

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07427

研究課題名(和文) 転写産物データベース・形質転換系を活用した円石藻石灰化カスケードの解明

研究課題名(英文) Analysis of calcification mechanism of a coccolithophorid, using the transcripts database and transformation system

研究代表者

藤原 祥子 (Fujiwara, Shoko)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：30266895

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)：円石藻は、ハプト藻植物門に属す微細藻類で、細胞表面に精巧な形態の石灰化された鱗片(円石)をもつ。本研究では、その石灰化の分子機構の解明を目的とし、*Pleurochrysis haptonefera*を用いて以下の結果を得た。1. *Pleurochrysis*のRNAiによる円石形成関連遺伝子のスクリーニング系を確立し、cDNA マクロアレイ解析・転写産物データベースを活用して得られた候補遺伝子のスクリーニングを行った。2. *in vitro*石灰化実験により、円石の基板(ベースプレート)上のSDS・DTT可溶性タンパク質と酸性多糖Ph-PS-2が石灰化の開始に重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロアレイ解析とRNAiを組み合わせたスクリーニングによって円石形成関連遺伝子を選抜・同定することにより、石灰化機構の全容を分子レベルで解明するための糸口が得られた。その遺伝子群のうちの一つは実際に円石に含まれるタンパク質をコードしており、そのタンパク質は石灰化の最初の重要なステップである結晶核形成に関与していることを*in vitro*実験からも示すことができた。また、ゲノム解析についても*Pleurochrysis*のドラフトゲノムを向上させ、2大系統であるEmiliania系統との比較による円石藻の一般性と特異性の理解のための足掛かりが得られたものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Coccolithophorids are haptophyte algae which have calcified scales with elaborate morphologies, called coccoliths, on the cell surface. In this study, we aimed to clarify the molecular mechanism of calcification, and obtained the following results, using a coccolithophorid *Pleurochrysis haptonefera*: 1) A screening system of calcification-related genes by RNAi has been established. Using the system, candidate genes which had been obtained from cDNA macroarray analysis and transcripts database were screened. 2) *In vitro* calcification experiments indicated that an SDS-DTT extracted protein and acidic polysaccharide Ph-PS-2 play an important role in crystal nucleation.

研究分野：バイオミネラル化、植物生理学

キーワード：石灰化 ハプト藻 円石藻 バイオミネラル化 転写産物データベース

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

円石藻は海洋に広く分布し、ドーバー海峡の白亜の岸壁に見られるような中生代白亜紀の石灰岩の形成に寄与したことで知られる。現在においても、海洋全体で年間約1億トン以上のCO<sub>2</sub>を炭酸カルシウムとして沈着していると見積もられている。このように、円石藻は生態学的にも地球科学的にも重要な意味をもつ藻類である。

円石形成機構については、主に *Emiliania* 属と *Pleurochrysis* 属を材料として、電子顕微鏡観察に基づく細胞学的研究や、円石に含まれる酸性多糖類の生化学的研究が行われてきた (de Jong et al. 1972, Marsh et al. 1992, Young et al. 1992)。近年、*Emiliania* では遺伝子レベルでの解析も盛んに行われるようになり、リン欠乏細胞(石灰化促進細胞)と通常の細胞を用いて、EST解析、cDNA マイクロアレイ解析などが行われ (Quinn et al. 2006 など)、ゲノム配列も報告された (Read et al. 2013)。これらにより、石灰化に関与する因子の候補が幾つか挙げられたが、*Emiliania* では遺伝子導入が困難なため、関与候補遺伝子の機能解析ができない状況にある。

一方、*Pleurochrysis* においては、de Jong、Marshらと、日本のグループ(申請者、筑波大・井上、東京学芸大・岡崎、東京大・長澤ら)が研究ツールの開発を先導してきた (Fujiwara and Tsuzuki 2011 など)。申請者らは、まず、円石形成細胞と非形成細胞(生活環の中の異なる stage の細胞)の単離に成功し、円石形成機構の全容解明に向けて、これらの2種の細胞を用いた様々なツールの開発を行って来た。すなわち、(1)フローサイトメトリーによる円石形成の視覚化・検出系の確立 (Takahashi et al. 2002)、(2)円石成分の解析 (Hirokawa et al. 2005, 2013)、(3)ベースプレート上での *in vitro* 石灰化系の確立、(4)情報ツールの確立 (cDNA マクロアレイの作製・解析、転写産物データベース “Pleurochrysome” の構築・公開 [連携研究者矢野博士との共同研究]) (Fujiwara et al. 2007, Katagiri et al. 2010)、(5)プロトプラスト作製法の開発 (Takayanagi et al. 2007) である。そして、このプロトプラストを用い、ついに、連携研究者である遠藤博士(東京大学)により、*Emiliania* では未だなされていない RNAi、形質転換系が確立された (Endo et al. 2016)。

### 2. 研究の目的

円石藻は、ハプト藻植物門に属す微細藻類で、細胞表面に精巧な形態の石灰化された鱗片(円石)をもつ。しかし、その形成の分子機構はほぼ未解明である。本研究では、円石藻の石灰化機構の解明を目的として、まず、自作の cDNA マクロアレイ解析・転写産物データベース (2015年9月完成・公開) を活用して得られた円石形成候補遺伝子の、RNAi によるスクリーニングを行う。得られた円石形成遺伝子に関して、できる限り多く、最近確立された形質転換系を利用して機能解析を行い、円石形成カスケードにおける分子機序の全容の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 円石藻 *Pleurochrysis* において、cDNA マクロアレイによる比較解析から得られた石灰化遺伝子候補の RNAi 解析を行い、石灰化(円石形成)遺伝子のスクリーニングを行った。石灰化遺伝子候補の選定は、以下の3パターンの cDNA マクロアレイ解析により行った。

*P. haptonemofera* の円石形成細胞と非形成細胞

*P. haptonemofera* の石灰化促進条件と抑制条件(培地中の Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>濃度を変えた条件)

*P. carterae* の野生株と円石欠損変異株(酸性多糖 PS-2、PS-3 の欠損株 [Marsh and Dickinson, 1997; Marsh et al. 2002])

RNAi による石灰化遺伝子のスクリーニングは、*P. haptonemofera* において以下の方法で行った。候補遺伝子に関して、データベースの配列を基に dsRNA をデザインした。ポリエチレングリコール存在下でプロトプラストに dsRNA を導入した。1日後に一度脱灰処理して円石を溶かし、RNAi 効果を判断しやすくした。さらに2日後にフローサイトメトリーにより、クロロフィル蛍光と側方散乱を解析し、石灰化に対する効果を検出した。RNA を抽出後、定量的 RT-PCR により標的遺伝子の発現における RNAi 効果を確認した。

(2) *P. haptonemofera* の円石から調製したベースプレートを用いて、*in vitro* 石灰化実験を行った。円石に含まれる酸性多糖 (Ph-PS-1, -2, -3) の影響を調べるために、酸性多糖を全部保持したベースプレートだけではなく、全部除く処理 (EDTA 処理) をしたものや、Ph-PS-2 のみを残す処理 (低 pH 脱灰後ウレア処理) をしたものも用いて石灰化を行わせ、経時的に走査型電子顕微鏡で観察を行った。また、各酸性多糖添加条件下、酸性多糖を除去したベースプレート上でも同様の実験を行った。

円石結合タンパク質の影響を調べるために、SDS、DTT によりタンパク質を抽出したベースプレート上でも石灰化を検討した。

タンパク質の同定は、トリプシン消化したものについて nano LC-MS/MS 解析を行い、*P. haptonemofera* のトランスクリプトームから予想されるアミノ酸配列に対して Mascot search を行うことにより行った。cDNA のクローニングは、トランスクリプトームのデータを基に RACE 法により全長 cDNA クローンを調製し、発現用プラスミドに導入してリコンビナントタンパク質を調製した。

(3) *P. haptanemofera* の円石形成細胞のプロトプラストより DNA を抽出・生成し、次世代シーケンサーのゲノムデータを得た。ショートリードデータ (Illumina HiSeq) とロングリードデータ (Oxford Nanopore MinION と Pac Bio Sequel II) を複合させることにより、ドラフトゲノムの向上を図り、ゲノムデータベースの構築を目指した。上述の候補遺伝子群についてのゲノム情報も取得した。

#### 4. 研究成果

(1) RNAi による円石形成関連遺伝子のスクリーニング系を確立し、cDNA マクロアレイ解析・転写産物データベースを活用して得られた候補遺伝子のスクリーニングを行った。

具体的には、まず、円石形成細胞特異的発現遺伝子の一つであるカーボニックアンヒドラーゼ (CA) 遺伝子 ConC1 の ds RNA をプロトプラストに導入したところ、コントロールと比較して、mRNA 量の減少が確認されるとともに、偏光顕微鏡観察、フローサイトメトリーにより円石量の減少が認められた。このことから、CA の中でも円石形成細胞特異的に発現する ConC1 遺伝子産物が円石形成に関与することが示唆され、スクリーニング系の確立にも成功した。

この系を用いて他の円石形成細胞特異的発現遺伝子についてスクリーニングを行ったところ、13 遺伝子の RNAi でコントロールと比較して円石形成の少ない細胞が多く確認できた。特に 4 遺伝子では顕著であり、これらの遺伝子が *Pleurochrysis* において円石形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

(2) ベースプレート上での *in vitro* 石灰化系の確立に成功し、酸性多糖 (Ph-PS-1, -2, -3) のうち Ph-PS-2 が石灰化開始に重要な役割を果たしていることを実証した (Sakurada et al. 2018)。具体的には、Ph-PS-2 のみを残す処理 (低 pH 脱灰後ウレア処理) をしたベースプレートや、Ph-PS-2 のみを添加したベースプレート上でも、石灰化が起こることを明らかにした。

この *in vitro* 石灰化系を用い、SDS、DTT によりタンパク質を抽出したベースプレート上で石灰化を試みたところ、石灰化が抑制されることが明らかになった。このことと上述の酸性多糖添加実験の結果から、このタンパク質に酸性多糖 Ph-PS-2 が結合し、ベースプレートの縁で石灰化が始まる可能性が示唆された。

さらに、このタンパク質の同定と全長 cDNA のクローニングを行った。同定については、このタンパク質をトリプシン消化したものについて nano LC-MS/MS 解析を行い、*P. haptanemofera* のトランスクリプトームから予想されるアミノ酸配列に対して Mascot search を行ったところ、RNAi 法によりスクリーニングされていた円石形成関連候補遺伝子の産物の 1 つに一致することが示唆された。そこで、RACE 法により全長 cDNA を増幅してクローニングを行い、現在リコンビナントタンパク質の解析を進めている。

(3) *P. haptanemofera* ゲノムデータベースの構築を目指し、次世代シーケンサーのショートリードデータ (Illumina HiSeq) とロングリードデータ (Oxford Nanopore MinION と Pac Bio Sequel II) を複合させることにより、ドラフトゲノムの向上を図った。上述の候補遺伝子群について正確なゲノム情報を得ることができた。

#### <引用文献>

Sakurada, S., S. Fujiwara, M. Suzuki, T. Kogure, T. Uchida, T. Umemura, M. Tsuzuki: Involvement of acidic polysaccharide Ph-PS-2 and protein in initiation of coccolith mineralization, as demonstrated by *in vitro* calcification on the base plate. Mar. Biotechnol. 20: 304-12. (2018)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakurada, S., S. Fujiwara, M. Suzuki, T. Kogure, T. Uchida, T. Umemura, M. Tsuzuki	4. 巻 20
2. 論文標題 Involvement of Acidic Polysaccharide Ph-PS-2 and Protein in Initiation of Coccolith Mineralization, as Demonstrated by In Vitro Calcification on the Base Plate	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Marine Biotechnology	6. 最初と最後の頁 304 ~ 312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10126-018-9818-4	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 Okada, K., S. Fujiwara, M. Tsuzuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Energy conservation in photosynthetic microorganisms.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of General Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2020.02.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tsuzuki, M., K. Okada, H. Isoda, M. Hirano, T. Odaka, H. Saijo, R. Aruga, H. Miyauchi, S. Fujiwara	4. 巻 in press
2. 論文標題 Physiological Properties of Photoautotrophic Microalgae and Cyanobacteria Relevant to Industrial Biomass Production	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Marine Biotechnology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10126-019-09890-1	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 Yamamoto, N., T. Kudo, S. Fujiwara, Y. Takatsuka, Y. Hirokawa, M. Tsuzuki, T. Takano, M. Kobayashi, K. Suda, E. Asamizu, K. Yokoyama, D. Shibata, S. Tabata, K. Yano	4. 巻 57
2. 論文標題 Pleurochrysome: a web database of Pleurochrysis transcripts and orthologs among heterogeneous algae.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcv195	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11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Asakawa K, Sakurada S, Fujiwara S, Endo H, Suzuki M, Kogure T, Kubo R, Amano K, Tsuzuki M
2. 発表標題 Analysis of the factors involved in coccolith formation in the coccolithophore <i>Pleurochrysis haptonefera</i>
3. 学会等名 BiominiXIV, 14th International Symposium on Biomineralization (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤原祥子
2. 発表標題 植物プランクトンの 美しいミクロの世界をのぞいてみませんか？
3. 学会等名 第26回日本バイオイメージング学会市民公開講座（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 櫻田舜人, 鈴木道生, 小暮敏博, 藤原祥子, 都筑幹夫
2. 発表標題 円石藻 <i>Pleurochrysis</i> の円石形成
3. 学会等名 第11回バイオミネラリゼーションワークショップ
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 浅川航輝, 藤原祥子, 遠藤博寿, 都筑幹夫
2. 発表標題 RNAi による円石藻 <i>Pleurochrysis</i> の円石形成関連遺伝子の探索
3. 学会等名 第11回バイオミネラリゼーションワークショップ
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://bioinf.mind.meiji.ac.jp/phapt/Pleurochrysome>  
<http://bioinf.mind.meiji.ac.jp/phapt/index.html>

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
研究協力者	鈴木 道生  (Suzuki Michio)	東京大学	
研究協力者	小暮 敏博  (Toshihiro Kodure)	東京大学	
研究協力者	遠藤 博寿  (Endo Hirotoshi)	筑波大学	
研究協力者	矢野 健太郎  (Yaano Kentaro)	明治大学	