

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19870033

研究課題名（和文） 葉緑体分裂制御因子の同定と機能解析

研究課題名（英文） Identification and characterization of a chloroplast division protein.

研究代表者

中西 弘充 (NAKANISHI HIROMITSU)

独立行政法人理化学研究所・宮城島独立主幹研究ユニット・ユニット研究員

研究者番号：90443001

## 研究成果の概要：

シロイヌナズナの葉緑体分裂変異株を用いた解析から、9つの新規葉緑体分裂遺伝子を同定した。そのうちの1つは、葉緑体分裂面の決定に必要な植物特異的な遺伝子 MCD1 であった。この遺伝子産物はシアノバクテリアの細胞分裂面決定機構に由来する因子 MinD と相互作用して葉緑体分裂面の決定に関わることがわかった。このことは宿主植物細胞が葉緑体分裂面決定機構を調節するために新たな因子を加えたことを示唆する。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,080,000	324,000	1,404,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,180,000	324,000	2,504,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：植物分子生物・生理学

キーワード：シロイヌナズナ、葉緑体、葉緑体分裂、Min システム、オルガネラ

## 1. 研究開始当初の背景

葉緑体は植物細胞に特有なオルガネラの1つであり、シアノバクテリアの細胞内共生によって生じたと考えられている。葉緑体は分裂によって増殖し、細胞内に維持されるが、その分裂・増殖は宿主植物細胞に支配されている。葉緑体の分裂機構、及びその制御機構を理解することは、シアノバクテリアがどのようにしてオルガネラとして成り立ってきたのかを知ることにつながり、植物細胞独自の成り立ちを考える上でも重要である。

葉緑体の分裂機構は、原核型の分裂装置と真核型の分裂装置の両方が関わっていることが調べられてきた。原核生物の分裂時にリング状に形成される FtsZ が、植物の核ゲノムに見つかり (Osteryoung and Vierling, 1995)、葉緑体の分裂面にリング状に局在することが判明した (Mori et al., 2001)。さらに、原核生物において FtsZ リングの形成を制御する遺伝子群 (minD, minE, sulA) が高等植物の核ゲノムに見つかり、これら遺伝子産物も葉緑体の分裂に関与することが示唆された (Osteryoung and Nunnari, 2003)。これ

に対し、真核生物由来のGTPaseであるダイナミンの一種が、葉緑体分裂面に局在し、分裂に関与することが明らかになった(Miyagishima et al., 2003)。さらに、葉緑体の分裂面にあるリング状の構造、色素体分裂(PD)リングが宿主真核生物由来であることが示唆された(Miyagishima et al., 2001)。

葉緑体の分裂装置構成タンパク質のいくつかは同定されたが、電子顕微鏡で主要な構造として観察されるPDリングの構成タンパク質が未知であること、原核型分裂遺伝子の多くが高等植物の核ゲノムから消失していること(Miyagishima et al., 2005)から、多くの真核由来の分裂装置構成因子が未知であると考えられる。真核由来の分裂装置構成因子、並びにその制御因子を同定することが、植物細胞における葉緑体の増殖制御機構の成り立ちを理解する上で重要である。

1992年にPykeらによって、葉緑体分裂変異株(*arc*: accumulation and replication of chloroplast)が12系統単離され、*ARC3* (Shimada et al., 2004)、*ARC5* (Miyagishima et al., 2003)、*ARC6* (Vitha et al., 2003)、*ARC11* (Fujiwara et al., 2004)の原因遺伝子がそれぞれ同定された。原核型の分裂装置を指標にした逆遺伝学的手法と、葉緑体分裂変異株を用いた遺伝学的手法により、原核型の分裂装置と葉緑体の分裂装置との間に相関があることが明らかにされた。しかし、明らかにされたのは原核型の分裂装置が殆どであり、宿主細胞核が制御する真核型の分裂装置が出揃ったわけではない。さらに、葉緑体分裂変異株が飽和に達しているとは言い難く、実際に、Miyagishimaらは、EMS変異株ライブラリーから葉緑体分裂変異株をスクリーニングし、原核生物由来ではなく、真核由来と考えられる新規因子を同定することに成功している(Miyagishima et al., 2006)。

## 2. 研究の目的

本課題では葉緑体の分裂機構および制御機構について遺伝学的手法を用いた解析を行った。これまでに遺伝学的手法を用いて取られた変異株は、遺伝子の機能を破壊したものの(loss-of-function型)で、構造遺伝子の欠損による葉緑体分裂の阻害を劣性の表現型として捉えてきた。この方法では葉緑体の分裂装置そのものが、近い役割のものしか見つけることができず、調節因子などを見つけるまでに至っていない。そこで、アクティベーションタギングラインによる優性変異株の取得を試みた。この方法は、遺伝子の機能を増強したものの(gain-of-function型)を得ることができ、これまで破壊株のスクリーニングで得ることができなかった調節因子を、優性変異を調べることで見付けだせることが期待できる。また、同時にT-DNA挿入時に産出される劣性変異も得ることもできる。これら変異株を調べるこ

とで、これまで得られなかった制御因子に関する知見が得られることが期待できる。

## 3. 研究の方法

シロイヌナズナアクティベーションタギングラインから、葉緑体の分裂が促進または抑制される変異体をスクリーニングした。単離した変異株を戻し交配し、子孫の表現型から優性変異か劣性変異かを判断した。次にT-DNAの挿入部位をアダプターPCR法およびプラスミドレスキュー法で確認した。表現型とT-DNAが連鎖しているラインについては近隣の遺伝子を現遺伝子の候補とし、連鎖していないラインについては、マップベースクローニング法で原因遺伝子の単離を試みた。

優性変異の場合、葉緑体分裂制御因子候補をシロイヌナズナ野生株で過剰発現し、葉緑体の分裂が促進または抑制されることを確認した。劣性変異の場合、リソースセンターから候補遺伝子のT-DNA挿入ラインの表現型と比較し、一致するか確認した。

劣性変異の場合、変異株(Col-0)を野生株(Ler-0)と交雑し、得られたF2世代を用いて、染色体のどの領域に原因遺伝子座があるのかをDNAマーカーを用いて調べた。狭められた領域に既知の葉緑体分裂因子がある場合、シーケンスで変異を含むか確認した。既知の葉緑体分裂因子と異なる場合、および、近傍に存在しない場合、500から1,000個体のF2世代の植物体を用いて原因遺伝子座の領域をさらに狭めた。80kbから100kbの領域に狭めることができれば、候補となる遺伝子から順にシーケンスし、変異を含むか確認した。アミノ酸置換を引き起こす変異を含む遺伝子を見つけたら、リソースセンターからT-DNA挿入ラインを取り寄せ、構造遺伝子の欠損と表現型が一致するかを確認した。

確認の取れた遺伝子を葉緑体分裂制御因子として以降の解析を行った。葉緑体分裂制御因子の遺伝子破壊株および過剰発現株の葉緑体を比較し、データベース検索による予測等を併せてその機能を推察した。推察した機能並びに細胞内局在をもとに、必要のある遺伝子についてはGFP融合コンストラクトの作製もしくは特注抗体を作製し、その局在を確認した。また、既知の分裂装置構成因子の局在、RNA及びタンパク質の細胞内レベルなどを調べた。

また、シロイヌナズナのcDNAを過剰発現させたFOX(Full length cDNA over-expressor)ラインについても葉緑体分裂変異株のスクリーニングを行い、上記と同様の解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1)葉緑体分裂変異株の単離

約23,000のシロイヌナズナアクティベーションタギングラインと、約15,000のFOXラインから葉

緑体の分裂が抑制された変異株及び促進した変異株を単離した(図1)。その内訳を表1及び表2に示す。全部で74ラインの葉緑体分裂変異株を単離することができた。これら変異株のうち52ラインで原因遺伝子を同定することができ、30ラインが既知の葉緑体分裂因子に変異を持つことが分かった。残り22ラインは新規葉緑体分裂因子であることが分かり、9つの新規葉緑体分裂遺伝子を同定した。



図1：野生株と変異株の葉緑体写真  
野生株の葉緑体（緑色の粒）と比べて、大きくて数が少ない葉緑体分裂抑制株や、小さくて数が増える葉緑体分裂促進株を単離した。スケールバーは10µm

表1：アクティベーションタギングから単離した葉緑体分裂変異株の内訳

	抑制	促進	計
優性	6 (3)	3 (0)	9 (3)
劣性	13 (8)	3 (0)	16 (8)
計	19 (11)	6 (0)	25 (11)

( )の中は既知の分裂装置が関与する数

表2：FOXラインから単離した葉緑体分裂変異株の内訳

	抑制	促進	計
優性	18 (7)	10 (5)	28 (12)
劣性	18 (7)	3 (0)	21 (7)
計	36 (14)	13 (5)	49 (19)

( )の中は既知の分裂装置が関与する数

## (2)MCD1の解析

劣性変異の葉緑体分裂抑制株を用いた解析から、植物特異的な新規葉緑体分裂遺伝子 MULTIPLE CHLOROPLAST DIVISION SITE 1 (MCD1)を同定した。mcd1変異株の葉緑体は、野生株と比べて数が少なく、様々な大きさに巨大化していた。また、野生株の葉緑体では分裂面に1つだけリング状に形成されるFtsZが、変異株の葉緑体では間隔をあけて複数形成されることから、MCD1が葉緑体分裂面の決定に必要であることが分かった。MCD1は葉緑体内包膜に貫通するタンパク質で、葉緑体の分裂面にリング状および表面に分散した点状に局在した。

間接蛍光抗体法により葉緑体分裂面の決定に必要なMinDの局在を観察したところ、MCD1と同様に分裂面および表面に局在することを明らかにした。MCD1を欠損するとMinDが分裂面に局在できなくなることから、MinDの局在にはMCD1が必要であることが分かった。MinDタンパク質量によってMCD1のタンパク質量が増減し、mRNA量に変動がないことから、MinDとMCD1は複合体を形成することで安定化することが考えられた。Yeast two-hybrid assayの結果、MCD1とMinDが結合することが分かり、植物特異的なMCD1がシアノバクテリアに由来するMinDと直接相互作用することで葉緑体分裂面の位置決定を行うことが考えられた。これらの結果は、葉緑体分裂面の位置決定メカニズムにおいて、シアノバクテリアに由来するMinシステムを調節するための新しいタンパク質を、宿主植物細胞が付け加えたことを示唆する(Nakanishi et al., 2009)。

## (3)その他変異株

劣性変異の葉緑体分裂抑制株を用いた解析から、シアノバクテリアから保存される色素体型シャペロニンptCpn60とptCpn60が葉緑体の分裂に必要なであることを明らかにした(Suzuki et al., 2009)。また、gain-of-function型の変異株の解析から、葉緑体分裂の速度を決定する因子や、破壊株では致死となるために解析が困難になる葉緑体分裂に必要な因子を同定することができた(論文投稿中)。残りの新規葉緑体分裂因子については、現在解析中である。

## 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3件)

Hiromitsu Nakanishi, Kenji Suzuki, Yukihiro Kabeya and Shin-ya Miyagishima, Plant-specific protein MCD1 determines the site of chloroplast division in concert with bacteria-derived MinD. Current Biology, 19, 151-156, 2009. 査読有

Kenji Suzuki, Hiromitsu Nakanishi, Joyce Bower, David W Yoder, Katherine W Osteryoung and Shin-ya Miyagishima, Plastid chaperonin proteins Cpn60alpha and Cpn60beta are required for plastid division in Arabidopsis. BMC Plant Biology, 9, 38, 2009. 査読有

Hiromitsu Nakanishi, Kenji Suzuki, Yukihiro Kabeya, Kumiko Okazaki and Shin-ya Miyagishima, Conservation and

differences of the Min system in the chloroplast and bacterial division site placement. Communicative & Integrative Biology, Volume 2, Issue 5, 2009. in press  
査読無

[学会発表] (計 3 件)

中西弘充、宿主真核細胞由来の新規葉緑体分裂因子の同定と機能解析、第 49 回日本植物生理学会、2008 年 3 月 20 日、札幌

中西弘充、The Plant-Specific Protein MCD1 Determines the Site of Chloroplast Division in Concert with Bacteria-Derived MinD. 第 20 回 日本植物形態学会、2008 年 9 月 24 日、高知

中西弘充、植物特異的な MCD1 はシアノバクテリア由来の MinD と相互作用して葉緑体分裂面を決定する、第 50 回 日本植物生理学会、2009 年 3 月 21 日、名古屋

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中西 弘充 (NAKANISHI HIROMITSU)  
独立行政法人理化学研究所・宮城島独立主幹研究ユニット・ユニット研究員  
研究者番号: 90443001

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者