

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月23日現在

機関番号：15401
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23657039
 研究課題名（和文） クロレラに鞭毛はあるのか？

研究課題名（英文） A flagella-derived structure in *Chlorella*?

研究代表者

山田 隆 (YAMADA TAKASHI)
 広島大学・大学院先端物質科学研究科・教授
 研究者番号：40230461

研究成果の概要（和文）：クロレラ NC64A 株ゲノムに検出した鞭毛関連遺伝子 103 個、減数分裂関連遺伝子 4 個に加えて対照としてハウスキーピング遺伝子 22 個を設定し、DNA マイクロアレイを作成した。遺伝子発現誘導条件として、窒素源飢餓、乾燥処理、低温処理を行い、アレイ解析を行った結果、対照と比べて誘導条件下で有意に高発現する 2 つの鞭毛関連遺伝子を検出した。qRT-PCR 法を用いて、この 2 つの遺伝子の特異的な発現パターンを特定した。最適条件における他の複数遺伝子の発現を検討している。

研究成果の概要（英文）：Based on DNA microarray analysis, 103 flagella-related genes, 4 meiosis-related genes, and 22 housekeeping genes of *Chlorella variabilis* NC64A were characterized to be expressed under stress conditions. Two flagella-related genes (Ig174, eG176) were highly expressed under N-starvation and cold-stress conditions. Detailed expression patterns of these genes were further characterized by using qRT-PCR. With these genes as reference, expression of many other genes has been investigated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生理学

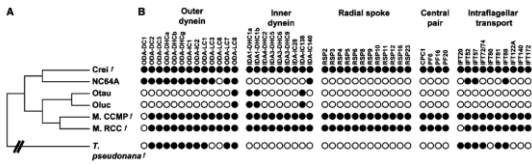
キーワード：オルガネラ・細胞壁

1. 研究開始当初の背景

単細胞緑藻クロレラは、光合成における Calvin 回路発見以来 50 年以上にわたって植物生化学、生理学におけるモデル系として主要な研究対象となってきた。さらにその高い増殖性、有用物質生産性から培養工学的研究も盛んに行われ、昨今の大気温暖化ガス二酸化炭素の吸収対策技術の対象としても注目されている。2006 年より米国エネルギー省(DOE)環境微生物ゲノム国際プロジェクト（米、日、仏、独、韓 共同代

表 Jim L.Van Etten,日本からは山田が参画) が開始され、2007 年 12 月をもって NC64A 株の全 46 Mbp の解読を終了した。NC64A 株は *Chlorella variabilis* NC64A と同定され、ゲノム情報は Plant Cell, 22 (9)に掲載されている(G. Blanc et al.,2010. The *Chlorella variabilis* NC64A Genome Reveals Adaptation to Photosymbiosis, Coevolution with Viruses, and Cryptic Sex. DOI/10.1105/tpc110.076406)。

NC64A ゲノム(GC 67.2%)は~1.1 - 8.6 Mbp の 12 本の染色体からなっており、9,791 の遺伝子をコードしている。予期に



反して、減数分裂関連遺伝子群 (MCK1-サプレッサー-DMC1, 相同性対合タンパク質 HOP1, HOP2, 減数期組換えタンパク質 MER3、核分裂タンパク質 MND1, MutS/MSH4) が全て保存されていた。さらに、クラミドモナスで同定されている 360 個の鞭毛関連タンパク質の内 103 個 (29%) が NC64A でも保存されていた。その多くは鞭毛運動に直接関係するダイニン外腕(outer dynein arm)のものであり、また鞭毛構築と維持に重要な鞭毛内輸送 (IFT:intraflagellar transport) タンパク質 IFT52, IFT57, IFT88 やキネシンモータータンパク質 FLA8, キネシン結合タンパク質 KAP もコードされていた)。IFT57, IFT88 は鞭毛を有する生物だけに見いだされている。

2. 研究の目的

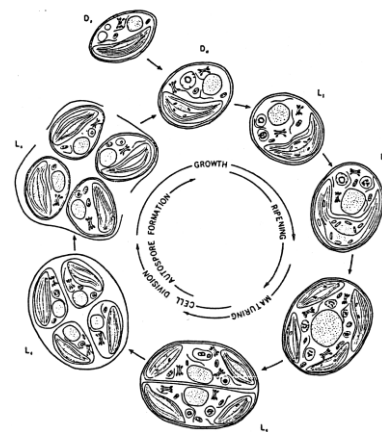
Chlorella variabilis NC64A に検出された 103 個の鞭毛関連タンパク質遺伝子について DNA マイクロアレイを作製し、種々の細胞培養条件 (孢子形成誘導条件、ストレス条件) における発現性を調べる。これと併行して、各種鞭毛タンパク質に対する抗体を用いた蛍光顕微鏡観察により鞭毛関連構造形成を細胞学的に検出する。さらに微細構造については透過型電子顕微鏡、免疫電子顕微鏡を用いてその詳細を明らかにする。クロレラはピコプラクトン (*Ostreococcus*, 12.6Mbp)、紅藻 (*Cyanidoschizon*, 16.5Mbp)、珪藻 (*Thalassiosira*, 34Mbp)、クラミドモナス (121Mbp) 等の各種下等真核藻類間の関係を系統的に結びつける中心に位置し、またこれら藻類をヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella*) を経てシロイヌナズナ (*Arabidopsis*, 140Mbp)、イネ (*Oryza*, 389Mbp) 等高等植物へ系統的につなげる扇の要として重要である。特に、本研究で明らかにする運動性、有性生殖性の証明はこれらの機能の起原・進化プロセスを知る上で極めて興味深い。他の単細胞藻類との系統学的な比較を含めて、光合成系により普遍的な進化体系を構築できる。

3. 研究の方法

C. variabilis NC64A ゲノムに検出した、クラミドモナス鞭毛形成関連タンパク質遺伝子 103 個に対して、DNA アレイを作製する。このアレイを用いて、孢子形成誘導条件、ストレス条件における各遺伝子の発現特性を調べ、発現パターンに応じてグループ化する。主要遺伝子については qRT-PCR 法により発現誘導最適条件を確定する。鞭毛関連遺伝子発現条件下におけるクロレラ細胞を抗各種鞭毛関連タンパク質抗体で処理し、鞭毛タンパク質生成、鞭毛構造形成を免疫蛍光顕微鏡法で検出する。さらに、微細構造については細胞超薄切片を調製し、透過型電子顕微鏡観察、免疫電顕法により、その実体・特性を明らかにする。減数分裂遺伝子についても発現性を調べ、鞭毛構造形成との相関性を明らかにする。

4. 研究成果

ゲノムに検出した鞭毛関連遺伝子 103 個、減数分裂関連遺伝子 4 個、に加えて対照としてハウスキーピング遺伝子 22 個 (含植物ホルモン関係遺伝子群、キチン分解関連遺伝子群等) を設定し、各遺伝子について 10~15 カ所、23~25 塩基の配列を設計し DNA マイクロアレイを作成した。遺伝子発現誘導条件としては、(1) 窒素源飢餓処理 (12 h, 48h), (2) 乾燥条件処理 (0.1 mM アブシジン酸処理 6h, 40h), (3) 低温処理 (4C, 6h), (4) ウイルス



感染、を行い、クロレラ細胞より全 RNA を抽出し cDNA 標識化した。対照としては通常培養条件下、対数増

殖期の細胞より全 DNA を抽出し同様に標識した。これらプローブを用いて、DNA マイクロアレイ解析を行った結果、対照と比べて誘導条件下で有意に高発現する 2 つの鞭毛関連遺伝子を検出した。これら高発現鞭毛関連遺伝子 Ig174, eG176 を指標に qRT-PCR を用いて鞭毛誘導条件の検討を行った。(1) 窒素源飢餓条件においては、Ig174 の高度の発現がみられたものの、eG176 は有意な発現を示さなかった。(2) アブシジン酸添加条件では、

両遺伝子発現レベルとも低かった。(3) 低

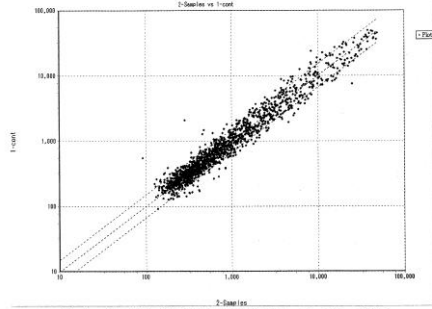
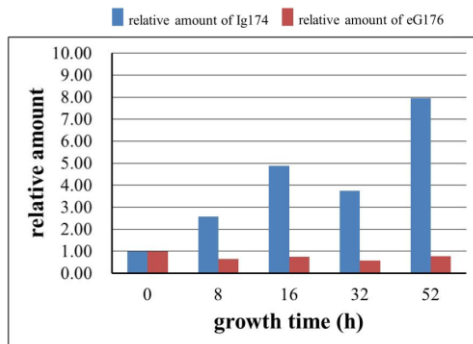


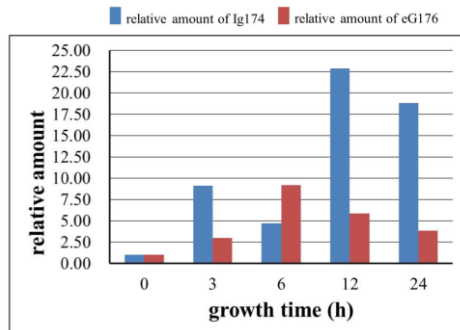
Fig.1 マイクロアレイ解析の結果を用いたスキャッタープロット解析

温条件 (4°C処理) では、6-12時間後、両遺伝子とも高い発現を示した。このように、クロ



qRT-PCRによるN-源飢餓条件下における鞭毛関連遺伝子の発現解析

レラの鞭毛関連遺伝子には、その発現を特異的に誘導する環境条件が存在することが判明



qRT-PCRによる低温ストレス条件下における鞭毛関連遺伝子の発現解析

した。この環境条件において他の鞭毛関連、減数分裂関連の各遺伝子が発現する可能性がある。クロレラは単細胞緑藻として最も広く認識され、光合成生化学・生理学においてモデル生物として長い研究の歴史(数十年)を持ち、その特性は多くの学術論文、書籍等の文献に記載されてきた。その中で従来否定されてきたクロレラの運動性(鞭毛形成)と有性生殖プロセスについて、ゲノム情報から得られた関連遺伝子が実際に発現するという本研究からの新知見の意義は大きい。類似の事例として、配偶子形成の際に特殊な運動性鞭毛形成し有性生殖を行う淡水性珪藻タラシオシラが知られている。さらに、クロレラをは

じめ他の単細胞藻類との系統学的な比較を含めて、光合成生物全般(運動性、有性生殖プロセスを含めて)のより普遍的な進化体系を構築する必要がある。鞭毛形成遺伝子の発現が誘導される条件確定後、その条件で処理した細胞に対して、抗鞭毛タンパク質抗体を用いた免疫染色と蛍光顕微鏡観察による鞭毛構造解析を行う事を計画していたが、時間切れとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

1. Rakkhumkaew, N., Shibatani, S., Kawasaki, T., Fujie, M., Yamada, T. (2013) Prolonged synthesis of hyaluronan by *Chlorella* cells infected with chloroviruses. (査読あり) J. Biosci. Bioeng. 115, 527-531.
2. Rakkhumkaew, N., Shibatani, S., Kawasaki, T., Fujie, M., Yamada, T. (2013) Hyaluronan synthesis in cultured tobacco cells (BY-2) expressing a chlorovirus enzyme: cytological studies. (査読あり) Biotech. Bioeng. 110, 1174-1179.
3. Blanc G., Yamada, T. et al. (2012) The genome of the polar eukaryotic microalga *Coccomyxa subellipsoidea* reveals traits of cold adaptation. (査読あり) Genome Biol., 13, R39 10.1186/gb-2012-13-5-r39
4. Smith, D. R., Burki, F., Yamada, T., Grimwood, J., Grigoriev, I. V., Van Etten, J. L., Keeling, P. J. (2011) The GC-rich mitochondrial and plastid genomes of the green alga *Coccomyxa* give insight into the evolution of organelle DNA nucleotide landscape. (査読あり) PLoS One, 6(8), e23624, 10.1371/journal.pone.0023624
5. Yamada, T. (2011) Giant viruses in the environment: their origins and evolution. (査読あり) Curr. Opin. Virol. 1, 58-62.

[学会発表] (計3件)

1. 熊谷徳泰, 川崎 健, 藤江 誠, 山田 隆: クロレラ鞭毛関連遺伝子の発現解析, 第64回日本生物工学会大会2012年10月24日神戸国際会議場
2. Rakkhumkaew, N., Kawasaki, T., Fujie, M., Yamada, T. Prolonged synthesis of hyaluronan by *Chlorella* cells infected with Chloroviruses. 第64回日本生物工学会大会2012年10月24日神戸国際会議場
3. Rakkhumkaew, N., Shibatani, S., Kawasaki, T., Fujie, M., Yamada, T.

Cytological study of hyaluronan synthesis in tobacco cultured-cells (BY-2) exerted by chlorovirus enzymes. The 4th Thailand-Japan International Academic Conference 2011, 6 Nov. Tokyo, Japan.

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/ichikou/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 隆 (YAMADA TAKASHI)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・教授

研究者番号：40230461

(2) 研究分担者

藤江 誠 (FUJIE MAKOTO)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・准教授

研究者番号：20274110

(3) 連携研究者

()

研究者番号：