

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：63801

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07418

研究課題名(和文)ラン藻、葉緑体のゲノムDNA複製機構とその進化的意義の解明

研究課題名(英文)Analyses of regulation mechanism of DNA replication and its evolutionary significance in cyanobacteria and chloroplast

研究代表者

大林 龍胆(Ohbayashi, Ryudo)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・博士研究員

研究者番号：90778333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：葉緑体はシアノバクテリアが細胞内共生し誕生したため、葉緑体はシアノバクテリア由来の独自のゲノムを保持している。さらにシアノバクテリア、葉緑体ともに1細胞(1葉緑体)内に複数コピーのゲノムを保持している。しかし、細胞の成長に伴いどのように複数コピーゲノムを保持しているのかという詳細な機構は不明であった。本研究の結果、複製されるゲノムは複数コピーのうち1つのみであり、その制御はDnaAというイニシエーター因子の活性によって制御されていることが明らかとなった。さらに、DnaAの量、活性を厳密に制御することにより、成長の速度に伴い複製されるゲノムコピー数も厳密に制御されていることも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Chromosome ploidy has diversified during evolution in all of the three domains of life, bacteria, archaea, and eukaryotes. Cyanobacteria (and chloroplast) maintain multiple copies of chromosomes (genomes). Although a correlation between ploidy level and cell size has been observed in bacteria and eukaryotes, it is poorly understood how replication of multi-copy chromosomes is regulated and how ploidy level is adjusted to cell size. Here we show that only one (or a few) copy of multiple chromosomes is replicated at once in the cyanobacteria and that this restriction depends on regulation of DnaA activity. Moreover, when cell growth rate was increased or decreased at a constant temperature, DnaA level, DnaA activity, and the number of replicating chromosomes also increased or decreased, resulting in nearly constant chromosome copy number per unit cell volume.

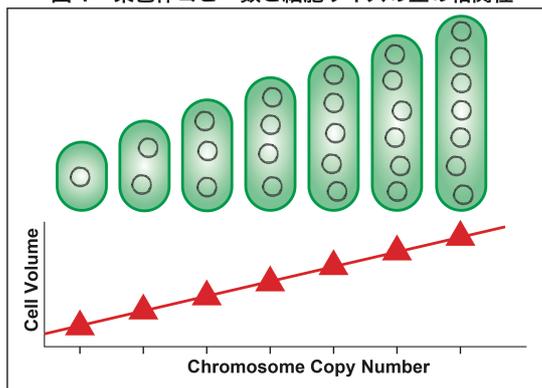
研究分野：ゲノム生物学

キーワード：DnaA DNA複製 ゲノム倍数性

### 1. 研究開始当初の背景

DNA 複製は地球上の全生物にとって、個を維持する上で最も重要なプロセスの一つである。そのため DNA 複製は厳密に制御されており、その制御機構も非常によく保存されている。原核生物の DNA 複製は DnaA という複製開始因子が複製開始点 (*oriC*) に結合し、二本鎖を解離したのち、複製複合体がリクルートされ複製が開始する (Katayama et al., 2010)。この複製開始点は GC skew (C-G/C+G で示されるリーディング、ラギング鎖での複製時変異バイアス) によって容易に予測でき、実際、多くの原核生物は GC skew のシフトポイントが *oriC* と終結点 (*terC*) である。また、*dnaA* 遺伝子は現存するすべての原核生物に保存されていることから、その起源は原核生物誕生初期に獲得したと考えられ、*oriC*-DnaA による複製開始機構は原核生物に普遍的に存在すると考えられてきた。しかし近年、申請者らの研究より光合成原核生物であるラン藻 (シアノバクテリア) には、DnaA “依存型” と “非依存型” の 2 タイプが存在することが実験的に明らかになりつつある。さらに、シアノバクテリアは 1 細胞あたり複数コピーゲノムを保持する倍数体であるという特徴がある (大腸菌などは 1 細胞あたり 1 つのゲノムを保持する 1 倍体)。このゲノムの倍数性と細胞サイズには正の相関性があることが示唆されているが (図 1)、どのように相関関係を維持しているのかという詳細な機構はほとんど分かっていない。このような DnaA 非依存の機構が生物一般に存在するかも含めて、DNA 複製という生命の根幹的現象から、生物の多様性と普遍性を理解することは重要である。

図 1 染色体コピー数と細胞サイズの正の相関性



### 2. 研究の目的

染色体の倍数性はすべての生物群に見られる形質である。真核生物の多くは 2 倍体であり、4 倍体以上のものも存在する。一方、原核生物においては大腸菌、枯草菌のような 1 細胞あたり 1 つのゲノムしか持たない 1 倍体がモデル生物として用いられてきた。しかし、原核生物にも 1 細胞あたり複数コピーゲノムを持つ種 (倍数体) が多岐の系統群に存在する。好熱菌、デイノコッカスや多くのシアノバクテリアは倍数体である。またシアノバ

クテリアが共生し誕生した葉緑体内には 10-1000 コピーもの複数ゲノムが存在していることもわかっている。さらに、葉緑体には *dnaA* 遺伝子が保存されておらず、葉緑体の複製機構はほとんど明らかとなっていない。このことから、シアノバクテリア、葉緑体に共通した DNA 複製開始機構の存在が想起される。またゲノムの複数性と細胞サイズとの相関関係は様々な生物群に見られることから、普遍的な現象であることが予想される。しかし、複数コピーの染色体をどのように維持しているのかという、基本的なメカニズムは不明である。

本研究では、複数コピー染色体が細胞の成長に相関し、どのように維持されているのかを明らかにすることを目的とし、シアノバクテリアと葉緑体を用いて研究をおこなった。

### 3. 研究の方法

(1) 複製、転写中のゲノムの細胞内局在解析

まずは複数コピーゲノムの動態、役割を調べるため、複製中のゲノム、転写中のゲノム動態を解析した。複製フォーク (複製進行中の複合体) をモニターするために、single strand binding protein (SSB) に蛍光タンパクを融合し、さらに転写においては RNA polymerase subunit (RpoC2) に蛍光タンパクを融合し局在を解析することで、転写中のゲノムを可視化した。この解析においては、共通性を見出すため、DnaA 依存、非依存だと示唆される 2 種の異なるシアノバクテリアと葉緑体 (*Cyanidioschyzon merolae*; 以下シゾン) を用いて解析した。

(2) 細胞の成長と染色体コピー数、複製される染色体数の相関関係の解明

細胞サイズとゲノムコピー数の相関関係が成り立つ機構を解明するため、(1) で確立したモニタリングシステムを用いて解析する。可能性としては、ゲノムコピー数の増加に伴い細胞が大きくなる (成長する) か、または細胞サイズの増加 (成長) に伴いゲノムコピー数が増加するのかという二つの仮説が考えられる。この仮説を明らかにするため、(i) 複製頻度、ゲノムコピー数を変化させた場合の細胞の成長速度、大きさへの影響を解析し、(ii) 成長速度を変えた場合の複製頻度、ゲノムコピー数への影響を検証した。

### 4. 研究成果

(1) 複製、転写中のゲノムの細胞内局在解析

SSB-GFP の細胞内局在を解析した結果、DnaA 依存、非依存のシアノバクテリアのどちらにおいても、フォーカスは細胞内に 1 つまたは 2 つであった。このことから、複製されているゲノムは複数あるゲノムのうち 1 つであることがわかった。また、シゾン葉緑体においても、ジャイレース (GyrA) の局在を

調べた結果、葉緑体内にフォーカスは1つのみであった。このことから、複製しているゲノムは1部であることが示唆されるが、揚力体内の複数ゲノムを区別できていないため、今後はより解像度よく観察する必要がある。一方、2種のシアノバクテリアにおけるRpoC2-GFPの局在を解析した結果、すべてのゲノムに局在していた。このことから、ほぼすべてのゲノムから遺伝子発現が起こっていることが明らかとなった。

(2) 細胞の成長と染色体コピー数、複製される染色体数の相関関係の解明

(i) 複製頻度、ゲノムコピー数を変化させた場合の細胞の成長速度、大きさへの影響  
複製頻度を変えるため、DnaAの変異体を作製した。その結果、DnaAの内在性ATPase活性欠損変異を導入したDnaAを発現させたときに、複製されるゲノム数が3つ以上に増加し、これに伴い細胞内のゲノムコピー数も増加した。このことから、複製するゲノムコピー数はDnaAの活性によって厳密に制御されていることが示唆された。

次に、この変異株を用いて生育速度への影響を検証した。その結果、野生株と比較して、生育速度、細胞の大きさは全く変化しなかった。このことから、複製するゲノム数、細胞内のゲノムコピー数は細胞成長、細胞サイズに全く影響しないことがわかった。

(ii) 成長速度を変えた場合の複製頻度、ゲノムコピー数への影響

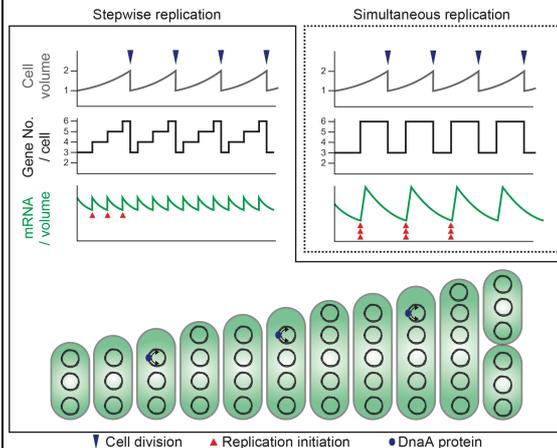
光の強度を変えることで成長速度を変えた場合の複製されるゲノム数、細胞内のゲノムコピー数への影響を検証した。その結果、生育が遅いほど、複製されるゲノム数は少なく、生育が速いほど複製されるゲノム数が増加した。一方、生育速度によらず、ある細胞体積あたりのゲノムコピー数はほとんど変化しないことがわかった。

さらに、生育速度の変化におけるDnaAタンパク量、活性を検証した結果、生育速度、複製活性に比例し、DnaA量、活性ともに上昇することがわかった。このことから、生育速度によってDnaAの量、活性を制御することで、複製するゲノムコピー数を制御していることが明らかとなった。

以上の結果より、複数コピーゲノムのをすべて同時に複製するのではなく、細胞の成長にあわせて厳密に複製するゲノム数を制御していることが明らかとなった。これは、細胞内を一定の状態に保つという面でも非常に理にかなっている。もし複数コピーをすべて同時に複製した場合、もしくは大腸菌など1倍体生物の場合、細胞内の遺伝子量は急激に2倍になるため、遺伝子発現量も必然的に2倍程度に変動してしまう(図2; Simultaneous replication)。一方、細胞が大きくなるにつれて徐々にゲノムを増やすと、急激な遺伝子量の増加はなく、転写量も一定に保たれると考えられる(図2; Stepwise replication)。

倍数体生物は一見コストの面でも1倍体生物よりも不利なように思えるが、細胞内環境変動を小さく抑えるという面では非常に有効なシステムである。シアノバクテリアは光合成を行うため、昼夜で劇的に外界環境が変化する。このように細胞内の変動を小さくするという事は、外界の環境変動に対応するためにも役立っている可能性も示唆される。

図2 細胞の成長と染色体複製との相関関係



## 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 4 件)

- ① Watanabe S, Noda A, Ohbayashi R, Uchioka K, Kurihara A, Nakatake S, Morioka S, Kanesaki Y, Chibazakura T, and Yoshikawa H. ParA-like protein influences the distribution of multi-copy chromosomes in cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Microbiology*. 164:45-56, 2018. 査読あり
- ② Hirooka S, Hirose Y, Kanesaki Y, Higuchi S, Fujiwara T, Onuma R, Era A, Ohbayashi R, Uzuka A, Nozaki H, Yoshikawa H, and Miyagishima SY. Acidophilic green algal genome provides insights into adaptation to an acidic environment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 114(39):E8304-8313, 2017. 査読あり
- ③ Fujiwara T, Ohnuma M, Kuroiwa T, Ohbayashi R, Hirooka S, Miyagishima SY. Development of a Double Nuclear Gene-Targeting Method by Two-step Transformation Based on a Newly Established Chloramphenicol-Selection System in the Red Algae *Cyanidioschyzon merolae*. *Front. Plant. Sci.* 14;8:343, 2017. 査読あり
- ④ Ohbayashi R, Yamamoto J, Watanabe S, Kanesaki Y, Chibazakura T, Miyagishima SY, and Yoshikawa H. Variety of DNA replication activity among cyanobacteria

correlates with distinct respiration activity in the dark. *Plant and Cell Physiology*, 1;58(2), pp279-286, 2017. 査読あり

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① 大林龍胆、中町愛、渡辺智、吉川博文、宮城島進也「細胞成長に伴うゲノムコピー数の増加とその制御機構」第 12 回日本ゲノム微生物学会年会、2018 年 3 月、京都大学
- ② 大林龍胆「バクテリアゲノムの構造、倍数性と複製機構から考える進化と意義」NGS 現場の会第 5 回研究会、仙台国際センター 展示棟、2017 年 5 月
- ③ 大林龍胆、中町愛、兼崎友、渡辺智、吉川博文、宮城島進也「シアノバクテリアにおける複数コピーゲノムの複製制御機構」第 11 回日本ゲノム微生物学会年会、2017 年 3 月、慶應義塾大学

〔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〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大林龍胆 (OHBAYASHI, Ryudo)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・博士  
研究員

研究者番号：90778333

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし