

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18588

研究課題名(和文) 真核細胞における好気エネルギー変換と細胞周期進行の関係

研究課題名(英文) Understanding the relationship between aerobic energy metabolisms and cell cycle progression in eukaryotes.

研究代表者

藤原 崇之 (Fujiwara, Takayuki)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・助教

研究者番号：10595151

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)：真核細胞は、ミトコンドリアと葉緑体の共生によって、それぞれ呼吸と光合成という高効率なエネルギー代謝を得た。しかし、それら好気エネルギー代謝は、活性酸素種の主要な発生源であり、細胞増殖にとって有害な側面を併せ持つ。真核藻類は、光合成と細胞周期進行の時間的分業を行うことにより、光合成酸化ストレスからDNA複製や細胞分裂を行う細胞を守る。この時間分業は概日リズムによって制御されるが、我々はさらに概日リズムが光合成の活性の変化によって調節されることを示した。この結果は、細胞周期進行のタイミングが宿主と共生体の相互作用によって調節されることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria and chloroplasts perform highly efficient energy metabolisms, respiration and photosynthesis, respectively, in eukaryotes. The aerobic energy metabolisms, however, are also main generators of reactive oxygen species and can damage cells. It has been poorly known how eukaryotic cells coordinate the aerobic energy metabolisms for safe cell proliferation during a daily cycle. Eukaryotic algae grow during the daytime. In contrast, the cell cycle progression is restricted to the night when photosynthesis does not operate. This temporal separation protects S- and M-phase cells from photosynthetic oxidative stress. Circadian rhythms are believed to control this temporal separation. We demonstrated that change in photosynthetic activity resets the circadian rhythms, which suggests that the timing of cell cycle progression, which is regulated by circadian rhythms, are probably determined by interaction between the molecular clock in a host and retrograde signals from endosymbionts.

研究分野：細胞生物学

キーワード：真核藻類 概日リズム 細胞周期 遺伝子改変 植物

1. 研究開始当初の背景

真核生物は、ミトコンドリアと葉緑体の獲得によって呼吸と光合成という効率的なエネルギー生産を可能とした。しかし両者は、活性酸素種(ROS)の主要な発生源でもあり、過剰な ROS は細胞にとって有毒である。さらに自然環境には、昼夜という大きな環境変化があり、植物細胞の光合成によるエネルギー生産は昼間のみに限定されている。光合成真核生物が、昼夜サイクルという変化する環境において、どのように好氣的エネルギー代謝と、細胞の生長・分裂(細胞周期進行)を破綻させることなく、細胞増殖を行っているのかについての知見は乏しかった。

申請者は、これまでに、真核藻類が昼夜サイクルにおいて、光合成(昼間)と細胞周期進行(夜間)の時間的分業を行うことで、DNA複製や細胞分裂する細胞を光合成酸化ストレスから守っていることを示してきた(引用文献)。この時間的分業は、概日リズムによって制御されていると考えられている。概日リズムは、転写翻訳のフィードバック(TTFL)に駆動されると考えられていたが、代謝などの非転写調節機構によっても制御されることが知られてきた。このことは、植物細胞の主要な代謝である光合成の活性の変化によって、概日リズムが調整される可能性を示唆するものであるが、それらの関係については、不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、光合成活性の変化によって概日リズムが変化することを示し、これにより、TTFL(宿主)と光合成(共生体)の双方の協調機構によって細胞周期進行のタイミングが決定するという仮説を提唱することである。さらに、時計を司る転写因子の昼夜サイクルにおける動態を解析し、光合成活性の変化がTTFLに入力される分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

本申請計画では単細胞真核紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* に着目した。単細胞藻類を用いることで、光合成活性、代謝、細胞周期進行などが比較的均一な細胞集団の解析が可能である。これは細胞分化により様々な組織によって成り立っている陸上植物では困難である。ゲノムサイズと遺伝子数ともに真核生物の中で最小クラスであり、遺伝子ターゲティングと導入遺伝子の安定持続的な発現が可能である。また 12 時間の明暗周期下で培養することにより、概日リズムの形成およびそれに制御される細胞周期の同調が可能である。

光合成活性、概日リズムと細胞周期進行の関係を調べるために、光合成阻害剤を用いた。細胞周期進行の時期を知るために G1/S 移行を司る転写因子複合体である E2F 複合体のリン酸化状態をモニターした。このリン酸化は

概日リズムによって起こり、G1/S 移行を正に制御する。時計転写因子の動態を調べるために、新たに *C. merolae* の形質転換系を開発し(発表論文、雑誌論文)、タグ融合時計転写因子株を作成した。光合成活性の変化が概日リズムに反映される機構を調べるために、時計転写因子に結合するタンパク質をプロテオーム解析によって探索した。

4. 研究成果

C. merolae を定常光下で非同調培養し、光合成阻害剤を加えると、E2F 複合体のリン酸化リズムがリセットされることから、光合成活性の変化と概日リズムの間には関連があることが示された。次に光合成が細胞内の酸化還元状態を変化させることを考慮し、非同調連続暗闇下で抗酸化剤処理を行った。その結果、概日リズムが形成されることが分かった。すなわち、真核藻類の概日リズムは、葉緑体(共生体)からの還元力の変化(レトログレードシグナル)によって調整され得る。このことから、環境(光、温度、栄養塩など)の変化が、光合成活性の変化を通じて概日リズムに反映され、TTFL のみによる時計を微調整している可能性が示唆された。このように概日リズムが宿主と共生体との相互作用によって形成されることが、光合成と細胞周期進行との時間分業を適切に行うことに重要であると考えられる。

光合成活性の変化が、概日リズムの形成に関係することは上記の実験によって判明したが、光合成に由来する還元力の変化を TTFL がどうやって検知するかは不明であった。まず、昼夜サイクルにおける時計転写因子の動態を調べるために、時計転写因子に HA タグを融合した形質転換体を作成し、抗体染色法を用いて細胞内局在の時空間的挙動を解析した。その結果、転写因子と性質から細胞核に常に存在すると予測していたが、昼夜サイクルにおいてその細胞質もしくは細胞核内へと局在を変化させていた。この局在の変化は転写因子の活性と関係すると思われる。またイムノプロット解析により、時計転写因子のリン酸化レベルが昼夜の間に変化することが分かった。転写時計因子は転写翻訳レベル以上に複雑な制御により概日リズムの形成に関わっていることが示唆された。

しかしながら、我々の実験では、細胞時計転写因子に細胞内の酸化還元状態の変化を検知するような活性のあるチオール基を発見することはできなかった。このことから、時計転写因子に作用し、かつ酸化還元状態を検知できるタンパク質の存在が示唆された。そこで、HA 融合時計転写因子を免疫沈降法で集め、LC/MS-MS によるショットガン解析を行った。その結果、時計転写因子に結合するタンパク質を 1 つ発見することが出来た(以下、時計結合タンパク質とする)。FLAG タグ融合時計結合タンパク質と HA 融合時計転写因子を両方発現する株を作成し(方法開発 発表

論文) 両者の相互作用を確認した。確かに両者が結合することが示され、さらに昼夜において結合レベルが変化することが分かった。時計結合タンパク質の時計転写因子への結合が、転写因子の活性を変化させ、概日リズムの形成において何らかの影響を与えていることを示唆している。

時計結合タンパク質は、2つのシステイン残基を有している。このタンパク質のオルソログはこの細胞内の酸化還元を検知して、結合相手のタンパク質の活性を変化させることが報告されている。よって時計結合タンパク質が細胞内の酸化還元状態をモニターし、その情報を時計転写因子へと伝達している可能性は高い。時計結合タンパク質のシステイン残基の酸化還元状態の変化と、概日リズムの変化を調べることで、細胞内酸化還元状態の変化が TTFL に伝達される機構が理解されるであろう。

本研究では、共生体の好気エネルギー代謝が、宿主の概日リズムを調整し、細胞周期進行を行うタイミングを決定に影響を及ぼすことを示した。これは、真核細胞が自身の安全な細胞増殖と、有毒な側面をもつ共生体の好气的エネルギー代謝をどのように両立しているのかという問題と、過去に別々の独立した生物であった真核宿主と共生体の祖先がどのように一つの真核細胞として成立したのかという問題を考えるうえで大きな示唆を与える。

<引用文献>

Miyagishima SY, Fujiwara T, Sumiya N. et al. Translation-independent circadian control of the cell cycle in a unicellular photosynthetic eukaryote. *Nat Commun.* vol.5 2014, article.3807.

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10件)

Yoshida Y, Kuroiwa H, Shimada T, Yoshida M, Ohnuma M, Fujiwara T, et al. Glycosyltransferase MDR1 assembles a dividing ring for mitochondrial proliferation comprising polyglucan nanofilaments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 査読有, vol.114, no 50, 2017. pp.13284-13289. doi: 10.1073/pnas.1715008114.

Arakaki Y, Fujiwara T, et al. Evolution of cytokinesis-related protein localization during the emergence of multicellularity in volvocine green algae. *BMC evolutionary biology.* 査読有, vol.17, no.1 2017. p243 doi.org/10.1186/s12862-017-1091-z

Hirooka S, Hirose Y, Kanesaki Y, Higuchi S, Fujiwara T, et al. Acidophilic green algal genome provides insights into adaptation to an acidic environment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 査読有,

vol.114, no.39, 2017, pp. E8304-E8313. doi: 10.1073/pnas.1707072114.

Fujiwara T et al. Development of a Double Nuclear Gene-Targeting Method by Two-Step Transformation Based on a Newly Established Chloramphenicol-Selection System in the Red Alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Front Plant Sci.* 査読有, vol.8, 2017, article 343, doi:10.3389/fpls.2017.00343.

Jong LW, Fujiwara T et al. Cell size for commitment to cell division and number of successive cell divisions in multicellular volvocine green algae *Tetrabaena socialis* and *Gonium pectorale*. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 査読有, vol.93, no.10, 2017, pp.832-840, doi: 10.2183/pjab.93.052.

Yagisawa F, Kuroiwa H, Fujiwara T et al. Intracellular Structure of the Unicellular Red Alga *Cyanidioschyzon merolae* in Response to Phosphate Depletion and Resupplementation. *CYTOLOGIA* 査読有, vol.81, no.3, 2016, pp.347, doi.org/10.1508/cytologia.81.341.

Sumiya N, Fujiwara T et al. Chloroplast division checkpoint in eukaryotic algae. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 査読有, vol.113, no.47, 2016, pp.E7629-E7638. doi.org/10.1073/pnas.1612872113

Rademacher N, Kern R, Fujiwara T et al. Photorespiratory glycolate oxidase is essential for the survival of the red alga *Cyanidioschyzon merolae* under ambient CO₂ conditions. *J Exp Bot.* 査読有, vol.67, no.10, 2016 pp.3165-3175. doi:10.1093/jxb/erw118.

Fujiwara T, et al. A nitrogen source-dependent inducible and repressible gene expression system in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Front Plant Sci.* 査読有, vol.6 2015, article.657. doi:10.3389/fpls.2015.00657.

-和文総説-

藤原 崇之 オルガネラ分裂・分配機構の解明に向けた単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* における解析技術開発、査読無、*Plant morphol.* Vol.29、2017、pp.91-97. doi.org/10.5685/plmorphol.29.91.

[学会発表](計4件)

藤原 崇之 廣岡 俊亮 大林 龍胆 宮城島 進也 「真核藻類の日周期と細胞周期進行における遺伝子発現変動の網羅的解析」日本植物学会大80回大会 東京理科大学野田キャンパス 2017年9月8日

-招待講演-

藤原崇之 「光合成真核生物における日周期と細胞周期進行の関係の理解に向けて」遺伝研究会「水圏微生物のエネルギー利用戦略とその相互作用に関する研究会」国立遺伝学研究所 2016年11月3日

藤原崇之 「真核藻類における日周期と細胞周期進行の関係の理解に向けて」平成 28

年度 日本物形態学会 奨励賞受賞講演 琉球大学 西原キャンパス 2016年 9月 15日

Fujiwara T., Era A, Sumiya A and Miyagishima S. Toward understanding the relationship between a day-night cycle and cell cycle progression in photosynthetic eukaryotes (with briefly summarized technical tips), 1st *Cyanidioschyzon merolae* Symposium, 2016 at University of Tokyo, July 4th, 2016.

〔図書〕(計2件)

Takayuki F., Ohnuma M. Springer. Procedures for transformation and their applications in *Cyanidioschyzon merolae*. In Kuroiwa T. et al. (Eds) *Cyanidioschyzon merolae: A New Model Eukaryote for Cell and Organelle Biology*. 2017. Chapter 7.

Takayuki F. Springer. Cell cycle and organelle division cycle in *Cyanidioschyzon merolae*. In Kuroiwa T. et al. (Eds). *Cyanidioschyzon merolae: A New Model Eukaryote for Cell and Organelle Biology*. 2017. Chapter 11.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 崇之 (FUJIWARA, Takayuki)
国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・助教

研究者番号：10595151

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし