

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850068

研究課題名(和文) 遺伝子タギング変異株の解析による微細藻類の脂質蓄積制御因子の探索と利用

研究課題名(英文) Characterization of a Chlamydomonas low-TAG accumulation mutant tar1-1 in nitrogen-deficient conditions

研究代表者

梶川 昌孝 (Kajikawa, Masataka)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：40594437

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)：微細藻の窒素欠乏下の中性脂質(TAG)蓄積制御機構解明を目指してTAG低蓄積変異体tar1-1を単離し、タンパク質リン酸化酵素をコードするTAG accumulation regulator1(TAR1)遺伝子を見出した。tar1-1は窒素欠乏2日目でTAG蓄積量が野生型の10%に低下し、光合成活性、クロロフィル量、クロロフィル生合成関連遺伝子の発現が野生型より高く維持された。TAR1は酵母の糖飢餓応答に関わるYak1キナーゼと相同性を示し、ミエリン塩基性タンパク質や自己タンパク質へのリン酸化活性を示した。TAR1は窒素欠乏時にTAG蓄積・光合成の制御を行っているかと推定される。

研究成果の概要(英文)：Although microalgae accumulate triacylglycerol (TAG) in response to N-deficient (-N) conditions, the regulatory mechanisms are poorly understood. I identified a kinase, TAG accumulation regulator 1 (TAR1), which is a member of dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase family in a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. Kinase domain of TAR1 demonstrated auto- and trans-phosphorylation activities. A tar1-1 mutant accumulated TAG to levels 0.1-fold of those of a wild-type strain in -N conditions. In -N conditions, tar1-1 maintained chlorophyll and photosynthetic activity. In -N conditions, global changes in expression levels of -N responsive genes in N assimilation and tetrapyrrole metabolism were noted between tar1-1 and wild-type cells. These results indicated that TAR1 is a regulator of TAG accumulation in -N conditions, and it functions in cell growth and repression of photosynthesis in -N conditions.

研究分野：植物生理学

 キーワード：環境応答 栄養欠乏応答 植物生理学 光合成 脂質代謝 トリアシルグリセロール 代謝工学 藻類
 バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

近年、化石燃料資源の有限性や低炭素社会への転換といった社会要請に対して、植物性バイオ燃料の実用的生産が提起されている。中でも藻類による脂質生産は他の植物性燃料生産戦略と比べ、大規模化が可能で作物耕作地との競合がないといった様々な利点を有していることから産業的な実用化が最も期待される。しかしボトリオコッカスなど脂質高蓄積能をもった藻類の多くは生育速度が非常に遅く、藻類によるバイオ燃料生産が実用化されるためには、藻類の脂質代謝経路に関する知見を蓄積して、脂質生産性と良好な生育を両立した種や、脂質生産能を人為的に制御可能な種といった産業利用に適した栽培品種を作出する必要がある。

2. 研究の目的

常時脂質を高蓄積する藻類は生育速度が遅く実用的な燃料生産には適さない。一方、通常は脂質生産能の低いクラミドモナスのような藻類にも、特定の栄養欠乏下で細胞内に脂質を新たに蓄積することがわかってきた。この脂質生成と蓄積の制御機構を利用することで藻類の良好な生育と高い脂質生産性を両立できる可能性がある。そこで、藻類を用いたバイオ燃料生産のための基礎的知見を得るために、モデル藻類クラミドモナスの脂質蓄積異常変異株をセルソーターを用いて選抜し、その原因遺伝子の解析から栄養欠乏による藻類の脂質蓄積の分子機構を明らかにする。制御因子が明らかになれば、その発現を制御することで任意に脂質蓄積誘導出来る藻類株の作出につながると期待される。

3. 研究の方法

クラミドモナスの脂質蓄積制御機構を明らかにするために、本研究計画では以下の研究項目を行った。

(1) 単離した脂質蓄積異常変異株の原因遺伝子を同定し、その機能解析を行う。

(2) タグ遺伝子断片挿入変異体のプールから FACS により新奇脂質蓄積変異体を探索する。

4. 研究成果

(1) クラミドモナスのランダム挿入変異株プールから、栄養欠乏下で低ナイルレッド蛍光強度を示す変異株を FACS を用いて選抜した。その中から TAG 低蓄積変異体 *tar1-1* を単離し、TAG 蓄積制御因子として Dual-specificity 型タンパク質リン酸化酵素 (DYRK) をコードする TAG accumulation regulator1 (*TAR1*) 遺伝子を見出した。*TAR1tar1-1* は窒素欠乏 2 日目で TAG 蓄積量が乾燥重量あたり野生型の 10% まで低下した。また硫黄欠乏 2 日目でも TAG 蓄積量が乾燥重量あたり野生型の 50% まで低下した。野生型では窒素欠乏時に光合成活性、クロロフィル量、葉緑体膜脂質量が低下するが、*tar1-1* ではこれらが野生型より高く維持され、

細胞分裂が完全に停止し、細胞肥大が認められた。RNAseq 解析により、窒素欠乏時に野生型と異なる発現変動パターンを示す遺伝子を網羅的に解析した結果、*tar1-1* ではクロロフィル生合成に関わる 11 個の酵素遺伝子やチラコイド膜維持に関わる *VIPP* 遺伝子が野生型よりも発現レベルが高いことがわかった。また変異原因遺伝子がコードするタンパク質 *TAR1* は、酵母のグルコース欠乏応答に必要なタンパク質リン酸化酵素 *Yak1* と相同性を示し、*in vitro* でカゼインおよびミエリン塩基性タンパク質に対してリン酸化活性を示した。さらに自己リン酸化活性も認められた。一方、*TAR1* 遺伝子自身の発現は窒素・硫黄欠乏の前後で変化しなかった。以上の結果から、*TAR1* は窒素欠乏時に基質タンパク質のリン酸化状態を変化させ、遺伝子発現を介して TAG 蓄積・光合成・細胞分裂・細胞サイズの制御を行っていると考えられる。また硫黄欠乏時にも TAG 蓄積の制御を行っていると考えられる。DYRK ファミリーに属するリン酸化酵素遺伝子は他の藻類や陸上植物のゲノム情報から複数見出されているが、これまでに機能が明らかになったものはない。本研究の *TAR1* は、真核光合成生物の DYRK ファミリーの中で栄養欠乏応答の制御因子として初めて変異体解析を元に機能を明らかにした事例である。本研究項目の成果について *Plant Physiology* 誌に掲載された (*Plant Physiol.* 168:752-764, 2015)。

(2) さらに FACS によるスクリーニングを進め、約 8 万個の変異体プールの中から *tar1-1* と同様の栄養欠乏下で低ナイルレッド蛍光強度を示す変異株を複数株単離した。これらについて今後原因遺伝子の解析を進め、*TAR1* との関連を調べることで脂質蓄積制御の分子機構について複合的に理解することが可能になると期待される。

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 3 件)

1. Kajikawa M, Sawaragi Y, Shinkawa H, Yamano T, Ando A, Kato M, Hirono M, Sato N, Fukuzawa H “Algal dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase *TAR1* regulates accumulation of triacylglycerol in nitrogen- or sulfur-deficiency.” *Plant Physiology* 168:752-764 (2015) 査読有 DOI: 10.1104/pp.15.00319.
2. Kajikawa M, Kinohira S, Ando A, Shimoyama M, Kato M, Fukuzawa H “Accumulation of squalene in a microalga *Chlamydomonas reinhardtii* by genetic modification of squalene synthase and squalene epoxidase genes.” *PLoS ONE*

- 10(3): e0120446 (2015) 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0120446.
3. Wang L, Yamano T, Kajikawa M, Hirono M, Fukuzawa H “Isolation and characterization of novel high-CO₂ requiring mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*.” *Photosynthesis Res.* 121(2-3):175-184 (2014) 査読有 DOI: 10.1007/s11120-014-9983-x
〔学会発表〕(計 13 件)
(国際・ポスター発表)
 1. Masataka Kajikawa, Yuri Sawaragi, Haruka Shinkawa, Takashi Yamano, Masafumi Hirono, Naoki Sato, Hideya Fukuzawa, “Characterization of low-TAG accumulating mutant in *Chlamydomonas reinhardtii*.” 16th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*, Pacific Grove, CA, USA, 2014.6.8-13
 2. Haruka Shinkawa, Masataka Kajikawa, Hideya Fukuzawa, “Isolation and characterization of lipid-accumulating mutants under photoautotrophic conditions using flow cytometer.” 16th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*, Pacific Grove, CA, USA, 2014.6.8-13
(国内・口頭発表)
 3. 梶川 昌孝, 榎木 裕里, 新川 はるか, 山野 隆志, 安藤 晶, 加藤 美砂子, 廣野 雅文, 佐藤 直樹, 福澤 秀哉「窒素栄養欠乏下における緑藻クラミドモナスの脂質蓄積異常変異体 *tar1-1* の解析」第 56 回日本植物生理学会年会、東京農業大学世田谷キャンパス、2015 年 3 月 15-18 日
 4. 梶川 昌孝, 榎木 裕里, 新川 はるか, 山野 隆志, 安藤 晶, 加藤 美砂子, 廣野 雅文, 佐藤 直樹, 福澤 秀哉「トリアシルグリセロールおよびデンプン蓄積の新奇制御因子 TAR1 の単離と機能解析」第 11 回クラミドモナス研究会「Go! Microalgae」、高知市文化プラザかるぽーと、2014 年 10 月 3-4 日
 5. 古谷 憲一, 久保 雄昭, 梶川 昌孝, 福澤 秀哉「Cah4-Luc 株を用いたランダム遺伝子挿入による CCM 新規調節因子の探索」日本植物学会第 77 大会、北海道大学高等教育推進機構、2013 年 9 月 13-15 日
 6. 木平 成子, 梶川 昌孝, 福澤 秀哉「遺伝子改変によるスクアレン蓄積緑藻の作出」第 31 回日本植物細胞分子生物学会・シンポジウム、北海道大学、2013 年 9 月 10-12 日
(国内・ポスター発表)
 7. 梶川 昌孝, 榎木 裕里, 新川 はるか, 山野 隆志, 安藤 晶, 加藤 美砂子, 廣野 雅文, 佐藤 直樹, 福澤 秀哉「トリ

- アシルグリセロールおよびデンプン蓄積の新奇制御因子 TAR1 の単離と機能解析」第 27 回植物脂質シンポジウム、静岡市産学交流センター、2014 年 11 月 28-29 日
8. 新川 はるか, 梶川 昌孝, 福澤 秀哉「セルソーターを用いた光独立栄養条件下における脂質蓄積異常変異株の単離」第 11 回クラミドモナス研究会「Go! Microalgae」、高知市文化プラザかるぽーと、2014 年 10 月 3-4 日
 9. 梶川 昌孝, 榎木 裕里, 新川 はるか, 古谷 憲一, 山野 隆志, 廣野 雅文, 福澤 秀哉「セルソーターを用いたクラミドモナス脂質低蓄積変異株の単離と解析」第 55 回日本植物生理学会年会、富山大学五福キャンパス、2014 年 3 月 18-20 日
 10. 王 連勇, 山野 隆志, 高根 俊輔, 舟津 尚子, 梶川 昌孝, 廣野 雅文, 福澤 秀哉「Isolation and Characterization of Novel High-CO₂ Requiring Mutants of *Chlamydomonas Reinhardtii*」第 55 回日本植物生理学会年会、富山大学五福キャンパス、2014 年 3 月 18-20 日
 11. 榎木 裕里, 新川 はるか, 山野 隆志, 梶川 昌孝, 福澤 秀哉「セルソーターを用いた脂質蓄積異常変異株の単離」第 10 回クラミドモナス研究会 -微細藻類研究のブレイクスルー-, 基礎生物学研究所、2013 年 11 月 29-30 日
 12. 安藤 晶, 下山 未希, 梶川 昌孝, 福澤 秀哉, 加藤 美砂子「スクアレンシンターゼを過剰発現させたクラミドモナスにおける代謝系の解析」第 10 回クラミドモナス研究会 -微細藻類研究のブレイクスルー-, 基礎生物学研究所、2013 年 11 月 29-30 日
 13. 王 連勇, 山野 隆志, 舟津 尚子, 高根 俊輔, 福田 有里, 梶川 昌孝, 廣野 雅文, 福澤 秀哉「緑藻クラミドモナスにおける新規高 CO₂ 要求性変異株の単離と解析」第 10 回クラミドモナス研究会 -微細藻類研究のブレイクスルー-, 基礎生物学研究所、2013 年 11 月 29-30 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.molecule.lif.kyoto-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶川 昌孝 (KAJIKAWA, Masataka)
京都大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号：40594437

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：