

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14539

研究課題名(和文)植物の明暗応答に関わる原型的ヒストンコードの研究

研究課題名(英文)Study of prototype histone codes for plant light/dark responses

研究代表者

田中 寛 (Tanaka, Kan)

東京工業大学・科学技術創成研究院・教授

研究者番号：60222113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：原始紅藻シズン(Cyanidioschyzon merolae)を材料に、植物の光環境応答に関連したヒストン修飾について研究した。特異的抗体を用いた解析により、ヒストンH3におけるK4メチル化およびK9アセチル化の検出に成功し、これら修飾がそれぞれ細胞周期のS期、M期で蓄積することを証明した。シズン細胞からのヒストン抽出条件を確立し、MS解析への道をひらくと共に、植物における光形態形成シグナル伝達因子DET1およびCOP1遺伝子が明暗変化に伴う転写活性調節に関わる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Using a primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae* as the material, the presence and the dynamics of histone post-translational modifications in response to changes of light conditions were analyzed. We identified methylation and acetylation of histone H3K4 and H3K9, respectively, by specific monoclonal antibodies, and found these modifications accumulate at S phase and M phase of the algal cell cycle, respectively. In addition, we established a method to extract histone proteins from *C. merolae* cells, and also showed the possibility that homologs of plant photomorphogenic signaling factors, DET1 and COP1, are involved in the light-regulated transcriptional regulation in *C. merolae*.

研究分野：分子遺伝学、微生物学、進化細胞生物学

キーワード：光環境応答 原始紅藻 ヒストンコード 翻訳後修飾 転写調節

1. 研究開始当初の背景

真核細胞の核ゲノムはヒストン8量体(H2A, H2B, H3, H4タンパク質がそれぞれ2つずつ含まれる)に巻き付いた形で折りたたまれ、保持されている。これらヒストンのN末端側領域は、アミノ酸残基の位置特異的に様々な翻訳後修飾を受けることが知られており、これらが染色体の高次構造や遺伝子発現などに大きな影響を与えることから、エピジェネティクスの実体として近年多くの注目を集めている。真核細胞の祖先と考えられる原核細胞アーキアでは、このようなヒストン修飾の現象は観察されない。従って、真核細胞に普遍的なヒストン修飾は真核細胞が細胞共生により進化した過程で発達し、真核細胞の枠組みを形作ったものと考えられることができる。さらに真核細胞の一群は、光合成細菌であるシアノバクテリアの内部共生により植物に進化し、光を中心とした生活様式を獲得した。この進化の際には、葉緑体となったシアノバクテリアが持っていた光環境感覚が真核細胞に取り込まれ、ヒストン修飾によるクロマチン制御と結びついた植物に固有の光制御システムを構築したはずである。しかし、その詳細は殆ど未解明であり、植物の光環境応答の統合的理解にはその原型を理解することが重要である。

2. 研究の目的

植物の光応答能力の原型は、シアノバクテリア共生による植物の起源と共に進化したはずである。植物の光応答に関しては陸上植物を中心とした膨大な研究があるが、これらの植物は進化の過程で極端に複雑化しており、その研究から植物における光応答の起源や進化を理解することは至難といえる。本研究では、シアノバクテリアが共生して植物が成立した原型に近い姿を残す原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (シズン) を材料とし、原始的なヒストン修飾とその光環境応答について研究する。シズンは特異的光受容体を持たないが、それでも外界の明暗に应答して核ゲノムの発現を大規模に制御する能力を持っている。本研究はシズンを材料に、明条件・暗条件でのシズン核ヒストンの翻訳後修飾を調べ、明暗での遺伝子発現制御のツボとなる原型ヒストンコードの理解を目的として行う。また、明暗制御に関わるヒストン修飾それ自体のみならず、その修飾や制御に関わる因子についても検討する。光制御に直結したヒストンのマーキングがあるかどうかは未知であるが、本研究により特定することに成功すれば植物に固有なエピジェネティック制御の新発見となり、植物学全般に大きなインパクトを与えるものとなる。

3. 研究の方法

本研究では、シズン核・葉緑体・ミトコンドリアゲノムの明→暗・暗→明シフトにおけるトランスクリプトーム変化について情報を集め、この変動とヒストン修飾の関連性について、ヒストン部位特異的修飾を検出する抗体等を用いたウエスタン解析、ChIP解析等により調べる。さらに実際にヒストンタンパク質を細胞から抽出し、質量分析機により明暗変化に伴って変化するヒストン修飾を解析する。また、シズンゲノムには、高等植物の光形態形成に関わる鍵遺伝子 (*COPI*, *DET1* 等) が見つかることから、これらの遺伝子破壊などの逆遺伝学的手法を用いて原型的な明暗環境応答とクロマチン制御の関係性を探る。

4. 研究成果

① ヒストン修飾の免疫学的検出:

まず、連続明条件で培養したサンプルを用いて、ヒストン修飾を特異的に認識する各種モノクローナル抗体を用いてウエスタン解析を行った。検出を試みたヒストン修飾は以下の通りである。

- 1) H3S10ph, 2) H3S28ph, 3) H3K9Ac, 4) H3K9Ac+H3K10ph, 5) H3K4me2, 6) H3K4me3, 7) H3K9me2, 8) H3K9me3, 9) H3K27me3, 10) H3K9Ac+H3K14Ac, 11) H4K20me2

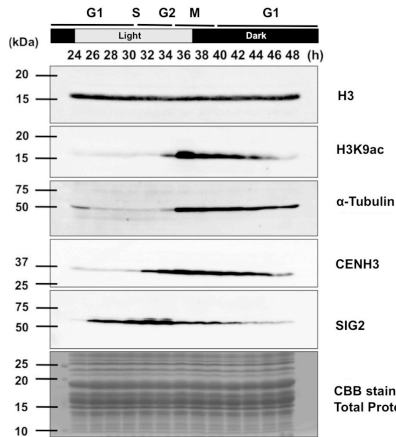
これらのうち、特異的なヒストン修飾が有意に検出されたものは、

- 3) H3K9Ac, 4) H3K9Ac+H3K10ph, 6) H3K4me3, 10) H3K9Ac+H3K14Ac

であった。

次に、これらヒストン修飾について、明暗条件との関連でさらに解析を行った。シズンは明暗条件をコントロールすることにより容易に細胞周期の同調が可能である。連続暗期18時間により細胞周期をG1期にアレストした後に光を照射するとDNA複製が一斉に開始する。明期6時間後に再び暗期とすると、6時間ほどでM期のピークを迎え、再びG1期にアレストする。このような培養条件でヒストン修飾を観察したところ、ヒストンH3タンパク質が一定の下、H3K4me3が光照射1-2時間(L1-2)で、H3K9Acが暗期6-8時間(D6-8)で顕著な蓄積を示した。他の2種の修飾については、この条件では変化が観察されなかった。L1-2はDNA複製期であるS期に相当し、D6-8は分裂期であるM期に相当する。H3K4meはL1-2で蓄積した後にL4以降はD18と同程度まで低下することから、明条件に対応するよりはS期と相関して蓄積することが示唆された。また、H3K9AcはD6-8で蓄積するがD10-12ではD18と同程度まで低下して

おり、暗期よりはM期と相関して蓄積することが示された。さらに、これら修飾の細胞周期依存性は連続明条件下でも起きることが示されたので、実際に細胞周期依存的に修飾が起きていることが確認された。



図：H3K9AcのM期特異的な蓄積

H3K9Acの蓄積については、シズンにおいてM期特異的に発現してくるチューブリンの蓄積と相関して起こる。さらに、抗H3K9Ac抗体を用いた免疫染色解析でも、分裂期の細胞核内での蓄積が証明された。一方で、このようなH3K9AcのM期における蓄積は他の生物種では観察されておらず、そのM期における蓄積の生理意義解明については今後の解析によらねばならない。

H3K27me3については、今回の実験ではシグナルが非常に弱く検出不能としている。一方で最近、シズンにおいてもH3K27me3の修飾が起こり、遺伝子発現の抑制に作用することが示されており(Mikulski et al. *Front Plant Sci* 2017)、この修飾に関しては他の真核細胞と同様の発現抑制機構が期待される。

② シズン細胞からのヒストン抽出法の検討と質量分析による検出：

当初は、光合成関連タンパク質の混入のために質量分析が困難であったが、穏やかに細胞を溶解し、光合成関連タンパク質を除去し、クロマチンを沈殿として得た後に、酸性バッファーを用いて、ヒストンを可溶性画分として得たものを用いた質量分析では、修飾ヒストンと見られるピークを検出した。しかし、未だ修飾の同定には至っておらず、サンプル量を増やして検出感度の改善に取り組む必要がある。

③ 光応答シグナル伝達因子の解析：

シロイヌナズナを用いた遺伝学的解析に

より、暗条件で光形態形成や遺伝子発現を抑制している一連の遺伝子が同定されている。これらの詳細な解析により、その中心にあるのがユビキチンリガーゼ複合体であるCUL4-DDB1であること。COP1はユビキチン化の対象となる標的タンパク質の特異性を与えるE3サブユニットであり、HY5などの光形態形成に関わる転写因子群を暗所でユビキチン化、分解を誘導することで光形態形成を抑制していることが明らかにされている。一方でCOP10-DDB1-DET1の複合体(CDD complex)もCUL4と相互作用し、光形態形成に伴うクロマチン制御に関わることが知られているが、その詳細な分子機構は不明なままである(Lau & Deng, *Trends Plant Sci* 2012)。シズンの核ゲノムには3種のCULLIN型のユビキチンリガーゼタンパク質、CUL1, CUL2, CUL4がコードされており、典型的な真核細胞と同様にこれらが分担して様々な細胞制御に関わることが想定される。シロイヌナズナで光形態形成に関わる因子としては、CUL4の他、DDB1, COP1, COP10, DET1の相同遺伝子がシズン核ゲノムにコードされることから、これらが複合体を形成してシズンでも明暗制御に関わる可能性がある。本研究では特異的な基質認識に関わるCOP1遺伝子に注目し、遺伝子破壊を試みたが、破壊株が得られなかったことから、生存に必須であることが示唆された。そこで、anti-senseを用いたCOP1発現抑制株を作成し、シロイヌナズナでCOP1との相互作用が示されているbZIP型転写因子について解析を行った。シズンでは、bZIP型転写因子が4つ存在し、これらとCOP1との直接の相互作用については、今のところ検出できていないものの、明条件下でbZIP4がリン酸化修飾を受けており、この修飾がCOP1発現抑制株では見られないことが判明した。また、暗条件下でbZIP4は細胞質に局在することから、明条件下でリン酸化修飾を受け、核へ移行する可能性が示唆された。

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 Sousuke Imamura, Keiko Taki and Kan Tanaka (2017) Construction of a rapamycin-susceptible strain of the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* for analysis of target of rapamycin (TOR) function. *J. Gen. Appl. Microbiol.* (in press) (査読あり)

② Yuki Kobayashi and Kan Tanaka (2016) Transcriptional regulation of tetrapyrrole biosynthetic genes explains abscisic acid-induced heme accumulation in the unicellular red alga

Cyanidioschyzon merolae. *Front. Plant Sci.* (online published) (DOI:10.3389/fpls.2016.01300). (査読あり)

③ Yuki Kobayashi, Hiroyuki Ando, Mitsumasa Hanaoka, and Kan Tanaka (2016) Abscisic acid participates in the control of cell-cycle initiation through heme homeostasis in the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Plant Cell Physiol.* **57**, 953-960. (DOI: 10.1093/pcp/pcw054). (査読あり)

④ Sousuke Imamura, Yasuko Kawase, Ikki Kobayashi, Toshiyuki Sone, Atsuko Era, Shin-ya Miyagishima, Mie Shimojima, Hiroyuki Ohta, and Kan Tanaka (2015) Target of rapamycin (TOR) plays a critical role in triacylglycerol accumulation in microalgae. *Plant Mol. Biol.* **89**, 309-318. (DOI: 10.1007/s11103-015-0370-6) (査読あり)

⑤ Keiko Taki, Toshiyuki Sone, Yuki Kobayashi, Satoru Watanabe, Sousuke Imamura, and Kan Tanaka (2015) Construction of a *URA5.3* deletion strain of the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*: A backgroundless host strain for transformation experiments. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **61**, 211-214. (doi: 10.2323/jgam.61.211) (査読あり)

[学会発表] (計 10 件)

① ○瀧景子、曾根俊之、墨谷暢子、神崎陸、宮城島進也、今村壮輔、田中寛：タイリングアレイによる原始紅藻シズンの窒素応答転写因子 CmMYB1 の転写ターゲットの網羅的解析：第 58 回 日本植物生理学会年会、鹿児島大学 (郡元キャンパス)、2017 年 3 月 17 日

② ○小林勇氣、田中寛：紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* における ABA シグナル伝達の解析：第 58 回 日本植物生理学会年会 鹿児島大学 (郡元キャンパス)、2017 年 3 月 18 日

③ ○竹村時空、小林勇氣、今村壮輔、田中寛：単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* における多重遺伝子変異系の開発：第 58 回 日本植物生理学会年会 鹿児島大学 (郡元キャンパス)、2017 年 3 月 18 日

④ ○吉川瞳子、小林勇氣、瀧景子、今村壮輔、田中寛：単細胞紅藻シズンにおける核遺伝子の光転写活性化機構の解析：第 11

回 日本ゲノム微生物学会年会：慶應義塾大学 (湘南藤沢キャンパス)、2017 年 3 月 3 日-4 日

⑤ ○田中寛：シアノバクテリアから葉緑体へ：共生進化を光環境応答から見る：日本進化学会第 18 回東京大会・シンポジウム S6：植物の進化・招待講演、2016 年 8 月 26 日、東京工業大学 (大岡山)

⑥ ○河瀬泰子、今村壮輔、田中寛：単細胞紅藻類において暗誘導される R1 型 MYB 転写因子 MYB2 の機能解析：第 57 回 日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 20 日、岩手大学上田キャンパス (盛岡)

⑦ ○今村壮輔、河瀬泰子、小林一幾、曾根俊之、恵良厚子、宮城島進也、下嶋美恵、太田啓之、田中寛：微細藻類においてトリアシルグリセロール合成を制御する TOR キナーゼ：第 57 回 日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18 日、岩手大学上田キャンパス (盛岡)

⑧ ○瀧景子、曾根俊之、小林勇氣、渡辺智、今村壮輔、田中寛：単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (シズン) の遺伝子改変ホスト株の分離：第 38 回 日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 3 日、神戸ポートアイランド

⑨ ○小林勇氣、安藤洗幸、華岡光正、田中寛：紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* におけるアブシシン酸の機能：第 38 回 日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 2 日、神戸ポートアイランド

⑩ Yuki Kobayashi、○Kan Tanaka：Abscisic acid signaling in a unicellular red alga Yamada Symposium, Dynamics and Regulation of Photosynthesis 招待講演, October 30, 2015, Nara

[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

<http://www.res.titech.ac.jp/~biores/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 寛 (TANAKA, Kan)

東京工業大学・科学技術創成研究院・教授
研究者番号：60222113

(2)研究分担者

瀧 景子 (TAKI, Keiko)

東京工業大学・科学技術創成研究院・研究
員

研究者番号：50332284