

平成 30 年 1 2 月 2 7 日

若手研究者海外挑戦プログラム報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

受付番号 201880025

氏 名 藤 井 祥
(氏名は必ず自署すること)

若手研究者海外挑戦プログラムによる派遣を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。
なお、下記記載の内容については相違ありません。

記

1. 派遣先：都市名 ミシガン州 アナーバー (国名 アメリカ合衆国)
2. 研究課題名 (和文) : 色素体ゲノム発現制御の網羅的解析から迫る葉緑体の形成機構
3. 派遣期間： 平成 30 年 6 月 10 日 ~ 平成 30 年 1 1 月 2 8 日 (173 日間)
4. 受入機関名・部局名： ミシガン大学 文理芸術学部 分子細胞発生生物学科
5. 派遣先で従事した研究内容と研究状況 (1/2 ページ程度を目安に記入すること)

植物は発芽したあと、子葉の細胞中にある未分化な色素体を葉緑体に分化させることで光合成能力を獲得する。とくに、植物が土の中のような暗所で芽生えて黄化芽生えとなった場合は、色素体はいったん葉緑体の前駆体であるエチオプラストに分化する。この子葉に光が当たると、エチオプラストは急速に葉緑体へと分化する。色素体には独自の DNA があり、色素体の機能に必須な遺伝子が多数含まれている。色素体が葉緑体へと分化する過程では、色素体 DNA とタンパク質の複合体である核様体の構造が大きく変化するとともに、多数の色素体遺伝子の発現量が上昇する。しかしながら、色素体における核様体の構造と遺伝子発現の関係については、謎に包まれた部分が多く残っている。派遣先では、葉緑体が分化する過程において、色素体 DNA の高次構造がどのように変化するか明らかにすることを目指して研究を行った。方法としては、単離色素体にエンドヌクレアーゼである *Micrococcus Nuclease* (MNase) を処理することで、色素体 DNA がどの程度保護されているかについて解析した。DNA がタンパク質や膜構造によって保護されている場合は、MNase によって分解されにくい。したがって、MNase 処理後に得られる DNA 断片が長いほど、DNA が強く保護されていると考えられる。キュウリの黄化芽生えと緑化した芽生えからそれぞれ単離したエチオプラストと葉緑体を MNase で処理したところ、葉緑体ではエチオプラストよりも DNA が分解されにくいことが明らかとなった。さらに、1%のホルムアルデヒドにより固定した組織から色素体を単離し、MNase 処理を行ったところ、固定しない場合よりも得られる DNA 断片が長くなった。ホルムアルデヒド処理によって核様体の構造が安定化されることで、より生体内に近い状態を検出できたのではないかと考えられる。ホルムアルデヒド処理後に単離した葉緑体から得られた DNA 断片のシーケンス解析 (MNase-seq) を行ったところ、色素体ゲノムの中に特に分解されにくい領域の存在が確認された。現在、エチオプラストから得られた DNA 断片の配列解析が派遣先で進められている。

6. 研究成果発表等の見通し及び今後の研究計画の方向性 (1/2 ページ程度を目安に記入すること)

研究成果については、派遣期間中にミシガン大学内での研究会で2度発表を行い、聴衆からの反応は良好であった。今後は、2019年に開催される国際学会での発表が予定されている。また、学術誌上での成果発表を目指し、多面的な解析から色素体の核様体の形態と機能の関係性に迫ることを予定している。

まず、エチオプラストと葉緑体の両方から得られたDNA断片の配列を比較し、保護されるDNA領域がどのように異なるか、詳細に調べる。また、これらの色素体から抽出したRNAを用いてRNA-seqを行い、DNAが保護されている度合いとその領域の転写量に、どのような関係があるか明らかにする。色素体における転写活性は、全体としてはエチオプラストよりも葉緑体のほうが高い。葉緑体のほうがDNAが強く保護されていたことから、葉緑体において転写を活性化する因子がDNAに多数結合し、MNaseによるDNA分解が抑制された可能性が考えられる。色素体の核様体は色素体内部の膜に結合した状態で存在しており、葉緑体の分化に伴って発達した膜系がDNAを強く保護するようになる可能性も考えられる。後者の可能性を検討するため、色素体の膜面分を調整し、膜近傍に存在するDNAについても解析も行う予定である。加えて、高解像度顕微鏡による核様体の観察を行い、MNase-seqから予想されるDNAの高次構造が、生体内での核様体の構造にどのように影響するか、明らかにすることを目指す。MNase-seqとは反対に、DNAの保護されていない領域を切り出して解析する方法に、トランスポザーゼを用いたオープンクロマチン領域解析(ATAC-seq)というものがある。色素体に対してATAC-seqが適用可能であるかどうかの検討も行うことを予定している。ATAC-seqの適用が可能であれば、その結果をMNase-seqの結果と比較することで、色素体核様体でのDNAがどのように保護されているか、より厳密に知ることができる。

MNase-seqは核のクロマチン構造の解析手法として重要であり、近年はATAC-seqも利用される機会が増えている。将来的には、このMNase-seqやATAC-seqによるDNAの高次構造解析を色素体の核様体に対しても一般的に使用できるような技術として確立することを目指す。核様体の構造を解析する手法は、これまで顕微鏡による観察が主流であり、分子レベルでDNAやタンパク質の配置を調べることは困難であった。シーケンス技術を基盤とした核様体構造の解析手法が確立されれば、色素体の個々の遺伝子が機能するうえで重要な配列の特定や、その配列に結合する因子の発見にもつながり、核様体機能に関する研究の新局面を切り開く糸口になると期待される。

7. 本プログラムに採用されたことで得られたこと (1/2 ページ程度を目安に記入すること)

派遣前までは生理学的な解析を用いて研究をしていた私にとって、本プログラムで分子生物学の手法、とくにシーケンス解析に必要な技術や考え方を習得できたことは、非常に大きな収穫であった。これまで知らなかった解析技術を新しく身につけることによって、その技術を知らなければ思いつきもしなかったような研究計画を練ることができるようになるということを学んだ。

私はこれまで色素体の分化に関する現象を解析していたが、派遣先の研究室は核のクロマチン構造の制御機構について研究しており、色素体に関する知識や経験の蓄積はほとんどなかった。このようなバックグラウンドの全く異なる環境での研究ができたことも、貴重な体験であった。派遣当初は研究室のメンバーに意見を伝えるのに苦労し、私の英語力の問題なのではないかと不安になることも多かった。そんなとき、受入先のPIであるAndrzej Wierzbicki准教授は、「あなたの英語は皆十分理解している。前提知識が異なる者同士がきちんと議論しようとしているからこそ苦労しているのだ。自信をもっていい」と励ましてくださった。実際に、何度も繰り返し話し合っていくうちに、次第に互いの理解が深まり、言葉が完璧に話せたり聞き取れたりしなくても、互いの意図している内容が推測できるまでになったように感じている。言語もバックグラウンドも異なる環境でも、数か月努力すれば何とか理解しあえるようになるという経験は、今後直面する研究環境の変化にも対応はできるのだろうという安心感につながったように思う。

研究室メンバーの研究の進め方から勉強になることも多かった。私なら大変すぎると判断して諦めるだろう実験にも、果敢に挑む傾向が強いように感じられた。その挑戦が必ずしも成功するとは限らないのだけれど、行き詰まったときに突破口を開いたり、目新しい技術を生み出したりするためには、そのような姿勢で研究を続けることも重要なのではないかと感じられた。