

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05832

研究課題名(和文)オートファジーと並行して働く藻類の細胞生存維持機構の解明

研究課題名(英文) Algal regulatory factors involved in maintenance mechanism for cell viability cooperating with autophagy

研究代表者

梶川 昌孝 (Kajikawa, Masataka)

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号：40594437

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)：緑藻クラミドモナスにおいて細胞生存を制御する新奇分子機構の解明を目指し、栄養欠乏条件において早期生存性低下を示すタンパク質リン酸化酵素遺伝子の変異株21B1の解析を行った。21B1変異株に野生型21B1-FLAG融合タンパク質を発現させると表現型が相補した。また21B1変異株と野生型との交配後代では21B1遺伝子への変異と表現型が連鎖した。以上より21B1変異株の表現型は21B1遺伝子への変異によることが示唆された。組換え21B1タンパク質はカゼインに対してリン酸化活性を示した。21B1-FLAG発現相補株の総タンパク質に対するFLAG抗体による免疫沈降により相互作用因子候補のシグナルを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

藻類を用いた有用物質生産を実用化するためには、藻類自体のストレスに対する頑健性(レジリエンス)を向上させることが欠かせない。本研究において窒素、硫黄、リンといった主要栄養素の欠乏に対して適応するのに重要な制御因子であるタンパク質リン酸化酵素を同定することに成功した。有用物質生産藻類種においてこの因子の発現を強化することで、栄養欠乏条件に晒されても生存性を維持することが可能になると期待される。また、この因子の働きの高さを指標にして、レジリエンスの高い藻類種を選抜することも可能になると期待される。また、本因子の基質や相互作用因子を同定することでリン酸化による分子制御機構の包括的な解明につながる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate novel molecular mechanisms regulating cell survival in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, we analyzed a mutant strain of the protein kinase gene 21B1, which exhibits early viability loss under nutrient-deprived conditions. In the 21B1-complementation lines expressing the wild-type 21B1-FLAG fusion protein, the phenotype was recovered. Insertional mutation in the 21B1 gene and phenotypes were linked each other in the progeny lines between the 21B1 mutant and the wild-type strain. These results suggest that the phenotype of the 21B1 mutant is due to mutation of the 21B1 gene. The recombinant 21B1 protein exhibited phosphorylation activity against casein. Immunoprecipitation of total protein of the 21B1-FLAG-expressing complemented strain with FLAG antibody provided some signals for candidate interaction factors with the 21B1 protein.

研究分野：藻類分子生物学

キーワード：藻類 環境応答 栄養欠乏ストレス タンパク質リン酸化酵素 細胞内シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

酵母、動物において細胞生存性維持に target of rapamycin (TOR) キナーゼの下流で働くオートファジーは必須の分子機構である。植物においてもオートファジー形成に必須なコア ATG 遺伝子群とオートファジーの仕組みは保存されており、栄養欠乏時の細胞生存の維持や葉緑体などのオルガネラのリサイクルに必要であることが示されている。一方、水生の光合成生物である藻類においても ATG 遺伝子群などオートファジーの構成因子は保存されているが、その生理学的な意義についてはまだ不明な点が多かった。そこで我々はオートファジー不能となる *ATG8* および *ATG3* 遺伝子の変異株を緑藻クラミドモナスから初めて単離し、その表現型解析から藻類のオートファジーが窒素や硫黄・リンといった栄養欠乏時の細胞生存を維持するために必要であり、さらに光合成同化産物の量的制御にも関与することを示した (Kajikawa et al., Plant Cell Physiol., 60, 126-138, 2018)。他方、細胞生存性の維持に働く機構は ATG に依存した従来型オートファジーだけなのであるだろうか。動物や菌類ではオートファジーは生活環を完結するのに必須であるが、クラミドモナスの *atg* 変異株ではオートファジーが不能であるにも関わらず栄養欠乏下での生存率は野生型よりも有意ではあるものの緩やかな減少に留まり、またモデル植物のシロイヌナズナの *atg* 変異株と同様に生活環を完結することができた (Kajikawa et al., 2018)。このことから、藻類や陸上植物には既知のオートファジーとは異なる新奇な栄養リサイクルと細胞生存性維持の仕組みが存在することが強く示唆される (図1)。この仮説に答えることはバイオ燃料源等への利用に適した栄養欠乏ストレスに強い藻類の育種のための重要な基礎的知見となる。そこで変異株のハイスループット解析が容易な緑藻クラミドモナスを活用して、ATG に依存した従来型オートファジーと並行して働く、栄養リサイクルと細胞生存性維持に必要な未知の分子機構を明らかにする。

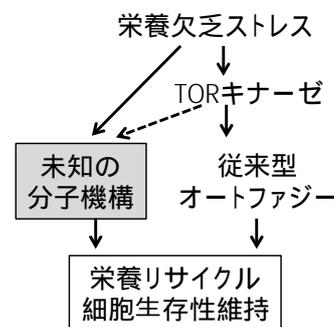


図1 栄養欠乏下の細胞生存性維持機構

本研究では、ハイスループットな変異株スクリーニングによる順遺伝学解析系が確立されたモデル緑藻クラミドモナスの *atg* 変異株を活用し、植物界で先駆けて従来型オートファジーとは異なる新奇な細胞生存を制御する分子機構の包括的な解明を目指す。モデル植物シロイヌナズナの *atg* 変異株を用いた研究からそのような分子機構が植物に存在することは予想されているが、多細胞生物であり器官分化の進んだ陸上植物においては、従来型オートファジーの作用は複雑多岐に渡っており、オートファジー不能の *atg* 変異株を元にした二重変異株が取得できても新奇因子の探索や従来型オートファジーとの切り分けは困難である。またシロイヌナズナの ATG 遺伝子の多くは遺伝子ファミリーを構成しており、新奇因子も同様に遺伝子ファミリーを構成していた場合には互いの機能重複によって順遺伝学的に変異株が単離できる確実性は乏しい。一方、クラミドモナスは単細胞性の緑藻であり、ATG 遺伝子の大半はゲノム中に1コピーのみ存在することから、シンプルなオートファジー駆動機構を持つと考えられる。オートファジーとはパラレルな新奇分子機構を担う遺伝子も同様に重複が少ないことが期待され、実際に窒素欠乏条件において *atg8* よりも早期に細胞死を起こす *atg8* 二重変異株 (スーパーアーリーデス変異株; *sed*) を約 2,000 株の母集団から複数株単離出来ている。また交配による遺伝学が可能で DNA タグ挿入ライブラリも整備されたクラミドモナスは、新奇因子の単独変異株を比較的容易に取得することができる。そのため、*atg8*、新奇因子の単独変異株、*atg8* 二重変異株 (*sed*) 間の表現型を比較することで、従来型オートファジーの機能と新奇因子の機能とを切り分けることが可能である。

予備的知見として既に単離した *sed-1* および *sed-2* 変異株は、通常栄養条件での生育は正常である一方、窒素欠乏条件での細胞生存性が6日目にそれぞれ 3%および 25%に低下した。同条件において親株の *atg8* 変異株では 50%、野生株は 90%の細胞が依然生存していたことから、*sed-1* および *sed-2* 変異株はスーパーアーリーデス変異株であるといえる (図2)。これらの変異株ではいずれも同一遺伝子の第3および第8エキソンにそれぞれ DNA タグが順向きに挿入されていた。同様の表現型を示す複数の変異株において同一遺伝子に挿入が見られたことから、これが変異原因遺伝子である可能性が高い。この遺伝子のコードするタンパク質は DNA ポリメラーゼ III γ/τ サブユニットと低い相同性 (E-value: $7e-04$) を示すドメインを持つがその機能は未知であり、細胞生存性の維持に関与する新奇因子であることが期待される。

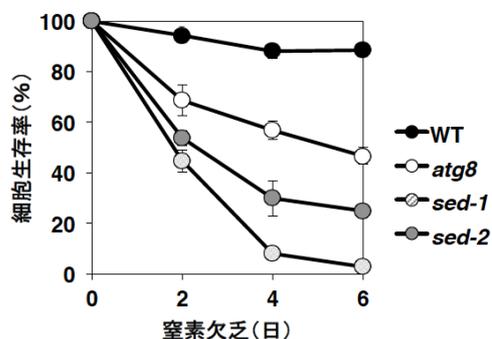


図2 窒素欠乏条件での細胞生存率

本研究ではさらに、新たな *sed* 変異株の探索と解析を進め、クラミドモナスの栄養欠乏下での

細胞生存性を維持するための分子機構の包括的な解明を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、ハイスループットな変異株スクリーニングによる順遺伝学解析系が確立されたモデル緑藻クラミドモナスの *atg* 変異株を活用し、それに二重変異を施すことでスーパーアーリーデス *sed* 変異株を単離する。*sed* 変異株の原因遺伝子を機能解析することにより、従来型オートファジーとは異なる新奇な藻類の細胞生存を制御する分子機構の包括的な解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究の目的である栄養リサイクルと細胞生存性維持に必要な、従来型オートファジーとは異なる藻類の新奇分子機構を明らかにするため、以下の3つの研究項目を設定し、遂行した。

① *sed-1* および *sed-2* 変異株の原因遺伝子の同定と機能解析

sed-1 および *sed-2* 変異株はどちらも *ATG8* に加えて DNA polIII γ/τ サブユニット様ドメインを持つ遺伝子に挿入変異を持つ。同一遺伝子のアレル変異株が複数得られたことから、これが変異原因遺伝子である可能性が高い。そこで相補実験として野生型の遺伝子断片を *sed-1* および *sed-2* 変異株に導入し、窒素欠乏下での細胞生存性に関する表現型が親株の *atg8* 変異株並に回復するかを検証する。また遺伝解析のために、*sed-1* および *sed-2* を野生株と交配し、子孫株において、この遺伝子への挿入変異のみを持つ子孫株を選び出し、表現型解析に供する。

② 窒素、硫黄およびリン欠乏条件での新たな *sed* 変異株の探索

目視およびエバンスブルー染色による細胞生死判定法を組み合わせた簡便かつハイスループット *sed* 変異株スクリーニング系により、約 2,000 株の *atg8* への二重変異株の中から窒素欠乏条件での *sed* 変異株の探索を行い、既に *sed-1* および *sed-2* を含む計 10 系統の変異株を得ている。各変異株ゲノム中の DNA タグが挿入された遺伝子を調べたところ既知の *ATG* 遺伝子やその他のオートファジー関連の既知因子と相同性を示す遺伝子は含まれなかった。このことから *sed* 変異株の多くは *atg8* 変異と従来型オートファジー以外の新奇機構に関わる因子の二重変異によるものである可能性がある。今後、さらに栄養欠乏条件における細胞生存性維持に関わる新奇因子を同定するために、新たに *ATG9* 遺伝子の変異株への二重変異導入による形質転換体ライブラリーを構築し、窒素欠乏に加えて硫黄およびリン欠乏の計 3 条件での *sed* 変異株スクリーニングを同時並行的に進める。

③ 新奇 *sed* 変異株の機能解析

窒素、硫黄およびリンの各欠乏条件で単離した *sed* 変異株を、複数の栄養欠乏に共通して細胞生存性が早期低下する変異株と各栄養条件に限定した表現型を示す変異株にグループ分けする。*atg* 変異株はこれら 3 種類の栄養欠乏全てで野生株より生存率が低下する。同様に複数の栄養欠乏において共通して表現型を示す *sed* 変異株は従来型オートファジーに匹敵する細胞生存性維持の必須因子である可能性があるため、優先的に変異原因遺伝子の同定および単独変異株の取得とその機能解析を進める。また原因遺伝子が植物界に広く保存されている場合には、植物に普遍的な細胞生存性維持の仕組みに関わることが期待されるので優先的に解析する。各変異株の原因遺伝子が同定されれば互いの二重変異株の作出と表現型解析、コードするタンパク質間の相互作用の有無、細胞内局在場所の重複を調べることで、それぞれの新奇因子が同一の分子機構を構成しているか、別々の分子機構に属するものかを推定する。

4. 研究成果

① *sed-1* および *sed-2* 変異株の原因遺伝子の同定と機能解析

sed-1 および *sed-2* 変異株はどちらも *ATG8* に加えて DNA polIII γ/τ サブユニット様ドメインを持つ遺伝子に挿入変異を持つ。そこで相補実験として野生型の遺伝子断片を *sed-1* および *sed-2* 変異株に導入し、窒素欠乏下での細胞生存性に関する表現型が親株の *atg8* 変異株並に回復するかを検証した。しかしながら、*sed-1* および *sed-2* 変異株にこの遺伝子を導入した形質転換株では、いずれも、細胞生存性に関する表現型は回復しなかった。この結果から、この遺伝子は *sed-1* および *sed-2* 変異株の原因遺伝子ではないと結論づけた。

② 窒素、硫黄およびリン欠乏条件での新たな *sed* 変異株の探索

atg8 とは異なる他のオートファジー関連遺伝子 *ATG9* の変異株 (*atg9*) をもとに約 5,000 株の形質転換株より窒素 (N) 欠乏、硫黄 (S) およびリン (P) 欠乏の計 3 条件での *sed* 変異株スクリーニングを進めた。その結果、もとの *atg9* 変異株と比べてどの栄養欠乏条件においても生存性が早期に低下する *sed* 変異株を新たに 38 系統単離することに成功した。これらの変異株の挿入変異遺伝子を Tail PCR 法により同定したところ、そのうち 2 つの系統 (1C7 および 21B1 変異株) ではそれぞれ異なるタンパク質リン酸化酵素遺伝子に変異を持つことを突き止めた。

③新奇 *sed* 変異株の機能解析

オートファジー変異株 (*atg9*) への更なる変異導入により選抜された N・S・P のいずれの栄養欠乏条件においても生存性が親株よりも早期に低下する変異株 1C7 および 21B1 変異株の解析を進めた。前項目で、これらの変異株ではそれぞれ異なるタンパク質リン酸化酵素遺伝子 (1C7 遺伝子、21B1 遺伝子と名付けた) に挿入変異を持つことを明らかにした。それぞれの変異株と野生型との交配により得られた子孫株において、ATG9 遺伝子への変異とそれぞれのタンパク質リン酸化酵素遺伝子の変異を分離した。1C7 遺伝子あるいは 21B1 遺伝子にのみ変異をもつ子孫系統の生存率に関する表現型は、元の 1C7 および 21B1 変異株と同等であった。このことから、1C7 および 21B1 変異株における生存率低下の表現型には ATG9 遺伝子の変異は寄与せず、もっぱら 1C7 遺伝子あるいは 21B1 遺伝子への変異によるものであることが示唆された。

それぞれの単独変異子孫株に野生型の 1C7 遺伝子および 21B1 遺伝子を導入すると変異表現型は野生型と同程度まで回復した。表現型が相補したことから、先の遺伝解析の結果と合わせて、1C7 遺伝子あるいは 21B1 遺伝子をそれぞれの変異株の原因遺伝子であると結論づけた。以上の結果をまとめ、2020 年藻類談話会の招待講演において学会発表した。

21B1 遺伝子に FLAG タグを連結したプラスミドを構築し、21B1 遺伝子の単独変異株に導入したところ、栄養欠乏下での生存率低下に関する表現型の回復とともに、FLAG 抗体を用いたウェスタン解析において 21B1-FLAG タンパク質に相当するサイズにシグナルが見られた。このシグナルの強度は栄養欠乏条件の切り替えの前後で変化しなかったことから、21B1 タンパク質の発現レベルは栄養欠乏による制御を受けていないことが示唆された。

21B1 遺伝子に蛍光タンパク質 Venus 遺伝子および FLAG タグを合わせて融合したプラスミドを構築し、21B1 遺伝子の単独変異株に導入したところ、栄養欠乏下での生存率低下に関する表現型の回復とともに、FLAG 抗体を用いたウェスタン解析において 21B1-Venus-FLAG タンパク質に相当するサイズにシグナルが見られた。これらの系統の細胞内の Venus 由来蛍光パターンの観察により 21B1-Venus-FLAG タンパク質の細胞内局在場所の推定を進めたところ、鞭毛基部にある収縮胞において特異的な蛍光シグナルが見られた。また、この蛍光パターンは栄養欠乏、栄養十分条件のそれぞれで同様であった。この観察結果から、21B1 タンパク質は恒常的に収縮胞に局在する可能性が示唆された。

一方で、リン酸化活性に必須と推定されるリジン残基のコドンをメチオニン残基のコドンに置換した変異型 21B1 遺伝子を 21B1 遺伝子の単独変異株に導入した場合には、変異表現型を相補しない結果を得た。この結果から、21B1 はクラミドモナスにおいてタンパク質リン酸化酵素として機能することで、栄養欠乏下での生存性の維持に貢献している可能性が高いと考えられる。

組換え 21B1 タンパク質と $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いた *in vitro* でのタンパク質リン酸化活性評価を行ったところ、人工基質である乳カゼインタンパク質に対して、中性条件 (pH7.5) で強いリン酸化活性を示すことがわかった。一方、弱酸性から酸性条件 (pH6、pH5、pH4) では乳カゼインに対するリン酸化シグナルは検出されなかった。

21B1 タンパク質の相互作用因子を探索するために、21B1 遺伝子の単独変異株に 21B1-FLAG 融合タンパク質を発現させた機能相補株から抽出した総タンパク質を用いた FLAG タグ抗体ビーズによる免疫沈降を行った。その結果、ネガティブコントロールである野生型由来の総タンパク質を用いた免疫沈降サンプルでは検出されない、複数の特異的タンパク質シグナルを得ることに成功した。これらは 21B1 タンパク質の相互作用因子の候補であると考えられる。さらに、変異型 21B1-FLAG 融合タンパク質を 21B1 遺伝子の単独変異株に発現させた機能非相補株から抽出した総タンパク質を用いた FLAG タグ抗体ビーズによる免疫沈降を行った。得られたバンドパターンは先に示した 21B1-FLAG 融合タンパク質発現相補株のサンプルのものとは異なっていた。以上の結果は、野生型の 21B1 タンパク質と相互作用する因子と変異型(非活性型)の 21B1 タンパク質と相互作用する因子とは異なることが推定される。今後の研究計画として、21B1 タンパク質の相互作用因子を明らかにするために、シグナルバンドを構成するタンパク質配列を LC-MS 解析により明らかにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Haruka Shinkawa; Masataka Kajikawa; Tomoyuki Furuya; Ryuichi Nishihama; Hirokazu Tsukaya; Takayuki Kohchi; Hideya Fukuzawa	4. 巻 63
2. 論文標題 Protein Kinase MpYAK1 Is Involved in Meristematic Cell Proliferation, Reproductive Phase Change and Nutrient Signaling in the Liverwort <i>Marchantia polymorpha</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1063-1077
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcac076	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 Kanade Tatsumi; Takuji Ichino; Natsumi Isaka; Akifumi Sugiyama; Eiko Moriyoshi; Yozo Okazaki; Yasuhiro Higashi; Masataka Kajikawa; Yoshinori Tsuji; Hideya Fukuzawa et al.	4. 巻 74
2. 論文標題 Excretion of triacylglycerol as a matrix lipid facilitating apoplast accumulation of a lipophilic metabolite shikonin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 104-117
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jxb/erac405	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 Bae Young Choi; Hanul Kim; Donghwan Shim; Sunghoon Jang; Yasuyo Yamaoka; Seungjun Shin; Takashi Yamano; Masataka Kajikawa; EonSeon Jin; Hideya Fukuzawa et al.	4. 巻 34
2. 論文標題 The <i>Chlamydomonas</i> bZIP transcription factor BLZ8 confers oxidative stress tolerance by inducing the carbon-concentrating mechanism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 910-926
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plcell/koab293	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 該当する
1. 著者名 Furuya T; Shinkawa H; Kajikawa M; Nishihama R; Kohchi T; Fukuzawa H; Tsukaya H	4. 巻 134
2. 論文標題 A plant-specific DYRK kinase DYRKP coordinates cell morphology in <i>Marchantia polymorpha</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of plant research	6. 最初と最後の頁 1265-1277
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10265-021-01345-w	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 Nitta et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Raman image-activated cell sorting.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 3452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-17285-3	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4件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 辻敬典, 岡田祐也, 長房すずか, 宮本明日香, 新川はるか, 新川友貴, 山野隆志, 梶川昌孝, 福澤 秀哉
2. 発表標題 緑藻クラミドモナスの硫黄欠乏応答におけるコイルドコイルドメイン含有タンパク質(CCDC)の機能
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大浦萌, 千北乃亜, 上田大貴, 伊福健太郎, 梶川昌孝
2. 発表標題 ツノケイソウのトリアシルグリセロール低蓄積変異株 46C1 の単離と解析
3. 学会等名 第21 回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 助口瑞樹, 土屋奈生, 大浦一樹, 櫻井優衣, 梶川昌孝
2. 発表標題 栄養欠乏下での細胞生存に必要な緑藻のタンパク質リン酸化酵素変異体の解析
3. 学会等名 日本植物学会 第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梶川昌孝
2. 発表標題 貧栄養環境での生存に必要な藻類の新奇因子の探索
3. 学会等名 藻類談話会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>生物工学科 研究室紹介「植物育種学研究室（講師・梶川 昌孝）」 https://www.youtube.com/watch?v=b0d1yzpSnFE 生物工学科 研究室紹介「植物育種学研究室（講師・梶川 昌孝）」 https://www.youtube.com/watch?v=_WV71k3-h0s 梶川昌孝 マイポータル-research map https://researchmap.jp/masataka.kajikawa 近畿大学教員紹介-梶川昌孝 https://www.kindai.ac.jp/bost/research-and-education/teachers/introduce/kajikawa-masataka-21a.html 生物理工学部生物工学科研究紹介 https://www.waka.kindai.ac.jp/labo/biology/002/</p>
--

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
---------	---------