

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06300

研究課題名(和文) 安全な細胞生長・分裂の基盤としての代謝変動日周リズムの解明

研究課題名(英文) Studies on diel changes in metabolic pathways for safe cell growth and division in photosynthetic eukaryotes

研究代表者

藤原 崇之 (Fujiwara, Takayuki)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・助教

研究者番号：10595151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：光合成真核生物は、葉緑体の獲得により高効率なエネルギー変換を可能としたが、光合成のための基質の供給や産物の利用(代謝フロー)がうまく回転しなければ、光化学系から活性酸素が発生し宿主細胞を傷害する。本研究では、日周と細胞周期の代謝への影響を明確に区別して理解するために、単細胞紅藻の細胞周期変異体を作成し、トランスクリプトーム解析を行った。結果、多くの主要な代謝は細胞周期非依存的に日周変動し、dNTP合成など限られた代謝経路のみが細胞周期に依存することが明らかになった。この遺伝子発現情報は、光合成真核生物が安全に増殖するための機構を解明することにつながる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核藻類は、細胞が分化しないため、同一の細胞で光合成と細胞分裂を行う。また、陸上植物より早く分岐したため、一次植物が成立した当初の特徴をより残している。したがって、植物の祖先細胞が、葉緑体を得て光合成を行うために、どのような生理的・代謝的な基盤を発達させたかを知る手がかりを得やすい。本研究では、真核藻類において、光合成、代謝および細胞周期(生長と分裂)の関係を調べるための遺伝子発現データベースを構築した。この情報は、上記の問題の解明だけでなく、近年再生可能エネルギーの原料として注目される藻類のバイオマス生産の向上のためにも有用である。

研究成果の概要(英文)：Photosynthetic eukaryotes have enabled highly efficient energy conversion through the acquisition of chloroplasts. However, if the supply of substrates and utilization of its products in photosynthesis (metabolic flow) are not rotated properly, reactive oxygen species are generated from the photosystem and damage the host cell. In this study, we produced the cell cycle mutants of unicellular red algae and conducted transcriptome analysis in order to clearly assess and understand the effects of diurnal and cell cycle on metabolism. The results showed that many major metabolic pathways fluctuate diurnally in a cell cycle-independent manner, while only limited metabolic pathways, such as dNTP synthesis, depend on the cell cycle. This gene expression information will lead to the elucidation of the mechanism for the safe growth of photosynthetic eukaryotes.

研究分野：藻類細胞生物学

キーワード：細胞周期 日周 真核光合成生物 単細胞紅藻 トランスクリプトーム 遺伝的改変 モデル藻類

1. 研究開始当初の背景

真核生物は、ミトコンドリアと葉緑体を獲得したことにより、酸素を使った高効率な好気エネルギー変換が可能となった。しかし、これらは活性酸素の主要な発生源ともなり、宿主細胞を傷害する危険性も孕む。とくに光合成においては、その原料(C、PやN)の供給と産物の利用を適切に行わなければ(光合成を行うための代謝フロー)、光エネルギーは光合成に回らず、活性酸素種を発生させる。しかも自然環境には昼夜があり、光合成と関連する代謝フローは一定ではない。さらに細胞周期という細胞の変化を伴うサイクルと代謝フローとの関連は明らかになっていない。このような変動する外部および内部環境において、代謝がどのように変化あるいは制御されて、安全に増殖するのかという、真核光合成生物の存立において重要な問題は必ずしも明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、まず、日周(昼夜)および細胞周期に依存する代謝変動を明確に区別し、両者の代謝への影響を調べるためのデータベースを構築することである。

3. 研究の方法

真核単細胞藻類は、ゲノムや細胞構造が比較的単純である。そして、陸上植物と異なり、組織や器官への細胞分化もなく、光合成と細胞分裂を同一の細胞で行う。また、それぞれの細胞を取り巻く培養環境(光、pH、温度、栄養塩類等)が殆ど一様である。これらによって、細胞の種類と培養条件が均一な細胞集団を得ることが出来る。このような特徴から真核藻類は真核光合成生物に共通した現象を解析する上で最適である。その中でも単細胞紅藻シアニディオシゾン・メロラエ(シゾン)は、ゲノムや細胞構造が極めて単純であり、オミクス解析を低コストで行うことが出来る。また、代表者らが様々な遺伝的改変技術を開発してきたことにより、多種の実験が可能となっている。

代謝変動の全体像を捉えるために、高感度DNAマイクロアレイによって、日周のトランスクリプトーム解析を行い、代謝関連遺伝子の変動を抽出した。次に細胞周期に依存する代謝変動を抽出するための実験系を構築した。多くの藻類においては、日周と細胞周期が連結していることから(昼に光合成によって生長し、夜間に細胞分裂を行う)日周と細胞周期による代謝への影響を区別することが不可能である。そこで、細胞周期におけるG1/Sの移行に必須なサイクリン依存性キナーゼCDKAに遺伝的改変を施し(CDKA-cKD株)、条件的に細胞周期進行を停止させる仕掛けを施した(図1)。これにより、細胞周期に依存する代謝遺伝子の発現および変動が特異的に抑えられ、日周の影響と区別することが可能となった。また並行して、G1/S移行における負の制御因子であるRetinoblastoma-family protein(RB)をノックアウトすること(RB-KO株)で、明暗周期下のどの時間帯でも一定の割合で細胞分裂が起こる培養系を構築した。そして、CDKA-cKD株の実験結果と比較した(図2)。

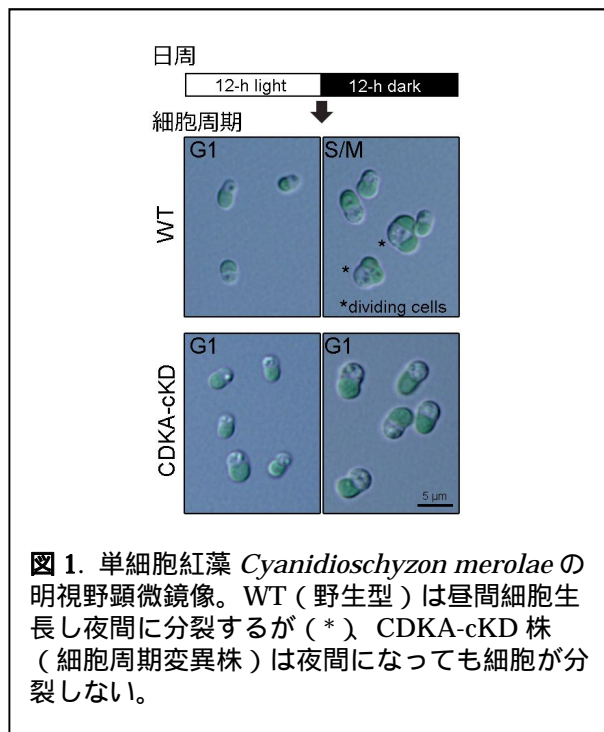


図1. 単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* の明視野顕微鏡像。WT(野生型)は昼間細胞生長し夜間に分裂するが(*), CDKA-cKD株(細胞周期変異株)は夜間になっても細胞が分裂しない。

4. 研究成果

シゾン野生型(WT)の日周(12時間毎の明暗周期培養)におけるトランスクリプトーム解析の結果、約1979遺伝子(シゾンの全タンパク質遺伝子4775個のうちの、42%、発現比2倍以上)が24時間リズムを示した。この遺伝子群の中から代謝関連遺伝子の変動を抽出するために、KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)エンリッチメント解析を行った。その結果、昼間には、多くの主要代謝経路(carbohydrate, energy, lipid, amino acid, vitamin metabolismなど)の遺伝子の発現が高くなり、一方で夜間には殆どの代謝関連遺伝子の発現は低下していた。夜間に発現が上昇するのは、デンプン分解やdNTP新生経路に関連する遺伝子群に限られていた。これは藻細胞が昼間光合成によって生長するが、夜間は生長せず貯蔵した光合成

産物を利用して恒常性を保つ、あるいは細胞周期進行を行うことを反映した結果となった。

次に CDKA-cKD 株と RB-KO 株を WT と同様に 12 時間毎の明暗周期下で培養し、比較トランスクリプトーム解析を行った。その結果、期待した通り、細胞核 DNA 複製や細胞周期進行に関連する遺伝子の発現は抑制された。一方で、光化学系に関連する遺伝子の発現パターンは、どの株でも同様であった。このように細胞周期に依存して日周変動する遺伝子を 454 個、細胞周期非依存的に日周変動する遺伝子を 1525 個、同定することに成功した(図 3)。そこで、細胞周期に依存する代謝関連遺伝子がどの程度存在するかを調べるために KEGG エンリッチメント解析を行った結果、細胞周期に依存する主要代謝系の遺伝子数は有意に減少しており、細胞周期に依存する遺伝子は、デンプン分解系に関連する遺伝子の一部と dNTP 新生の重要な遺伝子など一部の遺伝子のみであった。

デンプン分解系の遺伝子は、細胞周期依存的に日周に依存するものと、細胞周期非依存的に日周に依存するものの 2 つに分けられた。これは、光合成を行うことの出来ない夜間に解糖系を活性化させてエネルギーを得ること、そして、細胞周期進行(細胞核 DNA 複製と染色体分配、細胞質分裂など)のために必要なエネルギーを付加的に供給していると考えられた。dNTP 複製に関連する遺伝子群の上昇は細胞核 DNA の複製に必須であり、細胞周期に制御されていることは妥当であると考えられた。この他 38 個の細胞周期に依存する代謝関連遺伝子を同定したが、細胞周期進行との機能的関連は不明であり、今後の課題である。

このことから、細胞の維持・生長に必要な基本的な代謝は日周に依存しており、細胞周期はそれらの代謝に積極的には関与しないことが示された。自然環境では、実験室の培養条件とは異なり、貧栄養で且つ生物学的・非生物学的ストレスがあるため、1 日の間に必ず細胞周期が 1 周回るとは限らない。したがって、真核藻類において、基本的な代謝系が日周に依存していることは妥当な結果である。これらのトランスクリプトーム情報は、真核光合成生物の日周と細胞周期における代謝変動を理解するためのデータベースとして *Plant Physiology* に発表された (Fujiwara et al. 2020)。

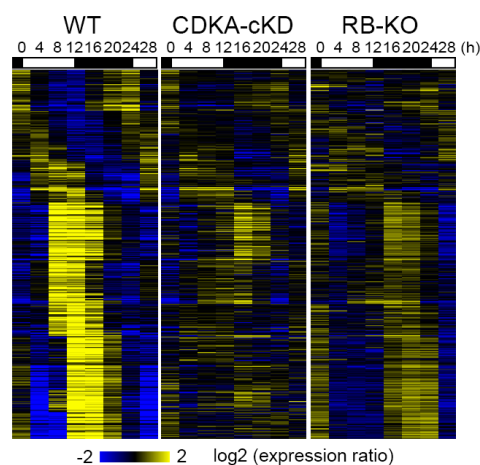


図 2. 日周 (12 時間明暗周期) において 24 時間リズムを示す遺伝子群のヒートマップ。細胞周期に依存して発現変動する遺伝子群は、CDKA-cKD や RB-KO では、その発現パターンが崩れる。

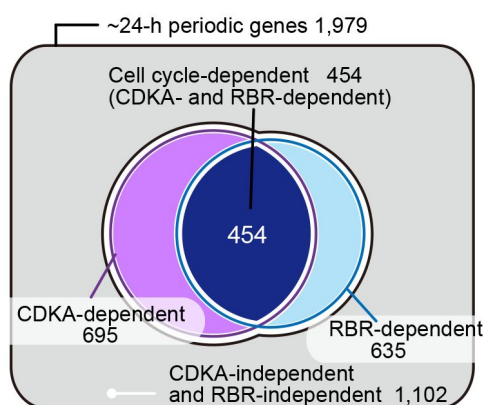


図 3. 細胞周期依存的に日周変動する 454 個の遺伝子と細胞周期非依存的に日周変動する 1525 個の遺伝子。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Fujiwara Takayuki, Hirooka Shunsuke, Mukai Mizuna, Ohbayashi Ryudo, kanesaki Yu, Watanabe Satoru, Miyagishima Shin-ya	4. 巻 3
2. 論文標題 Integration of a Galdieria plasma membrane sugar transporter enables heterotrophic growth of the obligate photoautotrophic red alga Cynanidioschyzon merolae	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Direct	6. 最初と最後の頁 e00134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pld3.134	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 -
1. 著者名 Yagisawa Fumi, Fujiwara Takayuki, Takemura Tokiaki, Kobayashi Yuki, Sumiya Nobuko, Miyagishima Shin-ya, Nakamura Soichi, Imoto Yuuta, Misumi Osami, Tanaka Kan, Kuroiwa Haruko, Kuroiwa Tsuneyoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 ESCRT Machinery Mediates Cytokinetic Abscission in the Unicellular Red Alga Cynanidioschyzon merolae	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 8:169
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2020.00169	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 -
1. 著者名 Ohbayashi Ryudo, Nakamachi Ai, Hatakeyama Tetsuhiro S., Watanabe Satoru, Kanesaki Yu, Chibazakura Taku, Yoshikawa Hirofumi, Miyagishima Shin-ya	4. 巻 10
2. 論文標題 Coordination of Polyploid Chromosome Replication with Cell Size and Growth in a Cyanobacterium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e00510-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mBio.00510-19	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 -
1. 著者名 Fujiwara Takayuki, Hirooka Shunsuke, Mukai Mizuna, Ohbayashi Ryudo, kanesaki Yu, Watanabe Satoru, Miyagishima Shin-ya	4. 巻 3
2. 論文標題 Integration of aGaldieriaplasmamembranesugarttransporter enables heterotrophic growth of the obligate photoautotrophic red algaCynanidioschyzon merolae	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Direct	6. 最初と最後の頁 e00134 ~ e00134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pld3.134	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 -

1. 著者名 Jong Lin Wei, Fujiwara Takayuki, Hirooka Shunsuke, Miyagishima Shin-ya	4. 巻 Online ahead of print
2. 論文標題 Cell size for commitment to cell division and number of successive cell divisions in cyanidiallean red algae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Protoplasma	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00709-021-01628-y	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 -

1. 著者名 Hirooka Shunsuke, Tomita Reiko, Fujiwara Takayuki, Ohnuma Mio, Kuroiwa Haruko, Kuroiwa Tsuneyoshi, Miyagishima Shin-ya	4. 巻 10
2. 論文標題 Efficient open cultivation of cyanidiallean red algae in acidified seawater	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13794
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70398-z	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 -

1. 著者名 Fujiwara Takayuki, Hirooka Shunsuke, Ohbayashi Ryudo, Onuma Ryo, Miyagishima Shin-ya	4. 巻 183
2. 論文標題 Relationship between Cell Cycle and Diel Transcriptomic Changes in Metabolism in a Unicellular Red Alga	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1484 ~ 1501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.20.00469	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 -

1. 著者名 Onuma Ryo, Hirooka Shunsuke, Kanesaki Yu, Fujiwara Takayuki, Yoshikawa Hirofumi, Miyagishima Shin-ya	4. 巻 14
2. 論文標題 Changes in the transcriptome, ploidy, and optimal light intensity of a cryptomonad upon integration into a kleptoplastic dinoflagellate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The ISME Journal	6. 最初と最後の頁 2407 ~ 2423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41396-020-0693-4	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 -

1. 著者名 Miyagishima Shin-ya, Fujiwara Takayuki	4. 巻 85
2. 論文標題 An Inducible and Repressible Gene Expression System in the Unicellular Red Alga <i>Cyanidioschyzon merolae</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 CYTOLOGIA	6. 最初と最後の頁 91 ~ 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1508/cytologia.85.91	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Kuroiwa Tsuneyoshi, Yagisawa Fumi, Fujiwara Takayuki, Inui Yayoi, M. Matsunaga Tomoko, Kato Shoichi, Matsunaga Sachihiko, Nagata Noriko, Imoto Yuuta, Kuroiwa Haruko	4. 巻 85
2. 論文標題 Mitotic Karyotype of the Primitive Red Alga <i>Cyanidioschyzon merolae</i> 10D	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 CYTOLOGIA	6. 最初と最後の頁 107 ~ 113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1508/cytologia.85.107	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 -

1. 著者名 Kuroiwa Tsuneyoshi, Yagisawa Fumi, Fujiwara Takayuki, Misumi Osami, Nagata Noriko, Imoto Yuuta, Yoshida Yamato, Mogi Yuko, Miyagishima Shin-ya, Kuroiwa Haruko	4. 巻 86
2. 論文標題 Smooth Loop-Like Mitochondrial Nucleus in the Primitive Red Alga <i>Cyanidioschyzon merolae</i> Revealed by Drying Treatment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 CYTOLOGIA	6. 最初と最後の頁 89 ~ 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1508/cytologia.86.89	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 藤原崇之, 廣岡俊亮, 大林龍胆, 宮城島進也
2. 発表標題 真核藻類の日周における代謝と細胞周期の時間分業
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤原崇之, 廣岡俊亮, 宮城島進也
2. 発表標題 光合成真核藻類のモデルとしての単細胞紅藻における研究解析技術の開発
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原崇之, 宮城島進也
2. 発表標題 単細胞紅藻シアニディオシゾンにおける細胞分裂制御リズムの翻訳非依存性
3. 学会等名 第27回日本時間生物学会学術大会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takayuki Fujiwara, Shunsuke Hirooka, Shin-ya Miyagishima
2. 発表標題 Temporal arrangement of metabolic pathways and cell cycle progression in eukaryotic algae.
3. 学会等名 2nd International Symposium "Cyanidioschyzon merolae as an arising model for unicellular eukaryotes" (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------