

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291063

研究課題名(和文) 被子植物に共通する誘導型オルガネラDNA分解とサルベージ機能の解明

研究課題名(英文) Elucidating salvaging role of tissue-specific organelle DNA degradation conserved in land plants

研究代表者

坂本 亘 (SAKAMOTO, Wataru)

岡山大学・その他部局等・教授

研究者番号：20222002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：葉緑体とミトコンドリアには細胞内共生の痕跡としてオルガネラゲノムが存在する。これらのDNAが有する遺伝情報はごく限られている一方で、コピー数が高くかつ変動すること知られている。また葉緑体DNAが花粉や葉の老化など、組織特異的に分解される現象は20年以上前からいくつかの植物で報告されているものの、統一した見解は得られておらず意見が分かれており、分子機構も未解明である。

本研究では、代表者らが最近発見したオルガネラヌクレアーゼDPD1の解析を通じて、被子植物に共通するDNA分解機構を分子レベルで明らかにし、DPD1が関与するサルベージ作用を証明する研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Chloroplasts and mitochondria are the organelles that originate from endosymbiosis of respective ancestral bacteria and retain their own DNA as a remnant. Although these organelle DNAs are very limited as genetic content, they exist as multi-copy and vary in the amount. Moreover, tissue-specific degradation of organelle DNAs has been reported in literature since two decades ago but little is understood at the molecular level. Recently, our group identified DPD1 exonuclease, which is conserved in land plants, be dual targeted to plastids and mitochondria, and appear to degrade organelle DNA.

In this study, we attempted to corroborate the role of DPD1 in organelle DNA degradation. We focused on leaf senescence and examine the possibility that organelle DNA degradation is related to nutrient salvage.

研究分野：植物分子生物学・遺伝学

キーワード：葉緑体 ミトコンドリア オルガネラ分化 DNA分解 葉老化 ステイグリーンヌクレアーゼ

1. 研究開始当初の背景

葉緑体(プラスチド)とミトコンドリアはそれぞれシアノバクテリアと α -プロテオバクテリアの細胞内共生により生じたと考えられ、その痕跡として両方のオルガネラがゲノム DNA と原核生物型の転写・翻訳装置を持っている。プラスチドとミトコンドリアのゲノム自身がコードする遺伝子は構成タンパク質のごく一部であり、ほとんどの遺伝子は核ゲノムに転移している。そのため、細胞質からオルガネラへ輸送されるタンパク質とオルガネラ自身が合成するタンパク質の協調した発現制御機構は植物の生育に重要である。オルガネラゲノムの特徴として、核ゲノムのように両親から由来するゲノムが融合せず、片親のみから遺伝すること(母性遺伝)、オルガネラあたりあるいは細胞あたりゲノムが複数コピー存在し、それらのゲノムコピー数が変動し得ること、が挙げられる。一方で、オルガネラゲノムのコピー数がどのように制御されるかについては殆ど知見がない。またオルガネラ DNA が生殖や葉の老化、栄養飢餓で分解誘導されるという現象の報告は過去にあるものの、DNA コピー数の変動については一般化された見解が得られておらず、オルガネラ DNA 分解を証明する分子機構が長らく不明であった。

このような背景のもと、筆者らはオルガネラ DNA の分解に着目した分子遺伝学的な研究を進め、花粉でオルガネラ DNA が分解されない突然変異体の単離と原因遺伝子の同定により、プラスチドとミトコンドリアに共同在する DNA 分解酵素(エキソヌクレアーゼ) DPD1 をシロイヌナズナで発見し 2011 年に報告した。DPD1 は花粉でオルガネラ DNA を分解するので、オルガネラが母親のみから遺伝する母性遺伝に関連するとの予想で研究を進めたが、それを支持する結果を実験的に得ることはできなかった。一方で、花粉以外の組織における DPD1 遺伝子の発現をデータベースで調べると、老化葉において顕著な発現誘導が観察される可能性が示唆された。また別の変異体 *dpd2* の解析からは、DNA の新規合成が抑制されるとオルガネラ DNA 分解も抑制されることが明らかとなり、オルガネラ DNA 分解と核酸のサルベージとの関連性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究ではこれらの予備データを踏まえ、DPD1 が葉の老化においてオルガネラ DNA を分解することを実証するとともに、DPD1 ヌクレアーゼの生化学的特性を明らかにすること、植物の生育への影響を調べるための

研究を行った。特に DNA 分解産物を再利用するサルベージへの関与について明らかにするための研究を行い、DPD1 により被子植物に普遍的に付与されたオルガネラ DNA 分解の生理的意義を明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナ葉老化におけるオルガネラ DNA 分解の検証

DPD1 の葉老化過程での発現誘導と DNA 分解を実証するため、まず暗黒誘導の切除葉における老化誘導の実験系を立ち上げた。短日条件下で2ヶ月程度生育させた葉を切り取って暗箱で静置し、老化を観察するとともに DNA および RNA を抽出して老化で誘導される遺伝子の発現、および DNA を定量的に検出できる実験系を確立した。対象となる遺伝子に特異的なプライマーを合成してこれらのサンプルを qPCR で解析し、核酸レベルを定量化した。本研究では特に、オルガネラ DNA 検出のためにデジタル PCR を導入して定量化を検討した。

(2) DPD1 によるオルガネラ DNA 分解の検証

上記の暗黒誘導老化において、DPD1 がオルガネラ DNA 分解に関与するかどうかを、*dpd1* 突然変異体および *dpd1* を野生型 *DPD1* 遺伝子で相補した個体 G31 を用いて調べた。上に述べた遺伝子発現、DNA レベルの解析だけでなく、暗黒誘導における葉老化の遅延および光合成活性の変化なども合わせて観察した。さらに、DPD1 が葉老化において誘導されていることを実証するために、タンパク質レベルでの DPD1 の検出を試みた。

さらに、DPD1 機能の普遍性を明らかにするため、シロイヌナズナ以外の植物で DPD1 ノックダウンあるいはノックアウト系統を作出するための研究を行い、タバコのノックダウン系統、イネのノックアウト系統の単離を試みた。

(3) DPD1 ヌクレアーゼの生化学的解析とサルベージ機能の解析

DPD1 ヌクレアーゼの諸性状については、これまでの研究でエキソヌクレアーゼ活性は明らかにしているものの詳細は不明である。本研究では、大腸菌でヒスタグ融合タンパク質として発現させた DPD1-His を精製し、その活性を *in vitro* で精査するための実験を行った。また、DPD1 で誘導されるオルガネラ DNA 分解がヌクレオチドサルベージに関わるかどうかを、メタボローム解析、トレーサー実験などにより試みた。これらの研究の過程では、ヌクレオチドの再利用に限らず、リン

酸が窒素などの再利用にオルガネラ DNA 分解が関与する可能性も考えられたため、水耕栽培の実験系を確立し、養分欠乏による DPD1 の生育への影響を同時に検討した。

4. 研究成果

(1) 老化葉のオルガネラ DNA 分解と DPD1

上述した暗黒誘導による葉老化実験系を確立させたところ、クロロフィル量で確認できる葉の老化は3~6日で観察されたため(図1)、誘導後5日までの切除葉を以後の研究に用いた。図1に示すように、葉緑体遺伝子を用いた qPCR では老化に従って葉緑体 DNA が分解されることが明らかとなった。一方で、ミトコンドリア DNA の分解は顕著に観察されず、本実験では誘導前においてもミトコンドリア DNA コピー量が少ないため定量的解析が困難である可能性が考えられた。このため以後は葉緑体 DNA を指標とした解析を進めた。

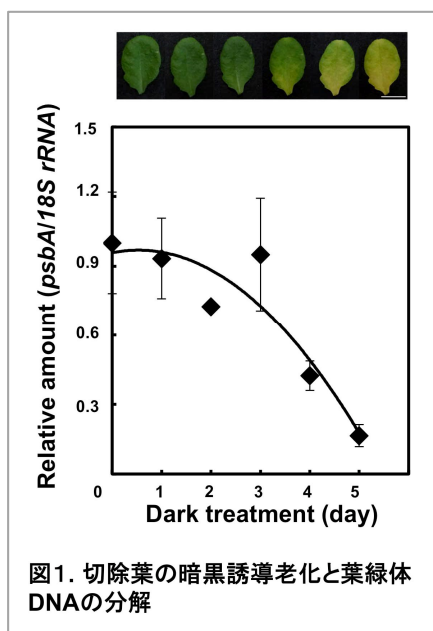


図1. 切除葉の暗黒誘導老化と葉緑体 DNA の分解

暗黒誘導老化における葉緑体 DNA 分解を *dpd1* 変異体で調べたところ、*dpd1* 変異体では葉緑体 DNA の減少が起こっていなかった(図2)。DNA 分解については qPCR での結果を確認するためにデジタル PCR でも同様にコピー数を調べたところ、デジタル PCR で検出されるコピー数が減少するものの、やはり *dpd1* 変異体での DNA 分解が抑制されていた。さらに、この DNA 分解と並行して野生型で DPD1 遺伝子の発現を qPCR により確認すると、DNA 分解の始まる老化誘導後3日頃から転写レベルが上がることも明らかとなった。老化葉の細胞を DAPI 染色により観察した組織化学的な観察でも同様に *dpd1* 変異体では DNA の残存が顕著であった。以上の結果より、葉

の老化において DPD1 により葉緑体 DNA が分解されていることが明らかとなった。

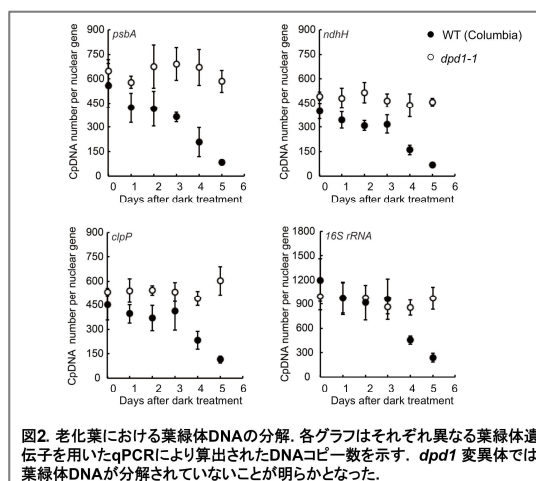


図2. 老化葉における葉緑体DNAの分解。各グラフはそれぞれ異なる葉緑体遺伝子を用いたqPCRにより算出されたDNAコピー数を示す。*dpd1* 変異体では葉緑体DNAが分解されていないことが明らかとなった。

(2) DPD1 欠損によるステイグリーン形質と葉緑体への生理作用

dpd1 変異体における老化葉の形質を詳しく調べたところ、*dpd1* は老化が遅延するステイグリーンを弱いながらも示すことが明らかとなった(図3)。これは、老化で分解されない葉緑体 DNA の残存による葉緑体遺伝子発現低下の抑制が原因と考えられたため、老化時の葉緑体遺伝子発現を qPCR で確認した。その結果、やはり葉緑体遺伝子の発現低下が抑制されており、加えて核にコードされた光合成遺伝子の抑制低下も観察されていた。以上の結果は、葉緑体 DNA 分解が葉の老化促進を規定する一因であることを示しており、老化の新たな側面を明らかにすることができた。

(3) DPD1 ヌクレアーゼの生化学的特徴

本研究では DPD1 活性を老化葉で検出するためのウエスタン解析あるいは抽出物の in gel アッセイを試みたが、明確な結果は得ることができなかった。一方、大腸菌で融合タンパク質として発現させ精製した DPD1-His を用いた実験ではヌクレアーゼ活性を検出することができた。この活性測定では、基質として合成した約20塩基のDNAあるいはRNAを用い、5'末端を蛍光ラベルし DPD1-His との反応後電気泳動で生成物を検出した。結果

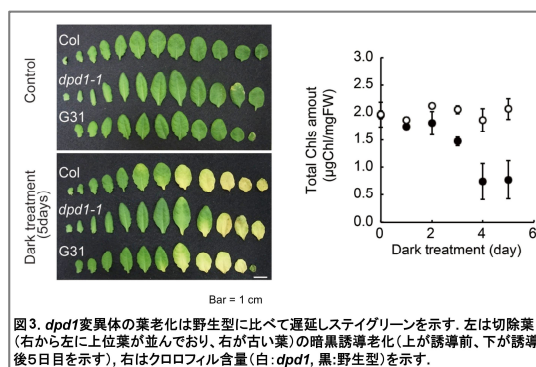


図3. *dpd1* 変異体の葉老化は野生型に比べて遅延しステイグリーンを示す。左は切除葉(右から左に上位葉が並んでおり、右が古い葉)の暗黒誘導老化(上が誘導前、下が誘導後5日目を示す)、右はクロロフィル含量(白: *dpd1*, 黒: 野生型)を示す。

を要約すると、DPD1 は 3' 5' のエキソヌクレアーゼ活性を持ち、活性は Mg イオン要求性で他のイオンでは活性を示さず、1 本鎖あるいは 2 本鎖の DNA は分解するが、RNA は分解しないことが明らかとなった。以上の結果より、葉の老化過程で DPD1 が分解するのはゲノム DNA のみであることがわかった。

(4) オルガネラ DNA 分解とサルベージ機能

以上の研究で証明された DPD1 によるオルガネラ DNA 分解は、老化で進行すると考えられているタンパク質や脂質、色素などの高分子化合物の分解と同様に養分の再利用に寄与することが推察される。そのため本研究ではシロイヌナズナの水耕栽培法で窒素やリン酸などの栄養条件を変化させた条件で *dpd1* および野生型を生育させて影響を調べた。研究終了時までこれらの研究を完了することができなかったものの、水耕液のリン酸を低下させた条件で生育させたときに *dpd1* 変異体では野生型に見られないリン欠乏症状であるアントシアニン蓄積が顕著に観察された。以上の実験は現在進行中であるものの、老化におけるオルガネラ DNA 分解と養分利用の可能性を支持する結果が得られた。

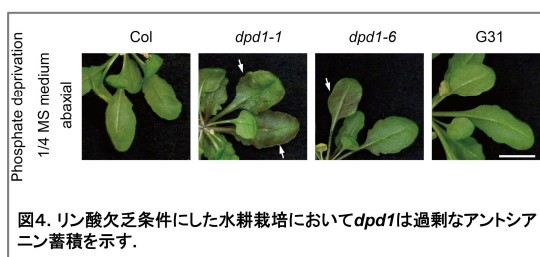


図4. リン酸欠乏条件にした水耕栽培において *dpd1* は過剰なアントシアニン蓄積を示す。

(5) まとめ

本研究では、シロイヌナズナ変異体の解析を通して、DPD1 がオルガネラ DNA の分解機構に関わることを証明し、葉の老化でオルガネラ DNA が分解されていることを新たに示すことができた。これまで老化および細胞死に関連して報告されているヌクレアーゼの殆どがエンドヌクレアーゼであって主に RNA を基質とすることを考慮すれば、DPD1 は植物が持つヌクレアーゼの中でも特徴的である。DPD1 が被子植物で広く保存されていることを考えると、それらの生理機能は植物の生育や適応に重要な役割を持つと考えられる。この生理機能の 1 つとして、本研究ではオルガネラ DNA 分解の養分再利用に着目した実験を進め、それらを支持する結果が得られた。今後の研究によりオルガネラ DNA の組織特異的分解が関与する新たな生理作用の全貌を明らかにすることができるかと期待される。

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 5 件)

Sakamoto, W. and Takami, T. (2014) Nucleases in higher plants and their possible involvement in DNA degradation during leaf senescence. *J. Exp. Bot.*, 65: 3835-3843, 査読有, doi: 10.1093/jxb/eru091.

Kato, Y. and Sakamoto, W. (2014) Phosphorylation of photosystem II core proteins prevents undesirable cleavage of D1 and contributes to the fine-tuned repair of photosystem II. *Plant J.*, 79: 312-321, 査読有, doi: 10.1111/tbj.12562.

Kamau, P., Sano, S., Takami, T., Matsushima, R., Maekawa, M., and Sakamoto, W. (2015) A mutation in *GIANT CHLOROPLAST* encoding a PARC6 homologue affects spikelet fertility in rice. *Plant Cell Physiol.*, 56: 977-991, 査読有, doi: 10.1093/pcp/pcv024.

Kato, Y., Ozawa, S., Takahashi, Y., and Sakamoto, W. (2015) D1 fragmentation in photosystem II repair caused by photo-damage of a two-step model. *Photosynthesis Res.*, 126: 409-415, 査読有, doi: 10.1007/s11120-015-0144-7.

Zhang, L. and Sakamoto, W. (2015) Possible function of VIPP1 in maintaining chloroplast membranes. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1847: 831-837, 査読有, doi: 10.1016/j.bbabi.2015.02.013.

[学会発表](計 11 件)

高見常明・村上華穂・坂本亘. DPD1 の機能欠損は老化葉の葉緑体遺伝子発現に影響する. 第 55 回日本植物生理学会年会, 2014 年 3 月 19 日, 富山.

村上華穂・高見常明・坂本亘. オルガネラヌクレアーゼ DPD1 は老化葉において葉緑体 DNA 分解に関与する. 第 55 回日本植物生理学会年会, 2014 年 3 月 19 日, 富山.

Sakamoto, W. Organelle DNA degradation during leaf senescence. 6th European Workshop on Leaf Senescence. October 15, 2013, Versailles, France.

高見常明・坂本亘. オルガネラ DNA を特異的に分解する DPD1ヌクレアーゼを欠損した *dpd1* 変異体の光合成活性. 第 56 回日本植物生理学会年会, 2015 年 3 月 17 日, 東京.

Sakamoto, W. and Takami, T. Regulation of chloroplast DNA levels and gene expression by organelle DPD1 nuclease. Gordon Reserach Conference on Chloroplast Biotechnology. January 21, 2015, California, USA.

坂本亘. 被子植物のオルガネラゲノムは組織特異的に分解される. 国立遺伝学研究所研究集会・オルガネラゲノムに支配される生命現象. 2014 年 11 月 7 日, 三島.

Sakamoto, W. and Takami, T. Regulation of organelle DNA levels and gene expression by organelle nuclease DPD1. 9th International Conference for Plant Mitochondrial Biology, May 19, 2015, Wroclaw, Poland.

高見常明・坂本亘. 葉の老化過程において葉緑体 DNA 分解は光合成能低下に影響する. 第 6 回日本光合成学会年会, 2015 年 5 月 22 日, 岡山.

Sakamoto, W. and Takami, T. Regulation of chloroplast DNA levels and gene expression by organelle nuclease DPD1: influence on leaf longevity and photosynthesis. Yamada Conference International Symposium on Dynamics and Regulation of Photosynthesis. October 30, 2015, Nara, Japan.

大西紀和・高見常明・坂本亘. 老化葉で発現するヌクレアーゼ DPD1 は RNA ではなく二本鎖および一本鎖 DNA を分解する. 第 57 回二本植物生理学会年会, 2016 年 3 月 18 日, 盛岡.

高見常明・坂本亘. オルガネラヌクレアーゼ DPD1 の欠損は成長に影響する. 第 57 回二本植物生理学会年会, 2016 年 3 月 18 日, 盛岡.

〔図書〕(計 2 件)

真野昌二・山田(後藤)志野・坂本亘(2014) 受精とオルガネラ: ミトコンドリア、プラスチド、ペルオキシソーム. 動植物の受精学(澤田均編) 化学同人.

加藤裕介・坂本亘(2014) 光合成の光阻害: 光化学系 II の損傷と修復の分子メカニズ

ム. 光合成研究と産業応用最前線. Pp. 97-107 エヌティーエス.

〔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:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

所属部局のホームページ(研究成果を公表している)
<http://www.rib.okayama-u.ac.jp/index-j.html>

6. 研究組織

- (1)研究代表者
坂本 亘 (Wataru SAKAMOTO)
岡山大学・資源植物科学研究所・教授
研究者番号: 20222002
- (2)研究分担者
高見常明 (Tsuneaki TAKAMI)
岡山大学・資源植物科学研究所・技術職員
研究者番号: 70614254
- (3)連携研究者
なし