

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 18 日現在

機関番号：82101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840128

研究課題名(和文)クリプト藻における射出器官の成立・進化に関する研究

研究課題名(英文)Study on evolution of trichocyst in cryptomonads

研究代表者

山岸 隆博(Yamagishi, Takahiro)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク研究センター・特別研究員

研究者番号：30379333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：トリコシストは、クリプト藻、渦鞭毛藻、及び繊毛虫で見られる射出器官である。これまで、射出器官の進化・起源は明らかになっていない。クリプト藻トリコシストの分子構造を明らかにすることにより、クリプト藻の射出器官が、渦鞭毛藻や繊毛虫が有する射出器官とは独立した起源を有することを明らかにした。Pyramimonas parkeae (Prasinophyceae) はまた、クリプト藻に類似した射出器官を有するが、この構造体の分子構造はこれまで明らかになっていない。LC/MS/MS解析等により、P. parkeaeの射出物質がコアヒストンから構成されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Trichocysts are ejectile organelles found in cryptomonads, dinoflagellates and peniculate ciliates. The fine structure of trichocysts differs considerably among lineages, and their evolutionary relationships are unclear. We concluded that cryptomonad trichocysts have an evolutionary origin independent from the peniculate ciliate trichocysts based on the biochemical makeup of the trichocyst constituents. Pyramimonas parkeae (Prasinophyceae) has an ejective organelle containing a coiled ribbon structure resembling the ejectosome in Cryptophyta. This structure is discharged from the cell by a stimulus and extends to form a tube-like structure, but the molecular components of the structure have not been identified. We concluded that the ribbon-like structure of P. parkeae constitutes a complex of core histones (H3, H2A, H2B and H4) and acidic polysaccharide. This is the first report to indicate that core histones form a complex associated with a non-DNA acidic polymer.

研究分野：Cell Biology

キーワード：Algae Molecular Evolution

### 1. 研究開始当初の背景

クロムアルベオラータ(*Chromalveolata*)は、クロミスタ(クリプト藻、ハプト藻、不等毛類)とアルベオラータ(繊毛虫類、アピコンプレクサ、渦鞭毛藻)からなる系統群であり、これらは紅藻由来の色素体を有する光合成性の共通祖先から進化したと考えられている。この系統群のうち、不等毛類、ハプト藻、アピコンプレクサを除きその大部分がトリコシスト(*Trichocyst*)と呼ばれる特殊なオルガネラ(射出装置)を有している。クロミスタに属するクリプト藻では、トリコシスト(エジェクトソーム)は、ガレット(咽喉部)と呼ばれる陥入部周辺部に存在している。このトリコシストの内部には、リボン状のフィラメントがコイル状に巻かれた構造体が存在し、刺激を受けると螺旋状に解けて細胞外に放出される。トリコシストの放出は、外敵からの防御反応であると考えられているが詳細は不明である。一方、アルベオラータに属する繊毛虫(特にゾウリムシやテトラヒメナ)では、およそ1000ものトリコシストが体表を覆うように細胞膜直下に存在し、細胞が機械的または化学的刺激を受けると一斉に内容物が細胞外に放出される。トリコシストタンパク質は紡錘状のオルガネラに格子状の結晶体として収納されているが、放出と同時にその構造は針状の分泌物へと変化する。トリコシストタンパク質の生化学的研究は、近年、特にゾウリムシとテトラヒメナにおいて良くなされており、ゾウリムシのトリコシストタンパク質(*trichocyst matrix proteins, TMPs*)は、100以上のポリペプチド(15-20 kDa)から成る非常に複雑な構造体であることが明らかになっている(*Gautier et al. 1996*)。

一方で、ある種のゾウリムシには、細胞内に *Caedibacter* 属の細菌が寄生することが知られている。*Caedibacter* は、細胞内に R-body と呼ばれるタンパク質構造体を有し、R-body の放出は宿主細胞に致命的なダメージを与える。しかしながら、ある系統のゾウリムシは *Caedibacter* 属の細菌に耐性を有し、共生関係が成立している。*Caedibacter* 属における R-body は、クリプト藻のトリコシストと同様、ロール状のリボン構造をなし、細胞外で解けて螺旋構造をとる。このように以前からクリプト藻におけるトリコシストと R-body との形態的類似性が指摘されてきた。*Caedibacter* における R-body タンパク質はすでに同定されており、RebA(18 kDa), RebB(13 kDa), RebC(10 kDa), RebD(10 kDa)の4分子から構成されることが知られている。これらのタンパク質はプラスミドコードであり、おそらくバクテリオファージ由来であると考えられている(*Jeblick and Kusch 2005*)。申請者は最近、繊毛虫におけるトリ

コシストおよびゾウリムシの寄生細菌である *Caedibacter taeniospiralis* における R-body とクリプト藻トリコシストの進化的類縁性を検証する目的で、海産クリプト藻 *Pyrenomonas helgolandii* からトリコシストを単離・精製し、構成タンパク質の解析を行った。その結果、トリコシスト精製分画の 2-D 解析は、クリプト藻トリコシストが少なくとも6つの低分子タンパク質から構成されることを示した。また、これらのうち4つのタンパク質について cDNA の全長を解読したところ (PheTri1, PheTri2, PheTri3-1, PheTri3-2)、それらはゾウリムシやテトラヒメナのトリコシストタンパク質とは同源性を有さず、*C. taeniospiralis* の R-body 構成タンパク質 RebB と同源性を示した (*Yamagishi et al. 2012*)。また、真核生物においてこれらに相同なタンパク質は見出されなかったこと、Tri タンパク質は N 末端領域に小胞体輸送シグナルや他のオルガネラ輸送シグナルとは全く異なるシグナル配列を有することなどから、クリプト藻におけるトリコシストは、*C. taeniospiralis* またはそれに近縁の細菌起源の細胞内共生由来オルガネラである可能性が示唆された (*Yamagishi et al. 2012*)。

### 2. 研究の目的

申請者は最近、クリプト藻のトリコシストから放出されるリボン状構造がゾウリムシの寄生細菌 *Caedibacter taeniospiralis* が作る R-body(クリプト藻と類似したリボン状構造)と進化的に相同であることを明らかにした。また、これらのタンパク質の N 末端領域には小胞体輸送や他のオルガネラ輸送とは全く異なるシグナル配列が存在することなどを明らかにし、クリプト藻のトリコシストが *Caedibacter* またはこれに近縁な細菌の細胞内共生に起源する可能性を示した。本研究では、クリプト藻トリコシストが細胞内共生に起源するののかについて詳細な検証を行う。また、シグナルペプチドのターゲットを解明することでトリコシスト関連物質の宿主-オルガネラ間輸送メカニズムの解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

R-body とクリプト藻トリコシストタンパク質の同源性は、タンパク質、遺伝子レベルで明らかにされているが (*Yamagishi et al. 2012*)、生化学的な検証は不十分である。生化学的同源性の検証の一貫として、R-body およびクリプト藻トリコシスト関連推定アミノ酸配列について人工ペプチドを作製し (抗原性チェックを行い、抗原性の高い領域において)、ポリクローナル抗体を作製する [外注]。これらの抗体のそれぞれのタンパク質に対する交差反応の有無を、ウェスタンブロットティング、間接蛍光抗体法及び免疫電顕法により解析し、生化学的同源性について検

証する。抗体の力価・特異性が不十分である場合は、リコンビナントタンパク質を作製後、ポリクローナル抗体を作製する。定なオルガネラである。したがって現在、無傷のトリコシストを単離することは困難である。一方で、トリコシストの放出にはカルシウムイオンが関連しており、カルシウムイオンキレート条件下では、トリコシストは非常に安定であることが報告されている (Rhiel et al. 2011)。本研究では、カルシウムイオンキレート条件下で、細胞破碎後、密度勾配法により無傷トリコシストの高度精製系を確立する。

クリプト藻のトリコシスト構成タンパク質は、真核生物において相同なタンパク質は見出されず、ゾウリムシの共生細菌である *C. taeniospiralis* の R-body 構成タンパク質 RebB に最も高い相同性を示す (Yamagishi et al. 2012)。また、R-body 構成タンパク質は、プラスミドコードであり、おそらくはバクテリアオフアージュ由来であるとされるが、詳細は不明である (Jeblick and Kusch 2005)。クリプト藻トリコシストの起源をより詳細に解析する目的で、バクテリアゲノム、バクテリアオフアージュおよびプラスミドゲノムのデータベースを利用し、トリコシスト関連タンパク質の広範囲なホモロジーサーチまたは HMM サーチを行い、トリコシストタンパク質の起源について解析する。

オルガネラの膜構造は、それが細胞内共生に由来するか否かを検証するための重要な要因の1つであるが、これまで、クリプト藻トリコシストの膜構造に関してはほとんど研究がなされていない。本研究では、凍結置換法による電子顕微鏡観察により、トリコシスト膜の詳細な観察を行う。さらに、キャピラリー電気泳動質量分析(CE-MS)によるトリコシスト膜タンパク質の網羅的解析を行いクリプト藻トリコシスト膜の構造を解析する。トリコシストの内容物(トリコシストリボン)は、刺激により細胞外へ放出され、非常に不安定なオルガネラである。したがって現在、無傷のトリコシストを単離することは困難である。一方で、トリコシストの放出にはカルシウムイオンが関連しており、カルシウムイオンキレート条件下では、トリコシストは非常に安定であることが報告されている (Rhiel et al. 2011)。本研究では、カルシウムイオンキレート条件下で、細胞破碎後、密度勾配法により無傷トリコシストの高度精製系を確立する。

無傷トリコシスト分画について、界面活性剤により膜分画を精製し、キャピラリー電気泳動質量分析(CE-MS)により、トリコシスト

膜タンパク質の網羅的解析を行う。クリプト藻 *Guillardia theta* (CCMP2712)のゲノムデータベース(ドラフト)を利用し、タンパク質の同定を行い、膜構造を検証する。

クリプト藻トリコシストが細胞内共生起源のオルガネラであるとするれば、トリコシスト関連遺伝子以外にクリプト藻ゲノム内に他の移行遺伝子が存在する可能性は高いと考えられる。本研究では、トリコシスト構成遺伝子の相同性からクリプト藻に共生した可能性が高いと考えられる *C. taeniospiralis* のゲノムドラフト解析を行い、クリプト藻 *Guillardia theta* (CCMP2712)ゲノム(ドラフト)との比較解析により、宿主への移行遺伝子の探索を行う。*C. taeniospiralis* は、free-livingの細菌ではないので、宿主であるゾウリムシを培養、破碎後、密度勾配法により単離・回収する。この単離法はすでに Schmidt et al. (1988)により確立されており、本研究でもこの方法に従い *C. taeniospiralis* の単離を行う。細菌ゲノム DNA から次世代シーケンサー(GS FLX)を用いて 180Mb 程度のフラグメント解析を行う。アセンブル後、*Guillardia theta* (CCMP2712)のゲノムとの比較解析により、宿主側への移行遺伝子の探索を行う。

クリプト藻トリコシスト構成遺伝子の N 末端領域には小胞体輸送や他のオルガネラ輸送とは全く異なるシグナル配列が存在する。このシグナルペプチドのターゲットおよび機能を分子生物学的手法を用いて解明することで、トリコシスト関連物質の宿主-オルガネラ間輸送メカニズムを解明する。この研究課題を達成するために、クリプト藻に汎用的な一過的遺伝子発現系を開発する。*Guillardia theta* (CCMP2712)のゲノム(ドラフト)が公開されているので(JGI)、このデータベースを利用し、高発現プロモーターの開発を行う。高い発現能を有するプロモーターが得られない場合は、プロモーターレスベクターを用いたクリプト藻ゲノム断片のショットガンクローニングにより、独自に高発現能を有するプロモーターを開発する。また、エレクトロポレーション法およびパーティクルガン法などを用いて、遺伝子導入技術の開発を行う。シグナルペプチドの N 末端に GFP などのレポーター遺伝子および開発したプロモーター配列を結合したプラスミドを構築する。構築したプラスミドは、培養細胞へ遺伝子導入し、継時的に観察を行い、蛍光タンパク質の局在を解析し、宿主-オルガネラ間輸送メカニズムを解明する。

形質転換系の開発が困難な場合は、平成 25 年度に作製したポリクローナル抗体を用い、

間接蛍光抗体法または免疫電顕法などにより、トリコシスト関連タンパク質の詳細な輸送経路の解明を試みる。

#### 4. 研究成果

海産クリプト藻 *Pyrenomonas helgolandii* において、これまで同定されている4つのトリコシスト関連タンパク質 (PheTri1, 2, 3-1, 3-2) に加え、新たに PheTri4, 5, 6 のアミノ酸配列を決定した。ホモロジーサーベイの結果、これらの配列もまた、*Caedobacter taeniospiralis* の R-body 構成タンパク質 RebB と相同性を示した。バクテリアゲノム、バクテリオファージおよびプラスミドゲノムのデータベースを利用し、広範囲なホモロジーサーベイおよびHMMサーチを行った結果、クリプト藻におけるリボン構造は、*C. taeniospiralis* のプラスミドゲノムに起源することが明らかになった。

クリプト藻とは系統を大きく異にする、*Pyramimonas parkeae* (Prasinophyceae) はまた、ロール状のリボン構造を含むオルガネラを有する。クリプト藻のリボン構造との類縁関係を検証する目的で、*P. parkeae* のリボン構造の単離精製系を確立した。精製分画の Tricine-SDS-PAGE 解析は、*P. parkeae* のリボン構造が分子量 2,000~5,000 の低分子ペプチドから成ることが示唆され、クリプト藻のリボン構造とは、分子構造を大きく異にすることが示唆された。また、*P. parkeae* のリボン構造は、DAPI やトルイジンブルーにより強く染色されることから、*P. parkeae* のリボン構造は、強く負に帯電することが予測され、アルギニン酸やグルタミン酸を多く含むことが示唆された。

クリプト藻におけるトリコシストの膜構造を解析する目的で、トリコシストの無傷単離系を確立した。

海産クリプト藻 *Pyrenomonas helgolandii* において、これまで同定されている4つのトリコシスト関連タンパク質 (PheTri1, 2, 3-1, 3-2) のうち、PheTri3-1 についてポリクローナル抗体を作製した。間接蛍光抗体法により、本抗体が、クリプト藻のトリコシストを高い特異性でディテクトできることを明らかにした。

本抗体を用い、トリコシストの細胞分裂周期における挙動および輸送経路を解析する目的で、*P. helgolandii* における細胞分裂同調系を確立した。

プラシノ藻の一部では、クリプト藻が有するトリコシストに類似したロール状のリボン様構造が観察される。リボン様構造精製分画の Tricine-SDS-PAGE 解析から、リボン様構

造は分子量 13 kDa~17.5 kDa の複数のタンパク質とトルイジンブルーによって染色される分子量約 1.7 kDa~4.6 kDa の複数の低分子酸性多糖物質から成ることが予測された。検出されたタンパク質の N 末端解析およびウェスタン解析は、これらがコアヒストン (histone H3, H2A, H2B, H4) であることを明らかにした。免疫染色による局在解析は、明らかに、コアヒストンがリボン様構造に局在することを明らかにした。また、リボン様構造の単糖組成分析および lysozyme による分解特性から、リボン様構造が (1-4) 結合の N-acetyl-glucosamine を含む多糖から成ることを明らかにした。さらに、この多糖とリコンビナント 8 量体コアヒストンを用いた *in vitro* での再構築実験から、コアヒストンがリボン様構造の重要な構成タンパク質であることを明らかにした。

#### 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6件)

Yamagishi, T. and Kawai H. (2015) A ribbon-like structure in the ejective organelle of green microalga *Pyramimonas parkeae* (Prasinophyceae) consists of core histones and polymers containing N-acetyl-glucosamine. *Protist* 166: 522-533. (査読有り)

Fu G., Nagasato C., Yamagishi, T., Kawai, H., Okuda, K., Yoshitake, Y., Horiguchi, T., Motomura, T. (2015) Ubiquitous distribution of helminchrome in phototactic swimmers of the stramenopiles. *Protoplasma* DOI 10.1007/s00709-015-0857-7. (査読有り)

Kawai, H., Hanyuda, T., Yamagishi, T., Kai, A., Lanej, C. (2015) Reproductive morphology and DNA sequences of the brown alga *Plathysiphon verticillatus* support the new combination *P. gracilis*. *J. Phycol.* 51: 910-917. (査読有り)

Yamagishi, T., Dieter G. M., Kawai, H. (2014) Comparative transcriptome analysis of *Discosporangium mesarthrocarpum* (Phaeophyceae), *Schizocladia ischiansis* (Schizocladiphyceae), and *Phaeothamnion conferricola* (Phaeothamniophyceae), with special reference to cell wall-related genes. *J. Phycol.* 50: 543-551. (査読有り)

Toyoshima, M., Yamagishi, T., Aikawa, S.,

Kondo, A., Kawai H. (2014) A pilot floating closed culture system for the multicellular cyanobacterium *Arthrospira platensis* NIES-39. *J. Appl. Phycol.* DOI 10.1007/s1081-014-0484-2. ( 査読有り )

Aikawa, S., Joseph, A., Yamada, R., Izumi, Y., Yamagishi, T., Matsuda, F., Kawai, H., Chan, J.S., Hasunuma, T. and Kondo, A. (2013) Direct conversion of *Spirulina* to ethanol without pretreatment or enzymatic hydrolysis process. *Environ. Sci.* 33: 327-336. ( 査読有り )

[ 学会発表 ] ( 計 3 件 )

山岸隆博、川井浩史 *Pyrenomonas helgolandii* およびブラシノ藻綱 *Pyramimonas parkeae* でみられるエジェクトソーム関連タンパク質の同定 2014 年 3 月、船橋、日本藻類学会第 38 回大会

Yamagishi, T., Müller, D. G., Kawai, H. Comparative transcriptome analysis of *Discosporangium mesarthrocarpum* (Phaeophyceae), *Shizocladia ischiensis* (Schizocladiphyceae), and *Phaeothamnion confervicola* (Phaeothamniophyceae), with special reference to cell wall-related genes. Mar. 2014, Kobe University, *Ectocarpus* 2014

山岸隆博、川井浩史 ブラシノ藻 *Pyramimonas parkeae* におけるエジェクトソーム様構造の分子同定：ヒストンと酸性多糖の重合体から成る新奇ポリマー 福岡 2015 年 日本藻類学会第 39 回大会

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

山岸 隆博 (Yamagishi Takahiro)

( 国立環境開発法人国立環境研究所・環境リスク研究センター・特別研究員 )

研究者番号 : 30379333