

## 研究紹介

ChIP法を用いた葉緑体光合成遺伝子の転写制御解析<sup>§</sup>

千葉大学 大学院園芸学研究科 応用生命化学領域

華岡 光正\*

葉緑体には、独自のゲノムDNAとその遺伝子発現系が存在している。我々は葉緑体分化や環境応答に際した光合成遺伝子の転写制御機構の解明を目指しており、本稿では筆者らが最近確立したクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法を用いて行った研究の一例について紹介する。分化後期に発現が誘導されるシグマ因子SIG1に着目し、ChIP法を用いて通常条件と強光ストレス条件下における標的プロモーターへの結合変化を調べた結果、両条件でのSIG1の発現挙動と相関が見られなかったことから、SIG1の翻訳 (後) 制御やストレス応答シグマ因子SIG5との役割分担の可能性が示唆された。

## 1. はじめに

葉緑体は、原始シアノバクテリアの細胞内共生により誕生したと考えられている。従って、葉緑体には、共生に由来する独自のゲノムDNAとその転写翻訳システムが残されている。光合成機能に関わる遺伝子はシアノバクテリアから継承され、その多くは今なお葉緑体ゲノム上に残されている。一方で、植物の長い進化を経て、シアノバクテリア由来の多くの遺伝情報は葉緑体ゲノムから消失したか、核ゲノムに移行した。その結果、現在の植物では、光合成などの葉緑体機能に必要な遺伝子群は、核ゲノムと葉緑体ゲノムに分かれて存在している。そのため、発達や環境変化に応じて、両ゲノム上の遺伝子の発現を協調させることが、植物の生存戦略において特に重要であると考えられる。

両ゲノムにおける遺伝子発現の協調には、核と葉緑体間の双方向のシグナル伝達が重要な役割を果たす。現在までに、核からのシグナル (アンテログレード (順方向の) シグナル) による葉緑体遺伝子の発現調節に関する知見が蓄積しているが、葉緑体からのシグナル (レトログレード (逆方向の) シグナル) による核遺伝子の発現制御についても、最近になって非常に注目されている<sup>2)</sup>。我々は、葉緑体分化や環境応答に際した遺伝子発現の協調メカニズム、中でも光合成遺伝子の転写制御に関わる核と葉緑体間の情報伝達機構の解明を目指して研究を行っている。

本研究では、核コードのシグマ因子による葉緑体遺伝子の転写制御の理解に向けて、筆者らが最近確立したクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法をベースとした解析を行ったので、その概要について紹介する。

## 2. 葉緑体シグマ因子SIG1の発現量変化

葉緑体には、遺伝子の転写に関わるRNAポリメラーゼが2種類存在しており、それぞれNEP (Nuclear-encoded plastid RNA polymerase)、PEP (Plastid-encoded plastid RNA polymerase) と呼ばれる。これらのうち、光合成遺伝子の転写には、主にPEPが関わりとされている。PEPは、シアノバクテリア由来の複数のサブユニットからなる酵素であり、転写伸長を司る

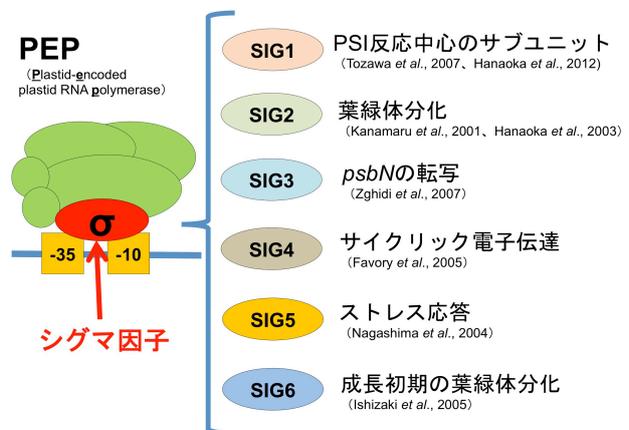


図1 シロイヌナズナの葉緑体シグマ因子

<sup>§</sup> 第4回日本光合成学会シンポジウム ポスター発表賞受賞論文

\* 連絡先 E-mail: mhanaoka@faculty.chiba-u.jp

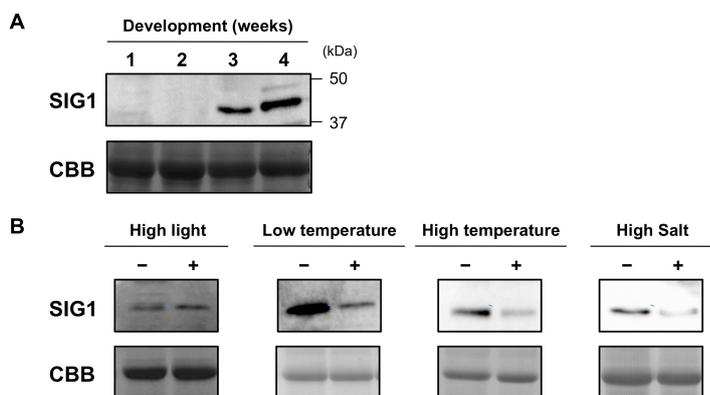


図2 様々な発達段階・ストレス条件下におけるSIG1の発現解析  
(A) 通常条件 (22°C、連続光) で生育させて1~4週目のシロイヌナズナ (Col-0) におけるSIG1タンパク質の蓄積量の変化。  
(B) 播種後4週目の植物体に強光 (1200  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 1時間)・低温 (4°C, 2時間)・高温 (30°C, 2時間)・塩 (250 mM NaCl, 2時間) ストレスを与えた際のSIG1タンパク質の蓄積量の変化。

コアサブユニットの遺伝子群は葉緑体ゲノムにコードされている。一方で、プロモーター配列の認識と転写の開始に必要なシグマ因子は、核ゲノムにコードされており複数種存在している。すなわち、植物の発達段階や環境条件に応じて、複数のシグマ因子を選択的に発現させることで、核による葉緑体遺伝子群の特異的な転写制御を可能にしていると言える。シロイヌナズナには6種類のシグマ因子が存在し<sup>3)</sup>、それぞれのシグマ因子の欠損株等を用いたこれまでの解析を通じて、個々の機能が徐々に明らかにされつつある (図1) が、その全体像の理解には至っていない。中でも、シロイヌナズナにおけるSIG1の機能についてはこれまであまり明らかにされていなかった。

本研究では、SIG1のタンパク質レベルでの挙動を明らかにするため、イムノブロット解析を行った。まず、発達段階に伴ったSIG1の蓄積量の変化を調べたところ、播種後1週目、2週目ではほとんど発現が見られなかったのに対して、3週目、4週目と週

を追うごとにSIG1の蓄積が見られた (図2)。このことから、SIG1は発達段階の後期で機能するシグマ因子であり、葉緑体分化・発達の初期過程において光合成装置の構築に関わるとされるSIG2<sup>4,5)</sup>やSIG6<sup>6)</sup>との機能分担の可能性が示唆された。

続いて、様々なストレス条件下におけるSIG1の蓄積量の変化を調べた。強光・低温・高温・塩ストレスを付与

した植物体におけるSIG1の発現を調べた結果、強光ストレスによりわずかに増加した一方で、低温・高温・塩ストレス下では蓄積量が減少する傾向が見られた (図2)。転写レベルではこれらのストレスにตอบสนองしないことが示されている<sup>7)</sup>ことから、各種ストレス条件下におけるSIG1の発現は、主に翻訳 (後) の段階で調節される可能性が示唆された。

### 3. SIG1による葉緑体遺伝子の発現制御

従来の葉緑体転写制御の研究は、目的因子の欠損株などを用いた分子遺伝学的手法、あるいは*in vitro*転写やゲルシフト法を利用した生化学的手法を中心に進められてきた。しかしながら、生化学的手法では一般

に*in vivo*の生理条件下における役割を説明することはできない。また、分子遺伝学的手法では遺伝子欠損による間接的な影響が同時に観察されるため、目的とする制御因子の直接的・特異的な制御を理解することが困難である。さらに、必須遺伝子であれば欠損させることはできず、また重複機能を持つパラログが存在する場合は機能相補により欠損の影響が見えなかったりと、解析が困難なケースも実際に多く見られた。そのため、従来のアプローチのみでは葉緑体遺伝子の転写制御系の全体像の理解に到達することは困難であると考えられた。以上の問題点を解決する技術として、近年この分野の研究で盛んに利用されているクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法が挙げられる。ChIP法は、転写因子をはじめとしたDNA結合タンパク質のターゲットへの結合状態を*in vivo*でリアルタイムにモニターすることのできる画期的な解析手法であり (図3)、生物種を問わず転写制御研究の最有力なツールの一つと

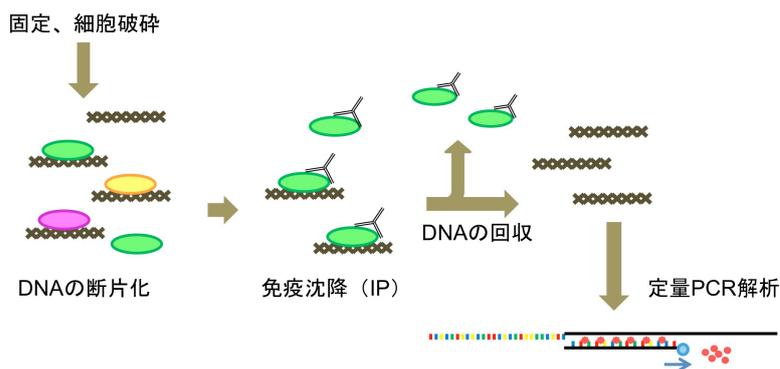


図3 クロマチン免疫沈降法の概略

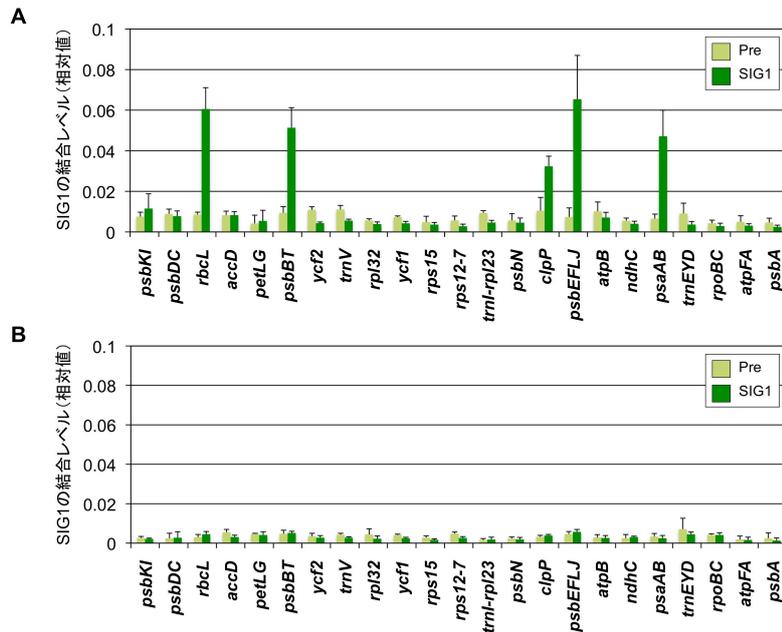


図4 SIG1のターゲットプロモーターへの*in vivo*における結合変化

様々な葉緑体遺伝子のプロモーター領域へのSIG1タンパク質の結合レベルを、(A) 通常生育条件 (22°C、連続光)、(B) 強光ストレス条件 (1200  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、1時間) のそれぞれについてChIP-qPCR解析によって調べた。

して広く利用されている。しかし、シロイヌナズナの葉緑体研究にChIP法を導入した事例はこれまで報告されていなかった。そこで本研究では、葉緑体遺伝子の転写制御機構についてさらに理解を深めるため、酵母における実験系<sup>8)</sup>をモデルに葉緑体のChIP解析系を構築し、シグマ因子SIG1とそのターゲット遺伝子の関係を調べることで実験系の評価を行った。

SIG1の蓄積が見られる4週目の植物体をホルムアルデヒドによって固定し、DNA-タンパク質複合体を抽出し、SIG1が結合しているターゲットDNAの量を定量PCRによって測定した。その結果、イネでSIG1の標的として報告されている*psaAB*プロモーターなど<sup>9)</sup>への特異的な結合が確認されたことに加えて、*clpP*などこれまで情報のない新たなプロモーターへの結合も検出することができた (図4)。さらに、強光ストレスを与えた植物体から回収したサンプルを用いて同様の実験を行ったところ、SIG1の標的プロモーターへの結合は強光ストレスに依存して一様に弱まる傾向が見られた (図4)。上述のイムノブロット解析において、SIG1の蓄積量は強光ストレスにより減少しないことが示されている。このことから、強光ストレス下においてSIG1は分解されるのではなく一過的にプロモーターから離れて、ストレスから解放された際に迅速に

元の転写を行うため待機していると予想された。ストレス条件下では別のシグマ因子であるSIG5が機能することが見出されており、環境変化によるSIG1との役割分担やシグマ因子の使い分けについても、今後のChIP法を用いた解析を通じてさらに明らかにできるものと期待される。

#### 4. 今後の展望

本研究では、葉緑体遺伝子の転写制御システムを解明する上での有力ツールとしてのChIP法に基づいた解析系を立ち上げ、SIG1のターゲットプロモーターへの結合と、ストレスの有無によるパターンの変化を示すことができた<sup>10)</sup>。ChIP法は、*in vivo*における転写調節因子の役割を知る上で重要な手がかりとなるものであり、他の解析手法と組み合わせること

で、葉緑体の遺伝子発現制御機構の詳細とその生理的意義についてさらに理解が深まるものと期待される。筆者の研究グループでは、光合成生物における遺伝子発現制御系の普遍性と特異性、さらにそのシステムの進化に興味を持って研究を進めており、本稿で紹介したシロイヌナズナの葉緑体研究に加え、シアノバクテリアにおける強光ストレス応答や概日時計に依存した転写制御についても、ChIP法を用いた解析を通じてその実体に迫ることに成功している<sup>11,12)</sup>。最近、単細胞紅藻*Cyanidioschyzon merolae* (シズン) の葉緑体転写制御系の研究にもChIP法の導入を試みており、新たな展開が見えつつある。ChIP法の利用により*in vivo*での遺伝子発現の動態を捉えることで、光合成生物に特有の転写制御システムの全体像を明らかにしていきたいと考えている。

#### 謝辞

本研究の遂行にあたり、東京工業大学の田中寛教授のご協力・ご助言を賜りました。また、千葉大学の大学院生・学生の皆さん、特に加藤麻衣子氏、木山貴史氏、安間美里氏には、一連の実験において多大な協力を頂きました。深く感謝申し上げます。

Received November 15, 2013, Accepted November 26, 2013, Published December 31, 2013

## 参考文献

1. Goldschmidt-Clermont, M. (1998) Coordination of nuclear and chloroplast gene expression in plant cells. *Int. Rev. Cytol.* 177, 115-180.
2. Woodson, J.D. and Chory, J. (2008) Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nat. Rev. Genet.* 9, 383-395.
3. Schweer, J., Türkeri, H., Kolpack, A. and Link, G. (2010) Role and regulation of plastid sigma factors and their functional interactors during chloroplast transcription - recent lessons from *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Cell Biol.* 89, 940-946.
4. Kanamaru, K., Nagashima, A., Fujiwara, M., Shimada, H., Shirano, Y., Nakabayashi, K., Shibata, D., Tanaka, K. and Takahashi, H. (2001) An *Arabidopsis* sigma factor (SIG2)-dependent expression of plastid-encoded tRNAs in chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 42, 1034-1043.
5. Hanaoka, M., Kanamaru, K., Takahashi, H. and Tanaka, K. (2003) Molecular genetic analysis of chloroplast gene promoters dependent on SIG2, a nucleus-encoded sigma factor for the plastid-encoded RNA polymerase, in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* 31, 7090-7098.
6. Ishizaki, Y., Tsunoyama, Y., Hatano, K., Ando, K., Kato, K., Shinmyo, A., Kobori, M., Takeba, G., Nakahira, Y. and Shiina, T. (2005) A nuclear encoded sigma factor, *Arabidopsis* SIG6, recognizes sigma-70 type chloroplast promoters and regulates early chloroplast development in cotyledons. *Plant J.* 42, 133-144.
7. Nagashima, A., Hanaoka, M., Fujiwara, M., Shikanai, T., Kanamaru, K., Takahashi, H. and Tanaka, K. (2004) The multi-stress responsive plastid sigma factor, SIG5, directs activation of the *psbD* light responsive promoter (LRP) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 45, 357-368.
8. Kuo, M.H. and Allis, C.D. (1999) In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods.* 19, 425-433.
9. Tozawa, Y., Teraishi, M., Sasaki, T., Sonoike, K., Nishiyama, Y., Itaya, M., Miyao, A. and Hirochika, H. (2007) The plastid sigma factor SIG1 maintains photosystem I activity via regulated expression of the *psaA* operon in rice chloroplasts. *Plant J.* 52, 124-132.
10. Hanaoka, M., Kato, M., Anma, M. and Tanaka, K. (2012) SIG1, a sigma factor for the chloroplast RNA polymerase, differently associates with multiple DNA regions in the chloroplast chromosomes *in vivo*. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 12182-12194.
11. Hanaoka, M. and Tanaka, K. (2008) Dynamics of RpaB-promoter interaction during high light stress, revealed by chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plant J.* 56, 327-335.
12. Hanaoka, M., Takai, N., Hosokawa, N., Fujiwara, M., Akimoto, Y., Kobori, N., Iwasaki, H., Kondo, T. and Tanaka, K. (2012) RpaB, another response regulator operating circadian clock-dependent transcriptional regulation in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J. Biol. Chem.* 287, 26321-26327.

## Analysis of Chloroplast Transcriptional Regulation by Chromatin Immunoprecipitation

Mitsumasa Hanaoka\*

Division of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Horticulture, Chiba University