

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：33401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14813

研究課題名(和文)水圏微生物による光毒素クロロフィルの無毒化メカニズムの究明

研究課題名(英文)Elucidating detoxification mechanisms of the phototoxic chlorophyll by aquatic microbes

研究代表者

柏山 祐一郎(Kashiyama, Yuichiro)

福井工業大学・環境情報学部・教授

研究者番号：00611782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：微細藻類捕食性プロティストの二員培養および微細藻類の単藻培養実験から、シクロフェオフォルバイドエノール(CPE)を産生する代謝が真核生物に遍在するもっとも代表的なクロロフィル分解代謝経路であり、多くの二次植物においても確認されることが分かった。また、CPE代謝をおこなう捕食性プロティストのトランスクリプトーム解析では、クロロフィルを含有するシアノバクテリアの捕食時に特異的な遺伝子発現プロファイル変化が示された。さらに、ユーグレナ藻のRNAiノックダウン実験によりクロロフィル代謝関連遺伝子を逆遺伝学的アプローチによって突き止め、二次葉緑体にクロロフィルサイクルが保存されていることが示された。

研究成果の概要(英文)：We elucidated that CPE catabolism is ubiquitous chlorophyll degradation process in eukaryotes from extensive experiments and pigment analyses on two-membered cultures protistan predators and algal prey as well as unialgal cultures of microalgae; thus, the results showed that CPE catabolism is also common among many of algal lineages with the secondary plastids. We then carried out a comparative transcriptome analysis on a protistan predator that feeds on both cyanobacteria (performing CPE catabolism) and non-phototrophic bacteria and inferred changes in a gene expression profile responding upon predation of chlorophyll-containing cyanobacteria. Furthermore, we suggested by a reverse genetic approach, the RNAi knockdown experiments on *Euglena gracilis*, that a part of genes responsible for degradation of chlorophylls known among green plants are preserved and functioned in the secondary chloroplasts of euglenophytes algae.

研究分野：microbiology

キーワード：chlorophylls chlorophyll catabolism algivorous protists

## 1. 研究開始当初の背景

光合成機構の中核をなすクロロフィル類は、地球生命圏のエネルギーフローにおける要(かなめ)分子である。その一方で、遊離クロロフィルは光環境下で一重項酸素を生じる細胞毒素としての側面を持つ(光増感作用による分子酸素の励起)。このクロロフィルの「光毒性」の制御は、クロロフィルを有する植物細胞のみならず、捕食性プロティストを含めた、光透過性の強い微生物間の相互作用において極めて重大である。我々は、いくつかの捕食性プロティストや光栄養性プロティスト(真核微細藻類)がクロロフィル類を光毒性の無いシクロフェオフォルバドエノール類(Cyclophorphorbide enols; CPE類と略す)に代謝することを見いだした。しかし、その分解過程の詳細は不明で、代謝過程を駆動する関連代謝酵素も全く不明である。蛍光顕微鏡観察や色素分析の結果からは、CPE類を産生しないプロティストにおいても、クロロフィル類を無色の誘導体にまで分解する未知のメカニズムが存在することが示唆されていた。しかし、水圏プロティストに関しては、CPE類への代謝メカニズムでさえ未解明である現状において、ましてやその他の分解経路に關与する酵素については全く情報が無い状態であった。

## 2. 研究の目的

まず、様々な捕食性プロティストおよび光栄養性プロティスト(微細藻類)の培養実験から、CPE産生を伴うクロロフィル代謝をおこなう系と未知の分解代謝の可能性を示す系を網羅的に探索した。次に、微細藻類捕食性のプロティストとシアノバクテリアの二員培養系の確立を試みた。これにより、真核生物である前者の mRNA を原核生物である後者のそれと区別して解析することで、二員培養の系において、トランスクリプトーム解析などの分子生物学的なアプローチや、生化学的な実験を可能にすることを目指した。また、捕食過程の細胞をライブ蛍光染色により顕微鏡下で観察することにより、トランスクリプトーム解析などにおいて重要になる、クロロフィルの代謝に關わる細胞動態を明らかにすることを目指した。さらに、微細藻類が自らのクロロフィルを分解する代謝経路について、ユーグレナ藻などを材料にして逆遺伝学的な手法での研究を目指した。これらにより、未知のクロロフィル代謝過程を発見し、それらを解明する基盤の構築を目標とした。

## 3. 研究の方法

**1) CPE 代謝・非 CPE 代謝プロティストの網羅的探索:** 真核生物の 9 つの主要系統群のうちのうち、アーケプラスチダを除く 8 つを網羅する合計 73 株の捕食性プロティストと微細藻類の二員培養系、および全ての一次植物および二次植物の系統群を網羅する 112 種

/ 株の微細藻類を培養し、カルチャー懸濁物の抽出物から HPLC 分析によりクロロフィルの代謝産物を探索した。[ 柏山, 横山, 矢吹 ]

**2) シアノバクテリアを餌とした二員培養系の確立:** 真核微細藻類捕食性の生物として環境中から分離したプロティストについて、シアノバクテリアを餌とした培養を試みた。また、環境水試料中に培養したピコシアノバクテリアを添加して、増殖したプロティストを分離し、同生物との二員培養系を作成した。[ 柏山 ]

**3) 微細藻類捕食性プロティストのトランスクリプトーム解析:** 2) で得られたシアノバクテリアを含むバクテリア全般を捕食するプロティスト *Paracercomonas* sp. KMO002 株に関して、シアノバクテリア食条件と非光合成バクテリア食条件について、mRNA の発現プロファイルを定量的に比較することで(比較トランスクリプトーム解析)、クロロフィルを含有するシアノバクテリアを捕食する際に特異的に働く遺伝子を探索した。[ 柏山, 谷藤 ]

**4) 微細藻類捕食時のプロティストの細胞動態の蛍光観察:** 比較的大型で観察に適した真核微細藻類捕食性のプロティスト *Abolliifer globosa* NIES-3697 などに関して、食胞の形成や消化に關わる小胞の蛍光指示薬を用いた顕微鏡下での連続観察をおこなった。[ 柏山, 横山 ]

**5) ユーグレナ藻におけるクロロフィル代謝関連遺伝子の研究:** 複数のクロロフィル代謝経路の存在が示唆される二次植物ユーグレナ藻を材料に、既存の RNA-seq データベースを利用した逆遺伝学的なアプローチからクロロフィル代謝関連遺伝子を探索、機能の解析をおこなった。すなわち、*Euglena gracilis* Z 株の RNAi ノックダウン実験により、クロロフィルサイクルとテトラピロール開環を伴う分解系について検証し、また、他のユーグレナ藻における RNAi ノックダウン実験のメソッドの検討もおこなった。[ 柏山, 中澤, 谷藤 ]

## 4. 研究成果

**1) CPE 代謝は真核生物に遍在するもっとも代表的なクロロフィル分解代謝経路である:** 検証実験をおこなった 8 つの真核生物の主要系統群からの 73 株の捕食性プロティストと微細藻類の二員培養系のうち、全ての主要系統群の 50 株において、捕食に伴う CPE 類の産生が確認された。また、微細藻類の単藻培養系では、4 系統に二次植物(ユーグレナ藻, クロララクニオン藻, 渦鞭毛藻, およびハプト藻)において、細胞内での葉緑体の「解体(Dismantling)」に伴ってクロロフィル類を CPE 類に代謝分解していることが示された。従って、CPE 代謝は、一次植物の系

統群であるアーケプラスチダを除く全ての真核生物の系統群に普遍的に見られる代謝であることが示された。

**2) クロロフィルを無色化合物へ代謝するプロティストも真核生物の複数系統に散在する:** 一方, 23 株の捕食性プロティストと微細藻類の二員培養系からは CPE 類が検出されなかったが, クロロフィルの分解自体はなされていることを示唆する分析結果が得られた。特に, クリプティスタの *Palpitomonas bilix* では, 顕微鏡観察下で餌生物の色素体の色の消失がクロロフィル蛍光の減衰と共に観察されたが, これは CPE 代謝を伴って食胞内に(ないし色素体 Dismantling の場合は細胞質に)暗橙色から茶褐色の顆粒状構造が形成される CPE 代謝のプロセスと対照的である。従って, *P. bilix* などでは, 陸上植物のクロロフィル分解経路 (Phyllobilin/PaO 経路) のように無色の最終代謝産物に至るクロロフィル分解の仕組みが存在していることが示唆された。

**3) 「バクテリア食」とされるプロティストの多くはピコシアノバクテリアを餌として培養できる:** バクテリア食として記載されている微細な捕食性プロティストを, バクテリアサイズ (<2  $\mu\text{m}$ ) の微細なシアノバクテリア (ピコシアノバクテリア) の培養液に植え継ぐと, 多くの場合にピコシアノバクテリアを捕食して増殖できることが分かった。例えば, バクテリア食者として知られるケルコゾア *Paracercomonas* sp. は, *Synechococcus* spp. や *Acaryochloris* sp. など捕食して, バクテリア食時よりも優勢に増殖することが分かった。これらピコシアノバクテリアを捕食する様子は, 顕微鏡観察によって確認された。また, バクテリアで維持培養がなされてきた既存の系統保存株 *Goniomonas pacifica* NIES-1372 などにおいても, *Synechococcus* の捕食と有意な増殖が確認された。さらに, これら顕在的なピコシアノバクテリア食者については, 典型的に CPE 代謝が確認され, クロロフィルの代謝能力を維持していることが示された。

**4) CPE 代謝をおこなう *Paracercomonas* sp. ではシアノバクテリア食時に特異的な遺伝子発現プロファイル変化がおきる:** *Paracercomonas* sp. KMO002 株の二員培養株における発現遺伝子解析をおこなった。すなわち, シアノバクテリア捕食株と非光合成バクテリア捕食株との比較トランスクリプトーム解析を試みた。非光合成バクテリア捕食時には, 飢餓応答を示唆する脂質代謝やオートファジー関連の遺伝子の発現量の上昇が認められ, 細胞内における窒素リソースの枯渇が起きている可能性が考えられた。一方, シアノバクテリア捕食時では, 活性酸素種などによるストレスに応答する遺伝子の発現量の上昇が確認され, クロロフィルを含有して活性酸素の発生のリスクを伴う餌に対応

するための分子レベルでの応答が示唆された。

**5) 食胞内のクロロフィル代謝に連動した酸性小胞形成が確認された:** 珪藻捕食性ケルコゾア *Abollifer globosa* の食作用の過程では, 餌の珪藻 *Skeletonema* sp. が細胞内に取り込まれた後, 珪藻の色素体クロロフィル蛍光が *A. globosa* の核近傍から外縁に向けて順に消失する様子が観察された。LysoSensor™ 染色下での蛍光観察をおこなったところ, クロロフィル蛍光消失の進行に伴って, 酸性小胞示す強い蛍光が核周辺部を中心に観察されることが分かった。このようなクロロフィル蛍光の消失と酸性小胞の形成が同調的に進行する様子は, 顕微鏡下で *Paracercomonas* sp. KMO002 株などでも確認することができた。

**6) ユーグレナ藻の二次葉緑体にクロロフィルサイクルが保存されている:** まず, *Euglena gracilis* Z 株に関して, 既存の mRNA 配列のデータベースから, 陸上植物のクロロフィル代謝酵素のうち, Chlorophyll *a* より下流側の分解系に至る酵素群の配列との相同性検索をおこなったところ, クロロフィルサイクルの 3 過程に関わる CAO, CBR, および HCAR, およびテトラピロール環の開環に関与する PAO に相同性を示す配列が見つかったが, マグネシウムの脱錯化に関わると考えられている SGR などの重要な遺伝子に相同な配列は存在しなかった。そのうち, 無色の代謝産物を生じる過程で不可欠な PAO に相同性の遺伝子について RNAi ノックダウン実験をおこなったが, 実際の PAO 活性を確認することはできなかった。一方, クロロフィルサイクルにおいて Chlorophyll *a* を Chlorophyll *b* に酸化する二段階の反応を触媒する酵素 CAO の遺伝子に高い相同性を示す「*E. gracilis* CAO like gene (*EgCAOL*)」について RNAi によるノックダウン実験をおこなったところ, は Chlorophyll *b* をほとんど含有しないノックダウン株が得られたため, *EgCAOL* が実際に CAO 活性を有すると考えられた。一方, ノックダウン後の数日は, バッチカルチャー内で Chlorophyll *b* の絶対量の有意な減少が認められ, Chlorophyll *b* を Chlorophyll *a* に還元するクロロフィルサイクルの残りの代謝経路の活性が存在していることが示唆された。このうち, 2 段階目の還元反応を触媒する HCAR に関しては, 相同性の高い遺伝子 (*EgHCARL*) が確認されたが, 1 段階目の CBR に関しては, 分子系統的に陸上植物のそれらに類縁性の高い配列は見つけることができなかった。また, *EgCAOL* と *EgHCARL* に高い相同性を示す遺伝子は *Eutreptiella* 属の mRNA 配列データベースからも見出され, ユーグレナ藻の二次葉緑体獲得過程を通して緑色植物から引き継がれたことが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Y. Kashiya, A. Yokoyama, A. Yabuki, M. Nakazawa, G. Tanifuji, *et al.* Taming chlorophylls allowed eukaryotes to prosper on the oxygenated Earth. Submitted to *Nature Ecology & Evolution*.

〔学会発表〕(計 16 件)

Y. Kashiya, M. Nakazawa, G. Tanifuji, A. Yokoyama, *et al.* An evolutionary transition of chloroplast degradation in euglenoids: heterotrophic digestion to secondary plastid senescence. *Annual meeting of the International Society of Protistologists*, Moscow, 2016 年 6 月. 口頭 (国際一般)

Y. Kashiya, M. Nakazawa, A. Yokoyama, *et al.* Roles of the metabolism producing cyclophorbide enols in Euglenozoa: an evolution from phycophagic heterotrophs to the secondary plants. *12th International Workshop on Supramolecular Nanoscience of Chemically Programmed Pigments (SNCP18)*, Kusatsu, Shiga, 2016 年 6 月. ポスター (国際一般)

Y. Kashiya, M. Nakazawa, A. Yokoyama, *et al.* Roles of the metabolism producing cyclophorbide enols in Euglenozoa: an evolution from phycophagic heterotrophs to the secondary plants. *Tetrapyrroles, Chemistry & Biology of Gordon Research Conference*, Newport, USA, 2016 年 7 月. ポスター (国際一般)

柏山祐一郎, 横山亜紀子, 民秋均. クロロフィルを制する者が光環境を征した - クロロフィルの分解代謝と二次植物の進化. *日本進化学会第 18 回東京大会*, 東京工業大学 (東京), 2016 年 8 月. 口頭 (招待)

柏山祐一郎, 横山亜紀子, 民秋均. 真核生物に広く共有されるクロロフィル無毒化代謝機構とその藻類進化との関わり. *日本植物学会第 80 回沖縄大会*, 沖縄コンベンションセンター (沖縄), 2016 年 9 月. 口頭 (招待)

柏山祐一郎, 横山亜紀子, 民秋均. 真核生物の繁栄を可能たらしめたクロロフィルの無毒化代謝. 第 49 回 *日本原生生物学会 岡山大会 原生生物若手の会*, 岡山大学 (岡山), 2016 年 10 月. 口頭 (基調)

Y. Kashiya, *et al.* A phagocytosis-associated pan-eukaryotic chlorophyll degradation metabolism preserved in a secondary plant chlorarachniophytes. *The 9th Asia Pacific Conference on Algal Biotechnology*, Bangkok, Thailand, 2016 年 11 月. ポスター (国際一般)

加山基, 柏山祐一郎. 微細藻類食 *Paracercomonas* sp. KMO002 株のクロロフィル分解代謝に関する研究. *日本藻類学会第 41 回大会*, 高知大学, 2017 年 3 月, ポスター (一般)

松田知樹, 加山基, 柏山祐一郎. シアノバクテ

リア食 *Heterolobosea* アメーバの研究. *日本藻類学会第 41 回大会*, 高知大学, 2017 年 3 月. ポスター (一般)

M. Kayama, G. Tanifuji, Y. Yazaki, Y. Kashiya. The chlorophyll catabolism in a phycophagic cercozoan *Paracercomonas* sp. Strain KMO002: exploring a biochemical/molecular biological approach. 第 15 回 *国際原生生物会議*, チェコ, プラハ市, 2017 年 7 月. ポスター (国際一般)

Y. Kashiya. Detoxification catabolism of chlorophylls: a key understanding the early evolution of eukaryotes. *日加先端科学 (JCFoS) シンポジウム*, 沖縄科学技術大学院大学 (沖縄), 2017 年 11 月. ポスター (国際招待)

柏山祐一郎, 中澤昌美, ほか. *Euglena gracilis* の二次葉緑体におけるクロロフィルサイクルとアンテナタンパク質. *日本藻類学会第 42 回大会*, 東北大学 (仙台), 2018 年 3 月. 口頭 (一般)

加山基, 谷藤吾朗, 矢崎裕規, 柏山祐一郎. *Paracercomonas* sp. KMO002 株のシアノバクテリア捕食に伴う遺伝子発現変化. *日本藻類学会第 42 回大会*, 東北大学 (仙台), 2018 年 3 月. ポスター (一般)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等:

<http://bnei-amateras.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柏山 祐一郎 (Kashiya, Yuichiro)  
福井工業大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号: 00611782

### (2) 研究分担者

谷藤 吾朗 (Tanifuji, Goro)  
国立科学博物館・動物研究部・研究員  
研究者番号: 70438480

中澤 昌美 (Nakazawa, Masami)  
大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教  
研究者番号: 90343417

矢吹 彬憲 (Yabuki, Akinori)  
海洋研究開発機構・海洋生物多様性分野・研究員  
研究者番号: 20711104

横山 亜紀子 (Yokoyama, Akiko)  
国立環境研究所・地域環境研究センター・特別研究員  
研究者番号: 30466601