

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)

1. シゾン核ゲノム全塩基配列の決定とその特徴

本研究の材料の 1 つである *Cyanidioschyzon merolae* (以下、シゾン) は高温強酸性の温泉に生息する単細胞紅藻であり、1 つの細胞にミトコンドリア、色素体 (葉緑体) などの細胞小器官 (オルガネラ) を 1 つずつ持ち、光の明暗により細胞分裂を同調させることで、オルガネラの分裂も同調させることができるためオルガネラ研究には最適な生物である。研究分担者の黒岩はこのような利点に早くから注目し、ミトコンドリアゲノム (32211 塩基対)、色素体 (葉緑体) ゲノム (149987 塩基対) に続いて、核ゲノムの全塩基配列の決定に成功した。その結果、以下のような事実、特徴が明らかになった。1) ゲノムサイズは、16,520,305 塩基対で、染色体は 20 本、植物としては最小であり、酵母に近い。その解読率は 99.9% を越え真核生物としては最も解読された生物である。2) 遺伝子数は僅か 5,331 個で酵母に近い、しかし真核生物の遺伝子に特徴的なイントロンが僅か 27 と極めて少なく、シゾンの原始性もしくは単純性を覗わせる。3) 核小体は存在するが、rRNA のセットのコピー数は、酵母で数百、高等動植物では数千あるが、シゾンでは僅か 3 セットで真核生物として最少である。またコンデンシンは中期染色体の凝縮に必須と考えられているが、染色体は凝縮しないにもかかわらず 4 個ある。4) オルガネラに関わる多くの遺伝子のセットも最小である。例えば、ダイナミンは、高等な真核生物ではエンドサイトーシス、隔膜形成、小胞形成など、膜の分断に働く 10 数個の遺伝子からなるファミリーを形成している。しかしシゾンには、この遺伝子は僅か 2 個しかなく、それぞれミトコンドリアと色素体の分裂装置の一員として分裂の最後に働く。またこれまでその他のオルガネラの分裂に関与すると考えられている遺伝子は全てない。5) シゾンの分裂は光の明暗で制御されるが、光シグナル伝達として必須なファイトクロームやフォトトロピンの遺伝子はない。6) カルビンサイクルをはじめ光合成に関わる酵素を分析したところ、シゾンが最も始原的な植物であり、葉緑体の単一起源説を裏づける結果となった。以上の様な事実、及び複数の遺伝子を使って分子系統学的に比較解析した結果から、シゾンは植物のみならず動物、菌類などを含めた全真核生物の中で最も早く分岐した生物であることが明らかとなった。シゾンはオルガネラ研究だけでなく、真核生物の起源、進化そして基本的な構造構築機構の研究をする上で多くのヒントを与えてくれる遺伝子構成を持った生物であると考えられる。

2. 葉緑体 DNA の組み換え、修復に関与すると考えられるバクテリア型 RecA タンパク質の解析

葉緑体における光合成明反応では伝達される電子の遺漏により活性酸素が生じる。葉緑体 DNA は活性酸素や太陽光からの紫外線により損傷を受けている。葉緑体 DNA は葉緑体機能に必須であるため、DNA 損傷は修復されていると考えられるが、その機構は不明である。DNA 損傷のうち、2 本鎖切断は最も重篤な損傷であるが、これは組み換え修復系によって修復される。バクテリアにおいて組み換え修復系の中心的役割を果たしているのが RecA タンパク質である。我々は既に、*Physcomitrella patens* (ヒメツリガネゴケ) の核ゲノムに、バクテリアの *recA* 遺伝子と相同性が高い 2 つの遺伝子を発見し、*PprecA1*、*PprecA2* と命名した。さらに *PprecA1* タンパク質はミトコンドリアに、*PprecA2* タンパク質は葉緑体に移行することを見出した。バクテリア RecA の機能から類推して、*PprecA2* タンパク質は葉緑体 DNA の修復に関与していると予想された。

(1) *PprecA2* 遺伝子による大腸菌 *recA* 欠損株の DNA 修復能の相補: 大腸菌 *recA* 欠損株は組み換え修復能がないため、DNA 損傷剤であるマイトマイシン C に感受性であるが、*PprecA2* 遺伝子を発現させるとマイトマイシン C に対する抵抗性を獲得した。この結果は、*PprecA2* タンパク質が DNA 修復能を有すること、葉緑体 DNA 修復系がバクテリアの DNA 修復系に類似していることを示唆している。

研究成果の概要 つづき

(2) *PprecA2* 遺伝子の発現解析 : ヒメツリガネゴケを DNA 損傷剤にさらして、葉緑体 DNA に損傷を与え、その際の細胞内における *PprecA2* の mRNA の発現量の変化を RT-PCR 法により解析した。その結果、DNA 損傷剤であるメチルメタンスルホン酸 (MMS)、ブレオマイシンいずれの処理時にも *PprecA2* 遺伝子の mRNA 発現レベルの有意な上昇が見られた。この結果は、葉緑体 DNA 損傷を検知した何らかの因子が、DNA 損傷に対応する為に必要な *PprecA2* の転写を誘導した結果であると考えられ、*PprecA2* の DNA 修復への関与を強く示唆する。

(3) DNA 損傷剤による PpRecA2 タンパク質の局在の変化 : *PprecA2*-GFP 遺伝子安定形質転換ヒメツリガネゴケ細胞では、1つの葉緑体内の 1ヶ所に PpRecA2-GFP タンパク質が集中して存在していることを示す大きなスポットを形成し、これが葉緑体 DNA と一致していた。MMS 投与により DNA 損傷を与え、6 時間後の GFP の局在解析を行ったところ、葉緑体内の大きなスポットは消滅し、葉緑体全体に GFP の小さなスポットが複数個観察された。同時に DNA 染色を行うと、この GFP のスポットは葉緑体全体に点状に散在している葉緑体 DNA と一致していた。この結果は、PpRecA2 タンパク質が DNA 損傷によりその分布が変わることを示し、恐らく損傷を受けた DNA 部分に PpRecA2 タンパク質が分配されるのではないかと考えられる。

(4) *PprecA2* 遺伝子の変異株の作成 : ミトコンドリアに移行する *PprecA1* の遺伝子破壊株は取得できたが、繰返して実験を行ったにもかかわらず *PprecA2* の遺伝子破壊株は取得できなかった。この結果は、*PprecA2* が細胞の生育に必須な遺伝子であることを強く示唆している。そこで、*PprecA2* 遺伝子のアンチセンス RNA を発現する遺伝子を組み込んだ変異株、および、いわゆる dominant negative タイプの作用をすると予想される、一部を欠失した変異型 PpRecA2 タンパク質を産生する遺伝子を組み込んだ変異株を現在作成中である。この変異株の細胞形態や葉緑体の活性、葉緑体 DNA の損傷度合いなどを解析することにより、PpRecA2 タンパク質の機能を明らかにしていくことができると考えている。

(5) オルガネラゲノム DNA 損傷の検出 : 上述の *PprecA2* 変異株の DNA 修復能を検証するためには DNA 損傷を定量的に検出する必要がある。アルカリアガロース電気泳動法 + サザンブロット法を用いて DNA 二本鎖切断や一本鎖切断を、定量 PCR 法を用いて DNA 切断及びメチル化等の損傷の検出を試みた。アルカリアガロース電気泳動法では MMS による葉緑体 DNA 損傷を追うことができ、その結果、MMS 処理直後が最も損傷頻度が高く、その後は回復をたどり、数日で完全に回復する事が判明した。また、定量 PCR 法では MMS による DNA 損傷後の核 DNA、葉緑体 DNA、ミトコンドリア DNA 各々の修復の過程を同時に追う事が出来た。*PprecA2* 変異株の取得ができ次第、今回確立された DNA 損傷検出法を用いて変異株の DNA 修復能を検証する。

3. 葉緑体分裂リングの分画と構成タンパク質の探索

これまでに葉緑体の分裂には、葉緑体 (色素体) 分裂リング (PD リング)、FtsZ リング、ダイナミンリングが関与していることが判明している。このうち、FtsZ リングとダイナミンリングに関しては、その遺伝子は同定されているが、PD リングの遺伝子は同定されていない。PD リングの遺伝子を同定できれば、葉緑体分裂に関する一連の制御機構を明らかにする途が開けるはずである。PD リング遺伝子の同定は、PD リングを集めてそのアミノ酸配列を TOF-MAS 解析で求めることにより達成できる。そこで、明暗周期をつけた培養法によってシゾンの細胞分裂と葉緑体の分裂を同調化させ、分裂期の細胞を得た。この細胞から葉緑体を集め、界面活性剤処理を経て粗 PD リング分画を得ることに成功した。この分画と (PD リングが形成されていない) 間期の細胞の葉緑体の各々の SDS-PAGE の結果を比較することによって、粗 PD リング分画特異的なタンパク質の存在を確認した。このタンパク質の TOF-MAS 解析を現在検討中である。

研究発表 (研究によって得られた研究経過・成果を発表した①～④について、該当するものを記入してください。該当するものが多い場合は主要なものを抜粋してください。)

- ①雑誌論文 (著者名、論文標題、雑誌名、巻号、発行年、ページ)
- ②図書 (著者名、出版者、書名、発行年、総ページ数)
- ③シンポジウム・公開講演会等の開催 (会名、開催日、開催場所)
- ④その他 (学会発表、研究報告書の印刷等)

① (1) Nishida, K., Misumi, O., Yagisawa, F., Kuroiwa, H., Nagata, T. and Kuroiwa, T.: Triple immunofluorescent labeling of FtsZ, Dynamin and EF-Tu revealed a loose association between the inner and outer membrane mitochondrial division machinery in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *J. Hist. Cyto.* In press.

(2) Miyagishima, S., Nozaki, H., Nishida, K., Nishida, K., Matsuzaki, M. and Kuroiwa, T. (2004) Two types of FtsZ proteins in mitochondria and red-lineage chloroplasts: the duplication of FtsZis implicated in endosymbiosis. *J. Mol. Evol.* 58, 1-13.

(3) Matsuzaki, M., Misumi, O., et al., Genome sequence of the ultra-small unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. (2004) *Nature* 428, 653-657

(4) Ohtsubo, E., Minematsu, H., Tsuchida, K., Ohtsubo, H., and Sekine, Y. Intermediate molecules generated by transposase in the pathway of transposition of bacterial insertion element IS3. (2004) *Adv. Biophys.* 38, 125-139.

(5) Nanamiya, H., Akanuma, G., Natori, Y., Murayasu, R., Kosono, S., Kudo, T., Kobayashi, K., Ogasawara, N., Park, S.-M., Ochi, K. and Kawamura, F. (2004) Zinc is a key factor in controlling alternation of two types of L31 protein in the *Bacillus subtilis* ribosome. **Mol. Microbiol.** 52: 273-283

(6) Miyagishima, S., Nishida, K., Mori, T., Matsuzaki, M., Higashiyama, T., Kuroiwa, H. and Kuroiwa, T. (2003) A plant-specific dynamin-related protein forms a ring at the chloroplast division site. *Plant Cell* 15: 655-665.

(7) Miyagishima, S., Nishida, K. and Kuroiwa, T. (2003) An evolutionary puzzle: chloroplast and mitochondrial division rings. *Plant Cell* 15: 655-665.

(8) Nishida, K., Takahara, M., Miyagishima, S., Kuroiwa, H., Matsuzaki, M. and Kuroiwa, T. (2003) Dynamic recruitment of dynamin for final mitochondrial severance in a primitive red alga. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 2146-2151.

(9) Ohta, N., Matsuzaki, M., Misumi, O., Miyagishima, S., Nozaki, H., Tanaka, K., Shin-i, T., Kohara, Y. and Kuroiwa, T. (2003) Complete sequence and analysis of the plastid genome of the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *DNA Res.* 10: 67-77.

④ (1) Miyagishima, S., Nishida, K., Kuroiwa, H. and Kuroiwa, T. Sequential formation of the plastid division complex: FtsZ, plastid-dividing, and dynamin rings participates with plastid division by distinct modes. American society of plant biologists (Jul 25-Jul 30, 2003: Honolulu, Hawaii, USA)

(2) 西田敬二、宮城島進也、黒岩晴子、森稔幸、黒岩常祥「原始紅藻におけるオルガネラ分裂機構の解析」日本植物形態学会第15回大会(2003年9月・札幌)

(3) 松崎素道、三角修己、宮城島進也、野崎久義、太田にじ、佐藤直樹、田中寛、新井理、小原雄治、黒岩常祥「原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* の全ゲノム」日本植物学会第67回大会(2003年9月・札幌)

(4) 三角修己、松崎素道、宮城島進也、黒岩常祥「*Cyanidioschyzon merolae* のゲノム情報に基づいたオルガネラ関連遺伝子の解析」日本植物学会第67回大会(2003年9月・札幌)

(5) 七宮 英晃, 赤沼 元気, 名取 陽祐, 村山 力則, 古園 さおり, 工藤 俊章, Park, Seung-Moon, 越智 幸三, 小林 和夫, 小笠原 直毅, 河村 富士夫, 枯草菌リボソーム蛋白質のパラログ重複遺伝子とその発現変動解析, 2004年度日本農芸化学会年会(2004年3月・広島)

(6) 小田原真樹、井上貴之、藤田知道、長谷部光泰、関根靖彦「植物ミトコンドリアで機能する RecA 相同タンパク質の解析」第26回日本分子生物学会年会(2003年・12月・神戸)

(7) 井上貴之、小田原真樹、藤田知道、長谷部光泰、関根靖彦「ヒメツリガネゴケ葉緑体で機能する RecA 相同タンパク質の解析」第26回日本分子生物学会年会(2003年・12月・神戸)

研究成果の詳細**<申請当初の計画・目的の達成度>**

葉緑体 DNA の修復に関する解析は予定通り進行した。また、葉緑体の分裂を司る分裂リングの解析は、構成タンパク質の同定には至っていないが、比較的順調に進行した。当初予定していた葉緑体へのタンパク質輸送機構の解析については、シゾンの核ゲノム中に、関与していると思われる候補遺伝子が見つかることができなかつたので、解析できなかった。また、当初予定していたトランスポゾンを用いた葉緑体 DNA の改変系の開発については、バクテリアを用いたモデル実験には成功したので、これを植物細胞 (クラミドモナス) に適用している最中であり、当初の目的達成までの見通しは立てることができたと考えている。

<優れた成果があがった点>

シゾンの核ゲノムの全塩基配列 (16, 520, 305 塩基対) の決定とその解析結果は Nature に掲載され、新聞にも大きく取り上げられた極めて優れた成果である。当初の予想以上に、核ゲノムの全塩基配列が物語る事実が数多くあつた。特に重要な点は、シゾンが植物のみならず動物、菌類などを含めた全真核生物の中で最も早く分岐した生物であり、多様な真核生物の系譜の「要」となる始原的な生物であることが判明した点である。これは、今の所ほとんどが謎である真核生物成立の過程の解明にシゾンが極めて有用な情報を提供してくれることを意味する。また、オルガネラ DNA の動態がほとんど分かっていない現在において、バクテリアの DNA 組み換えタンパク質が葉緑体でも実際に DNA の組み換え修復に関わっていることを示したのは、優れた結果であると考えている。

<問題点>

ヒメツリガネゴケの最大の利点は遺伝子の改変が自由にできる点である。遺伝子産物の機能を解析するのに、その遺伝子を破壊した株の性質を調べることは極めて有効な手段であるが、ヒメツリガネゴケ PprecA2 遺伝子の破壊株は取得できなかった。この事実は、PprecA2 遺伝子が生育に必須であることを示しているが、破壊株が得られないのでそれを用いた解析はできないのは当然である。現在、遺伝子の活性を低下させる変異を導入した変異株を作成中であるが、どの程度活性を低下させることができるかの予測が難しい点が問題である。

<外部資金への応募状況・応募予定、および研究期間終了後の展望>

シゾンの核ゲノム塩基配列決定の成果に基づき、シズンを研究材料にして真核生物の成立の原理の解明を目的として「真核生物社会の誕生と構築原理の探究- 極限環境生物を基盤に-」と名付けた研究拠点形成を目指して 21 世紀 COE プログラムに申請した。また、現在、理学系研究科は学術フロンティア推進事業「環境変動に対する生命の適応戦略」を展開している。2006 年度にはこの事業の継続を予定している。継続申請にあたっては、現在進行中のテーマのうち業績のあがった分野に特化して特色あるプロジェクトを申請する予定であり、本 SFR 研究はその核を形成するものであると考えている。SFR 研究期間終了後も研究を継続し、そこから得られた成果の上に新たな研究展開をはかりたい。

<その他 (本資金制度等について、ご意見・ご要望等がありましたらご記入下さい)>

まとまった金額の研究費を援助して頂いたので、集中的に申請研究テーマに取り組むことが出来ました。深く感謝します。どうもありがとうございました。

※ この（様式4）は、研究評価のために使用するものであり、公表はしません。