

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770037

研究課題名(和文)クロマチン免疫沈降法を利用した色素体分化機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of plastid differentiation by chromatin immunoprecipitation

研究代表者

華岡 光正 (HANAOKA, MITSUMASA)

千葉大学・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) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、クロマチン免疫沈降(ChIP)法を用いて多様な色素体分化の分子機構を明らかにすることを目的とした。葉緑体分化をより高い時間分解能で捉えるため、シロイヌナズナT87培養細胞を用いた分化誘導系を構築し、分化に関わるシグマ因子の標的プロモーターの認識における役割分担の一端について明らかにした。また、これまで研究の立ち遅れていた非光合成色素体アミロプラストへの分化に際した遺伝子発現調節メカニズムについても、分化に関わる転写因子の候補の特定など、一定の知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to further clarify molecular mechanisms of plastid differentiation by the use of chromatin immunoprecipitation (ChIP)-based method. We here established a novel induction system of chloroplast differentiation using Arabidopsis thaliana T87 suspension cultured cells, and examined functional roles of plastid sigma factors during chloroplast differentiation. Furthermore, transcriptional regulation during amyloplast differentiation has been also characterized.

研究分野：植物分子生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、植物分子生物・生理学

キーワード：色素体分化 葉緑体 ChIP法 シグマ因子 T87細胞

1. 研究開始当初の背景

色素体は植物細胞に特有のオルガネラであるが、そこには光合成など多くの重要な代謝経路が局在しており、植物の独立栄養性や生産力を支えている。色素体は、組織や細胞の分化に応じて、あるいは環境変化にตอบสนองして、光合成組織では葉緑体、貯蔵組織ではアミロプラストなど、構造・機能的に多様に分化することが知られている。この分化過程においては、核と色素体に分かれてコードされている遺伝子の協調的な発現が重要な役割を果たすと考えられている。これまでに、色素体分化に際した遺伝子の発現制御、特に転写段階での調節機構については、国内外で活発に研究が進められてきたが、分子遺伝学的・生化学的手法をベースとした従来のアプローチでは、分化という動的な現象を明確に捉えることは難しく、全体像の理解に限界があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、転写制御因子のターゲットのみならず、それらの *in vivo* での挙動をリアルタイムにモニターすることのできるクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法を利用して、色素体分化における転写制御機構の実体を明らかにすることを目的とした。また、葉緑体に加え、他の非光合成色素体への分化制御系もあわせて解析することで、多様な色素体分化プログラムの全体像の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 植物個体を用いる場合と比較してより時間分解能の高い解析を行うため、シロイヌナズナ T87 培養細胞を用いた葉緑体分化誘導系の確立を行った。

(2) 葉緑体分化に関与する既知の制御因子 SIG2、SIG6 の動きを ChIP 解析によって *in vivo* で追うための実験系の構築を進めた。

(3) アミロプラストやクロモプラストなど、非光合成色素体への分化について基盤情報を得るため、これらの色素体に分化する際に発現する遺伝子やその転写に関わる制御因子の探索を行った。

(4) ChIP の汎用性を高めるため、葉緑体の他のシグマ因子のターゲット遺伝子の特定を進めた。特に概日時計に依存した転写制御に関わる SIG5 のターゲットプロモーターの探索を行った。

4. 研究成果

(1) 葉緑体分化の過程を詳細に調べるため、均一なサンプルを得やすく、経時的な回収が

容易なシロイヌナズナの葉組織に由来する T87 培養細胞を研究材料として用いた。まず、T87 細胞を用いた葉緑体分化誘導系の構築を行った。通常は連続光条件下で培養する T87 細胞を 4 週間暗条件下で培養したところ、クロロフィル含量が段階的に減少し、原色素体への脱分化が起こったと考えられた。さらに 4 週間の暗順応により白化した細胞に白色光を再照射した結果、クロロフィルの再蓄積が観察された。同時に、この光を再照射した細胞を経時的に回収し、ノザン解析により様々な遺伝子の発現量の変化を調べた結果、核遺伝子である SIG2 と SIG6 に加えて、葉緑体ゲノムコードの光合成遺伝子である *psbD* や *rbcL* の発現が活性化することを見いだした。以上の結果から、T87 細胞を用いた有効な分化誘導系が構築できたものと考えられた。

(2) T87 細胞における DNA-タンパク質間の結合を ChIP 法によって検出できるかを検討した。葉緑体分化の後期で機能することが予想されるシグマ因子 SIG1 の、T87 細胞における標的プロモーターへの結合パターンを調べたところ、緑葉組織を用いて行った以前の結果と相関しており、T87 細胞を用いた ChIP 解析が有効であることが示唆された。続いて、C 末端に FLAG タグが付加された SIG2・SIG6 タンパク質を発現する組換え T87 細胞株を作出し、まずは葉緑体分化過程における SIG2 の蓄積量をイムノプロット解析により調べた結果、光照射に伴い確かに発現が増加していることが示された。また ChIP 解析を行った結果、葉緑体分化に伴った SIG2 の *trnV* プロモーター領域への結合が示され、欠損変異株を用いて行った以前の結果との相関が見られた。しかしながら、現時点では ChIP による高い DNA の回収量が得られておらず、さらなる実験系の改良が必要と考えられた。

(3) 光合成能を持つ葉緑体と比較して、非光合成色素体への分化については不明な点が多い。そこで、非光合成色素体の一種であるアミロプラストに着目して、分化に際した転写制御について検討を行った。アミロプラストへの分化過程を詳細に調べるため、シロイヌナズナの根由来の培養細胞 Alex を用いた。分化誘導条件を詳細に検討した結果、ショ糖濃度 0.2% の培地に継代してから 72 時間後にショ糖濃度を 3% に上昇させることで、デンプンが蓄積し分化が誘導されることを見出した。そこで、72 時間目の細胞をアミロプラスト分化前、84 時間目の細胞を分化後とし、マイクロアレイ解析により遺伝子発現パターンを調べた。その結果、シロイヌナズナ全遺伝子のうち 84 時間目で 7 倍以上発現が増加した遺伝子が約 2%、減少した遺伝子が約 3% あり、これら遺伝子産物がアミロプラスト分化に関わる可能性が示唆された。この中には転写調節因子も多数含まれており、分化の鍵因子である可能性も考えられたため、

解析をさらに進めている。

(4) 核を中心に形成される概日時計の情報がどのように光合成器官である葉緑体に伝えられるかを明らかにするため、概日時計に依存した転写調節に関わるシグマ因子 SIG5 の機能解析、特に ChIP 法を用いた SIG5 の葉緑体ゲノム上の新規ターゲットの探索を行った。これまでに、光化学系 II 複合体の D2 タンパク質をコードする *psbD*-BLRP が SIG5 の標的の一つであることが明らかにされているが、SIG5 が他の葉緑体遺伝子の発現調節にも関与していることが期待されたため、ChIP 解析によってゲノムワイドに調べた。その結果、*psaAB* や *psbBT* など他の光合成遺伝子のプロモーターにも SIG5 が結合していることが示され、SIG5 が幅広い光合成遺伝子の発現を調節することで昼夜のサイクルに適応していることが示唆された。

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 15 件)

Antony N. Dodd, Jelena Kusakina, Anthony Hall, Peter D. Gould and Mitsumasa Hanaoka (2014) The circadian regulation of photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 査読有, 119, 181-190.
DOI: 10.1007/s11120-013-9811-8.

華岡光正 (2014) 「植物が葉緑体に「時」の情報を伝えるメカニズム」*バイオサイエンスとインダストリー*、査読無、Vol. 72, No. 2, pp. 125-126.
http://www.jba.or.jp/pc/archive/2014/vo172_no2.html

Zeenat B. Noordally, Kenyu Ishii, Kelly A. Atkins, Sarah J. Wetherill, Jelena Kusakina, Eleanor J. Walton, Maiko Kato, Miyuki Azuma, Kan Tanaka, Mitsumasa Hanaoka and Antony N. Dodd (2013) Circadian control of chloroplast transcription by a nuclear-encoded timing signal. *Science*, 査読有, 339 (6125), 1316-1319.
DOI: 10.1126/science.1230397.

華岡光正 (2013) 「ChIP 法を用いた葉緑体光合成遺伝子の転写制御解析」*光合成研究*、査読有、Vol. 23, No. 3, pp. 107-110.
<http://photosyn.jp/journal/kaiho68.pdf>

Takehiko Kanazawa, Kimitsune Ishizaki, Takayuki Kohchi, Mitsumasa Hanaoka and Kan Tanaka (2013) Characterization of four nuclear-encoded plastid RNA polymerase

sigma factor genes in the liverwort *Marchantia polymorpha*: Blue-light and multiple-stress responsive SIG5 was acquired early in the emergence of terrestrial plants. *Plant and Cell Physiology*, 査読有, 54 (10), 1736-1748.
DOI: 10.1093/pcp/pct119.

Gaku Fujii, Sousuke Imamura, Mitsumasa Hanaoka and Kan Tanaka (2013) Nuclear-encoded chloroplast RNA polymerase sigma factor SIG2 activates chloroplast-encoded phycobilisome genes in a red alga, *Cyanidioschyzon merolae*. *FEBS Letters*, 査読有, 587 (20), 3354-3359.
DOI: 10.1016/j.febslet.2013.08.031.

Kan Tanaka and Mitsumasa Hanaoka (2013) The early days of plastid retrograde signaling with respect to replication and transcription. *Frontiers in Plant Science*, 査読有, 3 (301), 1-5.
DOI: 10.3389/fpls.2012.00301.eCollection2012.

華岡光正 (2013) 「24 時間リズムを生み出す遺伝子発現調節機構」*バイオサイエンスとインダストリー*、査読無、Vol. 71, No. 1, pp. 36-37.
http://www.jba.or.jp/pc/archive/2013/vo171_no1.html

Mitsumasa Hanaoka, Maiko Kato, Misato Anna and Kan Tanaka (2012) SIG1, a sigma factor for the chloroplast RNA polymerase, differently associates with multiple DNA regions in the chloroplast chromosomes *in vivo*. *International Journal of Molecular Sciences*, 査読有, 13 (10), 12182-12194.
DOI: 10.3390/ijms131012182.

Shunsuke Hirooka, Mitsumasa Hanaoka, Kazuhiko Enami, Takehiko Kanazawa, Toshiyuki Sone, Yuta Imoto, Akikazu Ando, Haruko Kuroiwa, Tsuneyoshi Kuroiwa and Kan Tanaka (2012) Nuclear-encoded plastid sigma factor SIG6 exclusively contributes to chloroplast differentiation in plastid differentiation of *Arabidopsis thaliana*. *Cytologia*, 査読有, 77 (1), 73-82.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/cytologia/77/1/77_73/_pdf

他

[学会発表](計 49 件)

木山貴史、江波和彦、上原浩一、華岡光正 「シロイヌナズナ T87 培養細胞の葉緑体分化に際した転写制御の解析」*日本農芸化学会*

2014 年度大会、東京、2014 年 3 月 30 日

恩田和幸、江波和彦、華岡光正「シロイヌナズナ培養細胞におけるアミロプラスト分化機構の解析」第 55 回日本植物生理学会年会、富山、2014 年 3 月 19 日

石井健雄、加藤麻衣子、Zeenat B. Noordally, Kelly A. Atkins, Jelena Kusakina, 東美由紀、田中寛、Antony N. Dodd、華岡光正「概日リズム情報の共有に関わる核と葉緑体間のシグナル伝達」第 55 回日本植物生理学会年会、富山、2014 年 3 月 18 日

江波和彦、木山貴史、上原浩一、華岡光正「葉緑体分化過程におけるプラスチドシグナルに依存した遺伝子発現制御」第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、2013 年 12 月 5 日

Mitsumasa Hanaoka, Takayuki Kawakami, Daichi Satoh, Hiroyuki Ando, Misato Anna, Gaku Fujii, Sousuke Imamura and Kan Tanaka Endosymbiotic evolution of light responses in chloroplasts. The 12th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis August 20, 2013, Halifax, Canada.

Mitsumasa Hanaoka, Takayuki Kawakami, Daichi Satoh, Hiroyuki Ando, Gaku Fujii, Sousuke Imamura and Kan Tanaka Roles of the possible photosensory two-component system in the chloroplasts of *Cyanidioschyzon merolae*. International Symposium of Plant Photobiology (ISPP) 2013 conference June 6, 2013, Edinburgh, UK.

安間美里、木山貴史、加藤麻衣子、江波和彦、田中寛、華岡光正「葉緑体の分化・発達に伴った光合成遺伝子の転写制御」第 4 回光合成学会・シンポジウム、名古屋、2013 年 5 月 31 日

石井健雄、加藤麻衣子、Zeenat B. Noordally, Kelly A. Atkins, Jelena Kusakina, 東美由紀、田中寛、Antony N. Dodd、華岡光正「概日時計シグナルによる葉緑体遺伝子の転写調節」第 4 回光合成学会・シンポジウム、名古屋、2013 年 5 月 31 日

恩田和幸、江波和彦、華岡光正「アミロプラスト分化における核遺伝子の発現制御」第 54 回日本植物生理学会年会、岡山、2013 年 3 月 22 日

江波和彦、木山貴史、安間美里、加藤麻衣子、田中寛、華岡光正「シロイヌナズナ T87 細胞を用いた葉緑体分化における遺伝子発

現制御の解析」第 54 回日本植物生理学会年会、岡山、2013 年 3 月 21 日

華岡光正、高井直樹、細川徳宗、藤原正幸、秋元勇輝、小堀奈美、岩崎秀雄、近藤孝男、田中寛「シアノバクテリアの概日時計機構を支える RpaA/B による協調的な転写制御」第 35 回日本分子生物学会年会、横浜、2012 年 12 月 6 日

木山貴史、江波和彦、加藤麻衣子、安間美里、田中寛、華岡光正「シロイヌナズナ T87 細胞を用いた葉緑体分化誘導系の構築と葉緑体遺伝子の転写制御の解析」日本農芸化学会関東支部 2012 年度大会、新潟、2012 年 10 月 27 日

華岡光正、加藤麻衣子、安間美里、木山貴史、江波和彦、田中寛「ChIP 法によるシロイヌナズナの葉緑体分化に伴った転写制御機構の解析」第 76 回日本植物学会大会、姫路、2012 年 9 月 16 日

Mitsumasa Hanaoka, Naoki Takai, Norimune Hosokawa, Masayuki Fujiwara, Yuki Akimoto, Nami Kobori, Hideo Iwasaki, Takao Kondo and Kan Tanaka RpaB is involved in transcriptional regulation in response to the circadian clock as well as high light stress in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. ISPP 2012: The 14th International symposium on Phototrophic Prokaryotes August 7, 2012, Porto, Portugal.

華岡光正、高井直樹、細川徳宗、藤原正幸、秋元勇輝、小堀奈美、岩崎秀雄、近藤孝男、田中寛「シアノバクテリアの概日時計応答に関わる新たな転写制御様式の発見」第 3 回光合成学会・シンポジウム、横浜、2012 年 6 月 2 日

他

〔その他〕

千葉日報(朝刊)2013 年 3 月 15 日「伝達の仕組み解明 植物の“体内時計”情報」

Nature Japan 特集記事
「よく似た 2 つの転写因子が正負の協調を行うことで、24 時間の生体リズムを刻んでいた！」
<http://www.natureasia.com/ja-jp/jobs/to-kushu/detail/260>

Science 日本語版特集号
「核からの時間シグナルによる葉緑体転写の概日制御」
http://www.sciencemag.jp/files/2014-Issue_Science_JapanResearch-2013_72dpi.pdf

6 . 研究組織

(1)研究代表者

華岡 光正(HANAOKA, Mitumasa)

千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授

研究者番号:30508122