

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650126

研究課題名(和文)ポリバレントモデル植物ゼニゴケによる葉緑体ゲノム収奪の分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular analysis for chloroplast genome translocation using versatile model-plant Marchantia

研究代表者

上田 実(Ueda, Minoru)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：30632541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：モデル陸上植物ゼニゴケを利用して、葉緑体ゲノム断片の細胞核への移動(葉緑体ゲノム収奪)を計測する実験系を確立した。まず、ゼニゴケでの葉緑体ゲノム収奪の発生頻度を測定したところ、タバコ等の被子植物と比べ、低頻度(0.001%以下)であることが判明した。このゼニゴケの特長を利用して、葉緑体ゲノム収奪が発生する変異体のスクリーニングを行い、候補遺伝子を単離することに成功した。候補遺伝子のジーンターゲティングによる遺伝子破壊とその相補ラインを作出した。本研究期間内に候補遺伝子の破壊による葉緑体ゲノム断片の移行を確認できていないが、解析手法を改善し、引き続き探索を進める。

研究成果の概要(英文)：Having efficient chloroplast genome transformation and genetic screening system established in Marchantia, measurement of genome translocation rate from chloroplast genome to the nucleus has been done. Analysis of measurement of genome translocation rate revealed that the translocation rate is quite low in Marchantia. Because Marchantia suppresses the translocation, genetic screening using T-DNA insertion lines has been done to find a mutant in which the translocation occurs. As a result, one mutant has been isolated and another allele for the gene was prepared by gene targeting. Now, I am not able to conclude because NGS analysis have not detected any novel chloroplast genome insertion in the nucleus in mutants generated by gene targeting. I am still analyzing while improving method.

研究分野：実験進化学

キーワード：オルガネラゲノム収奪 進化 葉緑体 ゼニゴケ

1. 研究開始当初の背景

細胞内共生により誕生したオルガネラであるミトコンドリアや葉緑体は、その共生が成立してから今日に至るまで自身のゲノムを繰り返し核ゲノムへ転移させている(遺伝子転移)。遺伝子転移の中でも最初のステップであり、真核生物ゲノムの構成に大きな影響を及ぼしている核ゲノムによるオルガネラゲノムの取込み(オルガネラゲノム収奪)に関する分子メカニズムについてはこれまで殆ど明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では、葉緑体ゲノム収奪に関わる遺伝子単離に最適な新規モデル陸上植物ゼニゴケを用い、葉緑体ゲノム収奪を葉緑体形質転換体により再現する実験進化学的手法によって、オルガネラゲノム収奪に関する遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

核ゲノム形質転換に利用する選抜マーカーク(カナマイシン耐性遺伝子: neo)を葉緑体ゲノムに導入したゼニゴケを用い、順・逆遺伝学的手法により変異体を作成する。作成した変異体をカナマイシン含有培地により選抜し、カナマイシン耐性を示した個体を探索する。カナマイシン耐性を示した個体は、葉緑体ゲノムから核ゲノムへの移動(葉緑体ゲノムの収奪)が起こった変異体と考えられるため、変異を引き起こした原因遺伝子を同定する。

4. 研究成果

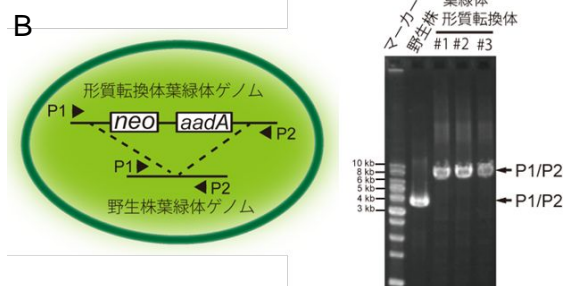
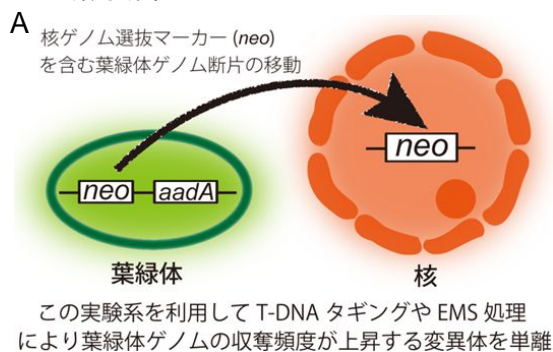


図 1. A. 葉緑体ゲノム収奪の検出法模式図 B. 作出した葉緑体形質転換体のホモプラズミック化を確認した PCR 産物の電気泳動像

(1) 核ゲノム形質転換に利用する選抜マー

カー(カナマイシン耐性遺伝子: neo)を葉緑体ゲノムに導入した葉緑体形質転換体の作出に成功した。葉緑体形質転換用の抗生物質(スペクチノマイシン)がない条件でも、導入した遺伝子が葉緑体ゲノムに安定して維持されることを確認した(図1)。

(2) 葉緑体形質転換体を抗生物質非存在下で生育させ、無性生殖によって得られる無性芽を材料に、ゼニゴケでの葉緑体ゲノム収奪の発生頻度を測定した。具体的には、仮に無性生殖により核ゲノム中に葉緑体ゲノム断片が挿入した場合は、カナマイシン耐性遺伝子が発現することで、カナマイシン耐性になることを利用して発生頻度を測定した。10万個体以上の無性芽についてカナマイシン含有培地で測定したところ、カナマイシン耐性個体は出現しなかった。このことから、ゼニゴケの無性芽では、タバコ等の被子植物と比べ、葉緑体ゲノム収奪の発生頻度は非常に低頻度(0.001%以下)であることが判明した。

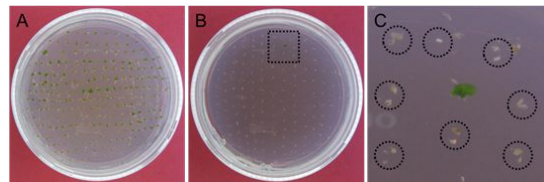


図 2. A. 選抜前のタグライン、 B. 選抜後 1 ヶ月のタグライン、 C. パネル B の点線四角部分を拡大。中央に薬剤耐性個体があり、点線の円で囲まれた部分に枯死した植物体が存在。薬剤濃度は kanamycin 200 μg/ml、Geneticin 20 μg/ml を使用。直径 9 cm シャーレ使用

(3) 葉緑体ゲノム収奪の発生頻度が低いというゼニゴケの特長を利用して、葉緑体ゲノム収奪が発生する変異体のスクリーニングを行い、候補遺伝子を単離することに成功した(図2)。スクリーニングには T-DNA 挿入ラインによる変異体の探索を行った。候補遺伝子のジーンターゲティングによる遺伝子破壊(図3)とその相補ラインを作成し、核ゲ

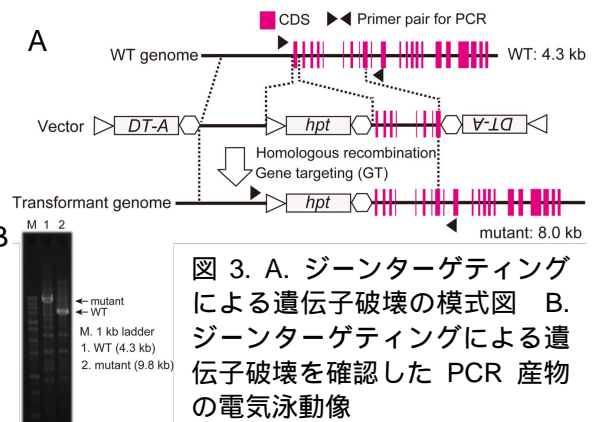


図 3. A. ジーンターゲティングによる遺伝子破壊の模式図 B. ジーンターゲティングによる遺伝子破壊を確認した PCR 産物の電気泳動像

ノムへ移行した葉緑体ゲノムの探索のため NGS 解析を行った。本研究期間内に候補遺伝子の破壊による葉緑体ゲノム断片の移行を確認できていないが、解析手法を改善し、引き続き探索を進める。

(4) 本研究から派生して、葉緑体ゲノムに蛍光タンパク質をコードする遺伝子を導入し、導入した遺伝子が葉緑体ゲノム内に安定的に維持され、CFP の発現が確認できる葉緑体形質転換体の整備に成功した。このラインを利用することで、葉緑体膜の安定性を可視化することが可能になった。葉緑体膜が不安定化する(葉緑体からの蛍光タンパク質の漏出)ような個体においては葉緑体ゲノム断片が細胞質(細胞核)に漏出する可能性が高まり、その結果、葉緑体ゲノム収奪の発生頻度が高まることが考えられる。今後 CFP の蛍光を指標に、葉緑体膜の不安定化する個体のスクリーニング等を行うことで、オルガネラゲノムの収奪についての詳細が明らかになるものと期待される。

(5) 葉緑体形質転換が可能なゼニゴケの特徴を利用して、葉緑体ゲノムにコードされている遺伝子の機能解析も行った。ゼニゴケには他の陸上植物が失った遺伝子を今もなお葉緑体ゲノムに留めていることが知られている。これらの遺伝子については、葉緑体ゲノムの収奪が発生しても、何らかの理由により葉緑体ゲノムに遺伝子を留めているものと考えられるが、その詳細についてはこれまで殆ど明らかにされていない。そこで、今回はコケ植物では葉緑体ゲノムにコードされ、大部分の種子植物の葉緑体ゲノムからは消失している遺伝子である、クロロフィル合成に関わる *chlB* 遺伝子の破壊を行った。解析の結果、*chlB* 変異体では短日条件下で、クロロフィル蓄積量の著しい減少が起こって

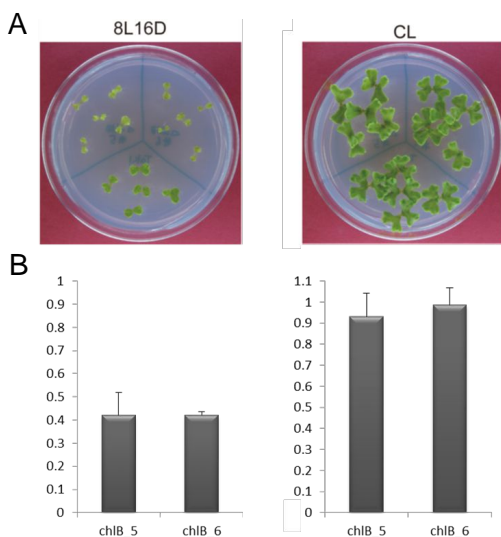


図4. A. *chlB* 変異体(上段2区画)と野生株【下段1区画】を異なる日長条件下で生育させた場合の表現型観察 B. それぞれの日長条件下での *chlB* 変異体2ラインのクロロフィル蓄積量(野生株=1)比較

いた(図4)。ゼニゴケのように乾燥を嫌い多湿な条件を好む植物にとっては、光が射さない環境(短日条件)を好む傾向が見られるが、*chlB* はそのような環境での生存に必須な遺伝子であることが示唆された。今回得られた知見をもとに今後はより詳細な解析を進めることで、*chlB* を葉緑体ゲノムに留める原因を探っていきたい。

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 3 件)

1. Boehm, C. R., Ueda, M., Nishimura Y., Shikanai, T., Haseloff, J., A cyan fluorescent reporter expressed from the chloroplast genome Of *Marchantia polymorpha*. **Plant and Cell Physiology** (2016) 57(2):291-9 doi: 10.1093/pcp/pcv160 査読有

2. Ishizaki, K., Nishihama, R., Ueda, M., Inoue, K., Ishida, S., Nishimura, Y., Shikanai, T., Kohchi, T., Development of gateway binary vector series with four different selection markers for the Liverwort *Marchantia polymorpha*. **PLoS One** 10(9):e0138876 (2015) doi: 10.1371/journal.pone.0138876 査読有

3. Ueda, M., Tanaka, A., Sugimoto, K., Kohchi, T., Shikanai, T., Nishimura, Y., *chlB* requirement for chlorophyll synthesis under short photoperiod in *Marchantia polymorpha* L. **Genome Biology and Evolution** (2014) 6(3):620-8 doi: 10.1093/gbe/evu045 査読有

[学会発表](計 1 件)

Ueda, M., Tanaka, A., Shikanai, T., Nishimura, Y. *Marchantia* plastid (chloroplast) transformation for the study of endosymbiosis. Proceeding of 12th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, Canada, Halifax, August 18th -22nd, 2013.

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

上田 実（Minoru UEDA）

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科
学研究センター・研究員

研究者番号：30632541

(2)研究分担者

（ ）

研究者番号：

(3)連携研究者

（ ）

研究者番号：