

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440195

研究課題名(和文)セブチン細胞骨格を起点とした細胞質分裂装置の進化過程の解明

研究課題名(英文)Evolution of apparatus of cytokinesis based on septin cytoskeleton

研究代表者

山崎 誠和 (Yamazaki, Tomokazu)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任助教

研究者番号：40400189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物は、原始的な単細胞性の動物が葉緑体を獲得することで進化した。しかし、生物の細胞が増殖する仕組みの一つである細胞質分裂が動物と植物で大きく異なる。ヒトなどの動物やカビなどの菌類は、細胞が分裂する際に細胞を包む細胞膜が外側から内側へと陥入し、最終的には細胞膜が縊り切れる。この陥入には収縮環と呼ばれる環状の分子装置が関わっていることが分かっている。一方で、植物では、細胞の内側から外側へと細胞板と呼ばれる分子装置が拡張することで為される。そこで、原始的な植物である藻類と動植物の細胞分裂に関わる遺伝子を比較した。その結果、セブチンと呼ばれる動物・菌類タイプの分裂装置の一つの進化過程が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Plants evolved by a primitive unicellular animals acquiring chloroplast. However, cytokinesis, which is one of mechanisms to proliferate cells, is greatly different between animals and plants. When animals and also fungi divide their cells, plasma membranes that envelop cells are invaded from the outside to the inside, and finally the cell membranes break down. It is known that this invagination involves a circular molecular apparatus called contractile ring. On the other hand, in plants, a molecular apparatus called cell plates are expanded from the inside to the outside of the cell. Here, genes involved in cytokinesis of algae, which are primitive plants, were compared with animals and plants. As a result, the evolutionary process of one of animal and fungal type cytokinetic apparatus called septin was revealed.

研究分野：植物科学、進化学

キーワード：細胞質分裂 進化 セブチン 藻類

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞質分裂の様式は生物種によって大きく異なる。動物や菌類などを含むオピストコンタではアクチンとミオシン(アクトミオシン)から構成される収縮環によって、車軸藻や陸上植物を含むストレプト植物では微小管やダイナミン(フラグモプラスチン)などによって構成される細胞板によって細胞質分裂が為される。かつては、大幅な形態学的差異からオピストコンタとストレプト植物では細胞質分裂を担う分子に共通性が殆どないと想像されていた。ところが近年、モデル生物を中心とした分子細胞生物学的な研究が進み、細胞質分裂の後期に関わる因子に共通性があることがわかってきている。例えば、エンドサイトーシスに関わるダイナミンや膜交通に関わるSNAREがそれに当たる。これらの事実は、細胞質分裂に関与する“ツールキット”が存在し、それらが生物種ごとに改変されることで多様な細胞質分裂の様式が生み出されていることを示唆する。

緑色植物は大きく分けてストレプト植物と緑藻に分類される。緑藻類(緑藻綱やトレボウクシア藻綱)では環状収縮によって細胞質分裂が為されるが、オピストコンタと異なり、細胞の赤道面で非対称な分裂溝が形成され、なにより収縮環の構成要素はアクトミオシンではない。これは細胞板によって細胞質分裂が為されるストレプト植物とも異なる。ストレプト植物と緑藻は共通の祖先から分岐しているため、共通祖先では細胞質分裂において同一の分子基盤を有したと考えられる。しかしながら、緑藻の細胞質分裂を担う分子についての知見は殆どなく、分子レベルでの進化的な検証がなされていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

オピストコンタでは、アクトミオシンからなる収縮環だけでなく、細胞質分裂面に形成されるセプチン環が細胞質分裂に関与していることが酵母と動物細胞の研究からわかっている。セプチンの分子機能については不明な点が多いが、遺伝学・細胞生物学的研究から、収縮環が形成される際の足場および2つの娘細胞間の細胞膜を分かち隔壁として機能する新規の細胞骨格だと考えられている。我々は、オピストコンタのみに存在すると長らく言われていたセプチンが、緑色植物である緑藻にも存在することを明らかにした(Yamazaki et al., *Plant J* 2013)。

我々は、研究計画以前に、トレボウクシア藻1(*Parachlorella kessleri*)と緑藻1種(*Haematococcus pluvialis*)、アオサ藻1種(*Ulva partita*)の全ゲノム・トランスクリプトーム解析を実施しており、前者については概ね全ゲノム情報が利用可能な状態であった。これら全ゲノム情報を基盤に、単細胞緑藻の細胞質分裂に関わる分子を同定し、オピストコンタおよびストレプト植物と比較

することで細胞質分裂の進化史を明らかにできるのではないかと考えた。

## 3. 研究の方法

研究当初の計画では、単細胞緑藻の細胞膜タンパク質の中から細胞質分裂に関わるセプチンと相互作用する因子を同定し、進化的な意義を推定する予定であった。研究材料として我々が全ゲノム情報を整備した単細胞緑藻クロレラを用いることとした。同藻を明暗周期により同調培養し、分裂期と成長期の細胞膜タンパク質を水性二層分配法によって単離し、単離した細胞膜タンパク質を、微量質量分析に供試、得られた質量データをデータベースに照らし合わせてタンパク質群を網羅に推定する予定であった。さらに、この中から免疫沈降法を用いて細胞質分裂因子セプチンと相互作用するタンパク質を精製、同定し、同定したタンパク質について特異的抗体を作成し、細胞内動態を蛍光顕微鏡法と免疫電子顕微鏡法を用いて解析しようと考えていた。最後に、同定したタンパク質についてヘマトコッカスやクラミドモナスなどの緑藻、オピストコンタと比較し、進化的な位置付けについての考察を考えていた。

しかし、当初の計画に比べて *P. kessleri* の遺伝子情報の整備の進捗が遅れてしまったことに伴い研究材料の遺伝子やたんぱく質情報のデータベース化がなされなかったこと、当初予定していた同調培養系が *P. kessleri* では達成できなかったため、*Chlorella sorokiniana* に変更した。しかし、こちらはゲノム情報の利用が困難であった。そのため、ゲノム情報を整備しつつ、比較ゲノム的手法を取り入れて細胞質分裂の緑藻類に渡り調査することに研究方法を修正した。

## 4. 研究成果

クロレラの細胞分裂を同調した同調培養系の確立：当初、ゲノム解読が先行していた *P. kessleri* を用いて明暗周期による同調系の確立を試みた。細胞分裂の同調化条件として明暗の長さ(連続光、24時間光周期で暗期を増加させるなど)、培地(混合培地、無機培地、緩衝剤を変えるなど)、通気(空気のみや二酸化炭素量を変えるなど)などを変えて増殖曲線を指標に試験した。しかしながら、*P. kessleri* では確かに暗期に増殖が促進されるものの明期でも増殖は抑制されなかった。そこで、*P. kessleri* の代わりに近縁種である *C. sorokiniana* を用いて上記に準じて同調化条件を試験した。その結果、光周期(暗期16時間：明期8時間)無機培地、緩衝剤(MOPS、pH7.0)、二酸化炭素(5%)の条件で、良好に同調化が認められた。一方で、*C. sorokiniana* については2017年現在国外のグループでゲノム解読が進んでいるものの未発表であるためプロテオーム的な解析には至らなかった。

比較ゲノム解析：そこで、既知のセプチン

に関連した細胞質分裂について比較ゲノムの手法を用いて解析した。当初、ゲノム解読を進めていたトレボウクシア藻 *P. kessleri* の遺伝子情報に加えて、アオサ藻 2 種 (*Ulva partita* と *Ulva prolifera*) についても我々はゲノム解析を進めておりそのデータも追加した。水生の緑藻(トレボウクシア藻 4 種、アオサ藻 2 種、緑藻 3 種、プラシノ藻 4 種)とストレプト植物(陸上植物:コケ、シダ、有胚植物であるシロイヌナズナ 3 種と車軸藻:クレブソルミディウム 1 種)の全遺伝子情報を用いた。セプチン関連因子と収縮環の構成因子については出芽酵母と分裂酵母の遺伝子情報と前述の緑色植物の全遺伝子情報を比較した。

まず、セプチンのオルソログは、これまでの知見通り、プラシノ藻には存在しなかった。しかし、プラシノ藻より進化的には新しい緑藻、トレボウクシア藻、アオサ藻のゲノムには存在していた。4 つの系統は、単一の祖先を共有するとされることから、共通祖先ではセプチンは存在したが、プラシノ藻では進化の過程で消失してしまったと言える。また、陸上植物においては、これも従来の知見通り、有胚植物にはセプチンのオルソログは存在しなかっただけでなく、シダやコケにも存在しなかった。3 者は、収縮環ではなく細胞板によって細胞質分裂が為されることから、収縮環形成の足場として機能するセプチンが存在しないことも理に適っている。ところが、興味深いことに陸上植物と共通祖先をもち、細胞板で細胞質分裂を為す車軸藻においてもセプチンのオルソログが存在していた。

緑藻植物は、収縮環で細胞質分裂を為さず、ファイコプラストと呼ばれる微小管からなる構造体が分裂面に形成され、細胞膜が陥入する。緑色植物全体のセプチンのオルソログの分布を翻って見るとセプチンと収縮環との関連性に疑問が残る。これは、緑藻植物ではセプチンが動物や菌類にはない新たな機能を獲得した可能性さえ伺わせる。一方、セプチンと相互作用するタンパク質や収縮環を構成するタンパク質に関しては、Bud3 や Bud4、CDC42 と言った分裂位置でのアクチン形成に関わり、直接、セプチンと相互作用するタンパク質のオルソログをコードする遺伝子が緑色植物では存在していなかった。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12 件)

1. Takeshita, T., Ota, S., Yamazaki, T., Kazama, Y., Abe, T., Kawano, S\*. Robust strains isolated by heavy-ion-beam irradiation and endurance screening in the green algae, *Haematococcus pluvialis*. *RIKEN Accel. Prog. Rep.* 査読在り in press. DOI.
2. Suzuki, R., Ota, S., Yamazaki, T., Toyoda, A., Nonaka, S., Matsukura, C., Kuwano, K., and Kawano, S\*. (2016) Morphological changes of giant mitochondria in the unicellular to multicellular phase during parthenogenesis of *Ulva partita* (Ulvophyceae) revealed by expression of mitochondrial targeting GFP and PEG transformation. *Phycol. Res.* 査読在り 64(3): 176-184. doi: 10.1111/pre.12132
3. Ota, S., Yoshihara, M., Yamazaki, T., Takeshita, T., Hirata, A., Konomi, M., Oshima, K., Hattori, M., Bisova, K., Zachleder, V., Kawano, S.\* (2016) Deciphering the relationship among phosphate dynamics, electron-dense body and lipid accumulation in the green alga *Parachlorella kessleri*. *Sci. Rep.* 査読在り 6, 25731. doi: 10.1038/srep25731
4. Ota, S., Oshima, K., Yamazaki, T., Kim, S., Yu, Z., Takeshita, T., Hirata, A., Bisova, K., Zachleder, V., Kawano S. (2016). Highly efficient lipid production in the green alga *Parachlorella kessleri*: draft genome and transcriptome endorsed by whole-cell 3D ultrastructure. *Biotechnology for Biofuels*. 査読在り 9:13. doi: 10.1186/s13068-016-0424-2
5. Yamazaki, T., Yamashita, Y., Ota, S., Takeshita, T., Kazama, Y., Abe, T., Kawano, S\*. (2015) Characterization of isolates derived from heavy-ion-beam irradiated cells in the unicellular green alga *Parachlorella kessleri* *RIKEN Accel. Prog. Rep.* 査読在り 48: 309. doi なし
6. Takeshita, T., Takeda, K., Ota, S., Yamazaki, T., Kawano, S. (2015) Simple method for measuring the starch and lipid contents in the cell of microalgae. *Cytologia*, 査読在り 80(4): 475-481. doi: 10.1508/cytologia.80.475
7. Ichihara, K., Suzuki, R., Yamazaki, T., Ota, S., Mogi, Y., Kagami Y., Kuwano, K., Kawano, S. (2015) *Ulva partita* sp. nov., a Novel Enteromorpha-Like Ulva Species from Japanese Coastal Areas. *Cytologia*, 査読在り 80(3): 261-270. doi: 10.1508/cytologia.80.261
8. Suzuki, R., Yamazaki, T., Toyoda, A., Kawano, S. (2015) A transformation system using *rbcS* N-terminal region

fused with GFP demonstrates pyrenoid targeting of the small subunit of RubisCO in *Ulva compressa*. *Cytologia* 79(4): 1-2. doi: 10.1508/cytologia.79.427

9. **Yamazaki, T.**, Endo, M., Ito, K., Suzuki, R., Ota, S., Kuwano, K., Miyamura, S., Toyoda, A., Kawano, S. (2015) HAP2/GCS1 is involved in the sexual reproduction system of the marine macroalga *Ulva compressa* (Ulvales, Chlorophyta). *Cytologia* 査読有り 79(4): 1-10. doi: 10.1508/cytologia.79.575
10. **Yamazaki, T.**, Ota, S., Oshima, K., Hattori, M., Kazama, Y., Abe, T., Kawano, S. (2014) Mutation rates of *Parachlorella kessleri* by heavy-ion-beam irradiation and classification of their genomic deletion types. *RIKEN Accel. Prog. Rep.* 査読有り Vol. 47, pp 301. DOI. なし
11. Takeshita, T., Ota, S., **Yamazaki, T.**, Hirata, A., Zachleder, V., Kawano, S. (2014) Starch and lipid accumulation in eight strains of six *Chlorella* species under comparatively high light intensity and aeration culture conditions. *Bioresour Technol.* 査読有り 158:127-34. doi: 10.1016/j.biortech.2014.01.135.
12. **Yamazaki, T.**, Hirai, C., Ota, S., Kuwano, K., Kawano, S. (2014) Use of FM1-43, a membrane-specific fluorescent dye, to estimate plasma membrane integrity in the cryopreservation of green algae. *CryoLetters.* 査読有り 35(3):180-7. doi なし

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 竹下 毅、大田 修平、**山崎 誠和**、河野 重行 クロレラ 6 種 8 株の実験室培養系におけるデンプンとオイルの蓄積と屋外大量培養系への展開 第 58 回日本植物生理学会 2017 年 3 月 16 日~2017 年 3 月 18 日 鹿児島県(鹿児島市・鹿児島大学)
2. 市原 健介、**山崎 誠和**、宮村 新一、桑野 和義、河野 重行 緑藻青アオノリ 2 種のゲノム解読と雌雄ゲノムの比較による性決定領域の解析 日本藻類学会第 41 回大会 2017 年 3 月 23 日~2017 年 3 月 26 日 高知県(高知市・高知大学)
3. 井坂 若菜、大西 美輪、羽生田武昭、市原 健介、**山崎 誠和**、石崎 康介、深城 英弘、河野 重行、川井 浩史、新免 輝男、三村 徹郎 汽水緑藻 *Ulva prolifera* の Na<sup>+</sup>に依存した成長とリン

酸の取り込みについて 日本藻類学会第 41 回大会 2017 年 3 月 23 日~2017 年 3 月 26 日 高知県(高知市・高知大学)

4. 大田 修平、関田 諭子、**山崎 誠和**、竹下 毅、平田 愛子、奥田 雄一、河野 重行 電顕 3D とフリーズフラクチャーで見るクロレラのオイル蓄積の動態とオートファジー 日本藻類学会第 41 回大会 2017 年 3 月 23 日~2017 年 3 月 26 日 高知県(高知市・高知大学)
5. 浅野 円花、大田 修平、**山崎 誠和**、石井公太郎、風間 裕介、阿部 知子、河野 重行 クロレラゲノムの倍数化と重イオンビーム照射による染色体分断化と再構成 日本植物学会第 80 回大会 2016 年 9 月 16 日~2016 年 9 月 19 日 沖縄県(那覇市・沖縄コンベンションセンター)
6. 市原 健介、**山崎 誠和**、宮村 新一、平岡 雅規、河野 重行 アポミクシスはスジアオノリの適応戦略に影響するか? 日本植物学会第 80 回大会 2016 年 9 月 16 日~2016 年 9 月 19 日 沖縄県(那覇市・沖縄コンベンションセンター)
7. 市原 健介、**山崎 誠和**、宮村 新一、平岡 雅規、河野 重行 アポミクシスはスジアオノリの適応戦略に影響するか? 日本植物学会第 80 回大会 2016 年 9 月 16 日~2016 年 9 月 19 日 沖縄県(那覇市・沖縄コンベンションセンター)
8. 清水 恭夫、**山崎 誠和**、大田 修平、市原 健介、鈴木 亮吾、宮村 新一、桑野 和義、河野 重行 *Ulva partita* ゲノムの雌雄特異的な領域にある遺伝子とその発現パターン 日本藻類学会第 40 回大会 2016 年 3 月 18 日~2015 年 3 月 20 日 東京都(千代田区・日本歯科大学)
9. **山崎 誠和**、鴻巣 絵梨香、竹下 毅、大田 修平、平田 愛子、風間 裕介、阿部 知子、河野 重行 微細緑藻 *Parachlorella kessleri* のシステム要求性株はオイルとデンプンの蓄積動態に異常を示す。 第 67 回日本生物工学会大会 2015 年 10 月 26 日~2015 年 10 月 28 日 鹿児島県(鹿児島市・城山観光ホテル)
10. 鈴木 亮吾、清水 恭夫、市原 健介、**山崎 誠和**、桑野 和義、河野 重行 ヒラアオノリの一過的形質転換系を用いて観察した単位生殖過程のオルガネラと細胞の動態 日本植物学会第 79 回大会 2014 年 9 月 12 日~2014 年 9 月 14 日 神奈川県(川崎市・明治大学)
11. 吉原 真衣、大田 修平、**山崎 誠和**、南郷 脩史、平田 愛子、河野 重行 クロレラ類の栄養飢餓条件における物質の蓄積動態を電顕 3D 法で立体構築する。日本植物学会第 79 回大会 2014 年

9月12日～2014年9月14日 神奈川県  
(川崎市・明治大学)

12. **山崎 誠和**、竹下 毅、大田 修平、Vilem Zachleder、クロレラ類のデンブ  
ン・オイル蓄積とその生産性に及ぼす強  
光と屋外大量培養系の影響 第66回日  
本生物工学会大会 2014年9月9日～  
2014年9月11日 北海道(札幌市・札  
幌コンベンションセンター)
13. **山崎 誠和**、大田 修平、竹下 毅、佐  
藤 聖樹、大島 健志郎、服部 正平、  
河野 重行 オイル蓄積を誘導する硫  
黄飢餓に対する微細藻類 *Parachlorella*  
*kessleri* のトランスクリプトーム解析  
第66回日本生物工学会大会 2014年9  
月9日～2014年9月11日 北海道(札  
幌市・札幌コンベンションセンター)
14. 大田 修平、吉原 真衣、**山崎 誠和**、  
南郷脩史、平田 愛子、河野 重行  
*Chlorella sorokiniana* におけるオート  
ファジーの3次元微細構造学的研究 日  
本藻類学会第39回大会 2015年3月20  
日～2015年3月21日 九州大学(福岡  
県、福岡市)
15. 市原 健介、鈴木 亮吾、**山崎 誠和**、  
桑野 和義、河野 重行 九州四国沿岸  
域のアオサ属の種の多様性と一新種の  
発見 日本藻類学会第39回大会 2015  
年3月20日～2015年3月21日 九州大  
学(福岡県、福岡市)
16. 竹下 毅、山下 雄一、大田 修平、**山**  
**崎 誠和**、大島 健四郎、服部 正平、  
阿部 知子、風間 裕介、河野 重行  
クロレラの重イオンビームによる突然  
変異誘導と屋外大量培養株の作出 日  
本藻類学会第39回大会 2015年3月20  
日～2015年3月21日 九州大学(福岡  
県、福岡市)
17. **山崎 誠和**、鈴木 亮吾、市原 健介、  
豊田 敦、桑野 和可、鈴木 穰、河野  
重行 アオサ藻綱ヒラアオノリの雌雄  
ゲノムの比較による性決定領域の探索  
日本藻類学会第39回大会 2015年3月  
20日～2015年3月21日 九州大学(福  
岡県、福岡市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2件)

名称:「カロテノイドの大量生産方法」  
発明者:河野重行、山崎誠和、大田修平、竹  
下 毅、宮下英明  
権利者:東京大学  
種類:特願  
番号:2014-259462  
出願年月日:平成 26年 12月 22日  
国内外の別:国内

名称:「長鎖脂肪酸生産藻類及びそれを用い  
た長鎖脂肪酸生産方法」

発明者:河野重行、山崎誠和、大田修平、鴻  
巣絵梨香、竹下毅、阿部知子、風間裕介

権利者:東京大学

種類:特願

番号:2014-152376・PCT/JP2015/071156

出願年月日:2015.7.24

国内外の別:国際

取得状況(計 0件)

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/pls/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山崎 誠和(YAMAZAKI, Tomokazu)

東京大学・大学院・新領域創成科学研究  
科・特任助教

研究者番号:40400189

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

河野 重行(KAWANO, Shigeyuki)

東京大学・大学院・新領域創成科学研究  
科・教授

研究者番号:70161338

(4)研究協力者

( )