

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03282

研究課題名（和文）緑藻の紫外線応答・耐性の分子基盤から紐解く光合成生物の陸上進出

研究課題名（英文）Unveiling the terrestrialization of photosynthetic organisms through understanding the molecular basis of UV response and tolerance in green algae

研究代表者

得津 隆太郎（Tokutsu, Ryutaro）

京都大学・理学研究科・特定准教授

研究者番号：60613940

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では緑藻を用い、その紫外線応答・耐性の分子メカニズムの解明を進めた。研究成果として、緑藻の紫外線応答遺伝子を利用し、生物発光を指標とした大規模スクリーニング系を構築した。また、このスクリーニング系を用いて2万以上の以上の形質転換体のスクリーニングを完了し、興味深い表現型を示す変異体を複数取得した。これに加えて、紫外線応答に伴うゲノムワイドな遺伝子転写量、転写開始点変化の解析を行うことで、緑藻における紫外線応答に特化した転写量・転写開始点変化を示す遺伝子群のカタログ化を完了した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では「光合成生物の陸上進出（ブレイクスルー）の謎に迫るため、水圏光合成生物における紫外線（UV-A）応答・耐性因子を探索した。これにより、いくつかの水圏特異的に紫外線応答反応がわかり、またその因子が見出された。これらの結果は、水圏緑藻が陸上植物とは異なる紫外線適応を獲得した、あるいは植物が陸上化の過程で水圏型紫外線応答を進化させた可能性を示唆している。本研究により、紫外線応答の観点から光合成生物の陸上進出の進化過程を紐解く研究基盤が整いつつあり、今後はより詳細な分子機構を解明していくことで、その全容が明らかになることが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study used green algae to explore the molecular mechanisms governing their UV response and tolerance. Initially, we developed a large-scale screening system employing a UV-responsive gene from the green alga *Chlamydomonas*. Through this screening system, we screened over 20,000 transformants and identified several mutants exhibiting intriguing phenotypes. Additionally, by analyzing genome-wide changes in gene transcription levels and transcription start sites linked to UV response, we compiled a catalog of gene sets displaying UV-responsive transcription levels and site-specific modifications specific to the green alga.

研究分野：植物分子・生理学

キーワード：紫外線応答 水圏緑藻

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々が普段目にする陸上植物は、どのようにして陸上に進出できたのだろうか。現存する陸上植物と、その共通祖先に近い緑藻類との大きな違いは乾燥・重力耐性の獲得にあるが、それらは陸上化後に段階的に強化された形質であり、陸上化の第一歩を可能にした要因は分かっていない。植物の陸上化の始まりは5億年ほど前と考えられている。それまでの地球環境の変化に着目すると、酸素発生型光合成の誕生により大気中の酸素濃度が上昇し、オゾン層が形成されたため、生物(核酸)にとって危険な紫外線(UV-B/C)は地表から大幅に減少した。しかし、紫外線全てが排除されたわけではない。そのため、生物が陸上に進出するためには、まず地表・水中まで到達する紫外線(UV-A)への耐性を獲得する必要があったと予想できる。これまでの研究から、陸上植物ではクチクラ形成により紫外線(および乾燥)耐性を強化したとされているが、紫外線応答・耐性の獲得起源を説明できるものではない。さらに、水圏藻類に関する紫外線応答因子の知見は乏しく、その存在・機能については殆ど分かっていない。したがって、これらの水圏藻類における紫外線応答因子の発見、機能解析が光合成生物の陸上進出のきっかけを解き明かす鍵となる。

### 2. 研究の目的

前述した背景に基づき、本研究では「光合成生物の陸上進出(ブレイクスルー)の謎に迫るため、水圏光合成生物における紫外線(UV-A)応答・耐性因子の探索・同定を目的とした。具体的には、陸上植物と共通祖先を持ち地球上のあらゆる場所(水中のみならず地中・氷中)に生息する“部分的に陸上化を果たした光合成生物”とも言える緑藻(*Chlamydomonas*)種を用い、その紫外線応答・耐性の分子メカニズムの解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

前述の目的の達成のため、後述する緑藻のUV-A応答型バイオマーカーを利用した大規模スクリーニングにより、新規の紫外線応答・耐性因子の発見、機能解析を計画した。具体的には、下記の4点の方法・工程を進めた。

#### 1. 緑藻への変異導入条件の検討

順遺伝学的スクリーニングを開始する前に、形質転換体選抜のための抗生物質耐性マーカーの導入濃度・手法を検討した。具体的には、形質転換後にサザンブロット法によりゲノム上の耐性マーカー数を確認し、1マーカー/1ゲノムとなる理想的なマーカー導入法を確立した。

#### 2. 大規模スクリーニングの開始および変異体のクラス分け

形質転換体数を2万株(1000株/月)作出し、SR1-Luciferase生物発光の表現型から紫外線応答の不良・過剰応答にクラス分けした変異体プールを構築した。

#### 3. RESDA-PCR法による変異カ所の同定および相補株の作成

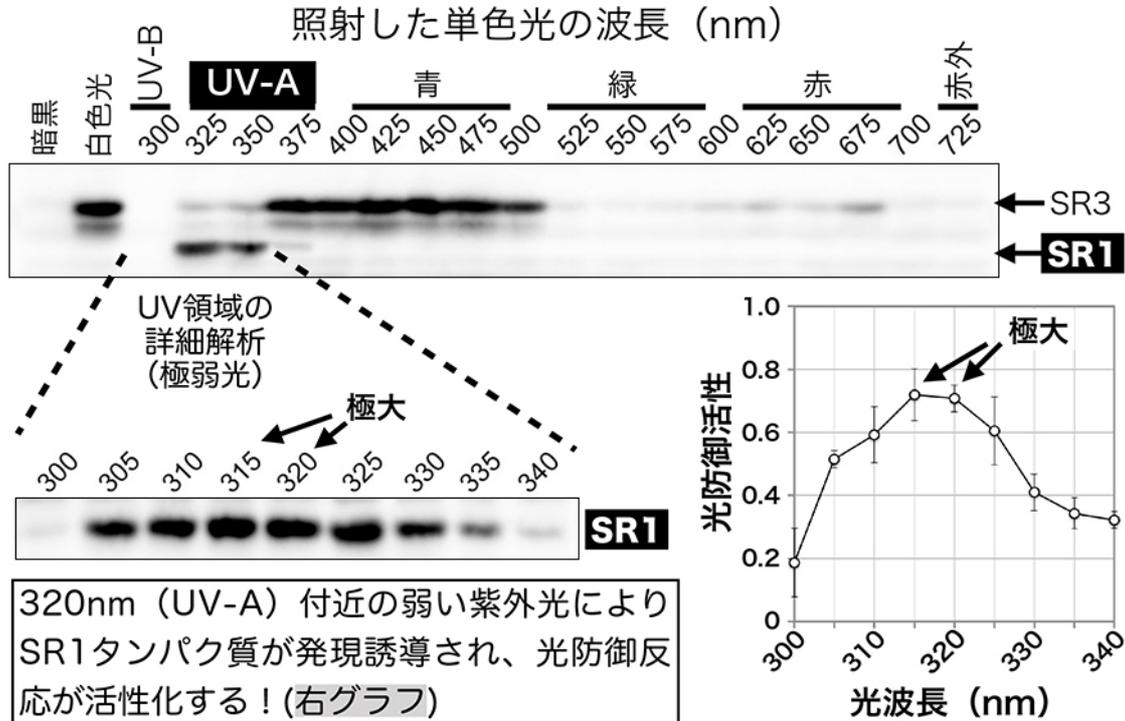
ゲノム上の制限酵素配列を利用したRESDA-PCR法(González-Ballester et al. 2005)により、上記実験2でクラス分けした変異の原因遺伝子を同定した。紫外線応答の不良変異株を中心に相補株を作成し、紫外線センサー・耐性因子の同定を試みた。

#### 4. 紫外線応答の変異による生育・光防御表現型の精査

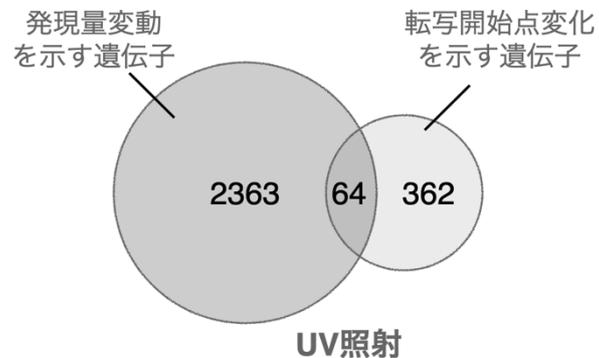
一部の変異体については、変異の同定・相補の完了の後、様々な光環境下における生育・光防御表現型を精査し、紫外線応答因子の生理学的意義を明らかにした。

#### 4. 研究成果

前述の方法・工程のうち、1-3については完了し、4については一部の変異体について原因遺伝子およびその表現型解析を完了した。具体的には、緑藻における紫外線センサーを同定し、光防御反応における役割と、その応答性について陸上植物型紫外線センサーとの違いを考察し(下図)、それらについて国際学術誌に投稿・掲載に至った (Tokutsu et al. 2021, Plant Physiology)。



また、2020年度の先進ゲノム支援課題として採択されたことにより、紫外線照射に伴う緑藻の発現変動遺伝子群のカタログ化を完了した。これに加えて、研究期間内の異動に伴い、転写開始点制御を専門とする研究室の所属したことで、紫外線照射に伴う緑藻の転写開始点変動遺伝子群のカタログ化も完了した (右図)。



これにより、当初の研究計画で着目していた遺伝子転写量の変動のみならず、転写開始点が変わる遺伝子まで範囲を拡大しつつ、緑藻の紫外線応答機構の探索が可能となった。本研究成果は、紫外線応答の観点から光合成生物の陸上進出の進化過程を紐解く研究基盤を提供するものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Yamasaki, T., Tokutsu, R., Sawa, H., Razali, N.N.B., Hayashi, M., Minagawa, J.	4. 巻 120
2. 論文標題 Small RNA-mediated silencing of phototropin suppresses the induction of photoprotection in the green alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.	6. 最初と最後の頁 e2302185120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2302185120	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 Tokutsu Ryutaro, Fujimura-Kamada Konomi, Yamasaki Tomohito, Okajima Keisuke, Minagawa Jun	4. 巻 185
2. 論文標題 UV-A/B radiation rapidly activates photoprotective mechanisms in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1894 ~ 1902
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiab004	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2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎 朋人 , 得津 隆太郎 , 皆 川 純
2. 発表標題 小分子RNAを介したフォトトロピンのサイレンシングはクラミドモナスにおける光防御誘導を抑制する
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 得津 隆太郎
2. 発表標題 葉緑体の防御反応から見た光シグナル伝達の多様性
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会（招待講演）
4. 発表年 2020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
---------	---------