

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18582

研究課題名(和文)核による二次葉緑体の分裂制御機構の解明

研究課題名(英文)Genetic control of plastid division in chlorarachniophytes

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) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、微細藻類であるクロララクニオン藻を用いて、細胞周期を通して葉緑体やヌクレオモルフ(葉緑体に付随する核)の分裂がどのように制御されているのか、またその制御機構がどのように進化してきたのかを明らかにした。葉緑体の内膜分裂関連タンパク質やオルガネラDNAの複製関連タンパク質を新たに発見し、それらの遺伝子の進化過程を考察した。

研究成果の概要(英文)：I have investigated the mechanism and evolution of organelle division and organelle DNA replication in the secondary plastid-bearing algae, chlorarachniophytes. I newly identified several proteins for constriction of the inner plastid membranes and for replication of plastid, mitochondrial, and nucleomorph DNA. I have discussed the evolution of those proteins based on molecular phylogeny.

研究分野：進化生物学

キーワード：葉緑体 オルガネラ 分裂 DNA複製 藻類

### 1. 研究開始当初の背景

今から数十億年前に、ある従属栄養性の原生生物がシアノバクテリア（光合成性原核生物）を細胞内に取り込む「細胞内共生」により葉緑体は誕生した。これを一次共生と呼び、陸上植物や緑藻、紅藻の葉緑体はこの一次共生に起因する。さらに、他の原生生物が緑藻や紅藻を細胞内に取り込む「二次共生」により非常に多様な藻類が二次葉緑体を獲得・進化してきたと考えられている。申請者が研究に用いたクロララクニオン藻は、緑藻起源のユニークな二次葉緑体をもつ海産の単細胞性藻類である。

細胞内共生の成立過程で、取り込まれた生物（共生者）のもっていた遺伝子の多くは失われ、一部の遺伝子に関しては取り込んだ生物（宿主）の核へと転移した。一次共生では、共生シアノバクテリアから宿主の核へと遺伝子転移が起こり、二次共生では共生者の核から宿主の核へと遺伝子が移動した。これにより、共生者は宿主核遺伝子の制御下におかれたオルガネラへと進化した。多くの二次葉緑体では、共生者の核は完全に消失しているが、クロララクニオン藻の二次葉緑体には共生緑藻の痕跡的な核であるヌクレオモルフが現在も見られる。このことから、本藻は二次共生の中間段階に位置する生物として着目されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、宿主核による二次葉緑体の分裂制御機構の解明に取り組んだ。1細胞内に1つの葉緑体しかもたない単細胞性藻類では、葉緑体分裂は核コードタンパク質にコントロールされており、二分裂した葉緑体は娘細胞へと正確に引き継がれる。この分裂制御機構の獲得が、葉緑体のオルガネラ化に重要であったと考えられる。クロララクニオン藻の二次葉緑体は、ヌクレオモルフをもつことから、植物の葉緑体とは異なる分裂制御機構をもつことが予測されるが、明らかではなかった。本研究では、クロララクニオン藻が、二次葉緑体やヌクレオモルフ、ミトコンドリアを含めたオルガネラをどのように細胞内で制御しているのかを明らかにし、細胞内共生によるオルガネラの進化過程を考察することを目的とした。主に「二次葉緑体の分裂装置」と「オルガネラ DNA 複製」の2つの視点から、二次葉緑体の分裂制御機構の解明にアプローチした。

### 3. 研究の方法

(1) 陸上植物の葉緑体分裂は、2枚の葉緑体包膜上に形成されるリング状の分裂装置（外膜/内膜リング）の収縮により起こる。これまで報告されている陸上植物の葉緑体分裂装置を構成するタンパク質は全て核遺伝子にコードされており、内膜リングの構成タンパク質はシアノバクテリア由来、外膜リングの構成タンパク質は宿主起源の遺伝子

にコードされている。一方、クロララクニオン藻の二次葉緑体は2枚の包膜をもち、分裂装置は不明であった。本研究では、全ゲノム配列が解読されているクロララクニオン藻の一種 *Bigelowiella natans* を用いて、葉緑体分裂関連遺伝子の新規同定を試みた。陸上植物などで同定されている分裂関連遺伝子に相同性のある遺伝子を *B. natans* のゲノム中から探索し、免疫抗体法を用いてそのタンパク質の詳細な細胞内局在を解析した。また、明暗周期で分裂同調した *B. natans* 細胞と次世代シーケンシングを用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、発現パターンから葉緑体分裂関連遺伝子の推定を試みた。

(2) クロララクニオン藻の細胞内には3つのオルガネラ DNA（葉緑体 DNA、ヌクレオモルフ DNA、ミトコンドリア DNA）が存在している。それらのオルガネラゲノムでは、DNA複製に関与する遺伝子が欠落しており、宿主核の遺伝子がオルガネラ DNA 複製を制御していると考えられていた。しかし、その実体は明らかでなかった。本研究では、タンパク質の輸送シグナル配列などから、オルガネラで機能する DNA 複製タンパク質の推定を行い、GFP（緑色蛍光タンパク質）タグを用いて細胞内局在解析を行った。また、分子系統解析によりそれらの遺伝子の進化過程を考察した。

### 4. 研究成果

(1) クロララクニオン藻の全ゲノム配列より、既知の葉緑体分裂関連遺伝子と相同性のあるものを探索した結果、2つの *FtsZ* 遺伝子（*FtsZD-1*、*FtsZD-2*）を同定した。それぞれに特異的な抗体を作成して、免疫電子顕微鏡により詳細な細胞内局在解析を行ったところ、どちらの *FtsZ* タンパク質も、二次葉緑体の最内膜で、リング状の構造を形成することが明らかとなった（図1）。リングの一部は、突出したピレノイド内を通過しており、ピレノイド先端で陥入する内膜に沿って局在していた。

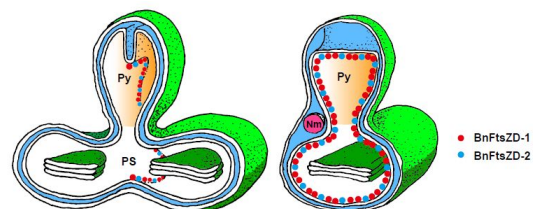


図1: *FtsZ* タンパク質の局在

細胞周期を通して葉緑体分裂期以外でも、*FtsZ* リングとピレノイド部分の内膜陥入は観察されたことから、クロララクニオン藻の *FtsZ* は内膜を部分的に縊ることができるが、葉緑体分裂には直接関与していないことが示唆された（Hirakawa & Ishida 2015）。植物などの葉緑体では、*FtsZ* が分裂装置の中核

を担うのに対して、クロララクニオン藻の二次葉緑体では他のタンパク質が分裂を制御している可能性が示唆された。

(2) 明暗周期で分裂同調した *B. natans* 細胞を用いて、網羅的遺伝子発現解析を行った結果、21,706 個の核遺伝子の内、7,751 遺伝子 (約 35%) が細胞周期で発現変動することが明らかとなった。この発現変動する核遺伝子の中から、ヌクレオモルフの DNA 複製に関与する 4 つの遺伝子を同定し、ヌクレオモルフ DNA の複製が核遺伝子に制御されていることを示した (図 2)。

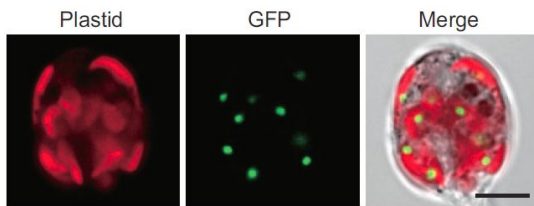


図 2: ヌクレオモルフに局在するタンパク質

中でも DNA 複製酵素である DNA ポリメラーゼは、ウイルスの配列に類似していることが分子系統解析により明らかとなり、ヌクレオモルフの DNA 複製に重要な遺伝子が、ウイルスからの水平伝播により進化してきたことが推察された (Suzuki et al. 2016)。

(3) 一般的に植物や緑藻、紅藻のミトコンドリアと葉緑体の DNA 複製は 1 種類の DNA ポリメラーゼ (POP) により制御されている。本研究では、クロララクニオン藻から POP に相同な遺伝子の探索を行い、系統的に異なる 2 種類の POP 配列を発見した。それぞれのタンパク質の細胞内局在を解析すると、POP1 はミトコンドリアに、POP2 は葉緑体に局在していた。これにより、本藻が植物などは異なるオルガネラ DNA 複製機構を進化させてきたことが明らかとなった (学会発表)。

(4) 植物などの葉緑体では、葉緑体内膜の FtsZ リングと葉緑体外膜上に形成されるダイナミン様タンパク質を主成分とするリング状構造により分裂が行われる。しかし、二次葉緑体では外膜リングを構成するタンパク質はこれまで発見されていない。本研究では、クロララクニオン藻がもつ 5 つのダイナミン様タンパク質に着目して、外膜リング構成タンパク質の解明を試みた。分子系統解析の結果、植物の葉緑体で働くダイナミン様タンパク質に近縁なものは、クロララクニオン藻には無かった。一方、クロララクニオン藻に特有なダイナミン様タンパク質において、抗体を用いて細胞内局在を観察した結果、葉緑体から突出するピレノイド周縁部に局在するダイナミン様タンパク質を発見した。このタンパク質が二次葉緑体分裂に関与するのは未だ不明であるが、今後の研究で明らかにしていく。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

平川 泰久 (2017) クロララクニオン藻の色素体制御機構、BSJ-Review、Vol8:169-174 (査読有り)

DOI:10.24480/bsj-review.8d1.00126

Yoshihisa Hirakawa, Takuro Nakayama, Nadine Keilert, Ken-ichiro Ishida (2017) Evolution of UhpC-type hexose-phosphate transporters in dinoflagellates. Phycological Research 65:166-170 (査読有り)

DOI:10.1111/pre.12164

Shigekatsu Suzuki, Yoshihisa Hirakawa, Rumiko Kofuji, Mamoru Sugita, Ken-ichiro Ishida (2016) Plastid genome sequences of *Gymnochlora stellata*, *Lotharella vacuolata*, and *Partenskyella glossopodia* reveal remarkable structural conservation among chlorarachniophyte species. Journal of Plant Research 129:581-590 (査読有り)

DOI:10.1007/s10265-016-0804-5

Yoshihisa Hirakawa, Ken-ichiro Ishida (2015) Prospective function of FtsZ proteins in the secondary plastid of chlorarachniophyte algae. BMC Plant Biology 15:276 (査読有り)

DOI:10.1186/s12870-015-0662-7

[学会発表](計 8 件)

Yoshihisa Hirakawa. Complex plastid evolution in chlorarachniophyte algae. Company of Biologists Workshop "Symbiosis in the microbial world: from ecology to genome evolution", 2017

平川泰久、石田 健一郎「クロララクニオン藻のダイナミン様タンパク質」日本植物学会、2017 年

Yoshihisa Hirakawa, Arisa Watanabe, Shigekatsu Suzuki, Ken-ichiro Ishida. Organelle DNA replication in chlorarachniophyte algae. Protist 2016, 2016

Arisa Watanabe, Shigekatsu Suzuki, Yoshihisa Hirakawa, Ken-ichiro Ishida. Evolution of organellar DNA polymerases in chlorarachniophyte algae. ICES 2016, 2016

渡辺ありさ、鈴木重勝、平川泰久、石田 健一郎「クロララクニオン藻のオルガネラ DNA ポリメラーゼの進化」日本植物学会、沖縄、2016 年 9 月

平川泰久、鈴木 重勝、石田 健一郎 「クロラクニオン藻の遺伝子発現から紐解く色素体制御機構」 日本植物学会、2016年

鈴木 重勝、石田 健一郎、平川 泰久 「クロラクニオン藻における日周期による遺伝子発現プロファイル」 日本藻類学会、2016年

平川泰久、鈴木 重勝、石田 健一郎 「クロラクニオン藻の細胞周期における遺伝子発現プロファイル」 日本植物学会、2015年

〔図書〕(計 1件)

Yoshihisa Hirakawa (2017) Secondary endosymbioses, *Advances in Botanical Research* Volume 84, Academic press, pp452

〔その他〕

ホームページ等

<https://yhirakawa.weebly.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 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