

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07753

研究課題名(和文) DYRK型リン酸化酵素TAR1による植物の窒素欠乏応答の制御機構の解明

研究課題名(英文) Protein kinase-mediated regulation in response to N deficiency in Chlamydomonas

研究代表者

梶川 昌孝 (Masataka, Kajikawa)

近畿大学・生物理工学部・講師

研究者番号：40594437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：藻類の脂質・デンプン蓄積を制御するマスター制御因子TAR1のリン酸化標的候補をリン酸化プロテオーム解析により網羅的に同定し論文報告を行った(Shinkawaら、2019)。TAR1の標的タンパク質である新奇リン酸化酵素の変異体が、tar1様の表現型を示すことを見出した。このタンパク質リン酸化酵素はC/Nストレス下での光合成活性の低下と適正なレベルの脂質蓄積に必要なことがわかった。またTAR1によるリン酸化標的アミノ酸を置換した変異型タンパク質を用いた相補実験から、この新奇リン酸化酵素はTAR1によりリン酸化制御されることで機能し、細胞膜に局在することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

栄養素が枯渇すると微細藻類はトリアシルグリセロール(TAG)を蓄積する。藻類の生産する油脂は化石燃料に代わる燃料源として注目されているため、その仕組みを明らかにすることは基礎科学的に興味深いだけでなく、産業応用の上でも重要である。申請者らはDYRK型タンパク質リン酸化酵素が藻類の脂質蓄積の鍵制御因子であることを初めて見出し、TAR1を起点としたタンパク質リン酸化の制御機構の詳細を解明することを本研究の目標とした。TAR1のリン酸化標的タンパク質について論文報告し、さらにTAR1の下流因子として働く新規リン酸化タンパク質を見出した。これらの成果は脂質生産の制御機構の解明に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：When nutrient deprived, microalgae accumulate triacylglycerol (TAG) in lipid droplets. Dual-specificity kinase, TAG-accumulation-regulator-1 (TAR1) has been reported to regulate carbon metabolism in a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. We identified total 426 TAR1-dependent phosphoproteins by phosphoproteomic analysis (Shinkawa et al. 2019). We focused a novel protein kinase from these TAR1's target proteins. It prevents the excess accumulation of triacylglycerol (TAG) in C/N-stress conditions. Phosphorylation of the continuous serine residues is TAR1-dependently induced in the C/N-stress conditions. Expression of mutated protein with Alanine substitution of these Ser residues could not complement the mutant phenotype of the kinase, suggesting the importance of phosphorylation of these serine residues for function of the kinase. We also showed this kinase protein located at plasma membrane.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：植物分子生物学 代謝制御 脂質 タンパク質リン酸化酵素 栄養欠乏応答 藻類

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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

我々は脂質蓄積異常変異体 *tar1* の解析からタンパク質リン酸化酵素 TAR1 が光合成活性を抑制し酢酸吸収を促進することで脂質・デンプン蓄積を制御することを示し、TAR1 のリン酸化標的として新奇なタンパク質リン酸化酵素を見出した。このリン酸化酵素遺伝子の変異体は *tar1* と似た表現型を示すことから TAR1 によるリン酸化制御を受け下流遺伝子の発現を制御していると考えられた。そこで変異体の詳細な表現型解析を元にその分子機構を解明する。

3. 研究の方法

クラミドモナスの脂質蓄積制御因子 TAR1 リン酸化酵素による栄養欠乏時の応答制御の分子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) TAR1 のリン酸化標的タンパク質のリン酸化プロテオーム解析による探索・同定を行う。
- (2) 同定した TAR1 の標的タンパク質の遺伝子についてクラミドモナス変異体ライブラリーから挿入変異株を取得し機能解析することで、TAR1 の制御下にある分子機構を解明する。
- (3) TAR1 によるリン酸化標的部位の役割を標的アミノ酸をアラニン置換した変異型タンパク質を変異体に発現させることで検証する。
- (4) 細胞内での局在場所を明らかにするために、Venus 融合タンパク質を変異体に発現させ、表現型を相補した株における細胞内蛍光を観察する。
- (5) ゼニゴケでの TAR1 相同遺伝子の機能解析

4. 研究成果

(1) *tar1-1* 変異体は光独立栄養かつ N 欠乏条件において野生型 (WT) 細胞と比較して、高いレベルの細胞生存率および過酸化水素の生成を維持した。配偶子形成での交配効率および主要調節因子の mRNA 存在量は *tar1-1* の方が WT よりも低かった。さらに *tar1-1* は WT と比較して高いレベルの TAG およびデンプンを蓄積した。さらにリン酸化プロテオーム解析により光独立栄養かつ N 欠乏条件においてリン酸化状態が有意に変動する 426 個の TAR1 依存性リン酸化タンパク質を同定し、N 同化および炭素代謝に関連するタンパク質を見出した。これらの研究結果は申請者らの研究グループより 2019 年に論文報告された (Shinkawa et al., Plant Cell Physiol., 2019)。

(2) TAR1 依存性リン酸化タンパク質には 10 個のタンパク質リン酸化酵素、1 個の脱リン酸化酵素、3 個の転写因子が含まれており、TAR1 の下流のタンパク質リン酸化カスケードと N 応答性遺伝子発現制御に関与する候補因子である。クラミドモナス変異体ライブラリーからこれら因子の変異体を得て解析したところ、新奇なタンパク質リン酸化酵素の変異体が、光独立栄養かつ N 欠乏条件において高 TAG/高デンプン/高クロロフィル蓄積かつ光合成活性を維持する *tar1-1* 変異体と同様の表現型を示した。この結果から、このタンパク質リン酸化酵素は C/N ストレス下での光合成活性の低下と適正なレベルの脂質蓄積に必要であることがわかった。一方で、変異体のデンプン蓄積量や接合率は野生型と変わらなかったことから、TAR1 とは異なり、デンプン蓄積や接合については関与していないと思われる。また TAR1 による標的アミノ酸の 350 番目と 351 番目のセリン残基をアラニン残基に置換した変異型タンパク質を変異体に発現させてもこれらの表現型が回復しなかったことから、このリン酸化酵素は TAR1 によりリン酸化制御されることで機能することが示唆された。また組換えタンパク質を用いた In Vitro でのリン酸化アッセイを行ったところ、このリン酸化タンパク質は自己リン酸化活性ならびにミエリン塩基性タンパク質に対するリン酸化活性を示した。さらに、748 番目のリジン残基をアルギニンに置換した場合、自己リン酸化活性のみ示し、ミエリン塩基性タンパク質に対するリン酸化活性を消失した。このことからこのリジン残基は非自己タンパク質に対するリン酸化活性に必要であることが示された。さらにこのリジン残基をアルギニン残基に置換した変異型タンパク質を変異体に導入したところ、主な表現型について相補性を失ったことから、リン酸化活性がその機能に必須であることが示唆される。また Venus 融合タンパク質を変異体に導入したところ、表現型の回復と同時に細胞膜に蛍光シグナルが観察されたことから、このリン酸化タンパク質が細胞膜に局在することが示唆された。現在、この新奇リン酸化酵素とその変異体の機能解析についての論文を投稿準備中である。

(3) ゼニゴケでの TAR1 相同性遺伝子に対する遺伝子破壊株を構築することで、TAR1 の進化的な機能保存性について検証した。変異株の作出、相補株の単離、発現部位の特定まで行われ、現在表現型解析の結果を中心に論文の投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kajikawa M, Fukuzawa H	4. 巻 11
2. 論文標題 Algal Autophagy Is Necessary for the Regulation of Carbon Metabolism Under Nutrient Deficiency	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 36-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.00036.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hidayati, N. A., Yamada Oshima, Y., Iwai, M., Yamano, T., Kajikawa, M., Sakurai, N., Suda, K., Hori, K., Obayashi, T., Shimojima, M., Fukuzawa, H., Ohta, H.	4. 巻 100
2. 論文標題 LIPID REMODELLING REGULATOR 1 (LRL1) is involved in the phosphorus-depletion response and lipid metabolism in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant J.	6. 最初と最後の頁 610-626
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.14473.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamaoka Y, Shin S, Choi BY, Kim H, Jang S, Kajikawa M, Yamano T, Kong F, Legeret B, Fukuzawa H, Li-Beisson Y, Lee Y.	4. 巻 31
2. 論文標題 The bZIP transcription factor regulates lipid remodeling and contributes to ER stress management in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Cell	6. 最初と最後の頁 1127-1140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1105/tpc.18.00723.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Shinkawa, H., Kajikawa, M., Nomura, Y., Ogura, M., Sawaragi, Y., Yamano, T., Nakagami, H., Sugiyama, N., Ishihama, Y., Kanesaki, Y., Yoshikawa, H., Fukuzawa, H.	4. 巻 60
2. 論文標題 Algal protein kinase, Triacylglycerol Accumulation Regulator1 modulates cell viability and gametogenesis in carbon/nitrogen imbalanced conditions.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 916-930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kajikawa, M., Yamauchi, M., Shinkawa, H., Tanaka, M., Hatano, K., Nishimura, Y., Kato, M., Fukuzawa, H.	4. 巻 60
2. 論文標題 Isolation and characterization of Chlamydomonas autophagy-related mutants in nutrient-deficient conditions.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 126;138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcy193	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka, N., Uruguchi, S., Kajikawa, M., Saito, A., Ohmori, Y., Fujiwara, T.	4. 巻 96
2. 論文標題 A rice PHD-finger protein OsTITANIA, is a growth regulator that functions through elevating expression of transporter genes for multiple metals.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Journal	6. 最初と最後の頁 997;1006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tbj.14085	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 梶川昌孝、福澤秀哉	4. 巻 56
2. 論文標題 実用珪藻の代謝工学による高付加価値油脂の生産	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 246;247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1271/kagakutoseibutsu.56.246	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kajikawa, M., Sierro, N., Kawaguchi, H., Bakaher, N., Ivanov, N.V., Hashimoto, T., Shoji, T.	4. 巻 174
2. 論文標題 Genomic insights into the evolution of nicotine biosynthesis pathway in tobacco	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Physiol.	6. 最初と最後の頁 999;1011
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.17.00070	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Shoji, T., Kajikawa, M., Sierro, N., Hashimoto, T.	4. 巻 e1338225
2. 論文標題 Evolution of the nicotine biosynthesis regulon in tobacco	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Signal Behav.	6. 最初と最後の頁 e1338225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2017.1338225	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計25件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 新川はるか, 梶川昌孝, 榎木裕里, 山野隆志, 兼崎友, 吉川博文, 福澤秀哉
2. 発表標題 藻類のタンパク質リン酸化酵素Triacylglycerol Accumulation Regulator1 はC/N ストレス条件下における細胞生存率と配偶子誘導を制御する
3. 学会等名 第61日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長房すずか, 宮本あすか, 新川はるか, 新川友貴, 山野隆志, 辻敬典, 梶川昌孝, 福澤秀哉
2. 発表標題 高CO2 かつ窒素欠乏条件でTAG を高蓄積する緑藻クラミドモナスの変異体B10 株の解析
3. 学会等名 第61日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masataka Kajikawa
2. 発表標題 Production of ricinoleic acid-containing monoestolide triacylglycerides in an oleaginous diatom, <i>Chaetoceros gracilis</i>
3. 学会等名 12th International Symposium Exploring the Global Sustainability (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長房すずか、宮本明日香、新川はるか、新川友貴、山野隆志、辻敬典、梶川昌孝、福澤秀哉
2. 発表標題 C/N ストレス条件で脂質を高蓄積する緑藻変異株ccdc124
3. 学会等名 第32回植物脂質シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新川はるか、梶川昌孝、西浜竜一、河内孝之、福澤秀哉
2. 発表標題 ゼニゴケDYRK型タンパク質リン酸化酵素MpYak1は、無性芽の休眠と生殖器誘導の制御に関する
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梶川 昌孝、山内 万里花、新川 はるか、田中 学、幡野 恭子、西村 芳樹、加藤 美砂子、福澤 秀哉
2. 発表標題 オートファジーに依存した緑藻 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> の生存と油脂蓄積
3. 学会等名 日本藻類学会第43回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長房 すずか、宮本 明日香、新川 はるか、新川 友貴、山野 隆志、梶川 昌孝、福澤 秀哉
2. 発表標題 C/N ストレス条件で葉緑素と脂質を異常蓄積する新奇緑藻変異株ccdc124 の解析
3. 学会等名 日本藻類学会第43回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梶川 昌孝
2. 発表標題 藻類での有用物質生産と脂質蓄積制御因子の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梶川 昌孝、山内 万里香、新川 はるか、田中 学、幡野 恭子、西村 芳樹、加藤 美砂子、福澤 秀哉
2. 発表標題 オートファジーを欠損させた緑藻における窒素欠乏応答異常
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梶川 昌孝
2. 発表標題 藻類での有用物質生産と脂質蓄積制御因子の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部例会503回講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梶川 昌孝
2. 発表標題 オートファジーを欠損した緑藻における栄養欠乏応答異常
3. 学会等名 植物の栄養研究会第4回研究交流会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名	Haruka Shinkawa, Masataka Kajikawa, Yuri Sawaragi, Takashi Yamano, Yu Kanesaki, Hirofumi Yoshikawa, Hideya Fukuzawa
2. 発表標題	Algal Protein Kinase TAR1 Modulates Cellular Viability and Promotes Gametogenesis in High- CO2 / Nitrogen-Deficient Conditions
3. 学会等名	18th International Conference on the Cell and Molecular Biology of Chlamydomonas (Carnegie Institution for Science, Washington, DC) (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Masataka Kajikawa, Tatsuki Abe, Kentaro Ifuku, Ken-ichi Furutani, Dongyi Yan, Tomoyo Okuda, Akinori Ando, Shigenobu Kishino, Jun Ogawa, Hideya Fukuzawa
2. 発表標題	Production of ricinoleic acid-containing monoestolide triacylglycerides in an oleaginous diatom, <i>Chaetoceros gracilis</i>
3. 学会等名	18th International Conference on the Cell and Molecular Biology of Chlamydomonas (Carnegie Institution for Science, Washington, DC) (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Haruka Shinkawa, Masataka Kajikawa, Yuri Sawaragi, Takashi Yamano, Yu Kanesaki, Hirofumi Yoshikawa, Hideya Fukuzawa
2. 発表標題	Algal Protein Kinase TAR1 Modulates Cellular Viability and Promotes Gametogenesis in High- CO2 / Nitrogen-Deficient Conditions
3. 学会等名	18th International Conference on the Cell and Molecular Biology of Chlamydomonas (Carnegie Institution for Science, Washington, DC) (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	長房すずか、宮本明日香、嶋村大亮、本庄智也、新川友貴、香西紀子、梶川昌孝、山野隆志、福澤秀哉
2. 発表標題	窒素欠乏環境下で葉緑体と脂質を異常蓄積する緑藻変異株の解析
3. 学会等名	第36回日本植物細胞分子生物学会 (広島国際会議場)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名 梶川昌孝、本庄智也、伊福健太郎、小川順、菓子野康浩、福澤秀哉
2. 発表標題 実用珪藻における有用不飽和脂肪酸リシノール酸の生産
3. 学会等名 第36回日本植物細胞分子生物学会（金沢商工会議所会館）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長房すすか、宮本明日香、新川はるか、新川友貴、山野隆志、梶川昌孝、福澤秀哉
2. 発表標題 C/Nストレス条件で葉緑素と脂質を異常蓄積する新奇緑藻変異株ccdc124の解析
3. 学会等名 日本藻類学会第43回大会（京都）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梶川 昌孝、山内 万里香、新川 はるか、田中 学、幡野 恭子、西村 芳樹、加藤 美砂子、福澤 秀哉
2. 発表標題 オートファジーに依存した緑藻 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> の生存と油脂蓄積
3. 学会等名 日本藻類学会第43回大会（京都）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮本 明日香、新川 友貴、嶋村 大亮、本庄 智也、香西 紀子、胡 東輝、豊川 知華、新川 はるか、梶川 昌孝、山野 隆志、福澤 秀哉
2. 発表標題 高CO2かつ窒素欠乏環境でTAGとChlorophyllを異常蓄積する緑藻変異株の単離と解析
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Haruka Shinkawa, Masataka Kajikawa, Ryuichi Nishihama, Takayuki Kohchi, Hideya Fukuzawa
2. 発表標題 DYRK-Type protein kinase MpYak1 is involved in rhizoid elongation and carbon allocation in response to nitrogen deficiency in <i>Marchantia polymorpha</i>
3. 学会等名 The 16th International Student Seminar (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Asuka Miyamoto, Yuki Niikawa, Daisuke Shimamura, Tomoya Honjo, Noriko Kozai, Donghui Hu, Chihana Toyokawa, Haruka Shinkawa, Masataka Kajikawa, Takashi Yamano, Hideya Fukuzawa
2. 発表標題 Isolation of green algal mutants accumulating high levels of TAG and chlorophyll under nitrogen deficient conditions
3. 学会等名 The 16th International Student Seminar (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Haruka Shinkawa, Masataka Kajikawa, Ryuichi Nishihama, Takayuki Kohchi, Hideya Fukuzawa
2. 発表標題 DYRK-Type Protein Kinase TAR1 Regulates Rhizoid Elongation and Carbon Allocation in Response to Nitrogen Deficiency in the Liverwort <i>Marchantia polymorpha</i>
3. 学会等名 The 65th NIBB Conference. Renaissance of <i>Marchantia polymorpha</i> the genome and beyond (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Uran Ohta, Haruka Shinkawa, Asuka Miyamoto, Masataka Kajikawa, Masafumi Hirono, Hideya Fukuzawa
2. 発表標題 Isolation and characterization of a <i>Chlamydomonas</i> mutant with high levels of chlorophyll and TAG under nitrogen deficiency
3. 学会等名 The 7th Asian Symposium on Plant Lipid (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masataka Kajikawa
2. 発表標題 Protein kinase TAR1 conserved in the algae and land plants regulates C/N-stress responses
3. 学会等名 第19回京都大学生命科学研究科シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masataka Kajikawa
2. 発表標題 Protein kinase TAR1 conserved in the algae and land plants regulates C/N-stress responses
3. 学会等名 第19回京都大学生命科学研究科シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考