

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06725

研究課題名（和文）パルマ藻を用いて解明するシリカの細胞壁の設計図

研究課題名（英文）The design of the silica cell wall to be elucidated using Palma algae.

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・教授

研究者番号：20405070

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）：パルマ藻とケイ藻の共通の特徴は、シリカを主成分とする細胞壁を持つことである。これまでのケイ藻を用いた研究で、シリカと共に細胞壁を構成するタンパク質は複数発見されているが、ケイ藻では、細胞壁を持たない細胞を人為的に作ることが困難であるため、それらのタンパク質の細胞壁形成時における細胞内での役割は十分に解明されていない。本研究では、ケイ藻とは異なり任意に細胞壁合成を制御することが可能なパルマ藻を用いて、シリカの細胞壁の形成機構を明らかにするため、細胞壁欠損株スクリーニング・トランスクリプトーム解析（RNA-seq解析）・生化学的解析・ゲノム解析により細胞壁形成に関わる遺伝子を同定する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ケイ藻は海洋で最も繁栄している一次生産者であり、推定10万種以上と多様性に富んでいる。パルマ藻とケイ藻において最も特徴的な共通の性質はシリカの細胞壁を持つことである。シリカの細胞壁の形状は種間で異なること、捕食・ウイルス感染・紫外線の防御、沈降速度の制御など多様な機能を持つことが知られている。そのため“ケイ素の取込み”“シリカの重合”“細胞壁の放出と隣接している細胞壁との結合”から成るシリカの細胞壁の形成機構の解明は、ケイ藻の形態形成や進化・繁栄を理解する上で重要である。

研究成果の概要（英文）：A common feature of Palmae and siliceous algae is that they have a cell wall composed mainly of silica. Previous studies using siliceous algae have discovered several proteins that together with silica constitute the cell wall, but the role of these proteins in the cell during cell wall formation has not been fully elucidated because it is difficult to artificially create cells without a cell wall in siliceous algae. In this study, genes involved in cell wall formation will be identified by screening of cell wall-deficient strains, transcriptome analysis (RNA-seq analysis), biochemical analysis and genome analysis, in order to clarify the mechanism of silica cell wall formation using Palmarophyceae, which can arbitrarily control cell wall synthesis, unlike silicophytes. Identification of genes involved in cell wall formation.

研究分野：進化

キーワード：細胞壁 バイオミネラリゼーション

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らは世界で初めてパルマ藻の培養株 (*Triparma laevis*) を確立し、パルマ藻はケイ藻に最も近縁な姉妹群 (パルマ藻・ケイ藻生物群) に含まれ、形態的およびオルガネラゲノム構造の観点からケイ藻の祖先的形質を保持していること、ケイ素を含む培地ではケイ藻と同様にシリカの細胞壁を形成するが、ケイ素を含まない培地では細胞壁を作らない状態で増殖することを明らかにした (図1)。

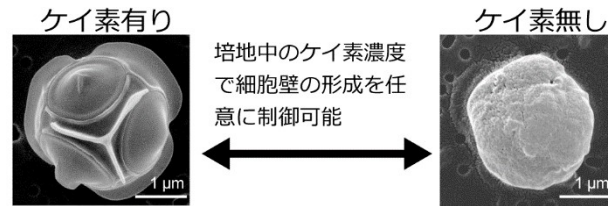


図1 パルマ藻におけるシリカの細胞壁形成

左：ケイ素を豊富に含む条件では、シリカの細胞壁を形成する。
右：ケイ素を含まない条件では、細胞壁が無い状態で増殖する。

ケイ藻は海洋で最も繁栄している一次生産者であり、推定 10 万種以上と多様性に富んでいる。パルマ藻とケイ藻において最も特徴的な共通の性質はシリカの細胞壁を持つことである。シリカの細胞壁の形状は種間で異なること、捕食・ウイルス感染・紫外線の防御、沈降速度の制御など多様な機能を持つことが知られている。そのため、“ケイ素の取込み” “シリカの重合” “細胞壁の放出と隣接している細胞壁との結合” から成るシリカの細胞壁の形成機構の解明は、ケイ藻の形態形成や進化・繁栄を理解する上で重要である。これまで、多くの形態学的研究に加え、生化学 (シリカの細胞壁に含まれる有機成分・タンパク質の解析)・分子生物学的研究により、シリカ輸送体や、シリカの重合に関わる多糖 (キチン) やいくつかのタンパク質 (Silaffin 等) が同定されている。しかし、それらの機能は *in vitro* の実験により示されたものである。ケイ藻は、細胞壁の形成が阻害されると増殖できないため、細胞壁を持たない変異体や細胞のプロトプラスト化の報告はなく、細胞壁形成に関わると考えられているタンパク質の細胞壁形成時における詳細な役割は不明である。加えて、シリカと共に細胞壁を構成し、シリカの重合能を持つタンパク質は、ケイ藻の種間でも異なっており、パルマ藻・ケイ藻生物群においてシリカ重合機構が、いつ獲得され、どのように進化したかは全く分かっていない。以上のことから、シリカの細胞壁形成の仕組みと進化は、未だに多くの未解明な問題を含んでいる。

2. 研究の目的

ケイ藻とは異なりシリカの細胞壁が無い状態でも生存・増殖が可能であり任意に細胞壁形成を制御出来るパルマ藻は、シリカの細胞壁形成の解析に適した材料である。本研究では、パルマ藻のシリカ重合に関わる遺伝子の同定を目的に、パルマ藻のゲノム解析により得られたケイ藻 *Thalassiosira pseudonana* のシリカ重合に関与するシリカニン (Silicanin, Sil-1) 遺伝子の相同遺伝子 (Tlsil) の系統・機能解析と、パルマ藻の細胞壁画分から同定された新規遺伝子 (TrL0_g5840. t1, TrL0_g5853. t1) の局在解析を行った。

3. 研究の方法

(1) パルマ藻におけるシリカニン遺伝子の相同遺伝子の解析: Sil-1 と Tlsil 遺伝子のアミノ酸配列をクエリとしたパルマ藻 6 株と Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project (MMETSP) データベースに含まれる珪藻と非珪藻種を対象にした tblastn 検索を行いシリカニン遺伝子と相同性の高い遺伝子を取得し、1 次・2 次構造予測と系統解析を行った。加えて、*T. pseudonana* 細胞で、Tlsil 遺伝子を異種発現し Tlsil 遺伝子転写産物の局在を確認した。

(2) 細胞壁構成タンパク質の生化学的解析: パルマ藻細胞から細胞壁画分を調整後、フッ化水素処理によりシリカを除去し細胞壁に含まれるタンパク質を回収した。得られたタンパク質の LC-MS/MS 分析を行い、結果を全ゲノム情報と比較することでシリカと共に細胞壁を構成しているタンパク質をコードする遺伝子 (TrL0_g5840. t1, TrL0_g5853. t1) を同定した。遺伝子がコードするタンパク質に対するペプチド抗体を作成し、ウエスタンブロッティング法、間接蛍光抗体法、免疫電子顕微鏡法により局在を確認した。

4. 研究成果

(1) パルマ藻のシリカニン相同遺伝子 Tlsil の解析

(1) - (1) 系統解析

Tlsil は、*T. pseudonana* Sil-1 と高い相同性 (アミノ酸配列で 18%) を示し、N 末端側にシグナルペプチドと多くのケイ素重合関連タンパク質に保存されている RXL モチーフを持つ点と C 末端側の 2 カ所の膜貫通領域を含む点において、ケイ藻の Sil-1 と共通性が見られる一方で、ケイ藻の Sil-1 ホモログに見られるアスパラギン酸 (N) とグルタミン (Q) を多く含む特徴は見られなかった。相同性検索の結果、多くのケイ藻はシリカニンのほかにパルマ藻のシリカニン様遺伝子と同様に、NQ リッチではないがシリカニンと相同性が高い遺伝子を保持していることが示さ

れた。系統解析では、ほぼケイ藻から構成される NQ リッチの Silicanin ファミリー遺伝子クレード (図 2 青)、多くのケイ藻が持つ NQ リッチではない Silicanin と相同性の高い遺伝子 (図 2 緑)、パルマ藻のシリカニン様遺伝子 (Tlsil) だけで構成されるパルマ藻シリカニンクレード (図 2 赤) の 3 つのクレードからなることが示された。多くのケイ藻に見られる NQ リッチではない Silicanin 相同遺伝子のケイ藻細胞における機能は未解明であるが、仮に Silicanin で報告されているようなシリカ重合能がない場合は、アスパラギン酸とグルタミンの含有量の増加とケイ素の重合能の獲得に何らかの関係があることが示唆されるため、今後は NQ リッチではない Silicanin 相同遺伝子の機能の解析を行うことにより、シリカニン相同遺伝子の分子進化とシリカ重合の関係が明らかになることが期待される。

(1) - (2) 局在解析

Tlsil の C 末端に GFP 遺伝子を結合し、遺伝子導入法が確立されているケイ藻 *T. pseudonana* に導入し、Tlsil が *T. pseudonana* 細胞において細胞壁に局在するのかを調べた。その結果、Tlsil は細胞壁での局在はみられず、葉緑体への局在が観察された。Tlsilic が細胞壁に局在する意義については、現在検討中である。

(2) 細胞壁構成タンパク質の生化学的解析

LC-MS/MS で得られたペプチド配列と *T. laevis* f. *longispina* ゲノム情報から細胞壁に含まれるタンパク質をコードすると予測される 2 つの遺伝子 (TrL0g5840, g5853) を同定した。TrL0g5840 と TrL0 g5853 がコードするタンパク質の推定される分子量はそれぞれ 55kDa と 48kDa で、いずれも 1 次構造では既知のタンパク質との相同性は検出されなかったが、N 末端にシグナル配列を持ちシリカ重合に関与するタンパク質の特徴である pentalysine cluster (1 2 - 1 4 アミノ酸配列中に 5 個のリジンが KXXXK, KXXX, or KXX という形で存在する) を複数含んでいた。細胞内局在予測プログラム TargetP- 2.0 を用いた局在予測では、TrL0g5840 が葉緑体への局在予測が 0.357 であった一方で、TrL0g5853 は葉緑体やミトコンドリアへ輸送される確率は示されなかった。TrL0g5853 がコードするタンパク質の抗原性が高い 2 つの部位を対象とするペプチド抗体 (anti5853 抗体) を作成し、ウエスタンブロッティングと間接蛍光法、免疫電子顕微鏡法によりタンパク質の局在を解析した。ウエスタンブロッティングでは、パルマ藻細胞の全タンパク質を含む試料では、目的のタンパク質と思われる約 35kDa バンドが確認されたが、細胞壁画分からフッ化水素で抽出されたタンパク質からは anti5853 抗体のシグナルが得られなかった。一方、細胞壁画分に対する間接蛍光法では、細胞壁が標識された (図 3)。そのため、より詳細に局在性を検証するために、免疫電子顕微鏡法により細胞壁の局在性について解析を行ったが、免疫電子顕微鏡法では、細胞壁特異的な標識は得られなかった。一般的に間接抗体蛍光法と比べ免疫電子顕微鏡では、より高い抗原の保存性や抗体の特異性が要求されるため、今後はモノクローナル抗体を作成することや、大腸菌等を用いて、作成した TrL0g5853 タンパク質を抗原として用いた抗体作成を行い、より抗原親和性の高い抗体を作成することで、TrL0g5853 遺伝子がコードするタンパク質の局在性についての知見が得られると考えられる。また、今後は、今回の研究期間内では十分な局在解析を行えなかった TrL0g5840 についても、抗体を用いた局在解析を行う準備を進めている。

Silicanin と相同性の高い遺伝子 (緑)

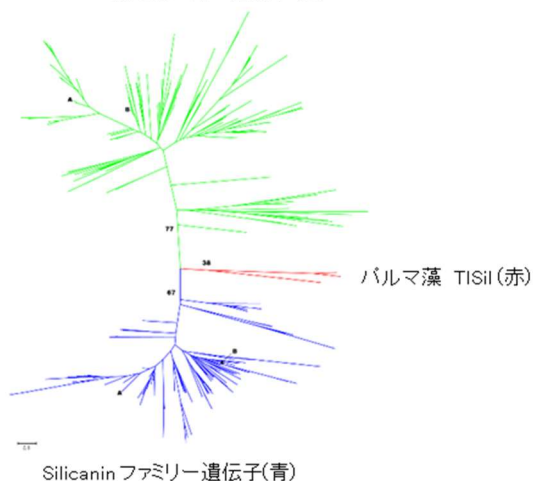


図 2 Silicanin ファミリー遺伝子、パルマ藻 Tlsil、Tlsil と類似性の高い遺伝子のアミノ酸配列に基づく無根系統樹、枝の長さは遺伝距離を、数値はブートストラップ値 (%) を示している。ブートストラップの回数は 1000。A はディク ティオカ藻の *Rhizochromulina marina*_CCMP1243 株、B は繊毛虫の *Tiarina fusa*_LIS 由来のアミノ酸を示す。

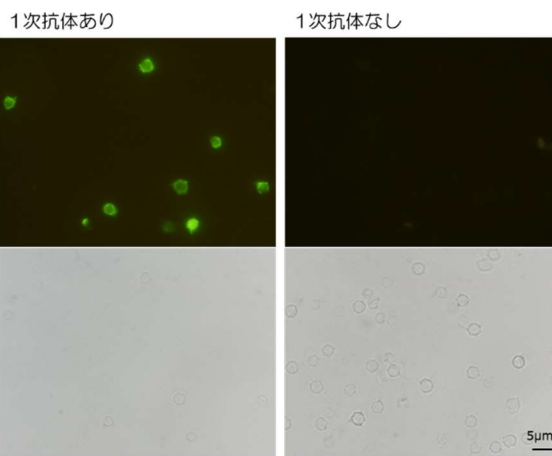


図 3 間接蛍光抗体法による局在解析

1 次抗体としてウサギ anti TrL0g5853 抗体、2 次抗体として抗ウサギ IgG Alexa Fluor® 488 を用いた。上の写真は蛍光像 (左: 1 次抗体あり、右: 1 次抗体なし) 下の写真は透過光像を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 吉川伸哉 岩城沙弥子 根本理子
2. 発表標題 パルマ藻の細胞壁形成に関わるタンパク質の解析
3. 学会等名 日本藻類学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroki Ban, Shinya Sato, Shinya Yoshikawa, Kazumasa Yamada, Yoji Nakamura, Mutsuo Ichinomiya, Hisashi Endo, Romain Blanc Mathieu, Akira Kuwata, Hiroyuki Ogata
2. 発表標題 The genome biology of parmales Bolidophyceae), a sister group of diatoms
3. 学会等名 Molecular Life of Diatoms 6 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新川裕大・山田和正・吉川伸哉・桑田晃・一宮睦雄・佐藤晋也
2. 発表標題 新規に分離されたパルマ藻Tetraparma属の分子系統解析
3. 学会等名 第84回 大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伴 広輝・桑田 晃・中村 洋路・佐藤 晋也・吉川 伸哉・山田 和正・一宮 睦雄・緒方 博之
2. 発表標題 シリカ被殻を持つ真核藻類: パルマ藻・珪藻の比較ゲノム解析
3. 学会等名 第44回 日本藻類学会
4. 発表年 2021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	根本 理子 (Nemoto Michiko) (30625926)	岡山大学・環境生命科学学域・准教授 (15301)	

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