

色素体核様体の構造と分裂機構

西村芳樹, 田草川真理
京都大学大学院理学研究科植物分子遺伝学研究室
〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

The division cycle of chloroplast nucleoids

Yoshiki Nishimura, Mari Takusagawa
Laboratory of Plant Molecular Genetics, Department of Botany, Graduate School of Science,
Kyoto University

Oiwake-cho, Kita-Shirakawa, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

Keywords: chloroplast nucleoids, Holliday junction resolvase

DOI: 10.24480/bsj-review.12a2.00195

1. はじめに

葉緑体／色素体は 10 億年以上前に現在のシアノバクテリアに類縁の原核生物が細胞内共生したことで誕生したといわれる。その進化的背景を反映するように、色素体には独自のゲノム「色素体ゲノム」が存在している。色素体ゲノムは光合成や色素体生合成に必須な遺伝子をコードし発現することで色素体の機能を支えている。色素体ゲノムは多コピーであり、一つの色素体には約 100 コピーのゲノムが存在する。一細胞に複数の色素体を有する陸上植物では、一細胞に数千コピーもの色素体ゲノムが存在する場合もある。この大量の色素体ゲノムは DNA 分子単体で色素体内に浮遊して存在するわけではない。DNA に特異的に結合する DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) などの蛍光色素を用いて色素体 DNA を可視化してみると、色素体 DNA は膜に結合した小さな輝点として観察される。色素体核様体と呼ばれるこの構造は、色素体 DNA が RNA 分子や多様なタンパク質と複合体を形成したものであり、藻類や植物において普遍的に観察される構造体である (Kuroiwa, 1991)。核様体における DNA 分子はコンパクトに折りたたまれていると考えられる。試みに 10 塩基対を 34 Å とした単純計算をすれば、色素体核様体において二本鎖 DNA は約 1/1000 のサイズまで圧縮されていることになる。このような密な状態にあっても、色素体核様体は DNA 複製・遺伝子発現・遺伝の中核として機能し、光合成をはじめとする葉緑体／色素体機能を支えている。本稿では、色素体における染色体とも称される色素体核様体の構造と、そのダイナミックな分裂制御について、近年明らかになってきた色素体 DNA の構造制御機構を中心に俯瞰してみる。

2. 色素体核様体のタンパク質構成とその進化

色素体核様体は、多くの場合、蛍光顕微鏡で直径 0.2 μm ほどの微細な球状の輝点として観察される。1980 年代より、この「形」に注目して色素体核様体を生化学的に精製する試みが、日本を中心として精力的に行われてきた (Sato and Kuroiwa, 1991)。まず細胞から色素体を精

製し、穏やかな界面活性剤処理 (Nonidet P-40 など)によって色素体を破碎、スペルミジンやシヨ糖を含むバッファーを用いるなどして核様体の形状を保ちつつ精製した。その形状を精製の各ステップで注意深く確認しながら精製された色素体核様体は、DNA 複製活性や遺伝子転写活性まで保持していた (Sakai et al., 1991)。こうして精製された色素体核様体の生化学的解析を起点として、いくつかの色素体核様体タンパク質が同定されてきた (Nemoto et al., 1988)。エンドウマメの葉緑体核様体の主要構成タンパク質として同定された亜硫酸還元酵素(Sulfite Reductase: SiR) (Sato et al., 2001)、プロテアーゼ活性を有し、葉の老化や転流に関わるとも推定される Chloroplast Nucleoid DNA binding protein (CND) 41 (Nakano et al., 1997; Murakami et al., 2000; Nakano et al., 1993)、膜にアンカーするタンパク質といわれている Plastid-envelope DNA-binding protein (PEND)などである (Sato et al., 1998, 1993)。

2000年代になり、ゲノム情報が利用できるようになってくると、細菌の核様体タンパク質の配列情報との比較解析などにより、色素体核様体タンパク質の探索や進化過程の考察が可能となった。そこで葉緑体核様体の精製技術とゲノム情報(Matsuzaki et al., 2004)を基盤として、紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* において細菌の主要核様体タンパク質の一つである Heat unstable (HU)の相同遺伝子が葉緑体核様体の構成因子をコードしていることが証明された (Kobayashi et al., 2002)。後の逆遺伝学的解析により、HU は緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* においても葉緑体核様体の主要構成因子であることが示された (Karcher et al., 2009)。しかし一方、車軸藻クレブソルミディウム *Klebsormidium flaccidum*、苔類ゼニゴケ *Marchantia polymorpha* や陸上植物において HU 遺伝子は検出されなかった。クレブソルミディウムは陸上でも湿度の高い環境であれば群生し、ゼニゴケは基部陸上植物として植物の陸上化初期の状態をよく反映しているといわれる。植物の陸上化前後で細菌由来の HU は葉緑体核様体から失われ、真核生物由来の核様体因子に置き換わっていった可能性がある (Kobayashi et al., 2016b)。

SiR については、その後 *in vitro* 解析により可逆的な DNA 分子の折りたたみ活性があること、転写抑制能があることが証明された (Sekine et al., 2002)。しかしその色素体核様体への局在については、エンドウマメやゼニゴケにおいて確認されたものの、シロイヌナズナやトウモロコシでは確認されず、植物種によってまちまちであった。そこで様々な植物種の SiR のアミノ酸配列を多重配列整列によって解析したところ、葉緑体核様体局在すると報告された SiR には C 末端に約 50 アミノ酸程度の短い領域 C-terminally encoded peptide (CEP) が特異的に存在することが明らかになったことから、CEP の有無が SiR の色素体核様体への局在を決定すると考えられた。そこで葉緑体核様体非局在型のシロイヌナズナ SiR にゼニゴケの CEP を融合したキメラ SiR を発現させたところ、予想通り葉緑体核様体への局在が確認され、CEP が色素体核様体局在に重要であることが示された (Kobayashi et al., 2016a)。

こうした流れと併行して、欧米では色素体の「転写機構」に注目し、転写活性を示す色素体 DNA-RNA-タンパク質複合体を Plastid Transcriptionally Active Chromosome (pTAC)として生化学的に精製し解析する研究が行われてきた (Hallick et al., 1976; Melonek et al., 2016; Pfalz and Pfannschmidt, 2015)。色素体における転写装置は大きく2つに分けられる。1つは Plastid-encoded RNA polymerase (PEP)と呼ばれる細菌型 RNA ポリメラーゼである。この酵素のコアサブユニットは色素体ゲノムにコードされているが、細胞核にコードされるシグマ因子によってプロ

モーター選択性の制御を受ける。もう一つは、Nuclear-encoded plastid RNA polymerase (NEP)と呼ばれるバクテリオファーージ型 RNA ポリメラーゼであり、細胞核にコードされている。これらの酵素により転写される色素体遺伝子の発現様式は複雑であり、多くはポリシストロニックに転写された後、5'/3'末端のプロセッシング、ステムループ構造の形成、様々な RNA 結合タンパク質 (Pentatricopeptide repeat (PPR) タンパク質など) による安定化を経て、成熟した mRNA となる。そして一方、mRNA の不安定化は 3'端のポリ(A)鎖付加によって引き起こされる (Stern et al., 2010; Komine et al., 2002; Nishimura et al., 2004)。これ以外にも、DNA ジャイレースが関与する DNA の超らせん構造度の変化なども色素体遺伝子転写制御に介在すると言われる (Salvador et al., 1998)。pTAC 解析は、こうした複雑で多岐にわたる色素体遺伝子の転写制御因子群を、網羅的に同定しようとする野心的試みであり、質量分析法の飛躍的進歩にもなっており現実的に可能となった。

単離された pTAC 画分は色素体 DNA を含んでおり、それを鋳型とした転写活性を示す (Hallick et al., 1976; Pflanz et al., 2006)。実際、電子顕微鏡で pTAC 画分を観察すると、部分的に解けた色素体 DNA がタンパク質によって折りたたまれている様子が観察された (Briat et al., 1982)。つまり pTAC 画分には色素体転写装置だけでなく、色素体 DNA の折りたたみ、複製や修復を担う因子群も数多く含まれていた。そのため色素体核様体の「形」と「転写装置」という二つの異なる動機を源とする研究の流れは、色素体における DNA 複製・修復・転写・翻訳の中核としての色素体核様体の実像を捉えるという一つのゴールに向けて合流していくこととなる。

2006 年に発表された Pflanz らによるシロイヌナズナとマスタードをもちいた pTAC 解析では、18 のタンパク質 (pTAC1-18) が同定された (Pflanz et al., 2006)。そのうち pTAC1 として同定されたタンパク質は、もともと細胞核の転写因子として同定された異色の背景をもつ色素体核様体タンパク質である。そのプロペラ状の構造から Whirly (渦巻き様) と名付けられたこのタンパク質は、一本鎖(ss)DNA への結合能を示す。当初はシロイヌナズナにおいて病原菌に応答する転写因子 (AtWHY1) として同定され (Desveaux et al., 2002)、またテロメアの制御因子として機能するという報告があった (Yoo et al., 2007)。しかし蛍光タンパク質をもちいた細胞内局在解析により、シロイヌナズナにコードされる 3 つの相同遺伝子のなかで AtWhy1 と 3 は色素体、AtWhy2 はミトコンドリアに局在することが示され (Krause et al., 2005)、2008 年にはトウモロコシにおいて Whirly は色素体遺伝子 *atpF* のグループ II イントロンのスプライシングに関わる因子として同定された (Prikryl et al., 2008)。2009 年にはシロイヌナズナにおいて色素体ゲノムの安定性制御に貢献していることが示される (Maréchal et al., 2009)。Whirly は色素体あるいは細胞核においてかなり多様な役割を果たしていると推定され、さらには葉緑体から細胞核への酸化還元状態に応じたシグナル分子として機能するという仮説も提唱されている (Foyer et al., 2014)。pTAC3 として同定されたタンパク質は、興味深いことに光依存的に PEP と相互作用してその活性を制御することにより、色素体遺伝子の光応答性発現誘導に関わることを示されている (Yagi et al., 2012)。

2012 年には、トウモロコシの色素体核様体の粗精製画分と、さらに既知の色素体核様体構成タンパク質 (ZmWHY1) に対する免疫沈降をおこなって精製した色素体核様体画分をもちい

て色素体核様体の網羅的なプロテオーム解析が行われた (Majeran et al., 2012)。この解析において、既知の色素体核様体タンパク質群に加え、DNA 複製や修復に関わる DNA ジャイレースや、転写や転写後制御に関わる RNA ポリメラーゼ、PPR タンパク質群、翻訳などに関わるリボソームやリボソームアッセンブリー因子など、多岐にわたるタンパク質群が色素体核様体の構成因子として同定され、色素体核様体が色素体におけるこれらのプロセスの機能的な中枢であることが、分子レベルで裏付けられることとなった。

そして2012年、MelonekらはpTACのプロテオーム解析から、色素体核様体の「コア因子」としてSWIBドメインタンパク質群を報告した (Melonek et al., 2012)。SWIBドメインタンパク質はミトコンドリア核様体にも局在し、ミトコンドリアの機能やゲノム安定性を保障していると考えられる (Blomme et al., 2017)。SWIBドメインは、もともと細胞核の染色体リモデリング因子のドメイン (SWI/SNF) として同定されたものであり (Bennett-Lovsey et al., 2002)、緑藻などの色素体核様体では検出されない。やはり色素体核様体のコア因子は、植物の進化のなかで、HUなどの細菌由来のタンパク質から、真核生物由来のSWIBタンパク質などへと、徐々に置き換えられてきたのかもしれない (Melonek et al., 2012; Kobayashi et al., 2016b)。

3. 色素体核様体のかたちの制御機構：核様体形態とDNA分子構造の「境界」を探る

これまでの研究から、色素体核様体は色素体におけるDNA複製/修復・転写・転写後制御や翻訳の中枢であり、多様な機能をもつタンパク質の複

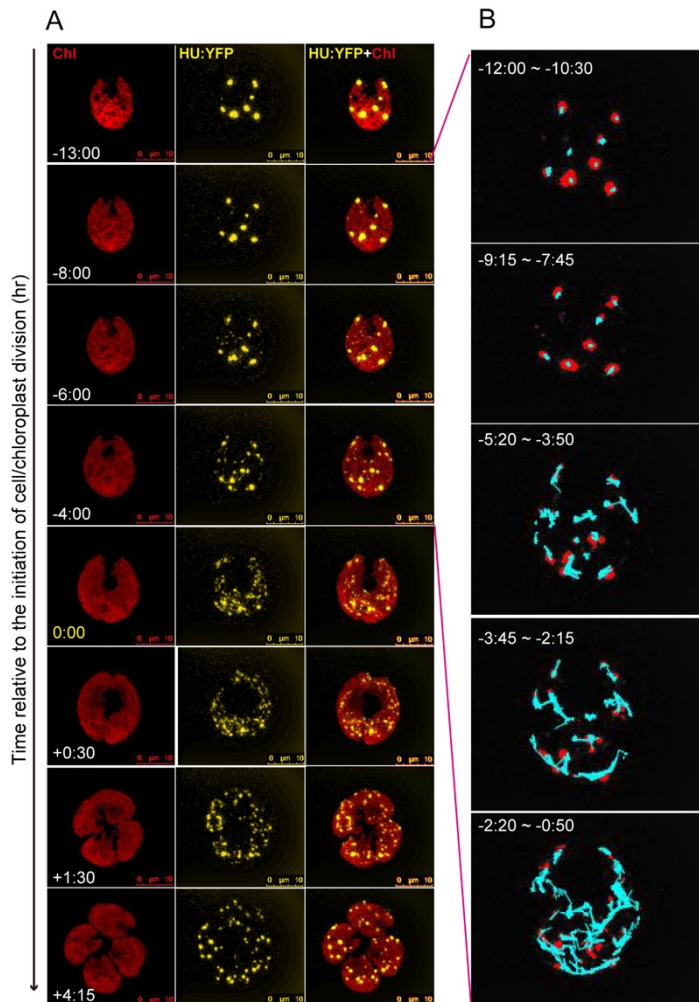


図1 ライブイメージングにより捉えられた葉緑体分裂における葉緑体核様体の解体と再構築。(A)赤はクロロフィル自家蛍光で、葉緑体の概形を示す (CHL)。黄色は YFP で標識された葉緑体核様体 (HU:YFP)。右カラムは重ね合わせ画像 (CHL+HU:YFP)。時間は葉緑体分裂開始を 00:00(HH:MM)とした相対時間を示してある。分裂に先立ち、葉緑体核様体が解体され拡散し、分裂完了後に球状構造が再構築される。(B)粒子トラッキング解析。葉緑体核様体 (赤) と、左上の時間枠 (90 分間) で記録された運動の軌跡 (水色)。

Kamimura et al., *Comms Biol* 2018 より改変

合体であることが明らかになってきた。しかしその複雑な分子構成にも関わらず、色素体核様体は色素体分裂や分化などにもなってダイナミックにその数、分布、形状を変化させる (Kuroiwa, 1991)。緑藻 *C.reinhardtii* には、1つの葉緑体あたり約 80 コピーの葉緑体ゲノム (約 205 kbp) が存在し (Gallaher et al., 2018), それらが間期には 5-10 個ほどの球状の葉緑体核様体としてまとめられている。しかし細胞周期のさまざまな時点で葉緑体核様体の形を比較すると、それらの数や形状が大きく異なっていた (Ehara et al., 1990)。

葉緑体核様体の動態をライブイメージングで捉えるには、まず鞭毛で泳ぎ回る緑藻細胞を、顕微鏡対物レンズの焦点面に生きたまま長時間にわたって固定する必要があった。このため、我々は透明な樹脂で形成された狭いギャップに細胞を挟み込みつつ、新鮮な培地を常時供給できる「マイクロ流体デバイス」を採用することにした。さらに、生きた細胞で葉緑体核様体を長時間追跡する上で、従来用いられてきた生細胞透過性の DNA 特異的蛍光色素 SYBR Green I は退色しやすく、また細胞核やミトコンドリア核様体まで同時に染色してしまうため、葉緑体核様体を識別しにくいという問題点があった。そこで前述した *C.reinhardtii* の葉緑体核様体の主要コア因子 HU (Karcher et al., 2009) を蛍光タンパク質 (YFP) で標識することでこの問題を克服した。これらの結果、生きた細胞における葉緑体核様体の分裂過程を捉えることに世界で初めて成功した。間期には直径 0.2 μm ほどの球状構造で、おそらくチラコイド膜にアンカーされているため、ほとんど動きをみせない葉緑体核様体が、葉緑体分裂に先立って徐々に解体され、微小な粒状構造が飛び出し、それらが粒子状構造同士をつなぐように葉緑体全体に広がっていき、分裂直前には葉緑体全体に広がるネットワーク状へと拡散した (図 1)。そしてそのネットワーク状構造は、分裂完了とともに球状構造へとすみやかに再構築された (Kamimura et al., 2018)。同様の形態変化は陸上植物にも共通する普遍的な現象であると考えられるが (Terasawa and Sato, 2005), こうした「球状→ネットワーク状→球状」という葉緑体核様体の解体/再構築サイクルが、どのような分子機構に支えられているのか、またその生物学的意義については謎であった。

この疑問に対し有力な手がかりを与える変異体があった。緑藻クラミドモナスの *monokaryotic chloroplast (moc)* 変異体である (Misumi et al., 1999)。この変異体では、葉緑体核様体が 1つの塊に凝集しており、「球状→ネットワーク状→球状」という葉緑体核様体の分裂サイクルが阻害されていた。そしてその結果葉緑体核様体は分裂の際に娘葉緑体に不均等に

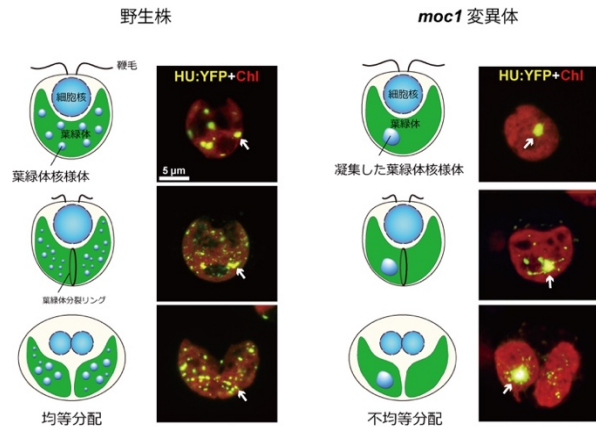


図 2 野生株と *moc1* 変異体の葉緑体分裂時の葉緑体核様体の比較。野生株では球状の葉緑体核様体が分裂に先立って解体され、葉緑体全体に拡散することで、娘葉緑体への均等分配が実現される。それに対し、*moc1* 変異体では、葉緑体核様体が凝集してしまうために不均等分配が引き起こされる。Kamimura et al., *Comms Biol.* 2018 より改変。

分配されてしまっていた。裏返せばこのことは、葉緑体核様体の解体／再構築が、葉緑体分裂の際に葉緑体核様体を娘葉緑体に均等分配するために必要であることを示唆している。この変異体で破壊されていた *MOC1* 遺伝子について、組換えタンパク質をもちいた生化学的解析と DNA オリガミ技術と高速原子間力顕微鏡による解析をおこなった結果、*MOC1* タンパク質が DNA 相同組換え中間体であるホリデイジャンクション(HJ)特異的に切断する HJ 解離酵素 (Holliday Junction

Resolvase: HJR)であることが証明された (Kobayashi et al., 2017)。すなわち、球状葉緑体核様体の解体は、HJR による DNA 一本鎖切断 (single strand break: SSB)と Holliday junction の解離、それによる葉緑体 DNA 分子同士の「絡み」の解消、および「DNA スーパーコイル構造」の解体によって引き起こされている可能性が考えられる (図3)。

葉緑体における HJR が同定されたのはこれが初めての報告であった。その後の構造解析により、葉緑体型 HJR (*MOC1*) は、アミノ酸配列レベルではほとんど相同性がないにも関わらず、細菌型の HJR と構造的に非常に似通っていることが示された (Yan et al., 2020; Lin et al., 2019)。さらに *MOC1* は、藻類や苔類においては葉緑体のみならずミトコンドリアゲノムの安定性制御に貢献していることが示されており (Kobayashi et al., 2020), その重要性がますます注目を集めている。

4. おわりに

色素体核様体の構成因子の理解は、質量分析法の進歩とともに飛躍的に進み、それが色素体における DNA 複製・修復・転写・翻訳・遺伝の機能的中枢であることが証明されてきた。しかし色素体分裂や色素体分化、または光／栄養環境の変化にともなう色素体核様体のダイナミックな形態・局在変化の制御機構については未だ謎が多い。これまでの研究から、核様体の形態と DNA 分子構造の間には強い相関関係が認められており (Odahara et al., 2016), 藻類に限らずシロイヌナズナでも DNA gyrase (Cho et al., 2004; Itoh et al., 1997)や RNaseH 変異体 (Yang et al., 2020)において色素体核様体の形態異常が報告されている。今後さらに色素体核様

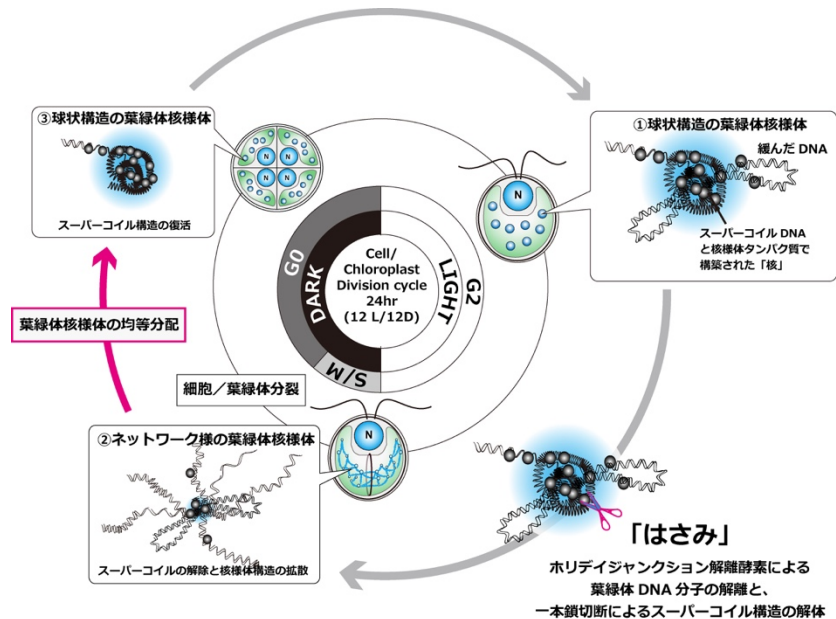


図3 DNA supercoil 制御を基盤とする葉緑体核様体の分裂サイクル仮説。葉緑体核様体は葉緑体 DNA の Supercoil 構造をその核としており、Supercoil 構造が *MOC1* タンパク質 (=ホリデイジャンクション解離酵素) による一本鎖 DNA 切断で解消されることで、葉緑体核様体の球状構造が可逆的に解体されると考えられる。

体の形態異常変異体の探索, および個々の構成因子の分子機能を解析していくことにより, 色素体における DNA 複製・修復・遺伝の詳細な分子機構などにも迫ることができるだろう。とくに色素体 DNA 修復機構について, その理解が進めば, より高ストレス環境での色素体ゲノムの安定化や, より高効率の色素体ゲノム改変技術の開発にむけた重要な糸口となるかもしれない。

謝辞

本研究は, 科研費 (18H02460) および公益財団法人三菱財団の基礎研究助成 (201910032) の支援を得て遂行された。

引用文献

- Bennett-Lovsey, R., Hart, S.E., Shirai, H., and Mizuguchi, K. 2002. The SWIB and the MDM2 domains are homologous and share a common fold. *Bioinformatics* 18: 626–630.
- Blomme, J. et al. 2017. The Mitochondrial DNA (mtDNA)-Associated Protein SWIB5 Influences mtDNA Architecture and Homologous Recombination. *Plant Cell* 29: tpc.00899.2016.
- Briat, J.F., Gigot, C., Laulhere, J.P., and Mache, R. 1982. Visualization of a Spinach Plastid Transcriptionally Active DNA-Protein Complex in a Highly Condensed Structure. *Plant Physiol.* 69: 1205–1211.
- Cho, H.S., Lee, S.S., Kim, K.D., Hwang, I., Lim, J.-S., Park, Y.-I., and Pai, H.-S. 2004. DNA gyrase is involved in chloroplast nucleoid partitioning. *Plant Cell* 16: 2665–82.
- Desveaux, D., Allard, J., Brisson, N., and Sygusch, J. 2002. A new family of plant transcription factors displays a novel ssDNA-binding surface. *Nat. Struct. Biol.* 9: 512–517.
- Ehara, T., Ogasawara, Y., Osafune, T., and Hase, E. 1990. Behavior of chloroplast nucleoids during the cell cycle of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta) in synchronized culture. *J phycol* 26: 317–323.
- Foyer, C.H., Karpinska, B., and Krupinska, K. 2014. The functions of WHIRLY1 and REDOX-RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR 1 in cross tolerance responses in plants: a hypothesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 369: 20130226.
- Gallaher, S.D., Fitz-Gibbon, S.T., Strenkert, D., Purvine, S.O., Pellegrini, M., and Merchant, S.S. 2018. High-throughput sequencing of the chloroplast and mitochondrion of *Chlamydomonas reinhardtii* to generate improved de novo assemblies, analyze expression patterns and transcript speciation, and evaluate diversity among laboratory strains and wild isolates. *Plant J.* 93: 545–565.
- Hallick, R.B., Lipper, C., Richards, O.C., and Rutter, W.J. 1976. Isolation of a transcriptionally active chromosome from chloroplasts of *Euglena gracilis*. *Biochemistry* 15: 3039–3045.
- Itoh, R., Takahashi, H., Toda, K., Kuroiwa, H., and Kuroiwa, T. 1997. DNA gyrase involvement in chloroplast-nucleoid division in *Cyanidioschyzon merolae*. *Eur J Cell Biol* 73: 252–258.
- Kamimura, Y., Tanaka, H., Kobayashi, Y., Shikanai, T., and Nishimura, Y. 2018. Chloroplast nucleoids as a transformable network revealed by live imaging with a micro fluidic device. *Commun. Biol.*: 1–7.

- Karcher, D., Köster, D., Schadach, A., Klevesath, A., and Bock, R. 2009. The chlamydomonas chloroplast HLP protein is required for nucleoid organization and genome maintenance. *Mol. Plant* 2: 1223–1232.
- Kobayashi, T., Takahara, M., Miyagishima, S.Y., Kuroiwa, H., Sasaki, N., Ohta, N., Matsuzaki, M., and Kuroiwa, T. 2002. Detection and localization of a chloroplast-encoded HU-like protein that organizes chloroplast nucleoids. *Plant Cell* 14: 1579–1589.
- Kobayashi, Y., Misumi, O., Odahara, M., Ishibashi, K., Hirono, M., Hidaka, K., Endo, M., Sugiyama, H., Iwasaki, H., Kuroiwa, T., Shikanai, T., and Nishimura, Y. 2017. Holliday junction resolvases mediate chloroplast nucleoid segregation. *Science* 356: 631–634.
- Kobayashi, Y., Ohadara, M., Sekine, Y., Hamaji, T., Fujiwara, S., Nishimura, Y., and Miyagishima, S. 2020. Holliday junction resolvase MOC1 maintains plastid and mitochondrial genome integrity in algae and bryophytes. *Plant Physiol.* in press.
- Kobayashi, Y., Otani, T., Ishibashi, K., Shikanai, T., and Nishimura, Y. 2016a. C-terminal region of sulfite reductase is important to localize to chloroplast nucleoids in land plants. *Genome Biol. Evol.* 8: evw093.
- Kobayashi, Y., Takusagawa, M., Harada, N., Fukao, Y., Yamaoka, S., Kohchi, T., Hori, K., Ohta, H., Shikanai, T., and Nishimura, Y. 2016b. Eukaryotic components remodeled chloroplast nucleoid organization during the green plant evolution. *Genome Biol. Evol.* 8: 1–16.
- Komine, Y., Kikis, E., Schuster, G., and Stern, D. 2002. Evidence for in vivo modulation of chloroplast RNA stability by 3'-UTR homopolymeric tails in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 4085–4090.
- Krause, K., Kilbiński, I., Mulisch, M., Rödiger, A., Schäfer, A., and Krupinska, K. 2005. DNA-binding proteins of the Whirly family in *Arabidopsis thaliana* are targeted to the organelles. *FEBS Lett.* 579: 3707–3712.
- Kuroiwa, T. 1991. The replication, differentiation, and inheritance of plastids with emphasis on the concept of organelle nuclei. *Int. Rev. Cytol.* 128: 1–60.
- Lin, H., Zhang, D., Zuo, K., Yuan, C., Li, J., Huang, M., and Lin, Z. 2019. Structural basis of sequence-specific Holliday junction cleavage by MOC1. *Nat. Chem. Biol.* 15: 1241–1248.
- Majeran, W., Friso, G., Asakura, Y., Qu, X., Huang, M., Ponnala, L., Watkins, K.P., Barkan, A., and van Wijk, K.J. 2012. Nucleoid-Enriched Proteomes in Developing Plastids and Chloroplasts from Maize Leaves: A New Conceptual Framework for Nucleoid Functions. *Plant Physiol.* 158: 156–189.
- Maréchal, A., Parent, J.-S., Véronneau-Lafortune, F., Joyeux, A., Lang, B.F., and Brisson, N. 2009. Whirly proteins maintain plastid genome stability in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 14693–14698.
- Matsuzaki, M. et al. 2004. Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* 428.
- Melonek, J., Matros, A., Trosch, M., Mock, H.-P., and Krupinska, K. 2012. The Core of Chloroplast Nucleoids Contains Architectural SWIB Domain Proteins. *Plant Cell* 24: 3060–3073.

- Melonek, J., Oetke, S., and Krupinska, K. 2016. Multifunctionality of plastid nucleoids as revealed by proteome analyses. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1864: 1016–1038.
- Misumi, O., Suzuki, L., Nishimura, Y., Sakai, A., Kawano, S., Kuroiwa, H., and Kuroiwa, T. 1999. Isolation and phenotypic characterization of *Chlamydomonas reinhardtii* mutants defective in chloroplast DNA segregation. *Protoplasma* 209: 273–282.
- Murakami, S., Kondo, Y., Nakano, T., and Sato, F. 2000. Protease activity of CND41, a chloroplast nucleoid DNA-binding protein, isolated from cultured tobacco cells. *FEBS Lett* 468: 15–18.
- Nakano, T., Murakami, S., Shoji, T., Yoshida, S., Yamada, Y., and Sato, F. 1997. A novel protein with DNA binding activity from tobacco chloroplast nucleoids. *Plant Cell* 9: 1673–1682.
- Nakano, T., Sato, F., and Yamada, Y. 1993. Analysis of Nucleoid-Proteins in Tobacco Chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 34.
- Nemoto, Y., Kawano, S., Kondoh, K., Nagata, T., and Kuroiwa, T. 1988. Studies on Plastid-Nuclei (Nucleoids) in *Nicotiana tabacum* L. III. Isolation of Chloroplast-Nuclei from Mesophyll Protoplasts and Identification of Chloroplast DNA-Binding Proteins. *Plant Cell Physiol.* 29: 167–177.
- Nishimura, Y., Kikis, E.A.A., Zimmer, S.L.L., Komine, Y., Stem, D.B. 2004. Antisense transcript and RNA processing alterations suppress instability of polyadenylated mRNA in *chlamydomonas* chloroplasts. *Plant Cell* 16: 2849–2869.
- Odahara, M., Kobayashi, Y., Shikanai, T., and Nishimura, Y. 2016. Dynamic interplay between nucleoid segregation and genome integrity in *Chlamydomonas* chloroplasts. *Plant Physiol.* 172: 2337–2346.
- Pfalz, J., Liere, K., Kandlbinder, A., Dietz, K.-J., and Oelmüller, R. 2006. pTAC2, -6, and -12 are components of the transcriptionally active plastid chromosome that are required for plastid gene expression. *Plant Cell* 18: 176–197.
- Pfalz, J. and Pfannschmidt, T. 2015. Plastid nucleoids: evolutionary reconstruction of a DNA/protein structure with prokaryotic ancestry. *Front. Plant Sci.* 6: 2014–2016.
- Prikryl, J., Watkins, K.P., Friso, G., van Wijk, K.J., and Barkan, A. 2008. A member of the Whirly family is a multifunctional RNA- and DNA-binding protein that is essential for chloroplast biogenesis. *Nucleic Acids Res.* 36: 5152–5165.
- Sakai, A., Yamashita, H., Nemoto, Y., Kawano, S., and Kuroiwa, T. 1991. Transcriptional Activity of Morphologically Intact Proplastid-Nuclei (Nucleoids) Isolated from Tobacco Cultured Cells. *Plant Cell Physiol.* 32: 835–843.
- Salvador, M.L., Klein, U., and Bogorad, L. 1998. Endogenous fluctuations of DNA topology in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Cell. Biol.* 18: 7235–7242.
- Sato, N., Albrieux, C., Joyard, J., Douce, R., and Kuroiwa, T. 1993. Detection and characterization of a plastid envelope DNA-binding protein which may anchor plastid nucleoids. *EMBO J.* 12: 555–561.
- Sato, N., Nakayama, M., and Hase, T. 2001. The 70-kDa major DNA-compacting protein of the chloroplast nucleoid is sulfite reductase. *FEBS Lett.* 487: 347–350.

- Sato, N., Ohshima, K., Watanabe, A., Ohta, N., Nishiyama, Y., Joyard, J., and Douce, R. 1998. Molecular characterization of the PEND protein, a novel bZIP protein present in the envelope membrane that is the site of nucleoid replication in developing plastids. *Plant Cell* 10: 859–872.
- Satoh, M. and Kuroiwa, T. 1991. Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Exp Cell Res* 196: 137–140.
- Sekine, K., Hase, T., and Sato, N. 2002. Reversible DNA compaction by sulfite reductase regulates transcriptional activity of chloroplast nucleoids. *J. Biol. Chem.* 277: 24399–24404.
- Stern, D.B., Goldschmidt-Clermont, M., and Hanson, M.R. 2010. Chloroplast RNA metabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 125–155.
- Terasawa, K. and Sato, N. 2005. Visualization of plastid nucleoids in situ using the PEND-GFP fusion protein. *Plant Cell Physiol.* 46: 649–660.
- Yagi, Y., Ishizaki, Y., Nakahira, Y., Tozawa, Y., and Shiina, T. 2012. Eukaryotic-type plastid nucleoid protein pTAC3 is essential for transcription by the bacterial-type plastid RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109: 7541–7546.
- Yan, J., Hong, S., Guan, Z., He, W., Zhang, D., and Yin, P. 2020. Structural insights into sequence-dependent Holliday junction resolution by the chloroplast resolvase MOC1. *Nat. Commun.* 11: 1–10.
- Yang, Z., Li, M., and Sun, Q. 2020. Arabidopsis Chloroplast Genome Maintenance Article for Arabidopsis Chloroplast Genome Maintenance. *Cell Rep.* 30: 243–256.
- Yoo, H.H., Kwon, C., Lee, M.M., and Chung, I.K. 2007. Single-stranded DNA binding factor AtWHY1 modulates telomere length homeostasis in Arabidopsis. *Plant J.* 49: 442–451.