

関西学院大学 研究成果報告

2023年 3月 13日

関西学院大学 学長殿

所属：理工学研究科
職名：博士研究員
氏名：松井 啓晃

以下のとおり、報告いたします。

研究制度	<input type="checkbox"/> 特別研究期間 <input type="checkbox"/> 自由研究期間 <input type="checkbox"/> 大学共同研究 <input type="checkbox"/> 個人特別研究費 <input checked="" type="checkbox"/> 博士研究員 ※国際共同研究交通費補助については別様式にて作成してください。
研究課題	光合成オルガネラ間コミュニケーションの動的分子基盤 海洋ケイ藻の光合成機能解析
研究実施場所	生命環境学部 生物科学科 松田研究室
研究期間	2022年 4月 1日 ~ 2023年 3月 31日 (12ヶ月)

◆ 研究成果概要 (2,500字程度)

上記研究課題に即して実施したことを具体的に記述してください。

海洋性珪藻は地球全体の炭素固定の約1/5を占める光合成能を有することから、地球大気環境の形成に重要と考えられている。その繁栄を支えている要因の一つに葉緑体内に特徴的にみられるピレノイドが挙げられる。ピレノイドには炭素固定の中心的役割を担うルビスコが密に存在するオルガネラとして知られているがその他の因子はほとんど同定されておらず、機能は不明瞭である。本研究では新奇ケイ藻ピレノイド因子の機能解明を行うことで、ケイ藻葉緑体におけるオルガネラ相互作用を解明することを目的とした。先行研究において、海洋性ケイ藻 *Phaeodactylum tricornutum* および *Thalassiosira pseudonana* 由来の新奇ピレノイド因子をゲノム編集することで機能欠損体が生産された。本年では、これらの機能欠損体を用いた生理学的解析を行った。生育解析の結果、大気圧レベルCO₂濃度では著しく生育速度が低下し、通常条件の数百倍量の無機炭素源を添加することで、生育が可能であることを明らかとした。また、欠損体の光合成活性を測定したところ、野生型ケイ藻と比べ顕著に無機炭素に対する親和性が低下した。1つの標的因子を欠損させただけで超高濃度CO₂要求性を示したことから、標的因子がケイ藻の光合成にとって重要であることが強く示唆された。また、新たなピレノイド因子の探索として、ビオチン-アビジン相互作用を用いたピレノイド近接タンパク質の取得を試みた。その結果、ビオチン発現株から得られたタンパク質を電気泳動することで、有意なバンドを検出することに成功した。今後、得られたバンドからタンパク質を抽出し、質量分析を行うことで新奇ピレノイドタンパク質の発見が期待される。

自発的な研究活動として、ゲノム編集技術を用いたケイ藻および大型褐藻への応用技術の開発に取り組んだ。藻類の生育に影響を与える要因として、糖や油脂の代謝系が大きく関与していることから、それらの代謝関連遺伝子をゲノム編集することで工業的に有用な二次代謝産物の生産を制御できると予想した。ゲノム編集候補として、糖合成酵素、脂質合成酵素、およびそれら分解酵素を標的とし、それぞれに対しガイドRNA (gRNA) を設計、*in vitro*での切断活性を判別した。その結果、核酸を切断するCas9エンドヌクレアーゼによって、それぞれの標的部位を切断することに成功した。一方、非特異的な切断を抑えるために、変異型Cas9であるCas9ニッカーゼを用いた切断アッセイでは、切断効率が低くなった。この原因は、ニッカーゼが2本鎖DNAを切断するには、2つの特異的gRNAがそれぞれ確実にDNAの片方1本鎖にニックを生じさせる必要があるためと考えられる。大型褐藻類にCas9/gRNA複合体を導入する場合、Cas9タイプの切断効率と特異性を鑑みたうえで、ゲノム編集を行う必要がある。同様に、ケイ藻においては窒素代謝を標的とすることで生育や二次代謝に影響するか検証を試みた。既にゲノム編集候補株は取得できているが、現在のところ生育に影響は見られず、さらなる検証が必要である。

別の自発的な研究活動として、科研費研究スタート支援を利用し、海洋性ケイ藻の環境変化におけるCO₂輸送メカニズムの解析に取り組んだ。ケイ藻の生体膜は細胞膜に加えて葉緑体を4重の膜が覆った、計5重もの膜が存在している。これらの生体膜をどのように透過して、無機炭素を輸送しているかは完全には明らかとされていない。そこで、新奇輸送体タンパク質の機能解析のため、それらの遺伝子を野生型ケイ藻細胞に高発現するコンストラクトを作製し、分子銃を用いた形質転換を行った。その結果、数百以上の抗生物質耐性株を取得することに成功した。しかしながら、それら1次選抜によって得られた株をGFP標識による蛍光選抜を行ったところ、微小な蛍光しか検出することができなかった。この原因として、無機炭素輸送が生体内で厳密に制御されており、生体恒常性を維持する機構によって発現抑制されている可能性が考えられる。同時に、ゲノム編集を用いた機能欠損体の作製も試みており、数クローンの候補株が得られているが、生育への影響は見られていない。標的領域の変更および複数ガイドRNAを用いた高効率なゲノム編集系を利用する必要があると考えられる。また、他の無機炭素輸送体候補であったSLCタンパク質については、定量的発現解析および重炭酸イオンの輸送速度測定を行った結果、低CO₂環境において重炭酸イオンを能動的に輸送することを明らかとした。本研究成果は、査読付き論文としてJournal of Experimental Botanyに掲載された。

さらに、公益財団法人鉄鋼環境基金の研究助成を受け、ケイ藻の鉄応答を利用した応用技術開発に取り組んだ。海洋において鉄は植物プランクトンの生育に必須だが、海洋に生息する生物が利用可能な鉄を特異的に検出することは困難である。本研究では、ケイ藻が鉄欠乏時に特異的に発現する遺伝子を用いてバイオレポーター化し、環境鉄濃度を判別することが可能と考えた。まず、現存技術である無機分析法を用いた鉄濃度測定と比較するため、様々な組成の人工海水培地を作製し、原子吸光光度計を用いて鉄濃度を測定した。その結果、海水に含まれる様々な無機塩類によってノイズが大きくなることが分かった。次年度では、サンプル処理法や原子吸光光度計の条件を検討し、ケイ藻鉄バイオレポーターと比較検討を行う予定である。

[発表論文]

Nawaly, H., Matsui, H., Tsuji, Y., Iwayama, K., Ohashi, H., Nakajima, K., Matsuda, Y. (2023) Multiple plasma membrane SLC4s contribute to external HCO₃⁻ acquisition during CO₂ starvation in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J Exp Bot*, 74(1), 296-307.

以上

提出期限：研究期間終了後2ヶ月以内

※個人特別研究費：研究費支給年度終了後2ヶ月以内 博士研究員：期間終了まで

提出先：研究推進社会連携機構（NUC）

※特別研究期間、自由研究期間の報告は所属長、博士研究員は研究科委員長を経て提出してください。

◆研究成果概要は、大学ホームページにて公開します。研究遂行上大学ホームページでの公開に支障がある場合は研究推進社会連携機構までご連絡ください。