

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22770061

研究課題名（和文）葉緑体核様体の形態変化から探る DNA の分配機構

研究課題名（英文）Analyses of segregation of chloroplast nucleoids

研究代表者

壁谷 如洋 (KABEYA YUKIHIRO)

国立遺伝学研究所・新分野創造センター・特任研究員

研究者番号：20462674

研究成果の概要（和文）：

本研究では、シロイヌナズナの葉緑体核を構成するタンパク質を同定し、その中で量が多く機能未知であるcpNUC1とcpNUC3について解析を行った。cpNUC1は、in vitroでDNAを凝集する能力のあるタンパク質、すなわち葉緑体核を形作るために必要なタンパク質であることを明らかにしたが、DNA分配への関与は見られなかった。また、cpNUC3はリボソームRNAのプロセシングに関わることを明らかにしたが、同様にDNA分配への関与は見られなかった。加えて、葉緑体DNA複製制御がレドックスによって制御されていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： In this study, 41 proteins were identified as chloroplast nucleoid-associated proteins by LC-MS/MS analyses. And then, I analyzed about two high content unknown function proteins, cpNUC1 and cpNUC3. I found that (1) cpNUC1 protein has an ability of DNA compaction in vitro but is uninvolved in the cpDNA segregation, and that (2) cpNUC3 is involved in hidden break of rrn23 RNA but is uninvolved in the cpDNA segregation. In addition, I revealed that chloroplast DNA replication is regulated by the redox rather than chloroplast division/cell cycle.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：葉緑体・核様体・DNA分配・DNA複製

1. 研究開始当初の背景

植物の細胞内小器官である葉緑体は、光合成や様々な代謝の場として重要な役割を担っている。葉緑体はシアノバクテリアの

祖先が共生したことにより誕生した細胞内小器官であり、シアノバクテリアに由来したDNAを持つ。シアノバクテリアがコードしていた遺伝子の多くは進化の過程で失

われ、また細胞核に移行し、現在では多くても 200 遺伝子程度しかコードしていない。しかし、いまだ葉緑体 DNA には光合成関連タンパク質やリボソームなどの遺伝子発現系がコードされている。そのため、葉緑体の分裂の際に葉緑体の機能発現に必須である葉緑体 DNA を娘葉緑体に確実に葉緑体 DNA を分配する必要がある。しかし、現在葉緑体 DNA の分配に関する知見はほとんど無い。

DNA の分配に関して研究が進んでいる大腸菌を見てみると、細胞分裂と DNA 分配は共役しており、細胞分裂のチェックポイントとして DNA の複製や分配が存在している。大腸菌等の原核生物の細胞分裂および DNA 複製・分配に関するタンパク質のオーソログを植物ゲノム上で探索すると、葉緑体分裂や DNA 複製に関与する原核生物由来の遺伝子はいくつか確認されるが、DNA 分配に関わる遺伝子に関しては見つからない。また、既知の葉緑体の DNA 結合タンパク質は bZIP や AT-hook など細胞核で働く DNA 結合タンパク質のモチーフを持ち、これらはシアノバクテリアに起源を求めることが出来ない。このことから、葉緑体は原核生物とは異なる DNA 分配機構を獲得したと推測される。

通常、葉緑体 DNA は葉緑体 1 個あたり 100 コピー以上存在し、葉緑体内では数十の顆粒として存在している。この顆粒は、DNA と多くのタンパク質からなる「核様体」と呼ばれる複合体である。核様体は顆粒状に葉緑体中に散在するため、以前は葉緑体は積極的に核様体の分配を行わないと考えられていたが、最近分裂中のダンベル型の葉緑体の核様体が網目状に形態を変えていることが明らかになった。この観察は、核様体の網目状への形態変化によって、葉緑体 DNA が葉緑体中にまんべんなく広がり、葉緑体の分裂面の狭窄によって確実に娘葉緑体へと葉緑体 DNA が分配されるようになるという、DNA 分配機構の存在を示唆する。すなわち、この核様体の形態変化

が、葉緑体 DNA 分配機構そのものであると言える。さらに、次ページに書くが、最近の申請者の研究で、葉緑体分裂と DNA 分配が共役している可能性を示唆する結果が得られ、徐々に葉緑体 DNA 分配機構分配の情報が得られてきている。

申請者は、葉緑体分裂機構の解明のため、葉緑体分裂異常変異体の解析を行ってきた。その変異体では、葉緑体分裂異常の他に葉緑体核様体の形態異常も同時に観察された。詳細に解析してみると、この変異体の原因タンパク質である YLMG1 タンパク質は、葉緑体核様体の形態に関与しており、YLMG1 タンパク質量の変化によって引き起こされる核様体の形態異常が、結果的に葉緑体分裂阻害を起こしていることが明らかになった。YLMG1 過剰発現体で見られる核様体の形態は、葉緑体分裂時に見られる網目状の形態に似ており、葉緑体分裂が核様体の形態変化、いわゆる葉緑体 DNA 分配と共役していることを示す。この研究成果から、葉緑体分裂における DNA の分配（核様体の形態変化）の重要性が示されたが、以前として葉緑体 DNA 分配機構の実体は謎に包まれている。

2. 研究の目的

葉緑体 DNA 分配を理解するには、核様体の形態変化の分子機構を理解する必要があり、それにはまず核様体を形作る因子を理解する必要があるとの考えに至り、ようやく葉緑体 DNA 分配機構の解明までの道筋が見えてきた。すなわち、核様体の形態に関わる因子を同定することが、葉緑体 DNA 分配機構の解明に繋がる。本研究では、(1)シロイヌナズナの変異体ラインから葉緑体核様体の形態異常変異体を探索し、核様体を形作る因子を同定するとともに(2)葉緑体分裂時に量変動する核様体タンパク質を質量分析によって同定する。この遺伝学的手法および生化学的手法という異なる手法によって葉緑体核様体の形態に関与する因子の同定を目指す。さらに、(3)同定

されたタンパク質の機能を遺伝学と生化学的手法により解析を行い、葉緑体核様体の形態変化、つまり DNA 分配への関与と役割を明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

(1)陸上植物シロイヌナズナを材料に、すでに整備済みの葉緑体タンパク質遺伝子の変異体ラインの播種後3週間の植物体の葉を DNA 染色試薬である DAPI で染色、蛍光顕微鏡で観察して、葉緑体核様体の形態が通常の顆粒状とは異なる形態になっている変異体を探索し、その原因遺伝子を同定する。また、葉緑体核様体を単離・精製し、質量分析 (LC-MS/MS) によって構成タンパク質を同定する。遺伝学と生化学的手法を用いて葉緑体核様体を形作る因子の同定を行う。それぞれから同定されたタンパク質に関しては、核様体への局在および DNA 結合性を検討する。(2)紅藻シアニディオシゾンを用いて、明暗周期で培養を行い細胞周期の同調を行う。シアニディオシゾンを始め藻類では細胞周期の S 期に葉緑体が分裂するので、S 期の細胞および葉緑体分裂が完全に終了している M 期の終期の細胞から葉緑体を単離し、さらに葉緑体核様体を単離精製し、SDS-PAGE によってそれぞれの核様体に含まれるタンパク質量の比較を行い、量に変動があったタンパク質を質量分析によって決定する。シロイヌナズナとシアニディオシゾンの核様体に共通して見られる因子を、葉緑体 DNA 分配関連因子の候補と考え、(3)それらのタンパク質をコードする遺伝子の欠損または過剰発現したシロイヌナズナを入手または作製し、葉緑体核様体の形態変化への影響を調べる。また、それぞれのタンパク質の相関関係を調べ、葉緑体 DNA 分配への関与を理解する。

4. 研究成果

(1)シロイヌナズナの葉緑体タンパク質遺伝子欠損変異体ラインから葉緑体核様体の形

態が異常な変異体の探索を行ったが、変異体は得られなかった。変異体は得られなかった原因として、今回使用した葉緑体タンパク質遺伝子変異体ラインに問題があったと考えられる。葉緑体で機能することが予測された

表 1

cpNUC	AGI	GI Number	Annotation	MW	Mascot score	peptide	Localization
1	AT3G46780	gi 42565672	PTAC16 (nucleoside-diphosphate-sugar epimerase)	54325	952	15	cp-nuc
2	AT3G10690	gi 6630561	GyrA	100341	807	12	cp-nuc
3	AT5G63420	gi 42568733	emb2746 (RNase J)	110161	730	12	cp*
4	AT1G65260	gi 18408237	PTAC4 (PspA/IM30 family protein, viPP1)	36541	714	10	cp-nuc
5	ATCG00170	gi 7525023	RpoC2	157237	646	11	cp-nuc
6	AT1G73990	gi 6690270	SppA (serine-type endopeptidase)	75724	604	9	cp-thy
7	ATCG00190	gi 2196464	RpoB	122246	580	9	cp-nuc
8	AT1G69200	gi 1232593	putative fructokinase	69564	529	7	cp-nuc
9	AT3G26650	gi 166704	GAPA-1	42766	480	8	cp
10	AT3G04260	gi 15229259	PTAC3 (SAP domain-containing protein)	103681	478	6	cp-nuc
11	AT1G12900	gi 15222111	GAPA-2	43105	451	8	cp
12	AT1G60030	gi 5902381	Similar to DNAJ proteins	54481	448	8	cp-thy
13	ATCG00180	gi 1525024	RpoC1	79502	377	5	cp-nuc
14	AT3G06730	gi 15230779	thioredoxin family protein	20828	375	5	cp-nuc
15	AT4G39960	gi 4490747	DnaJ-like protein	42891	346	4	cp-thy
16	AT5G04130	gi 3955568	GyrB	84618	336	6	cp-nuc
17	ATCG00740	gi 1232595	RpoA	38398	323	5	cp-nuc
18	AT2G02740	gi 42568881	PTAC11 (WHY3)	29766	306	4	cp-nuc
19	AT3G48500	gi 42565717	PTAC10 (S1 domain-containing protein)	79107	308	4	cp-nuc
20	AT4G13670	gi 4455296	PTAC5 (peptidoglycan binding domain)	49754	297	5	cp-nuc
21	AT1G74850	gi 15221411	PTAC2 (PPR protein)	97120	289	4	cp-nuc
22	AT1G42970	gi 336390	GAPB	43168	264	5	cp
23	AT3G40900	gi 15232415	pkfB-type carbohydrate kinase	54032	254	3	cp-nuc
24	AT4G20130	gi 42566980	PTAC14 (SET domain-containing protein)	55917	244	4	cp-nuc
25	AT2G05620	gi 18396137	PGRS	14398	180	2	cp-thy
26	AT5G01590	gi 7327818	hypothetical protein	65083	178	3	cp-env
27	AT2G44640	gi 15146246	PDE320 homolog (acylglycerol transport)	49932	175	3	cp-env
28	AT2G22360	gi 1839949	DNAJ heat shock protein	49358	158	2	cp-thy
29	AT5G51100	gi 2072626	FSD2	17792	150	2	cp-nuc
30	AT2G34640	gi 39104570	PTAC12	61142	149	2	cp-nuc
31	AT3G04590	gi 6175163	unknown protein	61142	149	2	nuc*
32	AT1G31660	gi 18395008	PTAC6	37525	115	2	cp-nuc
33	AT1G09340	gi 2765081	CSP41B	42824	114	1	cp
34	AT1G10522	gi 18391169	unknown protein	20524	107	2	cp*
35	AT3G09210	gi 8478916	PTAC13 (KOW domain-containing protein)	37508	106	2	cp-nuc
36	AT5G54180	gi 15239573	PTAC15 (mTERF-related protein)	56770	99	1	cp-nuc
37	AT2G32180	gi 15225202	PTAC18	16546	73	1	cp-nuc
38	AT5G20220	gi 18420148	zinc knuckle protein	45393	66	1	nuc*
39	AT5G23310	gi 15237281	FSD3	30512	61	1	cp-nuc
40	AT5G24314	gi 22327025	PTAC7	18891	57	1	cp-nuc
41	AT5G26742	gi 3775987	RNA helicase	81475	50	1	cp-st

図 1

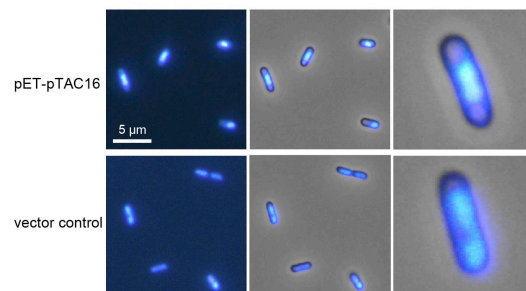
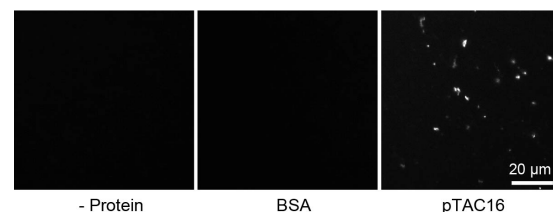


図 2



タンパク質遺伝子について変異体を取り寄せたが、変異体が存在しないもの、ホモ変異体が得られなかったものが少なからずあり、それによって不完全な変異体ラインを用いてスクリーニングを行うことになった。一方、生化学的手法では、シロイヌナズナ葉緑体核

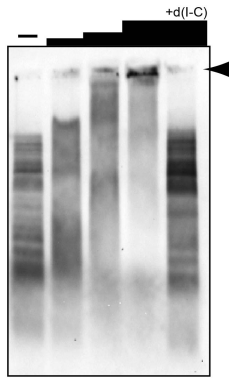


図3 pTAC16のゲルシフト解析

様体を構成するタンパク質を41個同定することができた(表1)。また、その中で核様体中に多く存在したpTAC16タンパク質(cpNUC1)およびcpNUC3タンパク質について解析した。pTAC16は、大腸菌で発現すると大腸菌核様体が小さく凝縮したような形態に変化した(図1)。また、in vitroで葉緑体DNAと組換えpTAC16タンパク質を混ぜると、葉緑体DNAは凝集し核様体様構造を再構成することを明らかにした(図2)。また、DNA結合性についてさらにゲルシフト解析を行ったところ、pTAC16タンパク質は配列非特異的にDNAに結合することが明らかになった(図3)。しかし、pTAC16を欠損および過剰に発現した変異体では葉緑体核様体の形態に変化が見られず、DNA分配への関与は見られなかった。

また、比較的核様体に多く存在したcpNUC3タンパク質について解析した。cpNUC3はRNaseJドメインを持つタンパク質である(以降RNJとする)。抗体を作製し、ウエスタンブロットおよび免疫蛍光染色によってRNJの局在を調べたところ、葉緑体核様体に局在す

図4

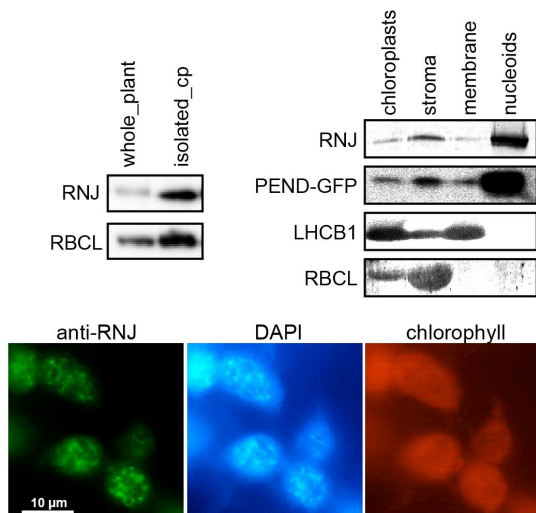
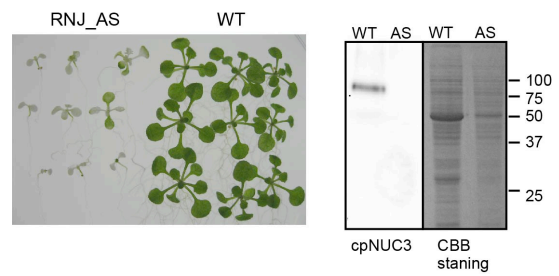


図5



ることが確認できた(図4)。RNJのT-DNA挿入変異体は胚性致死を示すことから、アンチセンスRNAによる発現抑制株を作製したところ、白化した変異体を得られた(図5)。葉緑体のDNA分配異常によるものかどうかを調べるために、サイバーグリーンでDNAを染色し、発現抑制株の葉緑体のDNA量を調べた。しかし、全ての葉緑体に等量のDNAが存在していたため、DNA分配に異常は見られなかった。

図6

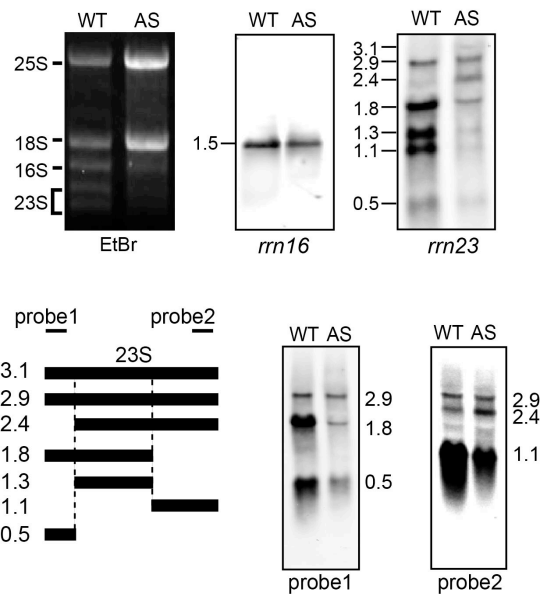
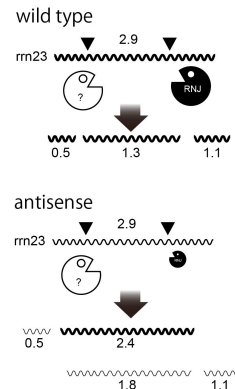


図7



白化した表現型の原因を調べるため、RNAによるブロット解析を行ったところ、リボソームRNAのプロセッシングに異常があることが確認された(図6)。この結果から、RNJタンパク質はrrm23のhidden breakに関与すること

が示唆された (図 7)。

(2) シアニデオシゾンの葉緑体核様体タンパク質の同定を試みたが、単離したシアニデオシゾンの葉緑体核様体は葉緑体膜タンパク質、特にフィコビリソームの混入が多く、信頼性が低いデータしか得られず、その後の解析を行うことができなかった。

一方、計画には無かったが、DNA 分配と密接な関係である DNA 複製について解析を行った。その結果、葉緑体 DNA 複製は葉緑体分裂や細胞周期とは関係ないこと、細胞内が還元状態にあるとき (光が当たって光合成しているときなど) 葉緑体 DNA は複製され、酸化状態にあるとき (暗所で光合成が行われていないとき) DNA は複製されないこと、人為的に細胞内レドックスを還元的に変えることで、光合成非依存的に葉緑体 DNA が複製されることを明らかにし、葉緑体 DNA 複製は葉緑体の分裂や細胞周期とは関係なく細胞内レドックスによって制御されていることが示された。

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 6 件)

- ① Kabeya, Y. and Miyagishima, S. (2013) Chloroplast DNA replication is regulated by the redox state independently of chloroplast division in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.*, 査読有 161, 2102-2112
- ② Mogi, Y., Hamaji, T., Suzuki, M., Ferris, P., Mori, T., Kabeya, Y., Miyagishima, S., and Nozaki, H. (2012) Evidence for tubular mating structures induced in each mating type of heterothallic GONIUM PECTORALE (Volvocales, Chlorophyta). *J. Phycol.* 査読有 48, 670-674.
- ③ Miyagishima, S., Suzuki, K., Okazaki, K., and Kabeya, Y. (2012) Expression of the nucleus-encoded chloroplast division genes and proteins regulated by the algal cell cycle. *Mol. Biol.*

Evol. 査読有 29, 2957-2970

- ④ Miyagishima, S., Nakanishi, H., and Kabeya, Y. (2011) Structure, regulation, and evolution of the plastid division machinery. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* 査読有 291, 115-153.
- ⑤ Miyagishima, S. and Kabeya, Y. (2010) Chloroplast division: squeezing the photosynthetic captive. *Curr. Opin. Microbiol.* 査読有 13, 738-746.
- ⑥ Kabeya, Y., Nakanishi, H., Suzuki, K., Ichikawa, T., Kondou, Y., Matsui, M., and Miyagishima, S. (2010) The YlmG protein has a conserved function related to the distribution of nucleoids in chloroplasts and cyanobacteria. *BMC Plant Biol.* 査読有 10, 57-69

[学会発表] (計 3 件)

- ① 壁谷如洋、宮城島進也 (2013 年 3 月 22 日) 葉緑体 DNA 複製のレドックス制御、第 54 回日本植物生理学会年会 (岡山大)
- ② 壁谷如洋、宮城島進也 (2012 年 3 月 17 日) 葉緑体 DNA 複製制御の解析、第 53 回日本植物生理学会年会 (京都産業大)
- ③ 壁谷如洋、鈴木健二、宮城島進也 (2010 年 3 月 18 日) 葉緑体プロテオームを基盤とした逆遺伝学的解析および質量分析による葉緑体核様体タンパク質の同定、第 51 回日本植物生理学会年会 (熊本大)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

壁谷 如洋 (KABEYA YUKIHIRO)

国立遺伝学研究所・新分野創造センター・特任研究員

研究者番号：20462674

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし