

2015年度 博士研究員研究成果報告書

氏名 (所属研究室) 中島 健介 (理工学研究科松田研究室)
研究課題 特殊生物の自己組織化能を利用した新規機能基材の開発
研究期間 2015年4月1日～2016年3月31日
研究成果概要

海洋性珪藻類は、地球上の全炭素固定の約 20%を担う重要な一次生産者である。現大気圧環境下における海水の溶存CO₂濃度は、約 10-15 μMであり、海水中のCO₂の拡散速度は、大気中と比較して 10⁴倍と非常に遅い。また、海水の高塩・高アルカリ環境下においては溶存無機炭素 (DIC) 種の形態は、直接的な光合成基質となるCO₂よりも圧倒的に重炭酸イオン (HCO₃⁻) が多いことから、海水中は極度のCO₂欠乏状態であり、海洋性珪藻類がCO₂を獲得しにくい環境であると言える。このような環境においては、海洋性珪藻類は、HCO₃⁻を積極的に取り込み、上記の高い一次生産量を達成している。しかしながら、海洋性珪藻類のHCO₃⁻獲得の詳細な分子機構は、未解明な部分が多い。これまでに、我々は、海洋性羽状目珪藻 *Phaeodactylum tricorutum* のゲノム上に、哺乳類のHCO₃⁻輸送体である solute carrier protein (SLC) 4 および SLC26 のホモログ因子が、少なくとも 10 因子存在し、そのうち、高CO₂ (1-5% CO₂) 環境下と比較して、低CO₂ (0.039% CO₂) 環境下で顕著に誘導される 3 遺伝子 (*ptSLC4-1*、*ptSLC4-2*、*ptSLC4-4*) がコードするタンパク質は、細胞膜上に局在し、主にNa⁺依存的にHCO₃⁻を輸送していることを明らかにした。一方で、珪藻類は、紅藻が真核従属栄養細胞に共生して誕生した二次共生生物であることから葉緑体は4重包膜を有しており、PtSLC4-1、PtSLC4-2、PtSLC4-4 によって取り込まれ、細胞内に蓄積したHCO₃⁻が、葉緑体に効率良く供給されるには、葉緑体4重包膜が大きな障壁となる。したがって、葉緑体4重包膜に局在するHCO₃⁻輸送体が重要な役割を担うことが強く示唆されるが、これを同定、機能解析した報告はない。そこで、本研究は、葉緑体4重包膜局在型HCO₃⁻輸送体の同定および機能解析を目的とした。

これまでに、SLC4 型HCO₃⁻輸送体候補因子であるPtSLC4-6 およびPtSLC4-7 が葉緑体4重包膜に局在していることを緑色蛍光タンパク質 (GFP) との融合タンパク質による細胞内局在解析より明らかにした。これらの株をPtSLC4-6 およびPtSLC4-7 過剰発現株として、酸素電極を用いた光合成パラメーターの決定を行ったが、野生型細胞と比較して顕著な差が見られなかった。この原因として、細胞膜上のHCO₃⁻輸送が律速状態にあることが考えられた。そこで、細胞膜局在型HCO₃⁻輸送体PtSLC4-2 とPtSLC4-7 を共過剰発現させるコンストラクトを作製し、野生型細胞を形質転換した。PtSLC4-2 およびPtSLC4-7 の直下にはGFPを連結させており、得られた形質転換体における各融合タンパク質の細胞内局在を観察した結果、細胞膜および葉緑体4重包膜にGFP蛍光が観察できたことから、PtSLC4-2 およびPtSLC4-7 の共過剰発現株 (PtSLC4-2G/PtSLC4-7G株) を得ることに成功した。また、PtSLC4-2 およびPtSLC4-7 の各発現は、定量的RT-PCRを用いて、転写レベルでも確認した。一方で、PtSLC4-2 およびPtSLC4-6 共発現株を得ることはできなかった。PtSLC4-2G/PtSLC4-7G株を用いて、酸素電極による光合成パラメーターの測定を行った結果、野生型細胞、PtSLC4-2 過剰発現株、PtSLC4-2G/PtSLC4-7G株の各最大酸素発生速度 (P_{max}) には顕著な差は認められなかった。しかしながら、 P_{max} の半分の速度を得るためのDIC濃度は、PtSLC4-2 過剰発現株よりも

PtSLC4-2G/PtSLC4-7G株で約40%減少していた。すなわち、PtSLC4-2G/PtSLC4-7G株においてDICに対する親和性が高いことがわかった。さらに、PtSLC4-2G/PtSLC4-7G株における無機炭素輸送活性の測定を行った結果、PtSLC4-2 過剰発現株と比較して、僅かに無機炭素輸送活性の上昇が認められた。次に、PtSLC4-7 の詳細な機能解析を行うために、PtSLC4-7 の全長cDNAにPtSLC4-2 の予測細胞膜移行シグナルを付加したコンストラクトを作製し、野生型細胞を形質転換し、PtSLC4-7 を強制的に珪藻細胞膜に局在させることによる無機炭素輸送活性の測定を試みた。現在、PtSLC4-7 が細胞膜に局在している可能性がある株の取得に至っており、今後、この株を用いた無機炭素輸送活性測定およびゲノム編集技術等を用いたPtSLC4-7 ノックアウト株の作出とそれを用いた生理学的解析を行うことによりPtSLC4-7 のHCO₃⁻輸送体としての機能解析が進むことが期待される。

最後に、珪藻細胞が取り込んだHCO₃⁻は、細胞内無機炭素流路調節において重要な役割を担う炭酸脱水酵素 (CA) によって、HCO₃⁻からCO₂に変換され、葉緑体で効率良く固定される。特に、葉緑体ピレノイド局在型CAであるPtCA1 は、環境CO₂濃度および細胞内cAMP濃度によって転写レベルで制御されており、PtCA1 プロモーター領域の詳細な解析からCO₂/cAMP response element (CCRE) がシスエレメントであることが明らかになっている。しかしながら、PtCA1 の光応答さらにはPtCA1 のパラログ因子であるPtCA2 の環境CO₂および光応答は不明であった。今回、*ptca1* および*ptca2* のプロモーター領域の詳細な解析から、CCREが両CAの光応答にも関与していることがわかった。また、内在*ptca1* および*ptca2* の発現は、光合成に必須な光波長によって誘導されること、さらに、光化学系Iのストロマ側における酸化還元レベルが限定的に関与していることを強く示唆する結果を得た。これらの成果は、下記に記載する論文として発表した。

<論文発表> (* : equal contribution)

Atsushi Tanaka*, Naoki Ohno*, Kensuke Nakajima*, Yusuke Matsuda (2016) Light and CO₂/cAMP signal cross talk on the promoter elements of chloroplastic β-carbonic anhydrase genes in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol* 170: 1105-1116