

科学研究費補助金（学術創成研究費）公表用資料  
〔事後評価用〕

平成16年度採択分

平成21年 3月31日現在

研究課題名（和文）

核・オルガネラコンソーシアムによる真核細胞の構築原理の研究  
研究課題名（英文） Studies of principles of the eukaryotic cell  
architecture based on the nucleus-organelle consortium

研究代表者

氏名 田中 寛 (TANAKA KAN)

所属研究機関・部局・職 東京大学・分子細胞生物学研究所・客員教授



研究の概要：真核細胞の基本的な作動原理を、その成立に深く関わったミトコンドリア・葉緑体の進化や機能に注目して研究した。動物・菌類を除く多くの真核細胞系統が一旦は葉緑体を持っていたとする‘超植物界仮説’を提唱すると共に、共生由来オルガネラである葉緑体からのシグナルが、植物細胞周期の開始に必須であることを示した。さらに、始原的真核細胞シズンをモデル系とした細胞生物学の新分野を切拓いた。

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、植物生理・分子

キーワード：Cyanidioschyzon merolae, organelle, chloroplast, mitochondria, genome analysis, red algae, symbiosis, DNA polymerase

1. 研究開始当初の背景

真核細胞は、細胞核の祖先にあたる古細菌様の原核細胞に、 $\alpha$ プロテオバクテリア、シアノバクテリアが共生することで誕生・進化してきた。シズン (*Cyanidioschyzon merolae*) は最も原始的な体制をもつ真核細胞であり、本研究の申請時に、ちょうどその核、ミトコンドリア、葉緑体の3ゲノム構造が完全に明らかにされた。本研究の動機は、シズンのゲノム配列を基盤情報として、真核細胞の枠組みを、共生体としての進化的・構築的背景から問い直そうと考えたことにある。

2. 研究の目的

本研究ではシズンを用い、共生コンソーシアムが一個の統合された細胞として機能するメカニズムや、その進化的背景を明らかにする。そして、ここで得られる基本的な概念を、高度に複雑化した動植物細胞に展開することで、真核細胞の普遍的な構築原理を明らかにする。また、シズンを用いた同調培養系や形質転換系の確立など、実験系の手法開発も並行して進める。

3. 研究の方法

共生による細胞周期の共役機構研究においては、確立した同調培養系を用いて DNA 量、RNA 量、転写活性などを詳細に測定し、各種阻害剤の効果などから細胞内シグナル伝達系を解析した。また、遺伝子発現や染色体構造の解析にはマイクロアレイ、タイリングアレイなどを用いた。プロテオーム解析には MALDI TOF-MS 装置、系統解析には東大医科研

のスーパーコンピューターを用いた。

4. 研究の主な成果

(1) 真核細胞のゲノムの解読は驚異的に進んでいるが、完全に 100% 解読された生物はなかった。我々学術創成のグループは総力を挙げてシズンの細胞核ゲノム配列を 20 本の染色体の総てについて端 (テロメア) から端 (テロメア) まで一塩基も残さず完全解読に成功した。シズンではすでにミトコンドリアと色素体のゲノムも解読を完了しており、生物の最も基本となる設計図の全貌が 100% 明らかとなったことになり、真核生物として初めてのケースとなった。

(2) シズン同調培養系を用い、オルガネラゲノムと核ゲノムの複製共調機構について解析した。細胞周期開始では、まずミトコンドリアと葉緑体ゲノムが同じタイミングで複製し、その後から核ゲノムが複製を行う。各種阻害剤を用いた解析の結果、オルガネラゲノム複製が起こることが核ゲノム複製に必須であることが判った。更に、オルガネラゲノムが複製すると、葉緑体で合成される Mg-ProtoIX (クロロフィル合成中間体) がシグナルとして G1/S 期 CDK を活性化し、核ゲノム複製を誘導することも判った。これはオルガネラが核の複製を誘導するという、従来の真核細胞生物学の常識を覆す成果である。さらに、同様のシグナル伝達系が高等植物でも機能していることが、タバコ培養細胞系を用いた解析で明らかとなり、少なくとも植物系における普遍性が示された。

#### [4. 研究の主な成果 (続き)]

(3) 翻訳装置の合成・活性は細胞増殖と相関して調節を受けており、本研究では、細胞質とオルガネラ 3 種リボゾームの合成協調機構について考察した。まず、3 種のリボゾームを個別に調製する方法を確立し、プロテオーム法で 3 種リボゾームのタンパク組成を決定した。次に、これまで植物で機能不明の TFIIB 様タンパク質として知られていた pBrp が、核で細胞質リボゾーム RNA (rRNA) 転写を行う RNA ポリメラーゼ I の基本転写因子であることを明らかにした。また細胞質 tRNA の解析により、環状化を介した全く新しい tRNA の合成経路を発見した。

(4) 窒素同化に関する制御系を理解するために、窒素欠乏時の細胞についてマイクロアレイを用いた解析を行った。その結果、MYB 型転写因子の一つ (MYB1) が窒素欠乏で誘導されることを見いだした。MYB1 は硝酸還元酵素など、窒素欠乏で誘導される遺伝子上流に結合する。また、この窒素欠乏による発現誘導が MYB1 欠損株では消失した。従って MYB1 は、シゾンにおける窒素欠乏時の転写誘導に必須な転写因子であることが示された。また、硝酸同化系を詳細に解析し、亜硫酸還元酵素由来の酵素が亜硝酸還元酵素として機能していることを明らかにした。

(5) 染色体の基本構造を解析する目的で、シゾンの 3 ゲノムを網羅する 27-base 密度のタイリングアレイを作成した。これを用い、抗 CENP-A 抗体を用いた ChIP-on-chip 解析の結果、20 本の染色体上に一カ所ずつ、それぞれ約 2-kb からなるセントロメア領域を同定することに成功した。

(6) 「植物」の起源は 10 億年以上前に起きたたった一つのシアノバクテリアが真核生物に取り込まれて色素体になったこと (色素体一次共生) と考えられている。しかし、その後の進化に関して様々な議論が交わされてきた。我々は、解析する生物を厳選し、太古の進化の推測に適切と考えられる遺伝子だけを用いて大規模なスーパーコンピューター解析を実施した結果、鞭毛虫などの多くの原生生物は元々色素体一次共生を経験しており、色素体をもつ植物と共に”超”植物界に分類すべきであるという結論に達した。

(7) ウラシル要求性変異株を用いて、ウラシル合成遺伝子をマーカーとした DNA 導入選択系を構築した。さらに、直鎖化した DNA を用いた形質転換を行うことで、染色体上への相同組換え (ダブルクロスオーバー) を介した特異的な遺伝子破壊に成功した。この技術開発により、シゾンの逆遺伝学が可能となり、シゾンモデル系とした様々な研究系の構築可能性が飛躍的に高まった。

#### 5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

本研究は世界的にも類似のものがない発想に基づく、オリジナリティーの高いものである。従来、細胞共生の研究は代謝相利性や共生した生物の同定を主な旨としてきた。シゾンという始原的生物、およびゲノムを始めとした基盤情報を用いることで、本研究プロジェクトではオルガネラ・核複製間の従来予想すらされていなかった関係性を見いだすことに成功した。また、翻訳系や窒素同化系などにおいて得られた成果でも、植物としては初めて明らかにできた点が多い。さらに、多くの非光合成真核細胞が一旦は葉緑体をもっていたとする「超植物界」の提唱も行い、あらゆる点で本プロジェクトのインパクトは非常に大きい。

#### 6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者は二重下線、連携研究者は一重下線)

Yuki Kobayashi, Yu Kanesaki, Ayumi Tanaka, Haruko Kuroiwa, Tsuneyoshi Kuroiwa and **Kan Tanaka** (2009) Tetrapyrrole signal as a cell cycle coordinator from organelle to nuclear DNA replication in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 803-807.

Takashi Osanai, Masahiko Imashimizu, Asako Seki, Shusei Sato, Satoshi Tabata, Sousuke Imamura, Munehiko Asayama, Masahiko Ikeuchi and **Kan Tanaka** (2009) ChlH, the H subunit of Mg-chelatase, is an anti-sigma factor for SigE in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 6860-6865.

Naoki Sato (2009) Gclust: *trans*-kingdom classification of proteins using automatic individual threshold setting. *Bioinformatics* **25**, 599-605.

Sousuke Imamura, Mitsumasa Hanaoka and Kan Tanaka (2008) The plant-specific TFIIB-related protein, pBrp, is a general transcription factor for RNA polymerase I. *EMBO J.* **27**, 2317-2327.

Soma, A., Onodera, A., Sugahara, J., Kanai, A., Yachie, N., Tomita, M., Kawamura, F. and Sekine, Y. (2007) Permuted tRNA genes expressed via a circular RNA intermediate in *Cyanidioschyzon merolae*. *Science* **318**, 450-453.

H. Nozaki, H. Takano, O. Misumi, K. Terasawa, M. Matuzaki, S. Maruyama, K. Nishida, F. Yagisawa, Y. Yoshida, T. Fujiwara, S. Takio, K. Tamura, S. J. Chung, S. Nakamura, H. Kuroiwa, **K. Tanaka**, N. Sato and T. Kuroiwa (2007) A 100%-complete sequence reveals unusually simple genomic features in the hot spring red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *BMC Biol.* **5**, 28