

関西学院大学 研究成果報告

2024年 3月 11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	☐ 特別研究期間 ☐ 自由研究期間 ☐ 大学共同研究 ☐ 個人特別研究費 ☒ 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
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	2023 年 4 月 1 日 ～ 2024 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。

海水はpH8付近の弱アルカリ環境のため、CO₂が溶け込んでも、即座に重炭酸イオンに変換されてしまうため、光合成を行うには劣悪な環境である。しかし海洋性珪藻はCO₂濃縮機構を獲得することで、海水中でも高効率な光合成を可能とした。現在、一部の珪藻にはsolute carrier protein 4 (SLC4)が重炭酸イオンを能動的に取り込み、葉緑体内でCO₂を濃縮する経路が明らかとなっている。一方で、細胞外炭酸脱水酵素(CA)を用いて、重炭酸イオンをCO₂に変換した後に、細胞内へ無機炭素を輸送する経路も報告されている。しかしながら、珪藻におけるCO₂の生体膜透過機構はほとんど解明されていない。また、炭素固定を触媒するルビスコを液液相分離構造で集積したタンパク質ボディ、ピレノイドは、その構成因子が不明なことから、珪藻の高効率な光合成の仕組みを解明する鍵として研究が進められている。本研究では、環境無機炭素を葉緑体内に輸送する経路の解明およびピレノイド構成因子の機能解析を目的とした。

先行研究より、珪藻ピレノイドの構成因子として重要と考えられるタンパク質、PyShellが発見された。そこで、2種の珪藻*Phaeodactylum tricornutum*および*Thalassiosira pseudonana*のピレノイド因子PyShell 遺伝子の発現レベルを解析した。定量的RT-PCRの結果、mRNAの蓄積量はCO₂濃度に依存しないことが分かった。このことから、CO₂濃縮が必要な低CO₂環境のみならず高CO₂環境においてもピレノイド構造の維持に必要な可能性が示唆された。実際に、PyShell機能欠損株を用いた光合成パラメーターを測定した結果、低CO₂環境における無機炭素親和性が低下したのみならず、高CO₂環境下においても親和性が低下した(下記発表論文1)。

続いて、無機炭素輸送体候補の1つと考えられていたSLC34を機能欠損したことで、珪藻のリン酸輸送が顕著に低下することを明らかとした。SLC34は既知の重炭酸イオン輸送体SLC4と同様にNaイオンに依存してリン酸輸送が制御されることが分かった。加えて、細胞外アルカリフォスファターゼを欠損することで、有機リン酸の輸送が抑制された。これらの研究結果は、今まで不明であった海洋での一次生産者によるリン酸取り込み機構の一端を発見したとして下記発表論文2に掲載された。

自発的な研究活動として、珪藻および大型褐藻のゲノム編集による有用形質の取得を試みた。褐藻のゲノム編集に向けて変異体の選抜に用いるマーカー遺伝子としてアデニンホスホリボシル転移酵素を標的としたCas9タンパク質によるゲノム編集を試みた。その結果、2-フルオロアデニンによる毒性耐性株を取得することに成功した。しかしながら、ゲノム配列を調べたところ、標的部位に変異は確認できなかった。再度、標的領域を変更する必要があると考えられる。珪藻においては、アンモニア輸送体候補遺伝子に対してゲノム編集を行った結果、高濃度の窒素源かつ炭素源を添加した培地上で候補株を取得することに成功した。今後、生育速度および光合成能にどのような影響が及ぼすか、詳細な生理解析を行う予定である。

公益財団法人、鉄鋼環境基金による研究助成を受けて、珪藻の鉄欠乏に応答する遺伝子を用いた応用技術開発に取り組んだ。鉄は植物プランクトンの生育に必須だが、海洋では鉄は酸化されることで沈殿しやすく、特に陸地から遠い海域では欠乏する可能性が高い。そこで、鉄を散布することでブルーカーボンを増加するプロジェクトが期待されているが、実際の海洋で生物利用可能な鉄を判別することは困難である。先行研究において、鉄が欠乏した条件で高発現する遺伝子とその制御を行う遺伝子領域を特定した。そこで、蛍光タンパク質をコードするGFP遺伝子と連結することで、海水中の鉄濃度を検出して蛍光を発するバイオレポーター珪藻を構築し。本研究では、珪藻鉄バイオレポーターの感度を詳細に解析し、実際の海洋で利用可能にする上での測定法を検討した。まず、鉄の種類によって検出感度が異なるか調べた。II価鉄として FeSO_4 、III価鉄として FeCl_3 を用いて、それぞれ0.1 nM, 10 nM, 20 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM, 1 μM , および 12 μM に調整した人工海水において蛍光測定を行った。その結果、III価鉄よりII価鉄に対して、より低濃度での蛍光変化が生じた。これはII価鉄の利用度がIII価鉄より高いことを示唆している。また、高pHまたは強光でクロロフィル蛍光に対してGFP蛍光強度が上昇すること、低温または高温環境においてはクロロフィルが影響を受けた結果、GFP蛍光シグナルの相対値が減少した。以上から、海洋環境および測定環境に応じた条件設定が必要であることが分かった。実用化に向けて、天然海水、鉄キレート剤（クエン酸、EDTA）、または鉄スラグを用いて鉄バイオレポーターを試験した結果、沿岸付近の海水および高炉スラグ添加によりGFP蛍光が低下した。一方、鉄の溶解度を増加するキレート剤や鉄の残存量が多い製鋼スラグを添加しても鉄を除いた人工海水と同等のGFP蛍光であった。このことから、珪藻鉄バイオレポーターは珪藻が利用可能な鉄が含まれているかを判別するツールとして有用であると推測される。

[発表論文]

1. Shimakawa, G., Demulder, M., Flori, S., Kawamoto, A., Tsuji, Y., Nawaly, H., Tanaka, A., Tohda, R., Ota, T., Matsui, H., ... & Matsuda, Y. (2023). Diatom pyrenoids are encased in a protein shell that enables efficient CO_2 fixation. *bioRxiv*, 2023-10.
2. Matsui, H., Harada, H., Maeda, K., Sugiyama, T., Fukuchi, Y., Kimura, N., ... & Matsuda, Y. (2024). Coordinated phosphate uptake by extracellular alkaline phosphatase and solute carrier transporters in marine diatoms. *New Phytologist*, 241(3), 1210-1221.

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。