

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19145

研究課題名（和文）植物の非膜オルガネラを消失させる因子の大規模探索

研究課題名（英文）Large-scale screening for factors that disrupt non-membranous organelles in plants

研究代表者

山野 隆志（Yamano, Takashi）

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：70570167

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、効率的な水圏光合成の駆動に非膜オルガネラであるピレノイドの消失機構の解明を目指した。モデル緑藻クラミドモナスのピレノイドのマーカを発現する株にランダム変異を導入し、約15,000株のスクリーニングを行った結果、ピレノイドの数と位置に異常がある変異株を複数単離した。次世代シーケンサーを用いて変異の原因遺伝子の同定を進めるとともに、ピレノイドの分裂の高解像度タイムラプス観察系を立ち上げ、野生株と変異株のピレノイド分裂様式の差を定量化することに成功した。いくつかの変異株については、光合成に関する表現型解析を進め、ピレノイドの数を1つに規定する生理学的意義が見えてきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、水中で効率的な光合成に重要なピレノイドという細胞内器官の消失機構の解明を目指したものである。クラミドモナスでピレノイドに目印を付け、ピレノイドが異常となった変異株を選抜し、その数や位置に異常のある株を複数単離した。原因遺伝子の特定や、高解像度顕微鏡によるピレノイド分裂様式の定量化にも成功した。本研究は、藻類がピレノイドを失った仕組みの理解を深めるとともに、将来的には陸上植物へのピレノイド導入による光合成効率の向上や、食料問題の解決につながる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the mechanism of disappearance of pyrenoids, non-membranous organelles essential for efficient aquatic photosynthesis. By introducing random mutations into a model green alga *Chlamydomonas* strain expressing pyrenoid markers and screening approximately 15,000 mutants, we successfully isolated several mutants with abnormalities in pyrenoid number and position. We proceeded to identify the causative genes using next-generation sequencing and established a high-resolution time-lapse observation system for pyrenoid division, which allowed us to quantify the differences in pyrenoid division patterns between wild-type and mutant strains. For some of the mutants, we conducted phenotypic analyses related to photosynthesis, shedding light on the physiological significance of restricting pyrenoid number to one.

研究分野：植物分子細胞生物学

キーワード：非膜オルガネラ 相分離 クラミドモナス ピレノイド

## 1. 研究開始当初の背景

液-液相分離(相分離)は、溶液が均質に混じり合わずに二相に分離する現象であり、中心体や核小体のような膜をもたないオルガネラ(非膜オルガネラ)の形成、染色体の構造と転写制御、アルツハイマーなどのタンパク凝集病の原理を統一的に理解するための重要な概念として注目されている。相分離を誘導する因子は数多く報告されているが、相分離を解消する分子メカニズムの研究は進んでいない。動物細胞では、DYRK3 というリン酸化酵素が相分離を解消する因子として初めて同定され、有糸分裂の際の非膜オルガネラの崩壊と生成を制御することが明らかになっている。しかし、植物細胞においては、相分離状態を解消する因子だけでなく、それを誘導する因子すら明らかになっていない。

水圏に生息する藻類は、光合成に不利な  $\text{CO}_2$  欠乏条件下で、細胞内に無機炭素 ( $\text{CO}_2$  と  $\text{HCO}_3^-$ ) を能動輸送し、 $\text{CO}_2$  を  $\text{CO}_2$  固定酵素ルビスコの周りに濃縮する  $\text{CO}_2$  濃縮機構 ( $\text{CO}_2$ -concentrating mechanisms: CCM) を持っている。CCM は水圏光合成の維持に必須である。ルビスコは葉緑体内の「ピレノイド」と呼ばれる構造に集積し、ピレノイドは  $\text{CO}_2$  固定の場として働く。近年の研究により、単細胞緑藻クラミドモナスのピレノイドは葉緑体内で相分離する非膜オルガネラであることが示された。ピレノイドは  $\text{CO}_2$  欠乏条件下で発達するが、細胞分裂時には消失し、娘細胞の葉緑体内で再び生成される(図1)。このことから、細胞分裂の際にピレノイドの相分離状態を解消する分子メカニズムが存在すると考えられる。ピレノイドの形成と維持に関わる因子としては、ルビスコを繋ぎ止めるタンパク質 EPYC1 やルビスコとピレノイドを繋ぐタンパク質 LCIB/LCIC 複合体などが同定されているが、ピレノイドの消失に関わる因子は明らかになっていない。

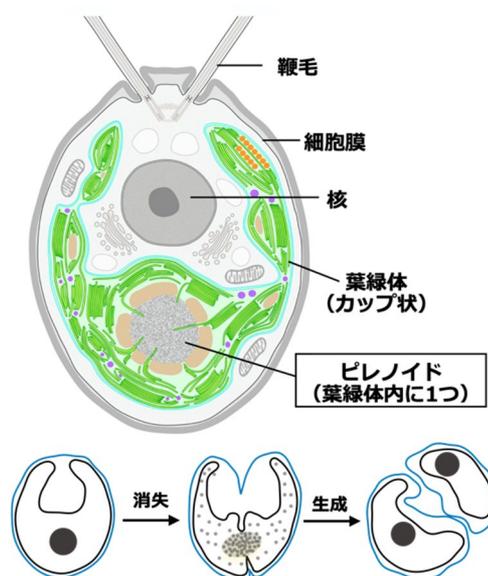


図1: 緑藻クラミドモナスの細胞内構造と細胞分裂時のピレノイドの様子

研究代表者を含めた国内外の研究から、藻類の CCM の駆動と制御に関わる分子の実態が明らかになりつつある。しかし、CCM の最も重要なステップである「ピレノイドへの  $\text{CO}_2$  の濃縮」が、具体的にどのような現象を指しているのかは長年の疑問であった。 $\text{CO}_2$  固定酵素ルビスコは、Ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP) に  $\text{CO}_2$  を結合して 3-Phosphoglycerate (3-PGA) を生成するカルボキシラーゼ反応と、RuBP に  $\text{O}_2$  を結合して 3-PGA と 2-Phosphoglycolate を生成するオキシゲナーゼ反応の両方を触媒する。 $\text{CO}_2$  の供給に限られる水圏環境では、ルビスコの触媒反応はカルボキシラーゼ反応よりもオキシゲナーゼ反応に傾きやすくなり、光合成効率が低下する。ピレノイドが相分離するという発見を受け、CCM を相分離の視点で捉え直すと、ピレノイドはルビスコと  $\text{CO}_2$  をドロブレットの中に隔離・濃縮し、競合阻害を起こす  $\text{O}_2$  を排除することで、 $\text{CO}_2$  固定反応を促進させるという具体的なイメージが浮かぶ。つまり、ピレノイドが相分離する「状態」と、 $\text{CO}_2$  を濃縮し固定する「機能」とが相関していると考えられる。そこで、「相分離生物学」の中でも研究が進んでいない相分離の解消に関わる因子に着目し、植物細胞の視点を取り入れることで、相分離するオルガネラが消失するメカニズムについて、その普遍性と多様性を理解できるのではないかとこの着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究は、水圏環境における光合成を根幹から支えるオルガネラ「ピレノイド」をモデルとして、植物細胞における相分離の解消を制御する因子を明らかにすることを目的としている。ピレノイドは、地球上の炭素固定の約3割を担い、生物相の一次生産を根幹から支えるオルガネラであるにもかかわらず、ピレノイドそのものの理解が十分ではないために、ピレノイドを陸上植物に導入し、光合成を改良することで作物の生産性向上につなげようとする研究は成功していない。

本研究では、相分離生物学においてこれまで視点が欠けていた植物細胞の知見を取り入れることで、相分離の制御に関わる因子群の普遍性と多様性を明らかにする。具体的には、細胞分裂時にピレノイドの消失が異常になった変異株を単離し、その原因遺伝子を同定することで、ピレノイドの分裂や消失に関わる因子を特定する。これにより、植物が陸上化に伴ってなぜピレノイドを消失していったのかという植物科学の大きな謎を解明するとともに、ピレノイドの消失機構の理解を深めることができる。

ピレノイドの消失機構の解明は、単に基礎研究としての意義だけでなく、食糧問題の解決

に向けた植物バイオマス生産の増大という喫緊の課題にも貢献すると期待される。本研究により、ピレノイドの消失機構の理解が深まれば、将来的には陸上植物へのピレノイド導入による光合成効率の向上が可能になり、作物の生産性向上と食糧問題の解決に寄与することができるだろう。

### 3. 研究の方法

本研究では、細胞分裂時にピレノイドの消失が異常になった変異株を単離し、その原因遺伝子を同定する。変異株の選抜には、以下の3つの表現型を指標とする。

1. ピレノイドが消失せずに野生株よりも大きくなる
2. 異常な分裂により数が増える
3. 異常な分裂により細胞内の位置が異なる

変異株の作出には、ピレノイドのマーカーとして利用されるルビスコの小サブユニット RbcS1 と Venus の融合タンパク質を発現するクラミドモナス株を用いる。この株に対して、ハイグロマイシン耐性カセットの形質転換によるランダム変異導入を行い、変異細胞集団を作製する。

次に、この変異細胞集団から、以下の3つの指標を用いて変異株のスクリーニングを行う。

1. ピレノイドのサイズの異常
2. ピレノイドの数の異常
3. ピレノイドの細胞内位置の異常

スクリーニングにより単離された変異株について、表現型解析を行い、ピレノイドの消失に関わる因子の候補遺伝子を絞り込む。さらに、野生型遺伝子を用いた相補実験により、候補遺伝子がピレノイドの消失に関わる因子であることを確認する。

### 4. 研究成果

上記の方法を用いたスクリーニングの結果、ピレノイドの数と位置に異常がある変異株を5株単離することに成功した。これらの変異株について、次世代シーケンサーを用いたゲノムリシーケンシングによりハイグロマイシンカセットの挿入部位配列の同定を進めた。さらに、いくつかの変異株については、光合成に関する生理学的な表現型解析を行った。その結果、ピレノイドの数が光合成効率に影響を与えることが示唆され、非膜オルガネラの数を規定する生理学的意義が初めて見えてきた。加えて、ピレノイドの分裂時のダイナミクスを詳細に解析するために、高解像度タイムラプス観察系を新たに構築した。この観察系を用いることで、野生株と変異株のピレノイド分裂様式の違いを定量的に評価することが可能となった。

以上の結果から、本研究では相分離オルガネラの消失に関わる因子の同定に向けて、重要な変異株を複数単離することに成功した。また、ピレノイドの数と光合成効率の関連性や、ピレノイドの分裂様式の詳細な解析に向けた基盤を確立することに成功した。今後は、同定した因子が実際に非膜オルガネラの消失因子として機能するかを、*in vitro* 実験などを通して明らかにしていく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshizawa Susumu, Azuma Tomonori, Kojima Keiichi, Inomura Keisuke, Hasegawa Masumi, Nishimura Yosuke, Kikuchi Masuzu, Armin Gabrielle, Tsukamoto Yuya, Miyashita Hideaki, Ifuku Kentaro, Yamano Takashi, Marchetti Adrian, Fukuzawa Hideya, Sudo Yuki, Kamikawa Ryoma	4. 巻 38
2. 論文標題 Light-driven Proton Pumps as a Potential Regulator for Carbon Fixation in Marine Diatoms	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	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) 10.1264/jsme2.ME23015	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 Yamano Takashi	4. 巻 35
2. 論文標題 Understanding of green algal pyrenoid as a phase-separating and CO <sub>2</sub> -concentrating organelle	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLANT MORPHOLOGY	6. 最初と最後の頁 3~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5685/plmorphol.35.3	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 Yamano Takashi, Hirakawa Yoshihisa, Matsuzaki Ryo	4. 巻 35
2. 論文標題 Pyrenoids: Cutting Edge of Phase-separated Organelles in Plants	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLANT MORPHOLOGY	6. 最初と最後の頁 1~2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5685/plmorphol.35.1	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 Shimamura Daisuke, Yamano Takashi, Niikawa Yuki, Hu Donghui, Fukuzawa Hideya	4. 巻 156
2. 論文標題 A pyrenoid-localized protein SAGA1 is necessary for Ca <sup>2+</sup> -binding protein CAS-dependent expression of nuclear genes encoding inorganic carbon transporters in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Photosynthesis Research	6. 最初と最後の頁 181~192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11120-022-00996-7	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 Tsuji Yoshinori, Kusi-Appiah George, Kozai Noriko, Fukuda Yuri, Yamano Takashi, Fukuzawa Hideya	4. 巻 23
2. 論文標題 Characterization of a CO <sub>2</sub> -Concentrating Mechanism with Low Sodium Dependency in the Centric Diatom <i>Chaetoceros gracilis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Marine Biotechnology	6. 最初と最後の頁 456 ~ 462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10126-021-10037-4	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 Yamano Takashi, Toyokawa Chihana, Shimamura Daisuke, Matsuoka Toshiki, Fukuzawa Hideya	4. 巻 188
2. 論文標題 CO <sub>2</sub> -dependent migration and relocation of LC1B, a pyrenoid-peripheral protein in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1081 ~ 1094
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiab528	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 Choi Bae Young, Kim Hanul, Shim Donghwan, Jang Sunghoon, Yamaoka Yasuyo, Shin Seungjun, Yamano Takashi, Kajikawa Masataka, Jin EonSeon, Fukuzawa Hideya, Lee Youngsook	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 2021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 Ng Lee Mei, Komaki Shinichiro, Takahashi Hideyuki, Yamano Takashi, Fukuzawa Hideya, Hashimoto Takashi	4. 巻 22
2. 論文標題 Hyperosmotic stress-induced microtubule disassembly in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Plant Biology	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) 10.1186/s12870-022-03439-6	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21件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Takashi Yamano
2. 発表標題 CO2-dependent migration and relocation of LC1B, a pyrenoid-peripheral protein in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
3. 学会等名 The 10th International Symposium on Inorganic Carbon Utilization by Aquatic Photosynthetic Organisms (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Daisuke Shimamura, Takashi Yamano, Yuuki Niikawa, Hu Donghui, Hideya Fukuzawa
2. 発表標題 Abnormal pyrenoid morphology due to the SAGA1 mutation affects CAS-dependent gene expression and CAS localization in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
3. 学会等名 The 10th International Symposium on Inorganic Carbon Utilization by Aquatic Photosynthetic Organisms (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山野 隆志
2. 発表標題 緑藻ピレノイドの相分離現象とCO2濃縮
3. 学会等名 日本植物学会 第86回大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 嶋村 大亮、安田 詢子、大垣 美萌、山原 洋佑、山野 隆志、福澤 秀哉
2. 発表標題 CO2濃縮機構を制御する緑藻クラミドモナスのWWドメイン含有タンパク質
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 山野 隆志、小峠 達大、福澤 秀哉
2. 発表標題 液-液相分離する緑藻ピレノイドの1細胞高解像度観察
3. 学会等名 ユークレナ研究会第37回研究集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 嶋村 大亮、安田 詢子、大垣 美萌、山原 洋佑、山野 隆志、福澤 秀哉
2. 発表標題 CO2濃縮機構を制御する緑藻クラミドモナスのWWドメイン含有タンパク質
3. 学会等名 第18回京大植物縦横無尽の会ワークショップ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shizuka Miichi, Daisuke Shimamura, Junko Yasuda, Takashi Yamano, Hideya Fukuzawa
2. 発表標題 Functional analysis of LC115, which suppresses the CO2-concentrating mechanism in the green algae <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
3. 学会等名 19th International Student Seminar (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yumeka Masuda, Tatsuhiro Kotoge, Hideya Fukuzawa, Takashi Yamano
2. 発表標題 Isolation and Characterization of Liquid-Liquid Phase Separated Pyrenoid Mutants with the Aberrant Morphology in the Green Alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
3. 学会等名 19th International Student Seminar (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 見市 静香、嶋村 大亮、安田 詢子、山野 隆志、福澤 秀哉
2. 発表標題 クラミドモナスのCO2濃縮機構を抑制するCobW-WWドメインタンパク質の局在と機能
3. 学会等名 第16回クラミドモナス研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 増田 夢佳、小峠 達大、福澤 秀哉、山野 隆志
2. 発表標題 クラミドモナスにおけるピレノイド形成異常変異株の単離と解析
3. 学会等名 第16回クラミドモナス研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池内 友彰、山野 隆志、福澤 秀哉
2. 発表標題 緑藻のMYB型転写因子LCR1が制御する炭酸脱水酵素とCO2チャンネルによるCO2濃縮機構の駆動
3. 学会等名 第16回クラミドモナス研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 嶋村 大亮、新川友貴、HU Donghui、山野隆志、福澤秀哉
2. 発表標題 ピレノイドに局在するSAGA1 タンパク質はCa <sup>2+</sup> 結合性タンパク質CASによる無機炭素輸送体の遺伝子発現に必要である
3. 学会等名 第16回クラミドモナス研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 辻 敬典、George Kusi-Appiah、香西 紀子、福田 有里、山野 隆志、福澤 秀哉
2. 発表標題 ツノケイソウChaetoceros gracilisはNa <sup>+</sup> への依存度が低いCO <sub>2</sub> 濃縮機構を有する
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 Daisuke Shimamura, Yuki Niikawa, Donghui HU, Takashi Yamano, Hideya Fukuzawa
2. 発表標題 Pyrenoid-localized protein SAGA1 is required for the expression of some CCM-related genes
3. 学会等名 19th International Conference on the Cell and Molecular Biology of Chlamydomonas (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小峠 達大、山野 隆志、福澤 秀哉
2. 発表標題 1細胞高解像度イメージングにより得られた緑藻ピレノイドの細胞分裂時のダイナミクス
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 小峠 達大、山野 隆志、福澤 秀哉
2. 発表標題 FRAP法を用いた液-液相分離する緑藻ピレノイドの動態解析
3. 学会等名 第17回京大植物縦横無尽の会ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安田 詢子、嶋村 大亮、山原 洋佑、山野 隆志、福澤 秀哉
2. 発表標題 緑藻クラミドモナスのCO2濃縮機構を制御するCCM1/CBP1複合体の機能解析
3. 学会等名 第17回京大植物縦横無尽の会ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安田 詢子、嶋村 大亮、大垣 美萌、山原 洋佑、中野 博文、山野 隆志、福澤 秀哉
2. 発表標題 緑藻クラミドモナスのCO2濃縮機構を制御するCCM1/CBP1複合体の機能
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 嶋村 大亮、新川 友貴、胡 東輝、山野 隆志、福澤 秀哉
2. 発表標題 緑藻クラミドモナスが持つピレノイドの形態変化はCO2濃縮機構に関わる遺伝子の発現に影響を与える
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 小峠 達大、山野 隆志、福澤 秀哉
2. 発表標題 液-液相分離する緑藻ピレノイドのCO2濃度変化における動態解析
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 大垣 美萌、嶋村大亮、山野隆志、福澤秀哉
2. 発表標題 緑藻クラミドモナスのCO2濃縮機構を制御するCCM1の新規機能ドメインとモチーフの探索
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究代表者の研究室ホームページ  
<https://www.molecule.lif.kyoto-u.ac.jp/index.html>  
 研究代表者の研究室ホームページ  
<https://www.molecule.lif.kyoto-u.ac.jp/index.html>  
 京大プレスリリース「葉緑体タンパク質が働く場所を変化させ光合成の能力を柔軟に維持する仕組みを発見」  
<https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2021-12-23-2>

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		
韓国	POSTECH		