

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06237

研究課題名(和文) 微細藻類におけるプログラム細胞死の分子機構解明と物質生産制御への応用

研究課題名(英文) Understanding the regulatory system of programmed cell death and its application to biomass production

研究代表者

辻 敬典 (Tsuji, Yoshinori)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：40728268

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、微細藻類のプログラム細胞死を制御する新規因子を同定し、その遺伝子の破壊や過剰発現により細胞死のタイミングを人為制御するための基盤技術確立を目指した。緑藻クラミドモナスを用いた順遺伝学的解析により、1) クラミドモナス野生株では、タンパク質リン酸化酵素(TAR1)が窒素欠乏下での細胞死促進に寄与するものの、TAR1による細胞死促進の程度には複数の野生株間でバリエーションがあることを見出した。2) クラミドモナスにおいて、硫黄欠乏下で細胞死を促進する新規因子(コイルドコイルドメイン含有タンパク質)を同定した。3) 生態学的・産業的に重要な珪藻において、細胞死制御を進めるための基盤を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、緑藻クラミドモナスにおいて、複数の野生株を用いた比較解析により、タンパク質リン酸化酵素TAR1による細胞死制御は、株間のバリエーションが大きいことを明らかにした。これは、リン酸化カスケードを介したプログラム細胞死制御の重要性を示すとともに、シグナル伝達系の制御による細胞死制御の可能性を示した。また、プログラム細胞死の新規因子を同定し、本因子の遺伝子破壊により、野生株と比べ硫黄欠乏下での細胞死が抑制され、かつ培養液当たりの油脂(トリアシルグリセロール)蓄積量が増加した。そのため、本因子の破壊により、大量培養におけるバイオマス生産やバイオ燃料生産の生産量増大につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, I aimed to identify novel factors that regulate programmed cell death in microalgae and to establish an artificial control system to regulate the timing of cell death for efficient biomass production. Using a forward genetics approach with the model green alga *Chlamydomonas*, this research revealed that 1) a protein kinase (TAR1) promotes cell death under nitrogen-deficient conditions in wild types, but the degree of cell death promotion via TAR1 is highly variable among strains. 2) A novel factor (coiled-coil domain-containing protein) that promotes cell death under sulfur-deficient conditions was identified. In addition to the study on the model green alga, 3) we established the technical platform to study the regulation of cell death and oil accumulation via a protein kinase, the Target of Rapamycin (TOR), in ecologically and industrially important diatoms.

研究分野：植物生理学

キーワード：クラミドモナス プログラム細胞死 栄養欠乏応答 タンパク質リン酸化酵素 DYRK

1. 研究開始当初の背景

プログラム細胞死 (Programmed Cell Death, PCD) は、クロマチンの凝集やカスパーゼ (プロテアーゼ) の活性化などを伴う制御された細胞死のことを指す。多細胞生物では、PCD が発生や環境応答において重要な役割を果たすことが良く知られている。近年、酵母や微細藻類などの単細胞生物において PCD が機能することが示された^[1-3]。単細胞藻類では、UV 照射やウイルス感染など、様々な要因によって PCD が誘導される^[4]。藻類における PCD の生理的意義としては、PCD により死細胞から放出された細胞内容物が生存個体に再利用され個体群の維持に寄与すること、ウイルス感染に対する防御応答であることなどが議論されている^[4]。また、死細胞から放出された物質が、別種の藻類の生育を抑制した例も報告されている^[5]。これらの研究から、藻類の PCD は、水圏の生物間相互作用・物質循環を支える重要な現象であると推定されている。しかし、PCD の分子機構が詳細に調べられている動物や植物とは対照的に、藻類の PCD については、体系的な研究がなされておらず、断片的な情報しかない^[4]。緑藻では、UV 照射や H₂O₂ 処理により PCD を誘導するが^[4]、これらのストレスが PCD を誘導するしくみは不明である。また、珪藻では不飽和アルデヒドが PCD のトリガーとなることや、一酸化窒素 (NO) が二次メッセンジャーとして機能することが報告されているが^[6]、トリガー分子が NO を介して細胞死を引き起こすまでのシグナル伝達経路については不明である。

2. 研究の目的

微細藻類の細胞死制御機構は、水圏生態系における物質循環や生物間相互作用を支える重要な現象だが、細胞死を誘導する分子機構は不明な点が多い。また、細胞死の制御機構は藻類バイオマス生産制御にも応用できる可能性を持ち、さらなる研究が望まれる。そこで本研究では、モデル緑藻クラミドモナスと海洋性珪藻を用い、藻類の PCD 誘導を制御する新規因子を同定することを目的とする。さらに、栄養欠乏時の PCD のタイミングを人為的に操作する新技術の基盤確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) 緑藻クラミドモナスの生理学的パラメーター測定

先行研究により単離された変異体について、培養液中のクロロフィル量、細胞数、細胞体積を測定した。クロロフィル定量には分光測定を用い、細胞数はセルカウンター (CDA1000, Sysmex) を用いた。細胞死の定量評価にはエバンスブルー染色、およびセルカウンターにより測定した細胞直径と細胞体積の変化を指標とした。ガスクロマトグラフィー (GC-FID) により、TAG 蓄積量を定量した。ランダム挿入変異体の解析では、薬剤耐性カセット挿入部位を Tail-PCR で同定した。

(2) 緑藻クラミドモナスにおけるゲノム編集技術を活用した異なる野生株間での表現型比較

研究開始時には、緑藻クラミドモナスでのゲノム編集技術は国内で普及していなかったため、海外グループの指導により、組換え Cas9 リボヌクレオタンパク質複合体 (RNP) をエレクトロポレーションで導入する手法を習得・最適化した。

(3) 細胞死を制御するリン酸化カスケードの階層解明と海洋性珪藻への研究拡張

酵母や植物の研究を参照し、クラミドモナスでは、DYRK 型タンパク質リン酸化酵素 TAG accumulation regulator 1 (TAR1) の上流制御因子として、タンパク質リン酸化酵素である Target of Rapamycin (TOR) が挙げられた。TAR1 と TOR およびその他の DYRK 型キナーゼの階層構造を明らかにするために、TAR1 および植物特異的 DYRK (DYRK1) の変異体と野生株の生育に対する TOR 阻害剤 (rapamycin, AZD-8055) の影響を比較した。また、TOR を解析するための基盤として、TOR カスケードの下流因子である RPS6 のリン酸化状態を Phos-tag 電気泳動により調べ、TOR の活性を評価した。

4. 研究成果

(1) 緑藻クラミドモナスの DYRK 型タンパク質リン酸化酵素 TAR1 による細胞死制御

先行研究において、DYRK 型タンパク質リン酸化酵素 TAR1 が、窒素欠乏における細胞死を促進することが報告された^[7, 8]。しかし、本研究において *tar1-1* 変異体の詳細な解析を進めていたところ、先行研究で用いられた野生株 C9-3 は、凍結保存していた C9 株 (C9-1) と比べ N 欠乏下での白化および細胞死の進行が著しく速くなった異常株であることが明らかになった (図 1)。これは、継代培養を続けることで変異が蓄積し性質が変化したためと推定される。そこで、CRISPR-Cas9 技術により、複数の野生株 (凍結保存していた C9、CC-125、CC-1690) から *tar1* 変異体を作成し、表現型の見直しを進めた。いずれの野生株から作出した *tar1* 変異体においても、白化と細胞死の抑制が見られたが、その程度は変異体ごと (由来する親株ごと) に大きな差異があった。例えば、窒素欠乏 9 目のクロロフィル量は、先行研究で報告された *tar1-1* 変異体で

は親株の 50 倍以上であったのに対し、凍結保存していた C9 (C9-1) から作出した *tar1* 変異体 (*tar1-5*) では親株の 3.3 倍であり、CC-125 から作出した *tar1* 変異体 (*tar1-3*) では親株の 1.3 倍であった (図 1)。同様に、生存率についても、先行研究 (*tar1-1* 変異体) では窒素欠乏 4 日目には親株の 6.8 倍に達したが、新たにゲノム編集で作出した *tar1-5* 変異体では親株の 2.1 倍であり、*tar1-3* 変異体では親株の 1.1 倍であった。本結果から、タンパク質リン酸化酵素は窒素欠乏下での細胞死を促進するが、その程度は株により大きな差異があることが明らかになった。

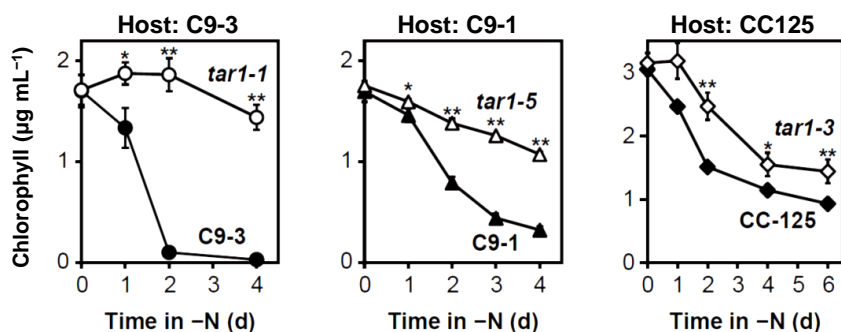


図 1. 三種の野生株 (C9-3, C9-1, CC-125) から作出した *tar1* 変異体における窒素欠乏条件下でのクロロフィル量の変化. 親株は黒シンボルで、変異体は白抜きシンボルで記した。C9-3 と C9-1 は同一の野生株 C9 に由来するが、C9-3 は研究室で継代培養されていた株で、C9-1 は凍結保存されていた株である。C9-3 は白化の進行が極端に早く、これは継代中の変異の蓄積によるものと推定される。いずれの *tar1* 変異体においても、程度の差はあるものの親株と比較して白化が抑制された。

(2) 緑藻クラミドモナスにおける CRISPR-Cas9 技術の最適化

緑藻クラミドモナスでは、Cas9 RNP と終止コドンコードする DNA オリゴ (stop オリゴ) および薬剤耐性を付与するプラスミドをエレクトロポレーションで細胞に導入し、標的部位に stop オリゴが挿入された変異株を選抜する手法が報告されていた^[9]。本法では、stop オリゴが染色体上にランダムに挿入され、予期せぬ遺伝子破壊が起こることが懸念されたため、DNA オリゴを添加せずに、PCR で増幅した薬剤耐性カセットのみを Cas9 RNP と共にクラミドモナスに導入し、薬剤耐性カセットが gRNA 標的部位に挿入された変異株を選抜する方法に改変した。また、ヒートショック後の回復時間および温度の最適化と、細胞壁溶解酵素を利用するなどの最適化も行い、改良 CRISPR-Cas9 法を確立した。改良 CRISPR-Cas9 法で得られた *tar1* 変異体のサザンブロット解析では、いずれの変異体でも標的部位に挿入が起こっているのみであり、オフターゲットによる gRNA 標的部位以外への挿入変異は見られなかった^[10] (図 2)。

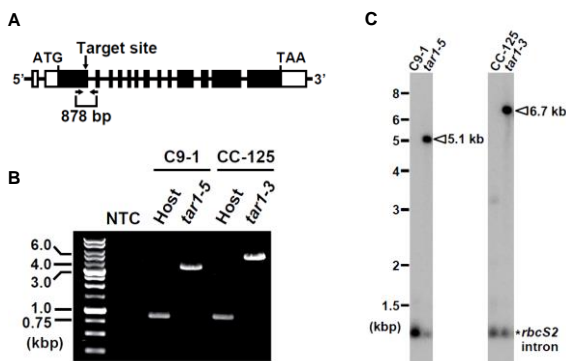


図 2. 改良 CRISPR-Cas9 法によるクラミドモナス変異体の作出. Greiner et al. (2017) の手法を参考とし、Cas9 RNP と薬剤耐性カセット断片をエレクトロポレーションでクラミドモナスに導入し、標的部位にカセットが挿入された変異株を選抜した。(A) *TARI* 遺伝子モデルと gRNA 標的部位. (B) PCR による挿入変異の確認. (C) DNA ゲルブロット解析による挿入コピー数の推定.

(3) 新奇細胞死制御因子コイルドコイルドメイン含有ドメインタンパク質同定と解析

クラミドモナスを用いた順遺伝学的解析により単離された変異体の解析により、機能未知コイルドコイルドメイン含有タンパク質 (CCDC) が硫黄欠乏下での細胞死を促進する因子であることを見出した。野生株 (CC-125) と、野生株から作出した *ccdc-4* 変異体および相補株 *ccdc-4-C11* を用い、硫黄欠乏下に移してから経時的に細胞数、総細胞体積、TAG・デンプン蓄積量を定量した。野生株では、硫黄欠乏 2 日目まで細胞数は増加し、3 日目以降に細胞数が減少に転じたが、*ccdc-4* 変異体では硫黄欠乏 4 日目まで細胞数が増加した (図 3A)。また、培養液中の総細胞体積については、野生株と *ccdc-4* 変異株のいずれにおいても、硫黄欠乏 1 日目以降に減少したが、*ccdc-4* 株では細胞体積の減少が緩やかであり、硫黄欠乏 4 日目における変異体の総細胞体積は野生株の 1.6 倍であった (図 3B)。培養液あたりの TAG 蓄積量についても、硫黄欠乏 4 日には *ccdc-4* 変異体は野生株の約 1.9 倍だった。これらの表現型は、CCDC 遺伝子の相補により野生株と同程度に戻ったことから、オフターゲット変異の影響ではなく、CCDC の欠損により細胞死が抑制されることで、培養液あたりの細胞総体積および TAG 蓄積量が増加したと結論した。

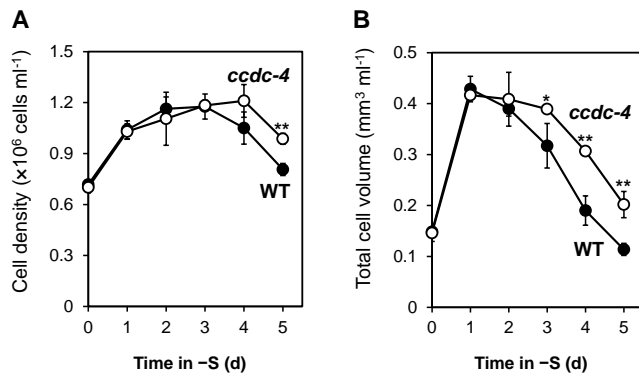


図3. 野生株と CCDC 欠損変異体 (*ccdc-4*) における硫黄欠乏下での細胞数 (A) および細胞体積 (B) の経時変化. CCDC 遺伝子の破壊により、硫黄欠乏下における培養液当たりの細胞数および細胞体積の減少が遅延した。

CCDC がどのようにして硫黄欠乏下で機能するか調べるために、CCDC の細胞内局在、蓄積量およびリン酸化状態の変化を硫黄充足条件と硫黄欠乏条件で比較した。*ccdc-4* 変異体において、CCDC に蛍光タンパク質 Venus を連結した融合タンパク質を発現させたところ、Venus 蛍光は細胞質に検出され、CCDC が細胞質局在であることが示唆された。硫黄の有無で局在に変化は見られなかった。野生株における CCDC の蓄積量についてもイムノブロット法で調べたが、硫黄充足条件と硫黄欠乏条件で違いは見られなかった。一方、Phos-tag 電気泳動を利用したリン酸化修飾解析により、硫黄欠乏に反応してリン酸化状態が変化することが示された。そのため、CCDC による硫黄欠乏下での細胞死制御は、局在変化や量的変化によるものではなく、リン酸化修飾に夜質的变化によるものと考えられた。

(4) 珪藻において TOR キナーゼ研究を進めるための基盤技術の確立

クラミドモナスの研究により、タンパク質リン酸化酵素 TAR1 がバイオマス・細胞死制御に関与することが示され、さらに TOR キナーゼが TAR1 の上流制御因子であることを示した。TOR キナーゼは真核生物に保存されたタンパク質リン酸化酵素であることから、緑藻以外の藻類においても、TOR シグナルの制御に夜人為的に細胞死あるいは TAG 生産制御が可能であると考えた。そこで、海洋の主要一次生産者であり、かつ窒素欠乏に反応して TAG を高蓄積することで知られているモデル珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* で TOR キナーゼの研究を推進するための基盤技術の開発を行うことにした。珪藻では細胞内の TOR キナーゼの活性評価法が確立されておらず、そのために TOR シグナル経路の研究が遅れていた。珪藻での TOR 研究を推進するために、TOR シグナル経路の下流因子であるリボソーム S6 (RPS6) のリン酸化状態を、Phos-tag 電気泳動と市販抗体を用いたイムノブロットングの組み合わせにより評価する系を確立した^[11]

(図4)。本手法により、珪藻 *P. tricornutum* における TOR シグナル経路の変異体の解析が可能になり、TOR と細胞死の関連を調べる研究や、TOR シグナル経路の改変による TAG 蓄積制御機構の技術的基盤が整った。

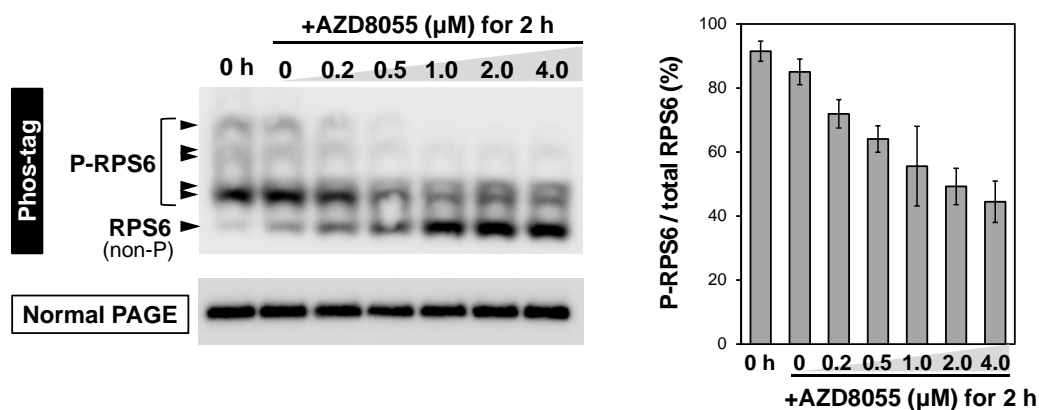


図4. RPS6 のリン酸化状態を指標とした珪藻 *P. tricornutum* の TOR 活性の評価. Phos-tag 電気泳動と市販の抗 RPS6 抗体を用いたイムノブロット解析により、TOR シグナルの下流因子である RPS6 のリン酸化状態を調べる系を確立した。*P. tricornutum* 細胞に異なる濃度の TOR キナーゼ阻害剤 (AZD-8055) を処理したところ、AZD-8055 の濃度依存的にリン酸化 RPS6 (P-RPS6) が減少し、脱リン酸化フォーム (RPS6) が増加した。本手法は、市販の試薬と抗体を用いているため、簡便に TOR 活性を評価できる。

(5) まとめと今後の展望

本研究により、緑藻クラミドモナスにおいて DYRK 型キナーゼである TAR1 により細胞死が制御されること、TAR1 による細胞死・白化の制御の程度については野生株間で大きな差異があることが明らかにした。また、TAR1 の上流制御因子として TOR キナーゼが関与することを示唆するとともに、多様な藻類で TOR シグナルを解析するための技術基盤を確立した。さらに、栄養欠乏下でクラミドモナスの細胞死を制御する新奇因子として、コイルドコイルドメイン含有タンパク質 (CCDC) を同定した。本研究により同定した新規細胞死制御因子である CCDC および TOR は、ヒトから藻類に至るまで広く保存されているため、クラミドモナス以外の藻類においてもこれらのシグナル伝達系および因子の改変によるバイオマス生産制御が可能になると考えられる。

<引用文献>

- [1] Madeo et al. (1997) *J. Cell. Biol.* 139: 729-734
- [2] Berges & Falkowski (1998) *Limnol. Oceanogr.* 43: 129-135
- [3] Segovia et al. (2003) *Plant Physiol.* 132: 99-105
- [4] Bidle (2016) *Curr. Biol.* 26 : R594-R607
- [5] Durand et al. (2014) *Biol. Lett.* 10: 20131088
- [6] Vardi et al. (2008) *Curr. Biol.* 18: 895-899
- [7] Kajikawa et al. (2015) *Plant Physiol.* 168: 752-764
- [8] Shinkawa et al. (2019) *Plant Cell Physiol.* 60: 916-930
- [9] Greiner et al. (2017) *Plant Cell* 29: 2498-2518
- [10] Tsuji et al. (2023) *J. Gen. Appl. Microbiol.* 69: 1-10
- [11] Tsuji & Ishikawa (2024) *BioRxiv*

<謝辞>

本研究の遂行を遂行するにあたり、福澤秀哉教授および山野隆志准教授をはじめとする京都大学 生命科学研究科 微生物細胞機構学分野の皆さまに多大なるご支援をいただきました。ゲノム編集技術については、独フンボルト大学の Simon Kelterborn 博士に技術指導をしていただきました。本研究で用いた藻類株の一部は、国立環境研究所 微生物系統保存施設 (NIES collection) および筑波大学 光合成代謝制御学研究室 (鈴木石根教授主宰) より分与していただきました。皆さまのご支援・ご協力に感謝いたします。

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 1件）

1. 著者名 Tsuji Yoshinori, Kinoshita Akari, Tsukahara Mizuho, Ishikawa Takumi, Shinkawa Haruka, Yamano Takashi, Fukuzawa Hideya	4. 巻 -
2. 論文標題 A YAK1-type protein kinase, triacylglycerol accumulation regulator 1, in the green alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> is a potential regulator of cell division and differentiation into gametes during photoautotrophic nitrogen deficiency	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of General and 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.2022.08.001	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshinori Tsuji, Takumi Ishikawa
2. 発表標題 Evaluating activity of algal Target of Rapamycin (TOR) kinase using Phos-tag PAGE and commercial antibodies
3. 学会等名 Molecular Life of Diatoms 7（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshinori Tsuji, Takumi Ishikawa
2. 発表標題 A convenient method to monitor the activity of algal Target of Rapamycin, a protein kinase regulating growth in response to nutrient availability
3. 学会等名 Molecular Life of Diatoms Japan 2024
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 石川 拓海、辻 敬典、木下 あかり、新川 はるか、山野 隆志、福澤 秀哉
2. 発表標題 緑藻のC/Nストレス応答におけるタンパク質リン酸化酵素TAR1とDYRKP1の機能比較
3. 学会等名 日本植物学会 第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辻 敬典、木下 あかり、石川 拓海、塚原 瑞穂、新川 はるか、山野 隆志、 福澤 秀哉
2. 発表標題 緑藻クラミドモナスにおけるDYRK型キナーゼを介したC/Nストレス応答制御
3. 学会等名 第34回植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辻 敬典、Kusi-Appiah George、香西 紀子、福田 有里、山野 隆志、成瀬 清、福澤 秀哉
2. 発表標題 ツノケイソウの光合成無機炭素獲得機構とモデル生物化に向けた凍結保存条件の検討
3. 学会等名 Cryopreservation Conference 2021
4. 発表年 2021年

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 木下 あかり、辻 敬典、新川 はるか、梶川 昌孝、山野 隆志、福澤 秀哉
2. 発表標題 C/N ストレス条件下で、クロロフィル蓄積量に異常を示すバルデー・ピードル症候群関連タンパク質9 (BBS9) 変異体の解析
3. 学会等名 第14回クラミドモナス研究会
4. 発表年 2020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
研究協力者	福澤 秀哉 (Fukuzawa Hideya)	京都大学・生命科学研究科・教授 (14301)	
研究協力者	山野 隆志 (Yamano Takashi)	京都大学・生命科学研究科・准教授 (14301)	

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