

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：12101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15812

研究課題名（和文）母性遺伝を保障する葉緑体DNAの「組換え抑制」と「選択的複製」の解析

研究課題名（英文）Analysis of maternal inheritance safeguarded by "inhibition of recombination" and "selective replication" in chloroplast DNA.

研究代表者

小林 優介（Kobayashi, Yusuke）

茨城大学・理工学研究科（理学野）・助教

研究者番号：20800692

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：多くの生物で葉緑体は母性遺伝する。クラミドモナスでは、接合後に雄葉緑体DNAが選択的に分解される。本研究で、葉緑体DNAの複製は、一葉緑体あたり約80コピー存在する葉緑体DNAの一部のコピーが何度も鋳型となって複製されることを示唆した。この複製様式は、接合子に雄葉緑体DNAが残存した場合でも、雌葉緑体DNAを選択的に複製することで、母性遺伝を保障すると考えられる。また、接合子特異的な相同組換え因子の発現上昇は、次世代に安定的に葉緑体ゲノムを渡すために重要であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

葉緑体は光合成を行うことで地球上の多くの生命を支えている。葉緑体DNAに外来遺伝子を導入することで多量の有用タンパク質を葉緑体内に蓄積させ、これをワクチンに利用する研究が進んでいる。また葉緑体が母性遺伝するという特徴から、葉緑体DNAに導入した外来遺伝子は花粉などによって野外に拡散されにくいと考えられている。葉緑体DNAの母性遺伝機構を理解すれば、その知見は有用作物の育種技術に応用できると期待される。

研究成果の概要（英文）：Chloroplasts are maternally inherited in many organisms. In *Chlamydomonas reinhardtii*, male chloroplast DNA is selectively degraded during the early stage of zygote maturation. Our study suggests that although there are approximately 80 copies in a chloroplast, limited number of the copies are templated recurrently. This replication system may guarantee maternal inheritance by selectively replicating female chloroplast DNA even when male chloroplast DNA remains in the zygote. We also show that zygote-specific homologous recombination factors are important to stabilize the chloroplast genome to the next generation.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：母性遺伝 クラミドモナス モノプラズミー 相同組換え

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアや葉緑体には独自のゲノム DNA が存在し、細胞核とは異なった複製・遺伝様式を示す。多くの真核生物では、これらオルガネラ DNA はメンデルの遺伝法則から逸脱し、片親からのみ次世代に遺伝する(母性遺伝)。母性遺伝は、配偶子間で細胞サイズに差がない同型配偶子同士の生殖でも観察される。つまり、母性遺伝は積極的に雄由来のオルガネラ DNA を排除し、雌由来のものを保護・複製する分子機構に裏付けられた現象である。しかし、母性遺伝に関する分子レベルでの理解は乏しい。

2. 研究の目的

同型配偶子で生殖を行う緑藻クラミドモナスでは接合子形成約 90 分後にオスの葉緑体 DNA が選択的に分解されることが知られている。さらに本研究では、同生物の接合子で観察される葉緑体 DNA の「組換え抑制」と「選択的複製」が母性遺伝を担保することを示し、母性遺伝の新奇モデルを提唱することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 葉緑体 DNA の複製機構の解析: 1つの葉緑体には約 80 コピーの相同な葉緑体 DNA が存在する。母性遺伝は、雄 DNA の選択的分解に加え、雌葉緑体 DNA が選択的に複製されることが重要だと考えられている。しかし、葉緑体 DNA の複製機構は理解が進んでいない。葉緑体 DNA の複製様式には、いくつかのモデルが考えられる。一つ目は、特定の DNA のみが何度も鋳型になる「選択的複製様式」、もう一つは、不特定多数の DNA がランダムに鋳型となる「非選択的複製様式」である。まず、葉緑体 DNA の複製機構に関する知見を得るために、接合子成熟を制御するホメオボックス遺伝子 *GSP1* の変異体を解析することにした。*gsp1* 変異体では接合子において雄葉緑体 DNA が分解されず、接合子成熟が停止し、栄養二倍体として増殖をする(Nishimura et al., Plant Cell 2012)。これまで栄養二倍体は両親の葉緑体 DNA が両性遺伝すると考えられていた。しかし我々は、栄養二倍体が分裂を続けると、集団としては両親の葉緑体 DNA を有するが、それぞれの細胞は雄または雌由来の葉緑体 DNA のみ有するホモプラズミー状態になることが分かった。このホモプラズミー化現象が起こる世代数を調べることで葉緑体 DNA 複製機構の一端を理解できるのではないかと考えた。例えば、ホモプラズミー化が数回の細胞分裂後に起こった場合、雌雄どちらかの DNA のみ(特定の DNA のみ)が複製される「選択的複製様式」が有力だと示唆される。本研究では、パスツールピペットの先端を熱しながら引き伸ばしたガラス管を作成し、このガラス管で顕微鏡下の接合子を単離した。栄養二倍体の葉緑体 DNA が雌雄どちらの由来か調べるために、雌雄それぞれに特異的なプライマーを作成した。DNA 抽出法、PCR 酵素と伸長条件を検討し、20 万コピーに混在する 1 コピーの雌または雄葉緑体 DNA を検出する実験系を確立した。

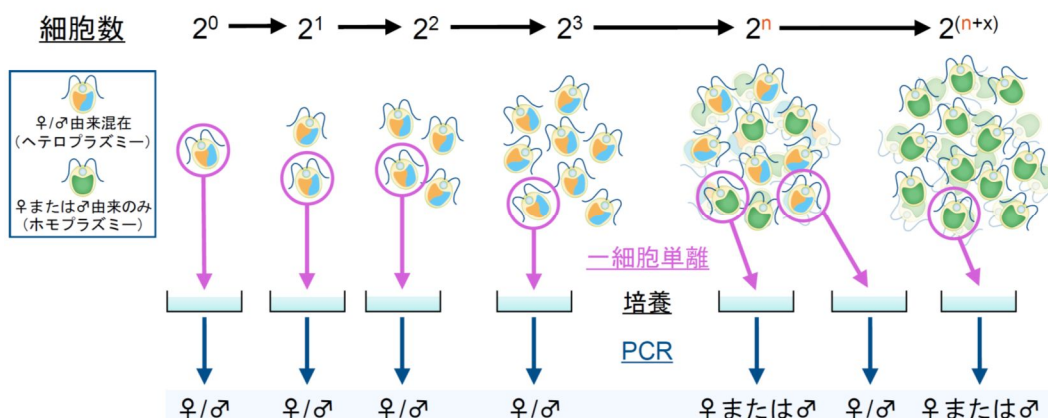


図 1、栄養二倍体でホモプラズミー化が起きる世代を明らかにする実験概略図。

(2) 葉緑体組換え因子と母性遺伝の関係性: 栄養細胞において RECA は葉緑体 DNA の相同組換え・ゲノムの安定性に関わる。接合子において RECA は発現が亢進するが、その意義は不明であった。そこで RECA と、その他の葉緑体ゲノムの維持に関わる遺伝子との多重変異体において母性遺伝が攪乱されるか調べた。各遺伝子の破壊株は米国のストックセンターから取り寄せたり、ゲノム編集技術によって独自に作成した。変異体で父性遺伝が起きるか調べるために、雄の葉緑体 DNA に *aadA* (スペクチノマイシン耐性) 遺伝子とルシフェラーゼ遺伝子を導入し、交配を行い、これらの雄葉緑体 DNA に組み込まれた遺伝子が次世代に遺伝するかどうかで調べた。

4. 研究成果

(1) 葉緑体 DNA の複製機構の解析：一細胞単離と PCR によるジェノタイピングを行い、ホモプラズミー化のタイミングを調べたところ、初期の分裂段階で、雄または雌葉緑体 DNA のみを持つことがわかった。これは、葉緑体 DNA は一部のコピーが何度も鋳型になることで複製されていること（選択的複製）を示唆している。もし、分解から逃れた雄葉緑体 DNA が接合子に残存した場合でも、雌葉緑体 DNA を選択的に複製することで、母性遺伝は保障されている可能性を示唆する。今後、共同研究として数理モデル化を行い、具体的な鋳型となる葉緑体 DNA のコピー数を明らかにしていくとともに、メチル化などの修飾が複製様式に影響を与えるか調べていく。

(2) 葉緑体組換え因子と母性遺伝の関係性：変異体同士で交配をすると、スペクチノマイシンに耐性を持つ子孫が高頻度で現れた。しかし、PCR による解析の結果、薬剤耐性をもつ株からは *aadA* やルシフェラーゼ遺伝子は検出されなかった。スペクチノマイシンは原核型翻訳装置を阻害する。つまり、これらの耐性株は、*aadA* を父性遺伝で獲得したのではなく、葉緑体 DNA のリボソーム遺伝子が変異を蓄積することで誕生したと考えられる。この結果は、有性生殖過程では、栄養細胞に比べて葉緑体ゲノムが変異を蓄積させやすく、この接合子特異的な組換え因子の発現は、次世代に安定的に葉緑体ゲノム情報を受け渡すために重要であることを示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takusagawa Mari, Kobayashi Yusuke, Fukao Yoichiro, Hidaka Kumi, Endo Masayuki, Sugiyama Hiroshi, Hamaji Takashi, Kato Yoshinobu, Miyakawa Isamu, Misumi Osami, Shikanai Toshiharu, Nishimura Yoshiki	4. 巻 118
2. 論文標題 HBD1 protein with a tandem repeat of two HMG-box domains is a DNA clip to organize chloroplast nucleoids in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2021053118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Yusuke, Odahara Masaki, Sekine Yasuhiko, Hamaji Takashi, Fujiwara Sumire, Nishimura Yoshiki, Miyagishima Shin-ya	4. 巻 184
2. 論文標題 Holliday Junction Resolvase MOC1 Maintains Plastid and Mitochondrial Genome Integrity in Algae and Bryophytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1870 ~ 1883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.20.00763	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohbayashi Ryudo, Hirooka Shunsuke, Onuma Ryo, Kanesaki Yu, Hirose Yuu, Kobayashi Yusuke, Fujiwara Takayuki, Furusawa Chikara, Miyagishima Shin-ya	4. 巻 11
2. 論文標題 Evolutionary Changes in DnaA-Dependent Chromosomal Replication in Cyanobacteria	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshitaka Kamimura, Yusuke Kobayashi, Yoshiki Nishimura	4. 巻 85
2. 論文標題 Dynamic Motion of Chloroplast Nucleoids Captured by the Microfluidic System	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cytologia	6. 最初と最後の頁 177-178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小林優介
2. 発表標題 Holliday junction resolvase MOC1 mediates plastid and mitochondrial genome segregation
3. 学会等名 IRN日仏研究交流（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林優介
2. 発表標題 葉緑体核様体の分子構造と進化に関する研究
3. 学会等名 令和2年度茨城大学学長学術表彰 表彰式・受賞記念講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林優介
2. 発表標題 Holliday junction resolvase MOC1 maintains plastid and mitochondrial genome integrity
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石原静圭、坂下幸汰、石田悠介、木森義隆、西村芳樹、小林優介、岩淵功誠、西村いくこ
2. 発表標題 苔類ゼニゴケにおける葉緑体核様体の新奇光応答反応 光分散・暗集合反応
3. 学会等名 2020近畿植物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浜地貴志、小林優介、山岡尚平、鹿内利治、西村芳樹
2. 発表標題 陸上植物系統において真核生物型DNAリガーゼIが葉緑体局在を獲得した分子基盤
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関