

関西学院大学 研究成果報告

2021年 3月 16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	海洋性珪藻の光合成機能解析
研究実施場所	理工学部4号館4階 松田研究室
研究期間	2021年 2月 1日 ~ 2021年 3月 31日 (2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。

海洋性珪藻は地球上の炭素固定の約20%を担う光独立栄養生物である。その進化的成り立ちは陸上植物、緑藻、および紅藻と異なり、二次共生によって光合成能を獲得したことで、独自の分子輸送メカニズムを有する。海水中のCO₂濃度は光合成を行うには不十分な一方で、重炭酸イオンは豊富に存在する。このような条件下で、海洋性珪藻は重炭酸イオンを積極的に取り込み、CO₂に変換・濃縮することで効率よく光合成を行う。このCO₂濃縮機構には無機炭素輸送体、炭酸脱水酵素、およびピレノイドが関与する。ピレノイドは炭素固定の中核を担うタンパク質、ルビスコの集合体であることが報告されているが、その機能や構造には謎が多い。これまで、ピレノイドは一般的なオルガネラに存在する生体膜が存在しない液液相分離型構造であるとされ、細胞分裂の際に一旦消失した構造体が、分裂後に再形成されることが観察されている。しかし、この珪藻ピレノイドの再構成に関与する因子は明らかになっておらず、珪藻が海洋で光合成を維持する重要な要素の一つと予想される。光合成の仕組みを理解する上で早急な機能解明が求められている。また、海洋性珪藻は特定の環境条件にて油脂を蓄積することが知られており、バイオ燃料の原料として注目されている。バイオ燃料の生産技術向上のためには、油脂やアルコール、またはそれらの原料物質を合成する生物をいかに低コストで大量に培養するかという問題を解決しなければならない。近年発見された油脂生産性海洋性珪藻、ソラリス株およびルナリス株が日本の気候条件下において、年間を通じて、他の藻

類よりも油脂生産量が比較的安定することが分かった。しかしながら、未だ培養事例が少なく、実用段階に至るまでの課題は多い。

本研究の目的①は、炭酸固定反応に関与する新規構造因子を特定し、液液相分離型オルガネラ（ピレノイド）界面の分子機構を解明することで、光合成と細胞内オルガネラの分子相互作用を解明する。目的②は油脂蓄積藻の生育条件と光合成関連因子との相互作用を調べ、油脂蓄積藻の培養法についての知見を得る。主に実施した作業内容について、以下に示す。

① ピレノイド関連因子の過剰発現体およびノックダウン体を用いた生理機能解析。本研究については、退任助教より来年度への引継ぎ業務を行った。

② 油脂蓄積藻の細胞維持、培養条件の検討、および光合成活性測定を行った。

始めに、屋内の実験室レベルで油脂生産珪藻を効率よく、良い状態で培養する方法の検討を行った。これまでに取り組まれた実験内容を把握するため、共同研究先の文献を入手、有益な情報の探索を行った。珪藻の培養条件として、水温、光強度、栄養塩濃度、およびCO₂濃度は細胞の増殖速度に著しく影響する。屋外培養法について記載された参考文献より、当株は4~35℃において生存が可能であること、光条件は弱光30μmol m⁻²s⁻¹~強光140μmol m⁻²s⁻¹にて培養可能、窒素源が不足することで油脂生産が促進する一方で炭素固定量は減少することが示された。以上の知見を踏まえた上で、研究室内で珪藻株を安定して培養する条件を決定した。2月より、本研究室で海洋性珪藻の培養に使用するF/2人工海水の寒天培地、室温20℃、恒常光40μmol m⁻²s⁻¹で培養を行った結果、約1ヶ月の維持が可能であった。これは現在、分子生物学実験に用いられるモデル珪藻とほぼ同等であり、細胞の維持にかかる手間およびコストは比較的易しいと判断する。さらに、液体培地を用いた小スケール（100mL容）培養を行った結果、室温20℃、恒常光40μmol m⁻²s⁻¹照射、通常組成F/2人工海水を用いることで、ソラリス株は7×10⁵/mL、ルナリス株は5×10⁵/mLまで増殖した。しかしながら、人工海水中の細胞は凝集し、珪藻独特の褐色葉緑体の脱色が観察された。この状態は珪藻にとって何かしらの環境ストレスを受けている可能性が高く、原因として海洋性珪藻の種によって要求する栄養分が異なる可能性が考えられた。事実、当研究室で使用する2種のモデル珪藻において、培養に適する塩濃度や、ビタミン量、および微量元素（Se）の要求性が異なることが報告されている。そこで3月からは、ソラリス株およびルナリス株において、培養条件を変更することでより状態良く培養可能な最適条件の決定を試みた。塩濃度を3/4に減らして培養を行った結果、1週間の培養で、ソラリス株は3×10⁶/mL、ルナリス株は1.5×10⁶/mLまで増殖した。細胞の凝集も前回と比べて少なかったことから、細胞の状態が改善されたと考えられた。ただし、過去の知見では、ソラリス株は10×10⁶/mLまで培養が可能であることが報告されているので、他の培養に影響を与える条件の検討が必要である。加えて、細胞状態を定量的に比較する指標として、光合成速度を測定した。光合成速度は細胞の状態に依存しているため、迅速に大量増殖しつつ、大気中の二酸化炭素を活発に回収可能な条件が望ましい。測定の結果、ソラリス株では、最大光合成速度（P_{max}）が高CO₂環境下において、低CO₂環境下と比べて約1.3倍に増加した。一方、ルナリス株では、高CO₂時、低CO₂時ともにP_{max}に顕著な差は生じなかった。加えて、光合成の無機炭素に対する親和性を比較したところ、低CO₂時に培地中の無機炭素濃度が低くても、活発な酸素発生を生じた。以上より、今回用いた油脂蓄積珪藻種はどちらもCO₂濃縮機構を有していることが判明した。今後さらに培養条件を増やし、水温、pH、光強度、および栄養塩濃度などを変更して細胞培養を行うことで、油脂蓄積藻の光合成機能を評価する必要がある。

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。

報告用紙②

- ◆ 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。