanor J. Walton, Maiko Kato, Miyuki Azuma, Kan Tanaka, Mitsumasa Hanaoka and Antony N. Dodd. Circadian control of chloroplast transcription by a nuclear-encoded timing signal. *Science*, 査読有, 2013, **339**, 1316-1319.

Kan Tanaka and Mitsumasa Hanaoka. The early days of plastid retrograde signaling with respect to replication and transcription. *Front. Plant Physiol.*, 査読有, 2013, **3**, 301.

Mitsumasa Hanaoka, Maiko Kato, Misato Anna and Kan Tanaka. SIG1, a sigma factor for the chloroplast RNA polymerase, differently associates with multiple DNA regions in the chloroplast chromosomes *in vivo*. *Int. J. Mol. Sci.*, 査読有, 2012, **13**, 12182-12194.

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, **19**, 289-303. 他

〔学会発表〕(計 31 件)

Kan Tanaka, Ikki Kobayashi and Tomohiro Shimada. Roles of Conserved response regulator Rre1 in stress-responsive transcription in cyanobacteria. The German-Japanese Binational Seminar 2015 (DFG-JSPS), 2015.3.22, Hotel Kanpo-no-yado, Atami Japan.

Kan Tanaka and Yuki Kobayashi. Abscisic acid signaling in a unicellular red alga. Japanese-Finnish Seminar 2014 (Finnish Academy-JSPS), 2014.10.13, Hotel Millione, Jozan-kei, Sapporo, Japan.

田中 寛, Bacteria made organelles made eukaryotic cells. 極限環境生物学会シンポジウム, 2014.6.7、東京工業大学、東京。

Kan Tanaka, Nitrogen assimilatory pathway and the regulation in a eukaryotic red alga *Cyanidischyzon merolae*. Physiology and Biotechnology of Microalgae, Russian Academy of Science, 2012.10.16, Moscow, Russia.

Kan Tanaka, Involvement of chloroplast and mitochondria in algal cell cycle regulation. The 12th Asian Conference of Transcription, 2012.6.6, Jeju island, Korea. 他

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

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

(3)連携研究者

華岡 光正 (HANAOKA, MITSUMASA)

千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授

研究者番号 : 30508122

望月 伸悦 (MOCHIZUKI, NOBUYOSHI)

京都大学大学院・理学研究科・助教

研究者番号 : 60280939