

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06358

研究課題名（和文）真核藻類のピレノイド構築メカニズムの進化

研究課題名（英文）Evolution of pyrenoid construction mechanism in eukaryotic algae

研究代表者

平川 泰久（Hirakawa, Yoshihisa）

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：40647319

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：水圏に生息する藻類は葉緑体の中に、炭素固定酵素が集積したピレノイドと呼ばれる構造をもつ。ピレノイドは光合成による二酸化炭素の固定反応を行う重要な器官である。本研究では、真核藻類のピレノイドの構築メカニズムとその進化を明らかにすることを目的とした。海産の単細胞藻類であるクロララクニオン藻を用いて、ピレノイドの単離法を確立し、ピレノイドの含まれるタンパク質を明らかにした。これにより、ピレノイドは藻類グループごとに独自に進化している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核藻類はピレノイドをもつことで、二酸化炭素濃度の低い環境でも効率的に光合成を行うことができる。近年、海外の研究者により、遺伝子組換え技術を用いて陸上植物にピレノイドを形成させ、高効率で二酸化炭素固定を行える植物の作出が試みられており、地球の二酸化炭素削減にも繋がる研究として注目されている。このような応用研究に発展させるためにも、真核藻類のピレノイド構築メカニズムを理解することは重要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Pyrenoid is a structure where RubisCO proteins are accumulated in plastids, and many aquatic algae possess it. Pyrenoid is an important organelle related to the carbon fixation by photosynthesis. In this study, we have investigated the pyrenoid construction mechanism and its evolution among eukaryotic algae. We newly established a method to isolate pyrenoids from the marine alga chlorarachniophyte, and identified proteins including in the pyrenoids using mass spectrometry. By this study, we have revealed that pyrenoids would be independently evolved among algal groups.

研究分野：藻類細胞学

キーワード：藻類 進化 ピレノイド 葉緑体 炭素固定

1. 研究開始当初の背景

太古の昔、ある原生生物がシアノバクテリア（光合成細菌）を細胞内共生することで葉緑体は誕生した。さらに、原生生物が真核藻類（緑藻や紅藻）を細胞内に取り込む二次共生により、複雑な葉緑体をもつ藻類グループが誕生した。現存する真核藻類の多様性は複数回の細胞内共生イベントにより生み出されたと言える。系統的に多様な真核藻類に共通して見られる形質の一つとして“ピレノイド”がある。ピレノイドは炭素固定を行う RubisCO タンパク質が高密度に集積した構造で、地球上で固定される二酸化炭素の約 30%はピレノイドによるとも言われている。ピレノイドは、顕微鏡観察により 1880 年代よりその存在が知られていたが、近年までそれを構築する分子メカニズムは未解明であった。2016 年にアメリカのグループにより、モデル緑藻クラミドモナスにおいて、RubisCO タンパク質の集積に関与する足場タンパク質が報告され、緑藻のピレノイド構築メカニズムの一端が明らかにされた。しかし、この足場タンパク質は緑藻に特異的なもので、他の多くの真核藻類では、RubisCO 集積メカニズムは未解明の状況であった。

2. 研究の目的

海産の単細胞藻類であるクロララクニオン藻を用いて、RubisCO タンパク質の集積に関与するタンパク質の新規同定を行い、真核藻類に普遍的にみられるピレノイドの構築メカニズムの多様性の解明を目指して研究を行った。クロララクニオン藻は緑藻を細胞内共生することで葉緑体を獲得したグループであり、二次共生によるピレノイドの進化を考察するうえで興味深い藻類群である。本研究では、クロララクニオン藻 *A. amoebiformis* のピレノイド単離法の開発、ピレノイドのプロテオーム解析、ピレノイドの局在タンパク質の同定を行った。加えて、解析に必要な分子基盤技術として、*A. amoebiformis* への高効率遺伝子導入系の開発も行った。

3. 研究の方法

(1) クロララクニオン藻への新規の遺伝子導入系の開発

これまで、*A. amoebiformis* の遺伝子導入にはパーティクルガン法を用いており、導入効率が非常に低いという問題点があった。本研究では新たに、エレクトロポレーション法を用いた遺伝子導入法の開発を行った。FITC-dextran（蛍光標識した DNA 様分子）を用いて、細胞内に蛍光物質が導入される条件を検討し、最適な遺伝子導入条件を導き出した。

(2) クロララクニオン藻のピレノイド単離法の確立

ピレノイドはタンパク質が集合した構造体で、ほとんどの藻類で単離法は確立していない。クロララクニオン藻のピレノイドは、葉緑体からコブ状に突出しており、その大部分は葉緑体膜に囲まれているという特徴をもつ（図 1）。本研究では、ピレノイドを葉緑体から物理的に分離する手法、遊離したピレノイドを精製する手法を様々な条件で検討することで、ピレノイド単離法を開発した。

(3) ピレノイドに含まれるタンパク質の同定

単離したピレノイドから全タンパク質を抽出し、質量分析 nano LC-MS/MS によりピレノイドに含まれるタンパク質を網羅的に推定した。推定には、*A. amoebiformis* のトランスクリプトームデータとオルガネラゲノムの分子情報を用いた。推定したピレノイドタンパク質候補において、GFP による蛍光標識法や特異的抗体を用いた蛍光抗体法により、ピレノイドに局在するタンパク質の特定を行った。

4. 研究成果

(1) エレクトロポレーション法は、幅広い生物の遺伝子導入に用いられている手法である。*A. amoebiformis* の細胞に FITC-dextran が導入される条件を検討したところ、哺乳類細胞で使用されているプロトコールが最適であることが解った。市販されているエレクトロポレーション溶液 (Bio-Rad) に細胞を懸濁し、電気パルス 120 V・25 ms の条件で GFP 発現プラスミドを導入した場合、導入効率は 1000 細胞に 1 つの割合であった。これは、パーティクルガン法に比べて約 1000 倍高い効率であった。これにより *A. amoebiformis* への遺伝子導入は、安定かつ高効率で行うことができるようになった。この研究成果は国内の学会、投稿論文として報告した。

(2) 新たに確立した遺伝子導入法を用いて、RubisCO+GFP の融合タンパク質を発現するプラスミドを *A. amoebiformis* に導入することで、ピレノイドを緑色蛍光で標識した（図 2）。これにより、蛍光顕微鏡下で迅速かつ簡便に単離ピレノイドを観察することができるようになった。様々な条件検討の結果、*A. amoebiformis* のピレノイドは、超音波処理と単層パーコール遠心分離により単離できることを発見した。細胞を短時間の超音波処理した後、単層パーコールに重層して遠心することで、ピレノイドのペレットを得ることができた（図 3）。蛍光顕微鏡観察では、

ピレノイド以外の不純物はほとんど観察されなかった。この成果は国内の学会で報告した。

(3) 単離したピレノイドに含まれる全タンパク質を、nano LC-MS/MSにより質量分析した結果、約 150 個のタンパク質が推定された。そのうち、ペプチドヒット数の多い 20 個に関して、GFP タグや蛍光抗体法を用いて、細胞内局在を解析した。その結果、RubisCO 以外に、数個のタンパク質がピレノイド基質に豊富に含まれることを明らかにした。興味深いことに、緑藻クラミドモナスで報告されているピレノイドタンパク質とは全く異なるものであった。つまり、ピレノイドを構成するタンパク質は、系統群ごとに独自の進化を遂げていることが示唆された。この成果は国内の学会で報告した。

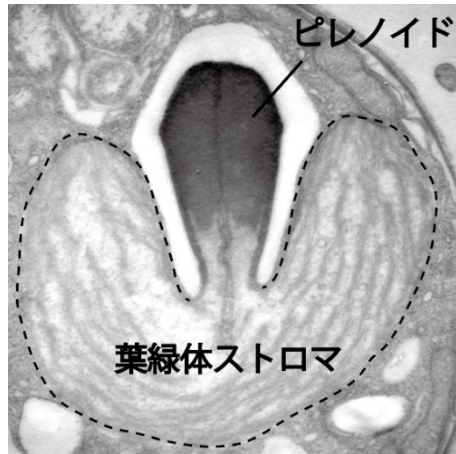


図 1. クロララクニオン藻のピレノイドの電子顕微鏡写真

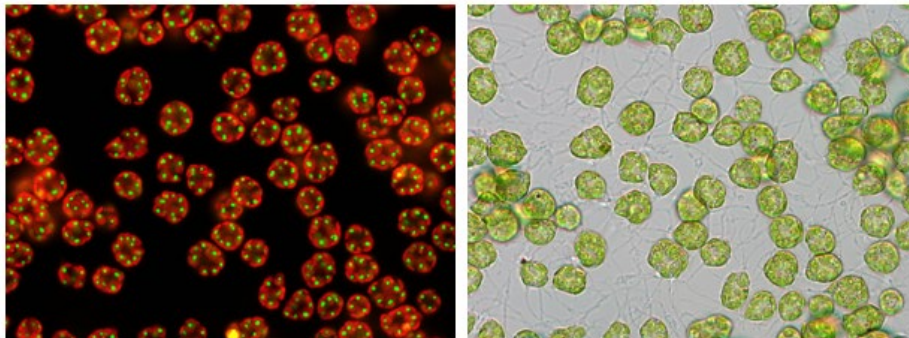


図 2. RubisCO に GFP タグを付加して、ピレノイドを緑色蛍光で標識した遺伝子導入細胞。赤色は葉緑体の自家蛍光。

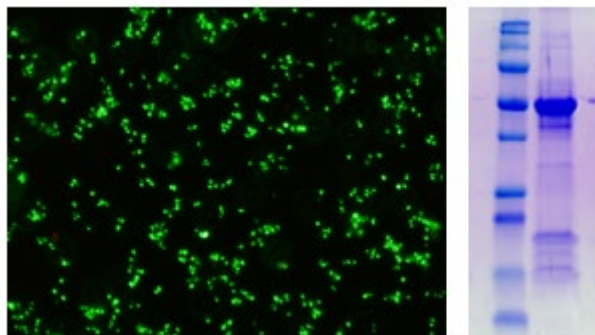


図 3. 細胞から単離したピレノイドの蛍光写真 (左) とピレノイドタンパク質の SDS-PAGE (右)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kodai Fukuda, Elizabeth C. Cooney, Nicholas A.T. Irwin, Patrick J. Keeling, Yoshihisa Hirakawa	4. 巻 48
2. 論文標題 High-efficiency transformation of the chlorarachniophyte <i>Amorphochlora amoebiformis</i> by electroporation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Algal Research	6. 最初と最後の頁 101903
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.algal.2020.101903	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Drahomra Faktorova, R Ellen R Nisbet,, Yoshihisa Hirakawa,, Julius Lukes	4. 巻 17
2. 論文標題 Genetic tool development in marine protists: emerging model organisms for experimental cell biology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Methods	6. 最初と最後の頁 481-494
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41592-020-0796-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 平川泰久、福田耕大、千田美紀、千田俊哉
2. 発表標題 クロララクニオン藻のCO2濃縮機構
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田耕大、長里千香子、本村泰三、平川泰久
2. 発表標題 クロララクニオン藻のピレノイド構成タンパク質のプロテオーム解析
3. 学会等名 日本藻類学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshihisa Hirakawa
2. 発表標題 Evolution of secondary plastid-bearing algae
3. 学会等名 Gordon Research Conference, Mitochondria and chloroplasts (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 諸見里玲奈、平川泰久
2. 発表標題 クロララクニオン藻のピレノイドを構成するタンパク質の同定
3. 学会等名 日本藻類学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

平川研究室のホームページ https://yhirakawa.weebly.com/

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
カナダ	ブリティッシュコロンビア大学			