

## 研究報告書

### 「クロロフィルの光毒性を利用した植食性原生動物の繁殖抑制農薬の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 柏山 祐一郎

#### 1. 研究のねらい

藻類培養の現場では、培養地に侵入する原生動物による食害が大きな問題である。この現象は「自然の摂理だ、しょうがない」と言えばそれまでだが、実はここに、「原生生物が藻類の持つクロロフィルを無毒化する代謝を行なっている」という重要な秘密が隠れている。

光合成に不可欠な分子であるクロロフィルは、一方でその光増感作用によって強力な細胞毒性を示す一重項酸素の発生源となり(強い光毒性)、生命にとって危険な分子でもある。そこで私のさきがけ研究では、原生動物によるクロロフィルの無毒化代謝産物であると考えられた光毒性を示さない色素「シクロエノール」産生に着目した。すなわち、餌の藻類に含まれるクロロフィルの光毒性を回避する「シクロエノール代謝」の機構を解明し、さらにはその機能の阻害を目指した。これにより、屋外開放系などの藻類培地における原生動物の繁殖・食害を抑制する方法論が確立できる。また、将来的には、高効率・低コストな有用藻類生産を実現するための基盤技術の発明に繋げることが目標である。

#### 2. 研究成果

##### (1) 概要

様々な微細藻類食原生生物について捕食に伴う色素代謝産物を分析した結果、シクロエノール代謝が真核生物のほぼ全ての系統で確認される、普遍性の高いプロセスであることが示された。さらに、光栄養性ユーグレノイドによるシクロエノール代謝を発見し、この単藻培養条件でも進行するシクロエノール代謝のプロセスを、*Euglena gracilis* Z 株の蛍光顕微鏡観察、透過型電子顕微鏡観察、細胞分画実験、および極微量の試料に対する色素分析を組み合わせることで研究した。その結果、*E. gracilis* による自己の葉緑体分解現象に伴い、その最初期の段階でシクロエノール代謝が進行すること、シクロエノールとその誘導体が葉緑体分解後に形成される褐色の顆粒構造の中に局在して蓄積されることを突き止めた。この葉緑体分解現象を人為的に誘導する方法を確立したことで、*E. gracilis* の単藻培養系を用いた生化学的ないし分子生物学的な研究が可能になった。また、*E. gracilis* を包含する光栄養性ないし微細藻類捕食性のユーグレノゾア生物における、シクロエノール代謝の普遍性と進化的な連続性を示した。これによって、*E. gracilis* のシクロエノール代謝メカニズムの解明から、捕食生物のシクロエノール代謝メカニズムを研究する道を開いた。そこで、*E. gracilis* の分解途上の様々な段階にある(すなわちシクロエノール代謝がこの特定の段階で進行していると考えられる)葉緑体を単離し、現在、プロテオーム解析に取り組み、シクロエノール代謝関連酵素の特定を目指している。この目的のため、RNAi ノックダウン実験によって目的酵素を特定する実験系を確立することができた。今後、プロテオーム解析の結果を待ってシクロエノール代謝メカニズムの解明に繋がるタンパクの同定をおこなう。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A: 植食性プロティストによるクロロフィル代謝の多様性解明

クロロフィルの光毒性を利用した繁殖抑制の実現には、培地に侵入する多様な原生生物に広く共通する代謝を阻害する必要がある。そこで、様々な捕食性原生生物を微細藻類との二員系で培養し、クロロフィルの代謝産物に関して、超高速液体クロマトグラフィーによりスクリーニング解析をおこなった。その結果、シクロエノールを産生する生物は、真核生物のほとんどの系統に広範に遍在することが確かめられた。このことは、シクロエノール代謝が真核生物の祖先的な形質であることを示唆するとともに、関連する代謝酵素が多くの原生生物の間で普遍的である可能性を示唆する。また、シクロエノール代謝の重要性は、環境試料中からこの化合物が多量に見いだされる事実とも符合する。

### 研究テーマ B: 光栄養性ユーグレノイドによるシクロエノール代謝の研究

上述のスクリーニング解析を通して、微細藻類である光栄養性ユーグレノイドでは、単藻培養条件でもシクロエノールの蓄積が認められた。この発見は、二員培養系では困難が予想される生化学的ないし分子生物学的研究手法を、単藻培養系、特に研究の蓄積のある *Euglena gracilis* を対象に取り組む道を開くものであった。

そこで、まず、*E. gracilis* がシクロエノールを産生するメカニズムの理解を試みた。すなわち、蛍光顕微鏡、電子顕微鏡、さらには超遠心分離機を用いた細胞分画実験の結果を総合し、(1) *E. gracilis* は環境の変化に応じて葉緑体を分解し、(2) その際にクロロフィルをシクロエノールに変換して細胞内に蓄積させること、さらに(3) その詳細なプロセスを明らかにすることができた。すなわち、この葉緑体分解の過程ではオートファジーを示唆する構造は観察されず、代わりにシクロエノール代謝は葉緑体包膜内部で進行することが示された。クロロフィル蛍光の減衰が示唆するシクロエノール代謝のタイミングは、チラコイド膜の構造的な秩序崩壊とほぼ同時に起こっており、光合成関連タンパク質の分解との時間的な関連が強く示唆された。

ところで、この代謝はより祖先的な捕食性ユーグレノイドも含めたクレード全体の共有形質だと考えられる。よって、ユーグレノイドが葉緑体を獲得した進化の過程で、餌のクロロフィルを分解するためのシクロエノール代謝が自家のクロロフィルの分解に転用されたこと、さらには代謝の場所が食胞内から葉緑体内部に変化したことが示唆された。

### 研究テーマ C: *E. gracilis* を用いたプロテオームないしトランスクリプトーム解析と RNAi 実験

上述の考察を受けて、*E. gracilis* の葉緑体分解が一斉に誘導される条件を見つけ、シクロエノール代謝が進行中の「分解途上の葉緑体」を分画してプロテオーム解析を試み、この代謝に関連するタンパク質の候補を探索した。また、トランスクリプトームデータから、誘導により変化がみられる遺伝子を抽出し、その中から予想されるモチーフ ( $\alpha/\beta$ -hydrolase など) の有無、葉緑体にターゲットされる可能性を示す配列情報の有無、さらに捕食性原生生物の RNA-seq データとの相同性を考慮して、いくつかのシクロエノール代謝関連遺伝子の候補を絞り込みを試みた。現在、これら遺伝子に対して RNAi によるサイレンシング実験を行ない、シ

クロエノール代謝関連遺伝子の特定に関する実験を継続している。

### 3. 今後の展開

このように本研究プロジェクトでは、原生生物が光存在下で微細藻類を捕食することを可能にしている、クロロフィルの無毒化を行なうシクロエノール代謝の重要性の理解を進展させ、この代謝を制御することでクロロフィルの光毒性を原生生物の繁殖抑制に利用できる可能性を示した。今後は、現在複数のアプローチから進めている、鍵となる酵素を特定する研究を急ぎ、代謝メカニズムの全容を解明する。一方で、重要な酵素の機能を阻害する方法、例えばアプタマーや拮抗阻害を示すことが予測される酵素の遺伝子を藻類に組み込むなどの研究を進めていく。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

#### 研究目的の達成状況

本プロジェクトは、計画当初より3つの研究の柱から構成されていた。そのうち、最も早い段階から取り組むことのできた「クロロフィル無毒化代謝のプロセスと機能の解明」に関しては、もっとも研究が進展し、既に国際誌などへ公表できた研究成果も数多く得られた。すなわち、シクロエノール代謝が真核生物の様々な系統において見受けられる普遍性の高いものであることを示し、微細藻類の中にもこの代謝をおこなう系統を発見できた。また、いくつかの原生生物や微細藻類を材料として、シクロエノール代謝に関わる細胞のダイナミックな変化を理解することができた。ただし、シクロエノール代謝の機能的な側面の理解には不十分な点が残し、この項目全体としての目標達成度は80%程度であると考えられる。

次に、2つめの研究の柱である「クロロフィル無毒化代謝に関わる酵素の特定」に関しては、まず、酵素の特定という最終目標まで到達することはできなかった。この研究は、未経験の研究手法の習得を必要としており、異動などによる研究体制の構築の遅れの影響を受けて、本格的な取り組みの開始まで2年以上を要してしまった。しかし、当初困難を予想していた原生生物と餌藻類の二員培養系に代わって、光栄養性のユーグレノイドの無菌単藻培養系を用いた実験の方法を見つけることができた。また、*Euglena gracilis* Z株を用いて、葉緑体の分解を人為的に誘導してシクロエノール代謝を進行させる方法を確認し、現在、これに基づいたプロテオーム解析を進めている。また、この代謝に関連する酵素遺伝子を特定するためのRNAiノックダウン実験系も確立させた。研究は途上であるが、この項目の目標達成度は50%程度と考える。

最後に、3つめの研究の柱である「具体的なプロティスト繁殖抑制技術の検討」については、残念ながら研究の着手ならびに進捗が大きく遅れている。これは一つには、この項目は、開始当初において、全2項目から得られた知見に基づいて詳細な研究デザインを立てることをもくろんでいたため、特に2項目目の研究の遅れが響いた。しかし、これらとは独立に、色素増感剤を培地に添加することによる繁殖阻害の実験や、シクロエノール代謝を拮抗的に阻害すると考えられる外来の遺伝子を利用する研究(これは1番目の項目の研究から得ら

れた知見に基づく)などを進めた。進捗の遅れもあり、この項目の目標達成度は20%程度であると考ええる。

#### 研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

本プロジェクト開始当初は専任研究員であり、立命館大学内の貸しラボスペースを利用してとりあえずの研究環境を整備したが、着任半年で福井工業大学へ講師の身分で異動し、独立したラボを構えることになった。前任者からの引き継ぎのラボではなかったにもかかわらず、さががけの研究費を受けて、さががけ研究のための環境整備を行い、研究を効果的に進めることができた。期間を通して断続的に研究補助者を雇用することで、未経験であった学務に時間を割かれる中でも効率的に実験・研究ができた。

#### 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

本研究プロジェクトで取り上げた原生生物における食害の問題は、オープンポンドにおける大量培養の現場に関わっている研究者仲間や企業のアドバイザーなどから、重要な取り組みであることを評価していただいている。微細藻類が量産するクロロフィルの、光毒素としての側面を利用するという発想はユニークであるが故にチャレンジ性が高く、まずは期間内に決定的な成果を得るまでに至らなかったシクロエノール代謝のメカニズム解明が急務であると考えられる。クロロフィルの光毒性の制御は、微細藻類食の原生生物に限らず、クロロフィルを通して光のエネルギーを利用する微細藻類や植物にも共通する問題であるため、その理解を深めることは、光合成生物を利用してクリーンエネルギー社会の実現を目指す人類にとっては重要な基盤知識であると信じている。よって、原生生物の食害問題を越えて、長い目で見て価値のある研究を進めることができ、また、今後これをさらに発展させていく基盤を、さががけという制度を通して確立できると考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った。)

本研究は、微細藻類培養の実際の現場における大きな問題である原生生物の食害について、生化学的な視点から捉えることで問題解決を目指すという非常にユニークなものである。

残念ながら期間内に代謝酵素の特定にまでは至らなかったものの、この研究の進捗状況は期間の終盤に向けて加速しており、比較的近い将来に酵素を特定し、代謝メカニズムを解明することで、将来的には有効な技術の創成に繋がるものと期待している。

また、本さががけ研究での取り組みが評価され、複数回の国際学会の招待講演や招待論文の投稿の機会などもあり、期間内にポスドクから教授(H28年4月予定)へと昇任した。今後も、藻類やプロティスト研究の若手のトップランナーの一人として大いに期待している。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. **Y. Kashiyama**, A. Yokoyama, Y. Kinoshita, S. Shoji, H. Miyashita, T. Shiratori, H. Suga,



S. Shoji, K. Ishikawa, A. Ishikawa, I. Inouye, K. Ishida, D. Fujinuma, K. Aoki, M. Kobayashi, S. Nomoto, T. Mizoguchi and H. Tamiaki: Ubiquity and quantitative significance of detoxification catabolism of chlorophyll associated with protistan herbivory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2012) **109**, 17328–17335, (Feature Article).

2. **Y. Kashiya**, A. Yokoyama, T. Shiratori, I. Inouye, Y. Kinoshita, T. Mizoguchi, H. Tamiaki:  $13^2$ 、 $17^3$ -Cyclopheophorbide *b* enol as a catabolite of chlorophyll *b* in phycophagy by protists. *FRBS Letters* (2013) **587**, 2578–2583.

3. **Y. Kashiya** and H. Tamiaki: Risk management of organisms against the phototoxicity of chlorophylls. *Chemistry Letters* (2014) **43**, 148–156, (Highlight Review).

4. **柏山祐一郎**, 横山亜紀子, 民秋均: クロロフィルを制した者が光環境を征した? 光合成生物を「食べる」生き様の舞台裏. *光合成研究* (2015) **25**, 58–70.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【主要な学会発表(招待講演)】

1. **Y. Kashiya**, A. Yokoyama and H. Tamiaki: Chlorophyll catabolism in aquatic ecosystems: Physiology、ecology、and evolution. *CER International workshop on Biogeochemical cycling and Microbial Ecology for Young Scientists*. Ohtsu, Japan, 2013. (国際招待)

2. **Y. Kashiya**: A chlorophyll catabolism by heterotrophic/mixotrophic protists in aquatic environments. *Ninth International Workshop on Supramolecular Nanoscience of Chemically Programmed Pigments*. Kusatsu, Japan, 2013. (国際招待)

3. **柏山祐一郎**, 民秋均: クロロフィルを制したものが光環境を征した—プロティストと二次植物の進化. 第5回日本光合成学会年会および公開シンポジウム, 奈良市, 2014. (招待)

4. **Y. Kashiya**, A. Yokoyama and H. Tamiaki:  $13^2$ 、 $17^3$ -Cyclopheophorbide enols as detoxified catabolites of chlorophylls – a widely distributed metabolism among phototrophic/heterotrophic protists. *Eighth International Conference on Porphyrins & Phthalocyanines*, Istanbul, Turkey, 2014. (国際招待)

5. **柏山祐一郎**: 水圏プロティスト・微細藻類によるクロロフィルの無毒化代謝の発見. 第18回日本光生物学協会年会・奨励賞候補者招待講演, 大阪市, 2014. (招待)

6. **Y. Kashiya**, J. Kawahara, M. Nakazawa, T. Ishikawa, T. Tanaka, T. Yoshino, H. Tamiaki: Inhibiting growth of contaminated phycophagous protists in algal cultures by controlling the phototoxicity of chlorophylls. *2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies*, Honolulu, USA