

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06726

研究課題名(和文) 珪藻シリカ細胞壁の形態可塑性を司る遺伝的因子の探索

研究課題名(英文) In search for genetic factors controlling morphological plasticity of diatom cell wall

研究代表者

佐藤 晋也 (Sato, Shinya)

福井県立大学・海洋生物資源学部・教授

研究者番号：80709163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：珪藻 *Pleurosira laevis* のシリカ細胞壁形成における塩分の影響について検証した結果、平坦な殻とドーム状の殻がそれぞれ塩分2%と7%を境に可塑的に変化することが分かった。トランスクリプトーム解析の結果、塩分2%ではメカノセンシティブイオンチャネル遺伝子が発現上昇し、Ca<sup>2+</sup> ATPaseの発現が下降していた。さらに、Ca<sup>2+</sup>に依存した膜-アクチンフィラメントの結合を仲介するアネキシン遺伝子と、アクチンフィラメントの伸長や架橋形成に関わるArp2/3遺伝子が塩分2%で発現上昇していた。これにより、珪藻が塩分変化を受けて細胞壁を形成する際のモデルを新たに提唱することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

珪藻はシリカでできた頑強な細胞壁(殻)をもつ。殻は立体的かつ緻密で微細な構造をもつが、その形態形成がどのような遺伝的メカニズムにより制御されているのかは不明であった。本研究では珪藻プレウロシラの培養実験から、この珪藻が塩濃度の変化に応じて殻面が平らなものとドーム状の2種類の形態を使い分けることを明らかにした。これら2種類の形態を形成する際の遺伝子発現パターンを比較することで、形態形成に關与する遺伝子を明らかにした。この知見は、立体的なシリカ細胞壁の形作りの謎を解くヒントになるだけでなく、人工的なナノレベル造形による微細回路やナノマシン作成といった技術開発にも寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The effect of salinity on the cell wall formation in the diatom *Pleurosira laevis* was investigated. We revealed that the flat and dome-shaped valves exhibited plastic changes at a salinity of 2‰ and 7‰, respectively. Transcriptome analysis showed that the expression of mechanosensitive ion channel genes was up-regulated, while Ca<sup>2+</sup> ATPase was down-regulated at a salinity of 2‰. Furthermore, genes involved in the binding of the membrane to actin filaments, such as annexin genes, and genes involved in actin filament elongation and cross-linking, such as Arp2/3 genes, showed up-regulation at salinity 2‰. Based on these findings, a new model was proposed to describe the formation of the cell wall in diatoms in response to changes in salinity.

研究分野：藻類学

キーワード：珪藻 細胞壁 可塑性 遺伝子発現 塩分 シリカ バイオミネラリゼーション

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

珪藻はシリカでできた細胞壁をもつ真核性単細胞藻類である。その細胞壁は複雑な輪郭や規則正しい緻密な模様をもち、種分類は細胞壁形態をもとに行われることから 10 万種以上が存在すると見積もられている。珪藻の細胞壁はシャーレの上下のように 2 つのパーツからなる。分裂前に母細胞の内側に新たな細胞壁が形成され、分裂の際に母細胞由来の細胞壁の半分と新たな細胞壁の半分がそれぞれ向かい合い娘細胞となる。珪藻の細胞壁形成の過程を形態学的に明らかにする試みは古くからなされていた。また主に各種阻害剤を用いた実験から、シリカ細胞壁の輪郭や装飾構造の形成に細胞骨格が関与している可能性が示唆されていた。さらに、シリカ沈着機構については生化学的・分子生物学的観点からの研究が近年急速に進展しており、例えば環境中の珪酸(珪藻シリカ細胞壁の原料)を細胞内に取り込む輸送体の同定や、試験管内で珪酸の水溶液と長鎖ポリアミンやシラフィンといった珪藻細胞壁から抽出したタンパクを混ぜることで、ごく小さなシリカ粒子が生成されることが分かっていた。ただ、珪藻が細胞内でどのように 1 次元の遺伝情報であるゲノムから 3 次元の複雑な形のシリカ細胞壁を作り上げるのかという「問い」に対しては、研究開始当初の時点では手がかりさえ得られていなかった。

### 2. 研究の目的

珪藻がどのようにシリカ細胞壁を形成するのか、という点については未だ謎が多い。これまで試験管内での生化学的アプローチや、細胞内における形態形成を顕微鏡観察により明らかにする研究は行われてきているものの、これまでのところ試験管内で見られるシリカ粒子がどのようにして細胞壁構造になるのか、両者から得られた結果を橋渡しする説明や知見はない。本研究では珪藻細胞壁にみられる複雑で精密な構造がどのように遺伝的に制御されているのか明らかにするため、最適な実験生物を探索し、再現性・定量性を担保可能な実験系を確立したのち、トランスクリプトーム解析により形作りに関与する遺伝子の特定を目指すことを目的とした。

### 3. 研究の方法

塩分の違いにより細胞壁の形態を可塑的に変化させることが示唆されていた *Pleurosira laevis* f. *laevis* と *P. laevis* f. *polymorpha* に着目し、この塩分応答を定量的に明らかにすることとした。まず *P. laevis* の 4 株(沖縄県産: HA-01、福井県産: HA-02、アメリカ産の *P. laevis* f. *laevis*: 4VIII19-1、およびアメリカ産の *P. laevis* f. *polymorpha*: 25VI12-2B) を異なる塩濃度条件下で培養し、形成された被殻を観察、計測した。その結果、いずれの株も塩濃度に応じて眼域の突出しない被殻(*laevis* 型)と突出した被殻(*polymorpha* 型)の両方を形成できることが分かった。さらに、その形態を分ける塩濃度の境界はいずれの株でも塩分 2~7 の間に存在しており、形態の変化は可塑的であった。わずかな塩濃度操作によって細胞壁形態を明瞭に変化させることができるという特徴は、珪藻の形態形成研究において有用である可能性がある。次にこの系を用い、珪藻の立体的な形態の決定に関与する遺伝子を見出すことを目的とし、塩分 2 および 7 で培養した株を用いて比較トランスクリプトーム解析を行った。

### 4. 研究成果

各種塩分条件下にて *Pleurosira laevis* の殻形成と形態タイプを観察したところ、殻の形態変化をもたらす塩分を明確に示すことができた。平らな殻面をもつ *laevis* 型は塩分 2 よりも低い状態で形成され、ドーム状に隆起する *polymorpha* 型は塩分 7 以上で形成された。両者の割合は塩分 3 から 6 にかけて徐々に移行していた。この塩分応答は各地で採集された培養株全てで共通しており、それぞれの生育地における塩分が多様であるにも関わらずよく保存された特徴であることが分かった(図 1)。注目すべきは本種が僅かな塩分変化で顕著な(光学顕微鏡レベルで認識可能な)形態変化を誘発可能なことであり、これは殻形成に関与する遺伝的因子の探索に焦点を当てた実験において理想的な特徴といえる。

そこで、塩分濃度 2 および 7 で培養した *P. laevis* の 2 株を用い、トランスクリプトーム解析を行うことにより *laevis* 型と *polymorpha* 型の殻を形成する際の遺伝子発現パターンを比較した。驚いたことに、塩分に対する応答は塩分条件間よりも株間(すなわち種内)での変動が大きかった(図 2)。このことは、種内で保存される転写応答を明らかにするうえで複数の株を用いた実験が重要であることを示していた。本研究では両株で共通して見られた反応に着目した。

その結果、*laevis* 型を形成する塩分 2 では、メカノセンシティブイオンチャネルをコードする

遺伝子の発現上昇と  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase をコードする遺伝子の発現抑制により、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が高く保たれるよう調節されているというモデルを提唱できた(図3)。すなわち、1) 低浸透圧による膜張力の増大をきっかけとした膜張力依存性の輸送体(メカノセンシティブイオンチャネル)を介した細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の調節、2) 膜接触部位における  $\text{Ca}^{2+}$ 依存性のアネキシンを介してアクチンフィラメントの動態制御、3) アクチンによるシリカ沈着小胞の形状のコントロールと、それに伴う殻形態の変異、という流れである。今後はロックアウトを含む各種培養実験により本仮説を検証することで、珪藻によるシリカ細胞壁形成をより詳細に理解できると期待される。

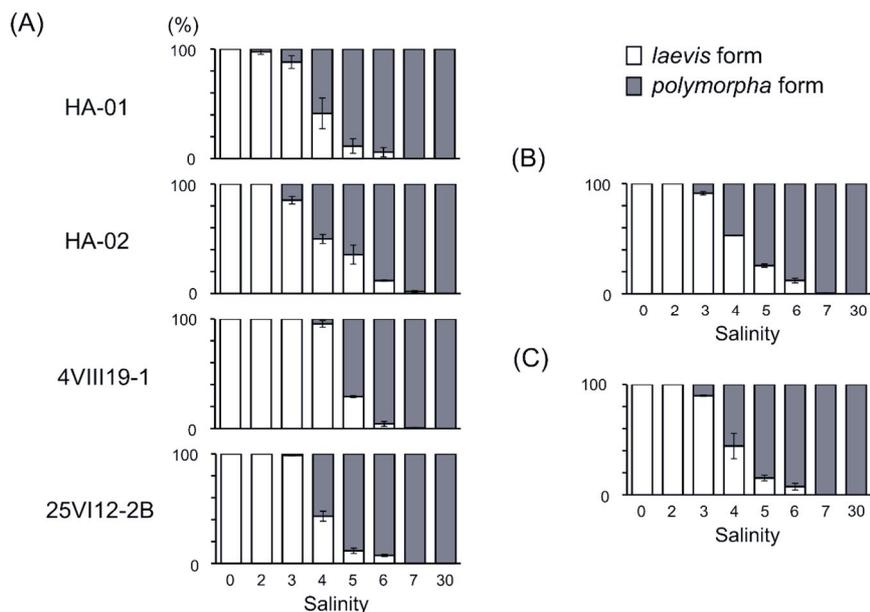


図1. 塩濃度変化に伴う *laevis* 型(白)と *polymorpha* 型(灰)の形成割合の推移。A: 実験に供した4株全てで似た応答を示した。塩分0で前培養した後に20日本培養した結果。B: HA-01株を塩分30で前培養した結果。C: HA-01株を用い、本培養期間を40日に延長した結果。

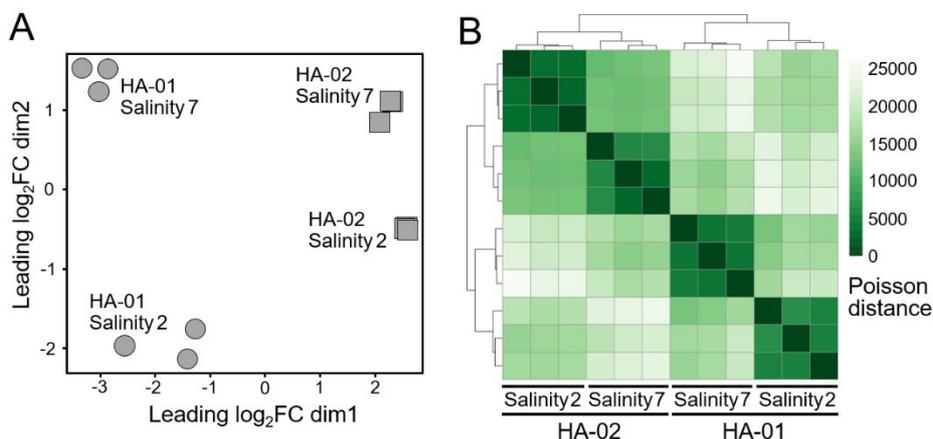


図2. 塩分2と7で培養した培養株(HA-01とHA-02)間における遺伝子発現様式のバリエーション。A: サンプル間で発現変動の大きかった上位500遺伝子を用いたMDSプロット。B: 全遺伝子を用いて比較を行ったヒートマップ。

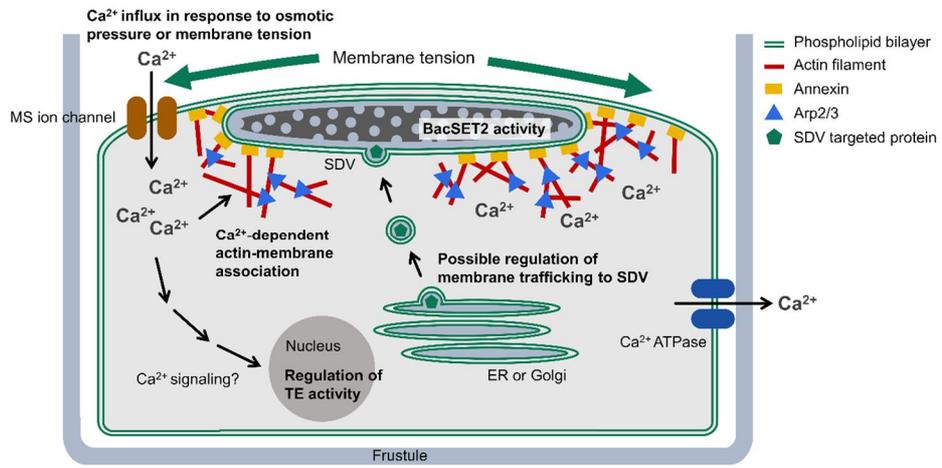


図 3. 珪藻 *Pleurosira laevis* の殻形態の可塑性に関する遺伝子およびカルシウムイオン動態を示した模式図。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kamakura Shiho, Ashworth Matt P., Yamada Kazumasa, Mikami Daichi, Kobayashi Atsushi, Idei Masahiko, Sato Shinya	4. 巻 58
2. 論文標題 Morphological plasticity in response to salinity change in the euryhaline diatom <i>Pleurosira laevis</i> (Bacillariophyta)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Phycology	6. 最初と最後の頁 631 ~ 642
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jpy.13277	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 該当する

1. 著者名 鎌倉史帆、佐藤晋也	4. 巻 54
2. 論文標題 塩濃度の変化に応じた珪藻シリカ細胞壁のしなやかな形態変化	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 314 ~ 317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kamakura S, Masahiko Idei, Shinya Sato
2. 発表標題 Comparative transcriptomics in a centric diatom <i>Pleurosira laevis</i> under two salinity conditions, with reference to stress response and morphological plasticity.
3. 学会等名 The 4th Asian Congress of Protistology (iACOP-IV, Online) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kamakura S, Idei M, Ashworth M & Sato S
2. 発表標題 Comparative morphological and transcriptome analyses of valve plasticity induced under different salinity conditions in a centric diatom <i>Pleurosira laevis</i> .
3. 学会等名 Molecular Life of Diatoms 6th Biennial Meeting. Online. (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kamakura S, Idei M, Ashworth M & Sato S
2. 発表標題 Salinity-related morphological change in a centric diatom <i>Pleurosira laevis</i> .
3. 学会等名 26th International Diatom Symposium. Online. (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤晋也, 鎌倉史帆, 小原隆哉, 馬淵萌恵, 佐藤善輝, 千葉 崇
2. 発表標題 世界初!生きた化石 <i>Pseudopodosira kosugii</i> の単離培養株の確立
3. 学会等名 日本珪藻学会第 41 回研究集会(オンライン開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鎌倉史帆, 出井雅彦, 佐藤晋也
2. 発表標題 珪藻 <i>Pleurosira laevis</i> における塩濃度に依存したシリカ細胞壁形態の可塑的变化
3. 学会等名 日本藻類学会第45回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鎌倉史帆、佐藤晋也
2. 発表標題 珪藻 <i>Pleurosira laevis</i> の立体的な被殻形態を制御する遺伝子発現の探索
3. 学会等名 日本藻類学会第47回大会
4. 発表年 2023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
研究 分担者	山田 和正  (Yamada Kazumasa)  (20778401)	福井県立大学・海洋生物資源学部・助教   (23401)	
研究 分担者	出井 雅彦  (Idei Masahiko)  (60143624)	文教大学・教育学部・教授   (32408)	

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