

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14791

研究課題名(和文) 葉緑体による真核細胞の概日時計制御機構とその進化過程の解明

研究課題名(英文) Regulation of circadian clock of the eukaryotic host cell by the chloroplast and its evolution

研究代表者

宮城島 進也 (MIYAGISHIMA, Shin-ya)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・教授

研究者番号：00443036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内共生による葉緑体の成立は、真核細胞による光合成性生物の捕食、細胞内での一時的保持、共生の順に進んだと考えられている。細胞内共生関係維持における、葉緑体光合成による宿主の制御機構と進化について、本研究では以下を明らかにした。単細胞紅藻において、葉緑体の光合成が還元力を介して宿主真核細胞の細胞内時計をリセットした。藻食アメーバ3種において、明条件での光合成生物の捕食は酸化ストレスを生じた。それに応答してアメーバは捕食・消化活性を変化させた。従って、光合成による還元力を介した葉緑体から宿主へのシグナル伝達機構が存在すること、その機構は捕食の段階から存在し進化したことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Chloroplasts were established through predation and temporary retention of photosynthetic prey and then as a facultative and permanent endosymbiotic relationship with photosynthetic organisms by a unicellular eukaryotic host cell. In this study, we investigated the mechanism regulating the host cell by the chloroplast and its evolution. We found that, in a unicellular red alga, photosynthetic activity in the chloroplast resets the circadian clock of the eukaryotic host cell through reducing power. In addition, we found that three species of amoebae feeding on photosynthetic prey are exposed to oxidative stress upon illumination. That stress decreased phagocytic uptake of prey whereas accelerated digestion of prey. These results suggest that there is a signal transduction mechanism by which reducing power generated by the chloroplast modulates eukaryotic host cell and that such mechanism has evolved from that in eukaryotes feeding on photosynthetic prey.

研究分野：進化細胞生物学

キーワード：細胞内共生 細胞内時計 光合成

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアと葉緑体はバクテリアの細胞内共生によって誕生した。従って、両オルガネラの成立過程の理解は真核生物の誕生と多様化を理解することに繋がる。両オルガネラの成立は、宿主細胞による他種細胞の捕食、一時的保持、共生体との任意共生、絶対共生を経たと考えられている。絶対共生系の確立は、共生体から宿主への遺伝子転移と、宿主(核ゲノム)による共生体制御系の獲得に起因する。そのため、この分野の研究は「宿主細胞による共生体の制御機構とその進化」という観点で、分子細胞生物学(宿主核コードタンパク質の共生体への輸送機構、宿主ゲノムによる共生体のゲノム発現、成長、分裂の制御など)、分子系統学を基盤として進められている(Dorrell and Howe, 2012)。研究代表者らはこれまで、宿主真核細胞による葉緑体の成長・分裂制御の研究分野を長年リードしてきた(Miyagishima and Kabeya, Curr. Opin. Microbiol. 2010)。この過程で、逆に宿主細胞の成長・分裂(細胞周期進行)が葉緑体の光合成に依存する一方、光合成酸化ストレス(光合成に起因する多量の活性酸素種)によってどのような制約を受けるのかという、この分野にはほとんどなかった、代謝・エネルギーを考えた研究を開始した。その結果、宿主細胞の概日時計(核コード転写因子群のネガティブフィードバックループ=TTFL)により、(1)昼に葉緑体による光合成活性(活性酸素種の主要な発生源)がピークを迎え、細胞周期進行(G1/S移行)の抑制がおこる、(2)夜間に(連続光照射下においては夜であるはずの時間帯にも)光合成活性の低下、一方で宿主細胞周期進行がおこることを見いだした。つまり、概日時計による宿主細胞と共生体由来オルガネラの分業が細胞内共生関係維持に重要であることを示した(Miyagishima et al., Nature Commun. 2014)(図1)。

さらに、予備的な研究により、(1)非同調細胞集団(連続明)の光合成電子伝達をDCMUにより停止させることで、宿主の概日リズムがリセットされ集団が同調することを明らかにしている。このことから光合成を介した葉緑体(共生体)から核(宿主細胞)へのシグナル伝達経路の存在が予想される(図1)。つまり、宿主と共生体がお互いに概日リズムを調整し合うことで、それぞれの作業の時間分業をしていることが示唆される(図1)。

では、このような、共生体から宿主へのシグナル伝達、共生体による宿主の活動の制御系がどのように進化してきたのかという点が疑問となる。細胞内共生によるオルガネラ成立は、他生物細胞の捕食、細胞内での一時的保持、任意共生(単細胞藻類を細胞内に共生させるサンゴ、ミドリゾウリムシなど)、絶対共生の順に進んだと考えられている。ミドリゾウリムシ(ゾウリムシと真核緑藻の任意共生)において、その機構・意義は不明だ

が、細胞内クロレラの有無によってゾウリムシの概日リズムが変動する事が報告されている(Miwa et al., 1996)。単細胞性の生物が光合成生物を捕食する過程においても、昼間は細胞内に取り込まれた光合成性餌に光が当たるため、高濃度の活性酸素種を細胞内で生じると考えられる。従って、共生体光合成による宿主の活動制御は、絶対共生確立以前の、捕食、任意共生の段階から存在していた可能性も予想される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(A)葉緑体の光合成による宿主真核細胞の時計(TTFL)の調節系がどのような経路によるのかを明らかにする(真核単細胞藻類を利用)こと、(B)上記のような光合成による宿主細胞機能の変化が、光合成生物を捕食する真核生物(藻食アメーバを利用)でもおこるかを明らかにすることである。

上記の共生体 宿主という制御メカニズムの存在が示されることで、細胞内共生関係の維持は、宿主による共生体制御だけでなく、共生体による宿主制御も含め、互いに制約を掛け合うことでなされているという、細胞内共生の研究に新たなパラダイムを提供することとなる。さらに本研究により、そのような相互制約が、光合成性餌 捕食者という関係から進化した可能性の有無も明らかとなる。

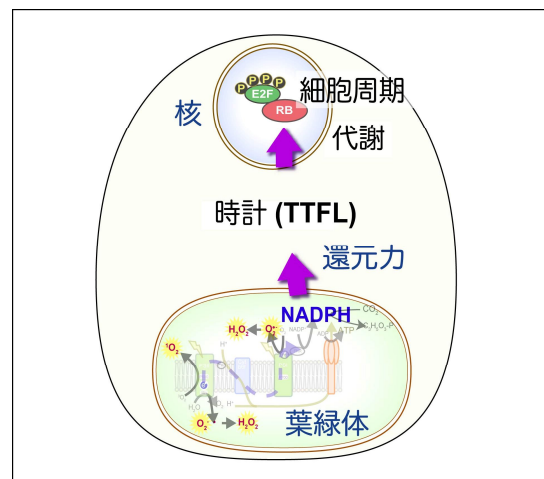


図1 葉緑体光合成による宿主真核細胞の時計制御

3. 研究の方法

(A) 真核藻類における葉緑体光合成による宿主真核細胞の時計制御

1) 単細胞紅藻 *C. merolae* の新規形質転換マーカーの開発

本研究の遂行に当たっては、真核藻類を用いた分子遺伝学的な実験が必須である。これまで、遺伝的改変が可能であることから、単細胞緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) がモデル真核藻類として広く研究に用いられてきた。しかしながら、強力なサイレンシング作用により導入遺伝子産物が発現しにくい、ゲノムの任意箇所の編集法が確立していないなど、その利用には大きな制

限がある。

これに対し我々は、核ゲノム組成の冗長性が極めて小さい(16.5 Mb⁵⁶; クラミドモナスは 120 Mb) 単細胞紅藻シゾン (*Cyanidioschyzon merolae* 10D)において、相同組換えによるゲノムの任意箇所編集技術、導入遺伝子の発現誘導・抑制法などを次々に開発してきた。本系においては導入遺伝子のサイレンシングは起こらず導入遺伝子産物の安定的な発現が可能である。しかしながら、形質転換体を選抜するためのマーカーが1つ(ウラシル要求株とウラシル合成遺伝子のセット)しかなかったために、その利用が制限されていた。以下の(A-2)では、例えば2種類のタンパク質をそれぞれ別のエピトプタグで標識すること等が必要であった。そこで、*C. merolae* ゲノムの複数任意箇所編集用として、新たにクロラムフェニコールによる形質転換体選抜系の開発を行った。

2) 葉緑体光合成による宿主真核細胞の時計制御経路

葉緑体光合成が光とは独立に宿主細胞の統計(TTFL)に作用するか、またその場合どのような経路によるかを明らかにするために、単細胞紅藻 *C. merolae* を以下のような条件で培養した。(i)非同調培養を明条件から暗条件に移した。(ii)明条件下の非同調培養にDCMUを加えた。(iii)暗条件下の非同調培養に光を照射した。(iv) *N*-アセチルシステインまたは TEMPOL を加え還元ショックを与えた。次に、各培養条件における細胞集団の時計の動きを、TTFL 因子をコードする *CCA1* mRNA、時計によりリン酸化レベルが変化する E2F タンパク質を指標として解析した。

上記と並行して、TTFL に光合成からの情報が入力されるメカニズムを探るため、*CCA1* タンパク質に結合する酸化還元タンパク質の探索を行った。

(B) 光合成性餌が単細胞捕食者に与える影響

本研究開始までに湿地より3種の藻食アメーバを単離していた。さらに餌となるシアノバクテリア(*Synechococcus elongatus*)との二員培養系も確立していた。餌の光合成が捕食者の行動に与える影響を調べるために、通常の色青緑色の *S. elongatus* に加え、窒素源欠乏下での培養により、光合成色素を失わせた無色の *S. elongatus* を用意した。それぞれのアメーバに青緑色または無色の餌を与え、暗条件から明条件に移し、その前後における、アメーバのトランスクリプトーム、増殖速度、捕食速度、捕食した餌の消化速度の変動を調べた。

4. 研究成果

(A) 真核藻類における葉緑体光合成による宿主真核細胞の時計制御

1) 単細胞紅藻 *C. merolae* の新規形質転換マーカーの開発

形質転換マーカーとして葉緑体トランジト配列を融合させたクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(cpCAT)を用いた。最初、形質転換体の選抜を、クロラムフェニコールを含むゲランガムプレートで試みたがうまくいかなかった。そこで、クロラムフェニコールを含む液体培地での選抜後、薬剤を含まないゲランガムプレートでクローンを単離する方法に切り替えた。その結果、クロラムフェニコールを用いた、*C. merolae* における新たな形質転換法の開発に成功した。この結果により、従来のウラシル合成遺伝子マーカーと併用することにより、ゲノムの任意の二カ所を編集できるようになった。

2) 葉緑体光合成による宿主真核細胞の時計制御経路

C. merolae を用いた培養実験の結果、(i)非同調培養を明条件から暗条件に移した場合、(ii)明条件下の非同調培養にDCMUを加えた場合、iとiiの双方で、培養集団の時計が、それぞれ同じ位相で同調することがわかった。つまり、光とは無関係に、光合成活性単独で時計をリセットする機構があることが示唆された。

さらに(iii)暗条件下の非同調培養に光を照射した場合、(iv) *N*-アセチルシステインまたは TEMPOL を加え還元ショックを与えた場合、iiiとivの双方で、培養集団の時計が、それぞれ同じ位相で同調することがわかった。つまり、光合成により生じる還元力により宿主細胞の時計がリセットされる機構があることが示唆された。

上記の機構に関わるタンパク質を同定するために時計タンパク質 *CCA1* に結合するタンパク質を探索した。遺伝的改変により、タグ付きの *CCA1* を knock-in により *C. merolae* に発現させ、抗タグ抗体による免疫沈降産物を質量分析した結果、30 kD のタンパク質が同定された。さらに、(A-1)で開発した手法を用いて、タグ付きの *CCA1* 及び別のタグ付きの30 kD のタンパク質を両方当該ローカスに knock-in した株を作成した結果、確かに両者が細胞内で結合することが示された。次に30-kD タンパク質に *CCA1* と結合できなくなるような変異を導入したところ、上記で見られた時計のリセットが遅れる結果を得た。さらに30 kD タンパク質が、光合成によりその酸化還元状態を変化させる予備結果を得た。以上の結果、30 kD のタンパク質が、葉緑体光合成 > 還元力 > 時計の経路ではたらく可能性が示唆された。

(B) 光合成性餌が単細胞捕食者に与える影響

3種の藻食アメーバと青緑色及び無色のシアノバクテリア餌の共培養実験により、餌の光合成能が捕食者に与える影響を調べた結果、

3種の系統的に遠縁のアメーバに共通する事項として以下の結果を得た。

(i) 強光下 ($500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (参考: 夏、昼の水面は約 $2,000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で青緑色の餌を捕食する場合にのみアメーバが強度の酸化ストレスに曝され、さらに一種においては一部の細胞が破裂して死んでしまうことも観察された。(ii) トランスクリプトーム解析の結果、光照射下で青緑色の餌を捕食する場合にのみ、酸化ストレス応答関連の遺伝子群及び DNA 修復関連の遺伝子群の発現が上昇し、一方でアクチン・ミオシン遺伝子群の発現が減少することが明らかとなった。(iii) iiの結果と一致して、弱光下 ($200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) であっても、青緑色の餌を捕食する場合にのみアメーバのファゴサイトーシス活性が低下し、餌の取り込みが低下した。(iv) 一方で細胞内に取り込まれた後の餌の消化が速まることが判明した。

以上の結果は、光合成性の餌を昼間に捕食すると単細胞捕食者が光合成酸化ストレスに曝されること、捕食者は捕食を低減しさらに消化を速めることで、細胞内の光合成性餌の量を減らし、酸化ストレス発生の軽減を行っていることを示唆している。つまり、光合成性餌の光合成により、捕食者の行動が変化することを示している。

以上の結果、被食者/共生体の光合成による宿主細胞の活性変化は捕食関係の段階から存在し、細胞内共生関係の成立に寄与したことが示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Fujiwara, T., Ohnuma, M., Kuroiwa, T., Ohbayashi, R., Hirooka, S. and Miyagishima, S. (2017). Development of a double nuclear gene-targeting method by two-step transformation based on a newly established chloramphenicol-selection system in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Front. Plant Sci.* Article 343
DOI: 10.3389/fpls.2017.00343

〔学会発表〕(計7件)

宮城島 進也「真核宿主細胞と細胞内共生体由来オルガネラの協調増殖機構」第17回名古屋大学遺伝子実験施設公開セミナー 2017年12月14日 名古屋大学(名古屋市)

宮城島 進也「真核細胞と葉緑体・光合成性細胞内共生体の協調増殖機構」2017年度生命科学系学会合同年次大会 2017年12月6日 神戸国際会議場(神戸市)

宮城島 進也、恵良 厚子、廣岡 俊亮、藤原 崇之「真核藻類における細胞周期進行とエネルギー変換の時間分業」日本

植物学会・第81回大会 2017年9月8日 東京理科大学(野田市)

宮城島 進也「真核宿主細胞と細胞内共生オルガネラの協調増殖機構」日本進化学会シンポジウム 2017年8月24日 京都大学(京都市)

宮城島 進也「真核細胞と葉緑体の分裂同調化機構」大阪大学タンパク研究所セミナー 真核細胞のオルガネラ研究最前線 2017年3月22日 大阪大学(大阪市)

宮城島 進也 “Uses of acidic hot spring eukaryotic algae: pure and applied sciences” 光合成科学: エネルギーとバイオマス 2017年01月28日 東京工業大学(横浜市)

Uzuka, A., Hirooka, S., Fujiwara, T., Kanesaki, Y., Yoshikawa, H., Miyagishima, S. “Analyses of photosynthetic oxidative stress responses in geribivorous unicellular organisms” *Prostist-2016* 2016年06月06日 モスクワ(ロシア)

〔図書〕(計1件)

Miyagishima, S. (2017) Regulation of cell cycle progression by circadian rhythms in *Cyanidioschyzon merolae*. In *Cyanidioschyzon merolae: A new model eukaryote for cell and organelle biology.* (Kuroiwa et al., eds.) Springer
DOI: 10.1007/978-981-10-6101-1

〔その他〕

ホームページ

<https://www.nig.ac.jp/nig/ja/research/organization-top/laboratories/miyagishima>

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮城島 進也 (MIYAGISHIMA, Shin-ya)
国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・教授
研究者番号: 00443036