

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：23401
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K07515
研究課題名(和文) 珪藻の細胞壁の進化を新奇パルマ藻から探る

研究課題名(英文) Parmales

研究代表者

吉川 伸哉 (Yoshikawa, Shinya)

福井県立大学・海洋生物資源学部・准教授

研究者番号：20405070

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)：パルマ藻 *Triparma laevis* と新奇パルマ藻株を用いて細胞壁形成過程の形態学的解析と分子生物学的解析を行った。透過型電子顕微鏡によるシリカの重合過程の観察によりパルマ藻のシリカの重合過程は、*Triparma laevis* や新奇パルマ藻のどちらも中心珪藻型の重合様式と羽状珪藻型の重合様式を2つのパターンを含むことが示された。*Triparma laevis* の殻形成時に発現する遺伝子の網羅的解析では、細胞壁形成時に214個の遺伝子で発現量の増加、99個の遺伝子で発現量の低下が見られた。遺伝子発現の上昇が見られた遺伝子の中には、ポリアミン合成や脂質の分解に関わる遺伝子が含まれていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パルマ藻のシリカの細胞壁の形成過程のケイ素の重合パターンを始めて明らかにした。これまでの珪藻を用いた研究では、中心珪藻の被殻を形成する環状のパターンセンター(PC)から、羽状珪藻の被殻を形成する線状のPCが派生したと考えられていたが、我々の結果により、パルマ藻と珪藻の共通の祖先で、既に両方のPCを保持していたことが示唆された。細胞壁形成過程の分子生物学的解析では、パルマ藻の細胞壁形成も珪藻と同様にポリアミンが関与していることが示唆された。また、細胞壁を持つ細胞で見られた脂質の分解に関与する遺伝子発現の上昇は、細胞壁を形成時に放出された細胞膜の再利用が行われていること示唆している。

研究成果の概要(英文)：Morphological and molecular analyses of the cell wall formation process in *Triparma laevis* and the new strain of Parmales were performed. Observation of the polymerization process of the silicate cell wall by transmission electron microscopy showed that the polymerization process of silica in Parmales have both patterns: a centric diatom (annulus) and pennate diatoms (sternum) type. This result suggests that the presence of the annulus and sternum as pattern centers is synapomorphic for the Parmales and diatom. The transcriptome analysis showed 214 genes were up- and 99 genes were down-regulated significantly in the walled cells compared to wall-less cells.

研究分野：形態

キーワード：細胞壁 珪素代謝 進化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

珪藻はもっとも繁栄した真核単細胞藻類であり、炭素代謝の制約を受けない珪酸質の細胞壁は、珪藻の繁栄に大きな役割を果たしたと考えられている。珪酸質を主成分とする細胞壁は、不等毛植物の大多数で見られる炭素を主成分とする細胞壁とは、形状や形成機構が大きく異なっているため、珪藻の細胞壁の進化を近縁種との比較から類推することが困難であり、珪藻の細胞壁がいつ獲得され？どのような進化を経て現在の珪藻で見られる形態に進化したのか？は、全く解っていない。珪藻と同様に珪酸質の細胞壁を持つことから、珪藻と近縁な藻類として着目されながら、培養株がないため、実体が不明であったパルマ藻 *Triparma laevis* の培養に申請者が世界で初めて成功した。形態・分子生物学的解析により、*T. laevis* は、珪藻と良く似た形質を持つ一方で、核分裂様式や葉緑体・ミトコンドリアのゲノム構造では、珪藻とは異なるが珪藻以外の不等毛植物では一般的な形質(珪藻の祖先形質)も有していることを明らかにした。よってパルマ藻は、珪藻特有と思われていた性質と珪藻では進化の過程で欠損した不等毛植物の一般的な形質の両方を持つ、珪藻と他の不等毛植物の間のミッシングリンクを解く藻類であることが強く示唆された。パルマ藻と珪藻の細胞壁の形成機構を比較すると、未解明であった珪酸質の細胞壁の進化についての知見が得られることが期待できる。

2. 研究の目的

パルマ藻や珪藻の特徴は、珪酸質の細胞壁である。分子系統解析により、パルマ藻と珪藻は1つのクレードを形成することが示されているが、珪藻の細胞壁は1対の半被殻であるのに対して、パルマ藻はプレートと呼ばれる複数のパーツから構成される点において、両者の細胞壁の形態は異なっており、パルマ藻・珪藻生物群における細胞壁の進化は不明な点が多い。申請者らは、新たに珪藻やパルマ藻とは異なる鱗片状の細胞壁を持つ新奇パルマ藻を発見した(図1)。新奇パルマ藻と典型的なパルマ藻型の細胞壁を持つ *Triparma laevis* を用いて、細胞壁形成過程の細胞学的解析と細胞壁形成に関わる遺伝子の同定を行う。得られた結果を細胞壁形成の知見が豊富な珪藻と比較し、パルマ藻・珪藻生物群における珪酸質の細胞壁の進化を明らかにする。

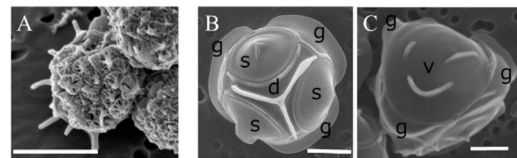


図1 パルマ藻 A: 新奇パルマ藻株, B, C: *Triparma laevis*
d: dorsal プレート g: girdle s: shield プレート v: ventral プレート
Scale bars=1 μm

3. 研究の方法

申請者らは、パルマ藻は培地中の珪素の欠乏により細胞壁がなくなること、珪素を再添加すると細胞壁を再形成することを明らかにした。この性質を利用し、細胞壁の形成過程を解析する。(1)形態学的解析: 熱硫酸法で *Triparma laevis* と新奇パルマ藻のプレート・鱗片を単離し、透過型電子顕微鏡を用いてシリカの重合過程を観察した。(2)細胞壁形成に関わる遺伝子の網羅的発現解析: 細胞壁を持つ細胞と持たない細胞の遺伝子の発現を RNA-seq 解析と GO enrichment 解析により比較した。(3)細胞壁合成に関わるホモログ遺伝子の解析: *Triparma laevis* のゲノムから検出された珪藻の珪素輸送体(silicon transporter :SIT)と珪素重合に関わるタンパク質(シリカニン)の *Triparma laevis* における機能を系統解析、定量 PCR 法、ウエスタンブロット法により解析した。

4. 研究成果

(1) 珪酸質の細胞壁形成の形態学的解析

Triparma laevis のプレート形成過程の解析

パルマ藻 *Triparma laevis* の細胞壁は、2種類の円形のプレート (shield, ventral) と2種類非円形のプレート (dorsal, girdle) の4種類の形状の異なる珪酸質のプレートの組み合わせで構成されている(図1B, C)。パルマ藻のシリカのプレートは、装飾や形状が中心珪藻の栄養細胞の被殻や増大胞子の鱗片と類似していることが知られているが、プレートの形成過程は、ほとんど調べられていないため、それらの発生学的観点からの相同性は十分に検証されていない。プレート形成過程の詳細な解析の結果、*T. laevis* 株の shield プレートは、中心珪藻と良く似た環状のパターンセンター (pattern center: PC) から形成されるが(図2A,C), ventral プレートは環状のPCだけでなく羽状珪藻とよく似た線状のPCからも形成されること(図2B,D)。環状のPCは、短い線形のシリカの重合体が湾曲しながら伸長することにより形成されること、2種類の非円形プレートは線状のPCから形成されることが示された。

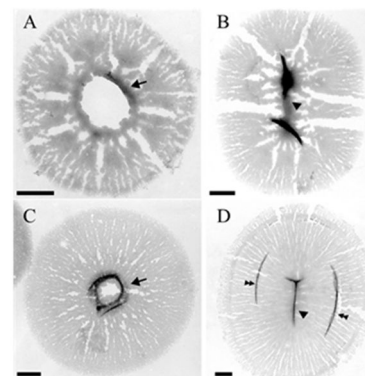


図2 環状と線状のパターンセンターを持つプレート形成の中期(A, B)および後期(C, D)段階 arrow: 環状のパターンセンター arrow head: 線状のパターンセンター double arrowheads: ペントラルプレートに特徴的な模様 Scale bars=200 nm

新奇パルマ藻のスケール形成過程の解析

鱗片の発生は、初期、中期、後期、終期の4つの段階からなることが示された(図3)。環状もしくは線状のPCから放射状に肋が伸びる過程を初期、伸長した肋同士の縁が繋がる過程を中期、中心部に突起(中心突起)が出現し、それぞれの肋に小さな顆粒状突起が形成される過程を後期、中心突起が伸長する過程を終期と定義した。中心突起が伸長した鱗片でも肋の間隙へ珪素の沈着は観察されなかった。鱗片の多くは線状のPCから形成されることが示される一方で、約3%の鱗片の形成過程では、環状PCも観察された。この結果は新奇パルマ藻株の鱗片の形成過程に、中心環を起点とするものとししないものの2パターンが存在すること示唆している。これまでの珪藻の被殻の形成過程の研究では、環状のPCをもつ中心珪藻から、羽状珪藻が進化したときに羽状珪藻の被殻形成で観察される線状PCが形成されると考えられているが、新奇パルマ藻株の鱗片の形成過程においても、*T. laevis* 株と同様に環状と線状の2パターンのPCが見られることから、パルマ藻と珪藻の共通の祖先で既に環状と線状の2種類のPCが獲得されていたことが示唆された。

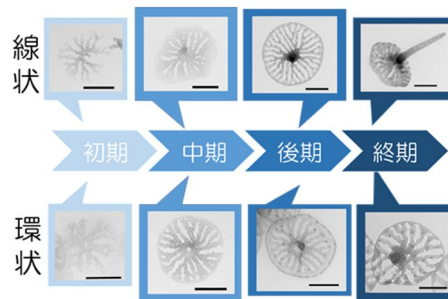


図3 鱗片の形成過程 上段:線状のパターンセンターを持つ鱗片 下段:環状のパターンセンターを持つ鱗片 Scale bars=200 nm

(2) *Triparma laevis* の細胞壁形成に関わる RNA-seq 解析

十分量の珪素を含む条件(Si+)で培養した細胞壁を持つ細胞と貧珪素条件(Si-)の細胞壁を持たない細胞では、それぞれ214と99個の遺伝子で、有意な(P<0.05)発現量の増加が検出された。Si+条件で発現量の増加が見られた遺伝子の中には、珪素と共に細胞壁を構成することが知られているポリアミンの合成に関わるO-acetylhomoserine/O-acetylserine sulfhydrylase (Acety-L-serineをL-Cysteineに変換)と5-methyltetrahydrofolate-homocysteine S-methyltransferase (L-HomocysteineをMethionineに変換)をコードする遺伝子が含まれていたこと、有意な発現量の増加が見られたと2個の遺伝子以外にもポリアミン合成に関わる全ての遺伝子の発現が確認されたことから、パルマ藻*T. laevis*のシリカ重合にも珪藻と同様にポリアミンが関与していることが示唆された。また、細胞壁を持つ細胞で、有意な発現上昇が見られた遺伝子の中には、脂肪酸の分解に関わる酵素をコードする2個の遺伝子も含まれていた。これまでの形態学的解析で*T. laevis*はエキソサイトーシスで細胞壁をシリカ沈着小胞(SDV)と共に細胞外へ放出した後、シリカ沈着小胞を細胞内に回収することが観察されている(Yamada et al. 2018)。Si+条件の細胞壁を形成している細胞に見られる脂肪酸の分解に関わる遺伝子の発現量の増加は、細胞壁を形成している細胞は、脂肪酸の分解に関わる代謝を活性化することで、膜のリン脂質のリサイクルを促進していることが示唆された。Si+とSi-条件のGO enrichment解析の結果、Si+条件では細胞壁形成や細胞壁の裏打ち構造に関わる糖合成系のGO Term (Biological process)、Si-条件ではDNA修復に関連するGO Termの出現頻度が有意に増加した。Si-条件におけるDNA修復関連遺伝子の発現上昇は、細胞壁が無い細胞では細胞壁による紫外線の吸収が無くなることに起因するかもしれない。今後、パルマ藻の任意に細胞壁の形成を制御する実験系を用いてパルマ藻のUV応答の解析を行うことにより、珪酸質の細胞壁とUV耐性の関係を解明できることが期待される。

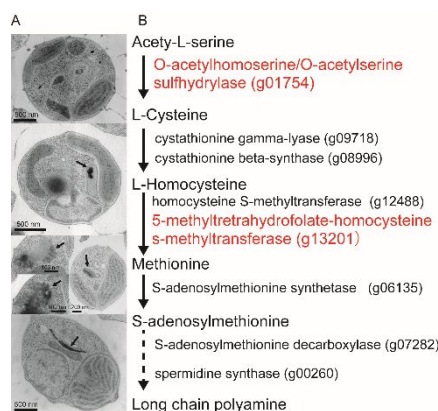


図4 細胞壁形成とポリアミン合成関連遺伝子の関係 A. 細胞壁形成過程のTEM像 矢印はシリカ沈着小胞(Silica deposition vesicle, SDV)を示す。 B. パルマ藻のゲノム中のポリアミン合成関連遺伝子、Si+条件で有意に発現量の増加が見られた遺伝子を赤色で示す。

(3) 細胞壁合成に関わるホモログ遺伝子の解析

Triparma laevis の珪素輸送体(SIT)の解析

ゲノム解析の結果から、パルマ藻*T. laevis*のケイ素輸送体(silicon transporter: SIT)は、一般的な珪藻の10回膜貫通型のSITとは異なり、膜貫通領域を20回持つ可能性が示唆されている。cDNAを用いたSIT遺伝子のクローニングにより、SIT遺伝子領域から3種類の転写産物(TlaSIT1-3)が転写されていることが示され、それぞれの転写産物から予測されるSIT1-3タンパク質の分子量は、105 kDa、72 kDa、67 kDaであった。*T. laevis*のSITタンパク質を同定するため、抗SIT抗体を作製し、免疫ブロット解析を行ったところ、250 kDa付近にバンドが検出された。この結果は、SITは細胞内では2量体もしくは3量体として存在していることを示唆している。

Triparma laevis のシリカニンの解析

珪藻の珪素重合と細胞壁形成に関わることが示されているsilicanin-1と類似性が高い遺伝子をパルマ藻*Triparma laevis*のゲノムから検出した。パルマ藻におけるsilicanin-1類似遺伝子(TI

silicanin)の機能を解明するため、2次構造解析、ドラフトゲノム解析が終了しているパルマ藻 6種 7株を用いた系統解析及を実施した。Tl silicanin は、silicanin-1 と同様に N 末端にシグナル配列と珪素重合に関与することが示唆されている RxL モチーフを持ち、C 末端領域に 2 回の膜貫通領域を持つ一方で、アスパラギン酸(N)とグルタミン(Q)を豊富に含む NQ リッチドメインを持たないことが示された。珪藻では、NQ リッチドメインが多くの種の silicanin-1 ホモログで保存されているものの珪素重合における NQ リッチドメインの役割は十分にわかっていない、Tl silicanin も silicanin-1 と同様に珪素重合に関与した場合は、NQ リッチドメインは珪素重合には必須ではないことが示唆されるため silicanin-1 の珪素重合における生化学的な機能を理解するためにも Tl silicanin の機能の検証は重要であると考えられる。Tl silicanin の系統解析では、パルマ藻の silicanin は、珪藻とは別のクレードを形成したため、パルマ藻の珪藻 silicanin-1 と類似性は高い遺伝子は、silicanin-1 のパラログ遺伝子であることが示唆された。現在、Tl silicanin の細胞壁形成過程における機能を類推するため、GFP 遺伝子と結合した Tl silicanin 遺伝子をモデル珪藻である *Thalassiosira pseudonana* の細胞内に導入することで、細胞壁形成過程における Tl silicanin の挙動を解析する準備を進めている。

< 引用文献 >

Ichinomiya M., Yoshikawa S., Kamiya M., Ohki K., Takaiichi S., Kuwata A. Isolation and Characterization of Parmales (Heterokonta/Heterokontophyta/Stramenopiles) from the Oyashio Region, Western North Pacific. *Journal of Phycology*. 2011, 47,144-151

Tajima N., Saito K., Sato S., Maruyama F., Ichinomiya M, Yoshikawa S., Kurokawa K, Ohta H, Tabata S., Kuwata A., Sato N., Sequencing and analysis of the complete organellar genomes of Parmales, a closely related group to Bacillariophyta (diatoms). *Current genetics* 62.4 (2016): 887-896.

Yamada K., Nagasato C., Motomura T., Ichinomiya M., Kuwata A., Kamiya M., Ohki K., Yoshikawa S., Mitotic spindle formation in *Triparma laevis* NIES-2565 (Parmales, Heterokontophyta), *Protoplasma* 2017, 254, 461-471.

Yamada K., Yoshikawa S., Mutsuo Ichinomiya, Mitsunobu Kamiya, Akira kuwata, Ohki Kaori Effects of silicon-limitation on growth and morphology of *Triparma laevis* (Parmales, Heterokontophyta). *PloS ONE* 2014, 9, e103589

Yamada K., Katsura H., Noël MH., Ichinomiya M., Kuwata A., Sato S., Yoshikawa, S. Ontogenetic analysis of siliceous cell wall formation in *Triparma laevis* f. *inornata* (Parmales, Stramenopiles). *J Phycol.* 55. 196-203.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamada Kazumasa, Katsura Hiroataka, No?I Mary-H?I?ne, Ichinomiya Mutsuo, Kuwata Akira, Sato Shinya, Yoshikawa Shinya	4. 巻 55
2. 論文標題 Ontogenetic analysis of siliceous cell wall formation in <i>Triparma laevis</i> f. <i>inornata</i> (Parmales, Stramenopiles)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Phycology	6. 最初と最後の頁 196 ~ 203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jpy.12800	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 Kuwata Akira, Yamada Kazumasa, Ichinomiya Mutsuo, Yoshikawa Shinya, Tragin Margot, Vaultot Daniel, Lopes dos Santos Adriana	4. 巻 5
2. 論文標題 Bolidophyceae, a Sister Picoplanktonic Group of Diatoms ? A Review	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Marine Science	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) 10.3389/fmars.2018.00370	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 該当する

1. 著者名 Yamada, K., Sato, S., Yamazaki, M., Yoshikawa, S., Kuwata, A., Ichinomiya, M.	4. 巻 68
2. 論文標題 New clade of silicified bolidophytes that belong to <i>Triparma</i> (Bolidophyceae, Stramenopiles) Phycological Research	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Phycological Research	6. 最初と最後の頁 178-182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pre.12413	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sato S, Yoshikawa S, Yamada K, Nagumo T, Idei M, Kuwata A, Ichinomiya M
2. 発表標題 Morphology, phylogeny and whole genome sequence of a hitherto undescribed scaly Parmales
3. 学会等名 25th International Diatom Symposium. Berlin, GERMANY. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤晋也, 吉川伸哉, 南雲保, 桑田晃, 山田和正, 一宮睦雄
2. 発表標題 バルマ藻未 記載分類群の形態と系統およびゲノム解析
3. 学会等名 日本珪藻学会第39回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉川伸哉, 山田和正, 桂大貴, 一宮睦雄, 桑田晃, 佐藤晋也
2. 発表標題 バルマ藻の殻形成に関する形態学的解析
3. 学会等名 日本藻類学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinya Yoshikawa, Shinya Sato, Masashi Yamazaki, Kazumasa Yamada, Mutsuo Ichinomiya, Kenji Saitoh, Yoji Nakamura, Naoki Sato, Akira Kuwata
2. 発表標題 Morphological and transcriptome analysis in cell wall formation of <i>Triparma laevis</i>
3. 学会等名 Molecular Biology of diatoms (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉川 伸哉, 佐藤 晋也, 山崎 誠司, 一柳 紀凜, 山田 和正, 一宮 睦雄, 斉藤 憲治, 中村 洋路, 佐藤 直樹, 桑田 晃
2. 発表標題 バルマ藻 <i>Triparma laevis</i> の細胞壁形成機構の解
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉川伸哉 山田和正 桂大貴 一宮睦雄 桑田晃 佐藤晋也
2. 発表標題 バルマ藻の殻形成についての研究
3. 学会等名 日本珪藻学会
4. 発表年 2017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	長里 千香子 (Nagasato Chikako) (00374710)	北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・教授 (10101)	