

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06285

研究課題名(和文)クロララクニオン藻のピレノイドで働く分子機構の進化

研究課題名(英文)Functional evolution of pyrenoids in chlorarachniophytes

研究代表者

平川 泰久(Hirakawa, Yoshihisa)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：40647319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々が作り出す二酸化炭素の約1/3は、藻類の葉緑体にある「ピレノイド」と呼ばれる器官で固定化されている。ピレノイドには二酸化炭素固定酵素であるルビスが豊富に含まれており、ピレノイドはルビスコに濃縮した二酸化炭素を届けるための器官だと考えられている。しかし、ルビスコ以外のピレノイドタンパク質に関する知見は少ない。本研究では、海産のクロララクニオン藻のピレノイドで働く8つの新規タンパク質を明らかにした。そのほとんどは本藻に特異的なタンパク質であり、藻類のもつ二酸化炭素濃縮固定器官で働く分子機構は藻類系統ごとに多様化しており、収斂的に進化してきたことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海で固定化された二酸化炭素の一部は長期的に蓄積される「ブルーカーボン」と呼ばれ、大気中の二酸化炭素の削減に貢献するものとして注目されている。本研究では、海産の微細藻類が効率的に二酸化炭素を固定化するメカニズムの一端を明らかにした。これは、藻類に普遍的に存在するピレノイドの進化の謎に迫るだけでなく、ブルーカーボンの潜在的な可能性の理解に繋がる内容である。

研究成果の概要(英文)：Approximately one-third of the global carbon assimilation is estimated to occur within pyrenoids, which are widely present in eukaryotic algae. Pyrenoids are involved in CO₂-concentrating mechanisms (CCMs) supplying CO₂ to the carbon-fixing enzyme Rubisco. Although Rubisco is the predominant component of pyrenoids, other pyrenoid-associated proteins remain to be elucidated in most algae. To understand the diversity and evolution of pyrenoid-based CCMs among algae, we here investigated the pyrenoid proteome of a marine chlorarachniophyte alga. Our localization experiments demonstrated the specific targeting of eight proteins to pyrenoids. These included a putative Rubisco-binding linker, carbonic anhydrase, membrane transporter, and uncharacterized GTPase proteins. Notably, most of these proteins were unique to this algal lineage. This study provides insights into the convergent evolution of CO₂-concentrating organelles at the molecular level.

研究分野：藻類進化学

キーワード：藻類 光合成 葉緑体 二酸化炭素 ピレノイド 収斂進化

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

葉緑体をもつ最初の原始真核藻類は、光合成細菌であるシアノバクテリアを細胞内共生することで誕生した。陸上植物や緑藻、紅藻などは、この原始真核藻類から派生したと考えられている。真核藻類の中には、緑藻や紅藻を細胞内に取り込む「二次共生」により葉緑体を獲得したグループも存在しており、例えば、珪藻は紅藻由来の二次葉緑体を持ち、本研究で用いたクロララクニオン藻は緑藻由来の二次葉緑体をもつ。このように複数回の細胞内共生を経て、系統的に多様な真核藻類は進化してきた。多彩な真核藻類に共通して見られる形質の一つとして「ピレノイド」がある(注: ツノゴケを除いて陸上植物には見られない形質)。ピレノイドは葉緑体内に見られる電子密度の高い構造体で、200年以上前からその存在は知られていた。1970年代には、ピレノイドに Rubisco 酵素が大量に存在することが報告された。そして近年のモデル緑藻やモデル珪藻の研究により、ピレノイドは二酸化炭素濃縮固定装置であることが分かってきた。

二酸化炭素 (CO_2) を有機炭素に固定化する Rubisco 酵素は地球上で最も豊富に存在するタンパク質として知られているが、非常に効率の悪い酵素としても有名である。加えて、海などの水中に溶けた CO_2 の多くは重炭酸イオン (HCO_3^-) の状態で存在しており、溶存する CO_2 濃度は低い。そこで多くの真核藻類は、ピレノイドと二酸化炭素濃縮機構を発達させたと考えられている。真核藻類は細胞内に取り込んだ HCO_3^- をピレノイド近傍まで輸送し、そこで CO_2 に変換することで、濃縮した CO_2 を Rubisco 酵素に届けるモデルが提唱されている。しかし、どのようにピレノイドが形成されるのか? どのようなタンパク質がピレノイドで機能しているのか? などの分子機構に関しては、ごく一部のモデル種でしか研究が進んでおらず、その多様性や進化に関しては未解明のままであった。

2. 研究の目的

ピレノイドの進化を知るためには、多様な真核藻類での研究が必要である。本研究では、海産の単細胞藻類であるクロララクニオン藻を用いて、ピレノイドで働く分子機構の解明を目指した。クロララクニオン藻は緑藻を二次共生することで二次葉緑体を獲得した藻類で、緑藻とクロララクニオン藻のピレノイドを比較することで、二次共生を介して、ピレノイドがどのように進化したのかを知ることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、クロララクニオン藻 *Amorphochlora amoebiformis* を用いて、ピレノイドで機能するタンパク質を明らかにした。先行研究では、単離したピレノイドを用いたプロテオーム解析により、ピレノイドに含まれるタンパク質を網羅的に推定していた。本研究では、細胞内局在解析を中心に行い、候補タンパク質の中からピレノイドで働く複数のタンパク質を特定した。

(1) *A. amoebiformis* の核ゲノム解読

これまで *A. amoebiformis* では、オルガネラゲノムの解読とトランスクリプトーム解析(発現遺伝子解析)が行われてきたが、核ゲノム配列は解読できていなかった。ゲノム編集などの分子ツールを活用するためにはゲノム解読が必須であり、ピレノイドタンパク質の解析を進めるためにも重要な基盤情報となる。そこで、次世代シーケンス技術の一つである MinION (Oxford Nanopore) を用いて、ロングリードシーケンスによるゲノム解読を行った。

(2) ピレノイド候補タンパク質の細胞内局在解析

ピレノイドプロテオーム解析により推定された 154 個のタンパク質 (Putative Pyrenoid-Associated Proteins: PPAP1 から PPAP154) の中から、検出頻度の多かった約 30 個のタンパク質 (PPAP1 から PPAP30) において、細胞内局在解析を行った。各タンパク質に GFP を融合したものを遺伝子導入によりクロララクニオン藻の細胞内で発現させ、GFP の緑色蛍光の局在を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。GFP によりピレノイドの局在が確認できた一部のタンパク質に関して、特異的な抗体の作成と免疫電子顕微鏡による詳細な細胞内局在の観察を行った。

(3) Rubisco と結合するタンパク質の解析

ピレノイドのマトリックス領域には、Rubisco 以外に、3 つの機能未知 GTPase タンパク質 (PPAP3、PPAP6、PPAP8) と 1 つの巨大天然変性タンパク質 (PPAP28) が含まれていた。これらのタンパク質の相互作用を知るために、共免疫沈降によるタンパク質間の結合を調べた。また、大腸菌で合成したりコンビナントタンパク質を用いて、酵素活性についても調べた。

4. 研究成果

本研究では、クロララクニオン藻のピレノイドに含まれる 8 つの新規タンパク質を明らかにした。そこには、Rubisco の集合に関わると予測されるリンカータンパク質 (PPAP28) や二酸化炭素の変換反応に関わる炭酸脱水酵素 (PPAP12)、GTPase 関連の機能未知タンパク質 (PPAP3、PPAP6、PPAP8、PPAP10)、機能未知の膜タンパク質 (PPAP4、PPAP9) が含まれていた(下図)。これらのピレノイドタンパク質を緑藻や珪藻のピレノイドタンパク質と比較したところ、種類が

異なることが明らかとなった。加えて、一部のタンパク質はクロララクニオン藻に特有なもので、本藻のピレノイドが独自に進化してきたことを示唆した。真核藻類に普遍的に存在するピレノイドの構造や役割は似ているが、そこで働く分子機構は藻類グループごとに異なっており、収斂的に進化してきたものであると考えられる。本研究成果は国内外の学会、および投稿論文で発表済みである。

(1) *A. amoebiformis* の核ゲノム解読

MinION (Oxford Nanopore) で解読した結果、クロララクニオン藻の他種である *Bigelowiella natans* よりも大きなサイズで、AT リッチなイントロンを大量に含む核ゲノム配列であることが分かった。予測されるタンパク質遺伝子の数は、*B. natans* と同程度であった。トランスクリプトーム解析では不完全長であったタンパク質遺伝子の配列も、ゲノム解読により完全長の配列を得ることができた。

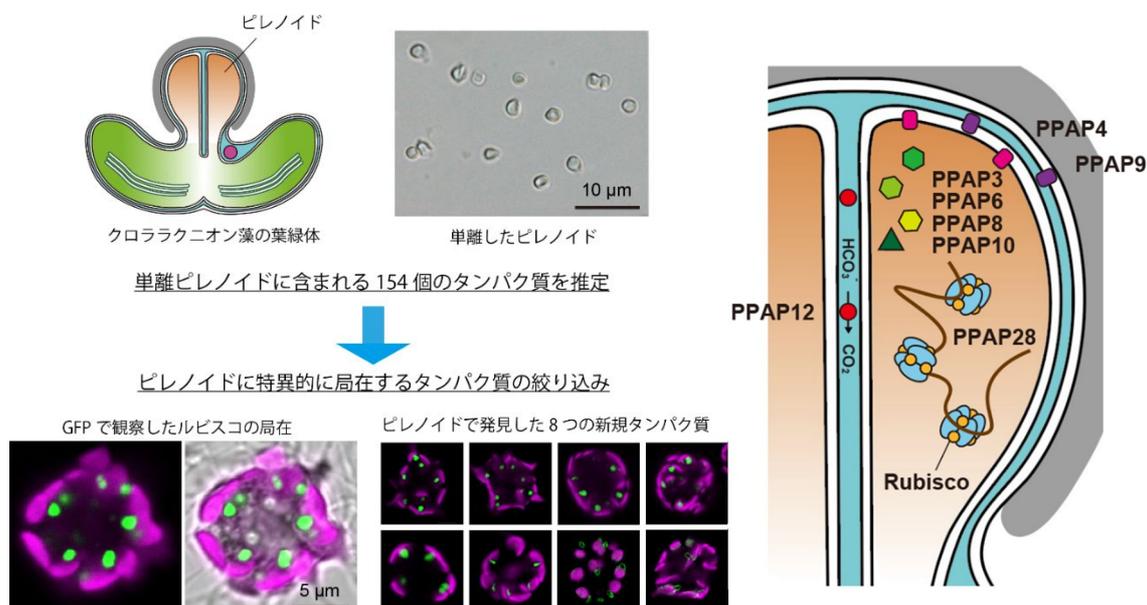
(2) ピレノイド候補タンパク質の細胞内局在解析

約 30 個のピレノイド候補タンパク質 (PPAP1 から PPAP30) において、GFP を用いた細胞内局在解析を行ったところ、8 つのタンパク質がピレノイドに特異的な局在を示した (下図)。この結果は、抗体を用いた免疫電子顕微鏡の観察でもサポートされた。5 つのタンパク質は Rubisco と同様にピレノイドのマトリックスに、2 つはピレノイド周辺の膜、1 つはピレノイド中央の膜陥入部に観察された。ピレノイド中央の膜陥入部に局在したタンパク質は、重炭酸イオンと二酸化炭素の変換反応を触媒する炭酸脱水酵素の一つであった。このことからピレノイドに陥入する膜は、二酸化炭素をピレノイド内部まで届ける役割があることが示唆された。ピレノイドマトリックスに局在していた 3 つの GTPase タンパク質は、他種のクロララクニオン藻にも遺伝子が保存されており、ピレノイドマトリックスにおける重要な役割をもつことが示唆された。しかし、その詳しい機能は不明である。

(3) Rubisco と結合するタンパク質の解析

Rubisco と結合するタンパク質を共免疫沈降法により解析したところ、ピレノイドマトリックスに局在していた PPAP28 が検出された。PPAP28 は比較的大きなタンパク質で、その大部分がリピート配列を含む天然変性領域で構成されていた。これまでモデル緑藻とモデル珪藻で、Rubisco に結合するリンカータンパク質 (EPYC1 と PYC01) が報告されている。どちらのリンカータンパク質もリピート配列を含む天然変性タンパク質で、Rubisco の集合に関与することが分かっている。これらのことから、PPAP28 はクロララクニオン藻のピレノイドで働くリンカータンパク質であると推察した。3 つのリンカータンパク質の間に配列の類似性はないが、構造的な特徴を共有しており、ピレノイドを構築するための重要なタンパク質が収斂進化により獲得されたことを示唆した。

本研究は、真核藻類が水中環境で効率的に二酸化炭素固定を行うための分子機構の一端を明らかにし、ピレノイドの進化に関する新たな知見を与えた。近年、遺伝子操作で植物細胞内にピレノイドを構築し、効率的に二酸化炭素を吸収できる植物を創生する試みが世界で進められている。本研究で明らかにしたピレノイドタンパク質は、このような二酸化炭素削減に資する応用研究にも貢献すると期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Moromizato Rena, Fukuda Kodai, Suzuki Shigekatsu, Motomura Taizo, Nagasato Chikako, Hirakawa Yoshihisa	4. 巻 121
2. 論文標題 Pyrenoid proteomics reveals independent evolution of the CO ₂ -concentrating organelle in chlorarachniophytes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2318542121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2318542121	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 Hirakawa Yoshihisa, Hanawa Yutaka, Yoneda Kohei, Suzuki Iwane	4. 巻 596
2. 論文標題 Evolution of a chimeric mitochondrial carbonic anhydrase through gene fusion in a haptophyte alga	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 3051 ~ 3059
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14475	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 Hirakawa Yoshihisa, Senda Miki, Fukuda Kodai, Yu Hong Yang, Ishida Masaki, Taira Masafumi, Kinbara Kazushi, Senda Toshiya	4. 巻 19
2. 論文標題 Characterization of a novel type of carbonic anhydrase that acts without metal cofactors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Biology	6. 最初と最後の頁 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12915-021-01039-8	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 Bantu Lingaswamy, Chauhan Suraj, Srikumar Afshan, Hirakawa Yoshihisa, Suzuki Iwane, Hagemann Martin, Prakash Jogadhenu S.S.	4. 巻 1865
2. 論文標題 A membrane-bound cAMP receptor protein, SyCRP1 mediates inorganic carbon response in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms	6. 最初と最後の頁 194803 ~ 194803
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagrm.2022.194803	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

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshihisa Hirakawa
2. 発表標題 Proteomics reveals the evolution of chlorarachniophyte pyrenoids
3. 学会等名 IX European Congress of Protistology & Annual Congress of the International Society of Protistologists (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平川泰久
2. 発表標題 藻類から学ぶ二酸化炭素固定のライフハック
3. 学会等名 日本植物学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山本健太, 平川泰久
2. 発表標題 クロララクニオン藻の葉緑体タンパク質輸送装置Tic20の局在
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 青木大地, 鈴木重勝, 平川 泰久
2. 発表標題 クロララクニオン藻Amorphochlora amoebiformisのゲノム解読
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山本健太, 平川泰久
2. 発表標題 クロララクニオン藻の葉緑体へのタンパク質輸送装置の探索
3. 学会等名 日本藻類学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 青木大地, 鈴木重勝, 平川 泰久
2. 発表標題 クロララクニオン藻 <i>Amorphochlora amoebiformis</i> のゲノム解読
3. 学会等名 日本藻類学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 平川泰久
2. 発表標題 クロララクニオン藻のプロテオームで紐解くピレノイドの進化
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 諸見里玲奈, 平川泰久
2. 発表標題 クロララクニオン藻のピレノイド構築に関するタンパク質の探索
3. 学会等名 日本植物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大田修平、平川泰久、河地正伸
2. 発表標題 PI3P分子を指標とした藻類細胞のストレス動態と多様性
3. 学会等名 日本藻類学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青木大地、平川泰久
2. 発表標題 クロララクニオン藻におけるT7ファージ型DNAヘリカーゼの局在と進化
3. 学会等名 日本藻類学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 諸見里怜奈、平川泰久
2. 発表標題 プロテオームで紐解くピレノイドの分子進化
3. 学会等名 日本藻類学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

平川研究室HP https://yhirakawa.weebly.com/
--

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