

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440155

研究課題名(和文) 植物界で初めて発見された水溶性アスタキサンチン結合蛋白質による強光防御機構の解明

研究課題名(英文) Characterization of a novel aqueous astaxanthin binding protein found in microalgae

研究代表者

川崎 信治 (Kawasaki, Shinji)

東京農業大学・生命科学部・教授

研究者番号：50339090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物は強光が付随する環境ストレス下では、活性酸素の生成を伴う光酸化ストレスを発生し枯死にいたる。強光下の真夏のアスファルトから単離した微細藻類Ki-4株は、光酸化ストレス下で細胞液を赤く変色して長期間生存する。この赤色物質は光合成生物で初めての発見となる抗酸化力に優れたアスタキサンチンを結合する水溶性タンパク質であることが判明し、AstaPと命名した。本研究でAstaPの諸性質を分子レベルで解析したところ、AstaPは細胞内でアスタキサンチンを特異的に結合・可溶化し、かつ細胞表層に局在させることで、サンスクリーン効果により細胞全体を強光から保護する機能をもつことが推定された。

研究成果の概要(英文)：Under extreme environmental conditions such as desiccation and high salinity combined with high light irradiation, it is difficult for higher plants to survive because light energy, in combination with oxygen, leads to the generation of reactive oxygen species under water stress conditions. A microalga, strain Ki-4 was previously isolated from asphalt in midsummer, and a novel water-soluble astaxanthin binding protein, named AstaP, was identified from this microalga. AstaP is thought to enable the microalga to survive under the extreme photooxidative stress conditions. We have identified the function of AstaP as a novel functional molecule to protect photooxidative stresses in the strain Ki-4. We concluded that AstaP functions at the cell surface of the strain Ki-4 to protect the single cells under severe photooxidative stress conditions.

研究分野：Microbiology

キーワード：微細藻類 極限環境 カロテノイド アスタキサンチン 強光ストレス 光酸化ストレス 活性酸素  
有用物質生産

## 1. 研究開始当初の背景

光は植物を枯らす最大の環境要因の一つである。強光照射下で乾燥や塩、低温などの光合成反応を抑制する環境ストレスが発生すると、葉緑体内が過還元状態となり、活性酸素の生成を伴う光酸化ストレス (photooxidative stress) が発生する。一般植物では、強光防御の中核機構としてチラコイド膜内のカロテノイド色素が関与するキサントフィルサイクルが古くから研究されている。原核生物のラン藻では、強光下で水溶性のカロテノイド結合タンパク質 (OCP) を発現し、強光防御を行う機構が知られている。真核の植物界において OCP に類似する水溶性のカロテノイド結合タンパク質は未同定であった。筆者らは新奇な光酸化ストレス耐性機構の発見を目指して、一般植物の生育が困難と思われる過酷な生育環境から微細藻類の探索を行い、これまでに約 70 株の微細藻類を単離してきた。単離株の中で真夏のアスファルトから単離した淡水性の真核微細藻類 Ki-4 株は、強光が付随する光酸化ストレスが発生する環境で赤色化を伴い長期間生存した。この赤色化に着目して研究を進めたところ、水溶性のアスタキサンチン結合タンパク質 (AstaP と命名) を細胞内に高濃度に蓄積することが判明した<sup>1)</sup>。これまでに植物界でアスタキサンチンを結合する類似の水溶性タンパク質は発見されたことがなく、光合成生物の強光防御に関与する新奇なタンパク質であることが強く推定された。

## 2. 研究の目的

上述のように光合成生物で報告例の無い水溶性のアスタキサンチン結合タンパク質が発見された。本タンパク質は Fasciclin ドメインという細胞表層での細胞接着などに関与するタンパク質のファミリーとして同定された。細胞表層移行シグナルを保持することから、同ファミリータンパク質群と同様の機能をもつことが推定されるが、生物界に広く分布する Fasciclin ファミリータンパク質間でカロテノイドを結合するタンパク質は報告例が無いことから、AstaP タンパク質は新奇な機能性を有するタンパク質であることが推定された。Ki-4 株以外の真核微細藻類や植物界における類似タンパク質の分布、さらには生物界全体における分布は不明である。また AstaP は抗酸化力が高いアスタキサンチンを結合・可溶化することから、光ストレス下で発現誘導されることから、AstaP の機能性は光酸化ストレス防御に機能する可能性が高いが、細胞内での詳細な機能性や細胞内局在に関しては不明な点が多く残されている。そこで本研究では、AstaP の生物分布の解析、細胞内局在の解析、AstaP タンパク質の光酸化ストレス下での機能性と強光防御機構に関する解析、以上の 3 項目について研究

を行うことで、水溶性のカロテノイド結合タンパク質が関与する新奇な強光ストレス防御機構に関する知見の獲得を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) AstaP の生物分布の調査: AstaP の生物分布は不明のため、タンパク質の 1 次構造解析に基づくタンパク質データベース解析を行い、生物分布を調査した。また分布が確認された生物における相同性タンパク質は全て機能未知タンパク質として分類されていることから、その機能性を評価するために、供試生物種を選定した。真核微細藻類からは *Chlamydomonas* や *Chlorella* 属に属するモデル藻類、原核生物からはモデルらん藻の *Synechocystis* 属種など、またバクテリアにも広く分布が推定されたことから、微生物保存機関から数種の菌株を取り寄せた。また Ki-4 株と系統的に近縁性を示す *Scenedesmus* 属などから微細藻類株も取り寄せた。これら生物種に保持されるホモログは全て機能未知であることから、その機能性を評価するために、AstaP が光酸化ストレス下で強く発現誘導される機構に着目して、AstaP ホモログの強光誘導性の調査を行った。バクテリアのタンパク質に関しては、大腸菌を利用したリコンビナントタンパク質の精製を行った。また我々が強光下の極限環境から単離した微細藻類における AstaP 類似タンパク質の分布も調査した。単離株は Ki-4 株と同様の細胞機能を保持することが強く推定されるため、通常の培養を行い、光酸化ストレス付与後の細胞から細胞抽出液を取得し、水溶性色素結合タンパク質の有無の検出と、かつ検出された株に関してはタンパク質精製による証明を試みた。

(2) 細胞内局在性の解析: AstaP は N 末端領域に細胞外輸送シグナルを保持し、Fasciclin タンパク質群の特徴である細胞表層での局在が強く推定された。そこで、AstaP に特異的な抗体の作製を行った。また本抗体を利用してウエスタン解析によるタンパク質の発現時期の調査と、免疫染色による共焦点レーザー顕微鏡を用いた局在性の観察を行った。

(3) AstaP タンパク質の光酸化ストレス下での機能性: Ki-4 株は光酸化ストレス下で AstaP を発現するが、その発現時期や、具体的な光酸化ストレス耐性への寄与は不明である。そこでまず Ki-4 株に光酸化ストレスを付与後の生理状態の解析と、AstaP の発現時期との相関性の解析を行った。生理状態の解析は各種の光合成測定法を用いて行った。まず O<sub>2</sub> 電極法により O<sub>2</sub> 発生に基づく光合成活性を解析し、PAM 蛍光法による光合成パラメータの算出を行った。次に AstaP タンパク質の発現プログラムの解析を行った。AstaP タンパク質は強光が付随する環境ストレス下 (乾燥や塩ストレス)

で大量に発現するが<sup>1)</sup>、詳細な発現時期は不明である。そこで AstaP をコードする *astaP* 遺伝子の光酸化ストレス応答機構の調査と、AstaP タンパク質の発現変化を解析した。前述で評価した光合成活性の経時変化を指標として、AstaP タンパク質の発現プログラムの同定と、AstaP の発現に付随して細胞内で起こる他の生理代謝との相関性を調査した。まず AstaP タンパク質の補因子であるアスタキサンチンを含む二次カロテノイド代謝産物のメタボライト解析を行った。光合成回復期から耐性期における一連のタイムラインにおける細胞を収集し、カロテノイドの抽出を行いHPLCやLCMSを用いた組成解析を行った。また同じ細胞から mRNA を抽出し、次世代シーケンサーによる RNAseq 解析を行った。これらの結果を統合して、*astaP* 遺伝子と同調発現する遺伝子群の同定と機能性相関に関する調査、ならびに本結果から類推される強光防御プログラムの解析を行った。

#### 4. 研究成果

上記(1)~(3)で行った研究結果は論文として投稿中または投稿準備中であり未発表データが多い。本報告書では学会などで既に発表した内容をもとにして結果の概要を報告する。

(1)AstaP の生物分布の調査：AstaP タンパク質の1次構造解析の結果に基づくタンパク質データベースを利用した解析を行った結果、AstaP の構造に相同性を示すホモログは真核のモデル微細藻類である *Chlamydomonas* 属や *Chlorella* 属に分布することが判明した。しかし *Chlamydomonas reinhardtii* が保持する AstaP ホモログは、Ki-4 株の AstaP の全長鎖が約 2~3 倍程度と長く、また *Chlorella variabilis* に分布する AstaP ホモログは N 末端のシグナル配列を有さなかった。このことからモデル藻類に分布する AstaP ホモログは、AstaP とは異なる機能性を持つ可能性が推定された。一方、らん藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 株が保持する AstaP ホモログや、海洋性バクテリア、好熱細菌などに分布する AstaP ホモログは全て Fasciclin ドメインを保持しており、そのほとんどが細胞表層への移行シグナルを保持していた。また興味深いことに、ホモログの分布が確認されたバクテリア類は、ほぼ全ての種がカロテノイド合成能を持つ有色の細菌であることが判明した。この結果は AstaP ホモログの機能性がカロテノイド代謝に関与する可能性を強く示唆している。ノザン解析を実施したところ、*Synechocystis* sp. PCC6803 株の *sll1483* 遺伝子は、過去の知見と同様に強光応答性を示した。また他の海洋性バクテリア類を調査したところ強光誘導性を示す遺伝子と示さない遺伝子に区分された。これらバクテリアの AstaP ホモログの機能性

を評価するために、AstaP ホモログのリコンビナント精製を行った。強光誘導性や精製タンパク質の機能性に関しては、学術論文を投稿準備中である。

当研究室で単離した微細藻類は、光酸化ストレスに対して高い耐性を示す。そこで AstaP の生産能に共通性を持つことが強く推定されたため、Ki-4 株と同様に光酸化ストレスを付与して、水溶性のカロテノイド結合タンパク質の有無を調査した。その結果、いくつかの株から AstaP 類似タンパク質の存在を示唆するデータが得られた。現在それらの株から精製を行い、その存在性と類似性の解析を行っている。

(2) 細胞内局在性の解析：AstaP の細胞内局在は、抗体を用いた免疫染色法による検出が可能である。そこで AstaP タンパク質の一次構造からエピトープ認識部位を検出し、本配列を標的配列としてペプチドを合成してペプチド抗体の取得を行った。ウエスタン解析の結果、作製したペプチド抗体は AstaP を特異的に認識することが判明した。そこで本抗体を用いて、免疫染色法による *in situ* 局在解析を実施した。現在、精密な細胞局在性に関する調査を継続しているが、細胞表層への分布を示唆するデータが得られた。

(3) AstaP タンパク質の光酸化ストレス下での機能性：Ki-4 株に光酸化ストレスを付与する前後の光合成解析を行った。Ki-4 株は淡水性であるが、光酸化ストレスとしては、光合成を低下させる塩ストレスを採用した。Ki-4 株は 0.7M の NaCl と強光を付与しても生存が可能であったが、淡水性のモデル藻類 *Chlamydomonas* は数時間後に白色化し、0.2M の NaCl が限界濃度と判明した。Ki-4 株はストレス付与直後に速やかに光合成活性を低下させるが、2 時間後には回復に転じ、24 時間後にはストレス付与前の約 50% に相当する光合成活性を回復するに至った。その後、光合成活性を数日間維持し、細胞の肥大化、赤色化を伴い、数日後にはシスト状細胞へと変化した。モデル藻類は 0.2M の NaCl 条件下で一時的に光合成活性が回復したが、1 日後に停止した。Ki-4 株の光合成回復プロファイルをもとにして、一連の耐性期間を光合成回復期と光合成耐性期に区分した。この光合成回復プログラムと AstaP の機能性との相関性を類推するために、*astaP* 遺伝子の発現開始時期と AstaP タンパク質の発現時期をノザン解析およびウエスタン解析により調査した。その結果、*astaP* 遺伝子は光合成回復期の初期に顕著な発現上昇が観察された。一方、AstaP 抗体を用いた AstaP タンパク質の発現は、ストレス付与後 1 日目頃から顕著な発現上昇が観察された。遺伝子の発現時期とタンパク質の発現時期に大きな差が観察されたことは、AstaP の機能性を類推する上で興味深い結果であった。また AstaP タンパク質

の顕著な発現は回復期の後期であったことから、光合成の回復期には AstaP には依存しない光酸化ストレス防御機構の存在が推察された。

AstaP タンパク質の機能発現には、補因子として結合するアスタキサンチンの生合成も必要不可欠である。特に前述のように *astaP* 遺伝子の発現と AstaP タンパク質の発現時期が一致しないことから、アスタキサンチンの生合成の時期との相関性に大変興味を持たれた。そこで、光合成の回復プロファイルとアスタキサンチンを含む二次カロテノイド代謝産物の相関性に関して解析を行った。光合成回復過程のタイムライン上で数時間ごとに Ki-4 細胞から mRNA を抽出し、cDNA ライブラリを作製した。本ライブラリを用いて次世代シーケンサーによる RNAseq 解析を行った。RNAseq 解析の結果、*astaP* 遺伝子は光合成回復期初期に発現誘導され、二次カロテノイド生産に関与する遺伝子の多くも、*astaP* 遺伝子の発現時期に類似したプロファイルを示した。また *astaP* 遺伝子は RPKM 値で最も高誘導・高発現する遺伝子の一つとして同定された。次に、HPLC を用いたカロテノイド組成解析を行った。アスタキサンチンを含む二次カロテノイド生産は AstaP タンパク質の発現時期にほぼ一致することが判明した。すなわち AstaP タンパク質は、その補因子であるアスタキサンチンの生合成時期と一致して細胞内で発現することが判明した。

(4)AstaP の機能性に関する考察：RNAseq 解析の結果、*astaP* 遺伝子は光酸化ストレス付与後に速やかに、かつ最も高発現する遺伝子の一つであることが判明し、Ki-4 株の光酸化ストレス耐性に関与する中枢遺伝子の一つであることが示唆された。本遺伝子の発現プログラムに類似してカロテノイド代謝に関与する遺伝子群も協奏的に発現した。カロテノイド組成解析の結果、AstaP タンパク質の発現時期ではアスタキサンチンの細胞内含量に匹敵してルテインやカンタキサンチンの細胞内含量も高いことが判明した。このことから AstaP はアスタキサンチンを細胞内で選択的かつ特異的に結合する能力をもつことが推定された。本結果は AstaP タンパク質の機能性を考察する上で、非常に重要な知見の一つであると考えている。すなわち、カンタキサンチンやルテインなどはアスタキサンチンと類似した構造を持ち、シスト細胞中における細胞内濃度はアスタキサンチンに匹敵するにもかかわらず、AstaP タンパク質が細胞内でアスタキサンチンを選択的に結合する事実は、アスタキサンチンが AstaP タンパク質に嗜好される何らかの“理由”があることを示唆していた。以上の知見から AstaP の機能性を総括すると、AstaP は光酸化ストレス下でアスタキサンチンを結合して細胞内濃度が  $OD_{484nm} = 17cm^{-1}$  に相当する高濃度に蓄

積し、水溶液中での 1 重項酸素消去活性と細胞表層でのサンスクリーン効果を併せ持つ bifunctional な酵素として機能し、さらにその機能を実現するために細胞内に混在する種々のカロテノイド種の中からアスタキサンチンを選択的に嗜好し水溶化する機能を持つことが判明した。今後は AstaP の有無が光酸化ストレス耐性に及ぼす影響を分子生物学的に解析することで Ki-4 株における機能性の証明を目指すと共に、バクテリアなどの他生物にも広く分布することが判明した光誘導性の機能未知 AstaP ホモログの機能解明を目指す方針である。

#### < 引用文献 >

1)Kawasaki S, Mizuguchi K, Sato M, Kono T, Shimizu H. A novel astaxanthin binding photooxidative stress inducible aqueous carotenoprotein from a eukaryotic microalga isolated from asphalt in midsummer. *Plant cell physiology* 54:1027-1040. 2013.

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表](計9件)

豊島拓樹, 吉田梨沙子, 石毛太一郎, 久保田恵理, 高市真一, 川崎信治. 過酷な環境から単離した微細藻類の新規な光酸化ストレス防御機構に関する研究. 日本藻類学会 (2018 東北大学)

吉田梨沙子, 豊島拓樹, 宮田彩実, 川崎信治. 過酷な生育環境から単離した微細藻類の系統・分類学的研究. 日本藻類学会 (2018 東北大学)

豊島拓樹, 吉田梨沙子, 小飯田えり, 山崎敬太, 小俣翼, 石毛太一郎, 久保田恵理, 高市真一, 川崎信治. 水溶性アスタキサンチン結合タンパク質による微細藻類の新規な光酸化ストレス防御機構. 日本農芸化学会 (2018 名城大学)

豊島拓樹, 小俣翼, 田邊義和, 小飯田えり, 佐藤光, 古川綾恵, 吉田梨沙子, 川崎信治. 過酷な環境で生育する微細藻類の単離と有用な生理代謝の解析. 日本藻類学会 (2017 高知大学).

長嶋雄大, 小俣翼, 田邊義和, 石毛太一郎, 久保田恵理, 豊島拓樹, 広瀬優, 新村洋一, 川崎信治. 過酷な生育環境から単離した真核微細藻類がもつ新奇な環境ストレス耐性機構の解析. 日本農芸化学会 (2016 札幌).

宮田彩美, 岡田和隆, 浅野朋美, 新村洋一, 川崎信治. 真核微細藻類で同定された水溶性アスタキサンチン結合タンパク質 (AstaP) ホモログの微細藻類における分布.

日本農芸化学会(2016 札幌)

加藤聖子, 荒木花梨, 岡田和隆, 新村洋一, 川崎信治。真核微細藻類で同定された水溶性アスタキサンチン結合タンパク質(AstaP)ホモログの機能解析。日本農芸化学会(2016 札幌)

川崎信治、加藤聖子、宮田彩美、岡田和隆、長嶋雄大、浅野朋美、小俣翼、田邊義和、新村洋一。真核微細藻類で同定された水溶性アスタキサンチン結合タンパク質の生物分布と機能。日本カロテノイド研究会(2015 年首都大学)。

岡田和隆、長嶋雄大、浅野朋美、小俣翼、加藤聖子、田邊義和、宮田彩美、新村洋一、川崎信治。過酷な生育環境から単離された微細藻類がもつ新奇な環境ストレス耐性機構の解析。日本農芸化学会(2015 年岡山)

〔図書〕(計 1 件)

川崎信治。環境と微生物の事典:乾燥に耐える微生物。116 項を執筆 p230-231.2014 年。朝倉書店。

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

川崎 信治 (KAWASAKI, Shinji)  
東京農業大学・生命科学部・教授。  
研究者番号: 50339090