

炭素と窒素の栄養バランス応答における
緑藻のタンパク質リン酸化酵素 **TAR1** の機能

新川 はるか

目次

略語表

要旨

序論

1. 環境中の栄養状態とタンパク質のリン酸化 1
2. タンパク質リン酸化酵素 dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 6
3. モデル緑藻クラミドモナス 9
4. C/N ストレス応答性のクラミドモナスの脂質蓄積制御機構 9
5. 光独立栄養と光混合栄養条件下での脂質代謝 15
6. 酢酸依存的な TAG 蓄積制御因子 TAR1 16
7. 目的 18

結果

1. 異なる CO₂ 濃度条件下における *tar1-1* の生理応答 19
2. C/N ストレス条件下における *tar1-1* の生存と活性酸素種の産生 20
3. C/N ストレス条件下における *tar1-1* の光合成関連タンパクの蓄積量 22
4. C/N ストレス条件下における *tar1-1* の TAG とデンプンの蓄積量 24
5. C/N ストレス条件下における *tar1-1* の接合率と配偶子関連遺伝子の発現 28
6. 光独立もしくは光混合栄養かつ N 欠乏条件下において TAR1 依存的に発現が変動する遺伝子 30
7. キナーゼドメインを含む TAR1 部分タンパク質によるタンパク質リン酸化 35
8. C/N ストレス条件下における *tar1-1* のタンパク質リン酸化プロテオーム 37

考察

1. C/N ストレス条件下において TAR1 は ROS の産生に関与する 42
2. C/N ストレス条件下において TAR1 は光合成関連タンパク質を分解することにより光合成を下方制御する 43
3. C/N ストレス条件下において TAR1 は TAG およびデンプン蓄積の負の調節因子として機能する 45
4. C/N ストレス条件下において TAR1 は配偶子誘導を正に制御する 46
5. C/N ストレス欠乏初期において TAR1 は転写調節に関与する 47
6. C/N ストレス条件下において TAR1 は他のタンパク質リン酸化酵素のリン酸化

状態を制御する	48
結論	51
材料と方法	52
参考文献	61
謝辞	72

略語表

ABA	abscisic acid
AMPK	adenosine monophosphate-activated protein kinase
C	carbon
C1	complementation line 1
CBL	calcineurin B-like
CDPK	calcium-dependent protein kinase
CIPK	calcineurin B-like-interacting protein kinase
CO ₂	carbon dioxide
DEG	differentially expressed gene
DGDG	digalactosyldiacylglycerol
DGTS	diacylglycerol- <i>N, N, N</i> -trimethylhomoserine
DYRK	dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinases
FA	fatty acid
F_v/F_m	maximum quantum efficiency of photosystem-II
GO	gene ontology
GPX5	glutathione peroxidase
HemA	chloroplastic glutamyl-tRNA reductase 1
InsPs	inositol polyphosphate
KAS	3-ketoacyl-ACP synthase
KD	kinase dead
kDa	kilodalton
LC-MS/MS	liquid chromatography–tandem mass spectrometry
LHC	light-harvesting complex
MAPK	mitrogen-activated protein kinase
MEKK	mitrogen-activated protein kinase kinase kinase
MLCK	myosin light chain kinase
MLTK	mixed lineage kinase-related kinase-like mitogen-activated protein kinase kinase kinase
N	nitrogen
<i>mt</i>	mating type
PE	phosphatidylethanolamine
PI	phosphatidylinositol
PKA	protein kinase A

PP2C3	protein phosphatase 2C3
PPP	phosphoprotein phosphatase
PRK	phosphoribulokinase
PTO1	alternative oxidase
ROS	reactive oxygen species
Rubisco	ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
SAC1	sulfur acclimation protein 1
SBP	sedoheptulose-1,7-bisphosphate
SnRK	sucrose-non-fermenting 1-related kinase
SQDG	sulfoquinovosyl diacylglycerol
STD1	starch degradation 1
TAG	triacylglycerol
TAP	tris acetate phosphate
TAP+N	photomixotrophic nitrogen-supplemented condition
TAP-N	photomixotrophic nitrogen-deficient condition
TAR	triacylglycerol accumulation regulator
TOR	target of rapamycin
TRXh2	thioredoxin h2
TP	tris phosphate
TP+N	photoautotrophic nitrogen-supplemented condition
TP-N	photoautotrophic nitrogen-deficient condition
V_{max}	maximum rate of photosynthetic oxygen evolution
WT	wild-type
Yak1	yet another kinase1
Φ II	quantum efficiency of photosystem-II photochemistry

要旨

微細藻類は窒素欠乏により炭素 (C) / 窒素 (N) 比が崩れると、トリアシルグリセロール (TAG) やデンプンなど貯蔵物質を蓄積する一方、クロロフィルや光合成関連タンパク質を分解する。このことから、C/N ストレス条件下における TAG 蓄積と光合成能のバランスを制御する因子の同定が期待されている。微細藻類における C/N ストレス条件下での TAG 蓄積制御機構の解明を目指して、緑藻クラミドモナス *Chlamydomonas reinhardtii* の低 TAG 蓄積変異株 *triacylglycerol accumulation regulator1-1 (tar1-1)* が単離され、原因遺伝子として **dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase** をコードする *TAR1* が同定された。培地中に有機炭素源として酢酸を含む、光混合栄養かつ N 欠乏条件下において、*TAR1* は脂肪酸合成の炭素源となる酢酸利用を促進し、TAG 生合成を正に制御する因子とされていた。しかし、光合成で固定された炭素由来の TAG 蓄積制御への *TAR1* の役割は解明されておらず、光独立栄養かつ N 欠乏条件下での *TAR1* の機能解明が望まれた。また、*TAR1* を介した C/N ストレス応答の分子機構を解明するためには下流のリン酸化標的因子の同定が必要である。本研究では、*TAR1* を介した C/N ストレス応答の分子制御機構を解明することを目的とし、C/N ストレス条件下における変異株 *tar1-1* の生理応答の解析、そして光独立と光混合栄養条件下それぞれにおいて *TAR1* 依存的に変動する遺伝子群の同定と、*TAR1* のリン酸化標的因子の同定を行った。光独立栄養で通気する空気に含まれる CO₂ 濃度が 5%かつ N 欠乏条件 (TP-N) において、*tar1-1* は野生株よりも TAG とデンプンを蓄積した。同条件下において *tar1-1* は、光合成関連タンパク質の分解を抑制することで野生株よりも高い光合成能を維持し、また高い細胞生存性を示した。このことが *tar1-1* における TAG とデンプンの高蓄積につながったと考えられる。一方、*tar1-1* では DNA やタンパク質を損傷する過酸化水素の産生量が野生株よりも少なく、かつ TP-N 条件特異的に、野生株よりも *tar1-1* において活性酸素除去系の酵素遺伝子群の転写産物量が増加した。また、C/N ストレスによる *tar1-1* の配偶子誘導が進まず、その鍵因子 *MID* の転写産物量も *tar1-1* において野生株よりも低下した。さらに、窒素栄養源の輸送体並びに有機窒素化合物の同化関連酵素遺伝子群の転写産物量が *tar1-1* において野生株よりも低下した。また、アミノ酸 tRNA リガーゼの転写産物量は野生株では C/N ストレス移行に伴い低下したのに対して、*tar1-1* では低下しなかった。このことから、C/N ストレス応答時に *TAR1* は転写を介して配偶子誘導と、窒素栄養源の取り込み並びに同化を正に、アミノ酸 tRNA リガーゼによるタンパク質の新規合成を負に制御する可能性が示唆された。組換え *TAR1* タンパク質とクラ

ミドモナス野生株由来の全タンパク質との *in vitro* 反応物、ならびに *tar1-1*、野生株および相補株から抽出した全タンパク質についてそれぞれリン酸化プロテオーム比較解析を行い、TAR1 のリン酸化標的因子を 18 個推定した。その中には分裂促進因子活性化タンパク質リン酸化酵素の上流リン酸化酵素 (MLTK1) やカルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質リン酸化酵素 (CDPK11) が含まれていた。

以上のことから、本研究により C/N ストレス条件下において TAR1 は ROS の発生を正に制御し、それに伴い細胞生存性と、光合成関連タンパク質の分解を促進することで光合成活性を負に制御する可能性が示唆された。一方で、クラミドモナスの適応戦略として、TAR1 は配偶子誘導と窒素栄養源の取り込みならびに同化を正に、そしてタンパク質の新規合成を負に、mRNA レベルでの転写を介して制御する可能性が示唆された。そしてリン酸化プロテオーム解析により MLTK1 や CDPK11 を含む 18 個のタンパク質が TAR1 依存的に C/N ストレス条件下においてリン酸化を受けることが明らかになった。今後は、C/N ストレス条件下におけるこれらの因子の機能解明により、TAR1 を介した C/N ストレス応答の機構解明が期待される。

序論

1. 環境中の栄養状態とタンパク質リン酸化

外環境中の栄養源の量と質は、細胞増殖を調節する。タンパク質リン酸化は、シグナル伝達に関与する最も広範な種類の翻訳後修飾である。栄養状態に応答して機能するタンパク質リン酸化酵素は、真核生物における重要な調節因子であり、AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK)、サイクリック AMP 依存プロテインキナーゼ A (PKA)、およびラパマイシン標的 (TOR) キナーゼなどが高度に保存されている (Shashkova et al., 2015)。植物においてはその中でも TOR キナーゼと、酵母 Snf1 タンパク質キナーゼおよび哺乳動物の AMPK に対応する植物オルソログ SnRK が栄養欠乏応答の観点から研究されている (Bechtold and Field, 2018)。植物にとって光合成で固定された炭素 (C) と根から吸収された窒素 (N) の代謝は、アミノ酸合成をはじめとした多くの代謝経路上で互いに影響し合っていることから、C/N バランスが植物の生育に重要な要因となる (Vidal and Gutiérrez, 2008)。

TOR キナーゼは出芽酵母で同定されて以来 (Heitman et al., 1991)、菌類、動物、植物など様々な生物種で研究が進められてきた (Dobrenel et al., 2016)。TOR キナーゼは細胞内外の栄養やエネルギー状態に応じてタンパク質翻訳、C 代謝、細胞増殖、老化およびオートファジーを制御する因子であり (Gonzalez and Hall, 2017)、酵母や動物では 2 つの複合体、TORC1 および TORC2 が存在する (Helliwell et al., 1994 ; Loewith et al., 2002)。一方、緑藻および陸上植物などの光合成生物では、TORC1 を構成する因子 TOR、LST8、Raptor が保存されている (Dobrenel et al., 2016)。シロイヌナズナで、グルコースによる TOR の活性化が根の分裂組織における細胞分裂を促進することや (Xiong et al., 2013)、エタノール誘導性の RNAi システムによる *AtTOR* 発現抑制株ではクロロフィル分解を伴う老化の促進が起こることが報告されている (Deprost et al., 2007)。植物における TOR 複合体のリン酸化標的因子は、動物と共通するもの (S6 キナーゼ) と植物でのみ報告されているもの (E2f 転写因子、PP2A サブユニットの TAP46、アブシジン酸レセプター-PYL) がそれぞれ知られている (Shi et al., 2018 ; 図 1)。しかし植物の TOR 複合体を中心とした分子機構については未解明な部分が多く残されている。

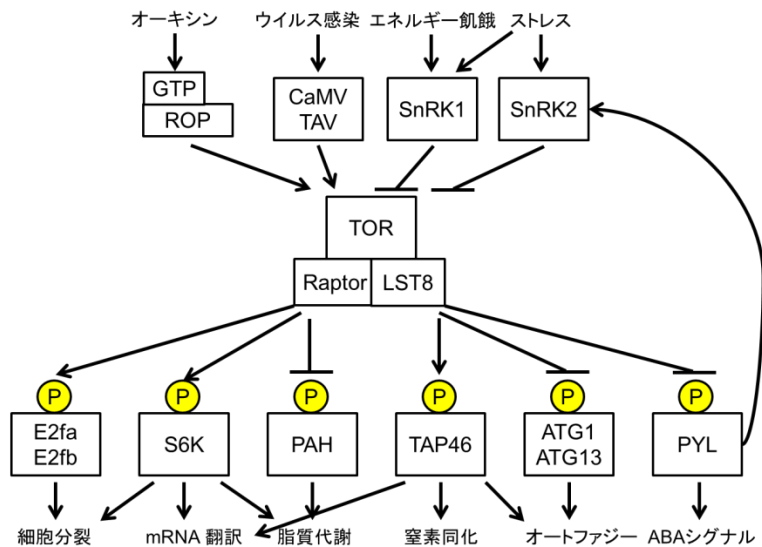


図 1. シロイヌナズナの TOR シグナルモデル図。Shi et al., 2018 をもとに作成した。ATG; autophagy related gene、ABA; abscisic acid、CaMV; cauliflowermosaic virus、GTP; small GTPase、LST8; lethal with SEC thirteen 8、P; リン酸化修飾、PAH; phosphatidate phosphohydrolase、PYL; Pyrabactin Resistance 1 Like、ROP; rho of plants、S6K; ribosomal protein S6 kinase、SNF1-related kinase; SnRK、TAP; type 2A-phosphatase-associated protein、TAV; transactivator-viropasmin、TOR; target of rapamycin。

植物 SnRK ファミリーは C と N 代謝の制御に関与する (Halford and Hey, 2009)。ドメイン構造に基づいて植物 SnRK ファミリーは SnRK1、SnRK2、および SnRK3 の 3 つのサブファミリーに分類されるが (Halford and Hey, 2009)、このうち SnRK2 と SnRK3 について、近年 C/N ストレス応答に関与することが報告された。SnRK2 はアブシジン酸 (ABA) シグナル伝達経路の重要な調節因子であり (Fujii and Zhu, 2009)、C と N 代謝に関連した一次代謝の制御に関与する (Shin et al., 2007)。近年 ABA の存在量に応じて制御を受け、SnRK2 を脱リン酸化する酵素 ABI1 が高グルコース添加かつ低 N という、C/N ストレス応答を制御する因子であることが報告された (Lu et al., 2015a)。

SnRK3 は Ca^{2+} 結合タンパク質である calcineurin B-like (CBL) との結合を介して Ca^{2+} 依存的に活性化されるため、CBL-interacting protein kinase (CIPK) とも呼ばれる (Luan, 2009)。このファミリーの一員である CIPK23 は、二重親和性硝酸塩輸送体をリン酸化することで硝酸塩応答を負に調節し、輸送体活性を調節する (Ho et al., 2009)。CIPK ファミリーの他のメンバーである CIPK8 も硝酸塩応答に関与しているが、その機能は CIPK23 とは逆に硝酸塩応答を負に制御する (Hu et al., 2009)。近年、CIPK7、CIPK12、CIPK14 が C/N ストレスに応答して CBL と複合体を形成して活性化し、C/N ストレス制御因子である膜局在型ユビキチンリガーゼ ATL31 をリン酸化し、C と N 代謝の主要な

酵素群と結合することで、その活性を制御する 14-3-3 タンパク質 (Comparot et al., 2003) に対する親和性を高めることが報告された (Yasuda et al., 2017 ; 図 2B)。ATL31 はシロイヌナズナ過剰発現体ライブラリーを用いたスクリーニングで C/N ストレスに非感受性を示す株として得られた株の原因遺伝子であり (Sato et al., 2009)、C/N 比ストレスによりリン酸化された ATL31 が 14-3-3 と結合、ユビキチン化することで 14-3-3 が分解され、C/N 応答が起こる (Sato et al., 2011)。

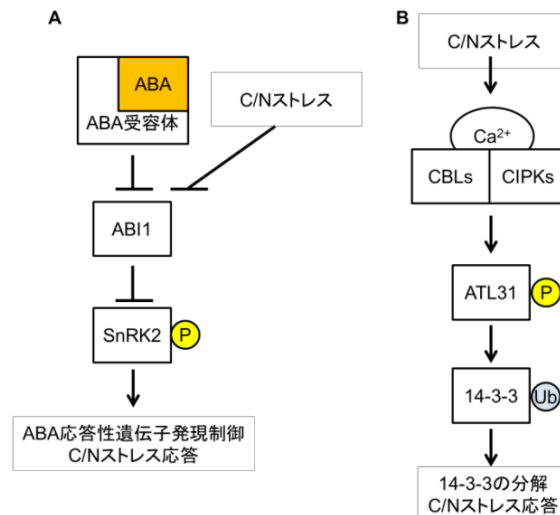


図 2. シロイヌナズナの炭素 (C) と窒素 (N) 比 (C/N) ストレス条件下における SnRK2 (A) と SnRK3/CIPK (B) の機能モデル図。Lu et al., 2015a と Yasuda et al., 2017 をもとに作成した。ABA ; abscisic acid、ABI ; ABA-insensitive、ATL ; arabidopsis toxicosen levadura、CBL ; calcineurin-like protein、CIPK ; CBL-interacting protein kinase、P ; リン酸化修飾、SnRK ; SNF1-related kinase、Ub ; ユビキチン化。

植物における TOR キナーゼと SnRK ファミリーは、細胞分裂、タンパク質合成、蓄積、および自食作用を含む、さまざまな生物学的プロセスにおいて拮抗的役割を果たす (Hulsmans et al., 2016)。SnRK1 は TOR キナーゼの上流でオートファジーの正の制御因子として機能する (Soto-Burgos and Bassham, 2017 ; 図 1)。一方、ABA シグナルを介して活性化された SnRK2 は TOR シグナルを抑制する (Wang et al., 2018 ; 図 1)。

藻類においては一次共生藻や二次共生藻の比較ゲノム解析により複数の種において、TOR キナーゼおよび TOR 複合体の構成因子が保存されており (Shemi et al., 2015)、真核型光合成生物における TOR シグナルネットワークの進化的起源であることが示唆された。緑藻のモデル生物であり一次共生藻の *Chlamydomonas reinhardtii* (以下クラミドモナス) は TOR の阻害剤であるラパマイシンによる生育阻害が確認された最初の藻類である (Crespo et al., 2005)。しかし、同じく一次共生藻の紅藻 *Cyanidioschyzon merolae*

はラパマイシンに対して生育阻害を示さなかった (Imamura et al., 2013)。一方、二次共生藻でユーグレナ目の *Euglena gracilis* (Mukaida et al., 2016) や円石藻目の *Emiliania huxleyi* (Schatz et al., 2014) はラパマイシンに対して生育阻害を示した。藻類における TOR の制御機構は多様であると推測されるが、その研究はまだ初期段階にある。最も研究が進んでいるクラミドモナスにおいては、ラパマイシン添加による TOR の阻害により、液胞の肥大と細胞分裂の停止 (Crespo et al., 2005)、オートファジーの活性化 (Pérez-Pérez et al., 2010)、脂質蓄積 (Imamura et al., 2015)、アミノ酸の新規合成 (Mubeen et al., 2018) が起こる (図 3)。これらの応答は C/N ストレス条件下のクラミドモナス細胞においても観察されることから、クラミドモナスにおいて TOR シグナルが C/N ストレス応答の制御に関与すると推定されているが (Pérez-Pérez et al., 2017)、その制御の分子メカニズムは解明されていない。近年 TOR の阻害剤であるラパマイシンに対して酢酸添加条件依存的に過感受性と高 triacylglycerol (TAG) 蓄積を示すクラミドモナス変異株 *vip1-1* が報告され、この変異体の原因遺伝子はイノシトールリン酸 (InsPs) の生合成酵素である inositol hexakisphosphate kinase をコードする遺伝子 *VIP1* であった (Couso et al., 2016)。このことから、クラミドモナスにおいて酢酸依存的な細胞増殖と TAG 蓄積は TOR キナーゼおよび InsPs シグナルによって調節されることが示唆されたが、その具体的な上流、下流の制御因子の同定には至っていない (図 3)。

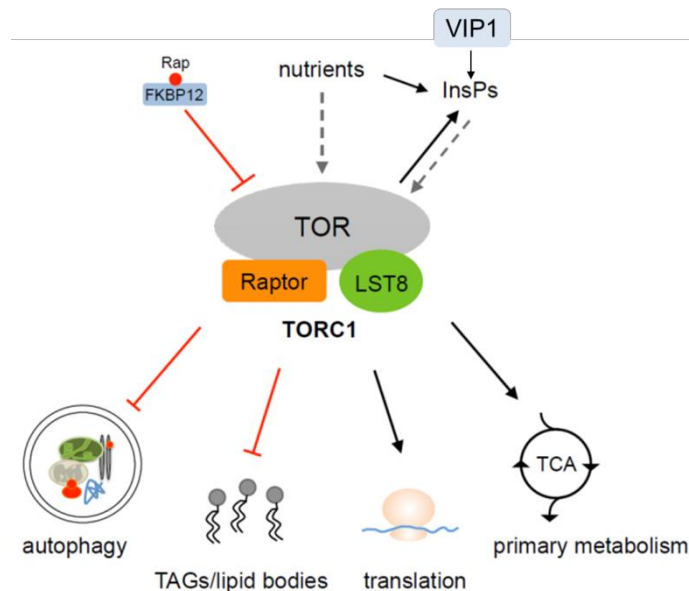


図 3. クラミドモナス TORC1 のモデル図。Pérez-Pérez et al., 2017 を一部改変し、転載した。FKBP ; FK506-binding protein, InsPs ; inositol polyphosphates, LST8 ; lethal with SEC thirteen 8, Rap ; rapamycin, TAG ; triacylglycerol, TCA ; tricarboxylic acid cycle, TOR ; target of rapamycin, TORC ; TOR complex, VIP1 ; inositol hexakisphosphate kinase。

藻類の SnRK ファミリーについては、クラミドモナスのゲノムにおいて 22 個の SnRK オルソログが同定され (Colina et al., 2019)、2 つのサブグループに分類される (Colina et al., 2019)。その内、SnRK2 はクラミドモナスの硫黄欠乏応答の重要な因子である。硫黄欠乏条件下において、硫黄の輸送に関与する sulfur acclimation protein1 (SAC1) により SnRK2.2 が不活性化し、硫黄充足条件下では SnRK2.2 により不活性化されていた SnRK2.1 が活性化する (Pootakham et al., 2010 ; 図 4)。シロイヌナズナでは SnRK2 が ABA シグナル伝達の重要な因子であるが、クラミドモナスでは ABA 添加により H₂O₂ ストレス (Yoshida et al., 2003)、浸透圧、塩ストレス (Yoshida et al., 2004) による増殖抑制が緩和することが報告されているが、ABA 受容体である PYR/PYL/RCAR が保存されておらず (Lu et al., 2015b)、クラミドモナスにおいて ABA シグナル伝達経路の存在については解明されていない。

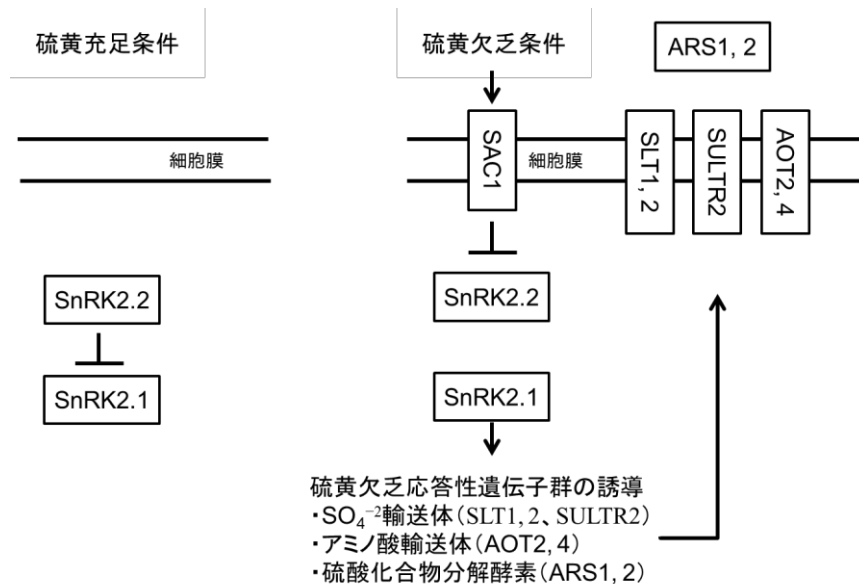


図 4. クラミドモナスの硫黄欠乏応答のモデル図。Saroussi et al., 2017 をもとに作成した。AOT ; amino acid transporter、ARS ; arylsulfatases、SAC1 ; sulfur acclimation protein1、SLT ; SAC1-like transporter、SnRK ; SNF1-related kinase、SULTR ; sulfate transporter。

2. タンパク質リン酸化酵素 dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase

真核生物で広く保存されている dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase (DYRK) ファミリーはチロシンおよびセリンとスレオニンの両方を基質とするリン酸化酵素のファミリーである (Aranda et al., 2011)。チロシン残基を基質とする活性は、自己リン酸化を行う場合に限られており、一部の DYRK は自己リン酸化されて初めて活性化する (Kannan and Neuwald, 2004)。DYRK ファミリーは分子系統解析により、Yak1、DYRK1、DYRK2、DYRK3、DYRK4、HIPK の 6 つのサブグループに分類される (Aranda et al., 2011; Kajikawa et al., 2015 ; 図 5)。

真核型単細胞生物において、出芽酵母では Yak1、分裂酵母では Pom1 などの DYRK ファミリーに属するタンパク質リン酸化酵素が同定されており、それらは細胞分裂や分化に関与する (Raich et al., 2003)。そのほかにも線虫やショウジョウバエ、ほ乳類においても DYRK ファミリーに属するリン酸化酵素が同定されている (Aranda et al., 2011)。DYRK キナーゼ群はヒトでは 5 つ確認され、そのキナーゼドメインの構造は mitogen-activated protein kinase (MAPK) や cyclin-dependent kinase と比較的類似している (Becker et al., 1998 ; Lochhead et al., 2003)。しかし 5 つの DYRK はキナーゼドメインの両側にそれぞれ独自の配列を持っており、細胞内でそれぞれ固有の局在・機能を持つと推定される。このうち、DYRK1A はヒト染色体 21 番にコードされており、そのトリソミーによって生じるダウン症の責任領域に含まれる。マウスモデルの実験等からダウン症のさまざまな症状のうちの少なくとも一部は DYRK1A の過剰発現が原因であると推定される (Altafaj et al., 2001 ; Yabut et al., 2010)。

DYRK ファミリーの活性制御機構については、分裂酵母の Pom1 は常にタンパク質として発現しているものの、そのリン酸化活性は細胞分裂のフェーズによって変動し (Bahler et al., 2001)、下流のタンパク質リン酸化酵素 Cdr2 のリン酸化を介して有糸分裂開始を負に制御する (Kettenbach et al., 2015)。出芽酵母の Yak1 は TOR の阻害剤であるラパマイシン添加によりチロシンが自己リン酸化されることで活性化する (Martin et al., 2004)。そして TOR が PKA を介して Yak1 を負に制御する (Martin et al., 2004)。Yak1 はグルコース欠乏時の細胞分裂の負の制御因子であり (Moriya et al., 2001)、グルコース欠乏時に転写因子の Msn2 や Hsf1 をリン酸化することで細胞分裂を制御する (Lee et al., 2008)。

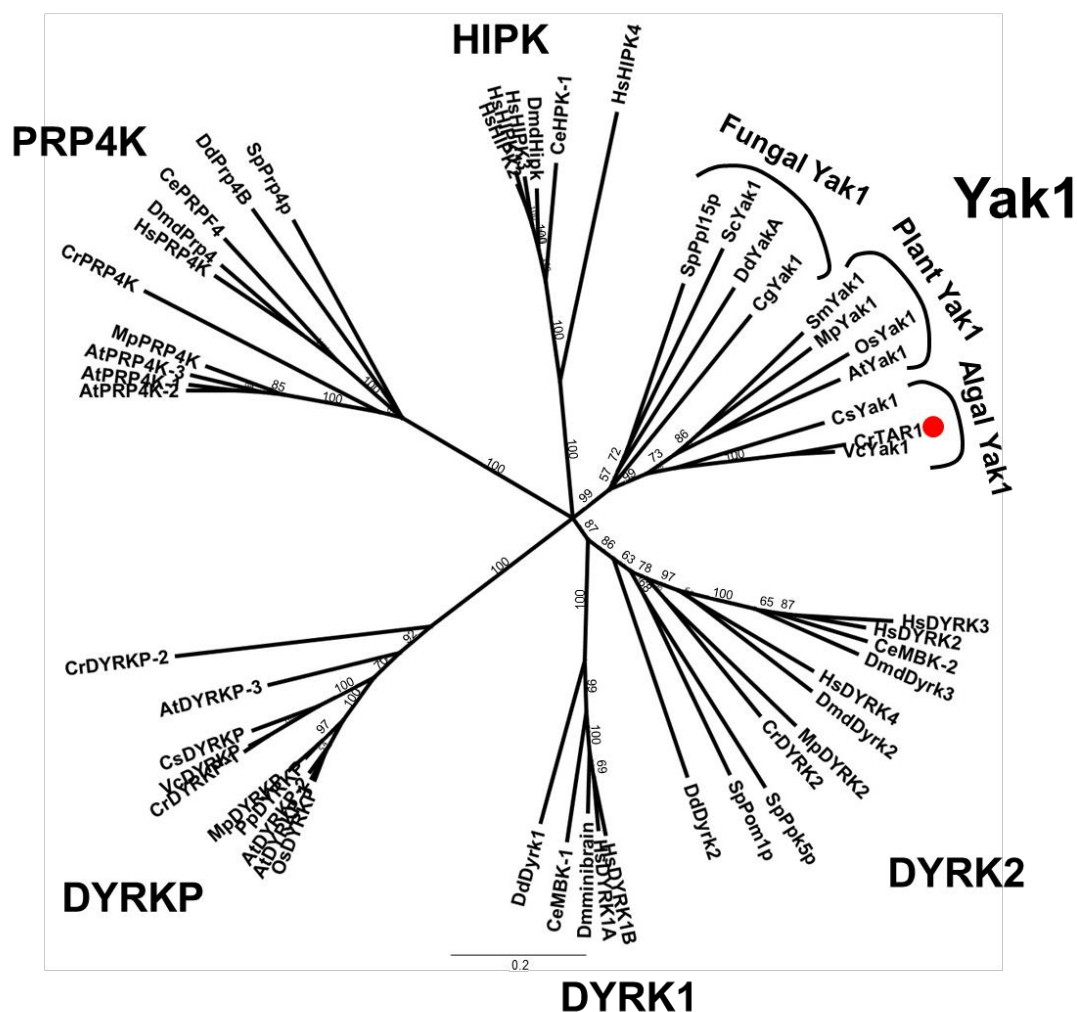


図 5. キナーゼドメイン部分のアミノ酸配列に基づいた dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinases (DYRKs) の分子系統樹。Kajikawa et al., 2015 を改変。赤丸は本研究で解析したクラミドモナス TAR1 を示す。図中数値はブートストラップ値を示す。At ; *Arabidopsis thaliana*, Ce ; *Caenorhabditis elegans*, Cg ; *Chaetoceros gracilis*, Cr ; *Chlamydomonas reinhardtii*, Cs ; *Coccomyxa subellipsoidea*, Dd ; *Dictyostelium discoideum*, Dm ; *Drosophila melanogaster*, Hs ; *Homo sapiens*, Mp ; *Marchantia polymorpha*, Os ; *Oryza sativa*, Sc ; *Saccharomyces cerevisiae*, Sp ; *Schizosaccharomyces pombe*, Sm ; *Selaginella moellendorffii*, Vc ; *Volvox carterii*。

植物において長らく DYRK ファミリータンパクの機能は知られていなかったが、培地中に有機栄養として酢酸を添加した光混合栄養かつ N 欠乏条件下において TAG を野生株より蓄積しないクラミドモナス変異株 *TAG accumulation regulator1-1 (tar1-1)* が単離され、この変異株の原因遺伝子が Yak1 型の DYRK をコードする遺伝子 *TAR1* として報告された (Kajikawa et al., 2015)。また、嫌気条件下においてデンプン分解が阻害される変異株 *starch degradation 1 (std1)* ; Chochois et al., 2010) の原因遺伝子が DYRKP サ

ブグループに属する DYRK をコードし、DYRK が光独立かつ N 欠乏条件において、光合成活性や TAG とデンプン蓄積を負に制御する因子として報告された (Schulz-Raffelt et al., 2016)。クラミドモナス以外の藻類での知見として、*E. gracilis* の *TAR1* と *STD1*、*STD2* オルソログ遺伝子の発現抑制株の代謝物解析が報告されている (Kimura and Ishikawa, 2018)。*EgTAR1* 発現抑制株は通常条件下において多糖の一種であるパラミロン蓄積量が野生株よりも少なかった。一方 *EgSTD1* 発現抑制株および *EgSTD2* 発現抑制株はどちらも通常条件下においてパラミロン蓄積量が野生株よりも多く、嫌気条件下において蓄積が誘導されるワックスエステルの蓄積量が野生株よりも増加した (Kimura and Ishikawa, 2018)。これらの研究により、藻類において DYRK が多糖や脂質蓄積など炭素代謝制御に関わる因子であることが示されたが、その下流シグナルの標的因子などの分子メカニズムについては解明されていない。

陸上植物の DYRK の機能に関する知見としては、シロイヌナズナの *Yak1* (*AtYak1*) についてそれぞれ異なる側面の機能が報告されている。ABA 添加条件でのリン酸化プロテオーム解析により、ABA 添加によりリン酸化ペプチド量が増加するリン酸化タンパク質として *AtYak1* が見出された (Kline et al., 2010)。DYRK ファミリー間で保存されているリン酸化活性部位のチロシン残基へのリン酸化が ABA 添加により亢進した。*Atyak1* 変異株は種子発芽、子葉緑化、気孔開閉において ABA 低感受性を示し、乾燥ストレス耐性が低下した (Kim et al., 2016)。また、概日リズムと光周性開花の制御因子 LIGHT-REGULATED WD1 (*LWD1*)、*LWD2* (Wu et al., 2008) と相互作用するタンパク質として *AtYak1* が見出され、*atyak1* 変異株は光周性開花が遅延し、種子数が減少した (Huang et al., 2017)。そして *lwd1*、*lwd2* との三重変異株の解析により、光周性開花の制御において *LWD1*、*LWD2* と *AtYak1* は拮抗的役割を果たすことが示された。これらの結果から、*AtYak1* は ABA シグナルの制御と光周性開花の制御に関与することが示されたが、藻類 DYRK のようにストレス条件下における代謝を制御する機能があるのかは解明されていない。また、藻類の生長相転換や ABA シグナル制御に DYRK が関与するののかも不明である。

3. モデル緑藻クラミドモナス

単細胞性緑藻クラミドモナスは培地中の酢酸を有機炭素として資化できる (Sager and Granick, 1953)。そのため、無機塩類培地かつ明条件の光独立栄養条件、培地中への酢酸添加かつ明条件の光混合栄養、培地中への酢酸添加かつ暗条件の従属栄養条件という三種類の培養条件下においてクラミドモナスは生育可能である (Harris et al., 1989)。さらに交配による遺伝学が可能であること、核・ミトコンドリア・葉緑体ゲノムの形質転換が可能であること、葉緑体遺伝子は相同組み換えによるジーンターゲッティングが可能であることなどから、「緑の酵母」と呼ばれ (Goodenough, 1992)、光合成、細胞分裂、代謝、環境応答のモデル生物として利用されてきた (Harris et al., 2009)。特に近年は高頻度な形質転換法の確立 (Yamano et al., 2013)、6 万株以上の変異体ライブラリーの構築 (Li et al., 2016)、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術の確立 (Greiner et al., 2017) など分子生物学的な手法がさらに拡充している。

4. C/N ストレス応答性のクラミドモナスの脂質蓄積制御機構

N 欠乏により C/N バランスが崩れると、ストレスへの順化のための様々な生理応答、例えば配偶子誘導 (Sager and Granick, 1954)、リボソームタンパク質 (Martin and Goodenough, 1975) ならびに cytochrome *b₆f* 複合体の分解 (Bulté and Wollman, 1992)、デンプン (Martin and Goodenough, 1975) や TAG (Weer and Gulati, 1997) などの炭素代謝物質の蓄積が起こる。2000 年代に入り、藻類が蓄積する TAG がバイオ燃料源として注目され (Henston, 2007)、藻類の TAG 蓄積制御機構研究のモデル生物として、クラミドモナスのストレス応答性の TAG 蓄積制御機構に関する研究報告の数が急激した。クラミドモナスは無機塩類欠乏ストレス (Boyle et al., 2012) および塩ストレス (Siaut et al., 2012)、そして強光ストレス (Goold et al., 2016) 条件下において TAG を蓄積する。特に N 欠乏による C/N ストレス条件下において、他のストレス条件下よりもクラミドモナスは TAG を多く蓄積するため (Boyle et al., 2012)、C/N ストレス応答性の TAG 蓄積制御因子、代謝酵素が多数報告されている (図 6、表 1)。

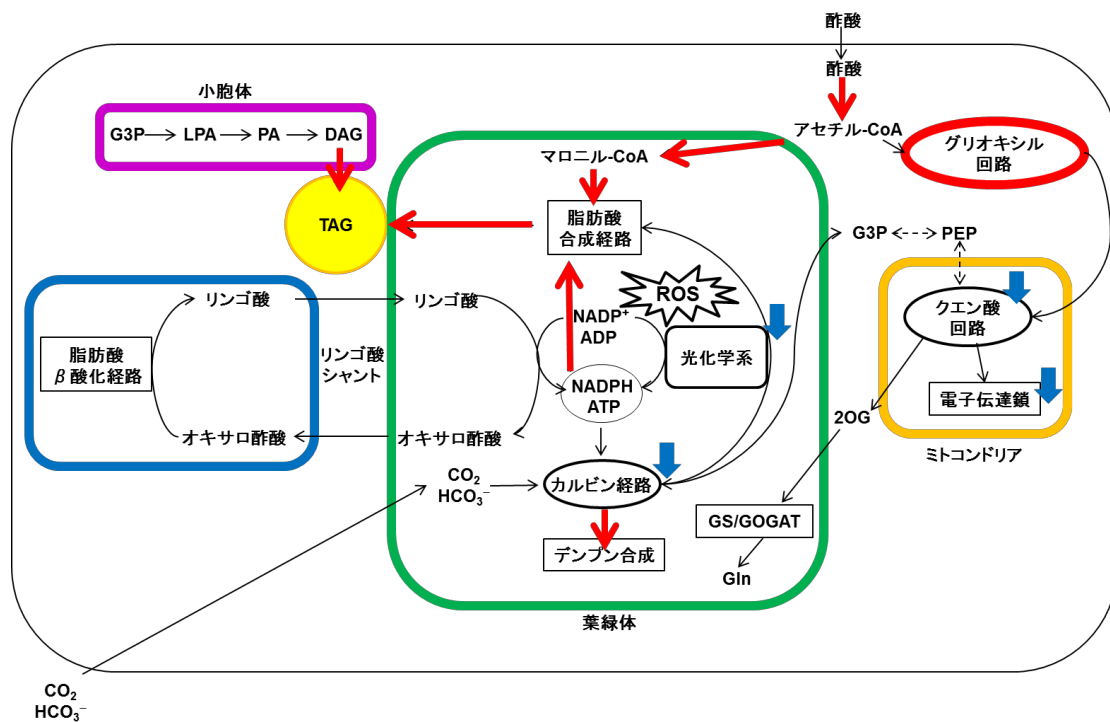


図 6. クラミドモナスにおける C/N ストレス条件下における炭素代謝。Gargouri et al., 2017、Du et al., 2018、Kong et al., 2018 をもとに作成した。実線は直接の経路、点線は複数の酵素反応を省略、赤線は C/N ストレスによって活性化する反応、青矢印は抑制される機構を示す。2OG ; 2-oxoglutaric acid、DAG ; diacylglycerol、G3P ; glyceraldehyde 3-phosphate、Gln ; glutamine、GOGAT ; glutamine oxoglutarate aminotransferase、GS ; glutamine synthetase、LPA ; lysophosphatidic acid、PA ; phosphatidic acid、PEP ; phosphoenolpyruvic acid、ROS ; reactive oxygen species、TAG ; triacylglycerol。

表 1. クラミドモナスの炭素 (C) /窒素 (N) ストレス応答性のトリアシルグリセロール (TAG) 蓄積に影響を与える代謝酵素ならびに調節因子

遺伝子名	タンパク質名	機能評価の方法	変異株の性質	機能	文献
代謝酵素					
<i>DGTT1</i>	Diacylglycerol acyltransferase 1	KD	TAP-N で TAG 蓄積量が減少した。	-N 条件下で TAG 蓄積に関与するアシル基転移酵素	Liu et al., 2016
<i>DGTT4</i>	Type-2 diacylglycerol acyltransferase	O/E	リン欠乏時の TAG 蓄積量が 2 倍増加した。	リン欠乏条件下での TAG 蓄積に関与するアシル基転移酵素	Iwai et al., 2014
<i>PDAT1</i>	Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase 1	KD	TAP+N と TAP-N 条件において TAG 蓄積量が 50%もしくは 80%程度に低下した。	膜脂質を基質とした、DAG から TAG へのアシル基転移酵素	Yoon et al., 2012
<i>LPAAT1</i>	Plastid-targeted 2-lysophosphatidic acid acyltransferase	O/E	TAP-N 時に TAG 蓄積量が増加した。	フォスファチジン酸 (DAG の前駆体) 合成酵素	Yamaoko et al., 2016
<i>PGD1</i>	Galactoglycerolipid lipase	KO	TAP-N 時に TAG 蓄積量が低下した。	MGDG 特異的リパーゼ	Li et al., 2012a
<i>LIP1</i>	Lipase 1	KD	TAP-N から TAP+N に戻したときの TAG 分解が遅れた。	TAG 分解酵素	Li et al., 2012b
<i>ACX2</i>	Acyl-CoA oxidase/dehydrogenase	KO	TAP-N から TAP+N に戻したときの TAG 分解が遅れた。	β 酸化経路による脂肪酸分解経路	Kong et al., 2017
<i>STA6</i>	ADP-glucose pyrophosphorylase	KO	TAP-N 時の TAG 蓄積量が増加した。	デンプン合成の鍵酵素	Li et al., 2010
<i>STA7</i>	Isoamylase	KO	TAP-N 時の TAG 蓄積量が増加した。	デンプン合成の鍵酵素	Work et al., 2010

-N ; 窒素欠乏条件、+N ; 窒素充足条件、KD ; 発現抑制株、KO ; 挿入変異による遺伝子欠損株、O/E ; 過剰発現株、TAP ; 光混合栄養、TP ; 光独立栄養。(次頁に続く)

遺伝子名	タンパク質名	機能評価の方法	変異株の性質	機能	文献
<i>CIS</i>	Citrate synthase	O/E、KD	TAP-N 条件において O/E では TAG 蓄積量が低下し、KD では増加した。	クエン酸回路の酵素	Deng et al. 2013
<i>ICL</i>	Isocitrate lyase	KO	TAP+N 条件での TAG 蓄積量が 3 倍に増加した。	酢酸を代謝するグリオキシル回路の鍵酵素	Plancke et al., 2014
<i>PEPC1</i>	Phosphoenolpyruvate carboxylase 1	KD	TAP-N 条件での TAG 蓄積量が増加した。	解糖系／糖新生経路の酵素	Deng et al., 2014
<i>PEPC2</i>	Phosphoenolpyruvate carboxylase 2	KD	脂質蓄積量が増加した。	解糖系／糖新生経路の酵素	Deng et al., 2011
<i>PDC2_E1a</i>	Chloroplast pyruvate dehydrogenase 2 E1a	KD	TP-N 条件で TAG 蓄積量が減少し、TAP-N 条件では影響なかった。	acetyl-CoA の合成酵素	Shtaida et al., 2014
<i>MDH2</i>	Peroxisome-located malate dehydrogenase2	KO	TP-N 条件で高 TAG、高デンプン蓄積した。	Malate shunt の酵素	Kong et al., 2018
転写因子					
<i>NRR1</i>	Nitrogen response regulator 1	KO	TAP-N 条件において TAG 蓄積量が 52% に低下した	-N 応答性転写因子	Boyle et al. 2012
<i>ROC40</i>	MYB related transcription factor	KO	TAP-N 時に TAG 蓄積が減少した。	-N 時新規脂肪酸合成を制御する転写因子	Goncalves et al., 2016
<i>CHT7</i>	CXC domain DNA-binding protein	KO	TAP-N から TAP+N に戻したときの TAG 分解が阻害された。	転写制御により +N 条件時の TAG 分解に関する遺伝子群の発現を調整する調整因子	Tsai et al., 2014 ; Tsai et al., 2017
<i>PSR1</i>	Transcription factor	KO と O/E	TAP-N においても KO の TAG 蓄積量が減少した。	リン欠乏特異的に発現量が増加するリン欠乏応答の鍵転写因子	Bajhaiya et al., 2015; ; Ngan et al., 2015

(次頁に続く)

タンパク質リン酸化酵素					
<i>TAR1</i>	Yak1 type dual-specificity tyrosine phosphorrrylation-regulated kinase (DYRK)	KO	TAP-N 条件では低 TAG 蓄積、TP-N 条件では TAG とデンプンを高蓄積した。	-N 応答のタンパク質リン酸化酵素	Kajikawa et al., 2015 ; Shinkawa et al., 2019
<i>STD1</i>	Plant specific DYRK	KO	TP-N 条件で高 TAG、高デンプン蓄積を示した。	-N 応答のタンパク質リン酸化酵素	Schulz-Raffelt et al., 2016
その他					
<i>MLDP</i>	Major lipid droplet protein	KD	TAG 量に変化はないが、油滴直径が増加した。	油滴表面で油滴形成を制御	Moellering and Benning, 2010
<i>PII</i>	Signal transduction protein	KD	TAP-N 時の TAG 蓄積量が増加した。	バクテリアにおける C/N バランスの制御因子	Zalutskaya et al., 2015
<i>TGD2</i>	Chloroplast lipid transporter	KO	TAP+N 条件で TAG 蓄積が増加した。	小胞体から葉緑体への DAG 輸送体	Warakanont et al, 2015
<i>VIP1</i>	Inositol hexakisphosphate kinase	KO	TAP+N ならびに TAP-N 条件下で TAG 蓄積量が増加した。	シグナル伝達分子としてのイノシトールリン酸生合成酵素	Couso et al., 2016
<i>TAB2</i>	Photosystem I (PSI) translation initiation factor	KO	TAP-N 条件では低 TAG 蓄積と高デンプン蓄積、TP-N 条件では低 TAG と低デンプン蓄積を示した。	PSI タンパクの翻訳制御因子	Gargouri et al., 2017

-N ; 窒素欠乏条件、+N ; 窒素充足条件、KD ; 発現抑制株、KO ; 挿入変異による遺伝子欠損株、O/E ; 過剰発現株、TAP ; 光混合栄養、TP ; 光独立栄養。

ジアシルグリセロール (DAG) にアシル CoA を転移する TAG 生合成活性をもつアシル基転移酵素 DGTT1 (Liu et al., 2016)、DGTT4 (Iwai et al., 2014)、そして DAG の前駆体であるフォスファチジン酸合成酵素 LPAAT1 (Yamaoka et al., 2016) について代謝工学的的手法による代謝改変が試みられた。DGTT1 の発現抑制株では TAG 蓄積量が減少し、DGTT4、LPAAT1 の過剰発現株では TAG 蓄積量が増加した。また、TAG を合成する経路には、アシル CoA 転移反応の他に膜脂質のアシル鎖を DAG に転移する経路があり、細胞膜脂質を基質とするアシル基転移酵素 PDAT1 (Yoon et al., 2012) や、葉緑体膜脂質の分解酵素 PGD1 (Li et al., 2012a ; Du et al., 2018) が TAG 蓄積を正に制御する。一方、TAG の分解制御も TAG 蓄積に関与しており、LIP1 (Li et al., 2012) や ACX2 (Kong et al., 2017) などの TAG や脂肪酸の分解酵素は TAG 蓄積を負に制御する。

TAG 合成のための C 供給源は、三種類考えられる。第一に他の貯蔵物質からの C 分配である。デンプン合成酵素をコードする *STA6* および *STA7* 遺伝子の欠損変異株では TAG 蓄積量が増加したことから、デンプン合成のための C フラックスが TAG 合成側に傾いたと考えられる (Li et al., 2010 ; Work et al., 2010 ; Blaby et al., 2015)。第二に脂肪酸の前駆体である acetyl-CoA の供給である。acetyl-CoA 合成酵素をコードする *PDC2_E1a* の発現抑制株で TAG 蓄積量が減少したことから、acetyl-CoA の生産量が減少したことで脂肪酸生合成が抑制されたと考えられる (Shtaida et al., 2014)。一方、クエン酸回路に関わる *CIS* (Deng et al. 2013)、グリオキシル回路に関与する *ICL* (Plancke et al., 2014)、解糖系/糖新生経路の *PEPC1*、*PEPC2* (Deng et al., 2011 ; Deng et al., 2014) 発現抑制株および遺伝子欠損株において TAG 蓄積量が増加したことから、クエン酸回路への C 代謝フラックスが阻害されることで acetyl-CoA が脂肪酸合成に向かうことが示唆される。第三に光合成で固定した無機 C である。C/N ストレス条件下でも光合成活性が維持される *std1* (Schulz-Raffelt et al., 2016)、*mdh2* (Kong et al., 2018) は光独立栄養かつ N 欠乏条件下において TAG とデンプンを野生株より蓄積したことから、光合成で固定した C の供給が持続したことが TAG とデンプン蓄積量の増加に貢献したと推測される。

TAG の合成および分解酵素、C 源の分配に関与する代謝酵素について、これらの遺伝子発現を制御する転写因子や活性を制御するタンパク質リン酸化酵素などが報告されている。C/N ストレス応答性の転写因子 NRR1 (Boyle et al., 2012)、時計遺伝子の転写因子として報告されていた ROC40 (Goncalves et al., 2016) およびリン酸欠乏のマスター転写因子として知られる PSR1 (Bajhaiya et al., 2015; Ngan et al., 2015) の欠損株は N 欠乏条件下でいずれも TAG 蓄積が野生株よりも低下したことから、C/N ストレスに応

答してこれら転写因子による下流の遺伝子発現の調節が TAG 蓄積制御に必要であることが示された。また、N 欠乏から N 充足条件に回復させた場合に TAG を分解する機構を制御する因子 CHT7 が報告され (Tsai et al., 2014 ; Tsai et al., 2017)、栄養欠乏回復のセンシング機構の存在が示唆されている。タンパク質リン酸化酵素については、筆者らが報告した TAR1 (Kajikawa et al., 2015 ; Shinkawa et al., 2019) や、DYRKP (Schulz-Raffelt et al., 2016) などが TAG とデンプン蓄積量の制御に関わる因子として報告された。

これら C/N ストレス応答性の TAG 蓄積を制御する転写因子やタンパク質リン酸化酵素が、TAG 合成酵素遺伝子や N 同化関連酵素遺伝子の発現量に影響を与えることが報告されているが、直接的に転写制御を受ける遺伝子やリン酸化標的となる因子は同定されていない。C/N ストレス条件における TAG 蓄積の表現型を指標として単離された変異体の解析により、C/N ストレス応答の制御因子が相次いで報告されている一方で、それぞれの制御因子間の相互作用や遺伝的上下関係は不明である。多様な表現型を示す C/N ストレス応答の制御機構を解明するためには、それぞれの制御因子の上流や下流の具体的な分子機構の解明が望まれる。

5. 光独立栄養と光混合栄養条件下での脂質代謝

これまで光混合栄養条件が、クラミドモナスの標準的な培養条件として用いられてきた。このことから、これまでのクラミドモナスの TAG 蓄積制御に関する知見の多くは、光混合栄養かつ N 欠乏条件下の実験結果に基づく。しかし微細藻類をバイオ燃料源として利用する際、コストのかかる有機 C 源を必要としない、光独立栄養条件での培養を想定する必要がある (Sakurai et al., 2014)。クラミドモナスは栄養欠乏かつ光独立栄養もしくは光混合栄養条件のどちらの条件下においても TAG を蓄積することが報告されている (Merchant et al., 2012)。しかし光独立栄養と光混合栄養条件では、脂質代謝のメカニズムが異なると考えられている (Msanne et al., 2006)。脂肪酸合成に関与する酵素の一つである 3-ketoacyl-ACP synthase I (KASI) をコードする遺伝子 *KASI* の発現量は、光混合栄養条件では N 欠乏に伴い発現量が増加するのに対し (Miller et al., 2010)、光独立栄養条件では発現量が減少する (Msanne et al., 2006)。脂肪酸の生合成に関与する酵素遺伝子の発現は、基質の量により制御されており、KASI の基質が酢酸由来であるために、光混合栄養条件下で *KASI* の発現量が増加したと考察されている (Msanne et al., 2006)。このことから、光混合栄養条件だけでなく、光独立栄養条件における脂質代謝メカニズムの解明が必要である。

光独立栄養かつ N 欠乏条件下におけるクラミドモナスの脂質代謝に関しては、通気する空気中に含まれる CO₂ 濃度を上昇させると、全脂質中の TAG の割合が減少する (Sakurai et al., 2014)。一方、光混合栄養かつ N 欠乏条件下において、培地に酢酸を過剰に供給すると、クラミドモナスはより多く TAG を蓄積する (Fan et al., 2012)。これらのことから、C/N バランスを感知する機構とは別に、C 源の違いによる TAG 蓄積の制御機構が存在すると推測される。近年、光混合栄養条件のみで TAG 蓄積を負に制御する因子 VIP1 や (Couso et al., 2016)、逆に光独立栄養かつ N 欠乏条件のみで TAG とデンプン蓄積を負に制御する DYRKP (Schulz-Raffelt et al., 2016) が報告された。光混合栄養と光独立栄養条件とで機能が異なる TAG 蓄積制御因子の解析により、C 栄養の種類に依存的な代謝制御機構が明らかになりつつある。

6. 酢酸依存的な TAG 蓄積制御因子 TAR1

微細藻における TAG 蓄積制御機構の解明を目指して、クラミドモナスの DNA-tag 挿入変異体群を様々な栄養欠乏条件下で培養し、TAG を染色する蛍光試薬 BODIPY の蛍光強度を指標に fluorescence activated cell sorter を用いて、TAG 蓄積に異常を示す変異株が探索された (図 7A)。光混合栄養かつ硫黄欠乏条件下において、変異体集団の BODIPY の蛍光強度が低い領域から細胞を分取し、TAG 蓄積量が低い変異株 *tar1-1* が単離された (図 7B、D)。しかし、*tar1-1* は硫黄欠乏よりも N 欠乏条件下において、より顕著な低 TAG 蓄積の表現型を示したことから (図 7C、D)、光混合栄養かつ N 欠乏条件下における TAR1 の機能解析が行われた。

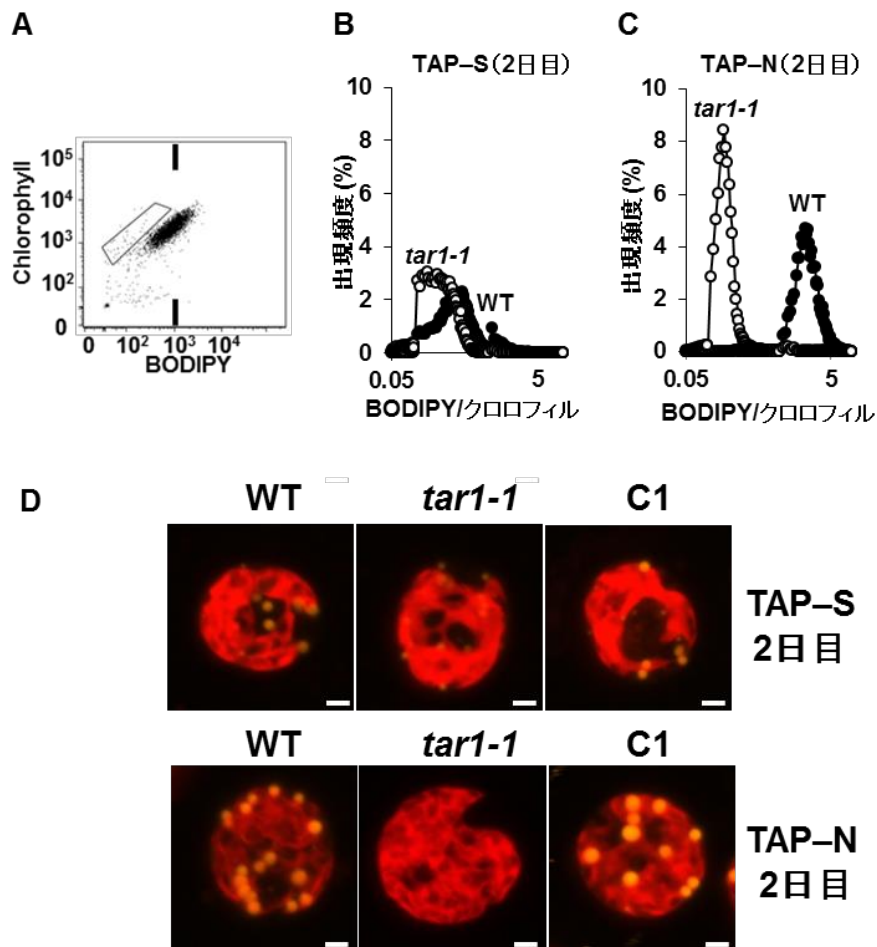


図 7. 低 TAG 蓄積変異株の分取と脂質蓄積。(A) 光混合栄養 (TAP) かつ硫黄欠乏 (-S) 条件下において 2 日間培養したクラミドモナスの DNA-tag 挿入変異体群の細胞を中性脂質の指示薬である蛍光試薬 BODIPY で染色し、fluorescence activated cell sorter で分析したプロット図。縦軸はクロロフィルの自家蛍光。横軸は BODIPY の相対蛍光強度。図中の四角枠の領域から細胞を分取した。野生株 (WT、黒丸) および *tar1-1* (白丸) 細胞を TAP-S (B) もしくは TAP かつ窒素欠乏 (-N) 条件下 (C) において培養した細胞の BODIPY とクロロフィル蛍光。縦軸は全細胞を 100% としたときの出現頻度、横軸は BODIPY/クロロフィル蛍光の相対値。(D) WT、*tar1-1*、相補株 (C1) を TAP-S もしくは TAP-N 条件下において 2 日間培養した細胞を中性脂質の指示薬である Adipored で染色した共焦点レーザー顕微鏡写真。黄色は油滴、赤はクロロフィルの自家蛍光。スケールバーは 1 μm を示す。Kajikawa et al., 2015 を改変した。

細胞を光混合栄養かつ N 欠乏条件に移行時、2 日目において *tar1-1* は野生株よりもクロロフィル量が残存し (図 8A)、高い最大酸素発生速度 (V_{max}) を維持していた (図 8B)。一方、培地中の酢酸は野生株と比較して *tar1-1* において 8 倍残存した。酢酸添加条件下においてクラミドモナスは酢酸を優先的に脂質合成に代謝することが知られており (Juergens et al., 2016)、*tar1-1* は酢酸取り込みもしくは資化に異常があるため、TAG 蓄積量が少ないと推測された。

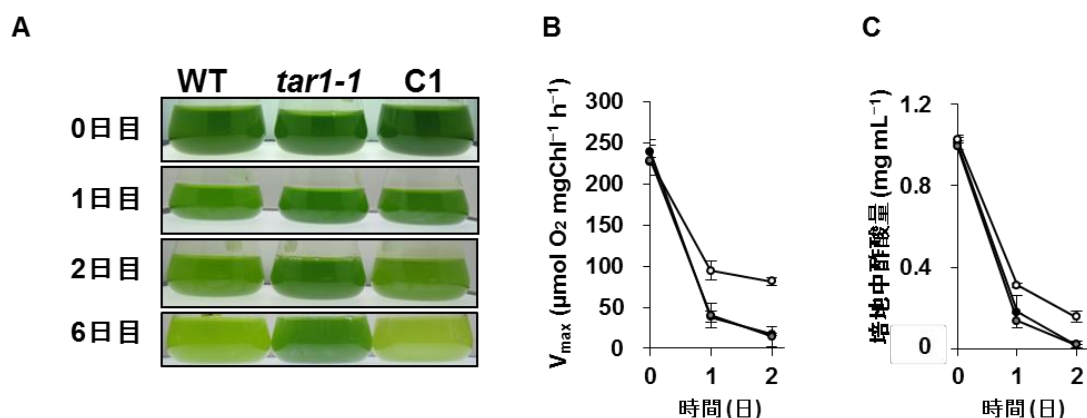


図 8. 野生株、*tar1-1*、相補株 (C1) の光混合栄養かつ窒素欠乏条件へ移行後の培養液の写真 (A)、最大酸素発生速度 ($\mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$; V_{max}) (B)、培地中の酢酸量 (C)。野生株は黒丸、*tar1-1* は白丸、C1 は灰色丸で示す。各データは 3 回反復実験を行い、標準偏差を算出した。Kajikawa et al., 2015 を改変した。

光混合栄養かつ N 欠乏条件下において TAR1 は酢酸同化を正に制御することで TAG 蓄積を正に制御すると同時に、光合成活性を負に制御する因子であると推定された (Kajikawa et al., 2015)。上記で述べた他の TAG 蓄積制御因子の変異株のうち、*std1* や *mdh2* のように光合成活性を維持する変異株では、光合成で固定した C の供給が持続したことにより、TAG およびデンプン蓄積量が野生株より増加した (Schulz-Raffelt et al., 2016 ; Kong et al., 2018)。そこで、本研究で用いた変異株 *tar1-1* も光混合栄養かつ N 欠乏条件下において光合成活性を維持することから、培地中の酢酸の影響を受けない、光独立栄養かつ N 欠乏条件下における TAR1 の機能評価が望まれていた。

7. 目的

本研究では、TAR1 を介した C/N ストレス応答の分子制御機構を解明することを目的とし、C/N ストレス条件下における変異株 *tar1-1* の生理応答の解析、そして光独立と光混合栄養条件下それぞれにおいて TAR1 依存的に変動する遺伝子群の同定と、TAR1 のリン酸化標的因子の同定を行った。

結果

1. 異なる CO₂ 濃度条件下における *tar1-1* の生理応答

通気する空気に含まれる CO₂ 濃度の変化に伴う、C/N バランスの変動による影響を評価するために、0.04、0.1、0.5、1、5、10%濃度の CO₂ を含む空気を通気した光独立栄養かつ N 欠乏条件に移行して 2 日目の野生株 (WT)、*tar1-1* の細胞生存率とクロロフィル量を測定した (図 9A、B)。すべての CO₂ 濃度条件下において、*tar1-1* の細胞生存率とクロロフィル量は、WT よりも有意に残存した (図 9A、B)。C/N 比の変動による C 代謝物の蓄積に対する影響を調べるために、同条件下における TAG 量とデンプン量を測定した (図 9C、D)。0.04%濃度の CO₂ 通気条件下において *tar1-1* は WT よりも TAG を少なく蓄積し、0.1%から 1%濃度の CO₂ 通気条件下においては *tar1-1* と WT との間で TAG 蓄積量に有意な差はなかったが、5%または 10%濃度の CO₂ 通気条件下において、*tar1-1* は WT よりも TAG を多く蓄積した (図 9C)。一方、デンプンについては、0.04%、0.1%そして 10%濃度の CO₂ 通気条件下においては *tar1-1* と WT との間でデンプン蓄積量に有意な差はなかったが、0.5%、1%、5%濃度の CO₂ 通気条件下において、*tar1-1* は野生株よりもデンプンを多く蓄積した (図 9D)。

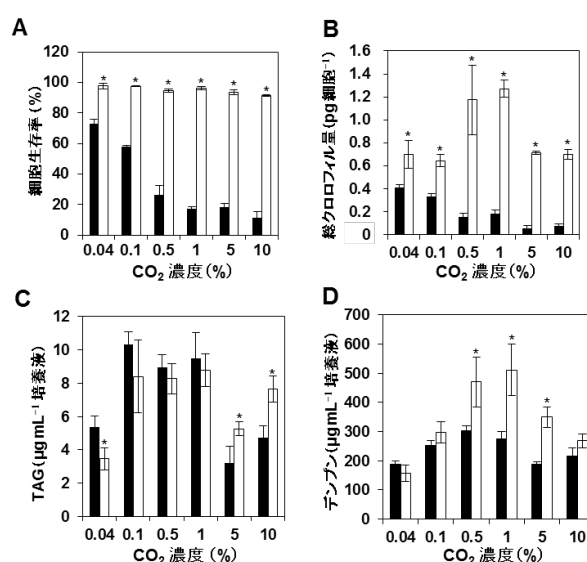


図 9. 光独立かつ窒素欠乏条件下における CO₂ 濃度に依存した、野生株 (黒) と *tar1-1* (白) の細胞生存率 (A)、細胞あたりのクロロフィル量 (B)、トリアシルグリセロール (TAG) 量 (C)、デンプン量 (D) の変化。大気レベルの 0.04%、0.1%、0.5%、1%、5%、10%濃度の CO₂ を含む空気を通気した窒素欠乏条件で 2 日間培養した細胞を分析した。各データは 3 回反復実験を行い、標準偏差を算出した。アスタリスクは野生株と比較して Student's *t* test による検定で *p* 値が 0.05 未満であったことを示す。

2. C/N ストレス条件下における *tar1-1* の生存と活性酸素種の産生

細胞を 5% (v/v) の CO₂ を含む空気を通気した、光独立かつ N 欠乏条件下において培養すると (以下 TP-N 条件と称する)、*tar1-1* は野生株と比較して、高い細胞生存率、高クロロフィル蓄積、高 TAG そして高デンプン蓄積の表現型を示した。そこで、TP-N 条件下における *tar1-1* の経時的な表現型の変化に着目し、まず TP-N 条件下における継時的なクロロフィル量を測定した。TP-N 条件移行前 (0 日目) と比較して、2 日目までに WT と相補株 (C1) では急激にクロロフィル量が低下した。一方、*tar1-1* はクロロフィルの分解が著しく抑制された (図 10A, B)。さらに、WT と C1 では 1 日目において細胞生存率がそれぞれ 45%、34%まで低下し、2 日目においてはそれぞれ 18%、22%まで低下した。一方、*tar1-1* の細胞生存率は 1 日目で 96%、2 日目には 94%と WT よりも高く細胞生存率を維持した (図 10C)。また、TP-N 条件移行後 6 時間後では、全株において H₂O₂ 量が増加したが、TP-N 条件移行後 1 日目において *tar1-1* では H₂O₂ 量が野生株の 27%まで低下した。(図 10D)。

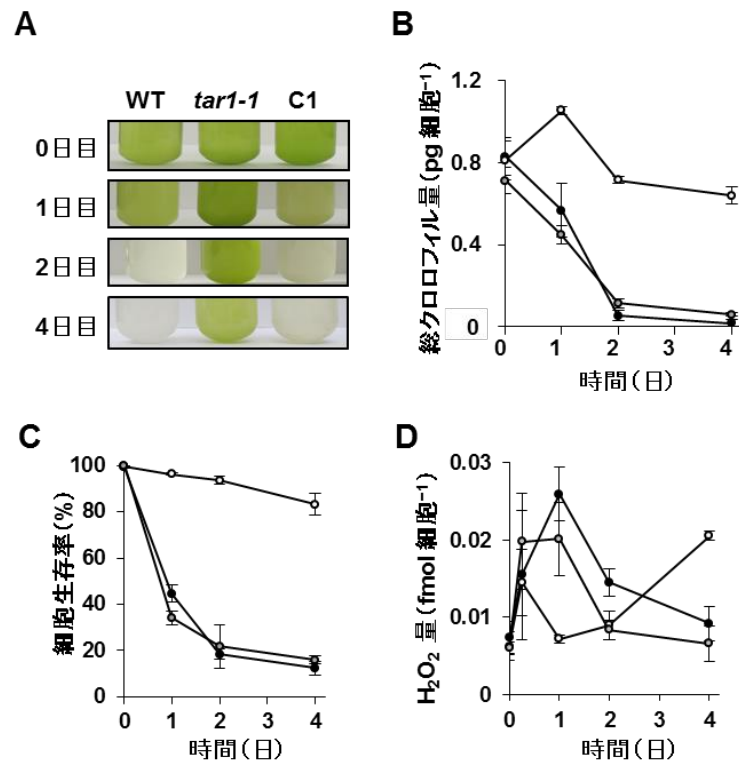


図 10. 炭素 (C) /窒素 (N) ストレスへの *tar1-1* の経時的な応答。(A) 野生株、*tar1-1*、相補株 (C1) の光独立栄養 (5% CO₂ 通気) かつ C/N ストレス条件移行後の培養液の写真。野生株 (黒丸)、*tar1-1* (白丸)、C1 (灰色丸) の継時的なクロロフィル量 (B)、細胞生存率 (C)、H₂O₂ 量 (D)。各データは 3 回反復実験を行い、標準偏差を算出した。

TP-N 条件下において、*tar1-1* は高い細胞生存率を維持したが、生存した *tar1-1* 細胞が増殖可能であるかどうかを検証するため、TP-N 条件へ移行後 2 日後の細胞について、コロニー形成率を調べた。その結果、WT のコロニー形成率は 17% で、*tar1-1* のコロニー形成率は 64% であった (図 11A)。同条件下における細胞生存率は WT が 21%、*tar1-1* は 94% であることに基づき (図 10C)、TP-N 条件へ移行後 2 日目の生存した細胞のうちコロニーを形成した細胞の割合を算出したところ、WT は $92\% \pm 20\%$ 、*tar1-1* は $68\% \pm 8.6\%$ と、どちらも生存している細胞のうち 7 割以上は細胞分裂能を有することが示された (図 11B)。

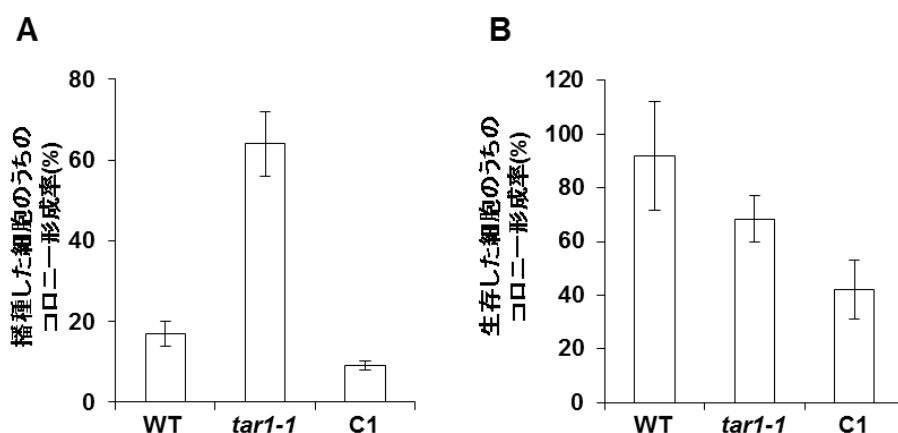


図 11. 独立栄養 (5% CO₂ 通気) かつ窒素欠乏条件へ移行後 2 日目における細胞のコロニー形成率。(A) 培養した野生株 (WT)、*tar1-1*、相補株 (C1) をそれぞれ約 100 細胞程度、寒天培地に播種し、培養 7 日目のコロニー数を計測して算出した。各データは 3 回反復実験を行い、標準偏差を算出した (B)。図 10C の細胞生存率と図 11A のコロニー形成率から培養液中の生存した細胞のうち、コロニーを形成した細胞の割合を算出した。図 10C と図 11A それぞれの標準偏差から、誤差の伝播法則により標準偏差を算出した。

3. C/N ストレス条件下における *tar1-1* の光合成関連タンパクの蓄積量

TP-N 条件下において、*tar1-1* は WT より多く TAG やデンプンを蓄積した (図 9C, D)。TP-N 条件下において炭素代謝物を生合成するための炭素源は光合成で固定された炭素であり、*tar1-1* の光合成活性が WT より高く維持されることが推察された。そこで TP-N 条件下での *tar1-1* の光合成活性を評価した (表 2)。PS-II の最大量子効率 (F_v/F_m)、PS-II の実効量子効率 (Φ_{II}) ならびに V_{max} を測定したところ (表 2)、TP-N 条件へ移行後 1 日目において、*tar1-1* の F_v/F_m および Φ_{II} 値はそれぞれ 0.49 ± 0.02 および 0.31 ± 0.03 で、WT の 0.27 ± 0.03 および 0.16 ± 0.02 より有意に維持された。2 日目の *tar1-1* における F_v/F_m および Φ_{II} 値は、それぞれ 0.27 ± 0.13 および 0.09 ± 0.08 に低下したが、これらの値は WT と C1 において測定限界以下であった。TP-N 条件移行後 2 日目における *tar1-1* の V_{max} 値は $72.4 \pm 12 \mu\text{mol O}_2 \text{ mgChl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ であったが、WT と C1 では同じく 2 日目において検出限界以下であった。TP-N 条件下において *tar1-1* の光合成活性は低下するものの、WT に比べて光合成活性を 2 日目まで維持した。

表 2. 野生株 (WT)、*tar1-1*、相補株 (C1) の光独立栄養 (5% CO₂ 通気) かつ窒素欠乏条件下 (TP-N) 条件における光合成活性

光合成活性	株	TP-N 条件下における培養日数(日)			
		0	1	2	4
PS-II の最大量子収率(F_v/F_m)	WT	0.72 ± 0.01	0.27 ± 0.03	UD	UD
	<i>tar1-1</i>	0.72 ± 0.01	$0.49 \pm 0.02^*$	0.27 ± 0.13	0.04 ± 0.03
	C1	0.70 ± 0.03	0.22 ± 0.03	UD	UD
PS-II の実効量子収率(Φ_{II})	WT	0.65 ± 0.004	0.16 ± 0.02	UD	UD
	<i>tar1-1</i>	0.65 ± 0.003	$0.31 \pm 0.03^*$	0.09 ± 0.08	UD
	C1	0.61 ± 0.005	0.17 ± 0.05	UD	UD
最大酸素発生速度 ($\mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$; V_{max})	WT	294 ± 7	10 ± 2	UD	UD
	<i>tar1-1</i>	$266 \pm 11^*$	$213 \pm 4^*$	$72.4 \pm 12^*$	UD
	C1	281 ± 7	24 ± 2	UD	UD

UD ; 測定限界以下。* ; WT と比較して Student's *t* test による検定で *p* 値が 0.05 未満であったことを示す。各データは 3 回反復実験を行い、標準偏差を算出した。Chl ; chlorophyll。

次にこれら光合成活性の低下が、光合成関連タンパク質の分解に起因するのかを検証するために、以下の光合成関連タンパク質、アンテナ複合体における light-harvesting complex protein II (LHCII)、PS-II の D1 タンパク (PsbA)、cytochrome *b₆/f* 複合体の cytochrome *f* (PetA)、PS-I の sbII (PsaD)、Rubisco のラージサブユニット (RbcL)、カ

ルビン回路のタンパク質 sedoheptulose-1,7-bisphosphate (SBP)、phosphoribulokinase (PRK)、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) そしてクロロフィル合成酵素の chloroplastic glutamyl-tRNA reductase 1 (HemA) のタンパク質の蓄積変化を調べた (図 12)。WT と C1 において、これらのタンパク質は TP-N 条件移行に伴い減少した。一方、*tar1-1* ではどの光合成関連タンパク質も TP-N 条件に移行後 2 日目において、WT と C1 よりも残存していた。これらの結果は、TAR1 が TP-N 条件下で光合成関連タンパク質の分解を促進する可能性を示唆した。また、細胞質局在のタンパク質分解に対する TAR1 の寄与を調べるために、N 欠乏に応答して減少する細胞質リボソームタンパク質 RPL37 (Couso et al., 2018) の蓄積を調べた。TP-N 条件下の WT と同様に、*tar1-1* における RPL37 は TP-N 条件移行に伴い減少した。このことから、TAR1 は細胞質局在のタンパク質ではなく主に光合成関連タンパク質の分解に寄与していることが示唆された (図 12)。

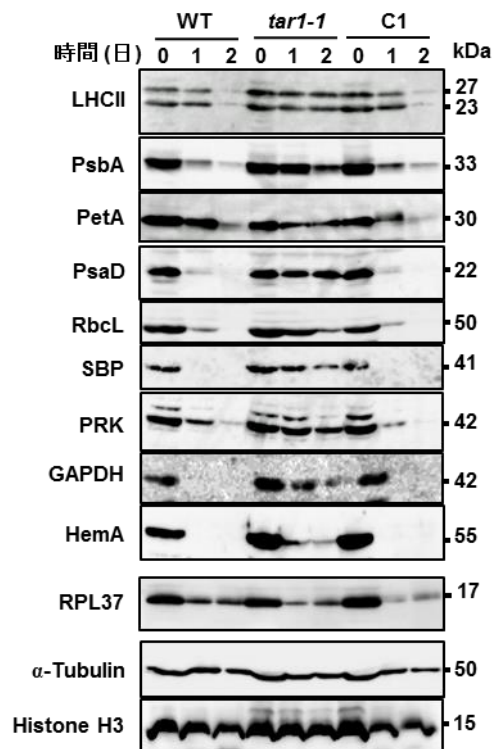


図 12. 野生株 (WT)、*tar1-1*、相補株 (C1) の光独立栄養 (5% CO₂ 通気) かつ窒素欠乏条件 (TP-N) 下における光合成関連タンパク質の免疫ブロッティング解析。抗体の種類は以下の通り。アンテナタンパクにおける light-harvesting complex protein II (LHCII)、PS-II の D1 タンパク (PsbA)、cytochrome *b₆/f* 複合体の cytochrome *f* (PetA)、PSI のサブユニット II (PsaD)、Rubisco のラージサブユニット (RbcL)、sedoheptulose-1,7-bisphosphate (SBP)、phosphoribulokinase (PRK)、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)、chloroplastic glutamyl-tRNA reductase 1 (HemA) そして 細胞質リボソームタンパク質 (RPL37)。 α -チューブリンとヒストン H3 はローディングコントロールとして用いた。

4. C/N ストレス条件下における *tar1-1* の TAG とデンプン蓄積量

TP-N 条件へ移行後 2 日目まで *tar1-1* の光合成活性が WT よりも維持されていたことから (表 2)、同条件下における *tar1-1* の炭素同化産物である TAG とデンプンの蓄積量は WT よりも高いことが推測された。そこで、TP-N 条件における継時的な TAG とデンプンの蓄積量の変化を調べた (図 13A, B)。WT、*tar1-1*、C1 全株における TAG 量は TP-N 条件移行後 1 日目で約 $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ に増加したが (図 13A)、*tar1-1* の TAG 量は TP-N 条件へ移行後 2 日目には $5.3 \pm 0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ とさらに増加したのに対して、WT は $3.2 \pm 1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ にとどまり、*tar1-1* は WT より 1.7 倍の TAG を蓄積した (図 13A)。同様にデンプン蓄積量についても、WT、*tar1-1*、C1 全株において、TP-N 条件へ移行後 1 日目で約 $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ 程度であったが、*tar1-1* のデンプン量は TP-N 条件へ移行後 2 日目には $353 \pm 28.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ と増加し、WT は $219 \pm 34.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ と 1 日目と同程度に留まった (図 13B)。膜脂質の絶対量についても、*tar1-1* は WT よりも葉緑体膜脂質である sulfoquinovosyl diacylglycerol (SQDG) と digalactosyldiacylglycerol (DGDG)、そして細胞膜脂質である phosphatidylinositol (PI)、diacylglycerol-*N,N,N*-trimethylhomoserine (DGTS)、phosphatidylethanolamine (PE) を多く蓄積した (図 13C)。

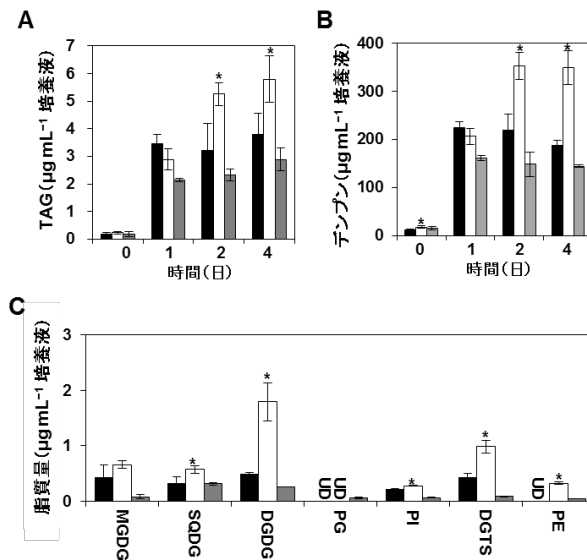


図 13. 光独立栄養 (5% CO₂ 通気) かつ窒素欠乏 (TP-N) 条件下における野生株 (黒)、*tar1-1* (白)、C1 (灰色) の代謝物解析。triacylglycerol (TAG) 量 (A)、デンプン量 (B)、TP-N 条件へ移行後 2 日目の膜脂質量 (C)。各データは 3 回反復の実験を行い、標準偏差を算出した。アスタリスクは野生株と比較して Student's *t* test による検定で *p* 値が 0.05 未満であったことを示す。DGDG ; digalactosyldiacylglycerol、DGTS ; diacylglycerol-*N,N,N*-trimethylhomoserine、MGDG ; monogalactosyldiacylglycerol、PE ; phosphatidylethanolamine、PG ; phosphatidylglycerol、PI ; phosphatidylinositol、SQDG ; sulfoquinovosyldiacylglycerol、UD ; 検出不可。

TAG 中の脂肪酸組成により、脂肪酸が新規合成由来か膜脂質由来なのかを推定できるので、TP-N 条件移行後 2 日目における WT と *tar1-1* の TAG 脂肪酸組成を比較した (図 14)。*tar1-1* の TAG 中における 16:1 Δ^9 、16:2 $\Delta^{7,10}$ 、16:3 $\Delta^{4,7,10}$ 、18:1 Δ^9 、18:1 Δ^{11} 、18:2 $\Delta^{9,12}$ の相対存在比が WT における存在量よりも有意に増加した。一方、*tar1-1* の TAG 中における 16:0、16:3 $\Delta^{7,10,13}$ 、18:0、18:3 $\Delta^{5,9,12}$ 、18:3 $\Delta^{9,12,15}$ の相対存在比は有意に低下した。変異株 *tar1-1* における 18:1 Δ^9 (Riekhof et al., 2005 ; Li et al., 2012) の TAG 中における相対存在比は、WT より 1.3 倍増加し、細胞膜膜脂質由来とされる 18:3 $\Delta^{5,9,12}$ や葉緑体膜脂質由来とされる 18:3 $\Delta^{9,12,15}$ (Sakurai et al., 2014) の TAG 中における相対存在比は、WT よりそれぞれ 0.8 倍、0.7 倍に低下したので、*tar1-1* において増加した TAG 中の脂肪酸は主に新規合成されたものである可能性が示唆された。

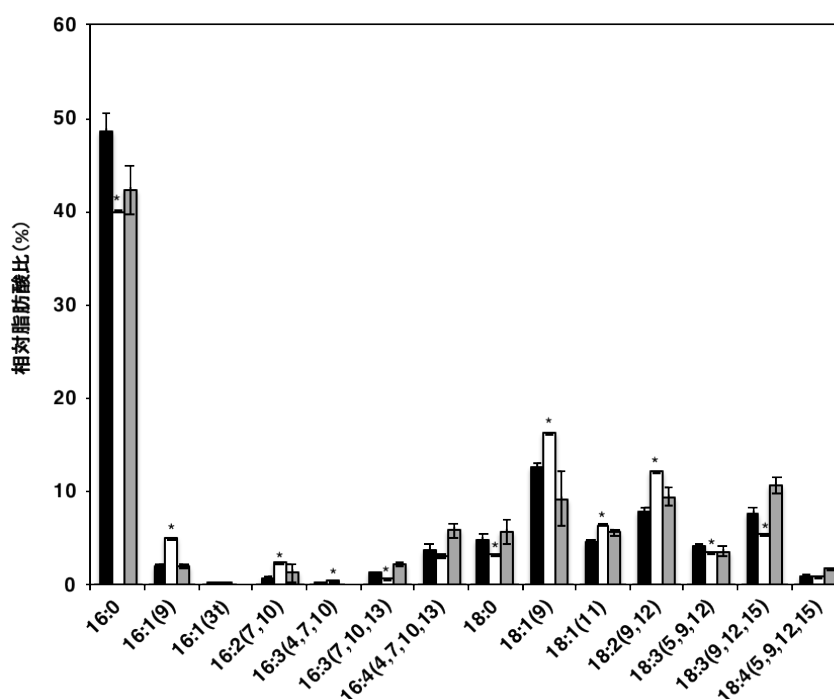


図 14. 光独立栄養 (5% CO₂ 通気) かつ窒素欠乏条件へ移行後 2 日目における野生株 (黒)、*tar1-1* (白)、C1 (灰色) の triacylglycerol (TAG) 中の脂肪酸組成。TAG 中の総脂肪酸量を 100 として各脂肪酸の存在比を算出した。各データは 3 回反復の実験を行い、標準偏差を算出した。アスタリスクは野生株と比較して Student's *t* test による検定で *p* 値が 0.05 未満であったことを示す。

さらにレーザー走査型共焦点顕微鏡および透過型電子顕微鏡観察により、TP-N 条件移行後 2 日目において油滴およびデンプン顆粒が *tar1-1* では WT より発達していることが示された (図 15 上段、中段)。また、透過型電子顕微鏡による葉緑体内部構造の写真から、TP-N 条件 2 日目において WT がチラコイドのスタック構造を失うのに対して、*tar1-1* の場合はスタック構造を維持していた (図 15 下段)。

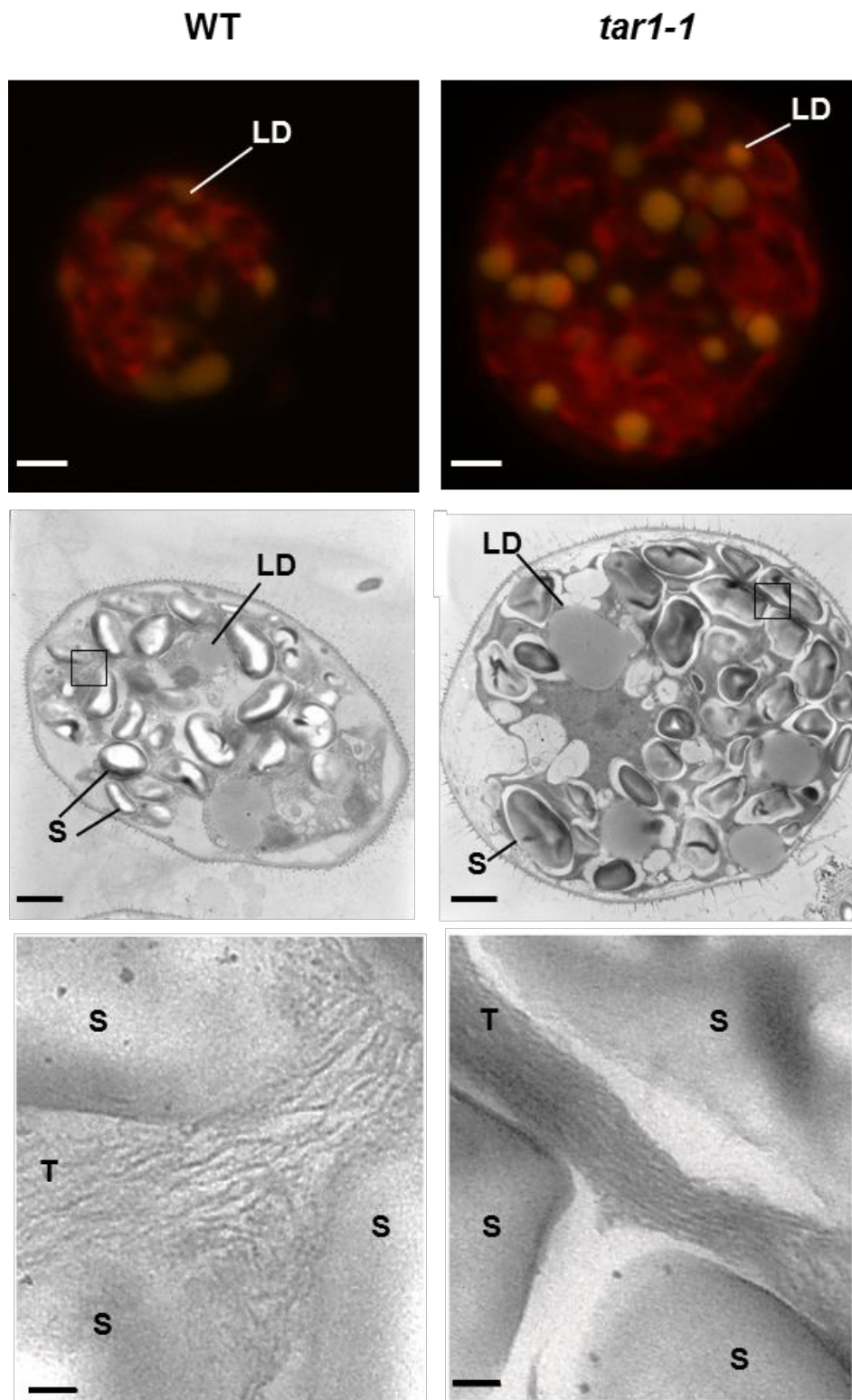


図 15. 光独立栄養 (5% CO₂ 通気) かつ窒素欠乏条件へ移行後 2 日目における野生株 (WT)、*tar1-1* の共焦点レーザー顕微鏡写真 (上段)、透過型電子顕微鏡写真 (中段) とその拡大写真 (下段、中段の黒四角枠領域)。油滴 (LD) は AdipoRed で可視化した。S; デンプン顆粒、T; チラコイド膜。スケールバーは上段と中段は 1 μm、下段は 0.1 μm を示す。

TP-N 条件下において *tar1-1* は野生株と比較して光合成活性を維持し、TAG とデンプンを高蓄積したことから、*tar1-1* のバイオマス総量が増加することが推察されたので、*tar1-1* の細胞あたりの乾燥重量を測定した (図 16A)。*tar1-1* の細胞あたりの乾燥重量は、TP-N 条件に移行前 (0 日目) においては WT と *tar1-1* との間で差は認められなかったが、移行後 2 日目において *tar1-1* の一細胞あたりの乾燥重量は $0.27 \text{ ng} \pm 0.029$ と、WT の $0.15 \text{ ng} \pm 0.005$ より 1.8 倍増加した (図 16A)。細胞サイズについては、TP-N 条件に移行前 (0 日目)、移行後 1 日目においては WT と *tar1-1* との間で差は見られなかったが、2 日目において *tar1-1* の細胞サイズは $7.4 \mu\text{m}$ と、WT の $5.5 \mu\text{m}$ より肥大した (図 16B)。

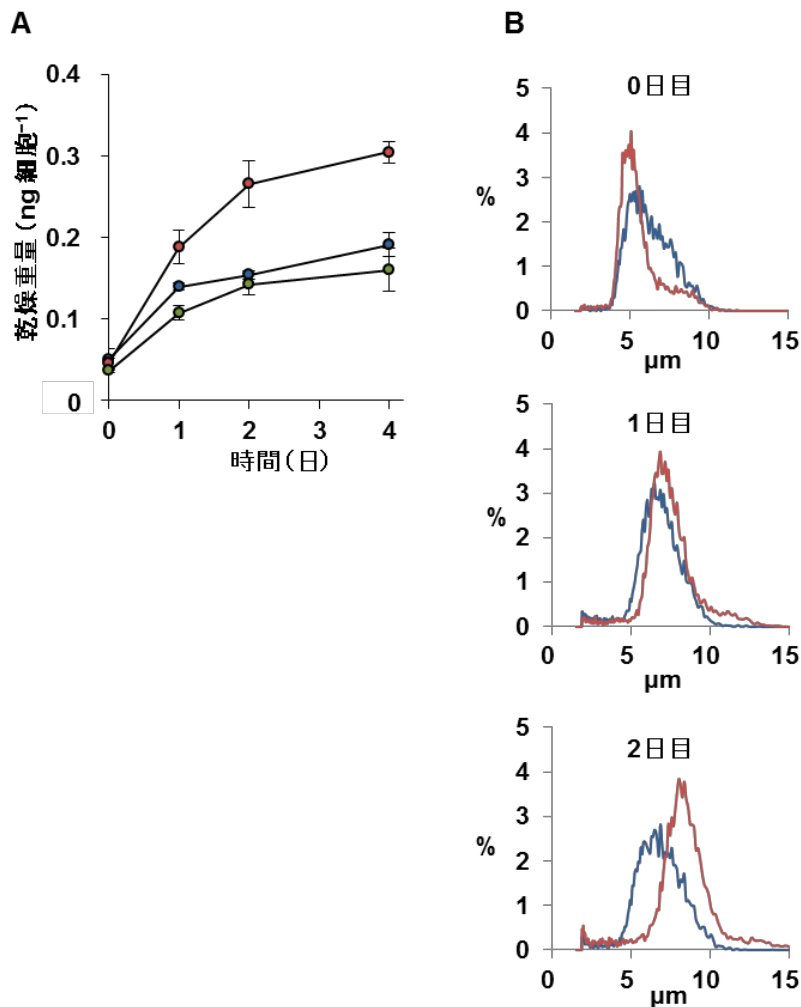


図 16. 光独立栄養 (5% CO₂ 通気) かつ窒素欠乏条件における野生株 (青丸、青線)、*tar1-1* (赤丸、赤線)、相補株 (緑丸) の細胞あたりの乾燥重量 (A)、細胞サイズ (B)。データは 3 回反復して実験を行い、標準偏差を算出した。

5. C/N ストレス条件下における *tar1-1* の接合率と配偶子関連

遺伝子の発現

これまで述べてきたように、*TAR1* 遺伝子の変異は TP-N 条件下における細胞生存性や光合成活性の維持など、クラミドモナスの生存にとって一見有利に思われる。*TAR1* の意義について知見を得るために、C/N ストレスにより引き起こされる緑藻の配偶子誘導について検討した。まず接合率を調べたところ、WT (C9、*mt*⁻) と WT (CC-125、*mt*⁺)、C1 (*mt*⁻) と WT (CC-125、*mt*⁺) という野生株間あるいは野生株と相補株間での接合率はそれぞれ 53%と 42%だったのに対して、*tar1* 株と野生株間あるいは接合型の異なる *tar1* 株間での接合率は、*tar1-1* (*mt*⁻) と WT (CC-125、*mt*⁺)、*tar1-1-F2-11* (*mt*⁺) と WT (C9、*mt*⁻)、そして *tar1-1* (*mt*⁻) と *tar1-1-F2-11* (*mt*⁺) においてそれぞれ 5.8%、21%、1.3%となり、野生株間あるいは野生株と相補株間での接合率より大幅に低下した (図 17A)。

接合型 *mt*⁻ 型において配偶子誘導を制御する転写因子をコードする *MID* の遺伝子発現量は、N 欠乏へ移行後 30 分と 6 時間目でそれぞれ発現量が増加する (Lin and Goodenough, 2007)。本研究では、WT において配偶子誘導条件へ移行後 45 分と 2 時間目において *MID* の発現量が増加したのに対して、*tar1-1* においては 45 分、2 時間目共に WT と比較して *MID* の発現量は低下した (図 17B)。*MID* の下流で発現制御を受ける配偶子誘導関連因子の *MTD* と *GSM* の転写産物量も配偶子誘導条件へ移行後 2 時間目において *tar1-1* では WT よりもそれぞれ 15%、16%までに低下した。一方、*mt*⁺ 型の配偶子誘導関連因子である *FUS* と *SAG* の転写産物量も、それぞれ WT と比較して *tar1-1-F2-11* (*mt*⁺) では 21%および 9.5%に減少した (図 17C)。以上のことから、*TAR1* は両接合型において配偶子誘導関連因子の転写を介して配偶子誘導を正に制御する因子である可能性が示唆された。

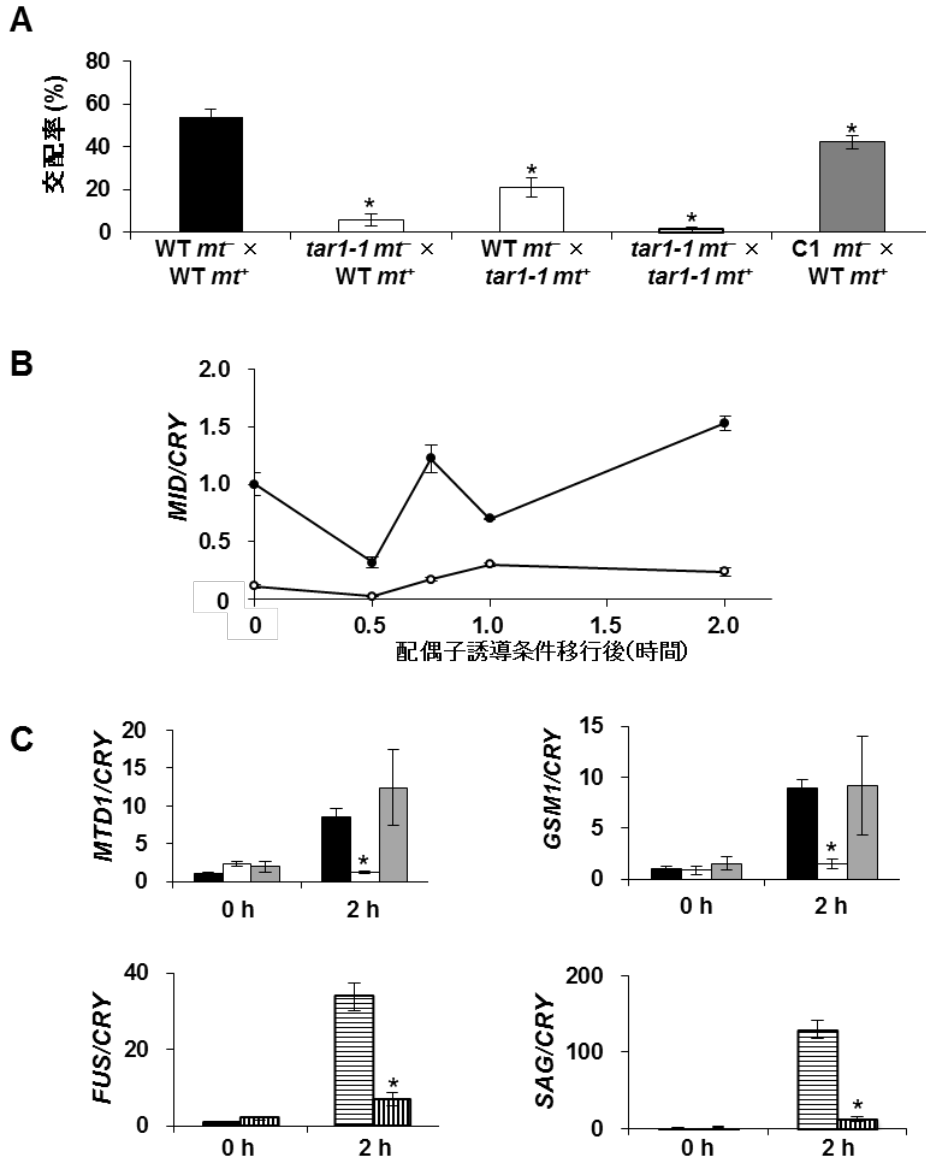


図 17. TAR1 による配偶子誘導への影響。(A) 野生株 (WT、黒四角)、*tar1-1* (白四角)、相補株 (C1、灰色四角) の配偶子を掛け合わせた接合率。(B) WT (黒丸) と *tar1-1* (白丸) における MID の経時的な相対的発現量の変化 (C) 配偶子関連遺伝子の相対的発現量。用いた株はそれぞれ WT (C9、*mt*⁻、黒四角)、*tar1-1* (*mt*⁻、白四角)、C1 (*mt*⁻、灰色四角)、WT (CC-125、*mt*⁺、横線四角)、*tar1-1*-F2-11 (*mt*⁺、縦線四角)。これらの細胞を、窒素分を除いた high-salt-medium で培養して RNA を抽出した。各データは 3 回反復実験を行い、標準偏差を算出した。アスタリスクは WT と比較して Student's *t* test による検定で *p* 値が 0.05 未満であったことを示す。

6. 光独立もしくは光混合栄養かつN欠乏条件下において

TAR1 依存的に発現が変動する遺伝子

細胞が TAR1 を欠損すると、C/N ストレスに伴い細胞生存、光合成、代謝、配偶子誘導など、多様な影響が認められる。これらの影響について *tar1* 変異により発現動態に影響を受ける遺伝子群を同定するために、TP-N 条件へ移行前 (TP+N) および移行後 6 時間目における WT、*tar1-1* および C1 での RNA-seq 解析を行った。それぞれの株において、TP+N 条件と TP-N 条件での遺伝子発現量を比較し、DEseq アルゴリズムに基づき有意水準を q 値 0.05 未満として TP-N 条件移行に伴う発現変動遺伝子 (DEG) を抽出した (Anders and Huber, 2010)。TP-N 条件下の WT、C1 そして *tar1-1* の DEG の中で、TP-N 条件への移行に伴い発現量が有意に増加、または減少する DEG を分類して、ベン図として示した (図 18)。このうち、TP-N 条件への移行に伴い発現量が増加した DEG の数は、WT は 244 個、C1 は 433 個で、このうち 218 個の DEG が WT と C1 との間で一致した。一方、TP-N 条件への移行に伴い発現量が減少した DEG の数は、WT は 632 個、C1 は 1,063 個で、このうち 627 個の DEG が WT と C1 との間で一致した。C1 において、TP-N 条件への移行に伴い発現量が増加もしくは減少した DEGs の中で、WT と一致する DEG は半分程度であった。この理由として、C1 を作出する際、*tar1-1* に *TAR1* 配列を含むプラスミド DNA 断片をエレクトロポレーションにより導入したため、他のゲノム配列領域へ生じた挿入変異によって引き起こされた可能性が推測された。そこで、*tar1* 変異による DEG を抽出するためのコントロールとして、WT と C1 との間で発現パターンが重複した DEG を、*tar1-1* の DEG と比較するコントロールとして用いた。

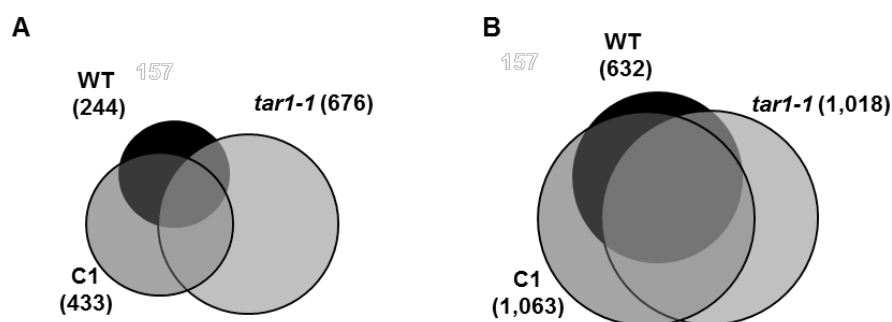


図 18. 光独立栄養 (5% CO₂ 通気) かつ窒素欠乏条件へ移行後前 (0 時間) と移行後 6 時間目との間で有意に発現変動した遺伝子 (DEGs) 数。野生株 (WT、黒円)、*tar1-1* (白円)、相補株 (C1、灰色円) でそれぞれ有意に発現変動した (q 値 < 0.05) DEG を示す。(A) 窒素欠乏により増加した DEGs。(B) 窒素欠乏により減少した DEGs。括弧内の数字は DEG 数を示す。

また、TP-N 条件下において *tar1-1* は WT よりも TAG を高蓄積するのに対して、光混合栄養かつ N 欠乏 (TAP-N) 条件下において、*tar1-1* の TAG 蓄積量は野生型よりも低下することから (Kajikawa et al., 2015)、TP-N 条件と TAP-N 条件の間で *tar1* 変異により発現動態に影響を受ける遺伝子群が異なることが予想される。そのため、TP-N 条件と TAP-N 条件の間で TAR1 依存的に発現パターンが異なる遺伝子群を抽出するため、TP-N 条件と TAP-N 条件 (Kajikawa et al., 2015) の RNA-seq データを比較解析した。

TP-N 条件下における DEG の中で、218 個の DEG が WT と C1 の両方で N 欠乏に伴い発現量が増加した (図 19A の左ベン図)。TP-N 条件下において WT と C1 のほうが *tar1-1* よりも発現量が多い DEG は 351 個あった (図 19A の左ベン図)。これらのうち、重複する 80 個の DEG が、TP-N 条件において TAR1 依存的に発現量増加される DEG とした。TAP-N 条件での RNA-seq データも同様に処理した (図 19A の右ベン図)。その結果、60 個の DEG が TAP-N 条件において TAR1 依存的に発現量増加される DEG であった。TP-N 条件と TAP-N 条件との間で重複している 29 個の DEG は「N 欠乏条件で発現量が TAR1 依存的に増加する DEG」として定義した (図 19A のベン図の中央のグループ (a))。TP-N 条件または TAP-N 条件で特異的に発現変動する TAR1 依存的な DEG は、51 個および 31 個で、「TP-N 条件または TAP-N 条件特異的に発現量が TAR1 依存的に増加する DEG」として定義した。(図 19A のベン図の中央のグループ (b) および (c))。

それぞれの発現パターンごとに分類した DEG に対して、Gene Ontology (GO) 濃縮解析を行い、「N 欠乏条件で発現量が TAR1 依存的に増加する DEG」については GO term の Cellular amino acid metabolic process が有意に濃縮された (図 20A (a))。このグループの中には argininosuccinate lyase、carbamoyl phosphate synthase small subunit、argininosuccinate synthase、ornithine carbamoyltransferase などの尿素回路やアミノ酸合成に関連した酵素遺伝子が含まれていた。さらに GO term の Transmembrane transporter activity が有意に濃縮され、xanthine/uracil/vitamin C permease-like (UAPA6) と cationic amino acid transporter のプリン塩基とアミノ酸の輸送体をコードする遺伝子が含まれていた。

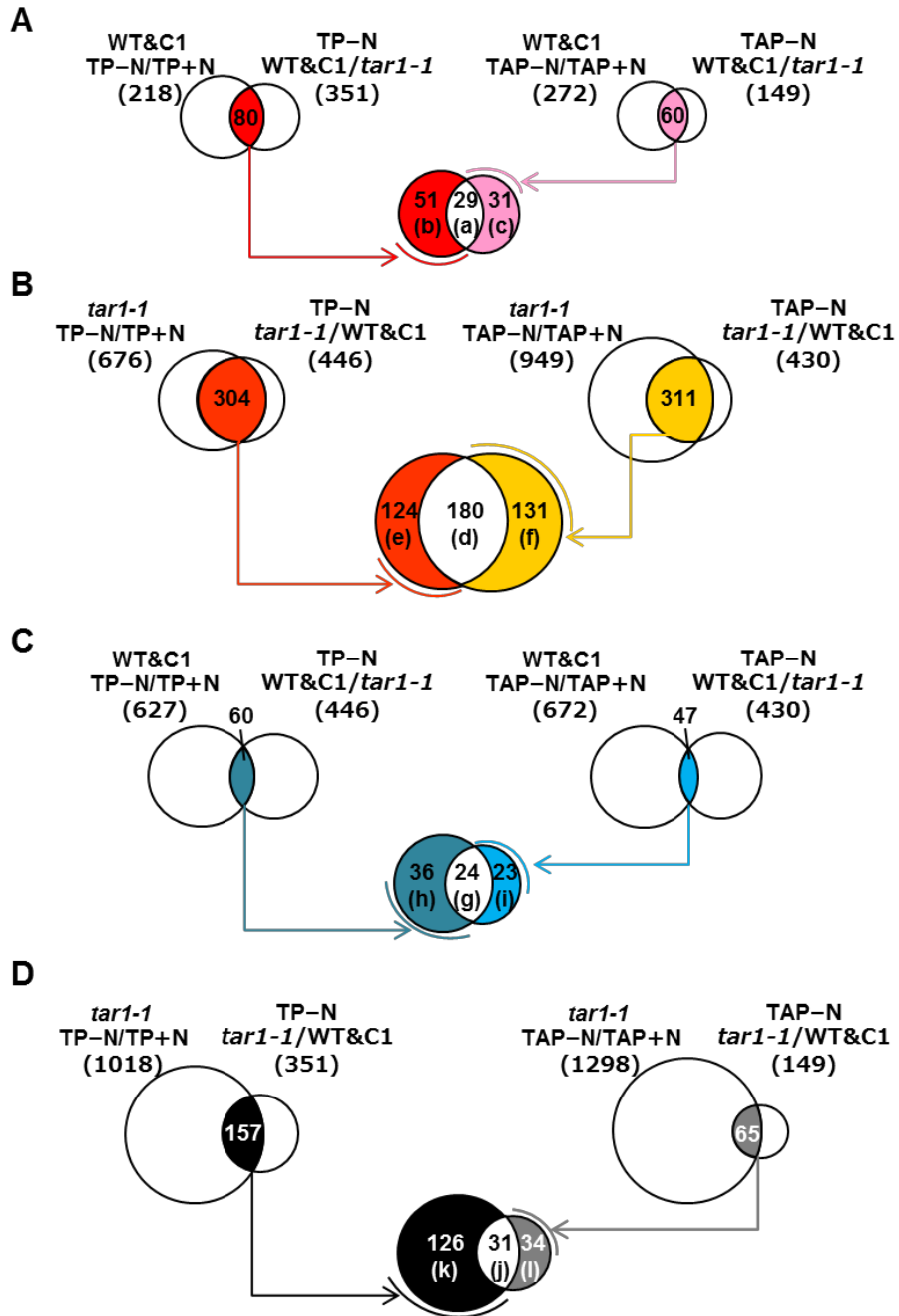


図 19. 光独立栄養 (5% CO₂ 通気、TP) もしくは光混合栄養 (TAP) かつ窒素欠乏条件移行前 (+N) と移行後 6 時間目 (-N) を比較した、野生株 (WT)、*tar1-1*、相補株 (C1) において有意に発現変動した遺伝子 (DEG) 数。(A) -N に伴い発現量が *TAR1* 依存的に増加する DEG。TP-N と TAP-N の両条件 (a)、TP-N 条件 (b) または TAP-N (c) 条件特異的に発現量が *TAR1* 依存的に増加する DEG。(B) -N に伴い発現量が *tar1* 変異依存的に増加する DEG。TP-N と TAP-N の両条件 (d)、TP-N 条件 (e) または TAP-N 条件 (f) 特異的に発現量が *tar1* 変異依存的に増加する DEG。(C) -N に伴い発現量が *TAR1* 依存的に減少する DEG。TP-N と TAP-N の両条件 (g)、TP-N 条件 (h) または TAP-N 条件 (i) 特異的に発現量が *TAR1* 依存的に減少する DEG。(D) -N に伴い発現量が *tar1* 変異依存的に減少する DEG。TP-N と TAP-N の両条件 (j)、TP-N 条件 (k) または TAP-N 条件 (l) 特異的に発現量が *tar1* 変異依存的に減少する DEG。括弧内の数字は DEG 数を示す。

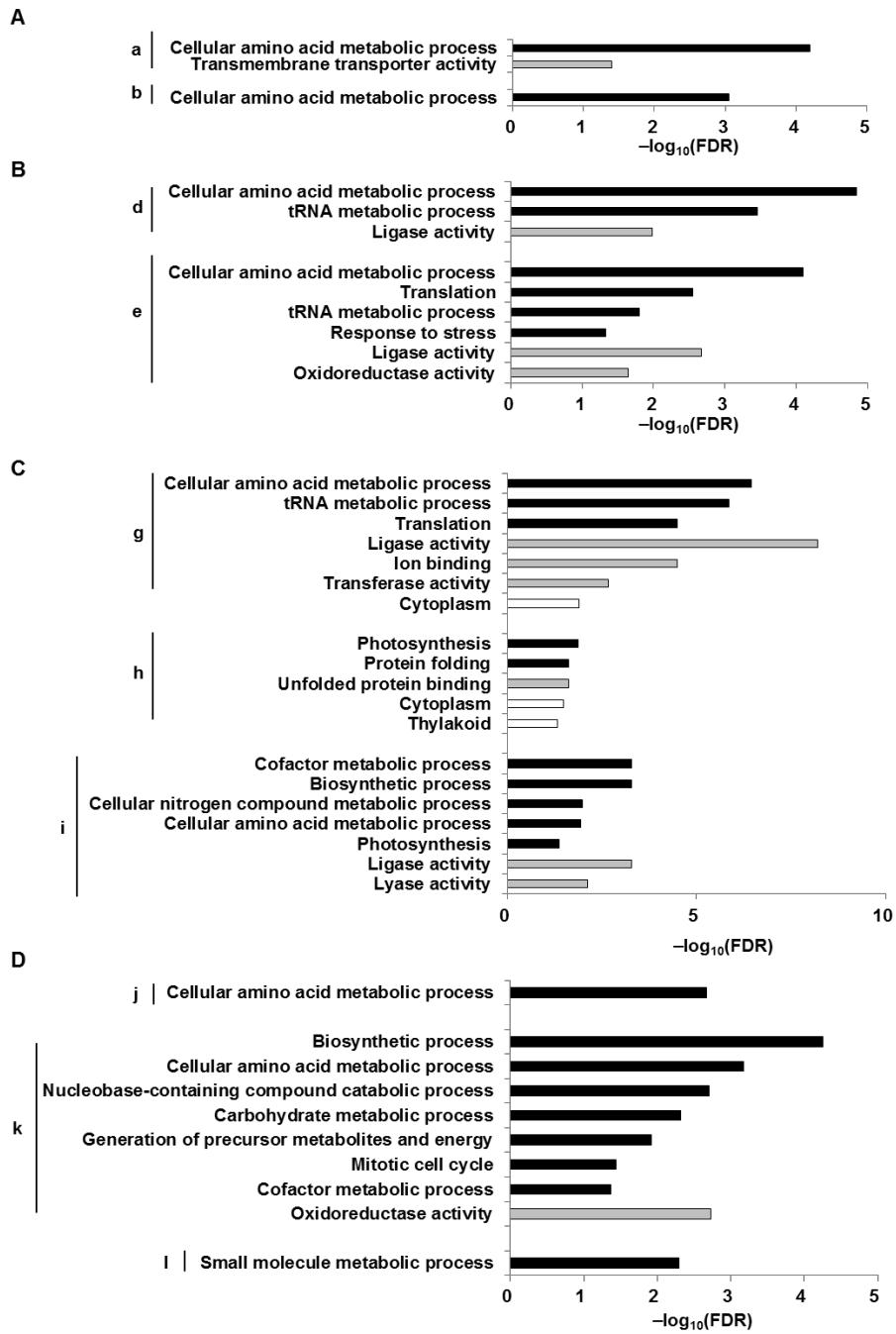


図 20. 有意に発現変動した遺伝子 (DEG) に対する Gene Ontology (GO) 濃縮解析。棒グラフの色は GO term の機能分類である biological process (黒)、molecular functions (灰)、cellular component (白) を示す。縦軸は有意に濃縮された (false discovery rate, FDR < 0.05) GO term、横軸は $-\log_{10}(\text{FDR})$ を示す。(A) 窒素欠乏 (-N) 条件で発現量が *TAR1* 依存的に増加する DEG に対する GO 濃縮解析で濃縮された GO term (a-c は図 19A を参照)。(B) -N 条件で発現量が *tar1* 変異依存的に増加する DEG に対する GO 濃縮解析で濃縮された GO term (d-f は図 19B を参照)。(C) -N 条件で発現量が *TAR1* 依存的に減少する DEG に対する GO 濃縮解析で濃縮された GO term (g-i は図 19C を参照)。(D) -N 条件で発現量が *tar1* 変異依存的に減少する DEG に対する GO 濃縮解析で濃縮された GO term (j-l は図 19D を参照)。

以下同様に遺伝子発現パターンごとに DEGs を分類し、図 17B で示した TP-N 条件と TAP-N 条件との間で重複した 180 個の DEG を「N 欠乏条件で発現量が *tar1* 変異依存的に増加する DEG」と定義した (図 19B のベン図の中央のグループ (d))。124 個および 131 個の DEG は、それぞれ「TP-N 条件または TAP-N 条件特異的に発現量が *tar1* 変異依存的に増加する DEG」と定義した (図 19B のベン図の中央のグループ (e) および (f))。「N 欠乏条件で発現量が *tar1* 変異依存的に増加する DEG」において、GO 濃縮解析により GO term の tRNA metabolic process が有意に濃縮され、アミノ酸 tRNA ligase である methionine-tRNA ligase、alanine-tRNA ligase、leucine-tRNA ligase、bifunctional glutamate/proline-tRNA ligase、valine-tRNA ligase、isoleucyl-tRNA ligase などの 6 遺伝子が含まれていた (図 20B (d))。

さらに、図 17 (e) の「TP-N 条件特異的に発現量が *tar1* 変異依存的に増加する DEG」では GO term の Oxidoreductase activity が有意に濃縮され (図 20B (e))、ROS の除去に関連する alternative oxidase (*PTO1*) と glutathione peroxidase (*GPX5*)、ROS から DNA を防御する機構に関わる thioredoxin h2 (*TRXh2*)、そして酸化還元反応に関連した Assimilatory sulfite reductas/Sulfite reductas、gamma-butyrobetaine hydroxylase-related、peptide-methionine (R)-S-oxide reductase をコードする遺伝子が含まれていた。

図 19C で示した TP-N 条件と TAP-N 条件との間で重複した 24 個の DEG を、「N 欠乏条件で発現量が TAR1 依存的に減少する DEG」と定義した。これら 24 個の DEG において、GO 濃縮解析により GO term の tRNA metabolic process が有意に濃縮された (図 20C (g))。これらの DEG の中には serine-tRNA ligase、aspartate-tRNA ligase、valine-tRNA ligase、bifunctional glutamate/proline-tRNA ligase、tryptophan-tRNA ligase が含まれていた。

以上の RNA-seq 解析の結果をから、TAR1 は N 欠乏に応答して、尿素回路に関連した酵素遺伝子および窒素栄養源の輸送体やアミノ酸代謝経路などの N 同化に関する遺伝子の mRNA 量レベルを増加させる一方、アミノ酸 tRNA リガーゼ遺伝子の mRNA 量を減少させることが推定された。さらに TP-N 条件特異的に、*tar1* 変異により ROS の除去もしくは防御に関する酵素遺伝子の発現量が増加した。

7. キナーゼドメインを含む TAR1 部分タンパク質によるタンパク質リン酸化

タンパク質リン酸化酵素である TAR1 のリン酸化標的候補因子を同定するために、大腸菌において完全長 TAR1 組換えタンパク質の発現を試みたが、十分なタンパク質量を得ることができなかった。そこで、キナーゼドメイン (Val-495 から Ile-830) を含む部分的 TAR1 組換えタンパク質 (pTAR1 ; Thr-421 から Leu-859) ならびにリン酸アンカー部位と推測される 523 番目のリシンをアルギニンに置換してリン酸化活性を失活させた (キナーゼデッド) 部分的 TAR1 組換えタンパク質 (pTAR1^{KD}, Kajikawa et al., 2015) を得た。これら二種類の pTAR1 ならびに pTAR1^{KD} と、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ を用いて *in vitro* タンパク質リン酸化反応を行った (図 21)。基質は、TP-N および TP+N 条件下で培養したクラミドモナス細胞から抽出し、脱リン酸化処理を施した全タンパク質、あるいはポジティブコントロールとして人工基質である myelin basic protein を使用した。pTAR1 はどの基質に対してもリン酸化活性を示した (図 21、レーン 1、4、7)。一方、pTAR1^{KD} はどの基質に対してもリン酸化活性を全く示さなかった (図 21、レーン 2、5、8)。

同様の実験を、ラジオアイソトープラベルしていない ATP を用いて行い、TiO₂-based hydroxyl acid-modified metal oxide chromatography (Ti-HAMMOC) 法によりリン酸化修飾を受けたタンパク質由来のペプチドを濃縮し、定量的 liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) によって定量分析した。pTAR1 と反応させたペプチドを重イオンタグでラベルし (H)、pTAR1^{KD} と反応させたペプチドを軽イオンタグでラベルした (L)。TP-N 条件で培養したクラミドモナス細胞抽出ペプチドとの反応物では、H/L 比が 2 倍以上のリン酸化ペプチド数は 538 個であった (LC-MS/MS の測定結果は jPOST に登録した。PXID ; PXD012391)。一方、TP+N 条件で培養したクラミドモナス細胞抽出ペプチドとの反応物では、H/L 比が 2 倍以上のリン酸化ペプチド数は 520 個であった (PXID ; PXD012391)。以上の結果をまとめると、pTAR1 による *in vitro* アッセイでリン酸化された重複を含まないリン酸化ペプチドの総計は 785 個で、これらリン酸化ペプチドを *in vitro* での TAR1 のリン酸化標的候補因子とみなした。ただし、今回リン酸化反応に用いた pTAR1 は完全長 TAR1 ではないため、本来の TAR1 のリン酸化標的ではない因子がリン酸化されてしまう可能性は否定できない。そこで後述する *in vivo* でのリン酸化プロテオーム解析の結果と比較解析することで、より精度の高い TAR1 のリン酸化標的候補因子の探索を試みた。

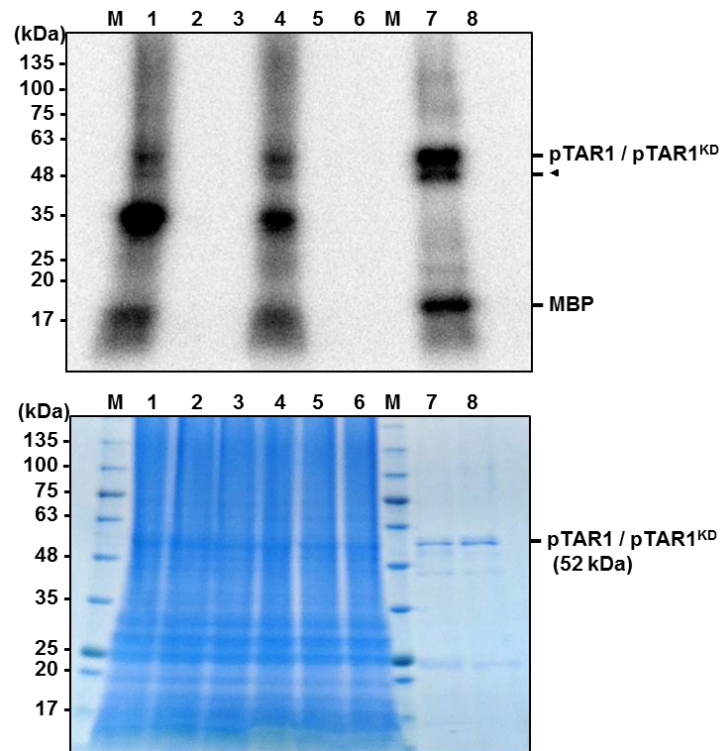


図 21. 部分 TAR1 タンパク質 (pTAR1) を用いた *in vitro* リン酸化アッセイ。レーン 1 ; pTAR1、光独立栄養 (5% CO₂ 通気) かつ窒素充足条件で培養した野生型細胞から抽出、脱リン酸化させた総タンパク質 (TP+N)。レーン 2 ; リン酸アンカー部位と推測され 523 番目のリシンをアルギニンに置換してリン酸化活性を失活させた (キナーゼデッド) 部分的 TAR1 組換えタンパク質 (pTAR1^{KD})、TP+N。レーン 3 ; 水、TP+N。レーン 4 ; pTAR1、TP かつ N 欠乏条件で培養した野生型細胞から抽出、脱リン酸化させた総タンパク質 (TP-N)。レーン 5 ; pTAR1^{KD}、TP-N。レーン 6 ; 水、TP-N。レーン 7 ; pTAR1、人工基質である myelin basic protein (MBP)。レーン 8 ; pTAR1^{KD}、MBP。M ; タンパク質のサイズマーカー。上図はリン酸化タンパク質のオートラジオグラム。下図はクマーシーブルー染色。矢印 (◄) は切断されたと推定される pTAR1 を示す。

8. C/N ストレス条件下における *tar1-1* のタンパク質リン酸化 プロテオーム

C/N ストレス条件下における TAR1 のリン酸化標的候補因子の探索と、TAR1 依存的にリン酸化を受けるタンパク質の動態を明らかにするために、TP+N および TP-N 条件に移行後 6 時間目の WT、*tar1-1* および C1 細胞由来のリン酸化ペプチドを Ti-HAMMOC 法により濃縮し、LC-MS/MS での定量分析により TAR1 依存的にリン酸化を受けるタンパク質を推定した。総計で 5,251 個のリン酸化ペプチドが同定され、TP+N 条件と比較して、TP-N 条件において、WT の 947 個、*tar1-1* の 307 個、および C1 の 550 個のリン酸化ペプチドのイオン強度が有意に増加した (p 値 <0.05 ; 図 22A)。一方、TP+N 条件と比較して、TP-N 条件において、有意にイオン強度が減少したリン酸化ペプチドは、WT で 1,069 個、*tar1-1* で 1,889 個、C1 で 1,864 個検出された (図 22B)。これらのリン酸化ペプチドを発現パターンにより 4 つのグループに分類した (図 23A-D)。

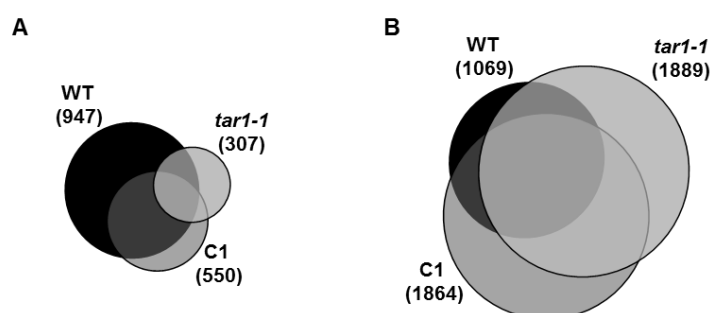


図 22. 光独立栄養 (5% CO₂ 通気) かつ窒素欠乏条件移行前と移行後 6 時間目との間で有意にリン酸化ペプチドのイオン強度が変動したリン酸化ペプチド数。括弧内の数字は野生株 (WT、黒円)、*tar1-1* (白円)、相補株 (C1、灰色円) それぞれで有意にリン酸化ペプチドのイオン強度が変動した (p 値 <0.05) リン酸化ペプチド数を示す。(A) N 欠乏によりイオン強度が増加したリン酸化ペプチド。(B) N 欠乏によりイオン強度が減少したリン酸化ペプチド。

その中で、WT と C1 では TP-N 条件への移行に伴いリン酸化ペプチドイオン強度が有意に増加し、(p 値 <0.05)、かつ TP-N 条件下において WT と C1 よりも *tar1-1* で有意にイオン強度が減少したリン酸化ペプチドは 222 個検出された (図 23A)。この 222 個のリン酸化ペプチドは TAR1 により TP-N 条件への移行に伴いリン酸化されたペプチドと推測されたため、「TP-N 条件下において TAR1 依存的に増加するリン酸化ペプチド」と定義した (図 23A)。これらリン酸化ペプチドには TAR1 により直接的にリン酸化修飾を受けるペプチドが含まれると推測した。しかし、これら 222 個のリン酸化ペプチドは、TAR1 依存的に活性を示す他のタンパク質リン酸化酵素によりリン酸化修飾を受けたペプチドも含まれる可能性があるため、これらリン酸化ペプチドのリン酸化部位と、

前項で述べた *in vitro* アッセイのリン酸化プロテオーム解析の結果とを比較し、リン酸化部位が一致したリン酸化ペプチドを TAR1 のリン酸化標的候補因子とした (表 3)。これらリン酸化ペプチドが帰属するリン酸化タンパク質にはタンパク質リン酸化酵素 calcium-dependent protein kinase 11 (CDPK11) と mitogen-activated protein kinase kinase (MLTK)、RNA ポリメラーゼ、N 同化関連酵素のグルタミン合成酵素、カルノシン合成酵素、アンモニウム輸送体 4 そして解糖系のホスホフルクトキナーゼ 1 が含まれた。

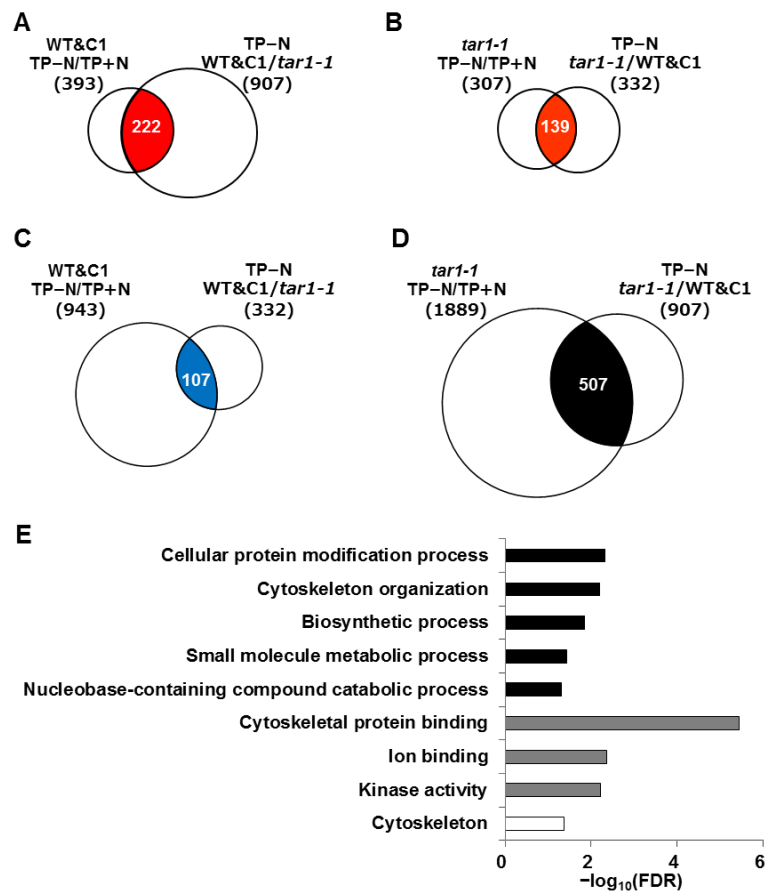


図 23. 光独立栄養 (5% CO₂ 通気、TP) かつ窒素欠乏条件移行前 (TP+N) と移行後 6 時間目 (TP-N) を比較して、野生株 (WT)、*tar1-1*、相補株 (C1) それぞれで有意に (p 値 < 0.05) イオン強度が変動したリン酸化ペプチド数。(A) TP-N 条件下において TAR1 依存的にイオン強度が増加するリン酸化ペプチド。(B) TP-N 条件下において *tar1* 変異依存的にイオン強度が増加するリン酸化ペプチド。(C) TP-N 条件下において TAR1 依存的にイオン強度が減少するリン酸化ペプチド。(D) TP-N 条件下において *tar1* 変異依存的にイオン強度が減少するリン酸化ペプチド。括弧内の数字はリン酸化ペプチド数を示す。(E) TP-N 条件下において *tar1* 変異依存的にイオン強度が減少するリン酸化ペプチドに対する Gene ontology (GO) 濃縮解析。棒グラフの色は GO term の機能分類である biological process (黒)、molecular functions (灰)、cellular component (白) を示す。横軸は $-\log_{10}$ (false discovery rate, FDR) を示し、有意に濃縮された (FDR < 0.05) GO term を左側に示す。

表 3. TAR1 のリン酸化標的候補因子

タンパク登録番号 ^{注1)}	タンパク質名略称	リン酸化部位 ^{注2)}	機能
タンパク質リン酸化酵素			
Cre06.g310100	MLTK1	S350, S351	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase
Cre13.g564500	CDPK11	T655	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase EF-hand protein superfamily
RNA ポリメラーゼ			
Cre16.g673900	RPC3	S359, S362	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC3 (RPC3、POLR3C)
窒素同化と炭素代謝関連因子			
Cre02.g113200	GLN1	S54	Glutamine synthetase
Cre06.g262900	PFK1	S77, S81	Phosphofructokinase
Cre13.g569850	AMT4	S475	Ammonium transporter. Belongs to AMT1 family (AMT1;4 or AMT1.4)
Cre13.g582800		S135, S155	Carnosine synthase
ストレス応答因子			
Cre03.g177500		S166	Receptor expression-enhancing protein 5/6 (REEP5_6)
Cre16.g663000	PRX	S424	Thioredoxin peroxidase
その他			
Cre01.g004400		S126	
Cre03.g180450	FAP215	S60, S578	5'-Nucleotidase and flagellar associated protein
Cre10.g447950		S67, S70	
Cre10.g467000	IFT57	S464	Intraflagellar transport protein 57
Cre14.g614850	FAP33	S1069	Flagellar associated protein
Cre14.g624900	FAP171	S675	Predicted integral membrane protein
Cre16.g689423		S88	Flagellar associated protein
Cre16.g691440	FAP43	S655	
Cre17.g706600		T162	

注 1) Phytozome に登録されているクラミドモナスタタンパク質データ version 5.5 の登録番号

注 2) *in vitro* と *in vivo* のリン酸化プロテオーム解析両方で検出されたリン酸化ペプチドの中で、リン酸化部位が一致していた場合、TAR1 のリン酸化標的の候補因子と推定した。

上記以外のリン酸化ペプチドのイオン強度の変動パターンについては、細胞を TP-N 条件へ移行した後、139 個のリン酸化ペプチドのイオン強度が *tar1-1* 細胞で増加し、かつ WT および C1 よりも *tar1-1* で増加したリン酸化ペプチドは、「TP-N 条件下において *tar1* 変異依存的に増加するリン酸化ペプチド」と定義した (図 23B)。TP-N 条件へ移行後、107 個のリン酸化ペプチドのイオン強度が WT および C1 で減少し、かつ WT および C1 では *tar1-1* と比較して低下したこれらのリン酸化ペプチドを「TP-N 条件下において TAR1 依存的に減少するリン酸化ペプチド」と定義した (図 23C)。507 個のリン酸化ペプチドのイオン強度が *tar1-1* で TP-N 条件への移行に伴い減少し、かつ *tar1-1* では WT と C1 と比較してイオン強度が低下したこれらのリン酸化ペプチドは、「TP-N 条件下において *tar1* 変異依存的に減少するリン酸化ペプチド」と定義した (図 23D)。これら TAR1 もしくは *tar1* 変異依存的に変動するリン酸化タンパク質について、GO 解析を行った。その結果、「TP-N 条件下において *tar1* 変異依存的に減少するリン酸化ペプチド」については 9 つの GO term が濃縮されたが、その他 3 つのグループについては GO term は有意に濃縮されなかった (図 23E)。TP-N 条件下において *tar1* 変異依存的に減少するリン酸化ペプチドでは GO term の Cellular protein modification process が濃縮され、これらの中には MAPK3、MAPK4、MAPK7、MAPK8、myosin light chain kinase (MLCK1)、MAP kinase kinase kinase (MEKK) などの MAPK 関連タンパク質リン酸化酵素や、protein phosphatase 2C3 (PP2C3)、PP2C4、phosphoprotein phosphatase 10 (PPP10)、PPP16 などの脱リン酸化酵素が含まれた。

TAR1 の自己リン酸化部位と推定される 655 番目のチロシン残基がリン酸化されたリン酸化ペプチドは、TP+N 条件下と TP-N 条件下において WT および C1 で検出された (図 24)。しかし、WT と C1 におけるこのリン酸化ペプチドのイオン強度は TP+N 条件と TP-N 条件との間で有意な差はなかった (図 24)。また、655 番目のチロシン残基以外でリン酸化修飾を受けた TAR1 由来のリン酸化ペプチドは検出されなかった。このことから、TAR1 の自己リン酸化部位と推測される 655 番目のチロシン残基は C/N ストレスに関わらずリン酸化を受けている可能性が示唆され、655 番目のチロシン残基以外のアミノ酸残基はリン酸化修飾を受けない可能性が示唆された。

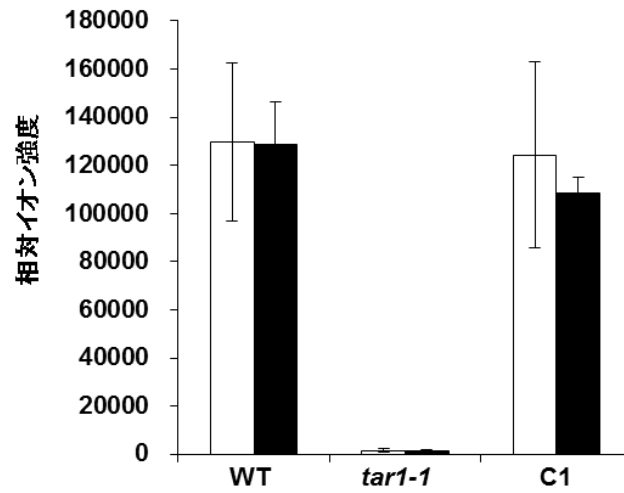


図 24. TAR1 の自己リン酸化部位と推定されるアミノ酸配列 655 番目のチロシン残基がリン酸化されたリン酸化ペプチドのイオン強度。光独立栄養 (5% CO₂ 通気) かつ窒素欠乏条件移行前 (白) と 6 時間目 (黒) における野生株 (WT)、*tar1-1*、相補株 (C1) のリン酸化ペプチドのイオン強度を示す。各データは 4 回反復実験を行い、標準偏差を算出した。

考察

1. C/N ストレス条件下において TAR1 は ROS の産生に関与する

5%濃度の CO₂ を含む空気を通気した、光独立栄養かつ窒素欠乏条件下 (TP-N) において生存率が低下した野生株とは対照的に、*tar1-1* は野生株よりも高い細胞生存率を示し (図 10C)、生存した細胞の内 7 割が細胞分裂能を有した (図 11A, B)。このことから、光独立かつ窒素欠乏条件下において野生株の細胞生存率は負の影響を受けるが、*tar1-1* はその影響を受けないことが示された (図 10C)。また、野生株では TP-N 条件に移行後 1 日目において一過的に H₂O₂ 量が増加したが、同時点での *tar1-1* の H₂O₂ 量は野生株よりも減少した (図 10D)。*tar1-1* では ROS の除去に関与する *PTOI* と *GPX5*、および DNA 修復に関与する *TRXh1* (Sarkar et al., 2005) のホモログである *TRXh2* の転写産物量が TP-N 条件移行に伴い増加した。これらの遺伝子はクラミドモナスにおいて H₂O₂ 添加処理によって転写産物量が増加することが知られている (Blaby et al., 2015)。これらのことから、*tar1-1* において ROS 除去システムの活性化が、細胞生存率の維持に貢献したと考えられる。クラミドモナス野生株では C/N ストレスに伴い ROS 産生量が増加するが、C/N ストレス条件において 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) により PS-II からの光合成電子伝達を阻害すると ROS が減少し、細胞生存率が上昇することが知られている (Du et al., 2018)。C/N ストレスにより CO₂ 固定反応が制限されると NADPH や ATP の消費が抑制され、NADP や ADP が不足した状態となり、光化学系で生じた電子が周囲の酸素分子に転移することにより、ROS が発生すると考えられている (Johnson and Alric, 2013)。また、ROS の発生によるタンパク質や膜脂質の酸化、損傷を防ぐため、藻類は C/N ストレス条件において NADPH や ATP を消費する脂肪酸合成を行い、TAG の形で脂肪滴に貯蔵すると推論されている (Hu et al., 2008)。しかし、本研究の結果から野生株では C/N ストレスにより TAG を蓄積するものの、ROS の除去に関与する *PTOI* と *GPX5*、および DNA 修復に関与する *TRXh1* の発現は誘導されなかった。植物および微細藻類などの酸素発生型光合成生物において ROS が様々なストレスに応答したシグナル伝達物質として機能することが示されている (Pérez-Pérez et al. 2012 ; Shao et al. 2013 ; Baxter et al. 2014)。シロイヌナズナでは塩ストレス条件へ移行後数時間で細胞内の ROS 産生量が増加し、ROS 産生シグナルが塩ストレス応答の引き金となる (Kurusu et al., 2015)。クラミドモナスにおいて、TP-N 条件へ移行後 TAR1 を介して ROS を一過的に発生させることが、C/N ストレスのシグナルとなっている可

能性が推測される。また、大腸菌では栄養飢餓条件において、死細胞のリサイクルが細胞の生存に重要であることが示唆されている (Takano et al., 2017)。このことから、クラミドモナスにおいて一過的な ROS の発生が直接野生株の細胞死を引き起こしている場合には、クラミドモナスが集団としての生存を追求するために、接合子を形成できなかった栄養細胞を細胞死させ、その構成成分を利用する、または単純に生細胞を減らすことにより細胞が獲得できる外環境中の窒素栄養の割合を増加させる可能性が考えられる。また、TP-N 条件へ移行後 2 日目において野生株の細胞生存率は 22%までに低下することから、同条件の *tar1-1* において光合成活性が維持されること、TAG およびデンプン蓄積量が増大することは、細胞生存率を負に制御する TAR1 が欠損したことに起因する二次的な表現型である可能性がある。野生株の細胞生存性が低下する前の、TP-N 条件に移行後数時間以内の初期応答を野生型と *tar1-1* 間で比較解析することで、光合成活性や TAG およびデンプン蓄積という生理応答への TAR1 の関与の有無について明確になると期待される。

ここまで 5% CO₂ を通気した TP-N 条件という C/N ストレス条件における、TAR1 を介した ROS 産生について議論してきたが、本条件は自然環境に近い大気レベルの 0.04% (v/v) CO₂ を含む空気を通気する条件 (0.04% CO₂ 通気条件) とは大きく異なる。0.04% CO₂ 通気のより弱い C/N ストレス条件下において *tar1-1* は野生株よりも 1.3 倍高い細胞生存率を示したことから (図 9A)、0.04% CO₂ 通気の C/N ストレス条件下においても TAR1 は細胞生存率を負に制御する因子である可能性が示唆された。

2. C/N ストレス条件下において TAR1 は光合成関連タンパク質を分解することにより光合成を下方制御する

微細藻類は C/N ストレス条件において、クロロフィル、葉緑体膜 (Sakurai et al., 2014)、光合成関連タンパク質 (Wei et al., 2014)、細胞質および葉緑体リボソームを分解することによって (Schmollinger et al. 2014)、光合成関連タンパク質の産生を阻害し、光合成活性を低下させる。*tar1-1* は光混合栄養かつ窒素欠乏条件下で野生株と比較してクロロフィル量および Rubisco、cytochrome *f* のような光合成関連タンパク質量を維持することが示されていたが (Kajikawa et al. 2015)、TP-N 条件下においても *tar1-1* は光合成関連タンパク質を野生株よりも維持したことから (図 12)、TAR1 が C/N ストレス条件下においてこれらの光合成関連タンパク質の分解を正に制御することが示された。クラミドモナスの葉緑体プロテアーゼ FtsH と Clp は cytochrome *b₆/f* 複合体と Rubisco の分解に関

与する (Wei et al. 2014)。本研究の RNA-seq 解析およびリン酸化プロテオーム解析によると、*FtsH* および *Clp* の mRNA 量と、FtsH および Clp タンパク由来のリン酸化ペプチド量の両者は、*tar1* 変異によって影響を受けなかった。さらに葉緑体チラコイド膜のスタック構造は *tar1-1* において、野生株よりも維持されていたことから (図 15 下段)、葉緑体プロテアーゼ以外のタンパク質分解機構、例えば葉緑体選択的なオートファジー (クロロファジー) などが TAR1 により制御を受ける可能性が推測された (Ishida et al. 2008 ; Kajikawa et al. 2019)。

C/N ストレス条件下において PS-II タンパク質の蓄積量および活性は、PS-I に比べてより早く減少する (Plumley and Schmidt, 1989 ; Juergens et al., 2015)。本研究でも、TP-N 条件下の野生株では、 F_v/F_m 、 Φ_{II} そして V_{max} は急速に減少し、2 日目で検出不能になった (表 2)。PS-II の D1 タンパク質は、PS-II 修復サイクルの一部として、効果的な分解システムにより代謝回転が早いことが知られている (Aro et al., 1993)。そしてその修復サイクルの一環として D1 タンパク質のリン酸化修飾が重要な役割を果たす (Tikkanen and Aro, 2012 ; Kato and Sakamoto, 2014)。一方、PS-I は PS-II よりも安定である (Aro et al., 1993)。しかし本研究において、TP-N 条件下において WT と C1 では PS-II と PS-I 共に急速に分解されることが示された (図 12)。一方 *tar1-1* では、PS-I のサブユニットである PsaD の量は窒素欠乏に伴い減少しなかったが、PS-II の D1 タンパク質量は TP-N 条件下で減少した (図 12)。これらの事実からは、*tar1-1* において PS-II の分解が WT より遅れているか、修復機構が亢進しているのか区別することはできないが、PS-II をより選択的に分解するシステムが *tar1-1* では存在する可能性が示唆された。

一方、細胞質局在のタンパク質については、窒素欠乏後の細胞質リボソームタンパク質 RPL37 タンパク質の分解はオートファジー阻害剤、コンカナマイシン A によって阻害されることから (Couso et al. 2016)、細胞質リボソームタンパク質の分解はオートファジー経路によるものだと推測されている。光合成関連タンパク質とは対照的に、TP-N 条件下での細胞質リボソームタンパク質 RPL37 の分解は、*tar1* 変異の影響を受けなかった (図 12)。以上のことから、TAR1 は C/N ストレスに伴う葉緑体チラコイド膜および光合成関連タンパク質の分解に寄与するものの、オートファジーを介した細胞質リボソームタンパク質の分解には、寄与しないことが示唆された。

3. C/N ストレス条件下において TAR1 は TAG およびデンプン蓄積の負の調節因子として機能する

変異株 *tar1-1* は光混合栄養かつ窒素欠乏条件下において TAG 蓄積量が野生株より低い (Kajikawa et al. 2015)。一方、今回の研究結果において、*tar1-1* は TP-N 条件下において TAG およびデンプンを WT より多く蓄積した (図 9C、D ; 図 13A、B)。クラミドモナスの TAG とデンプン合成の炭素源について、安定同位体ラベルした CO₂ と酢酸の取り込み実験により、光混合栄養かつ窒素欠乏条件下において、脂肪酸は主に培地中の酢酸由来、デンプンは主に光合成で固定された CO₂ 由来であるとされている (Juergens et al., 2016)。*tar1-1* は光混合栄養かつ窒素欠乏条件下において培地中の酢酸取り込み量が野生株よりも低下した (Kajikawa et al., 2015)。このことから *tar1-1* では脂肪酸の新規合成に使われる酢酸の取り込み活性、もしくは酢酸資化能が低下したために、TAG 蓄積が減少したことが示唆された。

近年、ラパマイシン過感受性を示すクラミドモナス変異株 *vip1-1* が報告され、この変異体の原因遺伝子はイノシトールリン酸の生合成酵素をコードする遺伝子 VIP1 であった (Couso et al., 2016)。この変異株の生育は光混合栄養条件下でラパマイシンにより阻害され、窒素充足、窒素欠乏両条件下において TAG を高蓄積した。一方、光独立栄養条件下では *vip1-1* は野生株と比較してこれらの表現型に差がなかった (Couso et al., 2016)。このことから、クラミドモナスにおいて酢酸依存的な細胞増殖と TAG 蓄積は TOR キナーゼおよびイノシトールリン酸シグナルによって調節されることが示唆された。また、出芽酵母では、TOR はグルコース欠乏条件下で PKA を介して Yak1 を負に調節する (Martin et al., 2004)。一方、クラミドモナスにおいて TOR キナーゼ、および TOR 複合体の構成因子のホモログが保存されており (Shemi et al., 2015)、PKA は鞭毛運動の制御に関与することが報告されているものの (Mitchell, 2000)、TAR1 と TOR との遺伝学的な関係は解明されていない。今後、光混合栄養かつ窒素欠乏条件下で低 TAG 蓄積を示す *tar1* 変異と、同条件下で高 TAG 蓄積を示す *vip1* 変異との二重変異株を解析することで TOR と TAR1 を介した酢酸依存的な脂質代謝の調節機構解明に貢献できると期待される。

一方、TP-N 条件下において、*tar1-1* が高い細胞生存率と光合成活性を維持したことで、光合成で固定した炭素の供給が持続したことにより TAG およびデンプンの新規合成が増加したと推測された。*tar1-1* における TAG の脂肪酸組成において、*de novo* 合成された脂肪酸由来と推定される 18:1 Δ^9 (Riekhof et al., 2005 ; Li et al., 2012) の割合が野

生株よりも増加した (図 14)。一方、*tar1-1* の TAG の脂肪酸組成において $18:3\Delta^{5,9,12}$ と $18:3\Delta^{9,12,15}$ の割合は野生株よりも低下した (図 14)。これら TAG 中の多価不飽和脂肪酸は MGDG、DGDG、PE、DGTS などの膜脂質から供給されると推測され (Sakurai et al., 2014)、*tar1-1* の TAG 中の脂肪酸は膜脂質からの転用ではなく、新規合成された脂肪酸を利用して TAG を産生したことが示唆された。TP-N 条件下において *tar1-1* の膜脂質が野生株よりも残存していたことも (図 13C)、*tar1-1* が蓄積する TAG の脂肪酸は膜脂質から転用された脂肪酸よりも新規合成された脂肪酸の割合が高い、という仮説を支持する。TP-N 条件において、細胞生存率が維持されたことによる二次的な影響として、*tar1-1* が TAG およびデンプンを野生株よりも多く蓄積した可能性がある。大気レベルの $0.04\%CO_2$ 濃度での C/N ストレス条件 2 日目において、*tar1-1* と野生株での細胞生存性の差は縮小した (図 9A)。この場合は、むしろ *tar1-1* の TAG 蓄積量は野生株よりも若干低下しており、デンプンの蓄積量は野生株と有意な差はなかった事実も (図 9C、D)、この仮説を支持する。

4. C/N ストレス条件下において TAR1 は配偶子誘導を正に制御する

細胞が TAR1 を欠損すると、光独立かつ窒素欠乏条件下において生存率の維持がもたらされ、一見 *tar1* 変異が C/N ストレス条件での生存戦略上有利に思われる。クラミドモナスは C/N ストレスにより栄養細胞から配偶子へと分化する (Sager and Granick, 1954)。クラミドモナスの *mt*⁻側の配偶子誘導の鍵因子である *MID* は C/N ストレス条件移行後 30 分と 6 時間目の二段階で発現量が増加する (Lin and Goodenough, 2007)。一段階目の *MID* の発現量増加により *mt*⁺の配偶子誘導関連因子の発現を抑制し、二段階目の発現量増加により *mt*⁻の配偶子誘導関連因子である *MTD1* と *GSM1* の発現を正に制御する (Lin and Goodenough, 2007)。窒素欠乏移行後 45 分と 2 時間目において *tar1-1* の *MID* の発現量は野生株よりも低下した (図 17B)。それに伴い、*tar1-1* の *MTD1* と *GSM1* の発現量も野生株より低下した (図 17B)。一方、*mt*⁺側の配偶子誘導関連因子である *FUS* (Ferris et al., 1996) と *SAG* (Ferris et al., 2005) の発現量も *tar1-1* において野生株よりも低下した (図 17B)。これらの事実から、両接合型における配偶子誘導関連遺伝子の発現が C/N ストレスに伴い TAR1 により制御されることで、配偶子が誘導されることが示唆された。接合率について *mt*⁻側と *mt*⁺側それぞれの *tar1-1* 変異株と野生株との接合率は 5.8%と 21%と、*mt*⁻側の方が *tar1* 変異の影響が認められた (図 17A)。しかし、クラミドモナスは野生株間で C/N ストレス条件下における TAG 蓄積量が異なるなど C/N ス

トレス応答に対する生理応答の強弱があることから (Siaut et al., 2011)、親株が異なる mt^- 側と mt^+ 側の *tar1* 変異株の接合率に差が認められた原因については、*tar1* 変異によるものと親株の遺伝的背景の違いによるものの二つの可能性がある。

次に TAR1 の貯蔵物質蓄積制御と、配偶子誘導の制御との関係性について考察する。配偶子は C/N ストレス条件下でデンプンを蓄積し、cytochrome *b₆/f* 複合体を失っていることが報告されている (Martin and Goodenough, 1975 ; Bulté and Wollman, 1992)。クラミドモナスの配偶子が貯蔵物質であるデンプンを蓄積するのは、長期間の C/N ストレス条件下で生存するため (Martin and Goodenough, 1975)、もしくは窒素栄養回復後の接合子発芽のため (Wang et al., 2009) などの理由が指摘されてきた。しかし、本研究により *tar1-1* は配偶子誘導を抑制するが、デンプンおよび TAG を高蓄積したことから、TAR1 が制御する C/N ストレス応答性の貯蔵物質の蓄積と配偶子誘導は、互いに独立した制御機構であると推測される。

5. C/N ストレス欠乏初期において TAR1 は転写調節に関与する

クラミドモナス野生株の C/N ストレス応答についてトランスクリプトーム解析ならびにプロテオーム解析に基づく知見をこれまでの報告と合わせて時間軸に沿って整理すると、(1) C/N ストレス条件に移行後 18 分後においてアンモニウム輸送体をコードする *AMT1-8* の発現が誘導されることで、細胞外アンモニウムイオンを能動的に取り込む機構が活性化する (Schmollinger et al., 2014)。(2) C/N ストレス条件に移行後 30 分後において *MID* の発現が誘導されることにより配偶子誘導が起こる (Lin and Goodenough, 2007)。(3) C/N ストレス条件に移行後 1 時間後において核酸の輸送体をコードする *UAPAI-UAPA6*、尿素的輸送体である *DUR1* および *DUR2* そして尿素回路関連のアミノ酸代謝酵素をコードする *AGS1*、*ARG7*、*OTC1* などの遺伝子群の発現が誘導されることで、細胞外の有機窒素化合物を積極的に取り込み同化する機構が活性化する (Schmollinger et al., 2014)。(4) C/N ストレス条件に移行後 2 時間後において *TST2*、*TSWI* などのアミノ酸 tRNA リガーゼをコードする遺伝子群の発現が抑制されることでタンパク質の新規合成が抑制される (Park et al., 2015)。(5) C/N ストレス条件に移行 12 時間から 24 時間後にかけて光化学系複合体の構成タンパク質が分解を受ける。

これら野生株における (1) から (5) の C/N ストレス移行後 24 時間以内の初期応答に対する TAR1 の寄与として、まず先に述べたように TAR1 は (2) の *MID* の一段階目の発現を正に制御することから、C/N ストレスに伴う配偶子誘導を制御すると考えられ

る。そして (3) の有機窒素化合物の取り込みならびに同化について、本研究の RNA-seq 比較解析により、尿素回路、アミノ酸合成酵素、核酸およびアミノ酸輸送体などの窒素同化に関する酵素遺伝子や輸送体遺伝子の発現レベルが野生株と比較して *tar1-1* で減少したので、これらの遺伝子群は TAR1 が正に制御する可能性が示唆された(図 20A (a))。また、(4) のタンパク質の新規合成の抑制についても、アミノ酸 tRNA リガーゼ遺伝子群の発現レベルが野生株と比較して *tar1-1* では増加したことから(図 20B (d)、C (g))、TAR1 はタンパク質の新規合成に関わるアミノ酸 tRNA リガーゼ遺伝子の転写を C/N ストレスに伴い抑制する可能性が示唆された。これらのことから、クラミドモナスは C/N ストレスに対して生殖細胞への生長相転換と、栄養細胞の順化という二つの異なる戦略をとると考えられ、その二つの戦略における mRNA レベルでの制御に TAR1 が関与する可能性が示された。

これまでの議論をまとめると、5% CO₂ 通気かつ窒素欠乏という C/N ストレス条件下において TAR1 は、活性酸素種の発生を正に制御し、それに伴い光合成関連タンパク質の分解を促進することで光合成活性を負に制御する一方で、クラミドモナスの適応戦略としての配偶子誘導と窒素栄養源の取り込みならびに同化を TAR1 が mRNA レベルでの転写を介して正に、そしてタンパク質の新規合成を負に制御する役割を担うと考えられた。

6. C/N ストレス条件下において TAR1 は他のタンパク質リン酸化酵素のリン酸化状態を制御する

リン酸化プロテオーム解析により、野生株においてリン酸化ペプチドのイオン強度が C/N ストレスに伴い変動しないが、*tar1-1* においてはリン酸化ペプチドのイオン強度が減少したリン酸化タンパク質群において、GO term の Cellular protein modification process に属するタンパク質が有意に濃縮された(図 23E)。この GO term をもつリン酸化タンパク質には、MAPK3、MAPK4、MAPK7、MAPK8、MLCK1、MEKK などの MAPK シグナル伝達カスケードに関連するタンパク質キナーゼ、ならびに PP2C3、PP2C4、PPP1、PPP16 のタンパク質脱リン酸化酵素が含まれていた。これらのタンパク質リン酸化修飾に関連する酵素タンパク質について、*tar1* 変異依存的にそれら自身のリン酸化レベルが減少した事実を考察し、以下の二つの仮説を推察した。第一に C/N ストレスに関わらず常にこれらタンパク質はリン酸化修飾を受けるが、TAR1 が失われると、C/N ストレス条件移行後これらタンパク質のリン酸化状態が維持されないという可能性が考えら

れる。第二に C/N ストレス条件下において、これらリン酸化タンパク質を脱リン酸化する未知の脱リン酸化酵素の活性が TAR1 により抑制されているが、TAR1 が失われると未知の脱リン酸化酵素が活性化し、これらリン酸化タンパク質が脱リン酸化される可能性が考えられる。MAPK シグナル伝達カスケードは陸上植物の環境応答において中心的な役割を果たす (Rodriguez et al., 2010)。この MAPK の制御については MAPK がリン酸化修飾を受ける保存配列として TEY と TDY の 2 タイプが知られており、TEY 型の MAPK は病原菌感染、低温、乾燥ストレスそして H₂O₂ 処理などのストレスに応答して活性化される (Nakagami et al., 2005)。本研究では MAPK3 および MAPK8 由来の TEY モチーフのチロシン残基がリン酸化されたペプチドのイオン強度が *tar1* 変異依存的に減少したことから、野生株では MAPK3 および MAPK8 のリン酸化レベルが C/N ストレス移行後も維持され活性化し、MAPK3 および MAPK8 の下流のリン酸化標的因子をリン酸化することで C/N ストレス応答機構を制御し、*tar1-1* では MAPK3 および MAPK8 のリン酸化レベルが減少することで活性が抑制される可能性が考えられる。今後、*tar1* 変異依存的にリン酸化状態が変化したタンパク質リン酸化酵素ならびに脱リン酸化酵素の制御機構の解明に向けて今後さらなる研究が期待される。

In vitro と *In vivo* のリン酸化プロテオームの比較解析により、TAR1 の直接的なリン酸化標的候補因子を推定した (表 3)。それらの中には MLTK1 や CDPK11 などのタンパク質リン酸化酵素、RNA ポリメラーゼ、グルタミン合成酵素やアンモニウム輸送体 AMT4 など窒素同化に関わる因子が含まれていた。これら因子について、グルタミン合成酵素や AMT4 は C/N ストレス条件へ移行に伴い転写産物量、タンパク量が増加することから、C/N ストレスに応答した窒素栄養源の取り込みならびに同化に関与する可能性が示唆されている (Schmollinger et al., 2014)。一方、その他の因子については C/N ストレス応答への寄与はこれまで報告されていない。分裂酵母の TAR1 オルソログ Pom1 のリン酸化標的因子には、他の細胞分裂の制御に関わるタンパク質リン酸化酵素 Cdr2 が含まれており、Pom1 は、Pom1-Cdr2 さらに下流因子のリン酸化によるリン酸化カスケードを介して有糸分裂開始を負に制御する (Kettenbach et al., 2015)。分裂酵母の Pom1-Cdr2 というタンパク質リン酸化カスケードと同様に、TAR1 およびその標的因子として見出された MLTK1 や CDPK11 といった他のタンパク質リン酸化酵素から構成されるリン酸化カスケードが存在する可能性がある (図 25)。また、シロイヌナズナの *cdpk11* 変異株は ABA 非感受性を示し (Zhu et al., 2007)、シロイヌナズナの CDPK11 は PP2C 型タンパク質脱リン酸化酵素の AHG1 および AHG3 と相互作用することが報告さ

れている (Lynch et al., 2012)。分子系統解析によると、AHG1 および AHG3 はシロイヌナズナの SnRK2 を脱リン酸化する酵素であり、C/N ストレス応答を制御する因子である ABI1 (Lu et al., 2015a) と同じサブグループに属する (Fuchs et al., 2013)。この知見から、TAR1 は CDPK11 をリン酸化制御し、CDPK11 と PP2C 型タンパク質脱リン酸化酵素が相互作用して C/N ストレスに応答する可能性がある。今後この可能性を検証するために、CDPK11 のクラミドモナス変異株の取得と解析、CDPK11 の相互作用因子の探索が望まれる。

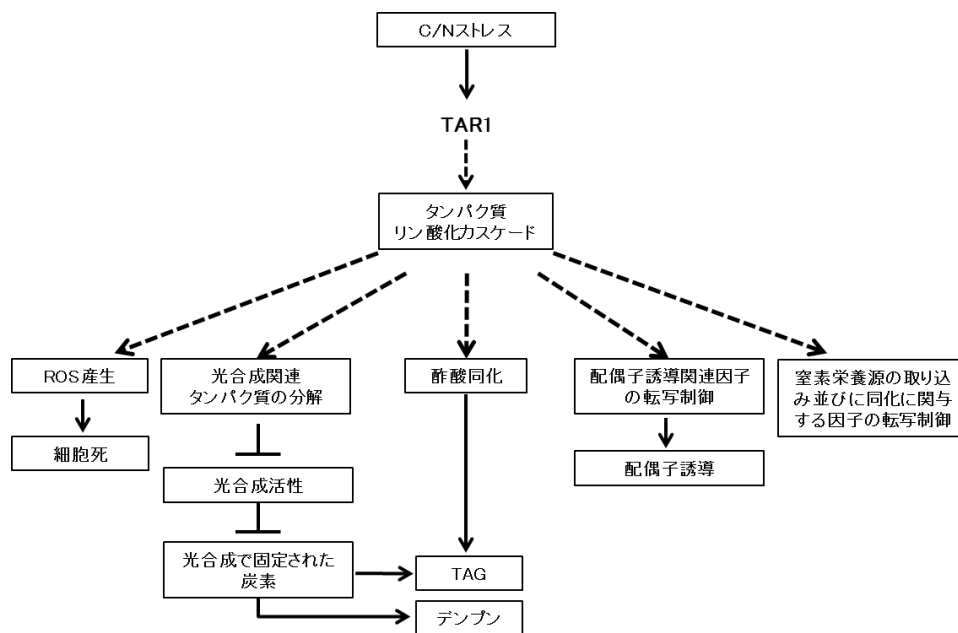


図 25. 炭素 (C) /窒素 (N) 比が異常なストレス条件における TAR1 の機能モデル図。点線矢印は推定される機能。ROS ; reactive oxygen species。

次に他のクラミドモナスのタンパク質リン酸化酵素と TAR1 との関係性について考察する。近年、植物特異的 DYRK である DYRKP のクラミドモナスオルソログ遺伝子の変異株 *std1* がこれまでに単離されている (Chochois et al., 2010)。*std1* も *tar1-1* と同様に、光独立 (2% CO₂ 通気) かつ窒素欠乏条件下において、野生株よりも光合成活性を維持し、高 TAG と高デンプン蓄積を示した (Schulz-Raffelt et al. 2016) それぞれの単独変異株は C/N ストレス条件下における光合成活性を維持したこと、デンプンならびに TAG を高蓄積したことから、TAR1 と DYRKP はそれぞれ独立して光合成活性の抑制と、TAG ならびにデンプン蓄積を抑制することが示された。また、今回のリン酸化プロテオーム解析では *tar1-1* と野生株および相補株との間で、イオン強度に有意差のある

リン酸化ペプチドの中にDYRKP由来のリン酸化ペプチドは見いだされなかったことから、TAR1とDYRKPのリン酸化を介したC/Nストレス応答制御は独立な関係であることが推測された。今後TAR1とDYRKPの相互作用については二重変異株の解析が望まれる。

DYRKはチロシンの自己リン酸化により活性化すると報告されている (Aranda et al., 2011)。出芽酵母のYak1はTORの阻害剤であるラパマイシン添加によりチロシンが自己リン酸化され、活性化すると報告もある (Martin et al., 2004)。これに対して本研究のリン酸化プロテオーム解析により、自己リン酸化部位と推定されるTAR1の655番目のチロシン残基がリン酸化されたリン酸化ペプチドのイオン強度は、野生株ならびに相補株においてC/Nストレス条件移行前と移行後6時間目との間で有意差はなかった (図24)。このことから、C/Nストレスに応答したTAR1のリン酸化活性は自己リン酸化による制御を受けない可能性が示唆された。さらに、655番目のチロシン残基以外のTAR1のアミノ酸残基で自己リン酸化修飾をうけたリン酸化ペプチドは検出されなかったことから、TAR1自身の活性はリン酸化以外の制御を受ける可能性がある。今後*tar1-1*のサプレッサー変異株を用いて解析することが、藻類のC/Nストレス応答機構の解明に必要となるであろう。

結論

本研究によりC/Nストレス条件下においてTAR1はROSの発生を正に制御し、それに伴い細胞生存性と、光合成関連タンパク質の分解を促進することで光合成活性を負に制御する可能性が示唆された。一方で、クラミドモナスの適応戦略として、TAR1は配偶子誘導と窒素栄養源の取り込みならびに同化を正に、そしてタンパク質の新規合成を負に、mRNAレベルでの転写を介して制御する可能性が示唆された。そしてリン酸化プロテオーム解析によりMLTK1やCDPK11を含む18個のタンパク質がTAR1依存的にC/Nストレス条件下においてリン酸化を受けることが明らかになった。今後は、C/Nストレス条件下におけるこれらの因子の機能解明により、TAR1を介したC/Nストレス応答の機構解明が期待される。

材料および方法

1. 材料と培養条件

本研究では *Chlamydomonas reinhardtii* 野生株 C-9 (NIES-2235, mt^-)、*TAR1* 遺伝子へのハイグロマイシン耐性遺伝子カセット挿入変異株 *tar1-1* (Kajikawa et al., 2015)、そして *tar1-1* に野生型 *TAR1* 遺伝子を形質転換により導入して得られた相補株 C1 (Kajikawa et al., 2015) を用いた。配偶子誘導実験には上記の株に加えて、野生株 CC-125 (mt^+)、*tar1-1* を CC-125 に 2 回戻し交配をして得られた子孫株の中から選抜した *tar1-1*-F2-11 (*tar1*, mt^+) 株を用いた。株の継代には tris-acetate-phosphate (TAP) 培地を用いた (Harris, 2009)。

光合成独立栄養素欠乏条件下での試験のために、あらかじめ 0.04%、0.1%、0.5%、1%、5% および 10% の CO_2 を含む空気を通気し、20 mM 3-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS) を含む pH 7.2 に調整した tris-phosphate (TP) 培地 (Kropat et al., 2011) 50 mL で、 $120 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の白色蛍光灯照射下、 25°C で前培養した細胞を利用した。N 欠乏誘導には上記の条件で培養した対数増殖期後期 (細胞密度 $2.0 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$) の細胞を TP 培地から無機 N を含む化合物を除去した TP-N で 2 回洗浄し、TP-N 50 mL 培地で培養した。空気中の CO_2 濃度は、 CO_2 ガス検出器 GCH-2018 (Sato Tech) を用いて監視した。細胞サイズおよび細胞数は、粒子分析器 CDA-1000 (Sysmex) を用いて測定した。細胞濁度は、分光光度計 (BioSpectrometer basic, Eppendorf) を用いて吸光度 730 nm の測定値を指標とした (Harris, 1989)。

2. クロロフィル定量

培養液 1 mL を 600 g、5 分間遠心して細胞を回収し、95%エタノールを 1 mL 添加して攪拌した。この懸濁液を 25,000 g、5 分間遠心し、上清 200 μL をプレートリーダー (Power Scan 4, DS pharma biomedical) で吸光度 665 nm および 649 nm の二波長を測定した。クロロフィル濃度は以下の計算式に従って算出した (Wintermans and de Mot, 1965)。

$$\text{クロロフィル } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 6.1 \times \text{OD}_{665} + 20.04 \times \text{OD}_{649}$$

3. 細胞生存率とコロニー形成率の測定

細胞生存率の測定法は Pérez-Martín et al., 2014 に基づく。細胞懸濁液 200 μL にエバンスブルーを終濃度 0.4% (w/v) になるように添加して染色し、25,000 g、1 分間遠心して細胞を回収して培地 1 mL で洗浄し、再度遠心後、上清を除去して、20 μL 程度の培地で懸濁し、顕微鏡観察に用いた。100 細胞以上を観察して染色された細胞を死細胞と判定し、観察した細胞中の生細胞の割合から細胞生存率を算出した。コロニー形成率については TAP 寒天培地一枚あたりに 100 細胞程度播種するように培養液を希釈し、細胞を播種した。培養 7 日後に形成されたコロニー数を計測した。

4. TAG と膜脂質蓄積量の定量

TAG の分析用に培養液 5 mL、膜脂質の分析用に 10 mL の培養液を 25,000 g、5 分間遠心して細胞を回収し、 -20°C で保存した。保存した細胞から Bligh-Dyer 法 (Bligh and Dyer, 1959) により全脂質を抽出した。細胞をガラス試験管に移し、蒸留水 0.5 mL、クロロホルム 0.6 mL、メタノール 1.2 mL を加えて激しく攪拌し、さらに蒸留水 0.6 mL、クロロホルム 2 mL を加えて攪拌し、遠心エバポレーター CC-105 (TOMY) で 1,700 rpm の回転速度で遠心した。下層の有機溶媒層を別のガラス試験管に回収し、遠心エバポレーター CC-105 (TOMY) で溶媒を 20 分蒸発乾固させた。

蒸発乾固させた総脂質をクロロホルム：メタノール混液 (2 : 1) 100 μL に溶解し、薄層クロマトグラフィー (TLC) プレート (TLC silica gel 60, Merck Millipore) に全量滴下した。TAG の測定用サンプルは展開溶媒 (ヘキサン：ジエチルエーテル：酢酸 = 70 : 30 : 1) で 30 分展開した。このときポジティブコントロールとしてサラダ油 1 μL を同時に展開した。

膜脂質の測定用サンプルとして抽出した脂質溶解液は TLC プレート左下角に一辺 25 mm の正方形の枠にスポットした。一次元目は、アセトン：ベンゼン：メタノール：水 = 8 : 3 : 2 : 1 の展開溶媒にて展開した。十分乾燥した後、 90° 反転させて、クロロホルム：アセトン：メタノール：酢酸：水 = 10 : 4 : 2 : 3 : 1 の展開溶媒にて展開した。展開溶媒が下から 12.5 cm の高さに到達するまで展開し、十分乾燥させた。その後ヘキサン：ジエチルエーテル：酢酸 = 80 : 30 : 1 の展開溶媒で展開した。

展開後、TLC プレートに 0.01% プリムリン-80% アセトン溶液を噴霧し、UV (315 nm) 照射下で TAG、もしくはそれぞれの膜脂質分画スポットを発色により確認した。発色

が確認された部分のシリカ片を回収、ガラス試験管に移した。回収したシリカ片に、2.5% 塩化水素メタノール溶液 2 mL とメタノールに溶解した 1 mM ヘプタデカン酸 (C17:0、Sigma-Aldrich) 20 μ L を添加し、80°C で 2.5 時間保温した (Sakurai et al., 2014)。

メチルエステル化したサンプルにヘキサン 2 mL を添加して攪拌させ、上層をガラス試験管に移した。これを 2 回繰り返した後、遠心エバポレーター CC-105 (TOMY) でヘキサンを蒸発乾固させた。ヘキサン 200 μ L を添加し、攪拌してガラス試験管の壁面を洗浄した後、再度遠心エバポレーターで溶媒を揮発した。ガラス試験管に残ったメチルエステル化反応物をアセトニトリル 20 μ L に溶解させ、ガスクロマトグラフィー (GC-2014、Shimadzu) で測定した。

5. デンプン定量

培養液 2 mL 分を 25,000 g、5 分間遠心して細胞を回収し、-20°C で保存した。デンプン量の定量には Total Starch Assay Kit (Megazyme) を使用した。凍結保存した細胞に 100% エタノール 1 mL を添加して懸濁した後、キャップ付きチューブに全量移し、95°C で 30 分間保温した。14000 rpm、5 分間、4°C で遠心した後上清を除去し、遠心エバポレーター CC-105 (TOMY) で 15 分間乾燥させた。乾燥したサンプルに 0.2M 水酸化カリウム溶液を 1 mL 添加して攪拌し、95°C で 30 分間保温した。その後 1 M 酢酸溶液を 200 μ L 添加して pH 5.0 付近に調整し、amyloglucosidase (Bottle 2) を 33 U 添加した。これをローテーターで 1 時間、55°C で保温した。反応物を 3000 rpm、30 分間、室温で遠心し、上清 20 μ L を 1.5 mL チューブにとり、キット付属の GOPOD 溶液 600 μ L を添加して転倒攪拌し、50°C で 20 分間保温した。この時 D-Glucose standard solution (Glu) をコントロールとした。反応液 100 μ L を 96 穴プレートに移し、プレートリーダー (Power Scan 4、DS pharma biomedical) で 510 nm の吸光度を測定し、以下の計算式に従ってデンプン量を算出した。

デンプン(mg) = $(OD_{510} \text{ sample} - OD_{510} \text{ blank}) \times 100 / OD_{510} \text{ Glu} \times 1.21 / 0.1 \times 1 / 1000 \times 162 / 180$

6. H₂O₂ 定量

1.2×10^7 分の細胞を含む培養液を 25,000 g、5 分間遠心して細胞を回収し、液体窒素で瞬間凍結して -80 °C で保存した。細胞を 1×reaction buffer (0.05 M リン酸塩; pH 7.4) と破碎ビーズ (Yasui Kikai) と共に Multi-beads shocker (Yasui Kikai) で、液体窒素で冷

却しながら、2,000 rpm、60 秒間の条件で 2 回破碎した。破碎液を 13,000 g、5 分間、4°C で遠心後、上清に含まれる H₂O₂ 量を、AmplexTM Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した (Çakmak et al. 2015)。

7. 光合成活性の測定

クロロフィル蛍光の測定は Nishimura et al., 2017 に基づき、MINI-PAM fluorometer (Walz) を用いて測定した。培養液 1.8 mL を測定チャンバーに移し、15 分間暗順応させた。その後測定光 (0.4 μmol photons m⁻² s⁻¹) を当て F₀ を取得した。培養条件時の光量を照射し (120 μmol photons m⁻² s⁻¹)、F_s を測定した。培養条件時の光量照射時の最大クロロフィル蛍光強度 (F_m') を測定するために、飽和光 8,000 μmol photons m⁻² s⁻¹ を 1 秒照射した。最大クロロフィル蛍光 (F_m) を測定するために、1 μM の DCMU を添加した。最大量子収率 (F_v/F_m)、実効量子収率 (ΦII) の計算式は以下の通りである。

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$$

$$\Phi_{II} = (F_m' - F_s)/F_m'$$

最大酸素発生速度の測定については、Yamano et al., 2008 に基づく。培養液を 600 g、5 分間遠心してクロロフィル濃度を測定し、ホットプレートスターラー PC-220 (CORNING) またはマグネティックスターラー RCH-3L (EYELA) を用いて加熱しながら N₂ ガスを 1 時間通気し、50 mM HEPES-NaOH (pH 7.8) に溶存する Ci を除いた。回収した細胞をクロロフィル濃度が 10-15 μg mL⁻¹ となるように懸濁した。1.5 mL の細胞懸濁液を、低温恒温水槽 NCB-1200 (EYELA) により 25°C の水によって温度を一定にしたチャンバーに入れ、15 分間 N₂ ガスを 50 mL min⁻¹ の流速で通気しながら 300 μmol photons m⁻² s⁻¹ の白色光を TECHNO LIGHT KTS-150RSV (Tokina) により照射し、細胞内およびバッファー内の Ci を除去させた。その後 750 μmol photons m⁻² s⁻¹ の白色光を照射しながら炭酸水素ナトリウムを 10 mM 添加し、酸素発生速度をクラークタイプ酸素電極 (OxyView1、Hansatech Instruments) により測定した。

8. タンパク質の抽出および免疫ブロッティング

免疫ブロッティングは Wang et al., 2014 および Kajikawa et al., 2015 に基づく。培養液 100 μL を回収し、10 μL の 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、25 % glycerol (w/v)、

2% sodium dodecyl sulfate (SDS) と 0.1 M DTT を含む SDS ローディングバッファーと懸濁し、100°C で 5 分間保温した。反応物を 4°C、25,000 g、3 分間遠心後、上清を SDS-PAGE 用ゲルに展開し、電気泳動槽 (ATTO) で 300 V の定電圧で 1.5 時間ほど泳動した。PVDF 膜 (BioRad) を 100%メタノールに 30 秒間浸漬後、25 mM Tris、192 mM グリシン、25% メタノールを含む転写バッファーに 30 分間程度浸漬した。トランスファー装置に 3 枚のろ紙、PVDF 膜、泳動したゲル、ろ紙 3 枚の順に重ね、300 V 定電圧で 30 分間転写を行った。

転写された PVDF 膜を 20 mM Tri-HCl、0.14 M NaCl、pH 7.5、0.1% Tween-20 を含む TBS-T で洗浄し、0.3%スキムミルク TBS-T 溶液に 1 時間浸漬した。TBS-T 溶液で 5 分洗浄したあと、一次抗体反応を 4°C で一晩行った。一次抗体反応に用いた抗体の種類と希釈率は以下の通りである。LHCII 抗体 (1 : 3,000)、PsbA 抗体 (1 : 20,000、AS05 084A、Agrisera)、cytochrome *f* 抗体 (1 : 5,000)、PsaD 抗体 (1 : 2,000、AS09 461、Agrisera)、RbcL 抗体 (1 : 5,000)、HemA 抗体 (1 : 3,000)、 α -チューブリン抗体 (1 : 5,000、T5168、Sigma-Aldrich)、SBP 抗体 (1 : 3,000)、PRK 抗体 (1 : 3,000)、GAPDH 抗体 (1 : 3,000)、RPL37 抗体 (1 : 5,000、AS12 2115、Agrisera)、ヒストン H3 抗体 (1 : 10,000、ab1791、abcam)。LHCII 抗体は京都大学伊福健太郎博士、cytochrome *f* 抗体は岡山大学高橋裕一郎博士、HemA 抗体は北海道大学田中歩博士、SBP、PRK と GAPDH 抗体は近畿大学田茂井政宏博士に分与していただいた。反応後、TBS-T 溶液で 15 分間、3 回洗浄したあと、二次抗体を TBS-T で希釈して室温で 1 時間、以下の希釈率で反応させた。PsbA、cytochrome *f*、PsaD、RbcL、HemA、PRK、RPL37 とヒストン H3 抗体とは horseradish peroxidase (HRP) -linked goat anti-rabbit IgG 抗体 (1:10,000、GE Healthcare) とを反応させた。SBP、GAPDH そして α -チューブリン抗体とは HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (1:10,000、GE Healthcare) 抗体と反応させた。反応後、TBS-T 溶液で 15 分間、3 回洗浄し、Luminata Crescendo Western HRP Substrate (Millipore) を PVDF 膜に 1 mL 添加して 1 分間静置し、両端を切ったビニールパックに封入して発光を LAS-4010 (GE Healthcare) で検出した。

9. レーザー走査型共焦点顕微鏡および透過型電子顕微鏡観察

中性脂質を染色する AdipoRed (Lonza) で染色した細胞を Leica TCS SP8 Microscope (Leica Microsystems) で観察した。AdipoRed の蛍光は 488 nm 波長のアルゴンレーザー

で励起し、500–550 nm と 705–765 nm 波長をそれぞれ AdipoRed とクロロフィル自家蛍光として検出した。

透過型電子顕微鏡観察は花市電子顕微鏡技術研究所に依頼した。細胞を 2% (v/v) グルタルアルデヒドを含む 0.1 M リン酸バッファー (pH 7.4) で 4°C で固定し、2% (w/v) 四酸化オスミウム溶液でポストフィックスした。固定した細胞をエタノールで段階的に脱水処理し、酸化プロピレンで置換した後、エポキシ樹脂 (Quetol 812; Nisshin EM) に包埋した。包埋したサンプルをウルトラミクロトーム (ULTRACUTS; Leica Microsystems) で 80–90 nm の厚さに切片化し、2% (v/v) 酢酸ウラニル溶液と鉛染色液で染色した後に JEM-1200EX (JEOL) を用いて観察した。

10. 配偶子誘導と接合実験

配偶子誘導の条件は Lin and Goodenough, 2007、接合実験は Nishimura et al., 2014 に基づく。液体 TAP 培地で 3 日間培養した細胞培養液の濁度を吸光度 730 nm を指標に測定し、 $OD_{730} = 2$ に調整した細胞懸濁液 200 μL を TAP 寒天 (1.5%寒天) に塗布し、60 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 6 日間培養した。培養した TAP 寒天上の細胞に少量の培地を加えて回収し、細胞密度を測定した。細胞密度が $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ になるよう濃度を調整し、この細胞懸濁液 5 mL を 25,000 g、5 分間遠心して細胞を回収し、qRT-PCR 用の配偶子誘導 0 時間目のサンプルとして回収した。残りの細胞を 600 g、3 分間遠心で回収した後、nitrogen-free high salt minimal (NFHSM) で 1 回洗浄し、45 mL の NFHSM に懸濁して、明所で培養し、配偶子誘導を開始した。配偶子誘導 2 時間目の細胞を qRT-PCR 用に回収し、配偶子誘導 4 時間目の培養液を mt^+ 、 mt^- 同士で等量混合し、明所で 1 時間静置した。反応後の混合液 490 μL に 10%グルタルアルデヒド溶液 10 μL を加えて細胞を固定し、顕微鏡で細胞を観察した。細胞を合計 100 個以上観察し、鞭毛を 4 本もつ細胞の割合から接合率を算出した。

11. RNA の抽出と qRT-PCR

qRT-PCR は Wang et al., 2014 に基づく。RNeasy Plant Mini kit (QIAGEN) を用いて全 RNA の抽出を行った。回収した細胞を滅菌水 100 μL と破砕ビーズ (Yasui Kikai) と共に Multi-beads shocker (Yasui Kikai) で、液体窒素で冷却しながら 2,000 rpm、60 秒間の条件で 1 回破砕した。破砕液とキット付属の RX Buffer : β メルカプトエタノール混液

(100 : 1) とを混合し、RNA 抽出に供した。途中 DNA の分解を行うため、10 μ L の DNaseI(QIAGEN)を 70 μ L の RDD バッファーに溶解した DNaseI 溶液をカラムに加え、15 分間室温で静置した。

PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara) を用いて cDNA の合成を行った。500 ng の全 RNA に対してキット付属の 5 × gDNA Eraser Buffer を 2 μ L、gDNA Eraser を 1 μ L 添加し、総容量が 10 μ L になるよう RNase-free water を添加して 60°C で 10 分間保温した。反応物に対してキット付属の 5 × PrimeScript Buffer 2 を 4 μ L、PrimeScript RT Enzyme Mix を 1 μ L、RT Primer Mix を 1 μ L、RNase-free water を 4 μ L 加え、15 分間と 37°C、5 秒間と 85°C の条件で逆転写反応を行った。合成された cDNA を鋳型に LightCycler 480 (Roche) を用いて 95°C、5 分間保温し変性させた後、95°C と 10 秒間、55°C と 30 秒間、68°C と 1 分間を 40 サイクルという条件で qRT-PCR を行った。qRT-PCR の反応液組成は、SYBR Premix Ex Taq GC (Takara) を 10 μ L、10 pmol の Forward プライマーと Reverse プライマー、cDNA 合成反応液を 1 μ L、dH₂O で 10 μ L になるように調製した。用いたプライマーの配列を下記に示す (表 4)。

表 4. 本論文で使用したプライマー配列

	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>MID</i>	AAACCTGATGCCGAATGGGTGAGA	ACTCTCCGAAGTGCCTTCGTTCAA
<i>MTDI</i>	TTGAGAATCTGTCTTGCAACGTGTC	GCTGCTAGCTCAATCTGACTGAAGG
<i>GSMI</i>	ACGACAACCTTCGTGTGGCCCTA	TTAATCTGCGTGTGTTTCAGCGCC
<i>SAG</i>	CTGCCAATAGCGTGTGTTGTGGTGT	CTACTGCCGTTTGTGTTGTTGCCT
<i>FUS</i>	TCAGCCAATCGTTGTGGGTGTCTA	TGGTAGCGTTTGGGTTGAATGTGC
<i>CRYI</i>	GAAACTATTTGCGCGTCAC	CAGTGATGCCAGCTCCT

MID、*GSMI*、*SAG*、*FUS* 遺伝子のプライマー配列は Nishimura et al., 2012 に基づく

12. RNA-seq 解析

ポリ(A)⁺-RNA は全 RNA から PolyAtract mRNA Isolation System III (Promega) を用いて精製した。精製した RNA を 2100 Bio-analyzer (Agilent Technologies) で定量し、80 ng の mRNA を用いて NEBNext mRNA library prep kit for Illumina (New England BioLabs) による cDNA ライブラリー作成を行った。二本鎖 cDNA 反応産物を Covaris S2 sonication system (Covaris) を用いて平均 300 bp 長に断片化した。Illumina HiSeq 2500 system によりリード長 100 bp でペアエンドシーケンスを行い、Illumina analysis pipeline (CASAVA 1.8.0) により生データを処理した。シーケンスデータは Phytozome database (Phytozome

database: http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/#!info?alias=Org_Creihardtii) に登録されているクラミドモナスの転写産物データ version 5.5 に対して Bowtie software package (Langmead et al., 2009) を用いてマッピングした。この時 100 bp あたり 2 bp のミスマッチを許容した。生物学的反復を取るためのサンプル数は 2 で、これらから各条件、株における reads per kilobase per million mapped reads (RPKM) を算出した。Bioconductor package, DESeq (Anders and Huber, 2010) を用いて各遺伝子において、培養条件間、株間での発現変動の有意差検定を行い、 q 値を算出した。Phytozome database に登録されているクラミドモナスタンパクデータ version 5.5 の GO 情報に基づき Blast2GO (Conesa et al., 2005) により false discovery rate < 0.05 の基準で機能濃縮解析を行った。

13. *in vitro* リン酸化アッセイとリン酸化プロテオーム解析

in vitro キナーゼ反応では、TP+N または TP-N 条件下で 6 時間培養した WT 細胞から全タンパク質を抽出した。回収した細胞を、EDTA を含まない protease inhibitor (Roche) を含む PBS バッファーに懸濁し、氷上で 1 分間の超音波処理によって破碎した。破碎液を 1,500 g、10 分間、4°C で遠心し、上清を回収して脱リン酸化処理に供した。脱リン酸化のために、100 μ g の抽出タンパク質を 1 μ L のアルカリホスファターゼで 37°C で 1 時間反応させ、75°C で 30 分間加熱することにより失活させた (Imamura et al., 2014)。リン酸化アッセイは以下のように行った。80 mM リン酸カリウム (pH 7.5)、20 mM 塩化マグネシウム、100 μ M ATP、370 kBq [γ ³²-P]-ATP (222 TBq mmol⁻¹, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)、0.5 μ g 精製組み換えタンパク (Kajikawa et al., 2015 ; TAR1 もしくは TAR1^{KD}) そして 20 μ g の脱リン酸化処理したクラミドモナス総タンパク質の混合液を 30°C で 1 時間反応させた。ポジティブコントロールとして 0.2 μ g の myelin basic protein (M1819, Sigma-Aldrich) を使用し、ネガティブコントロールとして滅菌水を使用した。反応液を 95°C で 5 分間処理して酵素を失活させ、SDS-PAGE により反応液を泳動し、分画した。CBB Stain One (Nacalai Tesque) により染色した後、FLA3000 imaging analyzer (Fuji Film) によりリン酸化タンパク質を検出した。リン酸化プロテオーム解析に供する反応物は、[γ ³²-P]-ATP を加えずに上記の反応を行ったサンプルを使用した。

リン酸化プロテオーム解析に供するリン酸化ペプチドのジメチルラベル法、TiO₂-based hydroxyl acid-modified metal oxide chromatography (Ti-HAMMOC) による濃縮法は既報 (Sugiyama et al. 2008 ; Imamura et al. 2014) に基づく。前処理したリン酸化ペプチドを質量分析計システム Q exactive hybrid quadrupole-Orbitrap mass spectrometer

(Thermo Fisher Scientific) により測定した。2,400 V のスプレーボルテージでサンプルを噴霧し、マススキャン範囲は m/z 300–1,500 で、上位 10 ピークの前駆イオンを MS スキャンにおいて選択した。検出されたリン酸化ペプチドは Mascot version 2.4 によりクラミドモナスタタンパクデータ version 5.5 を利用してアノテーションされた。

14. *in vivo* リン酸化プロテオーム解析

TP+N または TP-N 条件下で 6 時間培養した WT、*tar1-1* そして C1 の培養液 200 mL 分から細胞を回収し、液体窒素で凍結した。凍結保存したサンプルを Shake Master Neo (Bio Medical Science) により破砕し、8 M 尿素、0.1 M Tris-HCl (pH 9.0)、protein phosphatase inhibitor cocktails1、2 (Sigma-Aldrich) の溶液と氷上で混合した。混合液を 1,500 g で 10 分間遠心し、上清を回収した。上清のタンパク濃度を bicinchoninic acid protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) により測定した。上清を 10 mM ジチオトレイトールで 30 分間処理して還元し、50 mM ヨードアセトアミドで 30 分間アルカリ処理した後 Lys-C (1:200、w/w) で 3 時間ペプチドを切断し、さらに 50 mM 炭酸水素アンモニウムで希釈してトリプシン (1:100、w/w) で一晩切断処理した。切断処理したサンプルにトリフルオロ酢酸を添加して酸性化し、StageTips with C18 Empore disc membranes (3M) (Rappsilber et al. 2003) で脱塩処理した。処理後のリン酸化ペプチドを Ti-HAMMOC 法 (Sugiyama et al., 2008) により濃縮し、LC-MS/MS 解析に供した。2,400 V のスプレーボルテージでサンプルを噴霧し、マススキャン範囲は m/z 300–1,400 で、上位 10 ピークの前駆イオンを MS スキャンにおいて選択した。検出されたリン酸化ペプチドは Mascot version 2.4 ソフトウェアによりクラミドモナスタタンパクデータ version 5.5 を利用してアノテーションされた。

参考文献

- Altafaj, X., Dierssen, M., Baamonde, C., Martí, E., Visa, J., Guimerà, M. J., Oset, M., González, J.R., Flórez, J., Fillat, C. and Estivill, X. (2001) Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 10: 1915–1923.
- Anders, S. and Huber, W. (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 11: R106.
- Aranda, S., Laguna, A. and Luna, S. (2011) DYRK family of protein kinases: evolutionary relationships, biochemical properties, and functional roles. *FASEB J.* 25: 449–62.
- Aro, E.M., McCaffery, S. and Anderson, J.M. (1993) Photoinhibition and D1 protein degradation in peas acclimated to different growth irradiances. *Plant Physiol.* 103: 835–843.
- Bajhaiya, A.K., Dean, A.P., Zeef, L.A.H., Webster, R.E. and Pittman, J.K. (2015) PSR1 is a global transcriptional regulator of phosphorus deficiency responses and carbon storage metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 170: 1216–1234.
- Bahler, J. and Nurse, P. (2001) Fission yeast Pom1p kinase activity is cell cycle regulated and essential for cellular symmetry during growth and division. *EMBO J.* 20: 1064–1073.
- Baxter, A., Mittler, R. and Suzuki, N. (2014) ROS as key players in plant stress signalling. *J. Exp. Bot.* 65: 1229–1240.
- Bechtold, U. and Field, B. (2018) Molecular mechanisms controlling plant growth during abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 69: 2753–2758.
- Becker, W., Weber, Y., Wetzels, K., Eirmbter, K., Tejedor, F. J. and Joost, H. G. (1998) Sequence characteristics, subcellular localization, and substrate specificity of DYRK-related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases. *J Biol Chem.* 273: 25893–25902.
- Blaby, I.K., Glaesener, A.G., Mettler, T., Fitz-Gibbon, S.T., Gallaher, S.D., Liu, B., Boyle, N.R., Kropat, J., Stitt, M., Johnson, S., Benning, C., Pellegrini, M., Casero, D. and Merchant, S.S. (2013) Systems-Level Analysis of Nitrogen Starvation-Induced Modifications of Carbon Metabolism in a *Chlamydomonas reinhardtii* Starchless Mutant. *Plant Cell* 25: 4305–4323.
- Blaby, I.K., Blaby-Haas, C.E., Pérez-Pérez, M.E., Schmollinger, S., Fitz-Gibbon, S., Lemaire, S.D. and Merchant, S.S. (2015) Genome-wide analysis on *Chlamydomonas reinhardtii* reveals the impact of hydrogen peroxide on protein stress responses and overlap with other stress transcriptomes. *Plant J.* 84: 974–988.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911–917.
- Boyle, N.R., Page, M.D., Liu, B., Blaby, I.K., Casero, D., Kropat, J., Cokus, S.J., Hong-Hermesdorf, A., Shaw, J., Karpowicz, S.J., Gallaher, S.D., Johnson, S., Benning, C., Pellegrini, M., Grossman, A. and Merchant, S.S. (2012) Three acyltransferases and nitrogen-responsive regulator are implicated in nitrogen starvation-induced triacylglycerol accumulation in *Chlamydomonas*. *J. Biol. Chem.* 287: 15811–25.

- Bulté, L. and Wollman, F. A. (1992) Evidence for a selective destabilization of an integral membrane protein, the cytochrome *b₆/f* complex, during gametogenesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem.* 204: 327–336.
- Çakmak, Z.E., Ölmez, T.T., Çakmak, T., Menemen, Y. and Tekinay, T. (2015) Antioxidant response of *Chlamydomonas reinhardtii* grown under different element regimes. *Phycol. Res.* 63: 202–211.
- Chochois, V., Constans, L., Dauvillée, D., Beyly, A., Solivérès, M., Ball, S., Peltier, G. and Cournac, L. (2010) Relationships between PSII-independent hydrogen bioproduction and starch metabolism as evidenced from isolation of starch catabolism mutants in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int. J. Hydrogen Energ.* 35: 10731–40.
- Colina, F., Amaral, J., Carbó, M., Pinto, G., Soares, A., Cañal, M.J. and Valledor, L. (2019) Genome-wide identification and characterization of CKIN / SnRK gene family in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci. Rep.* 23: 1–16
- Comparot, S., Lingiah, G., and Martin, T. (2003) Function and specificity of 14-3-3 proteins in the regulation of carbohydrate and nitrogen metabolism. *J. Exp. Bot.* 54: 595–60.
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J.M., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M. and Robles, M. (2005) Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21: 3674–3676.
- Coruzzi, G.M., and Zhou, L. (2001). Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging 'matrix effects'. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:247–253.
- Couso, I., Evans, B., Li, J., Liu, Y., Ma, F., Diamond, S., Allen, D.K., Umen, J. G. (2016) Synergism between inositol polyphosphates and TOR kinase signaling in nutrient sensing, growth control and lipid metabolism in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 28: 2026–2042.
- Couso, I., Pérez-Pérez, M.E., Martínez-Force, E., Kim, H.S., He, Y., Umen, J.G. and Crespo, J. L. (2018) Autophagic flux is required for the synthesis of triacylglycerols and ribosomal protein turnover in *Chlamydomonas*. *J. Exp. Bot.* 69: 1355–1367.
- Crespo, J.L., Díaz-Troya, S. and Florencio, F.J. (2005) Inhibition of target of rapamycin signaling by rapamycin in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 139: 1736–1749.
- Deng, X., Li, Y. and Fei, X. (2011) The mRNA abundance of *pepc2* gene is negatively correlated with oil content in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biomass and Bioenergy* 35: 1811–1817.
- Deng, X., Cai, J. and Fei, X. (2013) Effect of the expression and knockdown of citrate synthase gene on carbon flux during triacylglycerol biosynthesis by green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC Biochem.* 14: 38
- Deng, X., Cai, J., Li, Y. and Fei, X. (2014) Expression and knockdown of the *PEPC1* gene affect carbon flux in the biosynthesis of triacylglycerols by the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol Lett.* 36: 2199-2208.
- Deprost, D., Yao, L., Sormani, R., Moreau, M., Leterreux, G., Nicolai, M., Bedu, M., Robaglia, C., and Meyer, C. (2007). The *Arabidopsis* TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Rep.* 8: 864–870.

- Dobrenel, T., Caldana, C., Hanson, J., Robaglia, C., Vincentz, M., Veit, B. and Meyer, C. (2016) TOR signaling and nutrient sensing. *Annu. Rev. Plant Biol.* 67: 261–285.
- Du, Z., Lucker, B.F., Zienkiewicz, K., Miller, T.E., Zienkiewicz, A., Sears, B.B., Kramer, D.M. and Benning, C. (2018) Galactoglycerolipid lipase PGD1 is involved in thylakoid membrane remodeling in response to adverse environmental conditions in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 30: 447–465.
- Fan, J., Yan, C., Andre, C., Shanklin, J., Schwender, J. and Xu, C. (2012) Oil accumulation is controlled by carbon precursor supply for fatty acid synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* 53: 1380–1390.
- Ferris, P.J., Woessner, J.P. and Goodenough, U.W. (1996) A sex recognition glycoprotein is encoded by the *plus* mating-type gene *fus1* of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Biol. Cell.* 7: 1235–1248.
- Ferris, P.J., Waffenschmidt, S., Umen, J.G., Lin, H., Lee, J.H., Ishida, K., Kubo, T., Lau, J. and Goodenough, U.W. (2005) *Plus* and *minus* sexual agglutinins from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell.* 17: 597–615.
- Fuchs, S., Grill, E., Meskiene, I. and Schweighofer, A. (2013) Type 2C protein phosphatases in plants. *FEBS J.* 280: 681–693.
- Fujii, H., and Zhu, J.K. (2009). *Arabidopsis* mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 8380–8385.
- Gargouri, M., Bates, P.D., Park, J.J., Kirchoff, H. and Gang, D.R. (2017) Biotechnology for Biofuels Functional photosystem I maintains proper energy balance during nitrogen depletion in *Chlamydomonas reinhardtii* promoting triacylglycerol accumulation. *Biotechnol. Biofuels* 1–21.
- Goncalves, E.C., Koh, J., Zhu, N., Yoo, M.J., Chen, S., Matsuo, T., Johnson, J. V. and Rathinasabapathi, B. (2016) Nitrogen starvation-induced accumulation of triacylglycerol in the green algae: Evidence for a role for ROC40, a transcription factor involved in circadian rhythm. *Plant J.* 85: 743–757.
- Goold, H.D., Cuiné, S., Legeret, B., Liang, Y., Brugière, S., Auroy, P., Javot, H., Tardif, M., Jones, B.J., Beisson, F., Peltier, G., and Li-Beisson, Y. (2016) Saturating light induces sustained accumulation of oil in plastidal lipid droplets in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 171: 2406–2417.
- Gonzalez, A. and Hall, M.N. (2017) Nutrient sensing and TOR signaling in yeast and mammals. *EMBO J.* 36: 397–408.
- Goodenough, U.W. (1992) Green yeast. *Cell*, 70: 533–538
- Greiner, A., Kelterborn, S., Evers, H., Kreimer, G., Sizova, I. and Hegemann, P. (2017) Targeting of photoreceptor genes in *Chlamydomonas reinhardtii* via zinc-finger nucleases and CRISPR/Cas9. *Plant Cell* 29: 2498–2518.
- Halford, N.G. and Hey, S.J. (2009). Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochem. J.* 419: 247–259
- Harris, E.H. (1989) *The Chlamydomonas Source Book: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*. San Diego: CA: Academic Press.
- Harris, E.H. (2009) *Chlamydomonas* in the laboratory. In D Stern, EH Harris, eds, *The Chlamydomonas*

Source Book: Introduction to *Chlamydomonas* and Its Laboratory Use, Ed 2, Vol 1. Elsevier, Dordrecht, The Netherlands, pp 241–302.

Heitman, J., Movva, N.R. and Hall, M.N. (1991) Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253: 905–909.

Helliwell, S.B., Wagner, P., Kunz, J., Deuter-Reinhard, M., Henriquez, R. and Hall, M.N. (1994) TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Mol. Biol. Cell* 5: 105–118.

Henston, D. (2007) Algae bloom again. *Nature*, 447: 520–521.

Ho, C.H., Lin, S.H., Hu, H.C., and Tsay, Y.F. (2009). CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* 138:1184–1194.

Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. and Darzins, A. (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54: 621–639.

Hu, H.C., Wang, Y.Y., and Tsay, Y.F. (2009). AtCIPK8, a CBL-interacting protein kinase, regulates the low-affinity phase of the primary nitrate response. *Plant J.* 57:264–278.

Huang, W.Y., Wu, Y.C., Pu, H.Y., Wang, Y., Jang, G.J. and Wu, S.H. (2017) Plant dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase optimizes light-regulated growth and development in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 40: 1735–1747.

Hulsmans, S., Rodriguez, M., De Coninck, B. and Rolland, F. (2016) The SnRK1 energy sensor in plant biotic interactions. *Trends Plant Sci.* 21: 648–661.

Imamura, H., Wakabayashi, M. and Ishihama, Y. (2012) Analytical strategies for shotgun phosphoproteomics: status and prospects. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 23: 836–842.

Imamura, S., Ishiwata, A., Watanabe, S., Yoshikawa, H. and Tanaka, K. (2013) Expression of budding yeast FKBP12 confers rapamycin susceptibility to the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 439: 264–269.

Imamura, S., Kawase, Y., Kobayashi, I., Sone, T., Era, A., Miyagishima, S.Y., Shimojima, M., Ohta, H. and Tanaka, K. (2015) Target of rapamycin (TOR) plays a critical role in triacylglycerol accumulation in microalgae. *Plant Mol. Biol.* 89: 309–318.

Ishida, H., Yoshimoto, K., Izumi, M., Reisen, D., Yano, Y., Makino, A., Ohsumi, Y., Hanson, M. R. and Mae, T. (2008) Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. *Plant Physiol.* 148: 142–155.

Iwai, M., Ikeda, K., Shimojima, M. and Ohta, H. (2014) Enhancement of extraplastidic oil synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* using a type-2 diacylglycerol acyltransferase with a phosphorus starvation-inducible promoter. *Plant Biotechnol. J.* 12: 808–819.

Johnson, X. and Alric, J. (2013) Central carbon metabolism and electron transport in *Chlamydomonas reinhardtii*: Metabolic constraints for carbon partitioning between oil and starch. *Eukaryot. Cell.* 12: 776–793.

- Juergens, M. T., Deshpande, R. R., Lucker, B. F., Park, J. J., Wang, H., Gargouri, M. (2015) The regulation of photosynthetic structure and function during nitrogen deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 167: 558–573.
- Juergens, M.T., Disbrow, B. and Shachar-Hill, Y. (2016) The relationship of triacylglycerol and starch accumulation to carbon and energy flows during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 171: 2445–2457.
- Kajikawa, M., Sawaragi, Y., Shinkawa, H., Yamano, T., Ando, A., Kato, M., Hirono, M., Sato, N. and Fukuzawa, H. (2015) Algal dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase, triacylglycerol accumulation regulator1, regulates accumulation of triacylglycerol in nitrogen or sulfur deficiency. *Plant Physiol.* 168: 752–764.
- Kajikawa, M., Yamauchi, M., Shinkawa, H., Tanaka, M., Hatano, K., Nishimura, Y., Kato, M., Fukuzawa, H. (2018) Isolation and characterization of *Chlamydomonas* autophagy-related mutants in nutrient-deficient conditions. *Plant Cell Physiol.* 60: 126–138.
- Kannan, N. and Neuwald, A.F (2004) Evolutionary constraints associated with functional specificity of the CMGC protein kinases MAPK, CDK, GSK, SRPK, DYRK, and CK2 α . *Protein. Science*, 13: 2059-2077.
- Kato, Y. and Sakamoto, W. (2014) Phosphorylation of photosystem II core proteins prevents undesirable cleavage of D1 and contributes to the fine-tuned repair of photosystem II. *Plant J.* 79: 312–321.
- Kettenbach, A.N., Deng, L., Wu, Y., Baldissard, S., Adamo, M.E., Gerber, S.A. and Moseley, J.B. (2015) Quantitative phosphoproteomics reveals pathways for coordination of cell growth and division by the conserved fission yeast kinase Pom1, *Mol. Cell. Proteomics*, 14: 1275–1287.
- Kim D, Ntui, V.O. and Xiong, L. (2016) Arabidopsis YAK1 regulates abscisic acid response and drought resistance. *FEBS Lett.* 590: 2201–2209.
- Kimura M. and Ishikawa T (2018) Suppression of DYRK ortholog expression affects wax ester fermentation in *Euglena gracilis*. *J Appl Phycol* 30: 367–373.
- Kline, K.G., Barrett-wilt, G.A. and Sussman, M.R. (2010) In planta changes in protein phosphorylation induced by the plant hormone abscisic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 15986–15991.
- Kong, F., Liang, Y., Légeret, B., Beyly-Adriano, A., Blangy, S., Haslam, R.P., Napier, J.A., Beisson, F., Peltier, G. and Li-Beisson, Y. (2017) *Chlamydomonas* carries out fatty acid β -oxidation in ancestral peroxisomes using a *bona fide* acyl-CoA oxidase. *Plant J.* 90: 358–371.
- Kong, F., Burlacot, A., Liang, Y., Legeret, B., Alseekh, S., Brotman, Y., Fernie, A.R., Krieger-Liszkay, A., Beisson, F., Peltier, G. and Li-Beisson, Y. (2018) Interorganelle communication: peroxisomal MALATE DEHYDROGENASE 2 connects lipid catabolism to photosynthesis through redox coupling in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 30: 1824–1847.
- Kropat, J., Hong-Hermesdorf, A., Casero, D., Ent, P., Castruita, M., Pellegrini, M., Merchant, S.S. and Malasarn, D. (2011) A revised mineral nutrient supplement increases biomass and growth rate in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 66: 770–780.
- Kurusu, T., Kuchitsu, K. and Tada, Y. (2015) Plant signaling networks involving Ca²⁺ and Rboh/Nox-mediated ROS production under salinity stress. *Front Plant Sci.* 6: 1–8.

- Lee, P., Cho, B.R., Joo, H.S. and Hahn, J.S (2008) Yeast Yak1 kinase, a bridge between PKA and stress-responsive transcription factors, Hsf1 and Msn2/Msn4. *Mol. Microbiol.* 70: 882-895.
- Li, Y., Han, D., Hu, G., Sommerfeld, M. and Hu, Q. (2010) Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol. Bioeng.* 107: 258–268.
- Li, X., Moellering, E.R., Liu, B., Johnny, C., Fedewa, M., Sears, B.B., Kuo, M.H., Benning, C. (2012a) A galactoglycerolipid lipase is required for triacylglycerol accumulation and survival following nitrogen deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell.* 24: 4670–4686.
- Li, X., Benning, C. and Kuo, M.H. (2012b) Rapid triacylglycerol turnover in *Chlamydomonas reinhardtii* requires a lipase with broad substrate specificity. *Eukaryot. Cell* 11: 1451–1462.
- Li, X., Zhang, R., Patena, W., Gang, S.S., Blum, S.R., Ivanova, N., Yue, R., Robertson, J.M., Lefebvre, P.A., Fitz-Gibbon, S.T., Grossman, A.R. and Jonikas, M.C.(2016) An Indexed, Mapped Mutant Library Enables Reverse Genetics Studies of Biological Processes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 28: 367–387.
- Lin, H. and Goodenough, U.W. (2007) Gametogenesis in the *Chlamydomonas reinhardtii minus* mating type is controlled by two genes, *MID* and *MTD1*. *Genetics.* 176: 913–925.
- Liu, J., Han, D., Yoon, K., Hu, Q. and Li, Y. (2016) Characterization of type 2 diacylglycerol acyltransferases in *Chlamydomonas reinhardtii* reveals their distinct substrate specificities and functions in triacylglycerol biosynthesis. *Plant J.* 86: 3–19.
- Lochhead, P.A., Sibbet, G., Kinstrie, R., Cleghon, T., Rylatt, M., Morrison, D.K. and Cleghon, V. (2003) dDYRK2: a novel dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase in *Drosophila*. *Biochem. J.* 374: 381–391.
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J.L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P. and Hall, M.N. (2002) Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol. Cell,* 10: 457–468.
- Lu Y, Sasaki Y, Li X, Mori IC, Matsuura T, Hirayama T, Sato T. and Yamaguchi J, J (2015a) ABI1 regulates carbon/nitrogen-nutrient signal transduction independent of ABA biosynthesis and canonical ABA signalling pathways in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.*, 66: 2763–2771.
- Lu, Y. and Xu, J. (2015b) Phytohormones in microalgae : a new opportunity for Phytohormones in microalgae, *Trends Plant Sci.* 20: 273–282
- Luan, S. (2009) The CBL-CIPK network in plant calcium signaling. *Trends Plant Sci.* 14: 37–42.
- Lynch, T., Erickson, B.J. and Finkelstein, R.R. (2012) Direct interactions of ABA-insensitive(ABI)-clade protein phosphatase(PP)2Cs with calcium-dependent protein kinases and ABA response element-binding bZIPs may contribute to turning off ABA response. *Plant Mol. Biol.* 80: 647–658.
- Martin, N. C. and U. W. Goodenough. (1975) Gametic differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*. I. Production of gametes and their fine structure. *J. Cell Biol.* 67: 587–605.
- Martin, D.E., Souillard, A. and Hall, M.N. (2004) TOR regulates ribosomal protein gene expression via PKA and the forkhead transcription factor FHL1. *Cell* 119: 969–979.

Merchant, S.S., Kropat, J., Liu, B., Shaw, J. and Warakanont, J. (2012) TAG, You're it! *Chlamydomonas* as a reference organism for understanding algal triacylglycerol accumulation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23: 352–363.

Mitchell, D.R. (2000) *Chlamydomonas* flagella, *J. Phycol.* 36: 261–273.

Miller, R., Wu, G., Deshpande, R.R., Vieler, A., Gärtner, K., Li, X., Cornish, A.J., Liu, B., Bullard, B., Sears, B.B., Kuo, H.M., Hegg, L.E., Shachar-Hill, Y., Shiu, H.S. and Benning, C. (2010) Changes in transcript abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following nitrogen deprivation predict diversion of metabolism. *Plant Physiol.* 154: 1737–1752.

Moellering, E.R. and Benning, C. (2010) RNA interference silencing of a major lipid droplet protein affects lipid droplet size in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* 9: 97–106.

Moriya, H., Shimizu-Yoshida, Y., Omori, A., Iwashita, S., Katoh, M. and Sakai, A. (2001) Yak1p, a DYRK family kinase, translocates to the nucleus and phosphorylates yeast Pop2p in response to a glucose signal. *Genes Dev.* 15: 1217–1228.

Msanne, J., Xu, D., Konda, A.R., Casas-Mollano, J.A., Awada, T., Cahoon, E.B. and Cerutti, H. (2012) Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Coccomyxa* sp. C-169. *Phytochemistry* 75: 50–59.

Mubeen, U., Juppner, J., Alpers, J., Hinch, D.K. and Giavalisco, P. (2018) Target of rapamycin inhibition in *Chlamydomonas reinhardtii* triggers *de-novo* amino acid synthesis by enhancing nitrogen assimilation. *Plant Cell* 30: 2240–2254.

Mukaida, S., Ogawa, T., Ohishi, K., Tanizawa, Y., Ohta, D. and Arita, M. (2016) The effect of rapamycin on biodiesel-producing protist *Euglena gracilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80: 1223–1229.

Nakagami, H., Pitzschke, A. and Hirt, H. (2005) Emerging MAP kinase pathways in plant stress signaling. *Trends Plant Sci.*, 10: 339–346.

Ngan, C.Y., Wong, C.H., Choi, C., Yoshinaga, Y., Louie, K., Jia, J., Chen, C., Bowen, B., Cheng, H., Leonelli, L., Kuo, R., Baran, R., García-Cerdán, G. J., Pratap, A., Wang, M., Lim, J., Tice, H., Daum, C., Xu, J., Northen, T., Visel, A., Bristow, J., Niyogi, K.K. and Wei, C.L. (2015) Lineage-specific chromatin signatures reveal a regulator of lipid metabolism in microalgae. *Nat. Plants* 1: 1–11.

Nishimura, Y., Shikanai, T., Nakamura, S., Kawai-Yamada, M. and Uchimiya, H. (2012) Gsp1 triggers the sexual developmental program including inheritance of chloroplast DNA and mitochondrial DNA in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell.* 24: 2401–2414.

Nishimura, T., Sato, F. and Ifuku, K. (2017) In vivo system for analyzing the function of the PsbP protein using *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth Res.* 133: 117–127.

Park, J.J., Wang, H., Gargouri, M., Deshpande, R.R., Skepper, J.M., Holguin, O., Juergens, M.T., Shachar-Hill, Y. and Hicks, L.M. (2015) The response of *Chlamydomonas reinhardtii* to nitrogen deprivation: a systems biology analysis. *Plant J.* 81: 611–624.

Pérez-Pérez, M.E., Florencio, F.J. and Crespo, J.L. (2010) Inhibition of target of rapamycin signaling and stress activate autophagy in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 152: 1874–1888.

- Pérez-Pérez, M.E., Lemaire, S.D. and Crespo, J.L. (2012) Reactive oxygen species and autophagy in plants and algae. *Plant Physiol.* 160: 156–164.
- Pérez-Martín M, Pérez-Pérez M.E., Lemaire S.D. and Crespo J.L. (2014) Oxidative stress contributes to autophagy induction in response to endoplasmic reticulum stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 166: 997–1008.
- Pérez-Pérez, M.E., Couso, I. and Crespo, J.L. (2017) The TOR signaling network in the model unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biomolecules* 7: 1–13.
- Plancke, C., Vigeolas, H., Höhner, R., Roberty, S., Emonds-Alt, B., Larosa, V., Willamme, R., Duby, F., Dhali, D.O., Thonart, P., Hiligsmann, S., Franck, F., Eppe, G., Cardol, P., Hippler, M. and Remacle, C. (2014) Lack of isocitrate lyase in *Chlamydomonas* leads to changes in carbon metabolism and in the response to oxidative stress under mixotrophic growth. *Plant J.* 77: 404–417.
- Plumley, F.G., Schmidt, G.W. (1989) Nitrogen-dependent regulation of photosynthetic gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2678–2682.
- Pootakham, W., Gonzalez-Ballester, D. and Grossman, A. R. (2010) Identification and regulation of plasma membrane sulfate transporters in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol.* 153: 1653-1668.
- Raich, W. B., Moorman, C., Lacefield, C. O., Lehrer, J., Bartsch, D., Plasterk, R. H., Kandel, E. R. and Hobert, O. (2003) Characterization of *Caenorhabditis elegans* homologs of the down syndrome candidate gene DYRK1A. *Genetics* 163: 571–580.
- Riekhof, W.R., Sears, B.B., Benning, C. (2005) Annotation of genes involved in glycerolipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: Discovery of the betaine lipid synthase BTA1_{Cr}. *Eukaryot. Cell* 4: 242–252.
- Rodriguez, M.C.S., Petersen, M. and Mundy, J. (2010) Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 621–649.
- Sager, R. and Granick, S. (1953) Nutritional studies with *Chlamydomonas reinhardi*. *Ann. N. Y. Acad.Sci.* 56: 831–838.
- Sager, R. and Granick, S. (1954) Nutritional control of sexuality in *Chlamydomonas reinhardi*. *J. Gen. Physiol.* 65: 729–742.
- Sakurai, K., Moriyama, T. and Sato, N. (2014) Detailed identification of fatty acid isomers sheds light on the probable precursors of triacylglycerol accumulation in photoautotrophically grown *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* 13: 256–266.
- Sarkar, N., Lemaire, S., Wu-Scharf, D., Issakidis-Bourguet, E. and Cerutti, H. (2005) Functional specialization of *Chlamydomonas reinhardtii* cytosolic thioredoxin h1 in the response to alkylation-induced DNA damage. *Eukaryot. Cell* 4: 262–273.
- Saroussi, S., Sanz-luque, E., Kim, R.G. and Grossman, A.R. (2017) Nutrient scavenging and energy management : acclimation responses in nitrogen and sulfur deprived *Chlamydomonas*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 39: 114–122.
- Sato, T., Maekawa, S., Yasuda, S., Sonoda, Y., Katoh, E., Ichikawa, T., Nakazawa, M., Seki, M., Shinozaki, K., Matsui, M., Goto, B. D., Ikeda, A. and Yamaguchi, J. (2009) CNI1/ATL31, a RING-type

ubiquitin ligase that functions in the carbon/nitrogen response for growth phase transition in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.* 60: 852–864.

Sato, T., Maekawa, S., Yasuda, S., Domeki, Y., Sueyoshi, K., Fujiwara, M., Fukao, Y., Goto, D.B. and Yamaguchi, J. (2011) Identification of 14-3-3 proteins as a target of ATL31 ubiquitin ligase, a regulator of the C/N response in *Arabidopsis*. *Plant J.* 68: 137–146.

Schmollinger, S., Mühlhaus, T., Boyle, N.R., Blaby, I.K., Casero, D., Mettler, T., Moseley, L.J., Kropat, J., Sommer, F., Strenkert, D., Hemme, D., Pellegrini, M., Grossman, A.R., Stitt, M., Schroda, M. and Merchant, S.S. (2014) Nitrogen-sparing mechanisms in *Chlamydomonas* affect the transcriptome, the proteome, and photosynthetic metabolism. *Plant Cell* 26: 1410–1435.

Schatz, D., Shemi, A., Rosenwasser, S., Sabanay, H., Wolf, S.G., Ben-Dor, S. and Vardi, A. (2014) Hijacking of an autophagy-like process is critical for the life cycle of a DNA virus infecting oceanic algal blooms. *New Phytol.* 204: 854–863.

Schulz-Raffelt, M., Chochois, V., Auroy, P., Cuiné, S., Billon, E., Dauvillée, D., Li-Beisson, Y. and Peltier, G. (2016) Hyper-accumulation of starch and oil in a *Chlamydomonas* mutant affected in a plant-specific DYRK kinase. *Biotechnol. Biofuels.* 9: 55.

Shao, N., Duan, G.Y. and Bock, R. (2013) A mediator of singlet oxygen responses in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Arabidopsis* identified by a luciferase-based genetic screen in algal cells. *Plant Cell.* 25: 4209–4226.

Shashkova, S., Welkenhuysen, N. and Hohmann, S. (2015) Molecular communication: crosstalk between the Snf1 and other signaling pathways. *FEMS Yeast Res.* 15: 1–10.

Shemi, A., Ben-Dor, S. and Vardi, A. (2015) Elucidating the composition and conservation of the autophagy pathway in photosynthetic eukaryotes. *Autophagy* 11: 701–715.

Shi, L., Wu, Y. and Sheen, J. (2018) TOR signaling in plants : conservation and innovation. 8: 1–13.

Shin, R., Alvarez, S., Burch, A.Y., Jez, J.M., and Schachtman, D.P. (2007). Phosphoproteomic identification of targets of the *Arabidopsis* sucrose nonfermenting-like kinase SnRK2.8 reveals a connection to metabolic processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 6460–6465.

Shinkawa, H., Kajikawa, M., Nomura, Y., Ogura, M., Sawaragi, Y., Yamano, T., Nakagami, H., Sugiyama, N., Ishihama, Y., Kanesaki, Y., Yoshikawa, H. and Fukuzawa, H. (2019) Algal Protein Kinase, Triacylglycerol Accumulation Regulator1, modulates cell viability and gametogenesis in carbon/nitrogen-imbalanced conditions. *Plant Cell Physiol.* 60: 916–930.

Shtaida, N., Khozin-Goldberg, I., Solovchenko, A., Chekanov, K., Didi-Cohen, S., Leu, S., Cohen, Z. and Boussiba, S. (2014) Downregulation of a putative plastid PDC E1 α subunit impairs photosynthetic activity and triacylglycerol accumulation in nitrogen-starved photoautotrophic *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Exp. Bot.* 65: 6563–6576.

Siaut, M., Cuiné, S., Cagnon, C., Fessle, B., Nguyen, M., Carrier, P., Beyly, A., Beisson, F., Triantaphylidès, C., Li-Beisson, Y. and Peltier, G. (2011) Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnol.* 11: 7.

Soto-Burgos, J. and Bassham, D.C. (2017) SnRK1 activates autophagy via the TOR signaling pathway in

Arabidopsis thaliana. *PLoS One* 12: e0182591.

Sugiyama, N., Nakagami, H., Mochida, K., Daudi, A., Tomita, M., Shirasu, K. et al. (2008) Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in *Arabidopsis*. *Mol. Syst. Biol.* 4: 193.

Takano, S., Pawlowska, B.J., Gudel, I., Yomo, T. and Tsuru, S. (2017) Density-dependent recycling promotes the long-term survival of bacterial populations during periods of starvation. *MBio*. 8: 1–14.

Tikkanen, M. and Aro, E.M. (2012) Thylakoid protein phosphorylation in dynamic regulation of photosystem II in higher plants. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.* 1817: 232–238.

Tsai, C.H., Warakanont, J., Takeuchi, T., Sears, B.B., Moellering, E.R. and Benning, C. (2014) The protein compromised hydrolysis of triacylglycerols 7 (CHT7) acts as a repressor of cellular quiescence in *Chlamydomonas*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 11: 15833-15838.

Tsai, C.H., Uygun, S., Roston, R., Shiu, S.H. and Benning, C. (2017) Recovery from N deprivation is a transcriptionally and functionally distinct state in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol.* 176: 2007–2023.

Vidal, E.A. and Gutiérrez, R.A. (2008) A systems view of nitrogen nutrient and metabolite responses in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 521–529.

Wang, Z.T., Ullrich, N., Joo, S., Waffenschmidt, S. and Goodenough, U. (2009) Algal lipid bodies: stress induction, purification, and biochemical characterization in wild-type and starchless *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* 8: 1856–1868.

Wang, L., Yamano, T., Kajikawa, M., Hirono, M. and Fukuzawa, H. (2014) Isolation and characterization of novel high-CO₂-requiring mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth. Res.* 121: 175–184.

Wang, L., Yamano, T., Takane, S., Niikawa, Y., Toyokawa, C., Ozawa, S., Tokutsu, R., Takahashi, Y., Minagawa, J., Kanesaki, Y., Yoshikawa, H. and Fukuzawa, H. (2016) Chloroplast-mediated regulation of CO₂-concentrating mechanism by Ca²⁺-binding protein CAS in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113: 12586–12591.

Wang, P., Zhao, Y., Li, Z., Hsu, C. C., Liu, X., Fu, L., Hou, Y. J., Du, Y., Xie, S., Zhang, C., Gao, J., Cao, M., Huang, X., Zhu, Y., Tang, K., Wang, X., Tao, W.A., Xiong, Y. and Zhu, J.K. (2018) Reciprocal regulation of the TOR kinase and ABA receptor balances plant growth and stress response. *Mol. Cell* 69: 100-112.

Weers, P.M.M. and Gulati, R.D. (1997) Growth and reproduction of *Daphnia galeata* in response to changes in fatty acids, phosphorus, and nitrogen in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Limnol. Oceanogr.* 42: 1584–1589.

Wei, L., Derrien, B., Gautier, A., Houille-Vernes, L., Boulouis, A., Saint-Marcoux, D. et al. (2014) Nitric oxide-triggered remodeling of chloroplast bioenergetics and thylakoid proteins upon nitrogen starvation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 26: 1–21.

Wintermans, J.F. and de Mot, A. (1965) Spectrophotometric characteristics of chlorophylls *a* and *b* and their pheophytins in ethanol. *Biochim. Biophys. Acta.* 109: 448–453.

Work, V.H., Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Meuser, J.E., Elliott, L.G., Vinyard, D.J., Laurens, L.M.L., Dismukes, G.C. and Posewitz, M.C. (2010) Increased lipid accumulation in the *Chlamydomonas*

reinhardtii sta7-10 starchless isoamylase mutant and increased carbohydrate synthesis in complemented strains. *Eukaryot. Cell* 9: 1251–1261.

Wu J.F., Wang Y. and Wu S.H. (2008) Two new clock proteins, LWD1 and LWD2, regulate Arabidopsis photoperiodic flowering. *Plant Physiol.* 148: 948–959.

Xiong, Y., McCormack, M., Li, L., Hall, Q., Xiang, C., and Sheen, J. (2013). Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature* 496: 181–186.

Yabut, O., Domogauer, J., D'Arcangelo, G. (2010) Dyrk1A overexpression inhibits proliferation and induces premature neuronal differentiation of neural progenitor cells, *J. Neurosci.* 30: 4004–4014.

Yamano, T., Miura, K. and Fukuzawa, H. (2008) Expression analysis of genes associated with the induction of the carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 147: 340–354.

Yamano, T., Iguchi, H. and Fukuzawa, H. (2013) Rapid transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* without cell-wall removal. *J. Biosci. Bioeng.* 115: 691–694

Yamaoka, Y., Achard, D., Jang, S., Legéret, B., Kamisuki, S., Ko, D., Schulz-Raffelt, M., Kim, Y., Song, W.Y., Nishida, I., Li-Beisson, Y. and Lee, Y. (2016) Identification of a *Chlamydomonas* plastidial 2-lysophosphatidic acid acyltransferase and its use to engineer microalgae with increased oil content. *Plant Biotechnol. J.* 14: 2158–2167.

Yasuda, S., Aoyama, S., Hasegawa, Y., Sato, T. and Yamaguchi, J. (2017) *Arabidopsis* CBL-interacting protein kinases regulate carbon/nitrogen-nutrient response by phosphorylating ubiquitin ligase ATL31. *Mol Plant* 10: 605–618.

Yoon, K., Han, D., Li, Y., Sommerfeld, M. and Hu, Q. (2012) Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase is a multifunctional enzyme involved in membrane lipid turnover and degradation while synthesizing triacylglycerol in the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 24: 3708–3724.

Yoshida, K., Igarashi, E., Mukai, M., Hirata, K. and Miyamoto, K. (2003) Induction of tolerance to oxidative stress in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, by abscisic acid. *Plant Cell Environ.* 26: 451–457.

Yoshida, K., Igarashi, E., Wakatsuki, E., Miyamoto, K. and Hirata, K. (2004) Mitigation of osmotic and salt stresses by abscisic acid through reduction of stress-derived oxidative damage in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci.* 167: 1335–1341.

Zalutskaya, Z., Kharatyan, N., Forchhammer, K. and Ermilova, E. (2015) Reduction of PII signaling protein enhances lipid body production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci.* 240: 1–9.

Zheng, Z., Xu, X., Crosley, R.A., Greenwalt, S.A., Sun, Y., Blakeslee, B., Wang, L., Ni, W., Sopko, M.S., Yao, C., et al. (2010). The protein kinase SnRK2.6 mediates the regulation of sucrose metabolism and plant growth in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 153: 99–113.

Zhu, S.Y., Yu, X.C., Wang, X.J., Zhao, R., Li, Y., Fan, R.C. et al. (2007) Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 3019–3036.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、指導教官であります福澤秀哉教授に心より感謝申し上げます。博士課程後期からの編入を希望した私を快く受け入れてくださり、根気強くご指導していただきました。梶川昌孝助教には研究を進めるにあたり、研究計画立案、実験操作、内外での研究成果発表、論文執筆など多岐にわたりご指導いただきました。山野隆志助教には本論文で用いた最大酸素発生速度の測定と、RNA-seq データのマッピング、DEG の q 値算出を行っていただきました。さらに日々の研究活動で異なる研究分野の視点から多角的なご指摘をいただきました。皆様には深く感謝致しております。また、卒業生の榎木悠里さんには本論文で用いた TAG 組成と極性脂質の定量実験を行っていただきました。私が編入した時、先行して *tar1-1* を解析していた榎木さんに福澤研究室での実験手法を教えてくださいました。

本研究を進める上で、多くの研究室外の方に大変お世話になりました。*in vitro* のリン酸化プロテオーム解析は京都大学 大学院薬学研究科の小椋真由さん、杉山直幸准教授、石濱泰教授、そして *in vivo* のリン酸化プロテオーム解析は理化学研究所（現 横浜市立大学）野村裕子さん、理化学研究所（現 Max planck institute）の中神弘史先生に行っていただきました。また、RNA-seq 解析は東京農業大学（現 静岡大学）兼崎友助教、東京農業大学の吉川博文教授に測定していただきました。この場を借りて深く感謝申し上げます。また、論文中で使用した抗体は、京都大学 大学院生命科学研究科の伊福健太郎助教、岡山大学の高橋裕一郎教授、近畿大学の田茂井政宏教授、北海道大学の田中歩教授に分与していただきました。特に伊福助教には抗体の分与だけでなく、PS-II の量子収率測定の指導、実験結果の議論についてご協力いただきました。

この研究を行うにあたり、お世話になった皆様へ心から感謝の気持ちと御礼を申し上げます。謝辞にかえさせていただきます。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて作成された。

Shinkawa, H., Kajikawa, M., Nomura, Y., Ogura, M., Sawaragi, Y., Yamano, T., Nakagami, H., Sugiyama, N., Ishihama, Y., Kanasaki, Y., Yoshikawa, H. and Fukuzawa, H. (2019) Algal Protein Kinase, Triacylglycerol Accumulation Regulator1, Modulates Cell Viability and Gametogenesis in Carbon/Nitrogen-Imbalanced Conditions. *Plant Cell Physiol.* 60: 916–930.