

令和元年5月30日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18588

研究課題名(和文)組換えの制御による葉緑体ゲノム安定性維持機構

研究課題名(英文) Mechanisms for maintenance of chloroplast genome stability by regulation of recombination

研究代表者

小田原 真樹 (Odahara, Masaki)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：40460034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：組換え制御を基盤とする葉緑体ゲノム安定性維持機構の解析を行った。葉緑体DNA上に1 kb以上の長い相同配列を導入したが、非常に高頻度に相同配列間の組換えが起きてしまうことが明らかになった。ディープシーケンシングにより葉緑体における組換えを網羅的に同定した結果、RECA2やRECG変異体に蓄積されている組換え体には顕著な位置的かつ方向的偏りが見られ、相同配列の位置との相関は低かった。葉緑体における組換えの制御に関わる可能性のある遺伝子RECXを同定し、RECXの葉緑体局在とRECA2とのタンパク質間相互作用を見出した。しかし変異体や過剰発現体の形態や葉緑体ゲノムに異常は見いだせなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、葉緑体ゲノムの不安定性をもたらす組換えに関して初めてゲノムスケールで解析を行い、ゲノムの構造との関係を明らかにすることができた。低頻度な組換えを核ゲノムあるいはバクテリアにおいてゲノムスケールで解析するのは技術的には難しく、本研究は組換えとゲノム安定性の関係を明らかにするためのモデルとなると考えられる。また、本研究で開発した次世代シーケンシングデータから組換えDNAを同定する情報学的手法は、オルガネラに限らず多くの生物のゲノム解析において有効であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the mechanisms for maintenance of chloroplast (cp) genome stability based on regulation of DNA recombination. We first introduced a pair of long repeats (>1 kb) into the *Physcomitrella patens* cpDNA, and observed that an efficient recombination was occurred between the introduced repeats. Next, we carried out comprehensive analysis of recombination products from cpDNA by deep sequencing and bioinformatics approaches, and showed that the identified recombination products were highly biased in terms of their locations and directions in RECA2 and RECG mutants. We analyzed RECX, a new candidate gene for regulation of recombination in chloroplast. RECX localized to both chloroplast and mitochondrial nucleoids, and interacted with chloroplastic RECA2. However, no significant phenotypes were observed in cpDNA as well as growth and morphology in RECX knockout or overexpression plants.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：葉緑体 ゲノム安定性 相同組換え 反復配列 次世代シーケンシング

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

1. 研究開始当初の背景

植物の葉緑体とミトコンドリアのゲノム DNA には、光合成と呼吸に関わる遺伝子や各オルガネラの内部における転写や翻訳に関わる重要な遺伝子がコードされており、これらオルガネラゲノムの安定的な維持は植物にとって必須である。遺伝子ターゲティングが可能な蕨類ヒメツリガネゴケを用いたこれまでの研究から、動物と菌類には存在せず、植物特異的に核ゲノムに存在している RecA ホモログである RECA1 (ミトコンドリア局在型) と RECA2 (葉緑体局在型)、RecG ホモログである RECG が、ゲノム上の短い散在性反復配列における異常な組換えを抑制することによりオルガネラゲノム安定性の維持において重要な役割を果たしていることを明らかにしている。しかし、RecA と RecG はそれぞれバクテリアの相同組換え修復において DNA リコンビナーゼと DNA ヘリカーゼとして組換えの促進にはたらくタンパク質であり、どのような機構で RECA1, RECA2, RECG が組換えを制御しているのかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

ゲノム改変が可能な葉緑体をモデルとして、ゲノム上に導入した長い人工的相同配列における組換えを解析することにより、相同組換え修復機構による組換え制御と相同配列の長さの関係性を明らかにする。また、相同組換え修復各因子が制御する組換えの詳細を明らかにするため、次世代シーケンシングと情報学的手法により各変異体オルガネラゲノムの解析を行い、変異体それぞれのオルガネラに蓄積されている組換え体を網羅的に同定する。一方、葉緑体オルガネラゲノム維持に関与すると予想される新規遺伝子の探索を行い、分子遺伝学的解析によりその機能、そして既知因子との関係を解析する。これらの解析によって、組換え制御を基盤とする葉緑体オルガネラゲノム維持機構の詳細を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 葉緑体における長い相同配列間の組換えの解析

葉緑体 DNA 上に長い順向きの人工的相同配列 (1 kb 以上) を導入するためのコンストラクトを作製した。コンストラクトは 1 ペアの順向きの相同配列とその間にスペクチノマイシン耐性マーカーを配置したものを基本構造とした。人工的相同配列は葉緑体 DNA の GC 含量に近いシロイヌナズナ核遺伝子由来の配列を用いた。作製したコンストラクトを PEG 法によりヒメツリガネゴケ細胞に導入し、スペクチノマイシンによる選抜を行った。

(2) 次世代シーケンシングによる葉緑体における組換え全体像の解明

リード長 150 bp の Illumina HiSeq X によりヒメツリガネゴケ RECA2、RECG 各遺伝子変異体と野生株オルガネラゲノムのディープシーケンシングを行った。情報学的解析により、得られたリードから組換え体配列を網羅的に同定し、それら組換えの位置と頻度の解析も行った。同時にマッピングによりオルガネラゲノム全体の遺伝子頻度の解析も行い、オルガネラゲノム構造の解析を行なった。

(3) 葉緑体の組換えを制御する新たな因子の探索

葉緑体の組換え制御に関与する可能性がある遺伝子として、バクテリア RecX のホモログ RECX をヒメツリガネゴケの核ゲノムから見出した。この遺伝子の産物に関し、GFP 融合による細胞内局在の解析を行なった。また RECX に関して遺伝子破壊と過剰発現を行い、形態的表現型とオルガネラゲノムへの影響を解析し、オルガネラゲノム維持機構への関与を検証した。大腸菌において RecX は RecA と相互作用する報告があるため、酵母ツーハイブリッド法により RECX と RECA1 や RECA2 との物理的相互作用の検証を行った。

4. 研究成果

(1) 葉緑体における長い相同配列間の組換えの解析

1 kb と 2 kb それぞれの長さの相同配列を 1 ペア持つコンストラクトを PEG 法により葉緑体に導入した。スペクチノマイシンによる選抜の結果、それぞれのコンストラクトについて複数の形質転換体を取得した。ジェノタイピングを行った結果、取得した複数の形質転換体の葉緑体 DNA には、一方の相同配列のみが残された形でホモプラスミックにコンストラクトが挿入されていた。これは、コンストラクトが葉緑体 DNA に組み込まれたものの、組み込まれた相同配列間における組換えによって、一方の相同配列とマーカー遺伝子が抜け出したことを示唆している。葉緑体内部は相同組換え活性が非常に高く、スペクチノマイシン添加による選択圧にも関わらず相同配列間の組換えが起きた葉緑体 DNA が優勢になったと考えられる。

(2) 次世代シーケンシングによる葉緑体における組換え全体像の解明

全 DNA を用いた次世代シーケンシングで得られたリードをマッピングした結果、野生株において葉緑体は約 27000 倍、ミトコンドリアは約 4000 倍のカバレッジとなった。野生株ではリードがオルガネラゲノム DNA 全体にほぼ均一に貼り付いたことから、オルガネラゲノム全体を均一に読むことができたと考えられる。一方で、この均一なリードデプスは、葉緑体は特定の起点からの DNA 複製がメインではなく、相同組換え依存あるいはローリングサークル型複製がメインであることを示唆している。RECA2 変異体の葉緑体では、ゲノム全体的にリードデプスが野生株の半分程度となったことに加え、2 つの小さなピークとそれに付随するデプスの緩やかな傾

斜が観察された。これは相同組換えが欠損したことにより、隠れていた特定の起点からの DNA 複製が顕在化した可能性を示唆している。一方 *RECG* 変異体の葉緑体 DNA にはデプスの減少は観察されず、むしろ部分的なリードデプスの増加と傾斜が観察された。これらの結果は、ゲノム動態における *RECA2* と *RECG* の関与の違いを暗示している。

情報学的解析により、リード中に含まれる組換え DNA の同定を行った。一部が葉緑体 DNA に一致するキメラなリードを集め、その配列の転座先を決定することにより、組換え DNA を網羅的に同定することに成功した。同定した組換え DNA の数は、野生株に対して *RECA2* 変異体で約 4 倍、*RECG* 変異体で約 65 倍多く見出され、それらのほとんどは 2-47 bp の散在性反復配列における組換え体であった。これらの組換えを葉緑体ゲノム上にマップした結果、変異体、特に *RECG* 変異体における組換えの多くがゲノム上に偏って分布し、クラスターを形成していることが明らかになった(図 1)。さらに、これらの組換え体は reciprocal ではなく一方に偏っていることも判明した。このような、変異体の葉緑体における組換えの位置的かつ方向的な偏りは、これまでの予想と異なり、組換えが反復配列の位置よりもむしろゲノム上の位置に依存していることを示唆している。

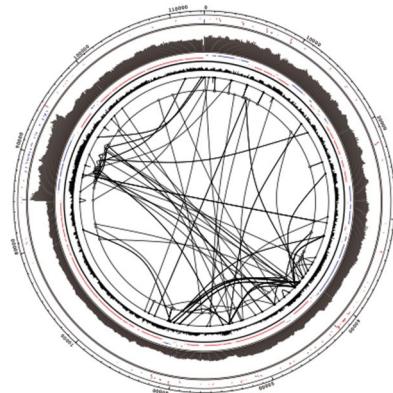


図1 *RECG*変異体葉緑体の組換え全体図
リードとリードから同定した組換え体の葉緑体DNAへのマッピングを行なった。*RECG*変異体葉緑体ではリードデプス(外周)が大きく変化し、組換え体(内周、組換え先を線で繋いだ)は偏って分布する。

(3)葉緑体の組換えを制御する新たな因子の探索

RECX は単細胞緑藻から被子植物まで保存されている遺伝子であり、そのアミノ酸配列は N 末端側を除いてバクテリアの *RecX* に全体的に相同性を示した。GFP を融合した *RECX* はヒメツリガネゴケ細胞内で葉緑体とミトコンドリアの核様体に局在した(図 2)。*RECX* の過剰発現株と遺伝子破壊株を作製して評価を行ったが、いずれもヒメツリガネゴケの生育や形態に大きな影響を及ぼさなかった。しかしながらミトコンドリア DNA の解析を行った結果、散在性反復配列における組換え体が、*RECX* 破壊株では中程度に、過剰発現株では著しく増加していることが明らかになった。一方、これらの株の葉緑体 DNA においては、組換え体の量に変化が見られなかった。酵母ツーハイブリッド法でタンパク質間相互作用を検証した結果、*RECX* と *RECA2*、*RECX* と *RECA1* 間の相互作用が見られた(図 3)。これらの結果は、*RECX* がおそらく *RECA1* の機能抑制を介して組換えを制御することによりミトコンドリアゲノムの安定性を維持していることを示唆する。一方で、*RECX* は葉緑体局在や *RECA2* との相互作用を示したものの、遺伝子破壊株と過剰発現株の葉緑体 DNA への影響は見られていない。*RECX* の葉緑体における役割を明らかにするため、今後ディープシーケンシングによって葉緑体 DNA に生じている低頻度な変異等を解析する必要がある。

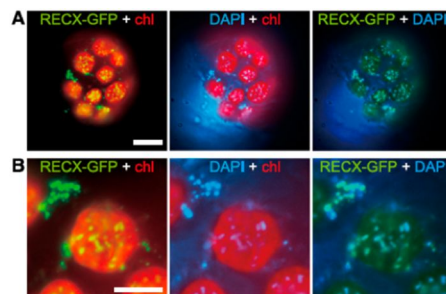


図2 *RECX*-GFPタンパク質の細胞内局在
ヒメツリガネゴケプロトプラスト内で*RECX*-GFPの局在を観察した。*RECX*-GFPの蛍光は葉緑体内の核様体と葉緑体外(ミトコンドリア)の核様体と一致する。文献5より。

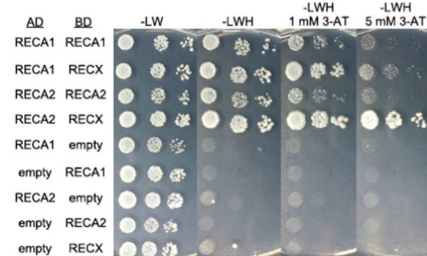


図3 *RECX*と*RECA1*あるいは*RECA2*とのタンパク質間相互作用の検証
酵母ツーハイブリッド法により*RECX*と*RECA1*、*RECX*と*RECA2*の相互作用を検証した。*RECX*は*RECA1*、*RECA2*いずれとも相互作用を示す。文献5より。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6件)

- (1) Kato Y, Odahara M, Fukao Y and *Shikanai T
Stepwise evolution of supercomplex formation with photosystem I is required for stabilization of chloroplast NADH dehydrogenase-like complex: Lhca5-dependent supercomplex formation in *Physcomitrella patens*
Plant Journal (2018) Dec 96(5):937-948. DOI: 10.1111/tpj.14080 査読有
- (2) *Odahara M and Sekine Y
RECX interacts with mitochondrial *RECA* to maintain mitochondrial genome stability.
Plant Physiology (2018) May 177(1):300-310 DOI: 10.1104/pp.18.00218 査読有
- (3) *Odahara M, Kishita Y, *Sekine Y
MSH1 maintains organelle genome stability and genetically interacts with *RECA* and

RECG in the moss *Physcomitrella patens*.

Plant Journal (2017) Aug 91(3):455-465. DOI: 10.1111/tpj.13573 査読有

- (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.

Holliday junction resolvases mediate chloroplast nucleoid segregation.

Science (2017) May 356(6338):631-634. DOI: 10.1126/science.aan0038 査読有

- (5) **Odahara M**, Kobayashi Y, Shikanai T, *Nishimura Y

Dynamic interplay between nucleoid segregation and genome integrity in *Chlamydomonas* chloroplasts.

Plant Physiology (2016) Dec;172(4):2337-2346. DOI: 10.1104/pp.16.01533 査読有

- (6) ***Odahara M**, Inouye T, Nishimura Y and Sekine Y.

PCR-based Assay for Genome Integrity after Methyl Methanesulfonate Damage in *Physcomitrella patens*.

Bio-protocol (2016) 6(19): e1954. DOI: 10.21769/BioProtoc.1954 査読有

*Corresponding author

[学会発表](計 4件)

- (1) **Odahara M** and Sekine Y

RECX Interacts with Mitochondrial RECA to Maintain Plant Mitochondrial Genome Stability

Gordon Research Conference 'Mitochondria and Chloroplasts' (Jul 8-13, 2018, Lucca, Italy)

- (2) **Odahara M** and Sekine Y

Maintenance of mitochondrial genome stability by RECX

10th International Conference for Plant Mitochondrial Biology (May 22-27, 2017, Hangzhou, China)

- (3) 小田原真樹、中村建介、大島拓、関根靖彦

ディープシーケンシングによって明らかになった RECA や RECG 欠損のオルガネラゲノムへの影響

日本植物生理学会年会 (2017年3月16-18日、鹿児島)

- (4) **Odahara M**, Kobayashi Y, Shikanai T, and Nishimura Y

Dynamic interplay between nucleoid segregation and genome integrity through the action of RECA and gyrases in *Chlamydomonas* chloroplasts

17th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas* (June 26-Jul 1, 2016, Kyoto)

6. 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

研究協力者氏名：中村 建介、大島 拓、関根 靖彦

ローマ字氏名：Kensuke Nakamura, Taku Oshima, Yasuhiko Sekine

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。