

## 関西学院大学 研究成果報告

2025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<br><input type="checkbox"/> 大学共同研究 <input type="checkbox"/> 個人特別研究費<br><input checked="" type="checkbox"/> 博士研究員<br>※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態分子基盤                                                                                                                                                                                           |
| 研究実施場所 | 松田研究室                                                                                                                                                                                                               |
| 研究期間   | 2024年 4月 1日 ～ 2025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。

海洋性珪藻は地球上の炭素固定の約20%を担う、重要な一次生産者であるが、その効率よい光合成の仕組みは完全には明らかとなっていない。これまでに、重炭酸輸送体によって能動的に無機炭素を取りこみ、葉緑体のピレノイドと呼ばれるルビスコ凝集体に高濃度のCO<sub>2</sub>を供給（CO<sub>2</sub>濃縮機構、CCM）することで、CO<sub>2</sub>が不足しがちな海水中でも高効率な光合成を可能としていることが分かってきている。しかし、細胞膜上の重炭酸イオン輸送体以外の輸送機構やそれらを制御するシグナル伝達機構については未解明な点が多い。そこで、本研究ではCCMに関与する新奇因子を探索することによって、珪藻の葉緑体、ピレノイド、またはミトコンドリア等、オルガネラ間における相互作用を解明することを目的とした。

まず、新奇無機炭素輸送体候補遺伝子を蛍光タンパク質GFPで標識した融合タンパク質を珪藻株に発現させ、その表現形を野生株と比較した。酸素電極を用いて酸素発生速度を測定した結果、無機炭素に対する親和性や最大光合成速度に変化はなかった。クロロフィル蛍光測定の結果、海洋性珪藻の1種*Phaeodactylum tricornutum*において非光化学的消光が上昇したが、別の珪藻種である*Thalassiosira pseudonana*では有意な差はなかった。この結果は、標的遺伝子が種によって異なる生理学特性を有している可能性を示唆している。

更に標的遺伝子の機能を解析するため、ゲノム編集による機能欠損株を作製した。抗生物質添加培地において、耐性コロニーを形成した候補株からゲノムを抽出し、PCRによって編集領域を増幅した結果、野生型遺伝子と比較してバンドサイズが変化した。増幅した遺伝子領域をシーケンス解析したところ、数十塩基の欠損または挿入が確認できたが、野生株や異なる遺伝子型の細胞が混在していたため、細胞懸濁液を限界希釈し、寒天プレートに再塗布した。その結果、単一株のみのコロニーを取得し、機能欠損株を作出することに成功した。これらの株を高CO<sub>2</sub>環境で培養し、酸素電極を用いた光合成パラメーターを算出したところ、野生株と比較して無機炭素親和性が低下した。以上の結果から、標的遺伝子が珪藻において無機炭素輸送に関与する可能性が示唆された。

続いて、CO<sub>2</sub>応答シグナル伝達機構の解明のため、環境CO<sub>2</sub>に応答して発現が変化する因子に相互作用するタンパク質を探索した。先行研究において、高CO<sub>2</sub>環境でCO<sub>2</sub>濃縮機構を抑制する因子が同定されていたが、その因子単独で機能するとは考えられず、新たな因子の発見が期待される。まず、標的因子と近位依存的に存在するタンパク質をビオチン化させるコンストラクトを作製し、珪藻に導入した。ビオチン-アビジン相互作用によってサンプルを精製し質量分析を行ったところ、脂肪酸合成やヒストン修飾因子などが取得できた。この結果は、これらのタンパク質が珪藻においてCO<sub>2</sub>応答に関与している可能性を示唆している。

ゲノム編集による褐藻の形質改良において、不稔化を目的とした有性生殖因子候補をゲノムデータベースから探索した。候補として、体細胞分裂から減数分裂に移行する際にリン酸化されることで下流因子を制御するタンパク質、相同組み換えを引き起こすトポイソメラーゼ、減数分裂時のDNA修復に必須なリコンビナーゼ、姉妹染色文体の接着に必要なコヒーシタンパク質、および微小管形成因子を選抜した。その中から、比較的遺伝子重複の少ない2遺伝子に絞り込んだ。褐藻でゲノム編集を行う前準備として、これらの遺伝子の珪藻における機能を評価した。Cas9ニッカーゼコンストラクトを作製し、珪藻に導入したところ、数十株の抗生物質耐性コロニーを取得することができた。ゲノムPCRによって編集領域を増幅し、電気泳動によってバンド変化を調べた結果、野生型遺伝子と比較してバンドサイズが変化していた。そこで増幅した遺伝子領域をシーケンス解析したところ、数重塩基の欠損および挿入が確認できた。しかし、野生株や異なる遺伝子型の細胞が混在していたため、細胞懸濁液を限界希釈し、プレートに再塗布することで珪藻株の単一株化を行った。その結果、プレート上に単一株のみのコロニーを形成し、各遺伝子の機能欠損株を作出することに成功した。作出した機能欠損株を液体培養し、細胞濃度に依存する濁度を経時的に測定することで生育曲線を作成した。その結果、野生株と比較して生育に差がないことが分かった。この原因として、候補因子が体細胞分裂に影響しない可能性、重複因子による機能相補が生じている可能性、一部の変異体においては片側アレルの野生型遺伝子によって影響が見られなかった可能性が考えられた。現段階で、珪藻有性生殖の分子遺伝学的な判別が困難なため、候補遺伝子の有性生殖の関与を評価することは困難である。しかしながら、褐藻における相同因子を欠損させることで配偶子形成を抑制する可能性が期待される。

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。

◆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。