

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870155

研究課題名(和文) 遺伝子の改変と置換によるオルガネラゲノム複製酵素の実験進化学的研究

研究課題名(英文) Evolutional study of the organellar genome replication enzyme by the genetic substitution in photosynthetic eukaryotes

研究代表者

森山 崇 (MORIYAMA, TAKASHI)

東京大学・総合文化研究科・助教

研究者番号：80534346

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)：2種類の紅藻において、葉緑体やミトコンドリアなどのオルガネラに局在するゲノムの複製に関わる酵素の構成についてGFPを用いて調べた結果、葉緑体とミトコンドリアでは複製関連酵素の構成が大きく異なることを明らかにした。これらの酵素の起源を調べるために系統解析もおこない、局在解析の結果とあわせると、真核光合成生物では、進化の過程において、オルガネラゲノム複製関連酵素は頻繁に入れ替わりが起きていることを示した。

研究成果の概要(英文)：We examined subcellular localization of enzymes related to replication of organellar genome in two red algae *Cyanidioschyzon merolae* and *Porphyridium purpureum* by observation of GFP-fusion protein, and indicated that the plastids and mitochondria contain markedly different components of replication machinery. These results and phylogenetic analyses showed that the enzymes related to organellar replication have been frequently replaced in the evolution of photosynthetic eukaryotes.

研究分野：植物生理学

キーワード：紅藻 真核光合成生物 オルガネラ 葉緑体 ミトコンドリア ゲノム複製 細胞内局在 進化

1. 研究開始当初の背景

複製は生物の最も重要な特徴であるが、オルガネラゲノム複製酵素は、進化の過程で入れ替えがおきていることが知られている(図1のフデ字で丸く囲った場所)。ミトコンドリアゲノムの複製酵素としては、DNAポリメラーゼ(Pol)がよく知られているが、Polは動物や菌類でしか保存されていない酵素である。他の真核生物(植物や原生生物)では、POP(Plant/Protist organellar DNA polymerase)と私たちが名付けた酵素がオルガネラゲノムの複製に働く。つまり、真核生物には、2種類のオルガネラゲノム複製酵素が分布している。

図1は、系統解析とPOPの分布状況から考えられた、オルガネラ複製酵素の遷移モデルである。順を追っていくと、真核生物の祖先がミトコンドリアを獲得した時の複製酵素は、もともと細菌の複製に働いていたDNAポリメラーゼIII(PolIII)であった。

ミトコンドリアゲノムの縮小化に伴い、細菌のゲノム修復酵素のDNAポリメラーゼI(PolI)にその役割が移行した可能性も考えられる。その後、由来はわからないがPOPが獲得され、多くの系統で保存されているが、動物や菌類の祖先では、POPからPolに入れ替わった。植物の祖先が葉緑体を獲得した時も、はじめの複製酵素はPolIIIだったが、ミトコンドリアで働いていたPOPが葉緑体でも使われるようになる。このように、最低でも3か所で、入れ替えがおきたと考えられる。

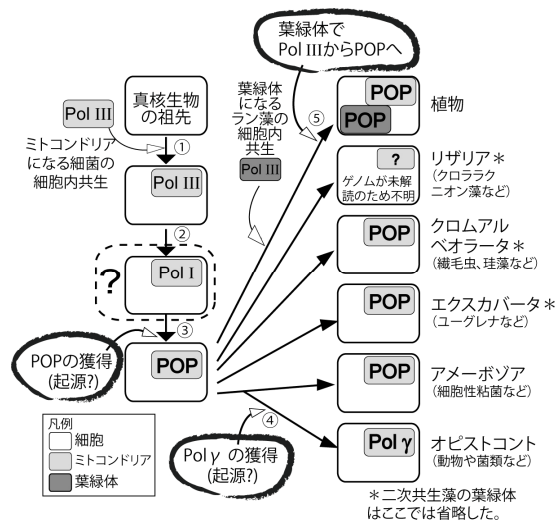


図1 真核生物におけるオルガネラゲノム複製酵素の分布と、申請者が提唱するオルガネラゲノム複製酵素の遷移モデル。四角の中に、オルガネラゲノム複製酵素を示した。フデ字で丸く囲んだ部分は、複製酵素の置換がおきた所を示す。

私たちは以前、POPとPolは進化的に別系統であるにも関わらず、これらは類似した酵素活性をもつことを報告した。このことから、オルガネラゲノムとして働くために必要な活性があるのではないかと、また、POPとPolは交換が可能なのではないかとということが考えられた。本研究では、POPのより詳細な酵素活性を調べるとともに、異種生物間で複製酵素を交換した形質転換体を作製し、生理的・遺伝的影響を詳細に調べることを計画した。

2. 研究の目的

オルガネラゲノムの複製酵素であるDNAポリメラーゼは、真核生物の進化の過程で数回に入れ替わりがおきている。このような現象は他の複製関連酵素でもおきている可能性が考えられた。しかし、紅藻のオルガネラにおいて、複製に関わる酵素としては、DNAポリメラーゼ以外の酵素についての知見はなかったため、紅藻において葉緑体とミトコンドリアのゲノム複製関連酵素を調べ、真核生物の進化の過程でどのように酵素が入れ替わっていたのかを調べることにした。

3. 研究の方法

(1) 紅藻シアニジオシゾンにおけるオルガネラゲノム複製関連酵素の細胞内局在解析
シアニジオシゾンのゲノムから、葉緑体やミトコンドリアに局在する可能性のある複製関連酵素を探し、これらの酵素を緑色蛍光タンパク質(GFP)と融合させたタンパク質をシアニジオシゾンで発現されることで、酵素の細胞内局在を調べた。

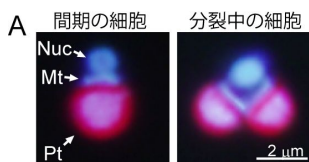
(2) 紅藻チノリモにおけるオルガネラゲノム複製関連酵素の細胞内局在解析
シアニジオシゾンとは系統的に離れている紅藻のチノリモにおいても同様にオルガネラゲノム複製関連酵素の細胞内局在を調べた。チノリモでの遺伝子導入方法は確立していないため、シアニジオシゾンにおいて細胞内局在を観察した。

(3) オルガネラ局在複製関連酵素の系統解析
シアニジオシゾンとチノリモにおける細胞内局在解析によって、葉緑体またはミトコンドリアに局在することがわかった酵素について系統解析をおこない、これらの酵素がどのように獲得されたものであるか調べた。

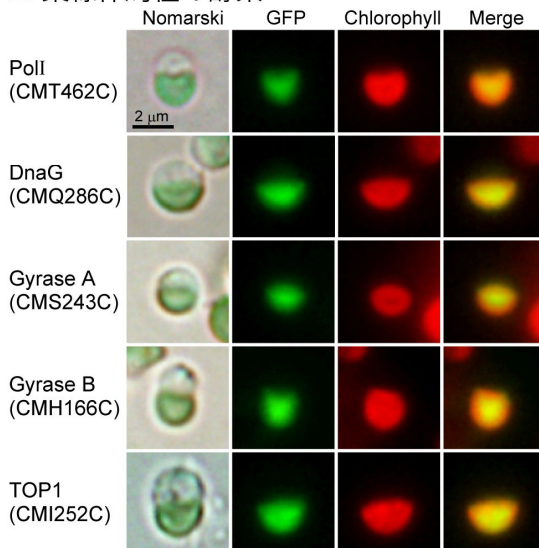
4. 研究成果

(1) 紅藻シアニジオシゾンにおけるオルガネラゲノム複製関連酵素の細胞内局在解析

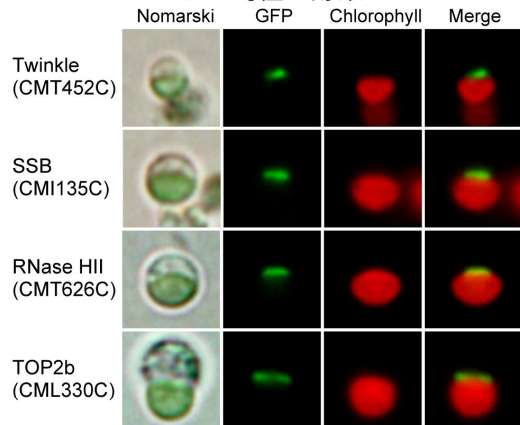
はじめに、シアニジオシゾンのゲノム配列から、DNAの複製に関わる酵素を探した。これらの酵素は、DNAを含むオルガネラである葉緑体、ミトコンドリア、または核のいずれかに局在することが考えられるため、この中から、葉緑体やミトコンドリアへの輸送配列を含むと考えられる酵素を選抜した。これらの酵素の細胞内局在を調べるため、複製関連遺伝子と GFP 遺伝子の融合遺伝子を作製した。この融合遺伝子をポリエチレングリコール法によってシアニジオシゾンに導入し、GFPの蛍光を観察した。シアニジオシゾンは細胞構造が単純で、細胞内に、核 (Nuc)、ミトコンドリア (Mt)、および葉緑体 (Pt) が 1 個ずつしか存在しないため、局在観察を容易におこなうことができる (図 2A)。観察の結果、5 個の酵素が葉緑体局在 (図 2B)、4 個の酵素がミトコンドリア局在、また、2 個の酵素が葉緑体とミトコンドリアの両方に局在することがわかった (図 2C)。このことから、葉緑体とミトコンドリアでは、DNA ポリメラーゼと DNA リガーゼは共通だが、その他の酵素 (プライマーゼ、DNA ヘリカーゼ、DNA トポイソメラーゼ、プライマー除去酵素、および一本鎖 DNA 結合タンパク質) は、タイプの異なる酵素がそれぞれのオルガネラに局在していることがわかった。この結果は、葉緑体とミトコンドリアで、ゲノムの複製に関するほとんどの酵素が共通である植物のシロイヌナズナとは大きく異なっていた。



B. 葉緑体局在の酵素



C. ミトコンドリア局在の酵素



E. 葉緑体とミトコンドリアの両方に局在する酵素

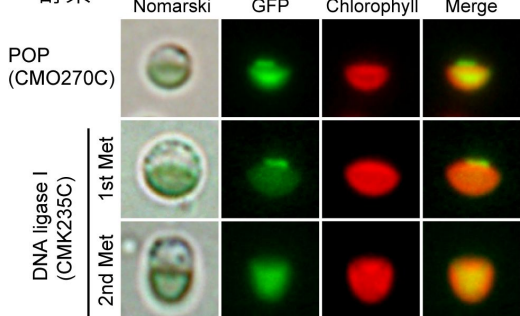


図 2 シアニジオシゾンにおけるオルガネラゲノム複製関連酵素の細胞内局在解析

(2) 紅藻チノリモにおけるオルガネラゲノム複製関連酵素の細胞内局在解析

シアニジオシゾンと系統的に離れている紅藻のチノリモでもオルガネラゲノムの複製関連酵素の構成を調べることで、紅藻における共通性を調べた。チノリモのゲノムを調べた結果、多くの酵素はチノリモとシアニジオシゾンとで共通に存在するが、シアニジオシゾンにはコードされていない酵素をコードすることや、逆にシアニジオシゾンには存在するがチノリモにはない酵素があることがわかった。チノリモでの遺伝子導入方法は確立していないため、チノリモの遺伝子と GFP との融合遺伝子をシアニジオシゾンに導入して細胞内局在を用いて調べた。シアニジオシゾンとは局在性が異なった酵素はいくつかあったが、多くの酵素は同じ局在を示した。

(3) オルガネラゲノム複製関連酵素の系統解析

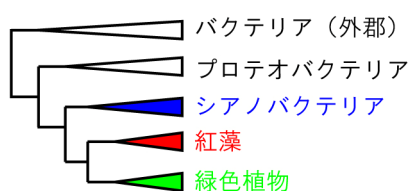
シアニジオシゾンとチノリモにおける細胞内局在解析で、葉緑体またはミトコンドリアに局在することがわかった酵素について詳細な系統解析をおこなった。紅藻は、葉緑体の起源と考えられているシアノバクテリアに由来する酵素が多く保存されているこ

とが示された(図3)。細胞内局在解析と系統解析の結果から、DNAポリメラーゼは、真核生物の進化においてPOPが獲得されてからは、紅藻および緑色植物で保存されているが、ポリメラーゼ以外の酵素は、真核光合成生物が誕生してからも、進化の過程において頻繁に入れ替わりが生じている可能性が示唆された。

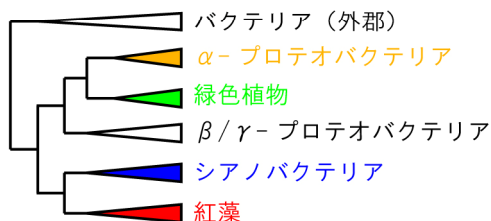
DnaB (ヘリカーゼ) と DnaG (プライマーゼ)



Gyrase A/B (トポイソメラーゼ)



TOP1 (type IA、トポイソメラーゼ)



SSB (一本鎖DNA結合タンパク質) と DNA polymerase I



図3 オルガネラゲノム複製関連酵素の単純化した系統樹

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4件)

Moriyama, T., Tajima, N., K., Sekine, K. and Sato, N. (2015) Characterization of three putative xylulose-5-phosphate/fructose-6-phosphate phosphoketolases in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* DOI:

10.1080/09168451.2014.993357. (in press) (査読有り)

Moriyama, T., Sakurai, K., Sekine, K. and Sato, N. (2014) Subcellular distribution of central carbohydrate metabolism pathways in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Planta* 240: 585-598. DOI:

10.1007/s00425-014-2108-0 (査読有り)

Moriyama, T., Tajima, N., Sekine, K. and Sato, N. (2014) Localization and phylogenetic analysis of enzymes related to organellar genome replication in the unicellular rhodophyte *Cyanidioschyzon merolae*. *Genome Biol. Evol.* 6: 228-237. DOI: 10.1093/gbe/evu009. (査読有り)

Moriyama, T. and Sato, N. (2014) Enzymes involved in organellar DNA replication in photosynthetic eukaryotes. *Front. Plant Sci.* 5: 00480. DOI: 10.3389/fpls.2014.00480. (査読有り)

〔学会発表〕(計4件)

森山 崇, 毛利奈津美, 佐藤直樹, 紅藻シアニジオシゾンにおける生理活性に対する有機物の添加効果の解析, 日本植物生理学会, 東京都世田谷区, 2015年3月16~3月18日

森山 崇, 佐藤直樹, *Anabaena* sp. PCC7120におけるホスホケトラーゼの同定, 日本植物学会, 神奈川県川崎市, 2014年9月12日~9月14日

森山 崇, 佐藤直樹, 紅藻シアニジオシゾンにおける細胞内局在解析に基づいた炭素代謝経路図の作製, 日本植物生理学会, 富山県富山市, 2014年3月18~3月20日

森山 崇, 田島直幸, 関根康介, 佐藤直樹, 単細胞性紅藻シアニディオシゾンにおけるオルガネラDNA複製関連酵素の局在および系統解析, 日本植物学会, 北海道札幌市, 2013年9月13日~9月15日

〔その他〕

ホームページ等

<http://nsato4.c.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

森山 崇 (MORIYAMA, Takashi)

東京大学・総合文化研究科・助教

研究者番号: 80534346