

令和 6 年 5 月 6 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15131

研究課題名（和文）珪藻の被殻形成スイッチをONにして、被殻形成関連タンパク質を探索する

研究課題名（英文）Turn on the diatom frustule formation switch and search for proteins associated with frustule formation

研究代表者

野村 真未（Nomura, Mami）

山形大学・理学部・助教

研究者番号：40770342

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：珪藻は人類の加工技術を超えた微細で精巧な珪酸質の被殻を形成するが、実際にどのようなタンパク質が関与しているかは明らかになっていない。本研究では、有孔虫に共生する珪藻という、珪酸質の被殻形成をOFFからONに切り替えることが可能な画期的な系を用い、遺伝子発現の経時変化を単細胞RNA-seqにより解析することを目指した。まず、有孔虫共生珪藻の培養株を作成するため、2種の珪藻共生性有孔虫を沖縄県と静岡県にて採集し、有孔虫細胞内から共生珪藻を取り出した。現在、粗培養ではあるが、培養に成功している。今後、種同定および単細胞RNA-seqのリファレンス配列を取得する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

珪藻は海洋の一次生産の約20%を占める程のバイオマスをもち、珪藻による珪素循環は生態学的に非常に大きな影響を及ぼす。つまり、珪藻におけるシリカバイオミネラル化のメカニズムを明らかにすることは、地球規模の物質循環を理解するうえでも重要であると言える。本研究において、2種の底生性有孔虫から共生珪藻を取り出し、クローンではないものの、培養に成功したことは海の生態系理解において非常に大きな成果である。今後、今回確立された有孔虫共生珪藻培養株のRNA-seqを行い、本珪藻株が新規系統であるのかを含め解析を行うことで、多様性の理解につなげたい。

研究成果の概要（英文）：Diatoms form elaborate siliceous frustules that are beyond human processing technology, but it is unclear in which proteins are actually involved in the formation of siliceous frustules. In this study, using an innovative system in which symbiotic diatoms living in foraminifera can switch siliceous frustule formation from OFF to ON, the goal was to analyze changes in gene expression over time using single-cell RNA-seq. First, to establish culture strains of foraminifera-symbiotic diatoms, two species of diatom-symbiotic foraminifera were collected in Okinawa and Shizuoka prefectures, and symbiotic diatoms were extracted from the foraminifera cells. Currently, the culture has been successfully grown, although in a crude culture. In the future, species identification and single-cell RNA-seq reference sequences will be obtained.

研究分野：細胞生物学

キーワード：珪藻 有孔虫 バイオミネラル化 シリカバイオミネラル化 共生

## 1. 研究開始当初の背景

原生生物における細胞外被構造は変化に富んだ外環境や外敵から細胞を守るなど重要な役割があり、その材質やデザインが多種多様であることが知られている。中でも珪藻は珪酸質の微細で精巧な模様の箱型の殻をまとっており、その模様は数 nm オーダーの細かなものである。これは我々人類の微細加工技術を超えた細かさであり、珪藻の被殻形成メカニズムの解明は微細加工による生体模倣を目指した応用研究の基礎となる非常に重要な課題である。

珪藻の被殻はゴルジ体由来の珪酸沈着小胞 (silica deposition vesicle: SDV) に珪酸が沈着することで形成される。珪酸はリン酸化をうけた珪酸沈着タンパク質の働きによって沈着する。また、被殻の形態を左右する SDV の形態は、SDV 膜上の膜タンパク質やそれに付随するタンパク質が微小管とアクチンと相互作用することによって制御されていると考えられている。しかし、珪酸沈着に関与するタンパク質のリン酸化がどのように制御され、SDV 膜と細胞骨格がどのようなタンパク質を介して相互作用しているのかは分かっておらず、珪藻における被殻形成の分子メカニズムは未だ完全に理解できていない状態にある。

これまで、珪藻の被殻形成に関わる遺伝子の探索には、細胞周期同調培養系を利用した比較トランスクリプトーム解析が行われてきた。しかし、細胞周期の同調には培地中の珪酸濃度を変化させることが必要で、珪酸質の被殻がなくては生存できない珪藻において、培地中の珪酸濃度の変化は珪藻の様々な生命現象に関与してしまうことになる。このため、被殻形成に関与する遺伝子の効率的な探索は困難であった。この問題を解決するため、有孔虫共生珪藻に着目した。一部の有孔虫は珪藻を細胞内に共生させており、共生珪藻は有孔虫細胞内では被殻を持たないが、有孔虫細胞内から取り出すと再び被殻を形成するようになる。つまり、有孔虫共生珪藻は有孔虫細胞内では被殻形成を OFF にしており、有孔虫細胞外へ取り出されると被殻形成スイッチを ON に切り替えることができるのだ。

## 2. 研究の目的

本研究では、有孔虫に共生する珪藻という、珪酸質の被殻形成を OFF から ON に切り替えることが可能な画期的な系を用い、遺伝子発現の経時変化を単細胞 RNA-seq により解析し、珪藻の被殻形成の分子メカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

珪藻を共生させる有孔虫は継代培養系が確立していないため、採集によって個体を得て、一時的に飼育する。珪藻共生有孔虫のなかでも底生性の *Amphistegina lobifera* という種は比較的浅瀬で採集が可能な種であるため、本種をメインターゲットとして、沖縄本島において採集を行う。採集した有孔虫はカミソリを使って炭酸カルシウムの殻を破壊し、有孔虫細胞内から共生珪藻を取り出す。その後、ガラスキャピラリーを使って 96 穴プレートに 1 細胞ずつ単離し、有孔虫から取り出した共生珪藻の単離培養株を確立する。次に、有孔虫から取り出した直後の共生珪藻において被殻形成が行われているかどうかを光学顕微鏡を用いたタイムラプスビデオ観察により明らかにする。

## 4. 研究成果

有孔虫共生珪藻の培養株確立を目指し、有孔虫の採集から研究をスタートさせた。コロナ禍にあり、なかなか思うように出張ができなかった研究初年度の 2021 年 4 月、琉球大学の藤田和彦教授にご協力いただき、珪藻共生有孔虫 *Amphistegina lobifera* (図 1)、*Baculogypsina sphaerulata*、*Calcarina gaudichaudii* の 3 種を 5 個体ずつ郵送していただいた。有孔虫の炭酸カルシウムの被殻を破壊し、共生珪藻を細胞外に取り出すと、細胞が肥大化していた。これらの細胞を 96 穴プレートに単離したが、クローン培養株を確立することができなかった。2022 年 11 月には実際に沖縄県の備瀬崎および伊計島にてサンプリングを行ったが、有孔虫の有性生殖が終わった直後で、めばしい細胞を見つけることができず、実験を進めることができなかった。2023 年 3 月に沖縄県の備瀬崎にて行った採集では多くの *A. lobifera* を採集することができたため、有孔虫の炭酸カルシウムの被殻を破壊し、共生珪藻を取り出し、培養を試みた。有孔虫の被殻にはさまざまな微生物が付着していたため、筆でやさしく被殻をなでて付着生物を取り除くことで、できるだけコンタミネーションを防いだ。有孔虫細胞内から珪藻を取り出した直後に珪藻細胞が肥大化してしまうのは浸透圧ショックだと考えられたため、さまざまな培地で珪藻を培養することを試みた。また、有孔虫の被殻を破壊後すぐに共生珪藻を単離してしまうと、珪藻細胞へのダメージが大きいと考えられたため、破壊した有孔虫細胞をある程度の塊ごと培地に移した。その結果、*A. lobifera* 由来と考えられる珪藻のコロニーが複数観察され、粗培養株の確立に成功した (図 2A)。また、*A. lobifera* の被殻は炭酸カルシウムの層が厚く、カミソリだけではうまく破壊できず、ネジ等を使ってかなりの力を込めなければ被殻を破壊することができなかった。この過程で、共生珪藻にも大きなダメージを与えてしまう可能性が考えられたため、より炭酸カルシウムの被殻が薄い種である *Pararotalia nipponica* をもう一つのターゲット種に

選定した。こちらは2024年2月に静岡県の下田臨海実験センター周辺にて採集を行い、1個体しか採集できなかったものの、カミソリを使って細胞を破壊し、*A. lobifera*と同様の方法で粗培養を試みた。その結果、珪藻のコロニーが形成されつつあり、非常にゆっくりとしているが安定して増殖している(図2B)。

上述のように、有孔虫 *A. lobifera* および *P. nipponica* 由来の共生珪藻は粗培養環境下ではあるが、現在安定的に培養できているため、今後、単離してクローン培養株の確立を目指す。その後、DNAを抽出し、18S rRNA 遺伝子および葉緑体 16S rRNA 遺伝子を増幅し、系統解析を行うことで、今回培養できた共生珪藻の系統的な位置を明らかにしたい。さらに、当初の予定にあったように、RNA-seq 解析を行い、被殻形成関連候補遺伝子探索のためのリファレンス配列を取得したい。当初想定していた研究計画から大きく遅れてしまったが、共生珪藻の粗培養株が確立できつつあることは今後の研究の基盤となり、大きな成果である。

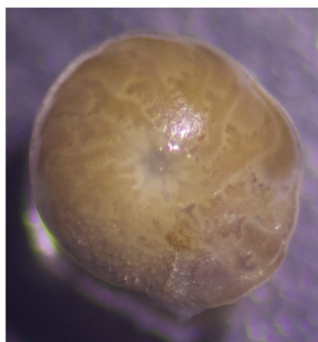


図1. *Amphistegina lobifera*

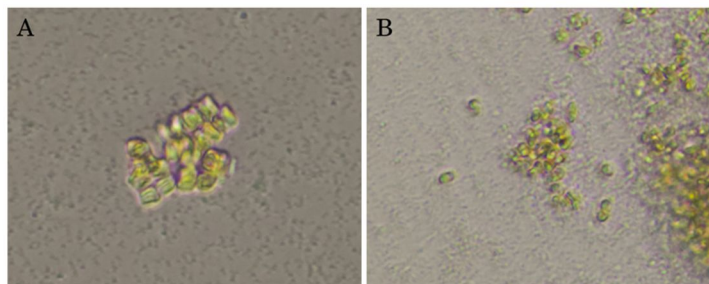


図2. 粗培養された有孔虫共生珪藻

A: *A. lobifera*由来の珪藻

B: *P. nipponica*由来の珪藻

2023年3月に多くの個体を採集できた有孔虫 *A. lobifera* の炭酸カルシウムの被殻を破壊し、共生珪藻を取り出し、共生珪藻のその後の挙動を経時観察した(図3)。有孔虫の被殻を破壊した直後(2分後)有孔虫細胞外に放出された共生珪藻は茶褐色の葉緑体を含む球形に近い細胞の形状をしていた。また、この頃の共生珪藻に珪酸質の細胞壁は観察できなかった。その後、徐々に細胞内に液胞様の構造が観察されるようになり、15分後には細胞内および葉緑体内が液胞に満たされてしまい、死滅してしまったように見えた。さらに40分後に同じ細胞を観察してみると、15分後と同様の形態のまま、細胞内の流動等が見えなかったため、有孔虫細胞外に放出後15分後には死滅してしまうと考えられる。また、一部の共生珪藻は有孔虫細胞内にとどまったまま被殻から放出されており(図4)このような共生珪藻の葉緑体が立体的に観察できることから、有孔虫細胞内で生きていたと考えられた。今回使用した細胞外液は海水だったため、有孔虫細胞内よりも塩濃度が高すぎた可能性があり、浸透圧ショックを受けていた可能性が考えられた。今後新規に合成される珪酸質の構造に取り込まれ、蛍光を発する PDMPO やローダミンなどを加え、被殻形成がいつどの様に始まるのかを明らかにしたい。

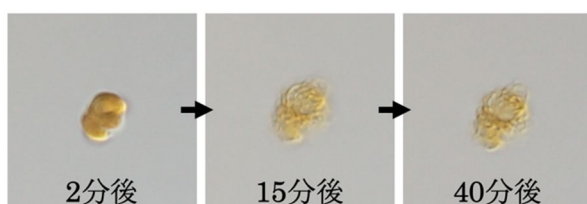


図3. 有孔虫細胞内から取り出した共生珪藻のタイムラプス観察

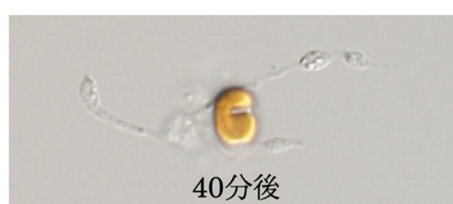


図4. 有孔虫細胞内にとどまる共生珪藻

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 Nomura Mami, Ohta Keisuke, Nishigami Yukinori, Nakayama Takuro, Nakamura Kei-ichiro, Tadakuma Kenjiro, Galipon Josephine	4. 巻 11
2. 論文標題 Three-dimensional architecture and assembly mechanism of the egg-shaped shell in testate amoeba <i>Paulinella micropora</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1232685
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2023.1232685	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0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 石谷佳之・野村真未	4. 発行年 2023年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 4
3. 書名 原生生物学事典	

〔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
---------	---------