

令和元年5月29日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14749

研究課題名(和文) プラスチドシグナル研究の新展開

研究課題名(英文) New Aspects of Plastid Signaling

研究代表者

華岡 光正 (HANAOKA, Mitsumasa)

千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授

研究者番号：30508122

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)：本研究では、植物の葉緑体から核に情報を伝える「プラスチドシグナル」による多様な遺伝子発現調節の側面を明らかにすることを目的とした。中心制御因子GUN1の発現は生育ステージの初期に特異的であることや、転写因子による制御に加え、ヒストン修飾の変化を介したエピジェネティックな制御も関与する可能性が示唆され、プラスチドシグナル伝達に関する新たな知見を得ることができた。また、光応答や概日時計制御にもプラスチドシグナルが関与することや、光合成微生物における同様のシステムの存在についても検討を進め、プラスチドシグナルの多様性についても理解を深めることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プラスチドシグナル伝達については、国内外の多くの研究者から注目が集まっており、これに関する国際シンポジウムが頻繁に開かれるほどホットな分野である。本研究により、その新しい分子機構や生理応答の側面を明らかにできたことで、植物分子細胞生物学分野の発展に大きく寄与できたものと考えられる。また、植物の光合成や代謝機能は、プラスチドシグナルも深く関わる核ゲノムと葉緑体ゲノムの遺伝子発現協調を前提としているので、様々な環境下に適応できる新たな作物の開発など、応用研究に向けての分子基盤としても強く期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify novel regulatory mechanisms of nuclear gene expression regulated by chloroplast-to nucleus retrograde (plastid) signals. We found that GUN1, one of the central regulators, accumulates and functions during very early stage of plant development, and that nuclear gene expression could be regulated by the epigenetic control such as histone modification. Furthermore, roles of plastid signals in light- and circadian clock-dependent gene expression, as well as similar stress response mechanisms in photosynthetic microorganisms, have been also characterized.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：プラスチドシグナル GUN1 エピジェネティック制御 光環境応答 概日時計

## 1. 研究開始当初の背景

葉緑体は、原始シアノバクテリアの細胞内共生により誕生したと考えられている。そのため、葉緑体には共生に由来する独自のゲノム DNA とその転写翻訳システムが残されている。光合成などの葉緑体機能に必要な遺伝子群は核ゲノムと葉緑体ゲノムに分かれてコードされているため、発達や環境に応じて両ゲノムの遺伝子発現を協調させるための仕組みが植物の生存戦略において特に重要であると考えられる。

この遺伝子発現の協調には、核と葉緑体間の双方向のシグナル伝達経路が重要な役割を果たす。現在までに、核からのシグナル(アンテログレード(順方向の)シグナル)による葉緑体遺伝子発現調節に関する知見が蓄積しているが、葉緑体からのシグナル(レトログレード(逆方向の)シグナル: プラスチドシグナル)を介した核遺伝子の発現制御についても、最近注目が集まっている。研究代表者はこれまでも、色素体分化や概日時計に应答した遺伝子発現の協調機構について、特にプラスチドシグナルの役割に着目しながら研究を進めており、一定の知見が得られてきた。

プラスチドシグナルは、葉緑体の転写・翻訳、レドックス状態、代謝、活性酸素ストレスなど、葉緑体の様々な状態を核に伝えることで核遺伝子の発現をコントロールすることが知られている。この情報伝達に関わる因子として、葉緑体で機能する GUN1~GUN6 と呼ばれるタンパク質が知られている。これらのうち、GUN2~GUN6 はヘムやクロロフィルなどテトラピロール化合物の合成に関わる酵素であることが示されており、この中間体がシグナルとしてはたらく可能性が示唆されている。一方、GUN1 については、葉緑体中の様々なパラメーターを統御する重要な役割も指摘されているが、DNA や RNA に結合する PPR ドメインを持つタンパク質であることが分かっているだけで、その詳細な機能については全く明らかにされていなかった。さらに、葉緑体から核に至る下流シグナル伝達経路に関しても不明点が多く残されている状況であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、まず中心制御因子と考えられる GUN1 のタンパク質レベルでの挙動、ならびにターゲットとなる葉緑体 DNA・RNA を同定し、プラスチドシグナル発生に至る葉緑体側の応答を明らかにすることを目的とした。また、核遺伝子の制御に関しても、従来より考えられている転写因子による制御に加え、エピジェネティックな修飾による新たな機構の存在を明らかにするとともに、プラスチドシグナルによる多様な遺伝子発現制御の実体をさらに明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) FLAG エピトープタグを付加した GUN1 を発現する形質転換株を作出し、タンパク質レベルでの発現とターゲット DNA・RNA の同定を試みた。

(2) プラスチドシグナルによるエピジェネティックな制御を明らかにするために、核ゲノムのヒストン修飾の変化について検討を行った。

(3) 遺伝子制御の多様性を理解するため、葉緑体で感知した光情報による核コード光合成遺伝子発現調節の実体について検討を行った。

(4) 遺伝子制御の多様性を理解するため、プラスチドシグナルが核の概日時計システムにどのような影響を与えるかについて検討を行った。

(5) 高等植物に加え、光合成微生物におけるプラスチドシグナルによる遺伝子発現制御機構を調べ、情報伝達経路の普遍性と特異性について理解を深めた。

## 4. 研究成果

(1) GUN1 のタンパク質レベルでの挙動を明らかにするために、当初は GUN1 に対する特異ペプチド抗体を作出してイムノブロットングによる検出を試みた。様々な組織・環境条件からサンプルを調製して検討を行なったが、検出は非常に困難であった。そのため、検出の感度と特異性をさらに高めるために、FLAG エピトープタグを C 末端側に付加した GUN1 タンパク質を発現する形質転換株を作出・選抜し、同様に GUN1 の検出を試みた。やはり GUN1 は非常に微量のタンパク質であると考えられ、様々なサンプルや調製法を試したもののうまく検出できなかったが、学会等での情報収集を経て、GUN1 の発現が発育初期に特化していることが予想された。この時期での挙動に着目して GUN1 発現パターンの変動を調べた結果、確かに発芽 3 日後くらいから蓄積が見られ、7 日後にはほぼ消失することが示され、特に生育初期におけるプラスチドシグナル伝達に關与する可能性が示唆された。この時期における ChIP 解析等は現

在も引き続き検討を進めているところである。

(2)従来の研究より、プラスチドシグナル伝達の下流ではたらく核遺伝子の発現制御においては、GLK や ABI4 といった転写因子が関与するモデルや、選択的スプライシングによって調節を行う可能性が示されてきた。一方、遺伝子発現制御には一般にヒストン修飾を介したエピジェネティックな調節の存在も指摘されており、動物細胞においては、細胞内の代謝状態に応じたクロマチンの制御も観察されつつあることから、プラスチドシグナルによる標的遺伝子の発現が、特定の転写因子による特異的な調節に加え、ヒストン修飾によるゲノムワイドな調節も存在する可能性を検討した。葉緑体の状態を変化させプラスチドシグナルを人為的に発生させる薬剤である NF (ノルフルラゾン) 存在下・非存在下でのヒストン修飾状態の変化を、アセチル化・メチル化・リン酸化など、幅広い修飾に対する抗体を利用した ELISA 法によりスクリーニングを行った。その結果、葉緑体の状態に依存してヒストン H3 の 27 位のリジン残基がトリメチル化されるなど、プラスチドシグナルによる特異的なヒストン修飾の変化を検出することができた。

(3)プラスチドシグナルは、主に葉緑体機能に異常が引き起こされた際のストレス応答の側面で解析が進められてきたが、光合成機能を最適化させるための光環境応答においてもプラスチドシグナルが関与する可能性を示すことを試みた。葉緑体に存在する CSK (Chloroplast Sensor Kinase) は、光合成電子伝達鎖の酸化還元状態に依存した一部の葉緑体光合成遺伝子の発現調節に関わることが知られているが、本研究では、CSK が葉緑体遺伝子のみならず核コードの光合成遺伝子の発現調節にも関与している可能性を検討した。シロイヌナズナの野生株と *csk* 欠損株を用いて、光化学系 I、および II をそれぞれ優先的に機能させることのできる PSI Light、PSII Light を照射した際の光合成遺伝子の発現変化を調べた。その結果、PSII Light 照射後に PSI Light を照射した際に野生株では核遺伝子 *PSAD*、*PSAF* の発現低下が見られたのに対し *csk* 欠損株では発現変動が見られなかった。また、照射順を逆にしたり、PSI/II Light の代わりに電子伝達阻害剤である DCMU や DBMIB を加えた際でも光合成電子伝達鎖の酸化還元状態の偏りを解消するような遺伝子発現変動が見られた。以上の結果から、CSK は常に変動する光環境において、葉緑体内の光合成電子伝達鎖の酸化還元状態の変化に依存して、葉緑体・核ゲノム双方にコードされた光合成遺伝子の発現量の最適化する上で重要な役割を果たしていることが示唆された。

(4)概日時計は光や温度により同調することが知られているが、糖や金属イオンなどによる影響も受けることが最近報告されている。本研究では、多くの代謝機能が集中する葉緑体の関与を検討するため、葉緑体の異常を引き起こす薬剤ノルフルラゾン (NF) を添加した際の核遺伝子発現を調べた。その結果、時計に依存した *CAB3* の発現振動は NF の添加により失われることが示された。一方、プラスチドシグナル伝達に関わる *GUN1* の欠損株では通常の発現振動が見られたことから、時計依存の核遺伝子発現も葉緑体の影響を受けることが示唆され、プラスチドシグナルによる核遺伝子発現制御は、非常に広範であることが予想された。

(5)上述のようなプラスチドシグナルによる制御が進化の上流に位置する光合成微生物にも備わっているかを検討するため、単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (シゾン) を用いて一連の解析を行った。様々な原始的な特徴をもつシゾンの核遺伝子の多くは光依存的に発現が誘導されるにもかかわらず、植物型の光受容体を介した制御の存在は示されていない。一方で、シゾンの葉緑体には光環境応答に関わると考えられる、シアノバクテリア由来の二成分制御系が保存されていることから、葉緑体から核へのプラスチドシグナルによる光応答転写制御系が存在する可能性が示唆された。これまでの研究で、一部の核遺伝子の発現が葉緑体のヒスチジンキナーゼ (HIK) 依存的に誘導されることを見出したが、他の多くの核遺伝子が光依存的に誘導される機構については不明であった。そこで本研究では、核遺伝子の光応答転写制御系についてさらなる検討を行った。HIK 依存の核遺伝子の発現は赤色光に応答するのに対し、他の多くの核遺伝子は青色光照射でのみ発現が誘導されることが示された。また、光合成電子伝達鎖の阻害剤である DCMU、DBMIB で処理した細胞から RNA を抽出してノーザンブロット解析を行ったところ、HIK 依存の核遺伝子は DCMU 添加により抑制され、DBMIB 添加により誘導されたのに対し、HIK 非依存の核遺伝子の発現は両薬剤により抑制された。従って、光によるシゾン核遺伝子の発現は葉緑体による制御を強く受けており、HIK に依存し光合成電子伝達鎖の酸化還元状態による制御と、葉緑体の光合成機能そのものによる制御を受ける遺伝子に大きく分類されると考えられ、高等植物と共通するプラスチドシグナル伝達経路の一部は、藻類にも保存されている可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Natsuko Kagawa, Hiroya Iguchi, Masahumi Henzan and Mitsumasa Hanaoka (2019) Drying the

leaves of *Perilla frutescens* increases their content of anticancer nutraceuticals.  
Food Science and Nutrition, 査読有, 7 (4), 1494-1501.  
DOI: 10.1002/fsn3.993.

Takatomo Fujisawa, Rei Narikawa, Shin-ichi Maeda, Satoru Watanabe, Yu Kanesaki, Koichi Kobayashi, Jiro Nomata, Mitsumasa Hanaoka, Mai Watanabe, Shigeki Ehira, Eiji Suzuki, Koichiro Awai and Yasukazu Nakamura (2017) CyanoBase: A large-scale update on its 20th anniversary. Nucleic Acids Research, 査読有, 45 (D1), D551-D554.  
DOI: 10.1093/nar/gkw1131.

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 and Cell Physiology, 査読有, 57(5), 953-960.  
DOI: 10.1093/pcp/pcw054.

〔学会発表〕(計 23 件)

梅原未来、舩城桐子、猪狩温、平安山昌史、華岡光正「レトログレードシグナルによる核コ  
ード光合成遺伝子発現制御の多様性」日本植物学会第 82 回大会、広島、2018 年 9 月 16 日

Mitsumasa Hanaoka (招待講演)  
Establishment and evolution of nucleus-chloroplast communication.  
Microbiology Society Annual Conference 2018  
April 12, 2018, Birmingham, UK.

Natsuko Kagawa, Masahumi Henzan, Hiroya Iguchi and Mitsumasa Hanaoka  
Effects of cutting and drying leaves of culinary herbs on contents of bioactive phytochemicals in *Perilla frutescens*.  
255th ACS National Meeting and Exposition  
March 20, 2018, New Orleans, LA, USA.

Mitsumasa Hanaoka (招待講演)  
Nuclear gene regulation by retrograde redox signals.  
CLS International Forum “Redox regulation of transcription, translation and protein folding”  
March 4, 2018, Tokyo, Japan.

片野貴章、雪竹健太郎、高橋広夫、恵良厚子、宮城島進也、今村壮輔、田中寛、華岡光正「単  
細胞紅藻 *C. merolae* における概日時計とオルガネラ機能の相互作用」第 16 回微生物研究会、横  
浜、2017 年 11 月 18 日

猪狩温、梅原未来、華岡光正「葉緑体の光応答タンパク質 CSK による光合成遺伝子発現の  
調節」日本植物学会第 81 回大会、野田、2017 年 9 月 10 日

大原ひかる、安藤洸幸、小林勇氣、今村壮輔、田中寛、五十嵐雅之、内海龍太郎、華岡光正  
単細胞紅藻シゾンの光応答に関わるレトログレードシグナルの解析  
日本植物学会第 81 回大会、野田、2017 年 9 月 8 日

片野貴章、雪竹健太郎、高橋広夫、恵良厚子、宮城島進也、今村壮輔、田中寛、華岡光正「単  
細胞紅藻 *C. merolae* における核とオルガネラ間の概日時計情報伝達の解析」日本植物学会第 81  
回大会、野田、2017 年 9 月 8 日

大原ひかる、安藤洸幸、小林勇氣、今村壮輔、田中寛、五十嵐雅之、内海龍太郎、華岡光正  
「単細胞紅藻 *C. merolae* のレトログレードシグナルに依存した転写制御」第 58 回日本植物生理  
学会年会、鹿児島、2017 年 3 月 16 日

猪狩温、林健太郎、横山栞、安間美里、華岡光正「葉緑体内の光環境に依存した光合成遺伝  
子発現調節における CSK の役割」第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 12 月 2 日

大原ひかる、安藤洸幸、小林勇氣、今村壮輔、田中寛、恵良厚子、宮城島進也、五十嵐雅之、  
内海龍太郎、華岡光正「単細胞紅藻 *C. merolae* の葉緑体から核への光シグナル伝達の解析」第  
15 回微生物研究会、藤沢、2016 年 11 月 5 日

舩城桐子、猪狩温、癸生川奈央子、安間美里、石井健雄、華岡光正「様々な環境下における

プラスチドシグナルに依存した核遺伝子の転写制御」日本植物学会第 80 回大会、沖縄、2016 年 9 月 16 日

Mitsumasa Hanaoka

Chloroplast-dependent nuclear gene regulation: evolution of retrograde signaling.  
The 13th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis  
September 13, 2016, Kyoto, Japan.

他

〔図書〕(計 1 件)

Yuki Kobayashi, Yu Kanesaki, Mitsumasa Hanaoka and Kan Tanaka (2018)  
Control of cell nuclear DNA replication by chloroplast and mitochondrion. In *Cyanidioschyzon merolae: A New Model Eukaryote for Cell and Organelle Biology*, T. Kuroiwa et al. (eds.), Springer Nature Singapore Pte Ltd., Singapore.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.h.chiba-u.jp/lab/tenure/>