

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18682

研究課題名(和文) 藻類・植物に共通のリン酸化酵素が制御する窒素欠乏応答性脂質蓄積機構の解明

研究課題名(英文) Algal protein kinase TAR1 modulates cellular viability and gametogenesis in carbon/nitrogen imbalance conditions

研究代表者

梶川 昌孝 (Kajikawa, Masataka)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：40594437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：栄養素が枯渇すると微細藻類はトリアシルグリセロール(TAG)を蓄積する。DYRK型タンパク質リン酸化酵素TAR1は緑藻クラミドモナスにおいて炭素代謝を調節することを既に報告した。tar1-1変異体は光独立栄養かつN欠乏条件において野生型(WT)細胞と比較して、高いレベルの細胞生存率および過酸化水素の生成を維持した。配偶子形成での交配効率および主要調節因子のmRNA存在量はtar1-1の方がWTよりも低かった。さらにtar1-1はWTと比較して高いレベルのTAGおよびデンプンを蓄積した。さらに426のTAR1依存性リン酸化タンパク質を同定し、N同化および炭素代謝に関連するタンパク質を見出した。

研究成果の概要(英文)：When nutrient deprived, microalgae accumulate triacylglycerol (TAG) in lipid droplets. Dual-specificity kinase, TAG-accumulation-regulator-1 (TAR1) has been reported to regulate carbon metabolism in a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. TAR1 is required for acetate-dependent TAG accumulation and degradation of chlorophyll and photosynthesis-related proteins in photomixotrophic nitrogen (N)-deficient conditions. We report that the tar1-1 mutant maintained high levels of cell viability and lower generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> compared with wild-type (WT) cells in photoautotrophic N-deficient conditions. Mating efficiency and mRNA abundance of key regulators in gametogenesis were lower in tar1-1 than those in WT. In addition, tar1-1 accumulated higher levels of TAG and starch per cell volumes compared with WT. We identified total 426 TAR1-dependent phosphoproteins by phosphoproteomic analysis. Several protein kinases and enzymes related to N assimilation and carbon metabolism were included.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：植物生理学 植物分子生物学 脂質代謝 光合成 藻類育種 タンパク質リン酸化

1. 研究開始当初の背景

近年、化石燃料資源の有限性や低炭素社会への転換といった社会要請に対して、植物性バイオ燃料の実用的生産が提起されている。藻類による脂質生産は他の植物性燃料生産戦略と比べ、大規模化が可能で作物耕作地との競合がないといった様々な利点を有していることから、代替エネルギーの供給源として産業的な実用化が期待される。しかし藻類の脂質代謝経路とその制御に関する知見は未だ乏しく、藻類によるバイオ燃料生産が実用化されるためには、それらの知見を蓄積して、脂質生産性と良好な生育を両立した種や、脂質生産能を人為的に制御可能な種といった産業利用に適した栽培品種を作出する必要がある。

2. 研究の目的

多くの藻類は窒素欠乏にตอบสนองして細胞内に脂質を高蓄積するが、栄養欠乏下では藻類の生育は停止してしまう。良好な生育と高い脂質生産性を両立させるためには、脂質蓄積の分子機構を人工的に制御することが必要である。申請者は窒素欠乏下での脂質蓄積量が低下する変異体 *tar1-1* を取得し、原因遺伝子 *TAR1* が脂質蓄積を正に制御するリン酸化酵素をコードすることを明らかにした。*TAR1* タンパク質のリン酸化標的のタンパク質を探索しその機能を解析することで、藻類の脂質蓄積制御に重要な役割を担うリン酸化経路の詳細を明らかにする。更にシロイヌナズナの *TAR1* ホモログ遺伝子変異体の表現型とリン酸化標的を解析することで、藻類から植物まで保存された *TAR1* リン酸化酵素が担っている栄養欠乏下の脂質蓄積制御のメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

クラミドモナスの脂質蓄積制御因子 *TAR1* リン酸化酵素による栄養欠乏時の応答制御の分子機構を明らかにするために、本研究計画では以下の研究項目を行った。

(1) *TAR1* のリン酸化標的タンパク質の探索・同定を行う。

(2) 同定した *TAR1* の標的タンパク質の遺伝子についてクラミドモナス変異体ライブラリーから挿入変異株を取得し機能解析することで、*TAR1* の制御下にある分子機構を解明する。

4. 研究成果

(1) *tar1-1* 変異体は光独立栄養かつ N 欠乏条件において野生型 (WT) 細胞と比較して、高いレベルの細胞生存率および過酸化水素の生成を維持した。配偶子形成での交配効率および主要調節因子の mRNA 存在量は *tar1-1* の方が WT よりも低かった。さらに *tar1-1* は WT と比較して高いレベルの TAG およびデンブンを蓄積した。さらにリン酸化プロテオーム解析により光独立栄養かつ N 欠乏条件においてリン酸化状態が有意に変動する 426 個の *TAR1* 依存性リン酸化タンパク質を同定し、

N 同化および炭素代謝に関連するタンパク質を見出した。

(2) *TAR1* 依存性リン酸化タンパク質には 10 個のタンパク質リン酸化酵素、1 個の脱リン酸化酵素、3 個の転写因子が含まれており、*TAR1* の下流のタンパク質リン酸化カスケードと N 応答性遺伝子発現制御に関する候補因子である。クラミドモナス変異体ライブラリーからこれら因子の変異体を得て解析したところ、MYB 型転写因子と相同性を示すが機能未知である MYBL4 の変異体が、光独立栄養かつ N 欠乏条件において高 TAG/高デンブン/高クロロフィル蓄積かつ光合成活性を維持する *tar1-1* 変異体と同様の表現型を示した。

5. 主な発表論文等 (計 3 件)

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

1. Kajikawa, M., Sierro, N., Hashimoto, T., Shoji, T.\* A model for evolution and regulation of nicotine biosynthesis regulon in tobacco. *Plant Signal Behav.*, e1338225 (2017) 査読有 DOI: 10.1080/15592324.2017.1338225.
2. Kajikawa, M., Sierro, N., Kawaguchi, H., Bakaher, N., Ivanov, N.V., Hashimoto, T., Shoji, T.\* Genomic insights into the evolution of nicotine biosynthesis pathway in tobacco. *Plant Physiol.*, 174, 999-1011 (2017) 査読有 DOI: 10.1104/pp.17.00070.
3. Kajikawa M., Abe T., Ifuku K., Furutani K., Yan D., Okuda T., Ando A., Kishino S., Fukuzawa H.\* Production of ricinoleic acid-containing monoestolide triacylglycerides in an oleaginous diatom, *Chaetoceros gracilis*. *Sci. Rep.*, 6:36809 (2016) 査読有 DOI: 10.1038/srep36809.

[学会発表](計 28 件)

(国際・口頭発表)

1. Masataka Kajikawa "Protein kinase *TAR1* conserved in the algae and land plants regulates C/N-stress responses" 2017 年 7 月 6-7 日 19 回京都大学生命科学研究科 シンポジウム (京都大学 芝蘭会館)
2. Masataka Kajikawa, Haruka Shinkawa, Sawaragi Yuri, Hideya Fukuzawa "TAG-accumulation-regulator-1 (*TAR1*) triggers suppression of photosynthesis and accumulation of lipid and starch under photoautotrophic and nitrogen-deficient conditions in *Chlamydomonas*" 2016 年 6 月 26-7 月 1 日 17th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas* (Koyo International Conference Center, Kyoto, JAPAN)
3. Masataka Kajikawa "Algal DYRK kinase, *TAR1*, regulates accumulation of triacylglycerol in nitrogen deficiency"

- Kyoto-Bristol-Heidelberg Plant Sciences Workshop: Novel Frontiers in Botany (2016. 3. 2, Science Seminar House, Kyoto Univ., Kyoto) Special Lecture (国際・ポスター発表)
4. Haruka Shinkawa, Masataka Kajikawa, Ryuichi Nishihama, Takayuki Kohchi, Hideya Fukuzawa "DYRK-Type protein kinase MpYak1 is involved in rhizoid elongation and carbon allocation in response to nitrogen deficiency in *Marchantia polymorpha*", 2018年2月28-3月1日 The 16th International Student Seminar (京都大学 芝蘭会館)
  5. Asuka Miyamoto, Yuki Niikawa, Daisuke Shimamura, Tomoya Honjo, Noriko Kozai, Donghui Hu, Chihana Toyokawa, Haruka Shinkawa, Masataka Kajikawa, Takashi Yamano, Hideya Fukuzawa "Isolation of green algal mutants accumulating high levels of TAG and chlorophyll under nitrogen deficient conditions" 2018年2月28-3月1日 The 16th International Student Seminar (京都大学 芝蘭会館)
  6. Haruka Shinkawa, Masataka Kajikawa, Ryuichi Nishihama, Takayuki Kohchi, Hideya Fukuzawa "DYRK-Type Protein Kinase TAR1 Regulates Rhizoid Elongation and Carbon Allocation in Response to Nitrogen Deficiency in the Liverwort *Marchantia polymorpha*" 2017年12月16-18日 The 65th NIBB Conference Renaissance of *Marchantia polymorpha* the genome and beyond (Okazaki Conference Center, Okazaki, Aichi, Japan)
  7. Uran Ohta, Haruka Shinkawa, Asuka Miyamoto, Masataka Kajikawa, Masafumi Hirono, Hideya Fukuzawa "Isolation and characterization of a *Chlamydomonas* mutant with high levels of chlorophyll and TAG under nitrogen deficiency" 2017年11月29-12月2日 The 7th Asian Symposium on Plant Lipid (Academia Sinica, Taipei, Taiwan)
  8. Uran Ohta, Haruka Shinkawa, Asuka Miyamoto, Masataka Kajikawa, Masafumi Hirono, Hideya Fukuzawa "Isolation and characterization of a *Chlamydomonas* mutant with high levels of chlorophyll and TAG under nitrogen deficiency" 2017年11月29-12月2日 The 7th Asian Symposium on Plant Lipid (Academia Sinica, Taipei, Taiwan)
  9. Masataka Kajikawa, Kentaro Ifuku, Jun Ogawa, Yasuhiro Kashino, Hideya Fukuzawa (Poster presentation) "Production of ricinoleic acid-containing monoestolide triacylglycerides in an oleaginous diatom, *Chaetoceros gracilis*" 2017年7月9-13日 International Conference "Molecular Life of Diatoms" (Ikuta Shrine Hall, Kobe, Japan)
  10. Marika Yamauchi, Masataka Kajikawa, Misako Kato, and Hideya Fukuzawa "Autophagy-related gene ATG3 is essential for the cell survival of *Chlamydomonas reinhardtii* under nitrogen-starvation conditions" 2016年6月26-7月1日 17th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas* (Koyo International Conference Center, Kyoto, JAPAN)
  11. Haruka Shinkawa, Masataka Kajikawa, Yuko Nomura, Mayu Ogura, Hirofumi Nakagami, Naoyuki Sugiyama, Yasushi Ishihama, and Hideya Fukuzawa (Poster presentation) "Phosphoproteomic analysis of a mutant of YAK1-type DYRK, TAR1 under the photoautotrophic C/N-imbalanced conditions" 2016年6月26-7月1日 17th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas* (Koyo International Conference Center, Kyoto, JAPAN)
  12. Haruka Shinkawa, Masataka Kajikawa, Yuri Sawaragi, Takashi Yamano, Yu Kanazaki, Hirofumi Yoshikawa, Hideya Fukuzawa "*Chlamydomonas reinhardtii* TAG-accumulation-regulator-1 (TAR1) triggers suppression of photosynthesis and accumulation of lipid and starch under photoautotrophic and nitrogen-deficient conditions" 2016年3月9-14日 The 14th International Student Seminar (京都 京都大学芝蘭会館)
  13. Haruka Shinkawa, Marina Ogawa, Masataka Kajikawa, Hideya Fukuzawa "Isolation of triacylglycerol-accumulating mutants from a green alga *Chlamydomonas reinhardtii*" 2016年3月9-14日 The 14th International Student Seminar (京都 京都大学芝蘭会館)
- (国内・口頭発表)
14. 梶川 昌孝、山内 万里香、新川 はるか、田中 学、幡野 恭子、西村 芳樹、加藤 美砂子、福澤 秀哉「オートファジーを欠損させた緑藻における窒素欠乏応答異常」2018年3月27-30日 第59回日本植物生理学会年会(札幌コンベンションセンター)
  15. 梶川 昌孝「藻類での有用物質生産と脂質蓄積制御因子の同定」2018年3月15日 日本農芸化学会2018年度大会(ホテルナゴヤキャッスル) 2018年度農芸化学奨励賞受賞講演
  16. 本庄 智也、梶川 昌孝、伊福 健太郎、菓子野 康浩、福澤 秀哉「リシノール酸生産により促進される実用珪藻の脂質蓄積」2018年3月15-18日 日本農芸

- 化学会 2018 年度大会(名城大学 天白キャンパス)
17. 梶川 昌孝、山内 万里香、新川 はるか、田中 学、幡野 恭子、西村 芳樹、奥 公秀、阪井 康能、加藤 美砂子、福澤 秀哉「オートファジーを欠損させた緑藻における窒素欠乏応答異常」2017 年 9 月 10-11 日 第 30 回植物脂質シンポジウム(お茶の水女子大学)
  18. 梶川 昌孝、山内 万里香、新川 はるか、田中 学、幡野 恭子、西村 芳樹、奥 公秀、阪井 康能、加藤 美砂子、福澤 秀哉「オートファジーを欠損させた緑藻における窒素欠乏応答異常」2017 年 9 月 8-10 日 日本植物学会第 81 回大会(東京理科大学 野田キャンパス)
  19. 梶川 昌孝、伊福 健太郎、菓子野 康浩、福澤 秀哉「リシノール酸生産により促進される実用珪藻ツノケイソウの脂質蓄積」2017 年 6 月 3-4 日 第 19 回マリンバイオテクノロジー学会大会(東北大学 青葉山キャンパス)
  20. 梶川 昌孝、安部 竜樹、伊福 健太郎、岸野 重信、安藤 昇規、小川 順、福澤 秀哉「実用珪藻ツノケイソウによるリシノール酸生産」2017 年 3 月 17-20 日 2017 年度日本農芸化学会(京都女子大学)
  21. 梶川 昌孝、安部 竜樹、伊福 健太郎、岸野 重信、安藤 昇規、小川 順、福澤 秀哉「実用珪藻ツノケイソウにおけるリシノール酸生産」2016 年 12 月 18-19 日 第 3 回分子珪藻研究会(有馬温泉 ねぎや稜楓閣)
  22. 梶川 昌孝、安部 竜樹、伊福 健太郎、岸野 重信、安藤 昇規、小川 順、福澤 秀哉「実用珪藻ツノケイソウにおけるリシノール酸生産」2016 年 11 月 25-26 日 第 29 回植物脂質シンポジウム(大阪大学 豊中キャンパス)
  23. 梶川 昌孝、福澤 秀哉(招待講演)「モデル緑藻および実用珪藻における代謝工学」2016 年 5 月 28-29 日 第 18 回マリンバイオテクノロジー学会大会(北海道大学 函館キャンパス)
  24. 新川 はるか、梶川 昌孝、榎木 裕里、山野 隆志、兼崎 友、吉川 博文、福澤 秀哉「緑藻クラミドモナス TAG accumulation regulator1 (TAR1) は光独立栄養の窒素欠乏条件下で光合成の抑制と脂質・デンプン蓄積量の維持に関与する」2016 年 3 月 18-20 日 第 57 回日本植物生理学会年会(岩手大学 上田キャンパス)
- (国内・ポスター発表)
25. 宮本 明日香、新川 友貴、嶋村 大亮、本庄 智也、香西 紀子、胡 東輝、豊川 知華、新川 はるか、梶川 昌孝、山野 隆志、福澤 秀哉「高 CO<sub>2</sub> かつ窒素欠乏環境で TAG と Chlorophyll を異常蓄積する緑藻変異株の単離と解析」2018 年 3 月

- 27-30 日 第 59 回日本植物生理学会年会(札幌コンベンションセンター)
26. 梶川 昌孝、山内 万里香、新川 はるか、田中 学、幡野 恭子、西村 芳樹、奥 公秀、阪井 康能、加藤 美砂子、福澤 秀哉「オートファジーを欠損させた緑藻における窒素欠乏応答異常」2017 年 9 月 1 日-2 日 第 3 回植物の栄養研究会(東京工業大学 すすかけホール)
27. 太田 羽藍、新川 はるか、梶川 昌孝、福澤 秀哉「脂質蓄積制御に関わるタンパク質リン酸化酵素 TAR1 の下流因子 MYB-like4 の解析」2016 年 11 月 25-26 日 第 29 回植物脂質シンポジウム(大阪大学 豊中キャンパス)最優秀ポスター受賞
28. 新川 はるか、小川 真梨菜、梶川 昌孝、福澤 秀哉(ポスター発表)「緑藻クラミドモナスにおける脂質蓄積異常変異株の単離」2016 年 3 月 18-20 日 第 57 回日本植物生理学会年会(岩手大学 上田キャンパス)

〔図書〕(計 2 件)

1. 梶川 昌孝、福澤 秀哉、「実用珪藻の代謝工学による高付加価値油脂の生産ツノケイソウでのリシノール酸生産と細胞毒性の回避」化学と生物 56(4)246-247 (2018)
2. 福澤 秀哉、梶川 昌孝「実用珪藻ツノケイソウにおけるリシノール酸生産」バイオサイエンスとインダストリー 75(3)242-243 (2017)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.molecule.lif.kyoto-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶川 昌孝 (KAJIKAWA, Masataka)  
京都大学・大学院生命科学研究科・助教  
研究者番号：40594437

研究者番号：

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )