単細胞紅藻シゾンにおける光応答戦略　-葉緑体自律的な転写制御-

華岡 光正
千葉大学大学院園芸学研究科
〒271-8510 千葉県松戸市松戸 648

Light-dependent transcriptional regulation in chloroplasts

Key words: chloroplasts, *Cyanidioschyzon merolae*, light response, transcriptional regulation, two-component system.

Mitsumasa Hanaoka
Graduate School of Horticulture, Chiba University
Matsudo 648, Matsudo, Chiba 271-8510, Japan

１．はじめに

葉緑体は，原始的な真核細胞にシアノバクテリアの祖先種が細胞内共生することで誕生したと考えられている。それゆえ葉緑体には，共生に由来する独自のゲノム DNA とその遺伝子発現（転写・翻訳）システムが備わっている。植物の光応答戦略は，一般に核の遺伝子発現を介するものとして理解されているが，少なくとも共生当初においては葉緑体がその機能を担っていたと推定される。本稿では，単細胞紅藻 *C. merolae* における葉緑体遺伝子の転写制御に関する知見について概説し，内部共生後の光環境応答系や遺伝子発現制御系の進化について考察する。

２．単細胞紅藻シゾン

Cyanidioschyzon merolae（*C. merolae*，以下シゾンと呼ぶ）は単細胞の紅藻であり，イタリア・ナポリ近郊の硫酸性温泉から単離された。高温・強酸性の極限環境に生息するこの微細藻は，核・ミトコンドリア・葉緑体をそれぞれ１個ずつしか持たないなど，非常に単純な細胞構造を示し，その特徴を利用してオルガネラ分裂装置の研究をはじめ，植物細胞生物学のモデルとしての研究が進められてきた（Kuroiwa 2000, Misumi et al. 2005）。

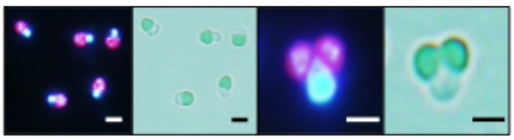

図1　単細胞紅藻*Cyanidioschyzon merolae* (佐藤大地氏撮影)
通常条件で増殖中の細胞（左）と分裂期細胞の拡大写真（右）を示した。それぞれDAPIによる染色像と明視野像を示している。Scale barは全て1μmである。

シゾンのミトコンドリア（Ohta et al. 1998），葉緑体（Ohta et al. 2003），核（Matsuzaki et al. 2004, Nozaki et al. 2007）のゲノムは全て解読されており，イントロンがほとんどない，遺伝子の重複が極めて低いなどの原始的な特徴がゲノム構造からも示され，ポストゲノム研究のモデルとしても注目が集まっている。最近になって，外来 DNA の導入や一過性発現，相同組換えを利用した遺伝子ターゲッティングも可能となっており（Ohnuma et al. 2008, Ohnuma et al. 2009, Imamura et al. 2010），今後の分子遺伝学研究の発展が期待されている。

３．シゾン葉緑体ゲノム

葉緑体は，シアノバクテリアの内部共生に由来する独自のゲノムを持つ。シゾンの葉緑体にも他の植物と同様に二本鎖環状のゲノム DNA が存在しているが，高等植物の葉緑体ゲノムと比較して，サイズは約 150 kbp とほぼ変わらないものの，遺伝子数は 243 とシロイヌナズナやイネ・タバコなど高等植物（約 120 遺伝子）の約 2 倍存在していることが示された（Ohta et al. 2003）。このことは，葉緑体ゲノムにより密に遺伝子が配置していることを示しており，共生前のシアノバクテリアの性質を強く反映していると言える。しかしながら，葉緑体で機能するタンパク質の総数は 2000-3000 と言われており，葉緑体ゲノム上の遺伝子だけで全ての機能を担うには程遠い。共生によって持ち込まれたシアノバクテリアの遺伝子の大部分は，進化の過程で消失したか核に移行したと考えられている（Leister 2003）。シゾンにおいても多くの葉緑体タンパク質をコードする遺伝子は核ゲノムに存在していることが明らかとなったが，高等植物では核ゲノムにコードされているような多くの遺伝子が未だ葉緑体ゲノム上に残されていることから，より共生当初の様相を示していると考えることができる。

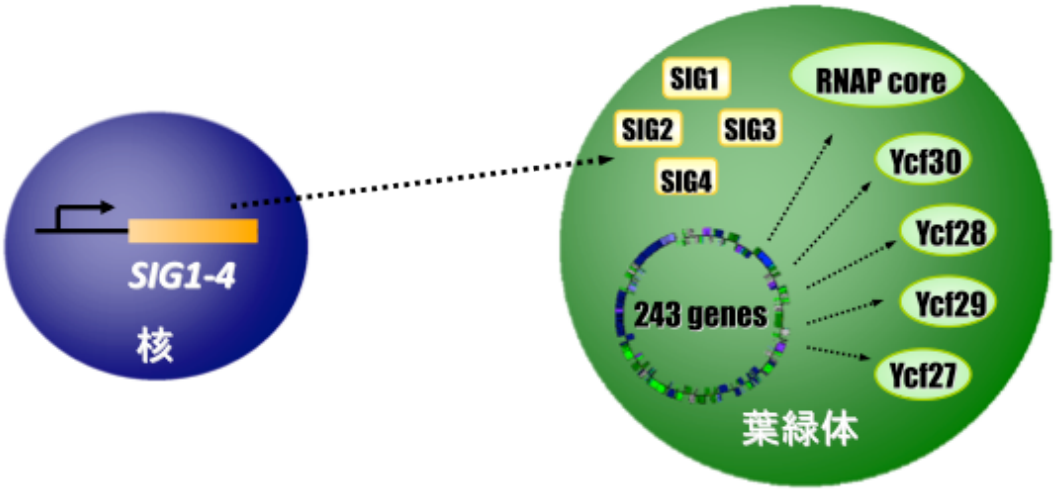

図2　シゾンにおける葉緑体転写制御系の特徴。葉緑体ゲノム上には高等植物の約2倍を超える243遺伝子がコードされており，共にバクテリア由来のRNAポリメラーゼとリボソームにより転写・翻訳される。また，葉緑体ゲノムにコードされる共生体由来の4種の転写因子が存在することも特徴の一つであり，細胞内共生直後により近い状態を反映しているものと予想される。

４．シゾンの葉緑体転写制御

上述の通り，葉緑体で機能するタンパク質をコードする遺伝子は，核ゲノムと葉緑体ゲノムに分かれて存在しているため，光合成などの葉緑体機能を正常に構築・維持するために両ゲノムの協調的な遺伝子発現が必須である（Goldschmidt-Clermont 1998）。したがって，環境変化や発達のステージに依存した遺伝子発現制御が重要な役割を果たす。これまでに，光環境に応答した核による葉緑体遺伝子の転写制御に関する研究が様々な植物種で展開されており，特に，葉緑体 RNA ポリメラーゼのプロモーター認識に関わるシグマ因子の使い分けによる転写制御の実体が，シゾンと高等植物の両方において示されている（Kanamaru et al. 2001, Hanaoka et al. 2003, Ishizaki et al. 2005, Minoda et al. 2005）。

一方で，このような核による葉緑体の転写制御に加えて，シゾンにおいてはシアノバクテリア

由来と考えられる 4 種の原核生物型の転写因子をコードする遺伝子が，葉緑体ゲノム上にコードされている。これらは Ycf27-Ycf30 と呼ばれ，シゾン以外の紅藻類の葉緑体ゲノムにも存在している（Reith & Munholland 1995, Glöckner et al. 2000）。これらのうち Ycf27 と Ycf29 は，それぞれ OmpR 型と NarL 型に分類される二成分制御系のレスポンスレギュレーターをコードしており，シアノバクテリアの Rre31（RpaA）・Rre26（RpaB），および Rre1 にそれぞれ相同性が高いとされている（Ashby et al. 2002）。RpaA と RpaB は，当初はステート遷移（光環境に応答して PSI と PSII のアンテナサイズを調節する）に相補的に関わる調節因子として同定されており（Ashby & Mullineaux 1999），また，シアノバクテリアにおいて，RpaA は概日時計の出力系に（Takai et al. 2006），RpaB は強光ストレス応答に関わる（Kappell & van Waasbergen 2007, Seki et al. 2007, Hanaoka et al. 2008）ことがそれぞれ示されており，以上のことからもシゾンの葉緑体に残された二成分制御系が何らかの光環境応答に深く関わる可能性が考えられる。

５．葉緑体自律的な環境応答と転写制御

環境応答に深く関わるとされている二成分制御系のレスポンスレギュレーター遺伝子（Ycf27・Ycf29）がシゾンの葉緑体に残されていることから，共生前のシアノバクテリア細胞が有していた環境応答システム，特に光応答系の一部がシゾン葉緑体で（核とは独立して）今なお機能している可能性が予想された。実際，単離葉緑体を用いた Run-on 転写系（Hanaoka et al. 2010）とクロマチン免疫沈降法を用いた一連の実験により，シゾンの葉緑体には自律的な光応答転写制御系が存在することが示されている（Hanaoka et al. 未発表データ）。核制御から独立した自律的な転写制御については，別の葉緑体コードの転写因子である Ycf30 が CO_2 環境の応答に関わることが示されており（Minoda et al. 2010），葉緑体にコードされたこれら 4 種の転写因子がバクテリア型環境応答の名残として葉緑体独自の環境応答に関わることが強く示唆されている。

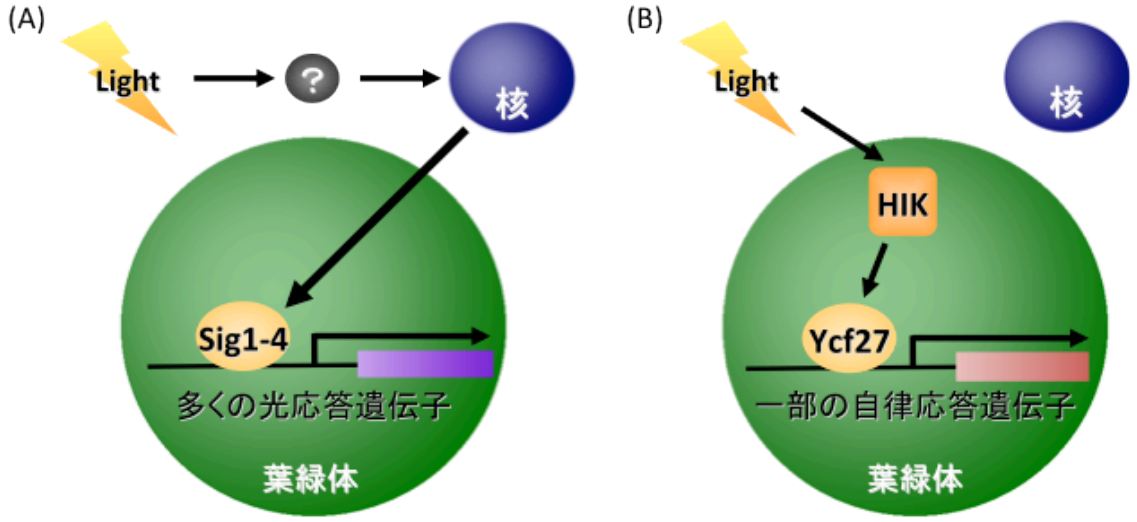

図3　光環境に自律応答した葉緑体遺伝子の転写制御。（A）葉緑体の光に応答した転写制御は、大部分が核や細胞質を介した制御を受けていると予想される。（B）一方，シゾンの葉緑体には，二成分制御系を介した光に自律的に応答した転写制御系が存在し、特定の遺伝子群の転写に関与している可能性が示唆されている。

シゾン葉緑体の二成分制御系において，レスポンスレギュレーターYcf27・Ycf29 と対をなす

ヒスチジンキナーゼ（CmHIK：環境刺激の受容に関わるセンサー）は，ただ 1 種のみ存在しており，核にコードされている（Matsuzaki et al. 2004）。この CmHIK は，植物型のフィトクロムやシアノバクテリアで光応答に関わることが示されている同様のヒスチジンキナーゼ（シアノバクテリオクロム）が有している GAF ドメイン（光受容に関わる発色団を結合する）に低いながらも相同性を持つ領域を持っており，何らかの光受容体として光応答に関わる可能性が示唆されているが，その詳細については明らかにされておらず，今後の研究による解明が期待される。

以前から高等植物においても葉緑体の自律的な光応答系が存在し，光化学系 I と光化学系 II のバランスを維持するために機能することが示されていたが（Pfannschmidt et al. 1999, Allen 2005），この制御に CSK（Chloroplast Sensor Kinase）と呼ばれるタンパク質が関わることが最近になって明らかにされた（Puthiyaveetil et al. 2008, Puthiyaveetil et al. 2010, Allen et al. 2011）。CSK は，ヒスチジンキナーゼではないものの弱く保存された GAF ドメインを持っており，先に述べた CmHIK のオーソログであることが示唆されている。このことは，シアノバクテリアに由来する光応答系が共生後の葉緑体においても部分的に残されており，進化を超えて継承されてきた可能性を示しており，たいへん興味深い。

6. 光応答系の進化

シアノバクテリアが共生する前の原始真核細胞では，光合成は行われていなかったと考えられ，それゆえ共生当初の光応答はシアノバクテリアが持ち込んだシステム，すなわち葉緑体を中心とするものであったと考えられる。進化の過程で，シアノバクテリア由来の多くの遺伝子は葉緑体ゲノムから失われたか，あるいは核に移行したとされているが，その過程で光応答に関わるコンポーネントの遺伝子も徐々に核に移行した，もしくは新しく構築されたものと考えられ，時間をかけて現在の植物型光応答系が形成されたと考えられる。

シゾンのゲノム上にはフィトクロム，クリプトクロム，フォトトロピンなど，典型的な植物型光受容体をコードしている遺伝子が見当たらないことが示されている（Matsuzaki et al. 2004, Nozaki et al. 2007）。核に光応答系が移行する途中の段階にシゾンが位置するのか，あるいは元々存在していた光応答系が極限環境に生息しているうちに失われてしまったのかは不明であるが，シゾンの多くの遺伝子発現が実際に光に応答することが示されている（Fujiwara et al. 2010）ため，シゾンが光に応答した何らかの遺伝子発現制御システムを有していることは確かである。上述のように，光受容に関わる可能性のある CmHIK は葉緑体に存在すると考えられ，シゾンにおいては葉緑体における光応答系が細胞全体の光制御に関与している可能性もあり，シゾン研究から（共生当初の）植物の光応答戦略の原型の一端を知ることができるかもしれない。

葉緑体独自の応答に加え，光に依存した核による葉緑体遺伝子発現制御は植物において重要な役割を果たすことはすでに述べてきた。一方で，近年「プラスチドシグナル」と呼ばれる葉緑体由来のシグナルが，核の遺伝子発現を制御するメカニズムが報告されており（Fernández & Strand 2008, Kleine et al. 2009），核と葉緑体間の双方向の情報伝達が重要であるとのモデルが提唱されている（Woodson & Chory 2008）。細胞内共生に際し，両ゲノムの遺伝子発現を協調させるためには，単に核側からの制御だけではなく，葉緑体の状態を反映してより効率的な調節を行う必要があったと考えられる。シゾンにおいて，そのような双方向シグナル伝達の基本機構が構築

されていたとするなら，光環境応答についても葉緑体で受容した光情報をプラスチドシグナルを介して核に伝達している可能性も考えられる。実際に，核ゲノムと葉緑体ゲノムの複製の協調において葉緑体由来のシグナル伝達が重要であることが示されている（Kobayashi et al. 2009, Kobayashi et al. 2011）。プラスチドシグナルを介したシゾンの遺伝子発現制御系については未だ明らかにされていない点が多いが，シロイヌナズナなど高等植物においては，核コードの光合成遺伝子の発現がプラスチドシグナルによって調節を受けることや，その情報伝達経路に関与するタンパク質が次々に明らかにされている。さらに，このようなシグナル伝達系は光合成器官のみならず，貯蔵組織などの非光合成色素体でもみられることが最近になって示されており（Enami et al. 2011），シゾンのような原始的な植物細胞で構築された核と葉緑体間の双方向シグナル伝達システムは高等植物への進化の過程でより高度に複雑に発達したものと考えられる。

7. 今後の展望

以上，単細胞紅藻シゾンに特徴的な葉緑体の転写制御系を紹介し，細胞内共生により葉緑体が誕生してから現在の高等植物に至るまでの光応答系の進化について考察した。光応答系に限らず，様々なバクテリア型のシステムが次第に核に移行していくにつれて，従来は共生体が担っていた環境応答系，遺伝子発現系は徐々に失われていったものと考えられる。それでも CSK のように高等植物の葉緑体においても自律的な光環境応答の一部は残されており，メインとなる核による制御，葉緑体によるプラスチドシグナルを介した制御とともに，植物細胞全体の光応答系を形成しているものと予想される。今後もひとつの制御様式に限定することなく，多面的な視点から光応答戦略の全体像を理解していくことが重要である。

一方，先にも述べた通り，シゾンは一種の極限環境生物であり，その環境で生きていくための必要最小限にまで遺伝子セットを落としている可能性があり，ある種の特徴的な光応答機構のみを残している可能性がある。したがって，紅色植物の光応答の一般像を知るために，また光応答戦略のより詳細な進化を知るためには，さらに多くの紅色植物を対象として同様なアプローチによる研究が必要であると考えられる。そのためには，さらに多くの紅色植物のゲノム情報を得ることがやはり重要であり，それによる光応答系の基本機構やその進化の解明が期待される。

引用文献

Allen, J.F. 2005. Photosynthesis: the processing of redox signals in chloroplasts. *Curr. Biol*. 15: R929-932.

Allen, J.F., Santabarbara, S., Allen, C.A., & Puthiyaveetil, S. 2011. Discrete redox signaling pathways regulate photosynthetic light-harvesting and chloroplast gene transcription. *PLoS One* 6: e26372.

Ashby, M.K., Houmard, J., & Mullineaux, C.W. 2002. The *ycf27* genes from cyanobacteria and eukaryotic algae: distribution and implications for chloroplast evolution. *FEMS Microbiol. Lett*. 214: 25-30.

Ashby, M.K., & Mullineaux C.W. 1999. Cyanobacterial *ycf27* gene products regulate energy transfer from phycobilisomes to photosystems I and II. *FEMS Microbiol. Lett*. 181: 253-260.

Enami, K., Ozawa, T., Motohashi, N., Nakamura, M., Tanaka K., & Hanaoka, M. 2011. Plastid-to-nucleus retrograde signals are essential for expression of nuclear starch biosynthesis genes during amyloplast differentiation in tobacco BY-2 cultured cells. *Plant Physiol*. 157: 518-530.

Fernández, A.P., & Strand, A. 2008. Retrograde signaling and plant stress: plastid signals initiate cellular stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 509-513.

Fujiwara, T., Kuroiwa, H., Yagisawa, F., Ohnuma, M., Yoshida, Y., Yoshida, M., Nishida, K., Misumi, O., Watanabe, S., Tanaka, K., & Kuroiwa, T. 2010. The coiled-coil protein VIG1 is essential for tethering vacuoles to mitochondria in vacuole inheritance of *Cyanidioschyzon merolae*. *Plant Cell* 22: 772-781.

Glöckner, G., Rosenthal, A., & Valentin, K. 2000. The structure and gene repertoire of an ancient red algal plastid genome. *J. Mol. Evol.* 51: 382-390.

Goldschmidt-Clermont, M. 1998. Coordination of nuclear and chloroplast gene expression in plant cells. *Int. Rev. Cytol.* 177: 115-180.

Hanaoka, M., Kanamaru, K., Takahashi, H., & 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.

Hanaoka, M., Kawakami, T., & Tanaka, K. 2010. Chloroplast isolation and run-on transcription assay in *Cyanidioschyzon merolae*. *Endocytobiosis Cell Res.* 20: 45-52.

Hanaoka, M., & 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.

Imamura, S., Terashita, M., Ohnuma, M., Maruyama, S., Minoda, A., Weber, A.P., Inouye, T., Sekine, Y., Fujita, Y., Omata, T., & Tanaka, K. 2010. Nitrate assimilatory genes and their transcriptional regulation in a unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*: genetic evidence for nitrite reduction by a sulfite reductase-like enzyme. *Plant Cell Physiol.* 51: 707-717.

Ishizaki, Y., Tsunoyama, Y., Hatano, K., Ando, K., Kato, K., Shinmyo, A., Kobori, M., Takeba, G., Nakahira, Y., & 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.

Kanamaru, K., Nagashima, A., Fujiwara, M., Shimada, H., Shirano, Y., Nakabayashi, K., Shibata, D., Tanaka, K., & Takahashi, H. 2001. An *Arabidopsis* sigma factor (SIG2)-dependent expression of plastid-encoded tRNAs in chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 42: 1034-1043.

Kappel, A.D., & van Waasbergen, L.G. 2007. The response regulator RpaB binds the high light regulatory 1 sequence upstream of the high-light-inducible *hliB* gene from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Arch. Microbiol.* 187: 337-342.

Kleine, T., Voigt, C., & Leister, D. 2009. Plastid signalling to the nucleus: messengers still lost in the mists? *Trends Genet.* 25: 185-92.

Kobayashi, Y., Imamura, S., Hanaoka, M., & Tanaka, K. 2011. A tetrapyrrole-regulated ubiquitin ligase controls algal nuclear DNA replication. *Nat. Cell Biol.* 13: 483-487.

Kobayashi, Y., Kanesaki, Y., Tanaka, A., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T., & Tanaka, K. 2009. Tetrapyrrole signal as a cell cycle coordinator from organelle to nuclear DNA replication in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 803-807.

Kuroiwa, T. 2000. The discovery of the division apparatus of plastids and mitochondria. *J. Electron Microsc.*

49: 123-134.

Leister, D. 2003. Chloroplast research in the genomic age. *Trends Genet*. 19: 47-56.

Matsuzaki, M. et al. 2004. Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* 428: 653-657.

Minoda, A., Nagasawa, K., Hanaoka, M., Horiuchi, M., Takahashi, H., & Tanaka, K. 2005. Microarray profiling of plastid gene expression in a unicellular red alga, *Cyanidioschyzon merolae*. *Plant Mol. Biol*. 59: 375-385.

Minoda, A., Weber, A.P., Tanaka, K., & Miyagishima, S.Y. 2010. Nucleus-independent control of the rubisco operon by the plastid-encoded transcription factor Ycf30 in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Plant Physiol*. 154: 1532-40.

Misumi, O., Matsuzaki, M., Nozaki, H., Miyagishima, S., Mori, T., Nishida, K., Yagisawa, F., Yoshida, Y., Kuroiwa, H., & Kuroiwa, T. 2005. *Cyanidioschyzon merolae* genome. A tool for facilitating comparable studies on organelle biogenesis in photosynthetic eukaryotes. *Plant Physiol*. 137: 567-585.

Nozaki, H., Takano, H., Misumi, O., Terasawa, K., Matsuzaki, M., Maruyama, S., Nishida, K., Yagisawa, F., Yoshida, Y., Fujiwara, T., Takio, S., Tamura, K., Chung, S.J., Nakamura, S., Kuroiwa, H., Tanaka, K., Sato, N., & Kuroiwa T. 2007. A 100%-complete sequence reveals unusually simple genomic features in the hot-spring red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *BMC Biol*. 5: 28.

Ohnuma, M., Misumi, O., Fujiwara, T., Watanabe, S., Tanaka, K., & Kuroiwa T. 2009. Transient gene suppression in a red alga, *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Protoplasma* 236: 107-112.

Ohnuma, M., Yokoyama, T., Inouye, T., Sekine, Y., & Tanaka K. 2008. Polyethylene glycol (PEG)-mediated transient gene expression in a red alga, *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Plant Cell Physiol*. 49: 117-120.

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

Ohta, N., Sato, N., & Kuroiwa, T. 1998. Structure and organization of the mitochondrial genome of the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* deduced from the complete nucleotide sequence. *Nucleic Acids Res*. 26: 5190-5198.

Pfannschmidt, T., Nilsson, A., & Allen, J.F. 1999 Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* 397: 625-628.

Puthiyaveetil, S., Ibrahim, I.M., Jelicić, B., Tomasić, A., Fulgosi, H., & Allen, J.F. 2010. Transcriptional control of photosynthesis genes: the evolutionarily conserved regulatory mechanism in plastid genome function. *Genome Biol. Evol*. 2: 888-896.

Puthiyaveetil, S., Kavanagh, T.A., Cain, P., Sullivan, J.A., Newell, C.A., Gray, J.C., Robinson, C., van der Giezen, M., Rogers, M.B., & Allen. J.F. 2008. The ancestral symbiont sensor kinase CSK links photosynthesis with gene expression in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 10061-10066.

Reith, M., & Munholland, J. 1995. Complete nucleotide sequence of the *Porphyra purpurea* chloroplast genome. *Plant Mol. Biol. Rep*. 13: 333-335.

Seki, A., Hanaoka, M., Akimoto, Y., Masuda, S., Iwasaki, H., & Tanaka, K. 2007. Induction of a group 2

sigma factor, RPOD3, by high light and the underlying mechanism in *Synechococcus elongatus* PCC7942. *J. Biol. Chem.* 282: 36887-36894.

Takai, N., Nakajima, M., Oyama, T., Kito, R., Sugita, C., Sugita, M., Kondo, T., & Iwasaki, H. 2006. A KaiC-associating SasA-RpaA two-component regulatory system as a major circadian timing mediator in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 12109-12114.

Woodson, J.D., & Chory, J. 2008. Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nat. Rev. Genet.* 9: 383-395.