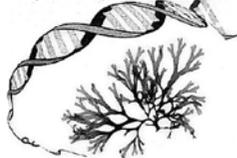


藻類学最前線



水圏の光合成を支える動的で柔らかいピレノイド

田中厚子

学生の頃、美しい電子顕微鏡写真に惹かれて始めたピレノイド研究は、その生物学的意義に対する質問を頂くことが多かった様に思う。藻類を研究していると「なんで藻類？」と聞かれることが多々あるが、ピレノイドを研究していた頃は藻類を研究されている方にまで「なんでピレノイド？」と聞かれることが幾度となくあった。それから長い時間が経ち、気がつけば生産力向上を目指して、陸上植物へのピレノイド導入試験が行われる時代になっていた。長く生きていくなあと、科学の発展スピードを讃えるべきか迷うところではあるが、筆者としては‘満を持して’ピレノイド研究の面白さをお伝えすべく、最新のピレノイド研究を紹介させて頂こうと思う。実は大型藻類の研究紹介を期待して執筆依頼を頂いたそうだが、筆者の無節操な性格に免じてお許し頂ければありがたい。

膜を持たない細胞小器官

細胞小器官とは細胞内で特定の機能を持つ構造体の総称であるが、一般的に思い出される細胞小器官は生体膜を伴うものが多い。葉緑体やミトコンドリアは包膜だけでなく内部にも存在する膜構造にタンパク質を固定することで適切な位置での機能発現を行い、リソソームや液胞は膜で包まれた内部に分解酵素やイオンを保持して反応を行う。その一方で膜を持たない細胞小器官 (proteinaceous membraneless organelles; PMLOs) も存在し、生体分子の濃縮体と合わせて 20 種類以上の構造が既に報告されている (Uversky 2017)。PMLO として代表的なのが核小体である。膜構造を持たない核小体にはタンパク質と RNA が大量に含まれており、非常に高い粘性を持つことで液滴として周囲の環境から隔絶されていると考えられている。この粘性は ATP 依存性があることから、エネルギーを使って動的に制御されているのだろう (Brangwynne *et al.* 2011)。このような膜を持たない“区分け (液-液相分離)”が細胞内の化学反応の場の形成として重要な役割を担うことが近年の研究で明らかとなってきた。そして藻類の細胞においてはピレノイドも代表的な PMLO とみなせることが分かってきたのだ。PMLO が細胞小器官として特定の機能を持つためには、膜構造を伴わない形での周辺との区分けが必須であるが、膜構造に依らない区分けを可能にするのが液-液相分離である。例えば、高濃度のポリエチレングリコールとデキストランを混ぜると溶液が二層に分かれるが、このようなポリマーの相分離は古典的な熱力学で説明できるとされている (Keating 2012)。高分子である物質 A と物質 B が高濃度で水に溶けている場合、均質な溶液になるか相分離するかはそれぞれの濃度に依存す

る (図 1)。さらに物質の相互作用の強度、温度、pH、イオン強度なども相分離の形成に影響があるとされている。液-液相分離の状態は識別が容易なものから困難なものまで幅広く存在するため、細胞内には未知の区画が多く存在するとも考えられる。細胞内で液-液相分離が関与している例として、遺伝子の発現制御 (Larson *et al.* 2017) やストレス応答 (Riback *et al.* 2017)、濃縮による反応の効率化 (Strulson *et al.* 2012) などが報告されている。植物細胞ではピレノイドも液-液相分離によって維持される PMLO として扱われるようになっており (Cuevas-Velazquez & Dinneny 2018)、ピレノイドは細胞内の区画からもう一步進んで、細胞小器官 (葉緑体) 内での区分け (相分離) の例と言える。

ピレノイドの形態

ピレノイドはリブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (Rubisco) を主成分とするタンパク質の集合体で、葉緑体の内部に存在する (Kerby & Evans 1978, Lacoste-Royal & Fibbs 1987, Kuchitsu *et al.* 1988, Morita *et al.* 1997)。微分干渉顕微鏡であれば、葉緑体内の明確な顆粒として容易に識別できる場合が多い。透過型電子

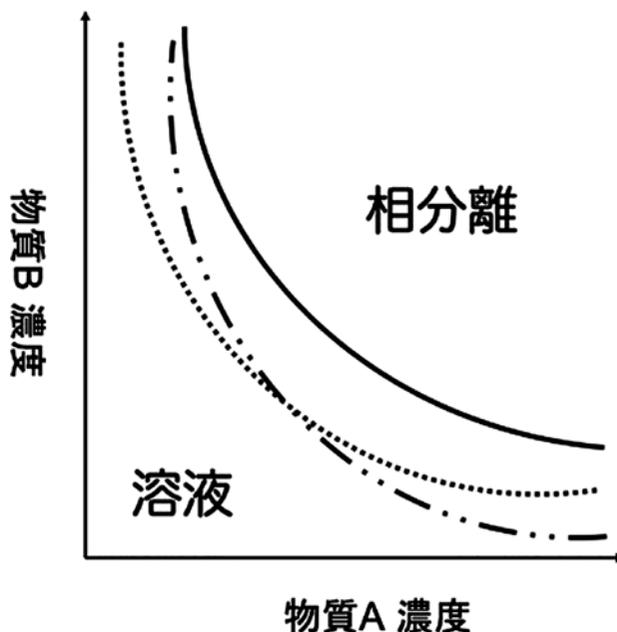


図 1. 高分子である物質 A と物質 B が共存する溶液での液-液相分離の相図。実線は各濃度に応じた共存カーブを示し、上の領域では相分離、下の領域では均質な溶液の状態となる。濃度だけでなく、相互作用の強さや温度、pH などにより、共存カーブが 2 種類の破線のように変化する。

顕微鏡で観察すると、一部の生物種ではデンプン粒によって区別されるものの、多くの場合は葉緑体ストロマとピレノイドの境界を示す明確な構造はなく、ストロマと異なる電子密度を有し、チラコイド膜が全く存在しないか極端に少なくなる区域として認識できる(図2)。ピレノイドマトリックスに関しては、これまでに結晶性が主張されている種(Holdsworth 1968)と非結晶性が主張される種(Herman & Sweeney 1976)がある。ピレノイド内部に膜構造が観察される種も多く、葉緑体包膜が貫入するタイプや(図2a)チラコイド膜の一部から連続する膜がピレノイドマトリックスを横断するタイプ(図2b)などが報告されている(Goodenough 1970, Herman & Sweeney 1976, Tanaka *et al.* 2007, Bedoshvili *et al.* 2009)。ピレノイドの形態は種によって様々で、褐藻類では葉緑体から突き出るタイプ(突出型)や、葉緑体の中央部に位置するタイプ(埋没型)、葉緑体の端に形成して複数が集まるタイプ(集合型)など

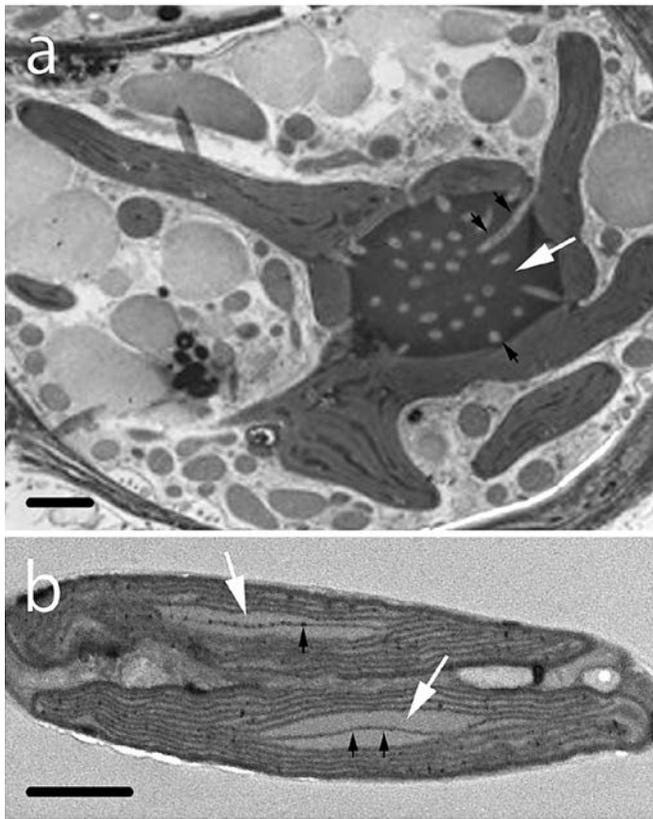


図2. 埋没型ピレノイド。a: 褐藻 *Splachnidium rugosum* の葉緑体とピレノイド。葉緑体の中央に巨大なピレノイド(白矢印)が位置し、その周辺からチラコイド膜を内在させた葉緑体部分が星状に広がる。ピレノイドの内部にはチューブ状の膜構造(黒矢印)が見られるが、これは葉緑体包膜が貫入して形成される(Tanaka *et al.* 2007)。b: 珪藻 *Phaeodactylum tricorutum* の葉緑体とピレノイド。二つに等分割された娘葉緑体の中央の一つのピレノイド(白矢印)が存在する。ピレノイドの中央を横断する膜はチラコイド膜の一部(黒矢印)。スケールは1 μm 。

が報告されている(Nagasato & Motomura 2002, Tanaka *et al.* 2007)。しかし、ピレノイド研究に多く用いられている緑藻クラミドモナス *Chlamydomonas reinhardtii* や珪藻 *Phaeodactylum tricorutum* を含む微細藻類は埋没型ピレノイドであることが多く、埋没型を中心にピレノイドの機能研究が進められている。

ピレノイドの機能

ピレノイドは維管束植物での報告例が無い一方で、一部のコケ類と多くの藻類で報告されており、真核生物全体を見渡しても多様な分類群に存在する。このことはピレノイドが水圏での光合成にとって重要な機能を持つ可能性を示唆するが、同属内でもピレノイドを持つ種と持たない種がある点が他の細胞小器官とは大きく異なる(Hori 1971, Morita *et al.* 1998)。

水圏での光合成とピレノイドを結びつけるのが無機炭素濃縮機構(Carbon Concentrating Mechanism; CCM)である。水中での二酸化炭素の拡散速度は空气中に比べて非常に遅い。さらに二酸化炭素は水と反応して重炭酸イオンや炭酸イオンとなり、これらをまとめて無機炭素と呼ぶ。無機炭素はそれぞれの形でpH依存的な平衡状態を保つが、炭素固定を行うRubiscoは二酸化炭素のみを基質にする。水圏で光合成を行う微細藻類のRubiscoは陸上植物のそれに比べて二酸化炭素に対する親和性が低く(福澤ら 2012)、さらにRubiscoのオキシゲナーゼ活性を抑えてカルボキシラーゼ活性を促進するためにはRubisco周辺の二酸化炭素濃度を高める必要がある。そのため多くの微細藻類では、能動的に無機炭素を細胞内に取り込み、二酸化炭素としてRubiscoへ供給する仕組み(無機炭素濃縮機構)を発達させたと考えられている。緑藻クラミドモナスでは、低CO₂環境下でエネルギー依存的な無機炭素プールの形成が報告され(Badger *et al.* 1980)、Rubiscoの大部分がピレノイドに局在し、ピレノイドが発達する様子(Lacoste-Royal & Fibbs 1987, Kuchitsu *et al.* 1988, Morita *et al.* 1997)が確認されるなど、ピレノイドが無機炭素濃縮機構の中心的な役割を担う可能性が強く示唆されるようになった(Kuchitsu *et al.* 1991, Ramazanov *et al.* 1994, Badger *et al.* 1998)。さらに高CO₂環境下でしか生育できないCO₂要求性の変異株が単離されると、低CO₂誘導性遺伝子の同定やCO₂要求性変異株と野生型株の遺伝子発現解析などが行われ、無機炭素濃縮機構関連遺伝子が推定された(Miura *et al.* 2004, Yamano *et al.* 2008)。無機炭素濃縮機構関連遺伝子には転写調節因子のほか、炭酸脱水素酵素や無機炭素輸送体、デンプン合成酵素などが含まれており、それらの局在から無機炭素濃縮機構のモデルが提唱されている(福澤ら 2012)。

クラミドモナスで提唱されているモデルでは、細胞膜や葉緑体包膜に局在する無機炭素輸送体から運ばれた無機炭素が、ピレノイド周縁部に局在する炭酸脱水素酵素で二酸化炭素へと変換されて、ピレノイドに局在するRubiscoへ運ばれ

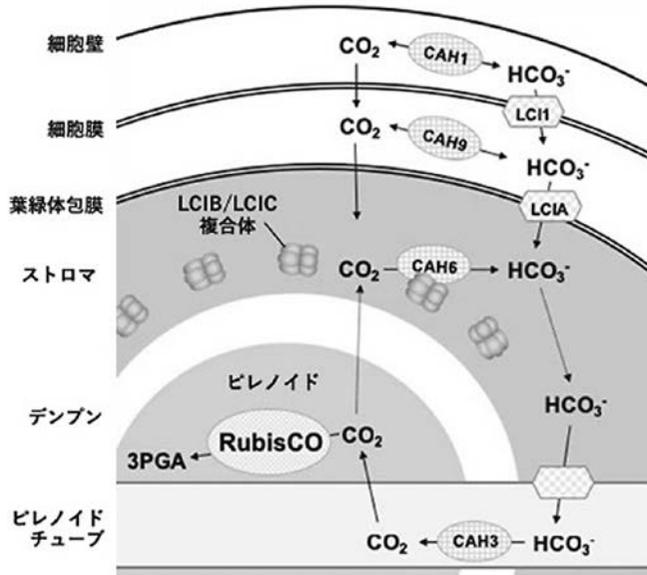


図3. クラミドモナスにおける無機炭素の流れの模式図。CAHは脱水素酵素，LCIは低CO₂誘導性因子を示す。ピレノイドから漏れ出した膜透過性の高いCO₂がピレノイド周辺に局在するCAH6によって膜透過性の低いHCO₃⁻へと変換される。(福澤ら(2012)の図を参考に作成)

る。二酸化炭素は生体膜の透過性が高いことから、逃げ出した二酸化炭素を捕獲して重炭酸イオンに戻すための酵素も存在する(図3)。このように現在ではピレノイドは炭酸濃縮機構の中心的な役割を担う細胞小器官であると考えられている。

ピレノイドの分裂と新生

ピレノイドを有する藻類は葉緑体分裂に先駆けてピレノイドを二分する種と、細胞分裂中はピレノイドが消失する種があるとされていたが(Griffiths 1970)、ピレノイドが新たに形成される様子もいくつかの種で確認されている。このようなピレノイドの分裂と新生様式の多様性は褐藻類でも報告されており、*Scytothamnus australis* では二分するピレノイドが報告されているほか(Tanaka *et al.* 2007)、カヤモノリ *Scytosiphon lomentaria* では、既存のピレノイドとは別の部位に新しくピレノイドが発達する様子が観察されている(Nagasato & Motomura 2002)。同様のピレノイド新生は緑藻や渦鞭毛藻類でも報告されており、ストロマの一部に電子密度の高い物質が集積し、チラコイド膜を押しやるように発達する様子が確認できる(Hoffman 1968, Herman & Sweeney 1976)。しかしこれらの新生過程の観察は全て電子顕微鏡による固定細胞の事例であり、生細胞での連続的な観察が求められていた。

2016年にMackinderらによって、Rubiscoと同様に低CO₂環境でピレノイドに集積するタンパク質 Essential

Pyrenoid Component 1 (EPYC1) がクラミドモナスで単離された。このEPYC1は無機炭素濃縮機構に必須であるだけでなく、Rubiscoのピレノイドへの集積にも不可欠な因子であることが報告されている(Mackinder *et al.* 2016)。複数のRubiscoホロ酵素がこのEPYC1と結合できることが示唆されたものの、ピレノイド内でのRubiscoの充填構造については不明であった。翌年には同じグループから、このEPYC1とRubisco小サブユニット1(RBCS1)を用いた生細胞での詳細なピレノイド観察が報告されている(Freeman Rosenzweig *et al.* 2017)。以下、この論文の内容を中心に紹介する。

ピレノイド複製は分裂と新生を併用する

前述の通り、生細胞でのピレノイド新生はこれまでに観察されていなかったため、ピレノイドの複製は種によって新生か分裂かのどちらか一方であるように漠然と考えられていた。しかしピレノイド局在タンパク質であるEPYC1とRBCS1の遺伝子に蛍光タンパク質(Venus)遺伝子をつなげて発現させた生細胞を観察してみると、EPYC1シグナルは大多数の細胞が分裂によって母細胞のピレノイドの一部を受け継ぐか(67%)又は全て受け継ぐことを示した(16%)が、少数ではあるが点状のピレノイド顆粒のみを受け継ぐ細胞(7%)又はピレノイドを全く引き継がない(9%)細胞も確認された。この割合はRBCS1シグナルでも同様であった(Figure 2 in Freeman Rosenzweig *et al.* 2017)。また点状のピレノイド顆粒しか存在しない場合や全くピレノイド成分が検出されない場合でも、新しいピレノイド顆粒の出現やピレノイド顆粒同士の融合が繰り返されることでピレノイドが新生される様子が観察されている。

ピレノイド分裂中のRBCS1シグナルを1分ごとに連続観察した結果は、分裂や新生の過程で示されるピレノイドの流動性を明らかにしている。例えば、ピレノイドが分裂する際には、ダンベル状に引っ張られ、娘ピレノイド間にブリッジ構造が見られた後、すぐに球形のピレノイドに戻る様子が観察された。さらに複数の点状に局在するピレノイド顆粒については、小さいものが縮小し、大きいものが成長する様子が確認され、まさしく液体ゾルなどの微小な粒子が分散している形において見られるオストヴァルト熟成^{注1}と呼ばれる現象を示した。このような複製過程における分裂と新生の併用は、アメリカツメガエルの核小体でも報告されており(Brangwynne *et al.* 2011)、ピレノイドが液体である可能性を示唆している(Freeman Rosenzweig *et al.* 2017)。

ピレノイドマトリックスの構造と流動性

分子レベルの細胞内環境を三次元で可視化できる *In situ* Cryo-ET (Cryo-Electron Tomography; Asano *et al.* 2016) を用いて、Rubisco周辺のホロ酵素濃度を計算してピレノイド内のRubisco充填量を定量してみたところ、結晶構造が持つべき長距離秩序(long-range order)の特徴を欠いている

ことが分かった。*In situ* Cryo-ETでは各Rubisco分子をピンポイントで位置決定することが可能であるため、この実測値とRubiscoが結晶構造を有すると仮定したシミュレーション結果を比較したところ、ピレノイドでのRubiscoのアレンジメントが六方最密充填構造とも結晶化したRubiscoの構造とも異なることが判明した。また、ピレノイドマトリックスのRubisco局所密度(local density)は液体分子の相互作用の単純なモデルの動径分布関数に一致したことから、ピレノイドマトリックス中で見られるRubiscoの動径分布は、液体の場合によく類似すると言える。ホロ酵素が適切な間隔でRubisco同士を連結し、ネットワーク構造を形成している可能性も示唆された (Figure 4 in Freeman Rosenzweig *et al.* 2017)。

次にピレノイドマトリックスの流動性を確かめるために、FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching 光褪色後蛍光回復法)を用いた検証が行われた。レーザーでピレノイドの半分の領域に局在する蛍光分子を褪色させると、死細胞では変化が見られないのに対し、生細胞では褪色部分が回復する様子が確認された (Figure 5 in Freeman Rosenzweig *et al.* 2017)。分子量の異なるEPYC1とRBCS1では回復に要する時間に差があったものの、両者とも生細胞でのみ褪色部分での蛍光の回復が見られたため、クラミドモナスのピレノイドマトリックスが液体のような挙動を示すことが明らかとなった。さらに生細胞でのみ流動性が維持されていることから、前述の核小体と同様にエネルギー依存的な流動性の確保が関与していると考えられる (Brangwynne *et al.* 2011)。細胞分裂期を通したEPYC1とRBCS1の観察と同時に蛍光輝度測定を行なったところ、葉緑体とピレノイドの分裂が完了する直前に、ピレノイドに局在するEPYC1量とRBCS1量が減少し、それらの葉緑体ストロマへの局在が増加した。しかし葉緑体とピレノイドの分裂が完了する頃には、再びピレノイドへの局在が増加してストロマの局在が減少していた (Figure 6 in Freeman Rosenzweig *et al.* 2017)。この現象は、ピレノイドの構成成分が細胞分裂の間にストロマでの拡散からピレノイドでの相分離へ移行している可能性を示唆しており、集積する液相の時期と可溶化して拡散する時期との間を移行する現象は、核小体など他の液状タンパク質でも見られる特徴的な性質である (Brangwynne *et al.* 2011)。

以上のような精密な実験結果から、やはりピレノイドが液-液相分離を伴う膜を持たない細胞小器官であることは疑いようのない事実であるように思われる。Freeman Rosenzweigら (2017)によるとピレノイドの最初の記載は1803年とされており、既に200年以上が経過している。そのピレノイドが現代になって液-液相分離という観点から見直され、その存在意義をやっと我々が理解し始めていることはとても興味深い。酵素 (Rubisco) と基質 (二酸化炭素) を同じ空間に閉じ込めて反応効率を向上させるというこのような仕組みは、細胞内や細胞小器官内の別の反応系でもおそ

らく多用されているだろう。液-液相分離によって形成された液滴が細胞内に無数の反応の場を提供し、それらが融合や消滅をすることで、細胞内の様々な反応系の共存を可能にしているのかもしれない。今後の研究の発展が非常に期待される分野である。

(注1) オストヴァルト熟成 (オストワルト成長): 粒子のサイズによる粒子表面のエネルギー差により、小さな粒子が溶解して大きな粒子に沈着する現象で、粒子全体の体積は変化せず、粒子の数が減少する。

引用文献

- Asano, S., Engel, B. D. & Baumeister, W. 2016. *In situ* cryo-electron tomography: A post-reductionist approach to structural biology. *J. Mol. Biol.* 428: 332-343.
- Badger, M. R., Kaplan, A. & Berry J. A. 1980. Internal inorganic carbon pool of *Chlamydomonas reinhardtii*: Evidence for a carbon dioxide-concentrating mechanism. *Plant Physiol.* 66: 407-413.
- Badger, M. R., Andrews, T. J., Whitney, S. M., Ludwig, M., Yellowlees, D. C., Leggat, W. & Price, C. D. 1998. The diversity and coevolution of Rubisco, plastids, pyrenoids, and chloroplast-based CO₂-concentrating mechanisms in algae. *Can. J. Bot.* 76: 1052-1071.
- Bedoshvili, Y. D., Popkova, T. P. & Likhoshway, Y. D. 2009. Chloroplast structure of diatoms of different classes. *Cell Tissue Biol.* 3: 297-310
- Brangwynne, C. P., Mitchison, T. J. & Hyman, A. A. 2011. Active liquid-like behavior of nucleoli determines their size and shape in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108: 4334-4339.
- Cuevas-Velazquez, C. L. & Dinnyen, J. R. 2018. Organization out of disorder: liquid-liquid phase separation in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 45: 68-74.
- Freeman Rosenzweig, E. S., Xu, B., Kuhn Cuellar, L. *et al.* 2017. The eukaryotic CO₂-concentrating organelle is liquid-like and exhibits dynamic reorganization. *Cell* 171: 148-162.
- 福澤秀哉・山野隆志・梶川昌孝 2012. 緑藻クラミドモナスにおける無機炭素濃縮機構と脂質代謝. *光合成研究* 22: 174-184.
- Goodenough, U. W. 1970. Chloroplast division and pyrenoid formation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Phycol.* 6: 1-6.
- Griffiths, D. J. 1970. The pyrenoid. *Bot. Rev.* 36: 29-58.
- Herman, E. M. & Sweeney, B. M. 1976. *Cachonina illdefina* sp. nov. (Dinophyceae): Chloroplast tubules and degeneration of the pyrenoid. *J. Phycol.* 12: 198-205.
- Hoffman, L. R. 1968. Observations on the fine structure of *Oedogonium*. V. Evidence for the de novo formation of pyrenoids in zoospores of *Oe. cardiacum*. *J. Phycol.* 4: 212-218.
- Holdsworth, R. H. 1968. The presence of a crystalline matrix in pyrenoids of the diatom, *Achnanthes brevipes*. *J. Cell Biol.* 37: 831-837.
- Hori, T. 1971. Survey of pyrenoid distribution in brown algae. *Bot. Mag. Tokyo* 84: 231-242.
- Keating, C. D. 2012. Aqueous phase separation as a possible route to compartmentalization of biological molecules. *Acc. Chem. Res.* 45: 2114-2124.
- Kerby, N. W. & Evans, L. V. 1978. Isolation and partial characterization of pyrenoids from the brown alga *Pilayella littoralis* (L.) Kjellm. *Planta* 142: 91-95.
- Kuchitsu, K., Tsuzuki, M. & Miyachi, S. 1988. Characterization of the pyrenoid isolated from unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: Particulate form of Rubisco protein. *Protoplasma* 144:

- 17–24.
- Kuchitsu, K., Tsuzuki, M. and Miyachi, S. 1991. Polypeptide composition and enzyme activities of the pyrenoid and its regulation by CO₂ concentration in unicellular green algae. *Can. J. Bot.* 69: 1062–1069.
- Lacoste-Royal, G. & Fibbs, S. 1987. Immunocytochemical localization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in the pyrenoid and thylakoid region of the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 83: 602–606
- Larson, A. G., Elnatan, D., Keenen, M. K. et al. 2017. Liquid droplet formation by HP1 α suggests a role for phase separation in heterochromatin. *Nature* 547: 236–253.
- Mackinder, L. C. M., Meyer, M. T., Mettler-Altmann, T. et al. 2016. A repeat protein links Rubisco to form the eukaryotic carbon-concentrating organelle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113: 5958–5963.
- Miura, K., Yamano, T., Yoshioka, S. et al. 2004. Expression profiling-based identification of CO₂-responsive genes regulated by CCM1 controlling a carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 135: 1595–1607.
- Morita, E., Abe, T., Tsuzuki, M. et al. 1998. Presence of the CO₂-concentrating mechanism in some species of the pyrenoid-less free-living algal genus *Chloromonas* (Volvocales, Chlorophyta). *Planta* 204: 269–276.
- Morita, E., Kuroiwa, K., Kuroiwa, T. & Nozaki, H. 1997. High localization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in the pyrenoids of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta), as revealed by cryofixation and immunogold electron microscopy. *J. Phycol.* 33: 68–72.
- Nagasato, C. & Motomura, T. 2002. New pyrenoid formation in the brown alga, *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonales, Phaeophyceae). *J. Phycol.* 38: 800–806.
- Ramazanov, Z., Rawat, M., Henk, M. C., Mason, C. B., Matthews, S. W. & Moroney, J. V. 1994. The induction of the CO₂-concentrating mechanism is correlated with the formation of the starch sheath around the pyrenoid of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 195: 210–216.
- Riback, J. A., Katanski, C. D., Kear-Scott, J. L., Pilipenko, E. V., Rojek, A. E., Sosnick, T. R. & Drummond, D. A. 2017. Stress-triggered phase separation is an adaptive, evolutionarily tuned response. *Cell* 168: 1028–1040.
- Strulson, C. A., Molden, R. C., Keating, C. D. & Bevilacqua, P. C. 2012. RNA catalysis through compartmentalization. *Nat. Chem.* 4: 941–946.
- Tanaka, A., Nagasato, C., Uwai, S., Motomura, T. & Kawai, H. 2007. Re-examination of ultrastructures of the stellate chloroplast organization in brown algae: Structure and development of pyrenoids. *Phycol. Res.* 55: 203–213.
- Uversky, V. N. 2017. Intrinsically disordered proteins in overcrowded milieu: Membrane-less organelles, phase separation, and intrinsic disorder. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 44:18–33.
- Yamano, T., Miura, K. & Fukuzawa, H. 2008. Expression analysis of genes associated with the induction of the carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 147: 340–354.

(琉球大学)