

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05818

研究課題名(和文)珪藻のシリカ被殻形成関連タンパク質の動態解析に基づく被殻形成機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of silica cell wall formation by monitoring the expression dynamics of the cell wall formation-related proteins

研究代表者

根本 理子(Nemoto, Michiko)

岡山大学・環境生命科学研究所・助教

研究者番号：30625926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、珪藻細胞内で段階的に被殻の微細構造が形成されていく過程で、被殻形成関連タンパク質の発現パターンがどのように変化するかを解析し、被殻形成における役割を明らかにすることを目的とした。珪藻種間の大規模な遺伝子比較解析から、珪藻のみに保存された新規のメチルトランスフェラーゼファミリーを見出すことができた。また、プロテオーム解析により、*Nitzschia palea*の新規被殻局在タンパク質を同定した。発現解析の結果、珪藻特異的メチルトランスフェラーゼおよび被殻局在タンパク質の発現はケイ素にตอบสนองして上昇しており、これらの遺伝子がシリカ被殻形成に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、珪藻の被殻形成関連タンパク質として同定・報告されたタンパク質はジメチル化およびトリメチル化されたリジン残基を持つことが知られており、シリカ形成におけるメチル化修飾の重要性が示唆されていたが、珪藻の被殻形成関連タンパク質をメチル化する酵素は見つかっていなかった。本研究により同定された珪藻特異的新規メチルトランスフェラーゼは、被殻形成関連タンパク質をメチル化することで、珪藻のシリカ形成を制御するタンパク質であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to get insight into the function of silica cell wall formation-related proteins by analyzing the expression pattern of these transcripts during the silica cell wall formation in diatoms. The comprehensive comparative analysis of eight diatom species identified a number of diatom-specific genes that have likely associations with silica cell wall formation, including a previously unrecognized SET domain protein methyltransferase family. Subsequent proteomic analyses revealed the presence of specific silica cell wall-associated proteins in *Nitzschia palea*. Expression analysis showed that the expression of the diatom-specific SET domain proteins and silica cell wall-associated proteins were upregulated in response to silicon, suggesting that these genes play roles in silica cell wall formation.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：珪藻 バイオミネラリゼーション RNA-seq解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

珪藻はシリカ (SiO₂) から成る被殻を細胞壁として持つ微細藻類である。珪藻の被殻は、現在の微細加工技術では合成困難なナノパターン構造を有する。近年、その微細構造に由来する特性を生かし、フォトニック結晶、ガスセンサー、分子フィルター、固定化酵素の担体などナノテクノロジー分野への応用が報告されており、今後ますますその応用範囲の拡大が期待される。珪藻の被殻形成機構を明らかにできれば、上記分野への応用が可能な新しいセラミックス材料を開発できる可能性がある。

これまで珪藻の被殻形成機構の解明に向けた研究は、ゲノムが解読された小型のモデル珪藻 *Thalassiosira pseudonana* (最大長径 5 μm) を中心に行われてきた。*T. pseudonana* からは配列中にリジン、セリンを多く含有する被殻局在タンパク質が複数同定されており、被殻形成への関与が示唆されている。申請者の先行研究においても、小型珪藻 *Fistulifera solaris* のゲノムから、被殻に局在するリジンセリンリッチタンパク質が同定され、被殻形成への関与が示唆された (Nemoto, Marine Genomics, 2014)。被殻に局在することが示されたリジンセリンリッチタンパク質はコラーゲン様の繰り返し配列を有しており、骨形成に関わるコラーゲンと同様、自己組織化することで、シリカの構造形成に関わっていることが推察されるが、その機能は不明である。珪藻の被殻局在タンパク質は 1994 年に初めて分離同定され、その後、申請者が同定したものも含め、複数のタンパク質が同定、報告されてきた。しかし、未だにそれらの被殻形成における機能を明らかにできない最大の理由は、被殻形成が珪藻の生存に必須である為、遺伝子破壊による被殻形成関連タンパク質の機能解析ができないことである。

申請者は、被殻形成過程を詳細に解析するため、中型~大型の様々な非モデル珪藻を用いてセルサイクルを揃えるための同調培養の条件検討を行った。その結果、最大長径 15-30 μm の中型の珪藻について、同調培養の条件を確立し、さらに被殻形成過程の細胞を捉えることに成功した。上記結果に基づき、申請者は同調培養の条件を確立した中型の珪藻種を用いて、被殻形成の過程で形成関連タンパク質が“いつ”“どこで”発現しているかを詳細に解析することで、上記タンパク質のシリカ被殻形成における役割を明らかにすることを着想した。

2. 研究の目的

本研究では、珪藻細胞内で段階的に被殻の微細構造が形成されていく過程で、被殻形成関連タンパク質の発現・局在パターンがどのように変化するかを解析し、被殻形成における役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 珪藻株

Nitzschia palea (NIES-487) および *Achnanthes kuwaitensis* (NIES-1349) は国立環境研究所の微生物系統保存施設より入手した。*Pseudoleyanella lunata* は福井県立大学の中村憲章氏より提供を受けた。

(2) RNA-seq によるトランスクリプトームデータの取得及びバイオインフォマティクス解析

3種の珪藻、*N. palea*、*A. kuwaitensis*、*P. lunata* から RNA を抽出し、トランスクリプトームデータを取得した。対数増殖期の藻体を遠心回収した後、ただちに液体窒素で凍結した。その後、藻体と同重量のジルコニアビーズと TRI REAGENT を添加し、ビーズビーターで細胞を破碎し、RNA を抽出した。抽出した RNA から次世代シーケンサ解析のためのライブラリを作製後、次世代シーケンサ Illumina HiSeq 2500 を用いて RNA シーケンス解析を行なった。バイオインフ

オマティクス解析は国立遺伝学研究所のスーパーコンピュータを利用して行った。RNA シーケンス解析から得られたリード配列に対し、アダプター配列および低クオリティ配列をトリミングした。トリミング後のリード配列をアセンブルすることでコンティグ配列を取得した。得られたコンティグ配列をトランスクリプトームデータとして、遺伝子比較解析に利用した。また、*T. pseudonana*、*Phaeodactylum tricornutum*、*F. solaris*、*Thalassiosira oceanica* および *Fragilariopsis cylindrus* のゲノムから予測された遺伝子配列を NCBI の GenBank データベースより取得し、相同性検索に基づく遺伝子比較解析に利用した。

(3) シリカ被殻局在タンパク質の抽出及び同定

シリカ被殻中に含まれるタンパク質の抽出は以下の方法を用いて行った。1.5 L の培地で一週間培養を行い、遠心回収後-20°C保存しておいた藻体のペレットに、2%SDS、100 mM EDTA を添加し、100°C、30 分加熱処理した。遠心後、沈殿に対し同操作を再度行い、シリカ被殻以外の細胞成分を除去した。その後、シリカ被殻表面に残った有機物をさらに除去するためアセトンを用いて、シリカ被殻が完全に白くなるまで洗浄を行った。超純水で洗浄後、overnight で凍結乾燥したものをシリカ被殻画分とした。得られたシリカ被殻に対し、フッ化水素酸を添加し、シリカを溶解させた。その後、遠心し不溶性画分を除去した後、上清画分を真空下で乾燥させた。乾燥後のペレットを 100 mM Tris-HCl (pH8.8) に懸濁した。この溶液をシリカ被殻局在タンパク質画分とした。上記のシリカ被殻局在タンパク質を、定量後、トリシン SDS-PAGE を用いて分離した。その後、SDS-PAGE のバンドを切り出し、各種プロテアーゼを用いてゲル内消化を行うことでペプチドを抽出した。抽出したペプチドは HPLC-Chip/QTOF MS を用いて解析した。

(4) 遺伝子発現解析

同定したタンパク質の遺伝子発現解析には *N. palea* を用いた。*N. palea* の細胞を対数増殖期まで培養した後、Si を添加しない培地 (-Si 培地) で洗浄し、再度-Si 培地に懸濁し 24 時間培養を行なった。その後、ケイ素を終濃度 352 μ M になるように添加し、ケイ素添加前、添加後 5 分、5 時間、11 時間、14 時間、17 時間 および 20 時間に培養液を回収し、培養液中のケイ素濃度及び細胞数を測定した。また、同培養液の細胞から前述した方法を用いて RNA を抽出した。ケイ素濃度測定にはモリブデンブルー法を用いた。抽出した RNA から cDNA を合成し、qRT-PCR 解析を行なった。各時間における目的遺伝子の発現量を TATA box 結合タンパク質遺伝子の発現量で正規化することで相対比較した。

4. 研究成果

(1) 被殻形成関連候補タンパク質の同定

①遺伝子比較解析に基づく被殻形成関連タンパク質の同定

本研究で取得した珪藻 3 種のトランスクリプトームデータとデータベース上に公開されている 5 種の珪藻の遺伝子情報を用いて、相同性検索による遺伝子情報の比較を行った。その結果、これまで *Cylindrotheca* 属からしか見つかっていなかった Pleuralin タンパク質に相同性を示すタンパク質が *N. palea* にも存在することが初めて示された。Pleuralin タンパク質はシリカ被殻内部に強固に結合し、シリカ形成に関与することが示唆されている。これまで、Pleuralin タンパク質は *Cylindrotheca* 属特異的なタンパク質と考えられていたが、本結果より、*Cylindrotheca* 属と *Nitzschia* 属に共通する被殻構造の形成に関与するタンパク質であることが示唆された。

本研究で取得した珪藻のトランスクリプトームデータとデータベース上の珪藻の遺伝子情報の網羅的な比較解析の結果、6,841個から15,654個の遺伝子が8種の珪藻間で保存されていた。そのうち、590個から1,830個の遺伝子は珪藻以外の生物の遺伝子に相同性を示さない、珪藻特異的遺伝子であった。*F. cylindrus*のゲノムからスクリーニングされた845個の珪藻特異的遺伝子を用いて、さらにN末端にERシグナルペプチドをコードするものを探索した。探索の結果、845個のうち、73個の遺伝子がERシグナルペプチドをコードしていた。73個の遺伝子をqueryとして、既知の被殻形成関連タンパク質に対してBLAST解析を行なったところ、そのうち12個が、全ての珪藻間で保存されている被殻形成関連タンパク質のsilicanin-1もしくはそのホモログだった。残りの61個についてさらに、SMARTを用いたタンパク質ドメイン検索を行なったところ、7個がSETドメインを有していた。SETドメインタンパク質はリジン残基のメチル化活性を持つことが報告されている。この珪藻(Bacillariophyceae)特異的SETドメインタンパク質ファミリーをBacSETタンパク質と命名し、さらに解析を行なった。同定したBacSETタンパク質は1個から4個のSETドメインを有していた(図1)。BacSETタンパク質のSETドメインとシロイヌナズナのLSMT(AtLSMT)および酵母のHMT(ScHMT)をアライメントした結果、推定の活性中心残基であるチロシンおよび、メチル基供与体であるS-アデノシルメチオニンの結合に関わる残基は保存されていたが、基質結合に関わる残基は保存されていなかった。*C. fusiformis*の被殻から分離され、シリカ形成活性を持つことが示されているsilaffinペプチドはジメチル化およびトリメチル化されたリジン残基を持つことが報告されている。また、他の珪藻から分離されたタンパク質やLCPAsもメチル化されていることが示されている。さらに、合成ポリアミンやシラフィンペプチドを用いた研究から、メチル化の有無が形成されるシリカの形状に影響することが報告されている。このことから、BacSETタンパク質は被殻形成関連タンパク質やLCPAsを基質とするこれまでに報告のない新規のメチルトランスフェラーゼファミリーであることが示唆された。

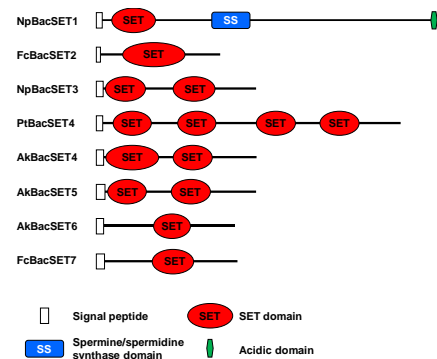


図1. 珪藻(Bacillariophyceae)特異的SETドメインタンパク質ファミリーの模式図
Fc, *Fragilariopsis cylindrus*;
Pt, *Phaeodactylum tricornutum*;
Np, *Nitzschia palea*;
Ak, *Achnanthes kuwaitensis*

②シリカ被殻局在タンパク質のプロテオーム解析による被殻形成関連タンパク質の同定

*N. palea*のシリカ被殻局在タンパク質を同定するため、シリカ被殻局在タンパク質の抽出及び解析を行った。大量培養した藻体を、SDS、EDTAおよびアセトンを用いて、洗浄することで、シリカ被殻のみ精製した。得られたシリカ被殻に対し、フッ化水素酸を添加し、シリカを溶解させタンパク質を抽出した結果、被殻重量mg当たり $4.5 \pm 0.7 \mu\text{g}$ のタンパク質を再現よく抽出できた。抽出した被殻局在タンパク質をトリシンSDS-PAGEを用いて分離した。その結果、低分子領域に複数のタンパク質バンドが確認された(図2)。得られたタンパク質バンドからペプチドを抽出し、HPLC-Chip/QTOF MSを用いて解析した結果、14個のタンパク質が同定された。14個のうち2個は既知のタンパク質に相同性を示さない新規タンパク質だった。これらをNpSMP1とNpSMP2と命名した。NpSMP1は、ERシグナルペプチドを持ち、珪藻のみに保存された73個のタンパク質のうちのひとつであった。

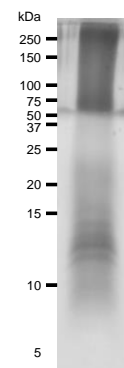


図2. *N. palea*のシリカ被殻から分離されたタンパク質のSDS-PAGE結果

(2)シリカ被殻形成過程における被殻形成関連タンパク質の遺伝子発現解析

(1)で同定した被殻形成関連タンパク質候補について、被殻形成過程における遺伝子発現量変化を解析するため、*N. palea*の同調培養を行い、被殻形成時の遺伝子発現パターンを解析した。ケイ素を添加後、20時間後には培地中のケイ素濃度は352 μM から0.2 μM まで減少した。また、14時間後から細胞増殖が確認された。遺伝子発現解析の結果、被殻形成関連タンパク質の発現パターンは大きく4つに分けられることがわかった(図3)。silicanin-1 (Np16494)、NpSMP2(Np23207)、NpBacSET6 (Np5036) および NpBacSET7

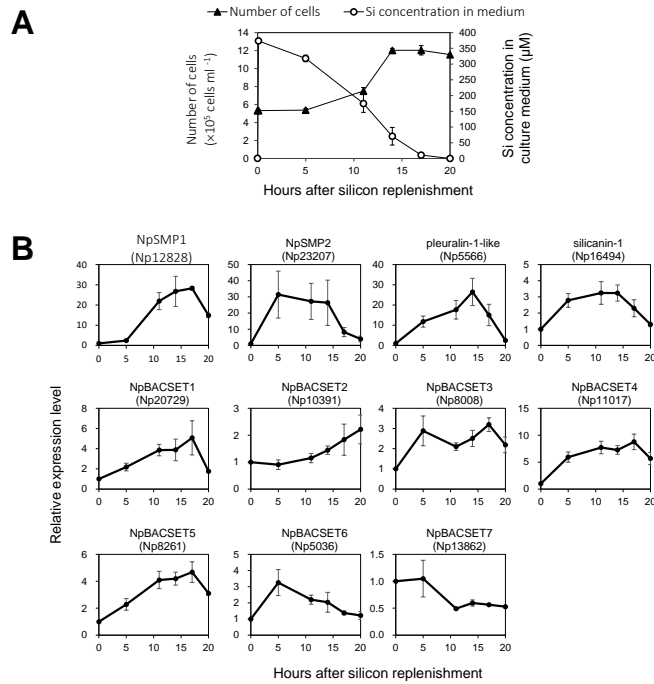


図3. *N. palea*の被殻形成過程における遺伝子発現変動の解析結果。ケイ素添加後、各時間における培地上清中のケイ素濃度および細胞数の変化(A)と被殻形成関連タンパク質遺伝子の発現量変化(B)

(Np13862)の発現はケイ素添加後5hの被殻形成初期に発現が大きく誘導されており、これらは被殻形成初期に機能していると考えられた。NpSMP1(Np12828)、NpBacSET5 (Np8261) および NpBacSET1 (Np20729) は被殻形成後期に発現が誘導され、殻が形成され増殖が止まった後に発現が低下しており、被殻形成後期に機能していると考えられた。NpBacSET3 (Np8008)、NpBacSET4 (Np11017) および NpBacSET2 (Np10391) の発現パターンには培地中のケイ素濃度変化や細胞増殖との関連は見られなかった。*N. palea*で同定された Pleuralin タンパク質のホモログ (Np5566)は細胞分裂直後に最も発現が誘導されていた。細胞分裂後の娘細胞では、側面の殻が少しずつ作られることで、細胞が伸長していく。細胞分裂直後に最も発現が誘導されていた pleuralin ホモログは細胞伸長後の殻の側面に局在していることが示唆された。

本研究では、初めて珪藻 *N. palea*, *A. kuwaitensis*, *P. lunata*の3種のトランスクリプトームデータを構築した。得られたトランスクリプトームデータは、珪藻の被殻形成機構やその他の生理学的機構を理解するための新たな基盤情報となる。さらに、本研究では、初めての珪藻種間の大規模な遺伝子比較解析を行った。その結果、珪藻のみに保存された新規のメチルトランスフェラーゼファミリーを見出すことに成功した。また、プロテオーム解析により、*Nitzschia palea*の新規被殻局在タンパク質を同定した。発現解析の結果、珪藻特異的メチルトランスフェラーゼおよび被殻局在タンパク質の発現がケイ素に応答して上昇しており、これらの遺伝子がシリカ被殻形成に関与していることが示唆された。今後、本研究により新たに見いだされた珪藻特異的SETドメインタンパク質ファミリーの基質の特定や被殻局在タンパク質の細胞内局在解析により、これらのタンパク質の被殻形成における役割が明らかになることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nemoto, M., Iwaki, S., Moriya, H., Monden, Y., Tamura, T., Inagaki, K., Mayama, S. and Obuse K.	4. 巻 22
2. 論文標題 Comparative gene analysis focused on silica cell wall formation: Identification of diatom-specific SET domain protein methyltransferases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Marine Biotechnology	6. 最初と最後の頁 551-563
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10126-020-09976-1	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 岩城沙弥子, 小布施祈織, 田村隆, 稲垣賢二, 根本理子
2. 発表標題 珪藻種間の遺伝子比較解析およびプロテオーム解析に基づくシリカ細胞壁形成関連タンパク質の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第56回講演会（例会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 根本理子, 岩城沙弥子, 岡田航輝, 田村隆, 稲垣賢二, 真山茂樹, 小布施祈織
2. 発表標題 Nitzschia属珪藻を用いた被殻形成関連タンパク質の解析
3. 学会等名 第6回分子珪藻研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 根本理子
2. 発表標題 RNA-seqを利用したバイオミネラリゼーション機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部 第30回若手シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩城 沙弥子, 小布施 祈織, 田村 隆, 稲垣 賢二, 真山 茂樹, 根本 理子
2. 発表標題 非モデル珪藻のトランスクリプトーム解析およびプロテオーム解析に基づく被殻形成関連タンパク質の同定
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Michiko Nemoto, Sayako Iwaki, Takashi Tamura, Kenji Inagaki, Shigeki Mayama, Kiori Obuse
2. 発表標題 Transcriptome and proteome analysis of non-model diatom species toward understanding of silica biomineralization
3. 学会等名 Marine Biotechnology Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sayako Iwaki, Kiori Obuse, Takashi Tamura, Kenji Inagaki, Shigeki Mayama, Michiko Nemoto
2. 発表標題 Comparative transcriptomics of three diatom species focused on silica biomineralization
3. 学会等名 The molecular life of diatoms (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩城沙弥子、小布施祈織、田村隆、稲垣賢二、根本理子
2. 発表標題 3種の珪藻の比較トランスクリプトーム解析に基づく細胞壁形成関連タンパク質の同定
3. 学会等名 おかもやまバイオアクティブ研究会 第55回シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 根本理子
2. 発表標題 生体鉱物の形成に関わるタンパク質の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部 第29回若手シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩城沙弥子、田村隆、稲垣賢二、根本理子
2. 発表標題 珪藻Nitzschia paleaの被殻形成関連タンパク質の同定
3. 学会等名 第20回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白石幸首、田村隆、稲垣賢二、真山茂樹、根本理子
2. 発表標題 ゲノム未知の珪藻からの遺伝子転写調節領域の取得及びそれを利用した形質転換用ベクターの構築
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第53回講演会 (例会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 根本理子、岩城沙弥子、田村隆、 稲垣賢二、小布施祈織
2. 発表標題 異なる珪藻種間の遺伝子比較解析およびプロテオーム解析に基づく珪藻の被殻形成因子の探索
3. 学会等名 第5回分子珪藻研究会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------