

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650142

研究課題名(和文) ポーリネラの珪酸被殻構築機構と生物による珪酸外被形成の進化の解明に向けた初期研究

研究課題名(英文) Mechanism of siliceous shell construction in *Paulinella chromatophora* and the evolution of siliceous cell covering production

研究代表者

石田 健一郎 (ISHIDA, Ken-ichiro)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：30282198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：有殻アメーバ *Paulinella chromatophora* (ポーリネラ) の珪酸質鱗片の形成と被殻構築に関係すると思われるタンパク質を推定するため、トランスクリプトーム解析による関連遺伝子探索と、単離鱗片のプロテオーム解析を行った。その結果、シリカトランスポーター (sit) 様の遺伝子をリザリア生物群で初めて確認したほか、数個の鱗片形成関連候補タンパク質を検出した。sit 遺伝子の分子系統解析の結果、地球上で初めてシリカバイオミネラルゼーションを行い始めた生物は、ポーリネラのような有殻アメーバであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：A transcriptome analysis and a proteome analysis on isolated siliceous scales were conducted in a siliceous testate amoeba *Paulinella chromatophora* (Rhizaria), in order to detect genes for siliceous shell construction and proteins associated with the siliceous scales. As a result, a silica transporter-like (sit-like) gene and several scale-associated proteins were detected. A phylogenetic analysis on the sit genes suggested that the first organism that performed the silica-biomineralization was a testate amoeba like *P. chromatophora*.

研究分野：原生生物の系統分類・進化学

キーワード：進化 *Paulinella* シリカバイオミネラルゼーション 殻構築

1. 研究開始当初の背景

リザリア系統群に属する有殻アメーバの一群であるユーグリファ類は、珪酸質の鱗片が規則正しく配置した壺形の殻を持ち、細胞分裂に先立って細胞外に新規殻を構築し、そこへ娘細胞の一つが移る。我々はこれまでにユーグリファ類の一種ポーリネラ・クロマトフォラ（以下ポーリネラ）において、形態学的な殻形成過程を観察し、鱗片は細胞内で1枚ずつ形成され殻の開口部から全て細胞外へ分泌されること、その後太い仮足が開口部側から鱗片を1枚ずつ積み上げながら壺型の殻を形成すること、などを明らかにした。このような方法で完全な殻を細胞外に組立てる生物は他に知られておらず非常に興味深い。この鱗片形成から殻構築までの複雑なプロセスがどう制御されているのかは誰もが抱く疑問であり、それを明らかにする学術的意義は大きい。

また、珪素は地球上に豊富に存在する元素の一つであり、珪酸質の外被や骨格を作る生物は多岐にわたる（イネ科植物のプラントオパール、海綿動物の骨片、珪藻の細胞外被など）。これらは真核生物の異なる系統に属しており、シリカバイオミネラル化の能力は真核生物の複数の系統に散在している。珪藻ではシリカバイオミネラル化に関する知見が比較的蓄積されているが、その起源や進化に関する解析は比較対象がなく困難であった。珪酸質被殻をもつことで有名な珪藻が属するストラメノパイル系統群とポーリネラが属するリザリア系統群は、姉妹群であることが示唆されている。ポーリネラにおける鱗片形成機構の解明はシリカバイオミネラル化の進化を理解する上でも重要である。

2. 研究の目的

本研究は、ポーリネラの細胞内での珪酸質鱗片の形成、細胞外での殻の組み立てをどのように制御しているのかを解明し、珪藻など様々な生物でみられる微細な珪酸質細胞外被形成の起源と進化を探るための基礎段階として、独自に確立したポーリネラ培養株を用い、(1)トランスクリプトーム解析により殻構築特異的に発現するタンパク質を特定すること、(2)単離鱗片のプロテオーム解析により珪酸質鱗片の形成と構築に関与するタンパク質を特定・機能推定すること、(3)分子系統解析により構成タンパク質の起源・進化を推定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)トランスクリプトーム解析による被殻形成関連遺伝子の推定

鱗片形成中の細胞を含むポーリネラ MYN1株の培養30Lより、トランスクリプトームデータを取得した。Blast 検索により、既知珪酸質被殻形成関連タンパク質遺伝子と相同性の高い配列を抽出した。それらの mRNA に

ついてアノテーションを行い、mRNA の全長を5' および3' Race により確認した。

同調培養系の確立については、ポーリネラ MYN1 株についてまず明暗周期を利用した同調を試みた。しかし、本来増殖の遅い生物であるため、通常の明暗周期による同調では確立に至らなかった。同調培養系の確立は、本研究のみならず、今後の研究に多大な貢献をもたらすと考えられ、非常に重要である。

(2)単離鱗片のプロテオーム解析による鱗片関連タンパク質の推定

鱗片関連タンパク質を推定するため、ポーリネラ MYN1 株の培養3Lから細胞を回収し、フレンチプレスで細胞を破碎したのち、鱗片を単離した。単離鱗片から高濃度 EDTA 処理や SDS 処理により表在性のタンパク質をまず抽出し、その残渣をフッ化アンモニウムで処理し、珪酸質を溶解して、内在性のタンパク質を抽出した。抽出したタンパク質を2次元電気泳動により分離し、得られたスポットについて MALDI-TOF-MS を用いた質量分析により、アミノ酸配列を予測した。得られたアミノ酸配列をもとに、プライマーを作成し、5' および3' Race により mRNA 配列を取得した。

(3)分子系統解析

プロテオーム・トランスクリプトーム解析により候補タンパク質となったタンパク質について、配列データベースより相同タンパク質の遺伝子配列を収集した。収集した遺伝子配列をもとに最尤法により分子系統解析を行った。

(4)得られた候補タンパク質の局在解析

被殻関連候補タンパク質遺伝子配列から、まず合成ペプチドを用いて外部委託により抗体を作成した。また、被殻関連候補タンパク質遺伝子配列を大腸菌を用いたタンパク質の大量発現系に組み込み、発現させ、それをもとに外部委託により抗体を作成した。作成した抗体を用いて、ウェスタンブロット及び間接蛍光抗体法により抗体の特異性を調べた。その後各タンパク質の細胞内局在を調べる予定であったが、特異性の高い抗体を得られなかった。

4. 研究成果

(1)トランスクリプトーム解析による被殻形成関連遺伝子の推定

ポーリネラ MYN1 株を約 30L 培養し、明らかに被殻形成中の細胞を含む状態で RNA 抽出、トランスクリプトーム解析を行い、珪藻において珪酸被殻形成に関与しているタンパク質の相同性検索を行った。その結果、既知のシリカトランスポーター遺伝子 (*sit*) に相同性のある配列を発見した。予測ソフトを用いた解析により、ポーリネラの *sit* は珪藻の半分の5回膜貫通領域を持つことが明らかとなった。化石記録から最古のシリカバイオミネラル化を行っていた生物はポーリネラを含むユーグリファ類であることが示唆されてい

ることから、もともと5回膜貫通型だった *sit* が珪藻でタンデムに重複し、10回膜貫通型となった可能性が示唆された。

さらに別の被殻形成関連遺伝子を特定するため、同調培養系の確立を目指し、試行錯誤したが、本来増殖の遅い生物であるため、通常の明暗周期による同調の試みでは未だ確立には至っていない。ポーリネラの場合、細胞周期と殻構築が密接に関係している可能性があるため、同調培養を確実に確立するためには、細胞周期の更なる理解が必須であると考えられる。

(2) 単離鱗片のプロテオーム解析による鱗片関連タンパク質の推定

鱗片関連タンパク質(表在性タンパク質および内在性タンパク質)を網羅的に同定するため、大量(300)のポーリネラ細胞を培養し、タンパク質抽出に十分量の細胞を得た。その後、フレンチプレスにより細胞を破壊し、その中から珪酸質鱗片のみを単離した。EDTA、NaCl、尿素、SDS、フッ化水素酸により、表在性~内在性までのタンパク質を段階的に抽出し、SDS-PAGEにより分離・精製した。複数の主要なバンドを切り出して質量分析を行い、各タンパク質の同定を行ったところ、複数のタンパク質の推定アミノ酸配列を得ることに成功した。このうちの一つは、既知のタンパク質には相同性をもたない、ポーリネラに特有の珪酸質被殻関連タンパク質であることが分かった。

(3) 分子系統解析による *sit* 遺伝子の起源と進化の推定

トランスクリプトーム解析から同定したSITの起源・進化を推定するために、分子系統解析を行った。まず、GenBankおよび Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project (MMETSP)より、SITと相同性の高い配列を収集した。珪藻や襟鞭毛虫以外に、近年 Durak et al. 2016 において報告されたようにハプト藻や有孔虫もSITと相同性の高い配列を持つことが分かった。収集した配列をもとに分子系統解析に用いるデータセットを作成し、183アミノ酸を用いた分子系統解析を行った結果、ポーリネラのSITはSITLcladeの基部から分岐した。これは、これまでに報告されている、化石記録のデータと合致する結果であり、地球上で初めてシリカバイオミネラリゼーションを行い始めた生物は、ポーリネラのような有殻アメーバであり、*sit* 遺伝子の水平伝播が真核生物の複数の系統でシリカバイオミネラリゼーションを行う生物が現れた一因であると考えられた。

(4) 推定されたSITタンパク質および鱗片関連タンパク質の局在解析

単離鱗片のプロテオーム解析から同定した鱗片関連タンパク質およびトランスクリプトーム解析から同定したシリカト

ランスポーター(SIT)の局在解析を行うため、抗体作成を行った。まず、合成ペプチドを用いた抗体作成をそれぞれのタンパク質において試み、ウエスタン解析および間接蛍光抗体法により抗体の特異性を検証したが、残念ながら特異性の高い抗体を得ることはできなかった。次に、単離被殻鱗片タンパク質遺伝子および *sit* 遺伝子を、大腸菌を用いたタンパク質の大量発現系に組み込み、発現させ、それを抗原として用いて抗体作成を行った。特に、*sit* 遺伝子の方は、大腸菌へ組込む遺伝子領域を変えた、C末端側を含む短領域と短領域を含む長領域の2パターンのタンパク質を精製し、これらを抗原として抗体作成を行った。こちらも抗体の特異性を検証したが、残念ながら特異性の高い抗体を得ることができなかった。抗体の特異性は局在解析において重要な要素であるので、今後モノクローナル抗体等の作成を検討して各タンパク質の局在と機能を解析する必要がある。また、ポーリネラのSITが珪酸を輸送する機能があるかどうかの検証も行う必要があると考えている。

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 2件)

Nomura M., Ishida K. Fine-structure observation of the siliceous shell formation process in the testate amoeba *Paulinella chromatophora*. Protist, (査読有)、2016 in press.

Nomura M., Nakayama T., Ishida K. Detailed Process of Shell Construction in the Photosynthetic Testate Amoeba *Paulinella chromatophora* (Euglyphid, Rhizaria). Journal of Eukaryotic Microbiology (査読有)、2014、61:317-321.

[学会発表](計 4件)

野村 真未、石田 健一郎、有殻アメーバ *Paulinella chromatophora* における核分裂様式の解明、日本藻類学会第40回大会、日本歯科大学生命歯学部(東京都千代田区・2016年3月)

野村 真未、石田 健一郎、*Paulinella chromatophora* の珪酸被殻構築過程における微小管・アクチン繊維の観察、日本植物学会第78回大会、明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市・2014年9月)

Nomura M., Ishida K. Fine-structure observation during siliceous shell formation of a testate amoeba *Paulinella*

chromatophora(Euglyphid).ESF-EMBO 共催
Biology of plastids; towards a blueprint
for synthetic organelles. (プルトウスク・
ポーランド 2014年6月)

野村 真未、石田 健一郎、有殻アメーバ
における *Paulinella chromatophora* の珪酸
質被殻構築過程の微細構造および微小管・ア
クチン繊維の観察、日本細胞生物学会、奈良
県新公会堂、東大寺総合文化センター(奈良
県奈良市・2014年6月)

〔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：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 健一郎 (ISHIDA, Ken-ichiro)
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号：30282198

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

吉田 昌樹 (YOSHIDA, Masaki)
筑波大学・生命環境系・助教
研究者番号：10449308