

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650111

研究課題名(和文)光ピンセットとマイクロ流路の融合が拓く母性遺伝の分子機構

研究課題名(英文) The molecular mechanism of uniparental inheritance of mtDNA analyzed by combining the optical tweezers and microfluidic device.

研究代表者

西村 芳樹 (Nishimura, Yoshiki)

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号：70444099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生物は、多様な組織・細胞・細胞小器官から構成される一つの複雑な社会である。個々の細胞や細胞小器官のもつミクロな「個性」を分子レベルで理解するためには、顕微鏡で狙った細胞を選択的に試験管内に取り込む技術が鍵となる。本研究課題では赤外線レーザーによって細胞を操作できる光ピンセットと、マイクロ流路を組み合わせることで、新たな細胞回収法の開発をめざした。具体的な対象として選んだのは、酵母菌類クリプトコッカスにおけるミトコンドリア遺伝機構である。その結果、1細胞解析をおこなうことで、ミトコンドリアDNAが接合子で選択的に分解され、これがミトコンドリア片親遺伝の基盤であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Living organisms consist of diverse tissues, cells and organelles, which can be compared to a complex society with various groups and individuals. To decipher the characteristics of individual cells and connections between them, it would be necessary to establish technologies to isolate individual cells for further molecular analyses. For this, we aimed to combine the optical tweezers and microfluidic devices. With this technique, the molecular mechanism of uniparental inheritance of mtDNA was analyzed using *Cryptococcus neoformans* as a model system, which revealed the active elimination of  $\alpha$ -mtDNA in the early developing zygotes that lead to the uniparental inheritance of mtDNA.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：光ピンセット マイクロ流路 ミトコンドリア 片親遺伝

### 1. 研究開始当初の背景

生物は、多様な組織・細胞・細胞内小器官から構成される一つの複雑な社会である。個々の細胞や細胞内小器官のもつマイクロな「個性」の解明は、生命活動を分子～集団レベルで理解していくための鍵技術となる。しかし、これまで光ピンセットによる細胞分取にもちいられてきたガラス製マイクロチャンバー(Nishimura et al., PNAS 1999, PNAS 2006, Plant Cell 2012)は、1つ1つ手作業で作成する必要があり、1つのチャンバーで1個の細胞しか回収できず、ガラス面に細胞が付着しやすく作業効率が低いなど、さまざまな問題点があり、これを解決する必要があった。

今回具体的な対象とした母性遺伝は、葉緑体やミトコンドリアがもつ独自のゲノムの非メンデル遺伝様式のひとつであり、ヒトをふくむ動植物に普遍的に観察される現象である。その核心には、ミトコンドリア/葉緑体DNAのオスにおける選択的破壊と、メスにおける保護を可能にする機構があると考えられているが、未だに理解が進んでいない。これまでの研究の問題点として、マウス、ショウジョウバエ、線虫やシロイヌナズナなど、その生殖システムが進化のなかで高度に複雑化した生物が注目されてきた点が考えられる。そこで本研究では、2つの接合型のあいだで同型配偶子によって生殖をおこなうという、シンプルなシステムで生殖をおこない、1細胞操作にも適した菌類クリプトコッカスと緑藻クラミドモナスをモデルとした。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、光ピンセットとマイクロ流路を組み合わせることによる1細胞解析技術の開発をとおり、酵母様菌類クリプトコッカス、および単細胞緑藻クラミドモナスにおけるミトコンドリア/葉緑体母性遺伝など、ミトコンドリアや葉緑体の染色体構造「核様体」の挙動の追跡、およびそれらを支配する分子機構の解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

1細胞回収技術については、まずチャンバーのデザインから、その材質、回収の際にもちいるバッファーなど様々な点を検証し、1細胞をより安定な環境で確実に回収できる

技術の開発をめざした。

クリプトコッカスにおけるミトコンドリア核様体の挙動については、これまでまったく研究されておらず、まずミトコンドリア核様体の同定、およびその接合子における挙動の観察からはじめた。DNA 特異的蛍光色素をもちいてミトコンドリア核様体の同定とその構造や分布について詳細な蛍光顕微鏡観察をおこなった。そして接合子について雌雄のミトコンドリアを識別しつつ、その挙動を追跡した。さらにミトコンドリア核様体の構成タンパク質について、ヒトや酵母の情報(Abf2 や Tfam 遺伝子配列情報)をもとに推定し、その局在を蛍光タンパク質をもちいて明らかにした。遺伝子破壊がミトコンドリア核様体に対してもたらす影響について遺伝学的に検証した。

### 4. 研究成果

1細胞回収技術について、マイクロチャンバーの構造、材質などを検討した結果、材質を従来のガラスから透明樹脂性に変更することで、光ピンセットによる操作性や捕捉力を損なうことなく、細胞の付着を抑え、作業効率を向上させることに成功した(図1)。

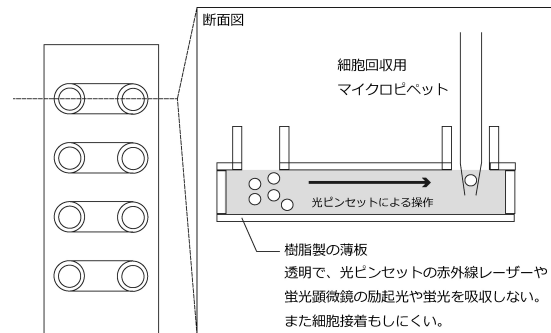


図1 細胞回収装置

クリプトコッカスの母性遺伝については、まずミトコンドリアをATP合成酵素をマーカーとして蛍光タンパク質 mCherry で標識することで、ミトコンドリア核様体を明確に識別することに成功した。つぎにオス(α親由来)のミトコンドリア核様体の接合子における動態を蛍光顕微鏡で観察した結果、それらが接合子形成後、菌糸の伸長がはじまるタイミングで、ミトコンドリア構造の崩壊に先んじて消失してしまうことを見出した(図2)。

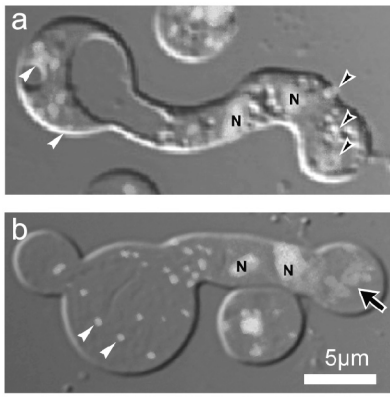


図2 DNA 特異的蛍光色素 SYBR Green I によって染色した生きた接合子。a)ミトコンドリアは mCherry (黒矢印) で標識してある。接合初期において、a)ミトコンドリアには mt 核様体 (mtDNA-タンパク質複合体) が観察されるが (a: 黒矢印)、Filamentation の開始までに選択的に消失する (b: 黒矢印)。この間、a 由来の mt 核様体は増幅される (a,b: 白矢印)。

この  $\alpha$  由来のミトコンドリア核様体の消失について、それを分子レベルで検証すべく、接合子の 1 細胞解析をおこなった。クリプトコッカスの接合率は 5 ~ 10 % 程度と低く、細胞集団のなかで 1 個の細胞を回収できる光ピンセット法は非常に有効であった。また菌糸を伸ばし、不定形となった接合子は周囲のガラス面に付着しやすく、旧来のガラスチャンバーでは回収が難しかったが、今回新規に開発した樹脂性チャンバーはこうした細胞の回収にも有効であった。1 細胞を PCR 解析した結果、 $\alpha$  由来のミトコンドリア DNA が

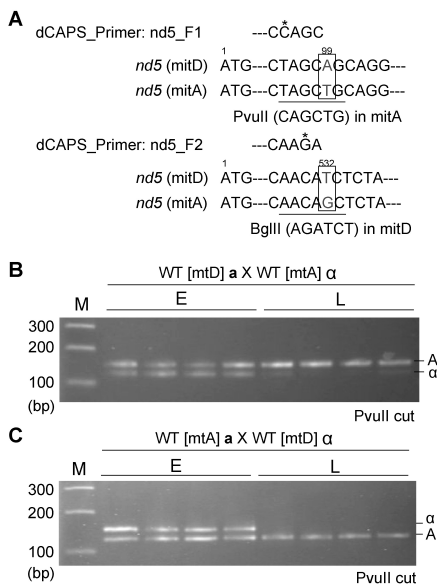


図3 1細胞解析により明らかになった $\alpha$ -mtDNAの選択的分解 (A) mtA株とmtD株のmtDNA多型(四角で囲んだ部位)と、それらを検出するためのdCAPsプライマーの配列 (B) mtD株とmtA株をそれぞれ $\alpha$ 親として交配した若い接合子(E: early stage)と菌糸伸長段階(L: Late stage)の接合子を1細胞X4単離して、dCAPsプライマーによる解析をおこなった。その結果、L接合子における $\alpha$ -mtDNAの選択的分解が明らかになった。 (C) Reciprocalな交配の結果。

接合後選択的に分解されることが明らかとなり、クラミドモナスや粘菌、メダカ、マウスなどと同様に、これがクリプトコッカスのミトコンドリア片親遺伝の基盤と考えられた(図3)。

さらにオートファジー関連遺伝子を破壊し、その影響を細胞学的、遺伝学的に解析した。オートファジー関連遺伝子 *ATG8* をホモで破壊しても、ミトコンドリアの片親遺伝は全く影響を受けなかった。このことから、クリプトコッカスにおいてオートファジーは母性遺伝の制御の核心部分ではないことが示された。一方、より詳細な顕微鏡観察をおこなってみると、ミトコンドリア核様体が消失したのちのミトコンドリア残渣が野生株よりも長時間残留することが明らかとなった(図3)。ミトコンドリア母性遺伝の基盤はミトコンドリア核様体の選択的保護/分解である一方で、オートファジー機構は、ミトコンドリア核様体が分解されたあと、ミトコンドリア残渣を除去するために必要であることが示唆された。

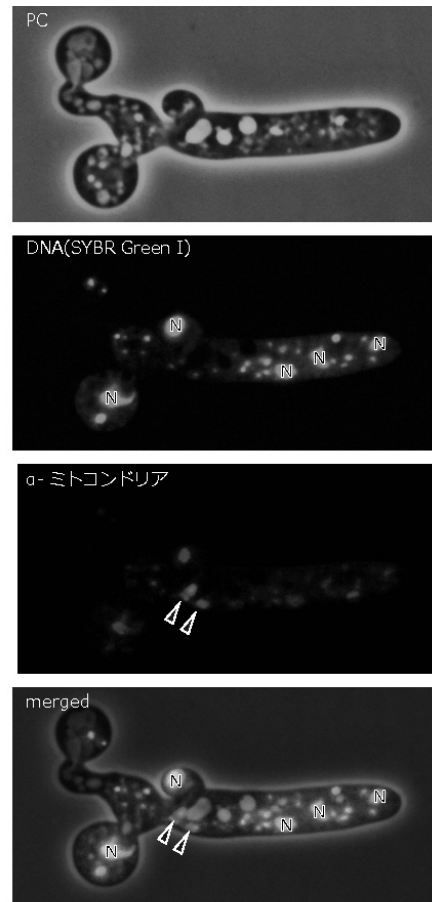


図4 オートファジー欠損変異体 (*ATG8 $\Delta$* ) の接合子における $\alpha$ -ミトコンドリアの挙動。mtDNAを失ったミトコンドリア(黒矢印)が接合子成熟の後期においても残留していた。

## 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 9 件)

① Ueda, M., Tanaka, A., Sugimoto, K., Shikanai, T., \*Nishimura, Y. *chlB* requirement for Chlorophyll biosynthesis under short photoperiod in *Marchantia polymorpha*. *Genome Biol. Evol.* (2014) **6**, 620-628.

DOI:10.1093/gbe/evu045

② Kobayashi, Y., Harada, N., Nishimura, Y., Saito, T., Nakamura, M., Fujiwara, T., Kuroiwa, T., Misumi, O., Algae sense exact temperatures: small heat shock proteins are expressed at the survival threshold temperature in *Cyanidioschyzon merolae* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genome Biol. Evol.* (2014) **6**, 2731-2740.

DOI:10.1093/gbe/evu216

③ Boehm, C., Ueda, M., Nishimura, Y., Shikanai, T., \*Haseloff, J. A cyan fluorescent reporter expressed from the chloroplast genome of *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell Physiol.* (2015) **57**, 291-299.

DOI:10.1093/pcp/pcv160

④ Ishizaki, K., Nishihama, R., Ueda, M., Inoue, K., Ishida, S., Nishimura, Y., Shikanai, T., \*Kohchi, T. Development of Gateway binary vector series with four different selection markers for the liverwort *Marchantia polymorpha*. *PLoS One* (2015) **10**, e0138876.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138876>

⑤ Odahara, M., Inouye, T., Nishimura, Y., \*Sekine, Y. *RECA* plays a dual role in the maintenance of chloroplast genome stability in *Physcomitrella patens*. *Plant J.* (2015) **84**, 516-526.

DOI: 10.1111/tpj.13017

⑥ Kobayashi, Y., Takusagawa, M., Harada, N., Fukao, Y., Yamaoka, S., Kohchi, T., Hori, K., Ohta, H., Shikanai, T., \*Nishimura, Y. Eukaryotic components remodeled chloroplast nucleoid organization during the green plant evolution. *Genome Biol. Evol.* (2015) **25**, 1-16.

DOI: 10.1093/gbe/evv233

⑦ Hamaji, T., Mogi, Y., Ferris, P.J., Mori, T., Miyagishima, S., Kabeya, Y., Nishimura, Y., Sequence of the *Gonium pectorale* Mating Locus Reveals a Complex and Dynamic History of Changes in Volvocine Algal Mating Haplotypes. Toyoda, A., Noguchi, H., Fujiyama, A., Olson, B.J., Marriage, T.N., Nishii, I., Umen, J.G., Nozaki, H. *G3* (2016) **115**, e026229.

DOI: 10.1534/g3.115.026229

⑧ Kobayashi, Y., Otani, T., Ishibashi, K., Shikanai, T., \*Nishimura, Y. C-Terminal Region of Sulfite Reductase Is Important to Localize to Chloroplast Nucleoids in Land Plants. *Genome Biol. Evol.* (2016) **22**, 1459-66.

DOI: 10.1093/gbe/evw093

⑨ Odahara, M., Kobayashi, Y., Shikanai, T., \*Nishimura, Y. Dynamic interplay between nucleoid segregation and genome integrity in *Chlamydomonas chloroplasts*.

*Plant Physiol.* (2016) in press.

<http://dx.doi.org/10.1104/pp.16.01533>

\*Corresponding author.

[学会発表] (計 11 件)

① Nishimura, Y. Deciphering the mechanisms underlying the uniparental inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA. Gordon Research Conference, Mitochondria and Chloroplast, Lucca (Barga) Italy, July 6-11, 2014

② Nishimura, Y. Restructuring of chloroplast nucleoids factor during the green plant evolution. The 13th International Colloquium of Endocytobiology and Symbiosis (Sep 10-14, 2016 Kyoto).

③ 西村芳樹、鹿内利治、東江昭夫、*ATG8* 欠損変異体におけるミトコンドリア母性遺伝、日本植物形態学会第 26 回大会 (明治大学、2014 年 9 月 11 日)

④ 田草川真理、小林優介、深尾陽一郎、西村芳樹、三角修己、クラミドモナスの葉緑体局在型 HMG タンパク質の機能解析、日本植物形態学会第 26 回大会 (明治大学、2014 年 9 月 11 日)

⑤ 西村芳樹、鹿内利治、東江昭夫、母性遺伝を引き起こす片親ミトコンドリアの選択的排除機構、日本植物学会第 78 回大会 (明治大学、2014 年 9 月 12~14 日)

⑥ 西村芳樹、鹿内利治、東江昭夫、ミトコンドリア片親遺伝をつかさどる複層的分子機構、第 56 回日本植物生理学会年会 (東京農業大学、2015 年 3 月 16~18 日)

⑦ 小林優介、田草川真理、原田尚実、深尾陽一郎、山岡尚平、河内孝之、堀孝一、太田啓之、鹿内利治、西村芳樹、葉緑体核様体コア因子の多様性と進化、日本植物学会第 79 回大会 (朱鷺メッセ、2015 年 9 月 6 日~8 日)

⑧ 西村芳樹、田草川真理、鹿内利治、東江昭夫、ミトコンドリア核様体構造からみた母性遺伝の分子機構、日本植物学会第 79 回大会 (朱鷺メッセ、2015 年 9 月 6 日~8 日)

⑨ Yoshiki Nishimura, Mari Takusagawa, Toshiharu Shikanai, Akio Toh-e, Active destruction of mitochondrial nucleoid as the driving force for uniparental inheritance in *Cryptococcus*, 第 57 回日本植物生理学会年会 (岩手大学、2016 年 3 月 18 日~20 日)

⑩ Masaki Odahara, Yusuke Kobayashi, Osami Misumi, Yoshiki Nishimura, Genome instability in the *Chlamydomonas chloroplasts* impaired in nucleoid segregation. 第 57 回日本植物生理学会年会 (岩手大学、2016 年 3 月 18 日~20 日)

11. Yusuke Kobayashi, Mari Takusagawa, Naomi Harada, Yoichiro Fukao, Shohei Yamaoka, Takayuki Kohchi, Koichi Hori,

Hiroyuki Ohta, Toshiharu Shikanai, **Yoshiki Nishimura**, Remodeling of chloroplast nucleoid organization by eukaryotic components during the green plant evolution. 第 57 回日本植物生理学会年会 (岩手大学、2016 年 3 月 18 日~20 日)

[図書] (計 2 件)

① **Nishimura, Y.** Springer, Microbiology Monographs, Chlamydomonas: Biotechnology and Biomedicine (edited by Dr. Michael Hippler), Part2-22. The Sexual developmental program of *Chlamydomonas reinhardtii*. 2017 in press.

② **Nishimura, Y.** Springer, Active digestion of paternal chloroplast DNA in a young zygote of *Chlamydomonas reinhardtii*: the basis for maternal inheritance. *Atlas in Plant Cell Structure*, Chapter 3, 2014

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

[http://www.bot.kyoto-u.ac.jp/j/5\\_iden.html](http://www.bot.kyoto-u.ac.jp/j/5_iden.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 芳樹 (Nishimura, Yoshiki)  
京都大学・大学院理学研究科・助教  
研究者番号：70444099

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者