

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570114

研究課題名(和文) 光合成生物の貯蔵多糖合成系の多様性と進化

研究課題名(英文) Diversity and evolution of storage glucan synthetic systems in photosynthetic organisms

研究代表者

藤原 祥子 (Fujiwara, Shoko)

東京薬科大学・生命科学部・准教授

研究者番号：30266895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：光合成生物はその産物をグルカンの形で貯蔵するが、その構造は多様性に富む。本研究ではその出現機構の解明を目的とし、以下の検証及び解析を行った。1. 原始紅藻Cyanidioschyzon (デンプン型)とCyanidium (グリコーゲン型)の酵素活性及び発現パターンの比較から仮説を立て、Cyanidioschyzonでイソアミラーゼ及び枝作り酵素の破壊株を作製、貯蔵多糖の分析を行った。2. ハプト藻から得られた酵母KRE6ホモログcDNAクローンの塩基配列を決定したところ、 α -グルカンとの結合に関与すると考えられるアミノ酸配列が保存されていた。この遺伝子の機能を検証するため、発現抑制法の検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Photosynthetic organisms have a wide variety of storage glucans. To clarify the evolutionary processes that led to syntheses of starch and α -glucan, we performed the following analyses: 1. Activities and expression patterns of glucan synthesis-related enzymes were compared between the primitive rhodophytes Cyanidioschyzon (semi-amylopectin-type) and Cyanidium (glycogen-type). To examine roles of the enzymes isoamylase and α -glucan branching enzyme, disruptants of the genes were constructed in Cyanidioschyzon and the structures of the glucan were characterized. 2. The nucleotide sequence of KRE6 homologue obtained from the haptophyte Pleurochrysis cDNA library has amino acid residues conserved in α -glucan binding proteins. Knockdown of this gene was examined to identify a function of the gene product.

研究分野：植物生理学

キーワード：貯蔵多糖 光合成産物 デンプン グリコーゲン セミアミロペクチン 光合成生物 紅藻 緑藻

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

光合成生物はその産物を α -グルカンもしくは β -グルカンとして貯蔵する。進化の過程で、シアノバクテリアがもっていたグリコーゲン(α -グルカン)を作る能力は、一次共生植物(灰色植物、紅色植物、緑色植物)ではデンプン顆粒(α -グルカン)を作る能力へと進化し、さらに二次共生によりその能力は一部のもの(クリプト植物、渦鞭毛植物)では維持されるとともに、他のもの(不等毛植物、ハプト植物、ユーグレナ植物、クロララクニオン植物)では β -グルカンを作る能力に移行したと考えられている。しかし貯蔵多糖合成系については、合成酵素の性質(産物が α -グルカンか β -グルカンか、また glucose 供与体が ADP-glucose か UDP-glucose か)や細胞内局在性(葉緑体か細胞質か、あるいは葉緑体周縁部か)が分類群によって異なり複雑である。これは共生直後には共生体と宿主の酵素が共存し、その後取捨選択されていったためと考えられるが(Ball et al. 2011)、具体的な進化の道筋はよくわかっていない。 α -グルカンでは、ランダムな枝分かれ構造のために 42nm 以上の構造が形成できない可溶性のグリコーゲンから、クラスター構造をもち大きな顆粒を形成することのできるデンプン顆粒へと進化することにより、浸透圧に影響を及ぼしにくい形で多糖を大量に貯蔵することが可能になったと考えられているが、合成系の進化はまだよくわかっていない。 β -グルカンの合成系については、ユーグレナ植物のパラミロン顆粒で膜結合性の合成酵素の性質が調べられているが(Kiss & Triemer 1988)、その構造および合成酵素遺伝子解析の報告はまだない。それ以外の生物では合成酵素の性質も、まだ全く調べられていない。

申請者は、デンプン合成系の出現機構に興味を持ち、様々なシアノバクテリアの貯蔵多糖の構造を調べたところ、セミアミロペクチン(グリコーゲンとアミロペクチンの中間型)を持つものが窒素固定性の単細胞種を含むクレード(グループ V)の中に見つかった(Nakamura et al. 2005)。このグループのシアノバクテリアが真核生物に共生して一次共生植物が生じた可能性が示唆された(Deschamps et al. 2008)が、さらなる解析によりデンプンへの進化はシアノバクテリア内とそれぞれの共生直後に合わせて3度起こったと考えられた(Ball et al. 2011)。申請者らはこれまでに原始紅藻(紅色植物)の貯蔵多糖に関し幅広く解析を行い、イデユコゴメ類にはグリコーゲンを持つものとセミアミロペクチンを持つものがあることを明らかにしてきた。 α -グルカン構造の変化機構については、シアノバクテリアで検討されているが、まだ詳しくはわかっていない。一次及び

二次共生植物では、宿主由来の酵素を含むためその機構も異なると考えられるが、まだ全く検討されていない。また、申請者らは多くの藻類がもつピレノイドデンプンにも着目し、その形成には顆粒結合性 α -グルカン伸長酵素(GBSS)が関与しているのではないかという仮説を立てて研究を進めている。さらに二次共生植物がもつ β -グルカンの構造についても解析を行い、中でも系統学的位置にも謎が残るハプト植物は β -1,6-結合が β -1,3-結合よりも多いという独特の構造をもつことを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

光合成生物はその産物をグルカンの形で貯蔵する。この一次生産者の作る産物が地球上の生命を支えていると言っても過言ではないが、その構造はグリコーゲン、デンプン等の α -グルカン、あるいは、ラミナラン、クリソラミナラン、パラミロン等の β -グルカンと多様性に富む。本研究は、その出現機構の解明を目的とする。

具体的には、一次共生植物の中でもグリコーゲン、セミアミロペクチン、セミアミロペクチン+アミロース、と驚くべき多様性を示す原始紅藻に注目し、その合成機構の解明および進化的考察を行う。同時に、まだ全く未解明なハプト植物を含む二次共生植物の β -グルカン合成系の解明も目指す。加えて、ピレノイドデンプンはアミロースを作る種(GBSSをもつ種)で形成されるのかどうか(低 CO_2 条件に適応して急速に発達するピレノイドデンプンの形成には、GBSSの作る長鎖の多い flexibility の高いデンプン合成が必要かどうか)の検証も行う。

3. 研究の方法

(1) デンプン型 \rightarrow グリコーゲン型移行仮説の検証: 原始紅藻 *Cyanidioschyzon*(デンプン型)と *Cyanidium*(グリコーゲン型)の細胞粗抽出液を用いて、グルカン合成関連酵素群(伸長酵素、枝作り酵素、枝切り酵素)酵素活性を調べると共に、クローニングを試みた。*Cyanidioschyzon*の枝切り酵素イソアミラーゼと枝作り酵素の遺伝子破壊株を作製し、グルカンの構造、デンプン顆粒の形態に対する影響を検討した。

(2) ピレノイドデンプンに関する仮説(合成にGBSSや細胞骨格が関与するという仮説)の検証: ピレノイドを持たない緑藻 *Chloromonas* や *Chlamydomonas* の変異株を用いて、GBSSの有無及びデンプンの構造を調べた。

(3) ハプト植物の β -グルカン合成酵素: 酵母細胞壁枝作り酵素 KRE6 に対するハプト植物の cDNA ホモログについて塩基配列の決定

を行った。さらに、この遺伝子の発現を抑制し機能を検証するために、発現抑制法及び少量の細胞からの β -グルカン検出法の検討を行った。

4. 研究成果

本研究では、多様性に富む貯蔵多糖の出現機構の解明を目的とし、以下の検証および解析を行った。

(1) デンプン型 \rightarrow グリコーゲン型移行仮説の検証：原始紅藻 *Cyanidioschyzon* (デンプン型) と *Cyanidium* (グリコーゲン型) のグルカン合成関連酵素群の活性の比較及び明暗サイクルにおける遺伝子発現パターンの解析から、デンプン型はイソアミラーゼによる枝揃えが活発に行われることにより形成される可能性、及びグリコーゲン型とは基質特異性の異なる枝作り酵素が働くことにより形成される可能性が考えられた。これらの酵素の機能を検証するため、*Cyanidioschyzon* で破壊株の作製を行った。これまでに、2つあるイソアミラーゼ遺伝子の各破壊株で鎖長分布に変化がみられ顆粒の形態にも異常がみられていることから、2つのイソアミラーゼがデンプン構造の形成に関与しており顆粒の形成にも重要な役割をもつ可能性が示唆された。

(2) ピレノイドデンプンに関する仮説 (ピレノイドデンプンは、伸長酵素の一種 GBSS により長鎖が作られるようになった藻類において形成されるようになったという仮説) の検証：緑藻 *Chloromonas* では GBSS の有無とピレノイドデンプンの有無に相関性はないことがわかり、さらなる検証には活性の定量や他の分類群でも調べる必要があることが示された。

(3) ハプト植物の β -グルカン合成酵素：円石藻 EST データベースから得られた酵母 *KRE6* ホモログクローンの全長塩基配列を決定したところ、 β -グルカンとの結合に関与すると考えられるアミノ酸配列が保存されていた。この遺伝子の発現を抑制し機能を検証するために、抑制法及び β -グルカン検出法の検討を行った。効率よい抑制法は現在も検討中であるが、少量の細胞で β -グルカンを定量する方法を確立できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 10 件)

① Miyashita, S., C. Murota, K. Kondo, S. Fujiwara, M. Tsuzuki: Arsenic metabolism in cyanobacteria. *Environ. Chem.* in press 査読有り

② Yamamoto, N., T. Kudo, S. Fujiwara, Y. Takatsuka, Y. Hirokawa, M. Tsuzuki, T. Takano, M. Kobayashi, K. Suda, E. Asamizu, K. Yokoyama, D. Shibata, S. Tabata, K. Yano: Pleurochrysome: a web database of *Pleurochrysis* transcripts and orthologs among heterogeneous algae. *Plant Cell Physiol.* 57, e6. (2016) 査読有り

DOI: 10.1093/pcp/pcv195

③ Sakurai, T., M. Aoki, X. Ju, T. Ueda, Y. Nakamura, S. Fujiwara, T. Umemura, M. Tsuzuki, A. Minoda: Profiling of lipid and glycogen accumulations under different growth conditions in the sulfotolerant red alga *Galdieria sulphuraria*. *Bioresour. Technol.* 200: 861-6. (2016) 査読有り

DOI: 10.1016/j.biortech.2015.11.014

④ Okada, K., E. Horii, Y. Nagashima, M. Mitsui, H. Matsuura, S. Fujiwara, M. Tsuzuki: Genes for a series of proteins that are involved in glucose catabolism are upregulated by the Hik8-cascade in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Planta* 241: 1453-62. (2015) 査読有り

DOI: 10.1007/s00425-015-2270-z

⑤ Sawada, T., Y. Nakamura, T. Ohdan, A. Saitoh, Francisco PB Jr, E. Suzuki, N. Fujita, T. Shimonaga, S. Fujiwara, M. Tsuzuki, C. Colleoni, S. Ball: Diversity of reaction characteristics of glucan branching enzymes and the fine structure of α -glucan from various sources. *Arch. Biochem. Biophys.* 562: 9-21. (2014) 査読有り

DOI: 10.1016/j.abb.2014.07.032

⑥ Kato, Y., T. Miyauchi, Y. Abe, D. Kojić, M. Tanaka, N. Chikazawa, Y. Nakatake, S. B. H. Ko, D. Kobayashi, A. Hazama, S. Fujiwara, T. Uchida, M. Yasui: Unprecedented cell-selection using ultra-quick freezing combined with aquaporin expression. *PLoS ONE* 9(2): e87644. (2014) 査読有り

DOI: 10.1371/journal.pone.0087644

⑦ Hirokawa, Y., S. Matsuzuka, S. Itayama, T. Uchida, S. Fujiwara, N. Ozaki, H. Nagasawa, M. Tsuzuki: Localization and associative strength of acid polysaccharides in coccoliths of *Pleurochrysis haptoneoformis* (Haptophyta) predicted from their extractability from partially decalcified coccoliths. *Open Journal of Marine Science* 3: 48-54. (2013) 査読有り

<http://dx.doi.org/10.4236/ojms.2013.31005>

⑧ Murota, C., H. Matsumoto, S. Fujiwara, Y. Hiruta, S. Miyashita, M. Shimoya, I. Kobayashi, M. O. Hudock, R. K. Togasaki, N. Sato, M. Tsuzuki: Arsenic tolerance in a *Chlamydomonas* photosynthetic mutant is due to reduced arsenic uptake even in light conditions. *Planta* 236: 1395-403. (2012) 査読

有り

DOI: 10.1007/s00425-012-1689-8

- ⑨ Miyashita, S., S. Fujiwara, M. Tsuzuki, T. Kaise: Cyanobacteria produce arsenosugars. *Environ. Chem.* 9: 474-84. (2012) 査読有り
<http://dx.doi.org/10.1071/EN12061>
- ⑩ Tabei, Y., K. Okada, E. Horii, M. Mitsui, Y. Nagashima, T. Sakai, T. Yoshida, A. Kamiya, S. Fujiwara, M. Tsuzuki: Two regulatory networks mediated by light and glucose involved in glycolytic gene expression in cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* 53: 1720-7. (2012) 査読有り
DOI: 10.1093/pcp/pcs115

[学会発表] (計 7 件)

- ① 櫻田舜人、浅川航輝、遠藤博寿、鈴木道生、小暮敏博、藤原祥子、都筑幹夫: 円石藻 *Pleurochrysis* の円石形成 —ベースプレートの性質と関連遺伝子の探索—。第10回バイオミネラリゼーションワークショップ (東京) 2015/12.
- ② 櫻田舜人、鈴木道生、小暮敏博、板山翔、都筑幹夫、藤原祥子: *Pleurochrysis* の円石形成 (in vitro 石灰化)。日本植物学会第79回大会 (新潟) 2015/9.
- ③ 櫻田舜人、鈴木道生、小暮敏博、板山翔、松塚悟、小林貴恵、都筑幹夫、藤原祥子: 円石藻 *Pleurochrysis* の円石におけるベースプレートの性質。東京大学大気海洋研究所共同利用研究集会「バイオミネラリゼーションと石灰化 —遺伝子から地球環境まで—」 & 第9回バイオミネラリゼーションワークショップ共催シンポジウム (千葉) 2014/12.
- ④ 植田達也、櫻井俊宏、藤原祥子、都筑幹夫: クラミドモナスの葉緑体形態に及ぼす阻害剤の影響。日本藻類学会第38回大会 (船橋) 2014/3.
- ⑤ 板山翔、小林貴恵、藤原祥子、遠藤博寿、長澤寛道、都筑幹夫: 円石藻 *Pleurochrysis haptanemofera* の石灰化に関する研究: 円石構成成分の機能解析と石灰化関連遺伝子の探索。日本藻類学会第38回大会 (船橋) 2014/3.
- ⑥ 白武拓磨、磯田春奈、戸谷藍子、出雲旦子、小高徹郎、西條広隆、藤原祥子、都筑幹夫: 気相および液相中におけるクロレラの光合成と増殖特性 —ハイオマス生産の生物学的基礎として—15回マリンバイオテクノロジー学会大会 (沖縄) 2013/6.
- ⑦ Itayama, S., S. Matsuzuka, Y. Hirokawa, S. Fujiwara, K. Nakanishi, and M. Tazuki: Localization and associative strengths of acidic polysaccharides of *Pleurochrysis haptanemofera*. The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology

Conference (Kochi) 2012/7.

[図書] (計 1 件)

- ① 藤原祥子、都筑幹夫: 藻類ハンドブック (渡邊信監修)、第2章 代謝と物質、第1節 代謝と物質、5 糖類—デンプン他、株式会社エヌ・ティー・エス、pp. 174-177. (2012).

[その他]

関連ホームページ

<http://bioinf.mind.meiji.ac.jp/phapt/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 祥子 (FUJIWARA SHOKO)

東京薬科大学・生命科学部・准教授

研究者番号: 30266895

(2) 研究分担者

なし