

「海洋性珪藻類の生産性を支える無機炭素輸送機構の解明」

関西学院大学理工学部生命科学科 松田 祐介

1 研究の背景と目的

近年、人工衛星によるクロロフィルのリモートセンシングと大規模な海洋調査により、海洋において珪藻類が、地球全体の一次生産（すなわち、独立栄養生物（光合成生物）による無機炭素からの有機物生産）の約 20%を受け持つことが証明された。この結果を受け、羽状目および中心目の代表的な海洋性珪藻として、それぞれ *Phaeodactylum tricornutum* および *Thalassiosira pseudonana* のゲノム配列が決定された。同時にこれらの珪藻細胞に外来遺伝子を導入したり、内在遺伝子の発現を特異的に抑える技術も進みつつある。これらは、珪藻の分子レベルでの研究や、代謝や細胞機能についてのシステム論的な情報解析を可能とするものである。また、珪藻細胞は油脂を多量に蓄えることでも知られ、その乾物量当たりの熱量は、石炭に匹敵する。バイオ燃料ソースとしても有望な細胞である。珪藻類の無機炭素獲得の仕組みは、この生物による一次生産の原動力であり、海水に溶ける様々な溶存無機炭素（Dissolved-inorganic carbon: DIC）の有効利用が生態学的にも有利であることが指摘されている。これまで、生理学的レベルで海水から取り込まれる無機炭素種の同定やその取り込み機構（CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism: CCM）の解析がなされている。しかし、これを担う分子は未同定である。この分子として、細胞膜の HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>2</sub> 透過性を制御する分子、4重に重層した二次共生藻葉緑体膜の無機炭素透過性を制御する分子、無機炭素を葉緑体まで送り届ける過程に与る炭酸脱水酵素（Carbonic anhydrase: CA）C<sub>4</sub>経路に関わるような有機酸代謝酵素、葉緑体内で無機炭素を捕集するタンパク質、などが考えられる。申請者はこれまでに、海洋性珪藻における CCM を生理学的なレベルで定量的に評価してきた。また、海洋性珪藻類の CA 酵素分子について、細胞内局在、活性調節、および環境変動に対する発現制御を分子レベルで解析してきた。

海洋性珪藻類の一次生産効率を維持・制御する分子機構は未解明である。このため、変動環境下におけるこの動態予測も細胞レベルからの根拠が不足している。同時に、この生産能力を利用する応用研究にも基礎知見・技術が不足している。海洋性珪藻が無機炭素を細胞内に取り込み、効果的に葉緑体に送り込む系は珪藻の効果的な生産力を担保する最初の重要なステップである。本研究では、海洋性珪藻類の無機炭素取り込みと蓄積を担う分子とその機能を同定し、これらの分子をコードする遺伝子の発現動態から、海洋性珪藻類の無機炭素獲得機構をモデル化することを目的とする。

2 研究方法・研究内容

**研究実施計画：**本研究は海洋性珪藻類のモデル細胞とされる羽状目 *P. tricornutum* および中心目 *T. pseudonana* を用い、無機炭素輸送に関わると考えられるタンパクの機能同定、葉緑体内および周辺部に局在する CA、C<sub>4</sub>関連酵素の機能解明、これらタンパク質の CO<sub>2</sub> (pH)、温度、鉄濃度に対する応答の定量的解析、を行った。より海洋性珪藻の CO<sub>2</sub> 獲得メカニズムであ

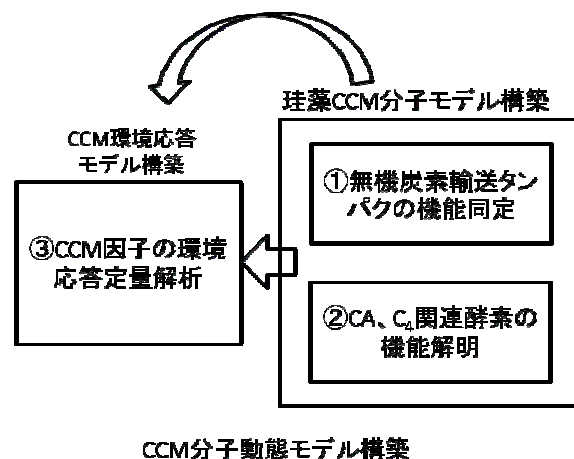


図 1

る CCM の分子モデルを構築した。さらに、よりこの環境応答モデル構築を目指した。プロジェクトの概要を図 1 に示す。

#### 研究方法：

##### 無機炭素輸送に関わると考えられるタンパクの機能同定

候補遺伝子のクローニング：これまでに重炭酸イオン ( $\text{HCO}_3^-$ ) 輸送体或いはチャンネルと考えられるタンパク質は、哺乳類やバクテリアなどでいくつかの報告があり、海洋性珪藻類のゲノムにもこれらに似た配列が存在する。これらは solute carrier (SLC) タンパク質ファミリーと呼ばれる。候補 SLC の中から  $\text{CO}_2$  濃度へ発現応答するタイプのものを優先的に選択し、2 種の珪藻 cDNA ライブラリの中からクローニングした。また、 $\text{CO}_2$  の膜透過性を制御すると考えられるタンパク質として、水チャンネルとして知られるアクアポーリンおよびヒト赤血球の Rh 因子に似たタンパク質を候補として、珪藻 cDNA ライブラリよりクローニングした。

局在解析用 DNA の作製：得られた無機炭素輸送体/チャンネル候補遺伝子を形質転換用ベクターに組み込んだ。この際、蛍光標識として緑色蛍光タンパク質遺伝子 (*gfp*) をこれら候補遺伝子の下流につなげた。

珪藻細胞への導入：作製した標識遺伝子を両珪藻類の細胞に導入した。この時、局在解析だけでなく、その後の機能解析を視野に入れて、候補遺伝子本来の発現制御とは違った発現制御を可能にするプロモーター配列の制御下に置いた。

輸送体/チャンネル候補タンパク質の細胞内局在解析：GFP 標識した DIC 輸送体或いはチャンネルタンパク質遺伝子を珪藻内で発現させた。抗生物質耐性によって選抜後、GFP を発現している細胞を選抜し、GFP の細胞内における所在を蛍光顕微鏡観察した。 $\text{CO}_2$  応答性のない候補遺伝子についても同様の手法で細胞内局在を順次決定した。

輸送体/チャンネル候補タンパク質の機能解析：通常、GFP を融合しているタンパク質はその機能を失わない場合が多いため、輸送体/チャンネルタンパク質の細胞内局在解析に作製した形質転換珪藻をそれらタンパク質の機能解析にも用いた。これらタンパク質は高発現が期待できる鉄応答性プロモーターやフコキサンチンクロロフィル *a/c* 結合タンパク質遺伝子 (*fcp*) プロモーターの制御下に発現させた。通常、高  $\text{CO}_2$  で生育した細胞の CCM は大幅に抑制され非常に活性が低くなるため、高  $\text{CO}_2$  細胞で候補遺伝子を定常的に高発現させることにより、その機能を確認できる。具体的には光合成の DIC に対する親和性、および細胞が培養液から DIC を吸収する速度を定量することで測定した。

##### 葉緑体内および周辺部に局在する $\text{C}_4$ 関連酵素の機能解明

$\text{C}_4$  および  $\text{C}_4$  有機酸代謝関連酵素の局在解析：申請者はすでに、*P. tricornutum* のこれらタンパク質ほとんどの局在決定を終え、*T. pseudonana* の一部も局在解析を終えている。このため、解析がまだ終了していないいくつかの酵素について解析を行った。

$\text{C}_4$  関連酵素の機能解析：一部の珪藻類では  $\text{C}_4$  有機酸代謝が CCM の一部として機能していることが示唆されている。このため、 $\text{C}_4$  有機酸代謝系の初発反応を行う PEP carboxylase (PEPC)、脱炭酸酵素である PEP カルボキシキナーゼ (PEPCK) および NAD-Malic enzyme についても、局在および発現動態を解析した。得られた結果より、DIC 獲得への貢献度を評価した。

##### これらタンパク質の $\text{CO}_2$ (pH)、温度、鉄濃度に対する応答の定量的解析

定量的 PCR (qPCR) による CCM 構成遺伝子の環境応答定量：局在と機能が明らかとなった遺伝子から順次、qPCR 法による転写応答の精密な分析を行う。細胞を現在の環境を模倣した  $\text{CO}_2$  (pH) および鉄濃度 (390 ppm, pH8.1, 10 nM Fe) に順化し、これをさらに 100 年後に予測される値 (1000 ppm 以上, pH7.6, 10 nM Fe) およびに順化し、両方の細胞から

それぞれ mRNA を抽出した。これを逆転写後 qPCR を行った。

### 3 研究成果

#### 無機炭素輸送に関わると考えられるタンパクの機能同定

**候補遺伝子のクローニング:** 2種の珪藻ゲノムを精査し、 $\text{HCO}_3^-$  輸送体と考えられるタンパク質の遺伝子を検索した。その結果、哺乳類 SLC ファミリー遺伝子が 10 個見つかった (PtSLC)。これらの  $\text{CO}_2$  濃度へ発現応答を調べた結果、PtSLC4-1, 2, 4 の 3 つが応答性を示した (図 2 A, B)。他生物の SLC4 とこれら珪藻の  $\text{CO}_2$  応答型 PtSLC4 の類縁関係を調べた結果、 $\text{CO}_2$  応答性のものを含めた PtSLC4-1 ~ 5 がヒト SLC4 に近縁であることが分かった。一方、他の珪藻 SLC4 の類縁性ははっきりとしなかった (図 2 C)。これらを珪藻 cDNA ライブラリの中からクローニングした。

**輸送体/チャンネル候補タンパク質の細胞内局在解析:**

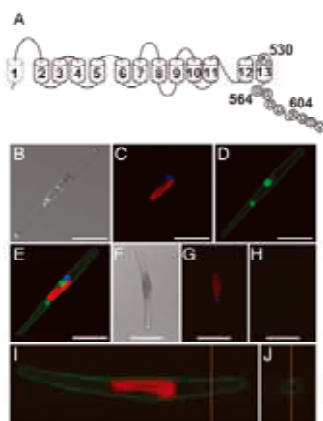


図3 珪藻のPtSLC4-2の膜トポロジー (A) および細胞内局在 (B-J, I, J)。B-E, PtSLC4-2の局在 (緑); F-H, PtSLC4-2:GFPを発現させていないコントロール細胞

PtSLC4:GFP 融合タンパク質を定常的に発現している細胞 (SLC4G) を用いて、PtSLC4-2 の機能を確認した。珪藻細胞は高  $\text{CO}_2$  で生育すると CCM 活性を大幅に失い、細胞が DIC を取り込む能力も非常に弱くなる。このため、SLC4G 細胞では、高  $\text{CO}_2$  で育てることにより、人為的に高発現させた PtSLC4-2 タンパク質の活性が確認出来ると考えた。高  $\text{CO}_2$  で生育した野生型細胞が  $100 \mu\text{M}$  の  $\text{NaHCO}_3$  を添加しても DIC の取り込みを示さないのに対し、低  $\text{CO}_2$  で生育した野生型では迅速な DIC 取り込みが観察された (図 4 A 丸印)。一方、SLC4G 株では、高  $\text{CO}_2$  生育株でもかなり速い DIC 取り込みを示した (図 4 三角印)。また、全ての細胞を用いて、無機炭素を取り込んだ状態から、暗下で無機炭素が漏れ出す速度を定量した結果、ほぼ同等の値を示した。これらの値および酸素電極で測

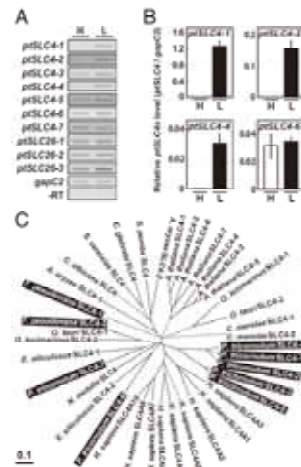


図2 珪藻の $\text{HCO}_3^-$  輸送体候補遺伝子A. 全候補の発現量比較 (H, 5% $\text{CO}_2$  L, 大気レベル  $\text{CO}_2$ ); B.  $\text{CO}_2$  応答性因子の定量PCR結果; C. SLC4遺伝子群の類縁関係

PtSLC4-2 遺伝子 (*ptslc4-2*) を形質転換用ベクターに組み込み、緑色蛍光タンパク質遺伝子 (*gfp*) と融合した。これを *P. tricornutum* の細胞に導入した。このタンパク質のアミノ酸配列はヒト SLC4 型輸送体とよく似ており、珪藻における近縁の PtSLC4 も同様に似ていた。配列から構造を予測した結果、PtSLC4-2 は 13 回膜貫通型の膜タンパク質で、C 末端側に CA 結合領域の可能性があるドメインを有していた (図 3 A)。GFP 標識による局在解析の結果、PtSLC4-2 は細胞の辺縁部に局在した (図 3 B-E, I, J)。その構造から膜タンパク質であることは明確と考えられるため、このタンパク質は細胞膜局在型タンパク質であると結論付けた。

**輸送体/チャンネル候補タンパク質の機能解析:**

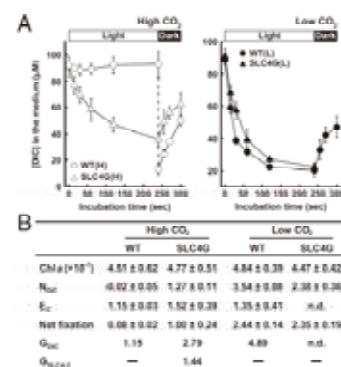


図4 PtSLC4-2高発現株の無機炭素取り込み活性 (A) および細胞膜無機炭素流量の算出 (B) High $\text{CO}_2$ , 5% $\text{CO}_2$  で生育した細胞; Low $\text{CO}_2$ , 大気レベル  $\text{CO}_2$  で生育した細胞; Chla, クロロフィルa含量; N<sub>DIC</sub>, ネットDIC取り込み速度; E<sub>c</sub>,  $\text{CO}_2$  漏れ出し速度; Net fixation, ネット光合成量; G<sub>DIC</sub>, 総DIC取り込み速度; G<sub>SLC4-2</sub>, SLC4-2による総DIC取り込み速度

定した光合成速度から、細胞膜を隔てた無機炭素流量について数学的モデルを構築して推定した結果(図4 B) 高CO<sub>2</sub>で生育した SLC4G 細胞において PtSLC4-2 は総 DIC 取り込み速度の約 50%を担っていることが分かった(図4 B)。

**PtSLC4-2のキャラクタリゼーション:** 哺乳類SLC阻害剤として知られる4,4'-Diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS)を用いて、この薬剤のPtSLC4-2および珪藻のCCMへの影響を調べた。高CO<sub>2</sub>生育野生型細胞ではDIDSは細胞のDICへの親和性に影響を与えなかったが、低CO<sub>2</sub>細胞ではDIDSの影響は顕著であった(図5 A)。また、高CO<sub>2</sub>生育SLC4G細胞では低CO<sub>2</sub>生育細胞と同様の親和性阻害が見られた(図5 A)。SLC4G細胞において、DIDSによる親和性阻害効果は低CO<sub>2</sub>生育細胞の方が高かったことから(図5 A)、PtSLC4-2だけでなく、その他のSLC型輸送体が低CO<sub>2</sub>生育細胞で働いていることが強く示唆された。これは、図5Bの、DIDSによるネットDIC取り込み阻害実験の結果からも強く支持された。9.5, 8.2, および7.5の3つの異なるpH環境で野生型およびSLC4G細胞のネットDIC取り込みを測定したところ、pH8.2で両者の活性は対照的な値となった(図5 C)。pH8.2ではほとんどのDICはHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>として存在するため、この結果はPtSLC4-2がHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>を特異的に輸送するタンパク質であることが示された。すなわち、珪藻類は哺乳類などで体内のpHやイオンバランスの維持に働いているタンパク質と起源が共通しているタンパク質を使って、海水から直接HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>を取り込んで光合成していることが初めて示された。

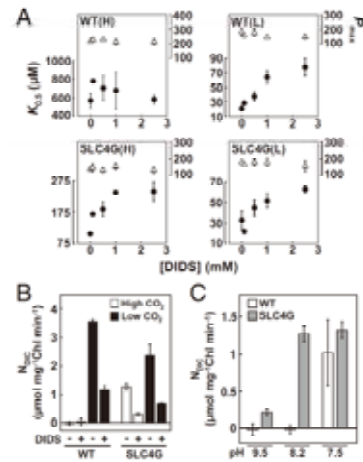


図5 SLC阻害剤DIDSおよびpHの影響 A, 光合成パラメーターへのDIDSの影響; B, ネットDIC取り込み速度へのDIDSの影響; C, 同じくpHの影響。

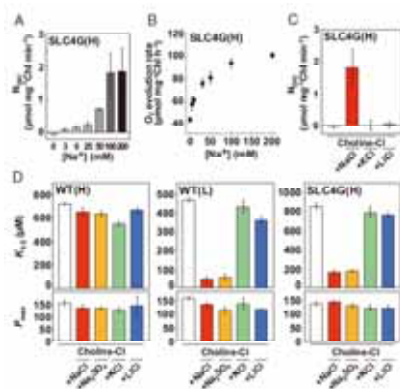


図6 ナトリウムイオン依存性 A, ネットDIC取り込みに対するNaイオン濃度の影響; B, 光合成親和性に対するNaイオン濃度の影響; C, Naイオンの特異性; D, 光合成パラメーターに対するNaイオンの特異的影響。

次に、PtSLC4-2および珪藻のHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>取り込みにおけるエフェクターイオンについて調べた。その結果、PtSLC4-2によるHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>の取り込みおよび高親和性光合成ともに100 mM以上のNaイオン存在下で十分な機能を発現していることが示された(図6 A, B)。また、PtSLC4-2の機能や高親和性光合成はNaイオン以外のLiやKイオンでは同様の動きを示さず(図6 C, D)、比較的高濃度のNaイオンに極めて特異性が高いことが分かった。

### 葉緑体内および周辺部に局在するCA、C<sub>4</sub>関連酵素の機能解明

**ピレノイド局在型 CA (PtCA1, 2) の機能解析:** *P. tricornutum* の PtCA1 および 2 はすでに低 CO<sub>2</sub> 濃度環境で転写誘導される CO<sub>2</sub> 応答性のピレノイド型 CA であることが分かっている。この 2 つの CA はその局在と転写制御から CCM で溜め込んだ CO<sub>2</sub> を固定化酵素 RubisCO に渡す、重要な役割を果たす酵素と考えられている。しかしながらその詳細な機能は分かっていない。高等植物とは対照的に、珪藻のカルビン回路は酸化還元制御をほとんど受けていないことがこれまでの研究で示唆されている。しかしなが

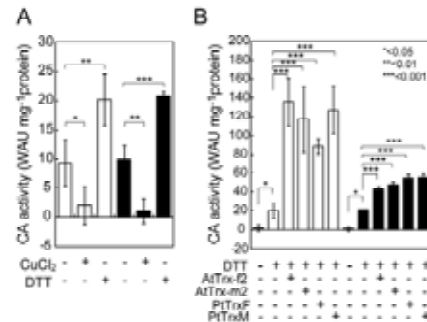


図7 PtCA1,2の酸化還元制御 A, PtCA1, 2のCuCl<sub>2</sub>およびDTTによる直接酸化および還元による活性変化; B, 酸化PtCA1,2のTrx存在下における還元再活性化。

ら、珪藻葉緑体にはいくつかのチオレドキシソ (Trx) が局在しており、カルビン回路以外の代謝を調節していることが示唆されている。PtCA1 および 2 を組換タンパクとして大腸菌で生産し、この活性を酸化或いは還元環境下で測定した。その結果、これら酵素は酸化環境で不活性化し、還元環境下で活性することが分かった (図 7, A)。さらに酸化体 PtCA を還元する場合、シロイヌナズナや *P. tricornutum* の Trx を添加すると、DTT 単独の場合に比してはるかに効果的に PtCA の還元的再活性化が可能であった (図 7 B)。この酸化還元調節の分子機構を探った結果、分子内に存在する 2 つのシステインが酸化環境下で活性部位を跨ぐように分子内ジスルフィド結合を形成することにより、不活性化されることが分かった。

葉緑体内で不活性化にかかわると考えられる因子を特定する為に、CuCl<sub>2</sub> に代えて過酸化水素、酸化型アスコルビン酸、酸化型グルタチオン、および分子酸素など葉緑体内因子である酸化分子による PtCA の不活性化を試みた。その結果、分子酸素のみが効果的に PtCA を不活性化するが、その他の因子にほとんど不活性化能は認められなかった (図 8 A)。分子酸素濃度は大気レベル

(21%) では不十分であり、大気レ

ベルの 2 倍強の 49%酸素では極めて効果的であった。

このことから、活発に光合成をおこなっている最中の葉緑体において、PtCA は常に光化学系 II で生成される大気レベル以上の分子酸素によって不活性化を受け、直線的電子伝達の結果、光化学系 I の還元力によってフェレドキシソ-Trx 系の補助で再活性化するバランスの上に機能を果たしていると考えられた (図 9)。また、珪藻葉緑体内では、Trx の機能は炭酸固定系ではなく、むしろ炭酸固定系に CO<sub>2</sub> を供給するシステムが酸化還元制御を受けており、これが光化学系のエネルギー分配状態を炭酸固定系に伝えるための媒介系として機能していることが強く示唆された。

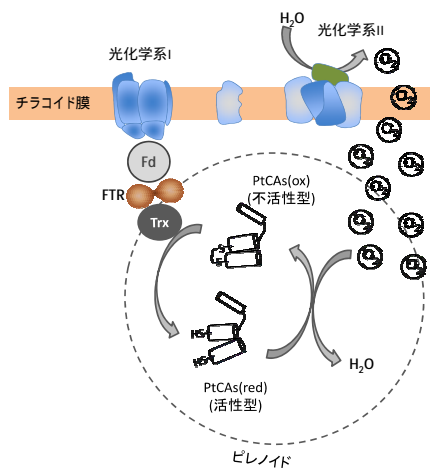


図9. PtCA1及び2の酸化還元調節モデル  
葉緑体内で予想されるPtCA1,2酸化還元制御モデル。  
Fd: フェレドキシソ、FTR: フェレドキシソ-チオレドキシソ  
レダクターゼ、Trx: チオレドキシソ

その他 CA および C<sub>4</sub>有機酸代謝関連酵素の局在解析: *P. tricornutum* ではこの他に 8 種の CA が存在し、このうち 5 つの 型 CA はすべて葉緑体 4 重包膜系、3 つの 型 CA はすべてミトコンドリアに局在することが分かった。*T. pseudonana* の CA については、13 の候補のうち、CA1, 10 は細胞質、CA3, 6 は細胞膜、CA7, 9, 13 はミトコンドリア局在であることが判明した。CA2, 4, 5, 8, 11, 12 の局在はまだ分かっておらず葉緑体系の CA は未確認である。

C<sub>4</sub>関連酵素の機能解析: 一部の珪藻類では C<sub>4</sub>有機酸代謝が CCM の一部として機能していることが示唆されているため、C<sub>4</sub>有機酸代謝系の初発反応を行う PEP carboxylase (PEPC) 脱炭酸酵素である PEP カルボキシキナーゼ (PEPCK) および NAD-Malic enzyme (ME) についても、局在および発現動態を解析した。*P. tricornutum* では 2 つの PEPC がミトコンドリアおよび葉緑体包膜系、PEPCK がミトコンドリア、2 つの ME が細胞質に局在し、C<sub>4</sub>代謝系の存在を指示する結果とならなかった。同様に、*T. pseudonana* では 2 つの PEPC はミト

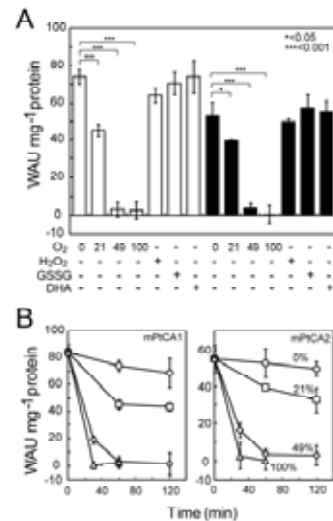


図8 PtCAの酸化的不活性化因子  
A, 葉緑体酸化因子によるPtCAの不活性化; B,  
分子酸素によるPtCAの不活性化効率.

コンドリアと葉緑体包膜系に、PEPCK はミトコンドリアに、また ME は 1 つで細胞質に存在し、*P. tricornutum* とほぼ同様の結果となった。これらのデータは、これら 2 種の海洋性珪藻では少なくとも典型的な  $C_4$  型光合成が働いていないことを強く示唆している。

#### これらタンパク質の $CO_2$ (pH)、温度、鉄濃度に対する応答の定量的解析

定量的 PCR (qPCR) による CCM 構成遺伝子の環境応答定量 : CA および  $C_4$  系酵素遺伝子の  $CO_2$  および光に対する応答性を調べた。*P. tricornutum* のピレノイド局在型 CA である PtCA1, 2 は低  $CO_2$  濃度で生育した場合に特異的に発現したが、その他の CA は  $CO_2$  濃度に関係なく定常的に発現していた。このうち、葉緑体包膜系に局在する CA-VII は光に強く応答し暗下では全く発現しないことが分かった。一方、*T. pseudonana* の CA は現在 CA-1, 3, 7 の発現動態が調査されている。これらはすべて低  $CO_2$  誘導型であることが分かった。

$C_4$  代謝系の酵素遺伝子についても同様の発現解析を行った。その結果、*P. tricornutum* の 2 つの PEPCK 遺伝子はいずれも光照射の低  $CO_2$  環境下で転写が活性化していることが分かった。*P. tricornutum* において、PEPCK や 2 つの ME 遺伝子の転写は光や  $CO_2$  に対する応答を示さなかった。一方、*T. pseudonana* において 2 つの PEPCK はいずれも光と  $CO_2$  に応答しなかった。また脱炭酸酵素 PEPCK および ME は光環境下では発現が抑えられており、暗環境下で発現していた。

研究期間中に温度および鉄に対する発現応答は解析できなかった。しかし、本研究で得られた結果より、珪藻類は現大気環境では  $HCO_3^-$  を直接海水から取り込み、体内に蓄積し、葉緑体内に運んだ後、ピレノイドに局在する CA によって  $CO_2$  を生成して RubisCO に供給することが分かった。また、 $CO_2$  濃度が高くなると、上に述べた取り込みとピレノイドでの脱水反応が抑制され、拡散による  $CO_2$  の供給にシフトすることがわかった。

#### 4 生活や産業への貢献および波及効果

上記により、海洋で植物プランクトンが活発に光合成をおこなうための詳しい仕組みの一つが初めて明らかとなった。これは海洋の食物連鎖や物質循環を支える仕組み解明の重要な一歩である。さらにこの研究から、ヒトの体内で pH やイオン濃度などを一定に保つために働いているタンパク質と同じ起源を持つタンパク質が、海洋や大気中の炭素をはじめとする物質循環バランスの維持にも働いていることが明らかとなった。一方、海洋性珪藻類は EPA などの油脂生産も盛んに行い、これは最終的には魚を通じてヒトの健康にも役立っている。珪藻類は旺盛な油脂生産能力を持ち、食料と競合しない次世代のバイオ燃料源としても期待されている。珪藻の油脂は光合成によって生産されており、その原料は海に溶けている  $CO_2$  や  $HCO_3^-$  である。今回の成果は珪藻類の油脂生産の増強などにも応用し得る発見である。