

令和元年6月5日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14768

研究課題名(和文) 葉緑体核様体ネットワークのダイナミクスを止揚する

研究課題名(英文) Deciphering the dynamics of chloroplast nucleoid network

研究代表者

西村 芳樹 (Nishimura, Yoshiki)

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号：70444099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物の葉緑体をもつ独自のDNA(葉緑体DNA)および遺伝子発現系は、光合成装置の構築や葉緑体生合成など植物の生存に必須なプロセスを支える重要因子である。葉緑体DNAは多様なタンパク質によって折りたたまれ「核様体」を構築する。葉緑体核様体は葉緑体DNAの複製・修復・分配・転写・遺伝の基盤であるが、この葉緑体核様体が分裂し次世代に遺伝する過程を、マイクロ流体デバイスに基づくライブイメージングにより初めて捉え、さらにそれを制御する重要因子として葉緑体局在型ホリデイジャンクション解離酵素の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝情報の正確な伝達は、細胞分裂や有性生殖における最重要問題である。染色体の構造や形態、その遺伝様式はこれまで詳細かつ徹底した解析が行われてきたのに対し、葉緑体における染色体ともいべき核様体の維持・遺伝機構は未だ謎に包まれている。本研究では、葉緑体核様体の分裂過程を生きた細胞で初めて捉えることに成功し、さらにその過程を制御する重要因子として、葉緑体DNAを正確に切り分けるハサミであるホリデイジャンクション解離酵素の遺伝子の同定に成功した。この酵素の遺伝子は緑色植物に広く保存されており、植物全般における葉緑体核様体の遺伝機構の一端が解明された。

研究成果の概要(英文)：Chloroplast (cp) DNA and the gene expression machinery are the fundamental system for the photosynthesis and biogenesis of chloroplasts. CpDNA molecules are packaged by multiple number of proteins into a minute globular structure called cp nucleoids. Cp nucleoids are the platform for multiple processes including DNA replication, repair, transcription, and inheritance. In this research, the process of chloroplast nucleoid division was visualized by our microfluidic device-based live imaging technology. Furthermore, chloroplast-localized Holliday junction resolvase was identified as a critical factor for the division of cp nucleoids.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：葉緑体DNA 核様体 マイクロ流体デバイス ホリデイジャンクション解離酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞呼吸や光合成の中核として機能するミトコンドリア (以下 mt) や葉緑体 (以下 cp) は独自のゲノムをもつ。これら mt/cp ゲノムは DNA-タンパク質複合体 (核様体) を形成している。mt/cp 核様体は、mt/cpDNA の折り畳み、複製、組換え、修復、遺伝子発現や遺伝などの機能ユニットとして重要であると提唱されてきたが、その動態制御については殆ど知見がなかった。

2. 研究の目的

本研究ではマイクロ流体プラットフォームを基盤とするライブイメージング技術によって cp 核様体の動態を詳細に捉えることを目指すとともに、cp 核様体の形態異常を示す変異体群の順遺伝学的解析および RNAseq 解析をおこなうことで、葉緑体の染色体ともいべき cp 核様体の動態制御のメカニズムを、遺伝子レベルで明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

本研究ではマイクロ流体プレートによる cp 核様体のライブイメージングおよび cp 核様体形態異常変異体の解析より、葉緑体核様体のダイナミズムとその制御機構の解明を目指した。対象として選んだのは、単純な細胞構造をもつ単細胞緑藻クラミドモナスである。被子植物などの多細胞生物においては、複雑な組織構造や 1 細胞あたり複数の葉緑体が存在するために、個々の葉緑体を正確に追跡することが難しい。それに対しクラミドモナスは 1 細胞あたり 1 個の葉緑体があり追跡が容易である。1 個の葉緑体には約 80 コピーの cp ゲノムが通常 5 ~ 8 個の球状の葉緑体核様体にまとめられて存在する。この葉緑体核様体が細胞周期とともに球状構造からネットワーク構造へと瞬時に変化する様子が我々のライブイメージング技術によりみえてきつつある。本研究では、さらに様々な阻害剤存在下での観察や、葉緑体核様体の形態制御に異常がある *monokaryotic chloroplast (moc) 1* 変異体の単離・解析とそのライブイメージングにより、cp 核様体ネットワークの微細構造と、そのダイナミズムを制御する分子機構の解明を目指した。

4. 研究成果

(1) マイクロ流体プラットフォームの応用

本研究において、マイクロ流体プラットフォームをもちいた単細胞緑藻クラミドモナスのライブイメージングにより、cp 核様体が細胞周期に応じて球状 ネットワーク状 球状へと変化を繰り返す様子を捉えることに成功した。

(2) 葉緑体核様体のダイナミズムを制御するホリデイジャンクション解離酵素の同定

クラミドモナスで葉緑体核様体が凝集し、葉緑体分裂に際して不均等な分配を引き起こす変異体 *moc1* について、その原因遺伝子を同定したところ、1 つの機能未知遺伝子が浮かび上がってきた。*MOC1* 遺伝子は植物に広く保存されており、塩基/アミノ酸配列情報に基づいた相同生解析では、その機能について何のヒントも得られなかったが、Swiss-model による構造データベースに基づいた解析をおこなったところ、DNA 相同組換え中間体として生ずる DNA 四つ又構造 (ホリデイジャンクション) を切断する酵素との構造的相同生が示唆された。そこで組換えタンパク質を調製して生化学的な解析をおこなったところ、ホリデイジャンクション中央に CC 配列があった際にそれを対称的に切断する活性が証明された。さらに DNA オリガミと高速原子間力顕微鏡をもちいた観察をおこなったところ、*MOC1* タンパク質がホリデイジャンクションの中央部に結合して、それを対称的に切断する様子を捉えることに成功し、これがホリデイジャンクション解離酵素であることが証明された。葉緑体に局在するホリデイジャンクション解離酵素が発見されたのは、これが初めてであった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Kamimura, Y., Tanaka, H., Kobayashi, Y., Shikanai, T., Nishimura, Y*. (2018) Chloroplast nucleoids as a transformable network revealed by live imaging with a micro fluidic device. *Comms. Biol.*, **1(47)**, 1-7.
2. Kajikawa, M., Yamauchi, M., Shinkawa, H., Tanaka, M., Hatano, K., Nishimura, Y., Kato, M., Fukuzawa, H. (2018) Isolation and characterization of *Chlamydomonas* autophagy-related mutants in nutrient-deficient conditions. *Plant Cell Physiol.* 60(1) 126-138.

3. Joo S, Nishimura Y, Cronmiller E, Hong RH, Kariyawasam T, Wang MH, Shao NC, El Akkad SE, Suzuki T, Higashiyama T, Jin E, Lee JH. (2017) Gene Regulatory Networks for the Haploid-to-Diploid Transition of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **175**; 314-332.
4. Kobayashi Y, Misumi O, Odahara M, Ishibashi K, Hirono M, Hidaka K, Endo M, Sugiyama H, Iwasaki H, Kuroiwa T, Shikanai T, Nishimura Y.* (2017) Holliday junction resolvases mediate chloroplast nucleoid segregation. *Science* **356**, 631-634.
5. Kobayashi Y., Misumi O., Nishimura Y.* (2017) A crucial factor for chloroplast nucleoid segregation. *Cytologia* 82, 1.

* Corresponding author

〔学会発表〕(計 17 件)

1. Yoshiki Nishimura. 「Chloroplast chromosomes on the move - Exploring the dynamics of chloroplast nucleoids -」理研/ERATO/CSRS セミナー (2018 年 11 月 16 日 理研、和光) 招待講演
2. 西村 芳樹, 浜地 貴志, 小林 優介, 鹿内 利治 「葉緑体核様体ネットワークの動態制御機構」日本植物学会第 8 2 回大会(広島国際会議場 2018 年 9 月 14 日～16 日)口頭発表(一般)
3. Yoshiki Nishimura, Yusuke Kobayashi, Yoshitaka Kamimura, Osami Misumi, Toshiharu Shikanai. Dynamic network structure of chloroplast nucleoids. 1st Asia-Oceania International Congress on Photosynthesis. (2018.8.19-23 at Beijing, China) 招待講演
4. 西村芳樹 「葉緑体核様体のダイナミクスと進化」SIC 研究部セミナー (2018 年 6 月 28 日 サントリーワールドリサーチセンター、京都) 招待講演
5. Yoshiki Nishimura, Yusuke Kobayashi, Yoshitaka Kamimura, Osami Misumi, Toshiharu Shikanai. Dynamic transformable network of chloroplast nucleoids. International symposium on photosynthesis and chloroplast biogenesis. (2018.11.07-10 at 倉敷市民ホール、倉敷) . Poster.
6. Yoshiki Nishimura, Yusuke Kobayashi, Yoshitaka Kamimura, Osami Misumi, Toshiharu Shikanai, Mari Takusagawa, Yusuke Kobayashi, Yoichiro Fukao, Isamu Miyakawa, Toshiharu Shikanai. Dynamic Network Structure of Chloroplast Nucleoids. 18th International Conference on the Cell and Molecular Biology of Chlamydomonas (2018.6-17-21 at Carnegie Institution, Washington DC, USA) Poster.
7. 豊岡 博子, 浜地 貴志, 西村 芳樹, 宮城島 進也, 箕浦 高子, 野崎 久義 「ボルボックス系列異型配偶ユードリナにおける配偶子誘導要因の解析」日本植物学会第 8 2 回大会(広島国際会議場 2018 年 9 月 14 日～16 日)口頭発表(一般)
8. 浜地 貴志, 山岡 尚平, 鹿内 利治, 西村 芳樹 「母性遺伝メカニズムの解明に向けたクラミドモナス有性生殖のゲノム編集アプローチ」日本植物学会第 8 2 回大会(広島国際会議場 2018 年 9 月 14 日～16 日)ポスター
9. 山本 荷葉子, 浜地 貴志, 豊岡 博子, 新垣 陽子, 野口 英樹, 豊田 敦, 水口 洋平, 野崎 久義 「雌雄異株種・同株種ボルボックスの性染色体領域・相同領域における比較ゲノム解析」日本植物学会第 8 2 回大会(広島国際会議場 2018 年 9 月 14 日～16 日)口頭発表(一般)
10. Mari Takusagawa, Yusuke Kobayashi, Yoichiro Fukao, Isamu Miyakawa, Toshiharu Shikanai, Osami Misumi, and Yoshiki Nishimura. Biological analysis of plastid nucleoid-associated HMG-box protein in *Chlamydomonas reinhardtii*. International symposium on photosynthesis and chloroplast biogenesis. (2018.11.07-10 at 倉敷市民ホール、倉敷) . Poster.
11. Mari Takusagawa, Yusuke Kobayashi, Yoichiro Fukao, Isamu Miyakawa, Toshiharu Shikanai, Osami Misumi, and Yoshiki Nishimura. Organelle nucleoid-associated HMG-box proteins may have been evolved independently through tandem domain duplications. 第 14 回植物縦横無尽の会 (2018 年 10 月 5 日、京都大学、京都) Poster.
12. Mari Takusagawa, Yusuke Kobayashi, Yoichiro Fukao, Isamu Miyakawa, Toshiharu Shikanai, Osami Misumi, and Yoshiki Nishimura. Organelle nucleoid-associated HMG-box proteins may

have been evolved independently through tandem domain duplications. Gordon Research Conference, Mitochondria and Chloroplasts. Jul. 8-13, 2018. Italy. Poster.

13. 西村芳樹、小林優介、浜地貴志、鹿内利治「葉緑体核様体のかたちを司る DNA リガーゼの同定」第 60 回日本植物生理学会年会。(2018 年 3 月 13-15 日, 名古屋) 発表予定
14. 田草川真理, 小林優介, 深尾陽一朗, 日高久美, 遠藤政幸, 杉山弘, 宮川勇, 鹿内利治, 三角修己, 西村芳樹. 「核様体局在の HMGB タンパク質が DNA 結合ドメインを 2 つもつ利点」第 60 回日本植物生理学会年会。(2018 年 3 月 13-15 日, 名古屋)
15. Masataka Kajikawa, Marika Yamauchi, Haruka Shinkawa, Manabu Tanaka, Kyoko Hatano, Yoshiki Nishimura, Kimihide Oku, Yasuyoshi Sakai, Misako Kato, Hideya Fukuzawa 「オートファジーを欠損した緑藻における窒素欠乏応答異常クラミドモナスの ATG 変異体の単離と解析」日本植物学会第 8 1 回大会(東京理科大学 2017 年 9 月 8 日~11 日)口頭発表(一般)
16. Yusuke Kobayashi, Osami Misumi, Masaki Odahara, Kota Ishibashi, Masafumi Hirono, Kumi Hidaka, Masayuki Endo, Hiroshi Sugiyama, Hiroshi Iwasaki, Tsuneyoshi Kuroiwa, Toshiharu Shikanai, Yoshiki Nishimura 「葉緑体核様体の形や遺伝はホリデイジャンクション解離酵素によって制御される」日本植物学会第 8 1 回大会(東京理科大学 2017 年 9 月 8 日~11 日)口頭発表(一般)
17. Koh Samuel Wee Han, Ito Hisashi, Tanaka Ayumi, Nishimura Yoshiki, Tanaka Ryouichi 「Intracellular localization of β -carotene ketolase in *Haematococcus pluvialis*」日本植物学会第 8 1 回大会(東京理科大学 2017 年 9 月 8 日~11 日)ポスター発表

〔図書〕(計 6 件)

1. Kobayashi, Y., Misumi, O., Nishimura, Y.* (2018) Identification of Holliday junction resolvases crucial for the chloroplast nucleoid morphology and segregation. *Plant Morphology* **30**, 73-81.
2. 西村芳樹* (2018) 葉緑体 DNA の分配を司るホリデイジャンクション解離酵素の発見 バイオサイエンスとインダストリー 76(5) 404.
3. 小林優介、三角修己、西村芳樹* (2018) 葉緑体核様体の進化と構造のダイナミクス 化学と生物 56(10) 651-658.
4. 浜地貴志・西村芳樹* (2018) ゲノム編集の時代における「緑の酵母」クラミドモナスの復権 生物工学 96(8) p475.
5. Nishimura, Y.* (2018) The sexual reproduction program of *Chlamydomonas reinhardtii*. in MICROBIOLOGY MONOGRAPHS (Springer) Chlamydomonas Biology, Biotechnology and Biomedicine. in press.
6. 小林優介、三角修己、西村芳樹* (2017) 葉緑体ゲノムの分配は Holliday ジャンクション解離酵素 MOC1 により保障される. *新着論文レビュー* (2017 年 5 月 30 日) DOI: 10.7875/first.author.2017.043

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
http://www.bot.kyoto-u.ac.jp/j/5_iden.html
6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。