

課題番号	GS015
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成24年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	葉緑体の遺伝子発現制御と母性遺伝の基幹に迫る
研究機関・ 部局・職名	京都大学・理学研究科・助教
氏名	西村 芳樹

1. 当該年度の研究目的

<p>【プロジェクト1】 葉緑体ゲノムはどのように遺伝子の発現を制御しているのか？ 葉緑体には、細胞核とは異なる独自のゲノム及び遺伝子発現機構が存在する。葉緑体遺伝子発現制御機構は、光合成や色素体の分化の制御、環境応答において重要な役割を果たしていると考えられている。葉緑体遺伝子の制御機構やその進化について詳細を明らかにしていくため、単細胞緑藻クラミドモナスや原始陸上植物ゼニゴケをモデルとした解析を進める。</p> <p>【プロジェクト2】 葉緑体（ミトコンドリア）ゲノムはどのようにして次世代に遺伝するのか？ 葉緑体やミトコンドリアの遺伝子はメンデルの法則には従わず、多くの生物において母親のみから遺伝（母性遺伝）する。母性遺伝は、父の葉緑体やミトコンドリアゲノムが、受精の過程で積極的に分解されてしまう。雄のDNAはどのようにして選択的に認識され、そして分解されるのか。また雌の葉緑体ゲノムはいかにして保護／安定化されるのか。そして性と母性遺伝は遺伝子レベルでどのように結びついているのか。こうした疑問に答えて行くため、当該年度では、これまでに我々が見いだした母性遺伝変異体について詳細な解析をおこない、問題解決の糸口を掴むことを目指す。</p>

2. 研究の実施状況

<p>【プロジェクト1】 葉緑体遺伝子発現の制御機構</p> <p>①転写調節 ～シグマ因子の機能分化と進化～：葉緑体（色素体）遺伝子の転写は、核コードのバクテリオファージ型 RNA ポリメラーゼと色素体コードの原核生物型 RNA ポリメラーゼ(PEP: plastid-encoded plastid RNA polymerase)によって担われている。このうち PEP のプロモーター認識を調節することで色素体遺伝子発現を制御するのがシグマ因子である。高等植物シロイヌナズナでは機能分化した <i>SIG1</i>~<i>6</i>がこの役割を担うが、より原始的な基部陸上植物ゼニゴケでは3コピーしかない。これらのシグマ因子の機能を探るため、<i>SIG1</i>破壊株(<i>Mpsig1</i>)を単離してその葉緑体遺伝子発現を定量 RT-PCR により解析した。その結果、ゼニゴケにおいてシグマ因子の機能分化は未熟であり、また <i>SIG1</i>は <i>SIG4</i>の役割を担っていたらしいことが明らかになった（論文準備中）。</p> <p>②転写後調節 ～mRNA 安定制御因子の探索～：葉緑体では遺伝子発現の際、複数の遺伝子が同時に転写され、その後複雑な転写後調節（プロセッシング、polyA 付加、RNA 結合蛋白質による 5' /3' UTR の RNA 二次構造安定化）を経て成熟 mRNA となる。この系において mRNA の蓄積量を決定する要因の</p>

一つは mRNA 安定性である。これまで葉緑体の mRNA 安定性制御機構は専らバクテリアとのアナロジーに基づく逆遺伝学的解析に依っており、PNPase や RNaseII などの 3' →5' exoribonuclease が同定されてきたものの、その全貌は未だ明らかではない。そこで私達は、あえて順遺伝学的アプローチをとることで、葉緑体 mRNA 安定性制御に関わる新規因子を同定したいと考えてきた。不安定なルシフェラーゼ遺伝子を緑藻クラミドモナスの葉緑体に形質転換し、ほとんど発光しない株を宿主として変異導入をすることで、発光が向上した変異体の単離を目指してきた。その結果、ようやく昨年末、変異体候補が3系統単離された。これらの変異体について、その原因遺伝子の同定に挑戦してみたい。

【プロジェクト2】葉緑体ゲノムの遺伝/安定化

①母性遺伝変異体 *biparental (bp) 31* の解析：雄も雌もミトコンドリア/葉緑体をもつ。しかし多くの場合、雄のものは子孫には伝わらず、雌のものだけが子に伝わる(母性遺伝)。単細胞緑藻クラミドモナスでは、接合子で雄の葉緑体 DNA が積極的に分解されてしまう。これまでに我々が単離した母性遺伝変異体 *biparental (bp) 31* の解析の結果、母性遺伝は配偶子特異的ホメオティック蛋白質 Gsp1 によって制御されることが明らかになった (Nishimura et al., Plant Cell (2012))。

(a) *bp31* の RNAseq 解析：*bp31* のトランスクリプトーム解析の結果、接合子において 1000 を超える遺伝子がたった一つの遺伝子 Gsp1 によって制御されていることがわかった。現在この遺伝子群について、とりわけ母性遺伝との関連性を考慮して解析を進めている。

(b) 葉緑体 DNA 修復、組換え関連遺伝子群：野生型接合子ではオルガネラ移行型の DNA 修復・組換え遺伝子群の発現が一斉に上昇することが明らかになった。この現象は *bp31* 接合子では観察されない。接合子におけるこれらの遺伝子群の機能を明らかにするため、amiRNA 抑制株を単離して解析したところ、葉緑体ゲノム構造の不安定化、核様体構造の異常な凝集が観察された。おそらく、これらの遺伝子群は、次世代に受け継がれる葉緑体ゲノムの健全性、葉緑体核様体構造の維持に貢献していると推測している。

(c) 葉緑体移行型ヌクレアーゼ：野生型接合子のみで発現上昇する遺伝子リストのなかには、ヌクレアーゼとしてのモチーフをもつものが幾つか存在する。それらについて網羅的抑制実験をおこない、母性遺伝に及ぼす影響を解析している。

(d) イノシトール代謝：*bp31* の表現型を相補するにあたっては、*GSP1* に加えてイノシトールモノフォスファターゼ (*INM1*) をコードする遺伝子の導入が必須であった。*INM1* は *myo-inositol* の *de novo* 合成に関わり、その発現は奇妙なことに雌配偶子に特異的である。その機能について明らかにするため、クラミドモナスの配偶子誘導過程、接合子成熟過程における IP6, IP3 といった各因子の変動を野生株と *bp31* で比較解析する。

②葉緑体核様体の構造、ダイナミクスの探究：雄の葉緑体 DNA がいかにして選択的に分解されるのか、雌の葉緑体 DNA は如何にして保護されるのか。一つの可能性としては、葉緑体核様体の蛋白質構成改変や修飾があげられる。私達は、高等植物の葉緑体から藻類に至るまで広く保存される核様体蛋白質である HU を手掛かりとして、クラミドモナスを対象とした免疫沈降実験を敢行することで、雌雄の配偶子誘導、接合子形成、接合子成熟過程といった様々な発生分化段階における核様体構成タンパク質を詳細に比較・解析し、そのダイナミズムに迫りたいと考えている。

様式19 別紙1

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 4 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 2 件 <u>Nishimura, Y.</u>, Shikanai, Y., Nakamura, S., Kawai-Yamada, M., and Uchimiya, H. (2012) The Gsp1 triggers sexual developmental program including inheritance of cpDNA and mtDNA in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>. <i>Plant Cell</i> 24, 2401-2414. Ueda, M., Kuniyoshi, T., Yamamoto, H., Sugimoto, K., Ishizaki, K., Kohchi T., <u>Nishimura, Y.</u>, Shikanai, T. (2012) Composition and physiological function of the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in <i>Marchantia polymorpha</i>. <i>Plant J.</i> 72, 683-693. (掲載済み一査読無し) 計 1 件 <u>西村芳樹</u> 「緑藻クラミドモナスから母性遺伝の謎に挑む」 (2012) <i>海洋と生物</i> 34, 453-458. (未掲載) 計 1 件 Hamaji, T., Ferris, P.J., Nishii, I., <u>Nishimura, Y.</u>, Nozaki, H. Distribution of the sex-determining gene <i>MID</i> and molecular correspondence of mating types within the isogamous genus <i>Gonium</i> (<i>Volvocales</i>, <i>Chlorophyta</i>). <i>PLoS One</i> in press.</p>
<p>会議発表 計 12 件</p>	<p>専門家向け 計 11 件 <u>西村芳樹</u>、田中瞳、鹿内利治「母性遺伝を操る生殖プログラムの構造」日本植物学会第 7 6 回大会(2012 年 9 月 15-17 日@兵庫県立大学、姫路) <u>西村芳樹</u>、田中瞳、鹿内利治「単細胞緑藻クラミドモナスにおいて細胞質遺伝は Gsp1 によって制御される」日本植物形態学会第 24 回大会(2012 年 9 月 14 日@兵庫県立大学、姫路) <u>西村芳樹</u>、田中瞳、鹿内利治「緑藻クラミドモナスの生殖とオルガネラ遺伝をつなぐ遺伝子を探る」第 54 回日本植物生理学会年会(2013 年 3 月 22 日@岡山大学、岡山) 小田原真樹、井上貴之、関根靖彦、<u>西村芳樹</u>「RecA ホモログによる葉緑体ゲノム安定性の維持」第 5 4 回日本植物生理学会年会(2013 年 3 月 22 日@岡山大学、岡山) 小田原真樹、井上貴之、<u>西村芳樹</u>、関根靖彦「RecA ホモログによる葉緑体ゲノム安定性の維持」日本遺伝学会第 84 回大会(2012 年 9 月 2 4 日~2 6 日、九州大学、福岡) <u>西村芳樹</u>「葉緑体の遺伝子発現制御と母性遺伝の基幹に迫る」さきがけ領域会議(2012 年 8 月 21 日、東レ総合研修センター、三島) <u>西村芳樹</u>「母性遺伝の生殖プログラムによる制御」研究会“オルガネラと生殖：細胞質における遺伝情報の次世代への伝達・分配”(2012 年 11 月 30 日、遺伝研、三島) 小田原真樹、<u>西村芳樹</u>「葉緑体母性遺伝と葉緑体ゲノム安定性維持機構」生命理学研究センターセミナー(2013 年 3 月 8 日、立教大学、東京) <u>Nishimura, Y.</u>, Shikanai, T., Nakamura, S., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H. 「Gsp1 triggers a sexual developmental program including the cytoplasmic inheritance in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>.」(15th International conference on the cell & molecular biology of <i>Chlamydomonas</i>, June 5-9, 2012, Potsdam, Germany). Hamaji, T., Mogi, Y., Ferris, P.J., Miyagishima, S., Mori, T., Olson, B.J.S.C., Suzuki, M., Toyoda, A., Fujiyama, A., James G. Umen, Ichiro Nishii, <u>Yoshiki Nishimura</u>, Hisayoshi Nozaki 「Sequencing the mating type locus of the isogamous colonial <i>Gonium pectorale</i>」15th International Conference on the Cell & Molecular Biology of <i>Chlamydomonas</i> (June 5-9, 2012, Potsdam, Germany). Ueda, M., Kuniyoshi, T., Yamamoto, H., Sugimoto, K., Ishizaki K., Kohchi, T., <u>Nishimura Y.</u>, Shikanai T., Chloroplast genetic engineering technology in <i>Marchantia polymorpha</i>. <i>Marchantia</i> workshop 2012, (Nov 15-17, 2012, Kumamoto, Japan). 一般向け 計 1 件 <u>西村芳樹</u>「子孫に遺伝しない父親の遺伝子？」京大アカデミックデイ(2012 年 9 月 2 日@京都大学百年時計台記念館、京都)</p>
<p>図書 計 0 件</p>	

様式19 別紙1

<p>産業財産権 出願・取得状 況 計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>http://www.bot.kyoto-u.ac.jp/j/5_iden.html</p>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<p>2012年9月2日に開催された京大アカデミックデイ(於 京都大学百周年時計台記念館)に参加して展示をおこない、高校生や地域の方々に研究内容を平易な表現で説明した。専門家とは異なる角度からの質問や、医療に携わる方々からの鋭い質問など、学会とは異なる新鮮な反応を多々頂くことができた。(総来場者数 531名)</p>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載 計0件</p>	
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されません

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	108,000,000	39,120,000	34,440,000	34,440,000	0
間接経費	32,400,000	11,736,000	10,332,000	10,332,000	0
合計	140,400,000	50,856,000	44,772,000	44,772,000	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	16,994,179	34,440,000	0	51,434,179	49,090,561	2,343,618	0
間接経費	11,736,000	10,332,000	0	22,068,000	11,034,000	11,034,000	0
合計	28,730,179	44,772,000	0	73,502,179	60,124,561	13,377,618	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	35,139,217	共焦点レーザー顕微鏡、顕微鏡デジタルカメラ等
旅費	902,750	研究成果発表旅費(Chlamy2012(独、ポツダム))
謝金・人件費等	12,600,284	博士研究員、技術補佐員人件費
その他	448,310	論文投稿費等
直接経費計	49,090,561	
間接経費計	11,034,000	
合計	60,124,561	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
(株)トミー精工製 微量高速冷却遠心機	MX-307	1	769,650	769,650	2012/6/14	京都大学
オリンパス(株)製 顕微鏡デジタルカメラ	DP73	1	1,476,300	1,476,300	2012/6/21	京都大学
独国ライカマイクロシステムズ社製プリズム分光型共焦点レーザー顕微鏡	TCS SP5 DS RGB	1	21,000,000	21,000,000	2012/6/27	京都大学
NuAire社製 安全キャビネット	NU-480-300D	1	999,600	999,600	2013/1/15	京都大学
ネッパジーン(株)製 遺伝子導入装置	NEPA21-S	1	1,972,950	1,972,950	2013/3/7	京都大学