

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 25 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

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。

【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。

2. 研究の実施状況

【プロジェクト1】 転写調節：葉緑体ゲノムの転写 ～基部陸上植物ゼニゴケから迫るその進化～
 ①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 *SIG1* がこの役割を担うが、基部陸上植物ゼニゴケでは3コピーしかない。我々はこれらのシグマ因子の機能を探るため、*SIG1* 破壊株 (*Mpsigt*) 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 *SIG1* は *SIG4* の役割を担っていたらしいことが明らかになり、植物の陸上化にともなうシグマ因子の機能分化過程がみえてきた (Ueda et al., Genome Biol. Evo. 2013)。
 ②ゼニゴケの葉緑体ゲノムには、進化の過程で葉緑体ゲノムからまさに失われようとしている遺伝子がいくつか存在している。クロロフィル合成に関わる DPOR 遺伝子をコードする *ch1B* 遺伝子がそ

の一例である。我々はゼニゴケ葉緑体遺伝子破壊法をもちいて *chlB* を破壊し、その表現型を詳細に観察した。その結果、ゼニゴケにおいて *chlB* は暗所でのクロロフィル中間体の代謝を速やかにおこなってその蓄積量を低レベルに保つことで、光に曝された際の活性酸素種の発生を防いでいるらしいことが明らかになった (Ueda et al., Genome Biol. Evo 2014)。

【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)。

②*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 (Lee, Nishimura et al., 論文準備中)。また、クラミドモナスの母性遺伝は、*mt+*配偶子にたいする紫外線照射によって攪乱されることが 1960~70 年代の古典的遺伝学研究から明らかにされている。紫外線照射は、接合子の成熟、接合胞子形成などには影響をあたえず、母性遺伝のみを特異的に阻害するといわれているが、その具体的な分子機構については明らかでない。母性遺伝の制御遺伝子群を絞り込む手掛かりとすべく、紫外線照射の具体的な標的を RNAseq 解析により網羅的に探索したところ、長らく謎だった紫外線照射による母性遺伝攪乱の正体がみえてきた (Harada et al., 論文準備中)。

③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 (Odahara et al., 論文準備中)。

③葉緑体核様体の構造とその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、そのダイナミズムを明らかにした。(Kobayashi et al., 論文準備中)。

④新たな母性遺伝研究のモデルの確立にむけて：母性遺伝研究の新たなモデルとして酵母様菌類クリプトコッカスに注目した。クリプトコッカスは同型配偶子で生殖をおこなうにもかかわらず、ミトコンドリアゲノムが片親遺伝する。光ピンセットによる 1 細胞解析の結果、 α ミトコンドリア DNA が接合直後に選択的に分解されることが明らかになり、またそれに関わる遺伝子群についても手掛かりが得られてきた。(Nishimura et al., 論文準備中)

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 5 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 3 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Ueda, M., Tanaka, A., Sugimoto, K., Shikanai, T., <u>Nishimura, Y.,*</u> (2014) <i>ch1B</i> requirement for Chlorophyll biosynthesis under short photoperiod in <i>Machantia polymorpha</i>. <i>Genome Biol. Evol.</i> 6, 620–628. 2) Ueda, M., Takami, T., Peng, L., Ishizaki, K., Kohchi, T., Shikanai, T., and <u>Nishimura, Y.,*</u>. (2013) Subfunctionalization of sigma factors during the evolution of land plants based on mutant analysis of liverwort (<i>Marchantia polymorpha</i> L.) MpSIG1. <i>Genome Biol. Evol.</i> 5, 1836–1848. 3) Hamaji, T., Ferris, P.J., Nishii, I., <u>Nishimura, Y.</u>, Nozaki, H. (2013) Distribution of the sex-determining gene <i>MID</i> and molecular correspondence of mating types within the isogamous genus <i>Gonium</i> (<i>Volvocales, Chlorophyta</i>). <i>PLoS One</i> 8, e64385. <p>*Corresponding author</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 2 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) <u>Nishimura, Y.*</u>, Shikanai, T., Kawamoto, S., and Toh-e, A., Active digestion of α mitochondrial DNA and autophagic elimination of α mitochondrial structure are the driving forces for uniparental inheritance in <i>Cryptococcus neoformans</i>. 2) Kobayashi, Y., Harada, N., <u>Nishimura, Y.</u>, Saito, T., Fujiwara, T., Kuroiwa, T., Misumi, O.* Algae sense exact temperature: small heat shock proteins are regulated by 50°C in <i>Cyanidioschyzon merolae</i>.
<p>会議発表 計 20 件</p>	<p>専門家向け 計 18 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) <u>西村芳樹</u> 「母性遺伝の基盤～雄葉緑体／ミトコンドリア DNA の選択的破壊プログラム～」(2013 年 5 月 28 日、東京工業大学) 2) <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」植物細胞生物学若手の会 (2013 年 8 月 26 日、東京大学) 3) <u>西村芳樹</u> 「葉緑体、ミトコンドリアの遺伝子の機能、次世代への遺伝のしくみ」環境共生生物学特別講義 (2013 年 9 月 2–3 日、山口大学) 4) <u>西村芳樹</u> 「クラミドモナスの生殖と母性遺伝、四分子解析」(2013 年 11 月 29 日、クラミドモナスワークショップ、基礎生物学研究所、東岡崎) 5) 小林優介、田草川真理、原田尚実、深尾陽一朗、鹿内利治、<u>西村芳樹</u> 「オルガネラゲノム核様体の構造様式とその分子動態」(2013 年 11 月 29 日、クラミドモナスワークショップ、基礎生物学研究所、東岡崎) 6) <u>西村芳樹</u>、鹿内利治、東江昭夫 「酵母様菌類クリプトコッカスのミトコンドリア母性遺伝機構」(2013 年 9 月 12 日、日本植物形態学会 25 回大会、北海道大学、札幌) 7) 小林優介、田草川真理、原田尚実、深尾陽一朗、鹿内利治、<u>西村芳樹</u> 「プロテオーム解析から紐解く核様体構造」(2013 年 9 月 12 日、日本植物形態学会 25 回大会、北海道大学、札幌) 8) <u>西村芳樹</u> 「母性遺伝における片親オルガネラの選択的排除機構」(2013 年 9 月 13~15 日、日本植

	<p>物学会第77回大会、北海道大学、札幌)</p> <p>9) 小林優介, 原田尚実, 小田原真樹, 深尾陽一朗, 鹿内利治, <u>西村芳樹</u>「オルガネラゲノム核様体の構造様式: その蛋白質構成、ダイナミズムに迫る」(2013年9月13~15日、日本植物学会第77回大会、北海道大学、札幌)</p> <p>10) <u>西村芳樹</u>「母性遺伝の分子機構を視る」第55回日本植物生理学会年会/シンポジウム「植物科学が切開く細胞研究のフロンティア」招待講演(2014年3月18-20日、富山大学、富山)</p> <p>11) Ueda, M., Tanaka, A., Sugimoto, K., Kohchi, T., Shikanai, T., <u>Nishimura, Y.</u>, Requirement of <i>chlB</i> (a subunit of DPOR) for chlorophyll synthesis under short photoperiod in liverwort (<i>Marchantia polymorpha</i> L.). <i>Marchantia IV</i> (JSPS Bilateral Program), Dec 8-11, 2013, Melbourne, Australia</p> <p>12) Ueda, M., Tanaka, A., Shikanai, T., <u>Nishimura, Y.</u> <i>Marchantia</i> plastid (chloroplast) transformation for the study of endosymbiosis. 12th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, August 18 -22, 2013, Halifax, Canada</p> <p>13) Ueda, M., Tanaka, A., Shikanai, T., <u>Nishimura, Y.</u>, Identification of a gene which is in the intermediate stage of gene loss from chloroplast genome in <i>Marchantia polymorpha</i>. (2013年12月3-6日、日本分子生物学会第35回年会、神戸ポートアイランド、神戸)</p> <p>14) 原田尚実、小林優介、鈴木孝征、東山哲也、鹿内利治、<u>西村芳樹</u>「RNAseq でみえてきた UV による母性遺伝攪乱の機構」(2013年9月12日、第25回日本植物形態学会、北海道大学、札幌)</p> <p>15) 原田尚実、小林優介、鈴木孝征、東山哲也、鹿内利治、<u>西村芳樹</u>「緑藻クラミドモナスを用いた UV 照射によるストレス応答と母性遺伝の攪乱に関する網羅的遺伝子発現解析」(2013年9月14日、第77回日本植物学会、北海道大学、札幌)</p> <p>16) 原田尚実、小林優介、田草川真理、鈴木孝征、東山哲也、鹿内利治、<u>西村芳樹</u>「RNAseq で解く紫外線による母性遺伝攪乱の分子機構」(2013年11月29日、クラミドモナスワークショップ、基礎生物学研究所、東岡崎)</p> <p>17) Harada, N., Kobayashi, Y., Takusagawa, M., Suzuki, T., Higashiyama, T., Shikanai, T., Nishimura, Y. 「RNAseq analysis on UV light-induced disturbance of the uniparental inheritance in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>.」(2014年1月9-10日、2nd Kyoto-Bristol Symposium, Kyoto Univ., Kyoto, Japan)</p> <p>18) Harada, N., Kobayashi, Y., Takusagawa, M., Suzuki, T., Higashiyama, T., Shikanai, T., Nishimura, Y. 「RNAseq analysis on UV light-induced disturbance of the uniparental inheritance in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>.」(2013年12月13日、International Symposium for "Biodiversity & Evolution" project of Excellent Graduate Schools, Kyoto Univ., Kyoto)</p> <p>一般向け 計2件</p> <p>1) <u>西村芳樹</u>「消えた父親の遺伝子」(2013年12月21日、京都大学アカデミックデイ、京都)</p> <p>2) <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」(2014年3月1日、FIRST シンポジウム、新宿)</p>
<p>図書 計1件</p>	<p>1) Nishimura, Y. Active digestion of paternal chloroplast DNA in a young zygote of <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>: the basis for maternal inheritance. <i>Atlas in Plant Cell Structure</i>, Chapter 3 (Springer, Heidelberg, Germany) in press</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 京都大学大学院理学研究科植物分子遺伝学研究室 ホームページ</p>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・ 京都大学アカデミックデイ (2013年12月21日、京大) : 高校生、大学生を含む一般向け発表企画。 来場者数529名。 ・ FIRST シンポジウム『科学技術が拓く2030年』へのシナリオ (2014年3月1日) : 研究者、研究 支援者、行政関係者、企業関係者、研究者を目指す方、科学技術に興味をお持ちの方々を対象とした 一般向け研究発表会。早稲田総研イニシアティブの企画により、ベルサール新宿グランドにて開催さ れた。
<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25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す

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	73,560,000	34,440,000	0	0
間接経費	32,400,000	22,068,000	10,332,000	0	0
合計	140,400,000	95,628,000	44,772,000	0	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	2,343,618	34,440,000	0	36,783,618	36,783,618	0	0
間接経費	11,034,000	10,332,000	0	21,366,000	21,366,000	0	0
合計	13,377,618	44,772,000	0	58,149,618	58,149,618	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	24,492,401	試薬、消耗品、遺伝子導入装置、ルミノ・イメージアナライザー等
旅費	990,580	学会出席(植物学会、植物生理学会)
謝金・人件費等	10,724,438	博士研究員、技術補佐員人件費
その他	576,199	英文校閲、論文投稿料等
直接経費計	36,783,618	
間接経費計	21,366,000	
合計	58,149,618	

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
㈱トミー精工製 微量高速冷却遠心機	MX-307	1	769,650	769,650	2013/7/30	京都大学
㈱タナカ クリーンベンチ仕様改造遺伝子導入装置	IDERA/GIE-III	1	2,360,400	2,360,400	2013/9/17	京都大学
トミー精工 植物インキュベータ	CLE-303	2	802,620	1,605,240	2014/1/28	京都大学
仏国Vilber-Lourmat社製 ゲル撮影システム	E-BOX-VX2/20M	1	1,155,000	1,155,000	2014/1/20	京都大学
ライカマイクロシステムズ株式会社製 対物レンズ	HX PL APO 100x /1.47 OIL CORR T IRF /11506318	1	1,317,120	1,317,120	2014/1/24	京都大学
英国GEヘルスケア社製 ルミノ・イメージルミナイザー	-	1	4,998,000	4,998,000	2014/1/31	京都大学
ImageQuant LAS4000 システム						
独国メルク社製 微小流体プラットフォーム CellASIC ONIX Microfluidic System	EV262	1	1,995,000	1,995,000	2014/2/13	京都大学