

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16134

研究課題名（和文）巨大単細胞海藻クビレズタにおける翻訳後生体分子の局在解析による形態形成機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of morphogenetic mechanisms based on RNA and protein localization profiles in the giant unicellular alga, *Caulerpa lentillifera*

研究代表者

有本 飛鳥 (Arimoto, Asuka)

広島大学・統合生命科学研究科（理）・助教

研究者番号：00794603

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）：クビレズタは単細胞生物でありながら、1 m 以上に成長し、陸上植物に類似した複雑な形態を作り上げる。本研究では、クビレズタの形態形成機構に関して形態の異なる直立枝と匍匐枝の各部位におけるRNAやタンパク質の局在に着目して研究を行なった。本研究の過程で、解析精度を高めるためにクビレズタの形態変化を抑制する培養方法を確立した。また、直立枝、匍匐枝のどちらの部位においても、RNAとタンパク質のプロファイルを比較した際の類似度は乏しい結果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

巨大単細胞生物であるクビレズタは、複雑な形態の体を多細胞生物とは全く異なる機構で作りに上げていると考えられる。本研究により、クビレズタの形態が異なる各部位（粒状構造のある直立枝、茎状の匍匐枝）におけるRNAとタンパク質の局在について、ある程度の網羅的な情報が得られたことは、巨大単細胞生物の形態形成に関わる分子機構の理解という学術的側面のみならず、形の良さが求められる食用個体の栽培や作出に取り組む際の基盤的な知見となり得る。

研究成果の概要（英文）：Some unicellular organisms reach meters in size and possess complex shapes analogous to land plants. In this study, we compared mRNA and protein profiles in the siphonous macroalga, *Caulerpa lentillifera*. The comparison between two different structures was expected to address the molecular mechanisms regulating morphogenesis of the giant unicellular organism. We developed a cultivation method to suppress unintentional morphological changes of the alga. The method enables to improve experimental reproducibility of the study. The results from our analysis showed a limited correspondence between profiles of mRNA and protein even in the same part.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：形態形成 緑藻 多核嚢状体 セントラルドグマ RNA局在 タンパク質局在

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

単細胞生物には、数メートルに成長し、多細胞生物に類似した複雑な形態を作り上げる種が存在する。そのような巨大単細胞生物の体内は、物理的に区切られておらず、単一の細胞のみで複雑な形態の体を構築できるという事実は、驚くべきことである。この形態形成の方式は、多様な性質の細胞を有機的に多数集積することで、多細胞生物が巨大かつ複雑な形態の体を作り上げることと対照的である。このような両者の違いから、巨大単細胞生物の形態形成には、多細胞生物とは異なる形態形成のメカニズムが関与していると示唆されるが、その分子機構には不明な点が多く残されている。

本研究では、「海ぶどう」の名称で食用海藻として広く知られているクビレズタ *Caulerpa lentillifera* を用いた。本種は、陸上植物の根、葉、茎に類似したツタ状の形態を示すが、巨大単細胞生物の典型的な細胞構造を備えているため、その体内は細胞膜や細胞壁などで物理的に区切られていない。このような巨大単細胞生物であっても、形態の異なる各部位を作り上げるためには、多細胞生物と同様に特定の RNA が各部位に局在する必要があることが、我々や他の研究グループによって示唆されていた (Ranjan et al., 2015, *PLoS Genet*, doi: 10.1371/journal.pgen.100490; Arimoto et al., 2019, *Dev Growth Diff*, doi: 10.1111/dgd.12634)。しかし、RNA はタンパク質に翻訳された後に生物学的機能を果たすことが多く、各部位に局在している RNA がタンパク質に翻訳された後も同じ場所にとどまり続けて形態形成に関与するのか、ということに関しては十分な理解が得られていなかった。

## 2. 研究の目的

上記のような研究背景において、本研究ではクビレズタの形態が異なる各部位に局在している RNA が翻訳されてタンパク質となった後も同部位に留まり続けるのかを明らかにすることを目的とした。また、RNA とタンパク質の局在が異なる場合において、そのタンパク質が翻訳される部位の特定も目指した。

## 3. 研究の方法

本研究に先立って、研究代表者らは、クビレズタの全ゲノムを解読し、染色体レベルに準ずる連続性を持つゲノム配列と、それを参照した遺伝子モデルを得ることに成功していた。本研究では、これらの情報を基盤として次世代シーケンズデータおよび質量分析データの解析を行った。

### (1) RNA とタンパク質の局在部位の比較

形態が明瞭に異なるクビレズタの直立枝 (以下、粒状部と表記) と匍匐枝 (以下、莖状部と表記) の小片を、それぞれ NucleoSpin TriPrep キット (タカラバイオ社) に同梱された組織溶解試薬中で破碎し、組織破碎液を得た。この組織破碎液に含まれる mRNA は、キットの標準手法にしたがって精製した。微量 mRNA から Illumina 社シーケンサーに対応した次世代シーケンズライブラリを構築する手法 (Foley et al., 2019, *Genome Res*, doi: 10.1101/gr.234807.118) によって、精製した各部位の mRNA

から次世代シーケンスライブラリを構築した。組織破砕液に含まれるタンパク質は、メタノール/クロロホルム抽出を行い、回収した沈殿物は、8 M 尿素で可溶化した後、還元、アルキル化、トリプシン消化を行い、カラムで精製後、nano-LC/MS によるショットガン方式の質量分析に供した。

得られた各種のデータは、クビレズタの遺伝子モデルと比較し、クビレズタと共存する他生物由来のデータを除去した。これらのクビレズタに由来する可能性が高い RNA とタンパク質の各データセットを比較解析し、各部位における RNA とタンパク質の局在状況を得た。

## (2) 各種のタンパク質が RNA から翻訳される部位の特定

RNA からタンパク質を翻訳するリボソームの構成要素であるリボソーム RNA を認識する抗体を用いて、タンパク質に翻訳中の RNA を各部位から単離し、先述した解析で得られた RNA やタンパク質のレパートリーと比較することで、各種のタンパク質が翻訳される部位の特定を目指した。タンパク質に翻訳中の RNA は、リボソームと複合体を形成しているため、当該 RNA はリボソームを認識する抗体の免疫沈降などで選択的に回収できる。本研究では、抗体をビオチン分子で標識し、ビオチン分子と強固かつ特異的に結合するストレプトアビジンを固定した磁気ビーズを用いることで翻訳中 RNA の回収を試みた。組織溶解試薬やビーズ洗浄液などは先行研究にしたがった (Metz et al., 2021, *bioRxiv*, doi: 10.1101/819094; Metz et al., 2022, *Sci Rep*, doi: 10.1038/s41598-022-09638-3)。得られた RNA は、組織破砕液から精製した他の mRNA に適用した次世代シーケンス手法を用いて網羅的に同定できると考えられた。

## 4. 研究成果

### (1) クビレズタの管理

クビレズタの各部位の形態を規定する要因を探るためには、形態が安定して維持されている個体を用いることが必要である。しかしながら、クビレズタでは、栄養条件の変化や障害応答によって、粒状部が脱落して莖状部のみになる、莖状部から粒状部が突出する、粒状部から莖状部が形成される、などの形態変化が頻繁に生じる。特に莖状部から粒状部が突出する変化は、前触れなく生じる。この問題を解決するため、本研究ではクビレズタの形態変化の管理を試みた。その結果、粒状部が 5 cm 以上、莖状部が 10 cm 以上の大きさに成長した個体を、5  $\mu$ m の目合いのフィルターで濾過した自然海水中に静置し、弱光条件で明期と暗期を 12 時間ずつとして培養することで、粒状部や莖状部の新規形成や形態変化を抑制することが可能となった。

### (2) RNA とタンパク質の局在部位の比較

上記のように形態変化を管理した個体から RNA とタンパク質を抽出し、形態が異なる各部位について各種分子の局在プロファイルの解析を行なった。過去に実施状況報告書で言及したように微量サンプルからの測定試料調製であったものの、RNA、タンパク質ともに測定に十分な量が得られた。しかし、質量分析によって検出されるタンパク質のレパートリーには精製方法の違いに起因すると考えられる影響が見られた。また、RNA とタンパク質のプロファイルは共通性が乏しく、RNA としては存在量が多いもの

のタンパク質がほとんど検出されない遺伝子が多数見られた。この結果は、本研究で実施したいずれの調製方法においても、タンパク質が十分に可溶化できていないことを反映している可能性が高い。そこで現在は、タンパク質を沈殿させずに精製可能な方法の検討を進めている。

### (3) 各種のタンパク質が RNA から翻訳される部位の特定

クビレズタの各部位に含まれるリボソーム結合 RNA の単離については、当初の想定よりも標的分子が少ないという問題点があったものの、次世代シーケン斯拉イブラリを構築するための条件検討を行い、解析の実施に一定の目処をつけることができた。しかしながら、先述した RNA とタンパク質のプロファイル比較におけるプロファイルの不整合の検証と問題解決に注力したため、各部位におけるリボソーム結合 RNA を網羅的に同定し、各種タンパク質の翻訳が生じる部位を特定するには至らなかった。今後は、本研究での条件検討に基づいて各部位に由来するリボソーム結合 RNA の次世代シーケン斯拉イブラリの構築を行い、リボソーム結合 RNA プロファイルの取得を試みる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 有本 飛鳥	4. 巻 56
2. 論文標題 単細胞生物海ぶどうのゲノム研究:単細胞の陸上植物は作れるか	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 植物の生長調節	6. 最初と最後の頁 51 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18978/jscrp.56.1_51	査読の有無 無
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0件

〔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
研究協力者	西辻 光希  (Nishitsuji Koki)  (60770823)	沖縄科学技術大学院大学・マリンゲノミクスユニット・研究員    (38005)	

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